



UNIVERSITE de REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

ECOLE DOCTORALE SCIENCES TECHNOLOGIE SANTE

THESE

en vue de l'obtention du grade de
Docteur de l'Université de Reims Champagne-Ardenne
Discipline : Chimie spécialité Biochimie

soutenue le 11 décembre 2015

par

Charlotte BRUSA

Xylosides à aglycones aromatiques ou fonctionnalisés :
synthèse enzymatique ou chimio-enzymatique et évaluation de leurs
propriétés d'activation de la biosynthèse des glycosaminoglycanes

Directeurs de thèses
Richard PLANTIER-ROYON et Caroline RÉMOND

JURY

Mme Anne WADOUACHI, Professeur	UPJV, Amiens	Rapporteur
M. Michel DION, Professeur	Université de Nantes	Rapporteur, Président du jury
M. Sébastien FORT, Chargé de recherche	CERMAV, Grenoble	Examineur
M. Romain REYNAUD, Responsable R&D	Soliance, Pomacle	Invité
Mme Murielle MUZARD, Maître de conférences	URCA, Reims	Encadrante de thèse
Mme Caroline RÉMOND, Professeur	URCA, Reims	Directrice de thèse
M. Richard PLANTIER-ROYON, Professeur	URCA, Reims	Directeur de thèse

N° attribué par la bibliothèque

| | | R | E | I | | | | |

Remerciements

Je tiens à remercier Mme Anne Wadouachi et M. Michel Dion d'avoir accepté d'évaluer ce travail, ainsi que M. Sébastien Fort de faire partie de mon jury de thèse au titre d'examineur.

Je remercie la Région Champagne-Ardenne ainsi que le FEDER pour avoir financé ces trois ans de thèse.

Je remercie chaleureusement mes deux directeurs de thèse : Mme Caroline Rémond et M. Richard Plantier-Royon ainsi que Mme Murielle Muzard, mon encadrante pour m'avoir accompagnée tout au long de ce travail. Merci de votre gentillesse, d'avoir toujours été à l'écoute et de votre disponibilité.

Le projet XYLOCOS étant un projet pluridisciplinaire, je remercie toutes les personnes qui ont collaboré au bon déroulement de ce travail. Je remercie M. Yanusz Wegrowski, M. Stéphane Brézillon ainsi que Mme Aurore Chatron-Colliet pour leur collaboration. Je tenais à remercier M. Nicolas Belloy et M. Manuel Dauchez d'avoir accepté de débiter une étude de modélisation moléculaire. J'ai appris en votre compagnie et apprécié de réaliser ce travail. Je tenais également à remercier l'entreprise Soliance de son accueil au sein de leurs locaux ainsi que Carole Lambert et Romain Reynaud.

Merci à Harivony ainsi qu'à Béatrice pour m'avoir initiée à la biologie moléculaire et d'avoir été disponibles lorsque j'ai eu besoin d'un conseil avisé. Hari, merci aussi pour ces discussions animées en salle café. Béatrice, je te souhaite une belle retraite bien méritée.

Je remercie Nathalie pour son aide précieuse, ses conseils mais surtout pour sa bonne humeur mais aussi pour ses coups de gueules, ... Je ne sais pas qui est la plus râleuse de nous deux !!! ☺ Merci pour tout.

Je remercie toutes les personnes que j'ai pu rencontrer pendant ces trois ans à l'ICMR mais aussi à l'UMR FARE. Le fait d'être sur ces deux sites n'a pas toujours été facile et, malheureusement, trois ans après, je ne connais pas encore tout le monde !! Je remercie toutes les personnes avec qui j'ai passé un bon moment que ce soit depuis trois ans ou seulement depuis quelques mois.

Je remercie Pierre-Vincent et Loïc pour leur bonne humeur, leur discussion animée, les mercredis soirs occupés par un Mc do (Big Mac obligatoire) et une soirée jeux de société. Je les ai souvent « choqués », les films Marvel ne sont pas mes préférés et Avengers, les gars, je vous le redis : c'est nul !!! ☺ Je remercie également Brieuc, Simon et Ambre pour les nombreuses soirées jeux.

Je remercie Asma et son mari Héli de m'avoir accueilli lors de week-ends bien sympathiques. Je remercie Stéphanie et Eve, on a passé de bons moments au sport. Il faut que nous pensions à améliorer notre synchronisation bras-jambes pour le step car parfois ce n'était pas cela du tout !!! Et que dire du gainage... sans commentaire, hein, Stéphanie !! Je souligne le courage de Thomas, qui a passé son temps entouré de filles... Merci à Elise pour sa bonne humeur et sa moins bonne !!! On a bien rigolé. Merci également à Bérangère et Gaëlle.

Et enfin, je remercie mes parents qui ont toujours su être là durant mes études qui m'ont aidée à faire ce que je voulais. Je remercie également mon frère et ma sœur pour les repas organisés en famille lorsque je rentrais chez les « parents » et la nouvelle venue de la famille Léonie, née quasiment en même temps que cette thèse qui a égayé mes week-ends.

Raphaël, merci d'avoir été là avant mais surtout d'être encore là après cette thèse. Cela n'a pas toujours été facile ces allers-retours et ce manque au quotidien. Difficile d'apporter son soutien quand on est loin mais malgré cela, je me suis toujours senti soutenue. Que dire de plus que tu ne sais déjà. Merci !

Valorisation du travail

Articles :

BRUSA, C., OCHS, M., REMOND, C., MUZARD, M. and PLANTIER-ROYON, R., Chemoenzymatic synthesis of "click" xylosides and xylobiosides from lignocellulosic biomass. - *RSC Advances* - 2014, 4 (18), 9330-9338.

CHATRON-COLLIET A., BRUSA C., BERTIN-JUNG I., GULBERTI S., RAMALANJAONA N., FOURNEL-GIGLEUX S., BREZILLON S., MUZARD M., PLANTIER-ROYON R., REMOND C., WEGROWSKI Y. - "Click" xylosides as initiators of the biosynthesis of glycosaminoglycans: comparison of mono-xylosides vs xylobiosides – *Molecular Biosystems* – soumis pour publication

Revue :

BRUSA, C., OCHS, M., REMOND, C., MUZARD, M. and PLANTIER-ROYON, R., β -xylopyranosides: Synthesis and Applications. - *RSC Advances* – Accepté pour publication. DOI: 10.1039/c5ra14023d.

Poster :

BRUSA C., CHATRON-COLLIET A., MUZARD M., ROBERT A., BREZILLON S., BERTIN-JUNG I., GULBERTI S., RAMALANJAONA N., FOURNEL-GIGLEUX S., MUZARD M., PLANTIER-ROYON R., REMOND C., WEGROWSKI Y. - Click xylosides: from biomass to GAGs primers – International Symposium on Green Chemistry (ISGC 2015) – La Rochelle (3-7 Mai 2015).

Communication orale :

BRUSA C., CHATRON-COLLIET A., OCHS M., MUZARD M., BREZILLON S., WEGROWSKI Y., REMOND C., PLANTIER-ROYON R. - Synthèse chimio-enzymatique de « click » xylosides et xylobiosides à partir de la biomasse lignocellulosique et évaluation de leurs propriétés biologiques – 25^{èmes} Journées du Groupe Français des Glycosciences (GFG 2014) – Paris (12-15 Mai 2014).

Obtention du prix de la meilleure Communication Orale

Table des matières

Remerciements	i
Valorisation du travail.....	iii
Table des matières.....	iv
Abréviations	ix
Introduction générale	1
Chapitre I : Synthèse bibliographique.....	7
I. La biomasse lignocellulosique	8
I.1. La structure des lignocelluloses.....	8
I.1.1. La cellulose.....	9
I.1.2. Les hémicelluloses	9
a) Les xylanes	9
b) Les mannanes	11
c) Les D-xylo-D-glucanes.....	12
d) Les β -glucanes	12
I.1.3. Les lignines.....	13
I.2. La transformation de la biomasse lignocellulosique	14
I.2.1. La récalcitrance de la paroi végétale lignocellulosique	15
I.2.2. Les prétraitements de la biomasse lignocellulosique	16
a) Les prétraitements physico-chimiques	18
b) Les prétraitements biologiques.....	20
I.2.3. Hydrolyse enzymatique.....	20
II. Les glycoside hydrolases.....	22
II.1. Généralités	22
II.1.1. Classification	22
II.1.2. Modes d'action	23
II.1.3. Sous-sites catalytiques.....	26
II.2. Les hémicellulases.....	27
II.2.1. Les xylanases	28
II.2.2. Les β -xylosidases	29
II.2.3. Les α -L-arabinofuranosidases.....	29
II.2.3. Les α -glucuronidases.....	29
II.2.4. Les estérases	29

II.3. Les xylanases GH10 et GH11	30
II.3.1. Structures tridimensionnelles et sites actifs des xylanases GH10 et GH11.....	30
II.3.2. Différences de modes d'action hydrolytique.....	32
a) Spécificité de substrat	32
b) Solubilité du substrat	33
II.3.3. Différences de modes d'action en transglycosylation	34
III. Synthèse des β-xylopyranosides	35
III.1. Synthèse chimique des β-xylopyranosides.....	35
III.1.1. La glycosylation de Fischer	35
III.1.2. Synthèse à partir de xylose peracétylé.....	38
III.1.3. La réaction de Koenigs-Knorr	41
III.1.4. La méthode des trichloroacétimides (« la glycosylation de Schmidt »)	44
III.1.5. Autres méthodes.....	47
III.2. Synthèse enzymatique de β-xylopyranosides.....	48
III.2.1. Introduction.....	48
III.2.2. Synthèse par les β -xylosidases	50
III.2.3. Synthèse par les xylanases	53
IV. Applications	59
IV.1. Applications biologiques des xylosides.....	59
IV.1.1. β -xylopyranosides en tant qu'initiateurs de la synthèse de GAGs	59
a) Généralités	59
b) Effet anti-prolifératif	63
c) Activité anti-thrombotique	66
d) Effet anti-vieillessement.....	67
IV.1.2. β -xylopyranosides comme inhibiteurs d'enzymes.....	68
a) La tyrosinase	68
b) Autres enzymes.....	70
IV.2. Applications physico-chimiques	71
IV.2.1. Tensioactifs.....	71
a) Généralités	71
b) Synthèse et propriétés physico-chimiques	72
IV.2.2. Activités diverses.....	74
a) Les liquides ioniques	74
b) Glycodendrimères	75
Chapitre II : Matériels et méthodes.....	76
I. Les xylanases	77
I.1. La xylanase commerciale.....	77

I.2. Production de xylanases Tx-xyn10 et Tx-xyn11 recombinantes	77
I.2.1. Origine des xylanases Tx-xyn10 et Tx-xyn11 recombinantes	77
I.2.2. Méthodes de culture pour l'obtention des xylanases Tx-xyn10 et Tx-xyn11 recombinantes.....	78
a) Milieux de culture	78
b) Pré-cultures	79
c) Cultures.....	79
I.3. Production du mutant Tx-xyn11 W126A.....	79
I.3.1. Souches utilisées.....	79
I.3.2. Extraction et analyse de l'ADN à partir de la Tx-xyn11 recombinante.....	80
a) Extraction de l'ADN plasmidique	80
b) Analyse de l'ADN extrait	80
I.4.3. Obtention du mutant Tx-xyn11 pECXyl5 W126A.....	81
a) PCR.....	81
b) Mutagénèse dirigée.....	82
c) Transformation des cellules chimiquement compétentes.....	83
d) Séquençage et analyse bio-informatique des clones issus de la transformation dans XL1-Blue.....	83
I.5. Extraction et purification des xylanases.....	84
I.5.1. Extraction des xylanases recombinantes	84
I.5.2. Purification des xylanases	84
I.5.3. Electrophorèse SDS-page.....	85
I.6. Caractérisation des xylanases.....	85
I.6.1. Dosage de l'activité xylanase	85
I.6.2. Paramètres cinétiques de la xylanase Tx-xyn11 pECXyl5 et de son mutant W126A.....	86
III. Synthèse des xylosides par réaction de transglycosylation	87
III.1. Sources de xylanes	87
III.1.1. Xylanes commerciaux.....	87
III.1.2. Analyse de la composition en sucres.....	87
III.2. Accepteurs	87
III.3. Synthèse enzymatique et purification des produits de synthèse	88
III.3.1. Synthèse enzymatique	88
III.3.2. Purification des produits de synthèse	89
a) Purification de propargyl xyloside et xylobioside	89
b) Purification des aryl xylosides et xylobiosides	90
IV. Synthèse des « click » xylosides et xylobiosides	90
V. Synthèse des S- et C-xylosides	91
V.1 Synthèse du benzyl 1-thio-β-D-xylopyranoside	91

V.2. Synthèse du phényléthyl C-xyloside.....	92
VI. Caractérisation des produits.....	92
VI.1. Masse.....	92
VI.2. RMN	93
VI.3. Température de fusion	93
VI.4. Pouvoir rotatoire.....	93
VI.5. Micro-analyse	93
VII. Quantification par Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP)...	93
VIII. Evaluation des propriétés biologiques.....	94
VIII.1. Cellules et xylopyranosides	94
VIII.2. Viabilité cellulaire (tests MTT).....	95
VIII.3. Criblage des xylopyranosides pour leur capacité à amorcer la synthèse de GAGs sur les cellules CHO pgsA-745.....	95
VIII.4. « Click-it inside »	96
VIII.5. Activité de la β -galactosyltransférase	96
Chapitre III : Etude <i>in silico</i> de la xylanase Tx-xyn11.....	97
I. Contexte.....	98
II. Résultats et discussion	102
II.1. Modélisation de la xylanase Tx-xyn11 de <i>T. xylanilyticus</i>	102
II.1.1. La xylanase Tx-xyn11 sous forme d'intermédiaire glycosyl-enzyme	102
II.1.2. Amarrage moléculaire de l'intermédiaire Tx-Xyn11 glycosyl-enzyme avec divers accepteurs	105
II.1.3. Interactions des résidus des sous-sites aglycones de Tx-xyn11 avec divers accepteurs	110
II.2. Mutagenèse, production et caractérisation du mutant Tx-xyn11 W126A.....	113
II.2.1. Choix de la construction.....	113
II.2.2. Mutagenèse, transformation et expression	113
II.2.3. Purification et caractérisation du mutant.....	114
II.3. Transglycosylation par Tx-xyn 11 et Tx-xyn11 W126A.....	116
II.3.1. Comparaison par CCM	116
II.3.2. Résultats par CLHP.....	117
III. Conclusion	119
Chapitre IV : Synthèse et évaluation biologique de xylosides et des xylobiosides	121

I. Contexte.....	122
II. Résultats et discussion	125
II.1. « Click » xylosides et xylobiosides	125
II.1.1. Synthèse enzymatique de propargyl xyloside et xylobioside.....	129
a) Optimisation des conditions de réaction	130
b) Choix des conditions.....	134
II.1.2. Réactions « click » avec divers azotures.....	135
II.2. Aryl xylosides	136
II.2.1. Synthèse enzymatique avec les accepteurs aromatiques	138
a) Synthèse et purification avec les accepteurs possédant une fonction alcool primaire.....	139
b) Synthèse et purification avec les accepteurs possédant une fonction phénol.....	141
c) Synthèse et purification avec les accepteurs avec une fonction alcool primaire et une fonction phénol	143
d) Synthèse et purification avec les accepteurs avec deux fonctions phénol	144
II.3. Evaluation biologique	145
II.3.1. Cytotoxicité.....	146
a) Cytotoxicité des « click » xylosides.....	147
b) Cytotoxicité des aryl xylosides.....	149
II.3.2. Criblage des xylosides et xylobiosides	150
a) « Click » xylosides.....	152
b) « Click » xylosides vs « click » xylobiosides: impact du DP sur la pénétration dans la cellule et sur l'activité de la β 4GalT7	157
c) Aryl xylosides	163
d) Comparaison entre « click » et aryl xylosides	166
II.4. Synthèse chimique et évaluation biologique des C- et S-xylosides	168
II.4.1. Synthèse chimique du S-xyloside	169
II.4.2. Synthèse chimique du C-xyloside.....	170
II.4.3. Influence de la nature de l'atome impliqué dans la liaison glycosidique sur l'activité de la β 4GalT7.....	172
III. Conclusion	176
IV. Caractérisation des produits.....	179
IV.1. Produits issus de la synthèse chimio-enzymatique	179
IV.2. Aryl xylosides.....	187
IV.3. C et S-xyloside	195
Conclusion générale et perspectives	197
BIBLIOGRAPHIE	203

Abréviations

[BMIM]Cl	1- <i>n</i> -butyl-3-méthylimidazolium
$[\alpha]_D^{20}$	Pouvoir rotatoire
2F	2-désoxy-2-fluoro-xylobiosyl
³⁵ S	Isotope 35 du soufre (radioactif)
ABS	Albumine de Sérum Bovin
ACN	Acétonitrile
AcOEt	Acétate d'éthyle
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFEX	Ammonia Fiber Expansion
AH	Acide hyaluronique
APG	Alkyl polyglycoside
APTS	Acide <i>p</i> -toluènesulfonique
Araf	α -L-arabinofuranose
ARP	Ammonia Recycling Percolation
AX	Arabinoxylanes
CazY	Carbohydrate Active enZymes
CBH	Cellobiohydrolase
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CE	Carbohydrate estérase
CHO	Chinese Hamster Ovary = cellules ovariennes d'hamster
CLHP	Chromatographie Liquide à Haute Performance
CMC	Concentration Micellaire Critique
CS	Chondroïtine sulfate
CSA	Acide 10-camphorsulfonique
DDQ	2,3-Dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone
DEDL	Détecteur à diffusion de lumière
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
dNTP	Désoxyribonucléotides tri-phosphate
DO	Densité optique
DP	Degré de polymérisation
DS	Dermatane sulfate
ED ₅₀	Dose effective qui induit 50% de mort cellulaire
EDTA	Éthylène Diamine Tétra-Acétique
éq.	Equivalent

F	Point de fusion
Fmoc	Fluorénylméthoxycarbonyle
fur	Furanose
GAG	Glycosaminoglycane
Gal	Galactose
GalNac	<i>N</i> -Acétylgalactosamine
GalNac	N-acétylgalactosamine
GH	Glycoside Hydrolase
GlcA	Acide glucuronique
GlcNac	N-acétylglucosamine
HMF	5-hydroxyméthylfurfural
HS	Héparane sulfate
HSPG	Héparane sulfate lié à la protéine « cœur »
IC ₅₀	Concentration inhibitrice de 50%
IdoA	Acide L-iduronique
IPTG	Isopropyl- β -D-thio-galactoside
IUBMB	International Union of Biochemistry and Molecular Biology
k _{cat}	Constante catalytique
Ki	Constante inhibition
K _M	Constante de Michaelis-Menten
KS	Kératane Sulfate
LI	Liquide ionique
LIs	Liquides ioniques
MEC	Matrice extracellulaire
MeGlcA	Acide 4- <i>O</i> -méthyl- α -D-glucuronique
<i>O</i> -pNP	<i>O</i> - <i>p</i> -nitrophényl
p/v	Ratio poids/volume
PCR	Polymerase Chain Reaction = Réaction de polymérisation en chaîne
PDB	Protein Data Bank
PG	Protéoglycane
<i>p</i> NP-Xyl	<i>p</i> -nitrophényl β -D-xylopyranoside
pyr	Pyranose
Rdt	Rendement
Réf.	Référence
Rf	Rapport frontal
RGD	Arginine-Glycine-Aspartate
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire

rpm	Rotation par minute
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SN	Substitution Nucléophile
SVF	Sérum de veau foetal
<i>tert</i> -BuOH	<i>tert</i> -butanol
ta	Température ambiante
TCA	Trichloroacétimide
TMSOTf	Trifluorométhanesulfonate de triméthylsilyle
Tx-xyn	Xylanase de <i>Thermobacillus xylanilyticus</i>
UI	Unité internationale d'activité
Umb-Xyl	4-méthylumbelliféryl- β -D-xylopyranoside
UV	Ultraviolet
v/v	Ratio volume/volume
V _M	Vitesse maximale
XOS	Xylo-oligosaccharides
Xyl	β -D-xylopyranose
XylNapOH	2-(6-hydroxynaphtyl)- β -D-xylopyranoside
β 4GalT7	Galactosyltransférase I ou β -1,4-galactosyltransférase-7

Introduction générale

Actuellement, l'industrie pétrolière fournit les matériaux, les molécules d'intérêt et le carburant nécessaires à notre vie quotidienne. Cependant, les ressources fossiles s'amenuisent et leur utilisation a des conséquences néfastes sur notre écosystème notamment par le biais des émissions de gaz à effet de serre. Il est donc nécessaire de mettre en œuvre des moyens pour remplacer ces ressources fossiles par l'emploi de matières premières à carbone renouvelable tout en développant des procédés de culture durables et des procédés de transformation éco-compatibles. La bioraffinerie, avec l'utilisation de la biomasse végétale comme matière première renouvelable, est dans ce contexte un moyen alternatif permettant d'obtenir des molécules d'intérêt, des biomatériaux et de l'énergie (biocarburant, biogaz, chaleur).

La Région Champagne-Ardenne est la première région agricole de France avec plus de 60% du territoire dédié à l'agriculture. Son développement économique s'est porté sur l'utilisation de la biomasse végétale avec un parc industriel composé de nombreuses bioraffineries. L'Institut Européen de la Bioraffinerie de Reims Champagne Ardenne (IEB), créé en 2014, a pour objectif une optimisation de l'utilisation de l'ensemble des constituants des végétaux dans une logique d'écologie industrielle. Le site de Pomacle-Bazancourt (51) avec 260 ha de superficie est le plus grand parc industriel d'Europe de bioraffinerie et traite plusieurs biomasses comme le blé, la betterave, le miscanthus... La Région Champagne-Ardenne soutient par ailleurs, depuis de nombreuses années des projets de recherche en lien avec la valorisation non alimentaire des agro-ressources. Une des spécificités des thématiques de recherche privilégiées par la Région Champagne-Ardenne concerne la valorisation des pentoses issus des co-produits agricoles, en particulier le son et la paille de blé.

Les hémicelluloses constituent 20 à 45% de la biomasse végétale et représentent le deuxième polysaccharide le plus abondant sur Terre après la cellulose. Les hémicelluloses et plus particulièrement les xylanes sont des macromolécules polysaccharidiques complexes riches en pentoses (D-xylose et L-arabinose). L'abondance de cette matière première et la volonté de proposer des conditions de synthèse respectant le principe de chimie « verte » et mettant en œuvre des méthodologies de biotechnologies blanches ont conduit à des études sur la valorisation des hémicelluloses vers des molécules d'intérêt par synthèse enzymatique. Les avantages de cette voie enzymatique par rapport à la synthèse chimique sont les conditions réactionnelles douces et une parfaite stéréosélectivité des réactions en une seule étape de synthèse.

Une des thématiques principales de l'Unité de Recherche « Fractionnement des Agro-Ressources et Environnement » (UMR FARE 614 URCA/INRA) concerne les mécanismes de dépolymérisation par voie biotechnologique des lignocelluloses avec des objectifs d'innovation et d'applications vers la production de molécules d'intérêt (monosaccharides, oligosaccharides, molécules phénoliques).

Depuis une quinzaine d'années, une collaboration entre l'équipe Chimie Bioorganique de l'ICMR et le groupe « Transformation biologique des lignocelluloses » de l'UMR FARE a conduit à développer des voies de synthèse enzymatique de diverses familles de glycosides à base de pentoses par le biais de l'utilisation d'hémicellulases.

L'utilisation d'une α -L-arabinofuranosidase a conduit à l'obtention de divers α -L-arabinofuranosides mais aussi de β -D-galactofuranosides et représentait le premier exemple de l'utilisation d'une furanosidase en synthèse (Remond et al. 2002, Remond et al. 2005, Remond et al. 2008).

Une β -xylosidase a ensuite été utilisée pour préparer divers xylosides et des études de modélisation moléculaire et de biologie moléculaire avec la production de mutants ont permis de mieux comprendre la réaction de transglycosylation catalysée par la xylosidase appartenant à la famille 39 des glycoside hydrolases (Muzard et al. 2009, Ochs et al. 2013).

Dans le cadre du Programme PentoRaf (CPER 2007-2013), le travail s'est porté sur l'utilisation d'une xylanase pour la synthèse de nouveaux alkyl oligoxylosides comportant une chaîne grasse pour des applications dans le domaine des tensioactifs. Ce travail, réalisé dans le cadre de la thèse de Marjorie Ochs (2008-2012), a permis le dépôt d'un brevet avec la Société ARD sur de nouveaux procédés de préparation de compositions à base de polypentosides. Les xylanases sont des *endo* enzymes et permettent la production de xylosides avec un degré de polymérisation supérieur à 1, molécules très difficiles à obtenir par synthèse chimique

Comme évoqué précédemment, le D-xylose est un sucre abondant dans le règne végétal car il est le constituant majeur des hétéroxylanes constituant les hémicelluloses. Mais, dans le règne animal, le D-xylose est un sucre très peu représenté. Il occupe néanmoins une position clé dans un complexe macromoléculaire appelé protéoglycane (PG) qui est sécrété par la plupart des cellules. Les PGs sont composés d'une protéine « cœur » sur laquelle sont fixées plusieurs chaînes polysaccharidiques de glycosaminoglycane (GAG). Ces PGs et GAGs, localisés à la surface des cellules et sécrétés dans le milieu extracellulaire, interagissent et modulent une large variété de protéines telles que des cytokines ou des facteurs de croissance et jouent des rôles fondamentaux dans la régulation de processus biologiques majeurs. Depuis plus de 40 ans, il est connu que des β -xylopyranosides, avec des aglycones hydrophobes en particulier, pouvaient induire une synthèse exogène des GAGs. Certains β -xylopyranosides ont ainsi montré d'intéressantes propriétés biologiques comme agents anti-thrombotiques, anti-prolifératifs ou pour des applications cosmétiques anti-âge.

Cette volonté de valoriser le D-xylose issu des hémicelluloses présentes dans les agro-ressources afin de produire des molécules d'intérêt pour des applications biologiques dans le domaine thérapeutique ou cosmétique a donné naissance au projet XYLOCOS. Ce projet de

recherche a été validé dans le cadre du programme Emergence 2011 et financé par la Région Champagne-Ardenne et le Fonds Européen de Développement Régional (FEDER).

XYLOCOS est un projet pluridisciplinaire à l'interface de la chimie et de la biologie et multi-partenaires avec l'association de trois équipes de recherche issues de 3 Unités de Recherche associées aux grands organismes : ICMR (UMR CNRS 7312), FARE (UMR INRA 614) et MEDyC (UMR CNRS 7369). Deux entreprises régionales : ARD et SOLIANCE (devenue filiale de GIVAUDAN SA, entreprise leader mondial dans le domaine des arômes et parfums depuis juin 2014) sont également partenaires de ce projet.

L'objectif du projet XYLOCOS est de mettre au point la production par synthèse enzymatique ou chimio-enzymatique de nouveaux β -xylosides et β -oligoxylosides fonctionnalisés par des aglycones de différentes natures puis d'évaluer leur capacité à initier la biosynthèse des glycosaminoglycanes pour des applications dans le domaine cosmétique. Le programme de recherche envisagé se trouve à l'interface de deux thématiques prioritaires de la Région Champagne-Ardenne : la valorisation non alimentaire des agro-ressources (matière première : son et paille de blé) et la santé, en particulier la thématique Longévité et Vieillesse (applications anti-âge des molécules).

L'UMR FARE INRA-URCA 614 est spécialisée dans le domaine de l'utilisation des ressources lignocellulosiques renouvelables. L'équipe « Transformation biologique des lignocelluloses » (Pr. C. Rémond) travaille sur l'hydrolyse enzymatique mais aussi sur la transformation par voies biotechnologiques (enzymatiques et fermentaires) des pentoses issus des hémicelluloses pour développer de nouvelles molécules. Pour ce projet, le travail concerne la mise au point des conditions expérimentales des synthèses de xylosides et oligoxylosides. Divers paramètres expérimentaux seront testés pour optimiser les rendements de synthèse (agitation, présence d'additifs, ...) lors de la mise en œuvre des enzymes pour produire les molécules d'intérêt.

L'équipe Chimie Bioorganique du groupe BSMA de l'ICMR (UMR CNRS-URCA 7312) est spécialisée dans la conception, la synthèse et l'évaluation biologique d'analogues de molécules naturelles pour des applications thérapeutiques ciblées. La chimie des sucres est la thématique privilégiée du laboratoire. L'objectif est également de participer à la mise au point des réactions enzymatiques, au choix des accepteurs alcools à utiliser et à la mise au point des conditions expérimentales. Le développement des voies de synthèse chimio-enzymatique de xylosides comportant des aglycones fonctionnalisées est envisagé en utilisant les compétences développées au laboratoire. La partie quantification des réactions, purification et caractérisation des xylosides préparés sera également effectuée au sein du laboratoire.

L'UMR URCA-CNRS 7369 MEDyC a une compétence internationalement reconnue dans l'étude du rôle de macromolécules de la matrice extracellulaire, notamment des GAGs et PGs dans le contrôle de la progression tumorale et dans le vieillissement cutané. Dans le projet

XYLOCOS, leur rôle est de réaliser un screening des xylosides préparés pour l'activation de la biosynthèse des GAGs et des PGs et de caractériser les macromolécules obtenues.

ARD et SOLIANCE sont deux entreprises régionales qui développent, produisent et commercialisent des ingrédients actifs innovants pour la cosmétique en utilisant essentiellement le fractionnement du végétal, la chimie verte et les molécules produites par les biotechnologies. En fin de projet, l'objectif sera de mettre au point un « scale-up » pour la production des xylosides d'intérêt à l'échelle de quelques centaines de grammes. Des tests biologiques complémentaires, directement reliés aux éventuelles propriétés d'applications cosmétiques, seront également développés.

Les résultats de cette thèse concerne essentiellement les travaux réalisés pour la synthèse enzymatique et chimio-enzymatique de β -xylopyranosides possédant diverses familles d'aglycones (Figure 1).

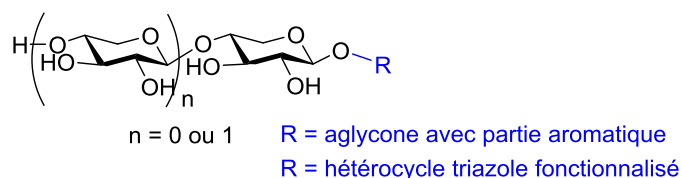


Figure 1. Molécules visées au cours de ce travail de thèse

L'ensemble des tests d'évaluation biologique concernant l'activation de la biosynthèse des glycosaminoglycanes par les différents xylosides préparés ont été effectués à la Faculté de Médecine de l'Université de Reims Champagne-Ardenne au sein de l'équipe de l'UMR 7369 MEDyC (équipe Dr. Y. Wegrowski, Dr. S. Brezillon) par Aurore Chatron-Collet, Ingénieure de Recherche recrutée dans le cadre du projet XYLOCOS.

Ce manuscrit est organisé en 4 chapitres :

Le chapitre I est une introduction bibliographique sur les principaux sujets développés au cours de ce travail. Cette introduction débute par une description de la biomasse lignocellulosique et les différents procédés actuellement développés pour sa valorisation industrielle. Ensuite, une deuxième partie concerne les principales informations et les modes d'action des glycoside hydrolases avec un focus particulier sur les xylanases qui seront les enzymes utilisées au cours de cette thèse. Une troisième partie est dédiée à la synthèse des β -xylopyranosides par synthèse chimique puis par synthèse enzymatique. Enfin, les différentes applications des β -xylopyranosides seront présentées pour démontrer l'intérêt de ces molécules dans des domaines aussi variés que la cosmétique, les molécules d'intérêt biologique, les tensioactifs ...

Le chapitre II présente une description des différents matériels et des méthodes utilisés dans ce travail de thèse pluri-disciplinaire.

Le chapitre III décrit une étude structure-fonction ciblée sur une xylanase particulière : la xylanase 11 de *Thermobacillus xylanilyticus* en vue de cibler une amélioration des capacités de transglycosylation de cette enzyme. Ainsi, une étude de modélisation *in silico* a été entreprise afin d'évaluer le rôle des principaux acides aminés du site actif et, le cas échéant, cibler un ou plusieurs résidus à muter. Une approche de biologie moléculaire a ensuite été effectuée afin de produire, purifier et obtenir une protéine mutée. La comparaison de l'enzyme sauvage et mutée a finalement été entreprise avec la détermination de leurs paramètres cinétiques et de leurs activités de transglycosylation respectives.

Le chapitre IV décrit, dans un premier temps, la synthèse enzymatique ou chimio-enzymatique de différentes familles de β -xylosides et β -xylobiosides comportant des parties aglycones variées et parfois fonctionnalisées. Une série de composés présentant des hétérocycles triazoles diversement fonctionnalisés, obtenus par une réaction de chimie « click », sur la partie aglycone a été préparée par une séquence chimio-enzymatique en deux étapes. D'autres xylosides et xylobiosides avec une partie aglycone possédant un cycle aromatique ont été obtenus directement par une réaction de transglycosylation enzymatique à partir de xylanes. Ces xylosides et xylobiosides, souvent originaux, ont ensuite été évalués pour leurs activités biologiques, notamment pour leur capacité à amorcer la biosynthèse de glycosaminoglycanes.

Chapitre I :

Synthèse

bibliographique

I. La biomasse lignocellulosique

Les parois des cellules végétales, composants majoritaires de la biomasse, représentent des compartiments dynamiques qui changent tout au long de la vie de la plante. Ces structures se composent d'un assemblage de trois couches organisées (Figure 2, a) (Popper 2008).

- La **paroi primaire**, première paroi formée, est de plus en plus importante durant l'expansion de la cellule. Elle est composée de cellulose, d'hémicelluloses et de pectines.
- Lorsque que la cellule cesse de croître et arrive à maturité, la **paroi secondaire** se dépose à l'intérieur de la paroi primaire et stoppe la croissance cellulaire. C'est une structure épaisse et rigide, composée de cellulose, d'hémicelluloses et de lignines. Elle est constituée de trois couches S1, S2 et S3 selon l'orientation des microfibrilles de cellulose (Figure 2, b).
- La **lamelle moyenne** forme l'interface et assure le maintien de la cohésion avec la paroi primaire des cellules adjacentes. Elle est composée majoritairement de pectines.

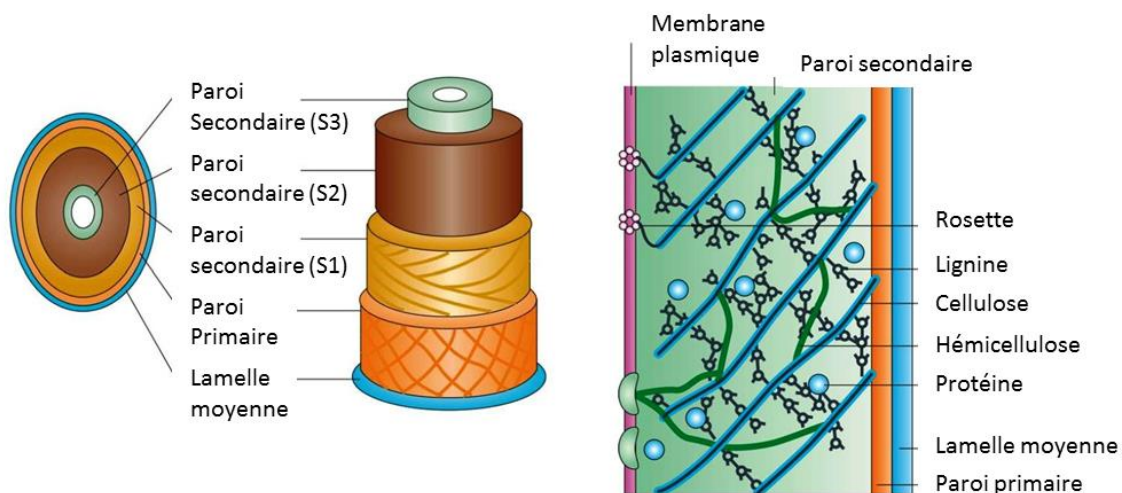


Figure 2. Structure d'une cellule végétale. a) Structure d'une cellule végétale comprenant la lamelle moyenne, la paroi primaire et la paroi secondaire. b) Structure de la paroi secondaire contenant des fibres de cellulose liées aux lignines et aux hémicelluloses (Mathews et al. 2015).

Les parois confèrent aux cellules végétales une protection contre les infections par les agents pathogènes, une certaine rigidité et une résistance mécanique. Elles assurent également des fonctions biologiques.

I.1. La structure des lignocelluloses

Les lignocelluloses correspondent essentiellement à des parois végétales lignifiées. Elles sont constituées de trois types de polymères: la cellulose, les hémicelluloses et les lignines qui sont fortement entremêlées et liées par des liaisons covalentes et non covalentes.

Les pourcentages de ces polymères au sein des parois varient d'une plante à l'autre (Tableau 1) (Perez et al. 2002, Otieno and Ahring 2012, Mathews et al. 2015). De plus, leur composition varie avec l'âge, le stade de croissance de la plante et en fonction des tissus de la plante.

Tableau 1. Composition des parois végétales lignocellulosiques (Mathews et al. 2015).

Constituants	Cellulose (%)	Hémicelluloses (%)	Lignines (%)
Bois tendres	45-55	24-40	18-25
Bois durs	45-50	25-35	25-35
Herbes	25-40	25-50	10-30

I.1.1. La cellulose

La cellulose est le composant majeur des lignocelluloses. C'est un polymère linéaire composé d'unités D-glucose reliées par des liaisons β -1,4 avec un degré de polymérisation (DP) d'approximativement 10 000 (Zhong and Ye 2015). Ces chaînes de glucanes sont liées entre elles par des interactions faibles (liaisons hydrogènes, forces de Van der Waals) pour former des microfibrilles. Les microfibrilles de cellulose (composées de 36 chaînes de glucanes) s'associent pour former les fibres de cellulose. La cellulose peut être sous forme cristalline. Cependant, il y a une part de cellulose qui n'est pas organisée et qui forme la cellulose amorphe.

I.1.2. Les hémicelluloses

Les hémicelluloses sont composées de polysaccharides hétérogènes avec un DP d'environ 200. Contrairement à la cellulose, elles sont composées d'unités monosacchariques diverses : D-glucose, D-mannose, D-galactose, D-xylose et L-arabinofuranose. Ces monosaccharides sont reliés par des liaisons glycosidiques β -1,4 ou β -1,3. Les chaînes linéaires peuvent être substituées par des monosaccharides ou des motifs oligosaccharidiques ainsi que par des groupements non glucidiques.

Les hémicelluloses sont réparties en quatre classes de polysaccharides selon les unités monosacchariques des chaînes linéaires: les xylanes, les mannanes, les β -glucanes et les xyloglucanes.

a) Les xylanes

Les xylanes sont les polysaccharides principaux des hémicelluloses des parois secondaires des plantes dicotylédones (20 à 30%) et jusqu'à 50% pour les plantes monocotylédones. Ce sont des hétéropolymères possédant un squelette linéaire de résidus D-xylopyranosyle reliés généralement par des liaisons glycosidiques β -1,4 avec un DP d'environ

100 (Ebringerova and Heinze 2000, Zhong and Ye 2015). La nature des substituants détermine les sous-catégories de xylanes (Figure 3).

Les **homoxylanes** sont des chaînes linéaires de résidus D-xylopyranosyles reliés entre eux par des liaisons β -1,3 ou β -1,4, et ils sont absents chez les plantes supérieures. Les homoxylanes sont présents dans les algues vertes avec des chaînes reliées par des liaisons β -1,3 alors que chez les algues rouges on trouve une alternance de liaisons β -1,3 et β -1,4.

Toutes les autres catégories de xylanes possèdent une chaîne principale d'unités xylose liées en β -1,4.

Les **glucuronoxylanes** sont principalement substitués par l'acide 4-*O*-méthyl- α -D-glucuronique (MeGlcA) lié en position *O*-2 des résidus D-xylopyranosyles de la chaîne principale. L'acide glucuronique peut se retrouver sous forme non méthylée. Les glucuronoxylanes représentent le principal composant des bois durs (15-30%) avec un ratio moyen de Xyl : MeGlcA 10:1 (Ebringerova et al. 2005, Peng et al. 2012).

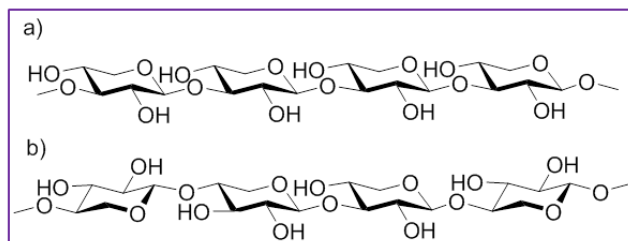
Les **(arabino)glucuronoxylanes** et **(glucurono)arabinoxylanes** sont principalement substitués par des résidus MeGlcA et des α -L-arabinofuranoses (α -L-Araf) liés en position *O*-2 ou *O*-3, respectivement et sont peu acétylés. Les (arabino)glucuronoxylanes sont typiques (5-10%) des bois tendres et des tissus lignifiés des herbes et des plantes annuelles. Le ratio L-Araf : GlcA : Xyl est de 1:2:8. Les (glucurono)arabinoxylanes sont présents dans les graminées et les herbes (15-30%) (Ebringerova et al. 2005, Girio et al. 2010).

Les **arabinoxylanes** représentent la principale hémicellulose des enveloppes entourant les graines de céréales. Ainsi, ils représentent 51% des constituants des parois du son de blé et 33% de la paille de blé en matière sèche (Rakotoarivonina et al. 2012). Ce sont des chaînes linéaires de résidus D-xylose mono-substitués ou di-substitués en position *O*-2 et/ou *O*-3 par des résidus α -L-Araf. Chez les plantes graminées, uniquement, les groupements arabinosyles peuvent être eux-mêmes substitués par des acides phénoliques tels que l'acide férulique jusqu'à 4% et l'acide *p*-coumarique jusqu'à 3% sur la position 5 des résidus α -L-Araf (Vogel 2008).

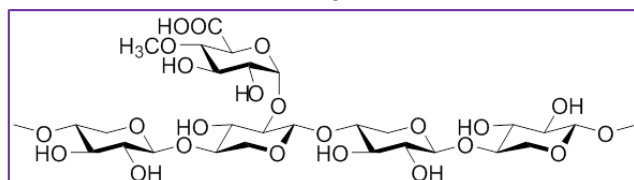
Les résidus xylosyles des xylanes peuvent être acétylés en position *O*-2 et/ou *O*-3. Au sein des glucuronoxylanes, le taux d'acétylation peut s'élever à 70% (Girio et al. 2010). Chez les arabinoxylanes des graminées, on retrouve 1 à 2% de groupements acétyles.

Homoxylyanes

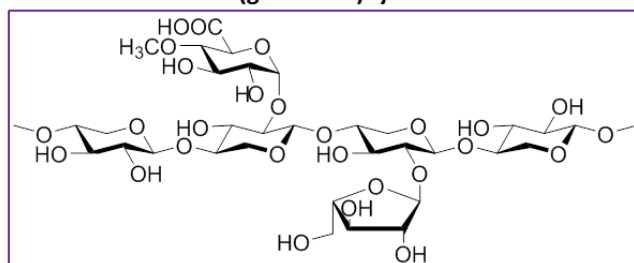
a) Liaisons en β -1,3; b) Liaisons en β -1,3 et β -1,4



Glucuronoxylanes



Arabino(glucurono)xylanes



Arabinoxylanes (graminées)

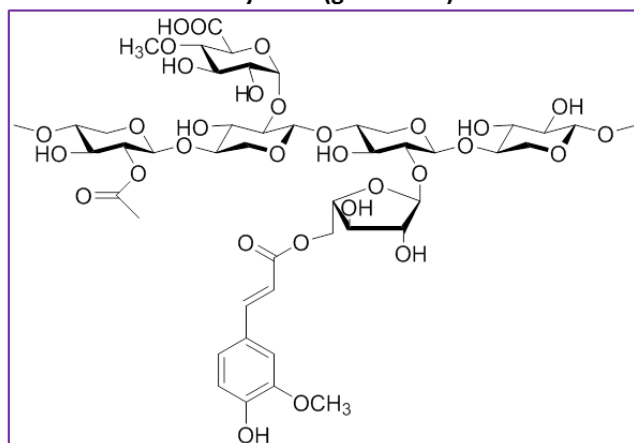


Figure 3. Les différentes familles d'hétéroxylanes.

b) Les mannanes

Tout comme pour les xylanes, on distingue diverses catégories de mannanes (Figure 4) selon leur composition en sucres. La chaîne linéaire peut être constituée uniquement de résidus D-mannoses liés en β -1,4 comme dans les galactomannanes, mais également par des unités D-mannose et D-glucose liés en β -1,4 et formant un motif non-répétitif comme c'est le cas au sein des glucomannanes et des galactoglucomannanes (Ebringerova et al. 2005). Les galactomannanes et les galactoglucomannanes se caractérisent par la présence de substituants

D-galactopyranosyles liés en position *O*-6 des unités D-mannose ou D-glucose de la chaîne principale. Par ailleurs, les glucomannanes sont souvent acétylés. Les galactomannanes hautement substitués par des résidus galactoses (30-96%) sont présents dans les tissus de stockage des graines (endosperme, cotylédones, périsperme). Les galactoglucomannanes constituent le composant majoritaire des hémicelluloses de la paroi secondaire des bois tendres (10-25%) alors que dans la paroi secondaire des bois durs leur teneur est plus faible. Les glucomannanes sont présents dans les bois tendres et durs à une teneur faible (5-10%) (Girio et al. 2010).

c) Les D-xylo-D-glucanes

Les D-xylo-D-glucanes (Figure 4) sont constitués d'une chaîne linéaire de résidus D-glucopyranoses substitués par des résidus D-Xyl en position *O*-6. D'autre part, des substitutions de type fucose, galactose, arabinose peuvent également être présentes le long des chaînes principales. Au sein de la paroi cellulaire, ces polysaccharides sont liés étroitement aux microfibrilles de cellulose par des liaisons hydrogènes. Ils sont présents dans les parois des plantes supérieures et représentent une quantité importante des parois primaires (20 à 25% des parois primaires des angiospermes dicotylédones). Ils peuvent être également présents dans les herbes à une teneur faible (2-5%) (Ebringerova et al. 2005).

d) Les β -glucanes

Les β -glucanes (Figure 4) sont formés de chaînes linéaires de D-glucose composées d'unités cellotriosyles et cellotétraosyles liées en β -1,4 et en β -1,3. Ces polysaccharides, caractéristiques des graminées, sont liés aux microfibrilles de cellulose lors de la croissance dans les parois primaires (Ebringerova et al. 2005).

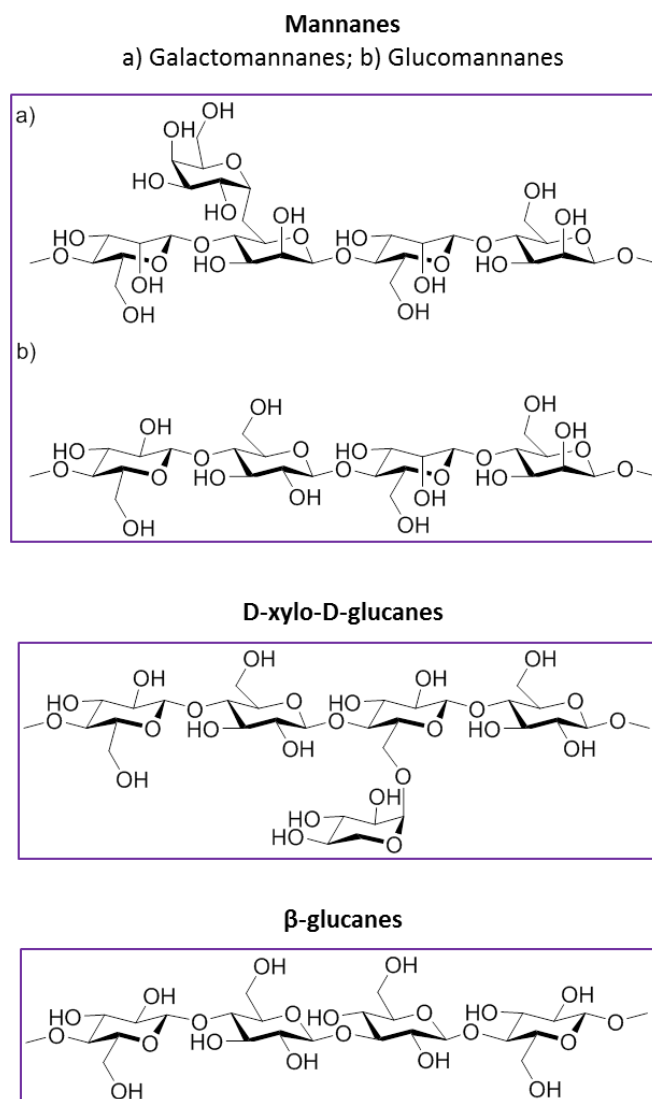


Figure 4. Les différentes hémicelluloses présentes autres que les hétéroxylanes.

I.1.3. Les lignines

Les lignines sont présentes dans la paroi cellulaire, lui conférant un support structural, une imperméabilité, une résistance contre les attaques microbiennes et au stress oxydatif. La lignine est un polymère de monolignols. Les trois composants principaux sont des alcools hydroxycinnamiques : l'alcool coniférylique, l'alcool *p*-coumarique et l'alcool sinapylique (Figure 5, a). La composition de la lignine, qui résulte de la proportion de ces trois unités, diffère selon les espèces de plantes mais aussi selon le type cellulaire d'une même espèce (Bonawitz and Chapple 2010, Zhong and Ye 2015). La lignine des bois tendres est principalement composée d'alcool coniférylique (80%) alors que dans les bois durs la lignine est formée de 56% d'alcool coniférylique et de 40% d'alcool sinapylique (Mathews et al. 2015). La lignine de plantes herbacées contient une teneur plus élevée (de plus de 10%) en alcool *p*-coumarique comparativement à la lignine de bois durs et tendres alors que les proportions en alcools coniférylique et sinapylique sont équivalentes (Perez et al. 2002). La lignine est associée

étroitement aux hémicelluloses par des liaisons covalentes formant une matrice complexe (Figure 5, b).

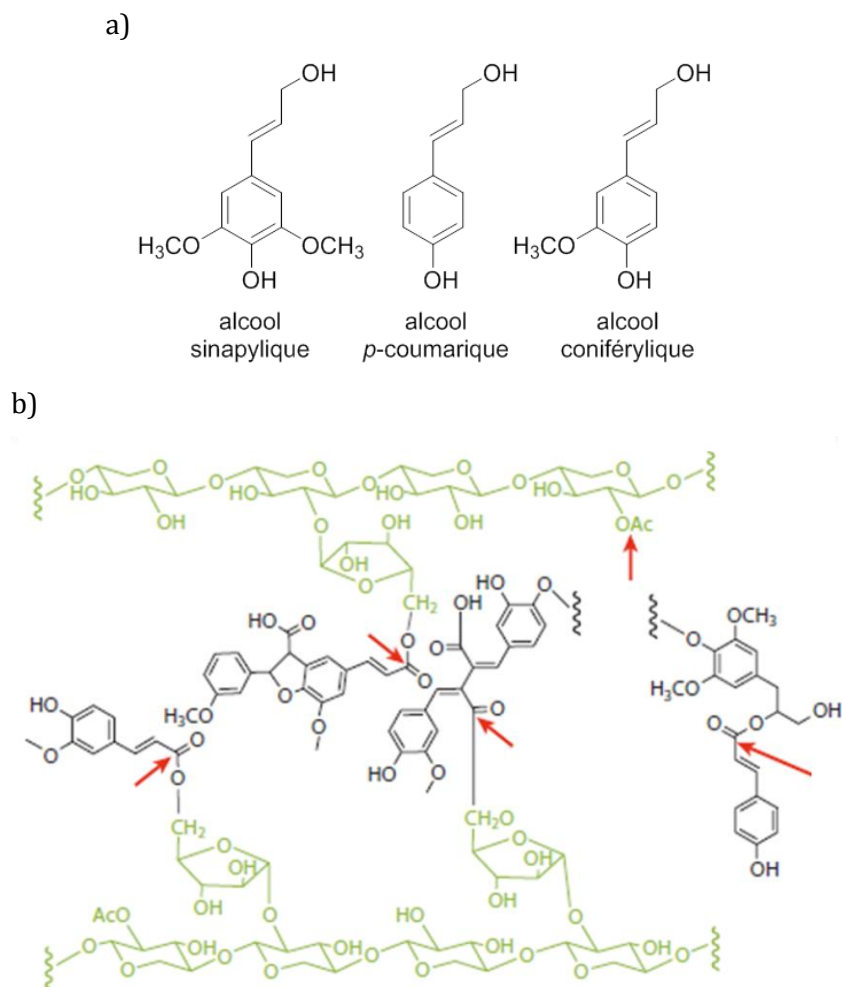


Figure 5. La lignine composant de la paroi lignocellulosique. a) Structure des trois monolignols composant la lignine. b) La matrice lignine-polysaccharides des graminées (hémicelluloses en vert, lignine en noir. Les flèches représentent les liaisons ester) (Chundawat et al. 2011).

I.2. La transformation de la biomasse lignocellulosique

Le concept de bioraffinerie vise à valoriser la plante entière ce qui implique une transformation complète de la biomasse lignocellulosique. Celle-ci peut être transformée et valorisée sous des formes multiples : énergies, matériaux et produits chimiques (Deutschmann and Dekker 2012).

Plusieurs traitements chimiques peuvent être employés pour la transformation de la biomasse lignocellulosique en molécules d'intérêt ou en énergie comme la pyrolyse, la gazéification et l'hydrolyse par une voie chimique (Lange 2007).

L'une des stratégies envisagées pour le fractionnement de la biomasse lignocellulosique en sucres fermentescibles est la méthode enzymatique. En effet, la voie enzymatique présente de multiples avantages. La spécificité des enzymes et la conduite des réactions en conditions

douces permettent de limiter l'apparition de molécules de dégradation ou de molécules inhibitrices pour les fermentations ultérieures. Le recours aux enzymes est non polluant et les conditions réactionnelles sont peu énergivores. Toutefois, dans le cas du fractionnement enzymatique des lignocelluloses, le coût des enzymes demeure encore un facteur qui peut limiter le développement des procédés, malgré une optimisation des cocktails enzymatiques et une baisse de leur coût de production par les fournisseurs d'enzymes (Novozymes, Genencor-DuPont, ...).

La récalcitrance des parois végétales est également un facteur qui limite fortement l'efficacité des enzymes. D'autre part, un recyclage des enzymes notamment par le biais de leur immobilisation est inenvisageable dans le cas de l'hydrolyse des parois végétales complexes et hétérogènes au sein desquelles les biocatalyseurs doivent pouvoir pénétrer pour accéder à leur substrat. Il est donc nécessaire d'avoir recours à une étape de prétraitement de la biomasse lignocellulosique préalablement à l'étape de conversion enzymatique afin d'améliorer l'efficacité des enzymes.

I.2.1. La récalcitrance de la paroi végétale lignocellulosique

Les parois des cellules végétales et notamment la paroi secondaire confèrent à la plante sa rigidité et sa résistance. Ce sont les premiers boucliers qui protègent la plante contre les attaques causées par l'environnement et les microorganismes (Himmel et al. 2007). La composition des parois végétales secondaires (cellulose, hémicelluloses et lignines) et leur organisation en une structure pariétale complexe conduisent à leur récalcitrance vis-à-vis de l'action d'agents biologiques tels que les enzymes.

Himmel *et al.* (Himmel et al. 2007) ont défini les facteurs naturels qui contribuent à la récalcitrance de la biomasse contre les dégradations physiques et enzymatiques ; i) les tissus épidermiques du corps de la plante, particulièrement les cires cuticulaires et épicuticulaires ; ii) l'arrangement et la densité des faisceaux vasculaires ; iii) la quantité relative des tissus sclérenchymateux ; iv) le degré de lignification ; v) l'hétérogénéité structurale et complexe des composés pariétaux ; vi) le challenge pour les enzymes à agir sur des substrats insolubles et vii) les inhibiteurs de fermentation qui existent naturellement dans les parois végétales ou qui sont générés pendant le processus de conversion.

D'un point de vue moléculaire, la cristallinité de la cellulose limite la pénétration des molécules d'eau et donc l'accès aux glycoside hydrolases empêchant l'hydrolyse (Bansal et al. 2012, Meng and Ragauskas 2014). Les hémicelluloses et leurs structures branchées sont des structures amorphes mais le fractionnement des hémicelluloses requiert un arsenal d'activités enzymatiques pour libérer les motifs unitaires. De plus, la matrice formée par les hémicelluloses associées aux lignines forme un complexe encore plus difficile à cliver par hydrolyse

enzymatique. La lignine quant à elle agit comme une barrière physique et restreint l'accès aux enzymes hydrolytiques. Le degré de lignification, la diversité de composition et de structure de la lignine et la distribution des polymères phénoliques dans la paroi végétale sont des facteurs déterminants pour l'accès aux enzymes hydrolytiques (Van Dyk and Pletschke 2012, Zhao et al. 2012a). De plus, les enzymes telles que les cellulases et les hémicellulases peuvent s'adsorber à la surface des lignines de manière non-spécifique devenant ainsi inefficaces (Berlin et al. 2006, Rahikainen et al. 2011).

I.2.2. Les prétraitements de la biomasse lignocellulosique

De nombreux prétraitements de la biomasse lignocellulosique ont été étudiés afin de faciliter l'accès aux enzymes hydrolytiques : prétraitements physiques, chimiques, physico-chimiques et biologiques. Lors de l'étape de prétraitement, la composition et la structure des parois végétales lignocellulosiques sont altérées (Figure 6). Selon la nature du prétraitement, les lignines et les hémicelluloses sont dépolymérisées ou monomérisées, la cristallinité de la cellulose est réduite, la porosité de la paroi est affectée ainsi que la surface accessible des constituants pariétaux. L'augmentation de la surface accessible de la cellulose par les cellulases est le premier objectif des prétraitements (Zhao et al. 2012a). Le Tableau 2 présente différents prétraitements utilisés et certains de leurs effets. Dans la suite de cette partie, seuls certains prétraitements seront développés.

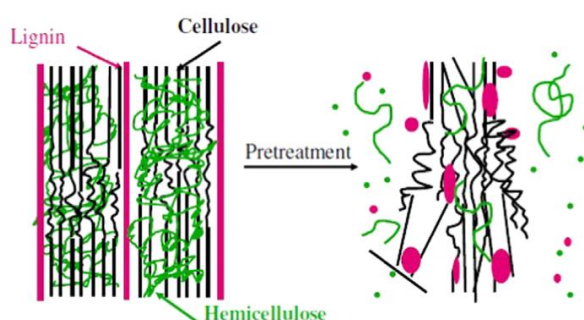


Figure 6. Effet des prétraitements sur la biomasse lignocellulosique (Kumar et al. 2009) adapté de (Hsu et al. 1980)

Tableau 2. Différents prétraitements et leurs impacts sur la biomasse lignocellulosique (Zhao et al. 2012b, Chen and Liu 2015)

	Augmentation de l'aire de surface accessible	Décristallinisation de la cellulose	Elimination hémicellulose	Elimination lignine	Altération la structure des lignines	Formation inhibiteurs de la fermentation	Avantages	Inconvénients
Traitement physique	✓✓✓	✓✓✓	✗	✗	✗	✗	Altère la structure de la biomasse ; réduit taille des particules ; diminue la cristallinité de la biomasse	Coûteux en énergie
Explosion à la vapeur	✓✓✓	✗	✓	✗	✓	✓	Peu coûteux ; solubilisation hémicelluloses ; impact environnemental faible	Rupture incomplète polysaccharides-lignines ; formation de composés toxiques
Hydrothermal	✓✓✓	ND	✓✓✓	✗	✓	✓	Faible température utilisée ; solvant = H ₂ O donc pas besoin de neutralisation	Demande forte en énergie avec large volume d'eau
Acide dilué	✓✓✓	✗	✓✓✓	✗	✓	✓✓✓	Solubilisation hémicelluloses	Corrosion équipements ; dégradation sucres ; génération inhibiteurs.
AFEX	✓✓✓	✓✓✓	✓	✓	✓✓✓	✗	Recyclage ammoniac ; conditions modérées (<100°C) et pH (<12.0)	Coût ammoniac élevé ; effet environnemental de l'ammoniaque
Alcalin	✓✓✓	✗	✓	✓✓✓	✓✓✓	✗	Elimination efficace hémicelluloses ; faible formation d'inhibiteur ; faible énergie requise	Durée longue ; altération de la structure des lignines ; besoin de neutralisation
Dégradation fongique	✓✓✓	✓	✓	✓✓✓	✗	✗	Conditions douces ; respectueux de l'environnement	Efficacité modérée ; grand espace requis ; temps long

✓ : partiel, peu d'effet, ✓✓✓ : effet significatif, ✗ : pas d'effet, ND : non déterminé

a) Les prétraitements physico-chimiques

Prétraitements physiques

Le prétraitement physique par broyage mécanique (broyage, extrusion, micronisation ...) permet de réduire la taille des particules de lignocellulose (10 à 30 mm par écaillage et 0,2 à 2 mm par broyage), d'augmenter la surface accessible des constituants des parois, de diminuer le DP et la décristallinisation des constituants pariétaux (Sun and Cheng 2002). Ce sont des prétraitements coûteux en énergie.

Prétraitements chimiques

Parmi les prétraitements chimiques, ceux basés sur l'utilisation d'acides ou de bases sont les plus répandus.

Le *prétraitement acide* le plus étudié est celui mettant en œuvre l'utilisation d'acide sulfurique. Il peut être effectué soit à une faible concentration en acide soit à haute concentration en acide. L'utilisation d'acide concentré conduit à des problèmes de toxicité, de corrosivité pour les équipements. La dégradation des monosaccharides produits en inhibiteurs de la fermentation comme le HMF (5-hydroxyméthylfurfural) ou le 2-furfuraldéhyde est faible (Girio et al. 2010). Il est nécessaire de recycler l'acide pour diminuer les coûts de production. L'acide dilué est plus efficace et nécessite des conditions moins sévères. La concentration en acide sulfurique de ce type de prétraitement est de 0,5 à 4% et à une température comprise entre 140 et 200°C. Il conduit à l'hydrolyse des hémicelluloses en monosaccharides ce qui permet d'augmenter l'accessibilité de la cellulose aux cellulases (Kumar et al. 2009). L'un des inconvénients de ce prétraitement est qu'il peut, selon la concentration en acide, la température et la durée réactionnelle, conduire à une dégradation des monosaccharides produits en inhibiteurs de la fermentation tel que le furfural (issu de la dégradation du xylose) et le 5-hydroxyméthylfurfural (provenant de la dégradation du glucose) (Girio et al. 2010). De plus, dans ces conditions (pH acide, $T > 150^{\circ}\text{C}$), la lignine peut se redéposer sous forme de gouttelettes sur la cellulose et empêcher l'action des cellulases (Selig et al. 2007). Ce prétraitement est coûteux car il nécessite des équipements résistants à la corrosion, ainsi que la neutralisation des hydrolysats (Kumar et al. 2009). De plus, il est nécessaire de recycler l'acide pour diminuer les coûts de l'étape de prétraitement.

Les *prétraitements alcalins* utilisent soit des ions hydroxydes (soude NaOH, potasse KOH ou hydroxyde de calcium $\text{Ca}(\text{OH})_2$), soit de l'ammoniac/ammoniaque.

Les prétraitements avec des ions hydroxydes ont l'avantage d'être utilisés à faible température et à basse pression. Le prétraitement à la soude diluée (3%) a été longuement étudié car ce prétraitement est très efficace (Sharma et al. 2002). Il conduit à la rupture des liaisons intramoléculaires entre les lignines et les hémicelluloses mais aussi à la dépolymérisation des lignines par clivage des liaisons éthers ainsi qu'à la diminution de la

cristallinité de la cellulose (Zhao et al. 2012b). Pour des raisons de coût et de sécurité, la chaux (Ca(OH)_2) est préférée à la soude. A faible pression et à faible température (25 à 130°C), elle permet la solubilisation des hémicelluloses et des lignines par désacétylation et délignification (Girio et al. 2010). En revanche, les temps réactionnels sont longs (heures à jours) et il est nécessaire d'effectuer une neutralisation du milieu après prétraitement (Agbor et al. 2011).

Il existe deux types de traitement basique: AFEX (Ammonia Fiber Expansion) et ARP (Ammonia Recycling Percolation). Lors du prétraitement AFEX, la biomasse est mise en présence d'ammoniac liquide (1-2 kg d'ammoniac/kg de matière sèche) à des températures comprises entre 40-140°C et à haute pression (20 à 30 bars) (Carvalho et al. 2008, Agbor et al. 2011). Après atteinte de la température souhaitée, la pression est relâchée, ce qui permet l'évaporation de l'ammoniac, le gonflement des fibres de cellulose et leur décristallinisation (Agbor et al. 2011). L'AFEX permet le clivage du complexe lignines-polysaccharides, l'hydrolyse des hémicelluloses et la décristallinisation de la cellulose. Les conditions réactionnelles douces (<100°C et pH < 12) minimisent la formation d'inhibiteurs de la fermentation. L'ARP correspond à l'utilisation d'une solution d'ammoniacale (15 à 20%) qui s'écoule par un flux continu (1 à 5 mL/min) dans un réacteur en colonne contenant la biomasse à haute température (150-180°C). Cette technique permet le recyclage de l'ammoniac (Agbor et al. 2011). L'ARP permet la délignification et l'élimination des hémicelluloses simultanément.

Prétraitements physico-chimiques

L'explosion à la vapeur est le prétraitement physico-chimique le plus utilisé. La biomasse est rapidement chauffée sous haute pression (160-270°C à des pressions de 20-50 bars) puis la pression est relâchée rapidement provoquant la séparation en fibres individuelles à partir de la matrice lignocellulosique par le biais de l'action de la vapeur (Sun and Cheng 2002, Chen and Liu 2015, Jacquet et al. 2015). C'est un processus thermo-mécano-chimique car la structure des lignocelluloses est rompue par la chaleur de la vapeur (thermo), par des forces de cisaillement grâce à la soudaine décompression et l'évaporation de l'humidité (mécano) et à l'hydrolyse des liens glycosidiques (chimique). Ce prétraitement est accompagné d'une hydrolyse acide par des acides organiques provenant directement de la biomasse comme l'acide acétique (groupements acétates des xylanes) ou les acides glucuroniques (présents sur les chaînes de glucuronoxylanes) (Sun and Cheng 2002, Jacquet et al. 2015). Ces conditions acides peuvent conduire à la formation de produits de dégradation et d'inhibiteurs de la fermentation (furfural et dérivés). L'imprégnation avec H_2SO_4 , SO_2 ou CO_2 de la biomasse avant prétraitement permet de réduire sa durée, d'augmenter l'hydrolyse enzymatique, et de diminuer la production d'inhibiteurs de la fermentation (Morjanoff and Gray 1987, Ferreira-Leitao et al. 2010). L'explosion à la vapeur permet de diminuer la cristallinité de la cellulose et elle génère une délignification ainsi qu'une hydrolyse des hémicelluloses. Ses inconvénients majeurs sont la dégradation des sucres

constitutifs des hémicelluloses, la rupture incomplète de la matrice lignines-polysaccharides et la génération d'inhibiteurs de la fermentation due à la dégradation des sucres (furfural et 5-HMF) (Li et al. 2005).

b) Les prétraitements biologiques

Les prétraitements biologiques sont beaucoup moins étudiés que les prétraitements précédemment décrits.

Les prétraitements biologiques sont généralement basés sur l'action de microorganismes qui sécrètent un arsenal d'enzymes permettant d'obtenir une délignification qui augmente l'accessibilité de la cellulose et des hémicelluloses avant leur hydrolyse enzymatique par des cocktails enzymatiques dédiés. Il existe deux sources de microorganismes : fongiques et bactériens. Des champignons, les basidiomycètes, ont la capacité unique à rompre et à minéraliser la lignine. Les champignons de pourriture blanche sécrètent des enzymes lignocellulolytiques dans le milieu extracellulaire, alors que les champignons de pourriture marron sécrètent uniquement des enzymes cellulolytiques (Agbor et al. 2011). De ce fait, les études portent sur les champignons à pourriture blanche et notamment ceux qui dégradent sélectivement les lignines (Dias et al. 2010, Castoldi et al. 2014). Ils dégradent la lignine par action d'enzymes (laccases et peroxydases) mais également par dégradation oxydative grâce à la production de peroxyde d'hydrogène entraînant la réaction de Fenton (Fe^{2+} et H_2O_2) et la libération de radicaux libres (Wan and Li 2012, Zhao et al. 2012b). Ces radicaux libres réagissent avec les polysaccharides et la lignine d'une manière non-spécifique et facilitent l'accessibilité aux enzymes. En revanche, pour une utilisation industrielle, le taux de conversion de la biomasse est faible. De plus, les conditions de culture des microorganismes sont assez strictes (Wan and Li 2012) et longues (Agbor et al. 2011).

Même si cette voie est beaucoup moins étudiée, l'utilisation de bactéries présente des avantages par rapport aux champignons car les bactéries ne nécessitent pas de nutriments additionnels comme du glucose pour la croissance et s'utilisent dans une large gamme de pH. Néanmoins, elles peuvent nécessiter des conditions anaérobies (Mathews et al. 2015).

I.2.3. Hydrolyse enzymatique

Une hydrolyse est nécessaire pour monomériser les polymères en sucres fermentescibles (hexoses et pentoses). C'est une étape clé pour la fermentation ultérieure des sucres en molécules d'intérêt. L'hydrolyse enzymatique par rapport à l'hydrolyse acide présente l'avantage de nécessiter moins d'énergie et d'utiliser des conditions douces (Sarkar et al. 2012, Van Dyk and Pletschke 2012). L'hydrolyse enzymatique consiste à utiliser une large variété d'enzymes travaillant en synergie ou individuellement. La synergie implique que les enzymes coopèrent pour fractionner leurs substrats et que leurs activités conjuguées soient plus élevées

que leurs activités prises individuellement (Van Dyk and Pletschke 2012). Il existe une large variété d'enzymes et chaque enzyme à son substrat propre : cellulose, hémicelluloses et lignines. Les différents types d'enzymes sont présentés dans le Tableau 3. Pour le fractionnement de la cellulose et des hémicelluloses, ce sont principalement des glycoside hydrolases qui sont employées (xylanases, xylosidases, mannanases, cellulases, ...) (Shallom and Shoham 2003, Girio et al. 2010). Elles feront l'objet d'une étude dans le chapitre II. Des enzymes de type carbohydre-estérase interviennent également dans le fractionnement des hémicelluloses (Rakotoarivonina et al. 2011). Récemment, la mise en jeu de polysaccharide monooxygénases (initialement classées parmi les GH61) et de cellobiose déshydrogénases a montré son efficacité pour le fractionnement de la cellulose (Zifcakova and Baldrian 2012).

Tableau 3. Les principales activités enzymatiques requises pour fractionner les lignocelluloses (Van Dyk and Pletschke 2012)

Lignine	Laccase, manganèse peroxydase, lignine peroxydase
Hémicelluloses	<i>Endo</i> -xylanase, β -xylosidase, <i>endo</i> -mannanase, β -mannosidase, α -L-arabinofuranosidase, α -glucuronidase, α -galactosidase, féruloyl estérase, <i>p</i> -coumaroyl estérase, acétyl xylane estérase
Cellulose	Cellobiohydrolase, <i>endo</i> -glucanase, β -glucosidase

hydrolases répertoriées au sein de CAZy (<http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>). Cette classification permet de prédire par homologie de séquence, pour une enzyme nouvellement séquencée, son activité catalytique, son mécanisme d'action et son substrat. Les structures tertiaires des enzymes sont plus conservées que leurs structures primaires (séquence en acides aminés), on peut donc classer également les enzymes en fonction de leur repliement sous la notion de clans (Henrissat and Davies 1997). Les familles dans les clans sont supposées provenir d'un ancêtre commun. Il y a quatorze clans de GH-A à GH-N (Tableau 5).

Tableau 5. Classification des glycoside hydrolases en familles et en clans

Clan	Structure	Familles
GH-A	$(\beta/\alpha)_8$	1, 2, 5, 10, 17, 26, 30, 35, 39, 42, 50, 51, 53, 59, 72, 79, 86, 113, 128
GH-B	β -jelly roll	7, 16
GH-C	β -jelly roll	11, 12
GH-D	$(\beta/\alpha)_8$	27, 31, 36
GH-E	β -propeller à 6 pales	33, 34, 83, 93
GH-F	β -propeller à 5 pales	43, 62
GH-G	$(\alpha/\alpha)_6$	37, 63
GH-H	$(\beta/\alpha)_8$	13, 70, 77
GH-I	$\alpha + \beta$	24, 46, 80
GH-J	β -propeller à 5 pales	32, 68
GH-K	$(\beta/\alpha)_8$	18, 20, 85
GH-L	$(\alpha/\alpha)_6$	15, 65, 125
GH-M	$(\alpha/\alpha)_6$	8, 48
GH-N	Hélice β	28, 49

Source CAZy (<http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>)

II.1.2. Modes d'action

Les glycoside hydrolases peuvent être définies par leur mode d'action *endo* ou *exo*. Les *endo*-enzymes hydrolysent les liaisons glycosidiques à l'intérieur des chaînes de polysaccharides alors que les *exo*-enzymes hydrolysent à l'extrémité réductrice ou non-réductrice de polysaccharides ou d'oligosaccharides (Figure 7).

Il existe trois configurations différentes possibles pour la topologie du site actif des GH : poche, tunnel ou crevasse/sillon (Figure 7) (Henrissat and Davies 1997). Les *exo*-enzymes ont un site actif en forme de poche qui permet la reconnaissance de l'extrémité réductrice ou non-réductrice des polysaccharides ou d'oligosaccharides. Le reste du squelette est positionné à la surface de l'enzyme comme c'est le cas pour les β -xylosidases et les β -galactosidases. Les exoglucanases de type cellobiohydrolases (CBH) sont des *exo*-enzymes avec un site actif en

forme de tunnel. La cellulose est clivée en dimères de glucose (cellobiose) de manière processive à l'extrémité réductrice (CBH1) ou non-réductrice (CBH2) (Sanchez et al. 2003, Chundawat et al. 2011). Le cellobiose formé est relargué avec la chaîne polysaccharidique toujours liée au site actif. Les *endo*-enzymes ont un site actif en forme de crevasse ou sillon qui permet la fixation de la chaîne polysaccharidique par des interactions faibles avec les sous-sites composant le site actif (théorie des sous-sites présentés au § II.1.3). Le clivage des liaisons glycosidiques se fait à l'intérieur de la chaîne.

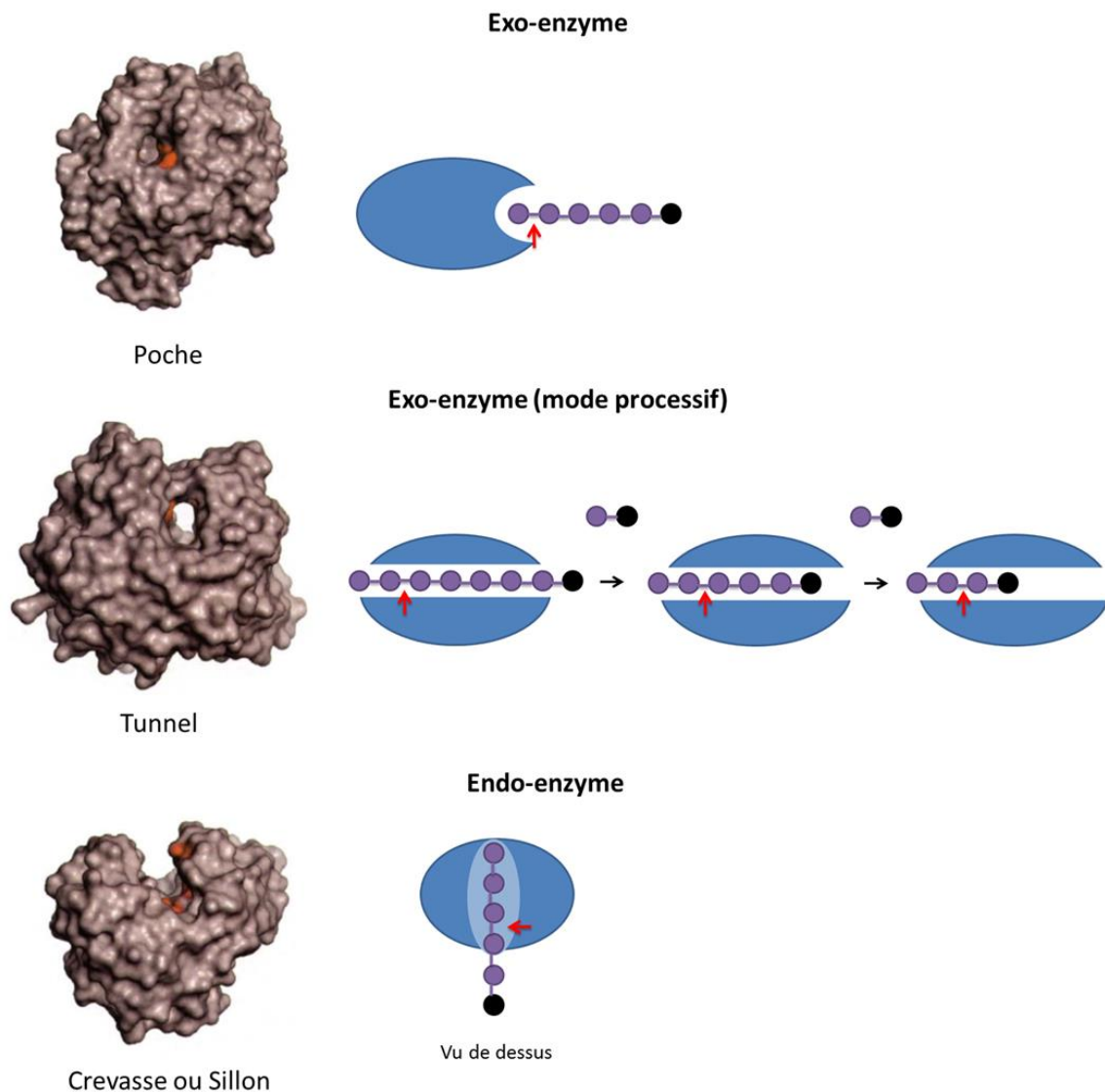


Figure 7. Mode d'action (*endo* ou *exo*) des glycoside hydrolases et topologie des sites actifs. (Les monosaccharides sont représentés par des cercles violets et les cercles noirs correspondent à l'extrémité réductrice. Les flèches en rouge correspondent au site de clivage de la chaîne polysaccharidique. Pour les *exo*-enzymes, le clivage des liaisons glycosidiques est représenté uniquement pour l'extrémité réductrice (d'après Davies and Henrissat, 1995).

Les glycoside hydrolases sont classées selon deux types de mécanisme, soit par rétention de configuration soit par inversion de configuration de la position anomérique (α ou β), selon Koshland (Koshland 1953). Le point commun de ces deux mécanismes est qu'ils impliquent une paire de résidus d'acides aminés de type carboxylique et qu'ils passent par un état de transition de type oxacarbénium (Rye and Withers 2000, Vuong and Wilson 2010).

Le mécanisme par inversion de configuration procède en une seule étape par une catalyse acide-base générale (Figure 8, a). Un des deux résidus impliqués dans la catalyse agit comme un acide et l'autre comme une base. Ils sont espacés d'environ 10 Å dans le site actif car la molécule d'eau doit pouvoir s'insérer entre la base et le sucre (Davies and Henrissat 1995). Le résidu acide « donne » un proton à l'oxygène de la liaison glycosidique alors que le résidu basique « capte » un proton de la molécule d'eau, ce qui augmente alors la nucléophilie de l'oxygène, facilitant par la suite l'attaque du carbone anomérique.

Le mécanisme par rétention de configuration procède en deux étapes en passant par un intermédiaire covalent appelé glycosyl-enzyme (Figure 8, b). La diade catalytique, séparée d'environ 5 Å, se compose d'un résidu jouant le rôle d'acide/base et l'autre de nucléophile. Dans la première étape, appelée glycosylation, le résidu acide/base agit comme acide en protonant le substrat alors que le résidu nucléophile provoque le départ du groupe partant et la formation de l'intermédiaire glycosyl-enzyme. Dans une deuxième étape, appelée déglycosylation, le résidu acide/base agit comme base en « captant » un proton d'une molécule d'eau qui attaque alors le carbone anomérique de l'intermédiaire glycosyl-enzyme.

Pour certaines enzymes à rétention de configuration, une réaction de synthèse appelée transglycosylation peut avoir lieu avec l'arrivée d'un nucléophile (généralement un alcool) autre qu'une molécule d'eau. Après la formation de l'intermédiaire glycosyl-enzyme, une molécule d'alcool pénètre dans le site actif ce qui conduit à la formation d'un glycoside avec une partie aglycone dépendant de la nature du nucléophile utilisé. La réaction de transglycosylation par synthèse enzymatique sera développée au § III.4.

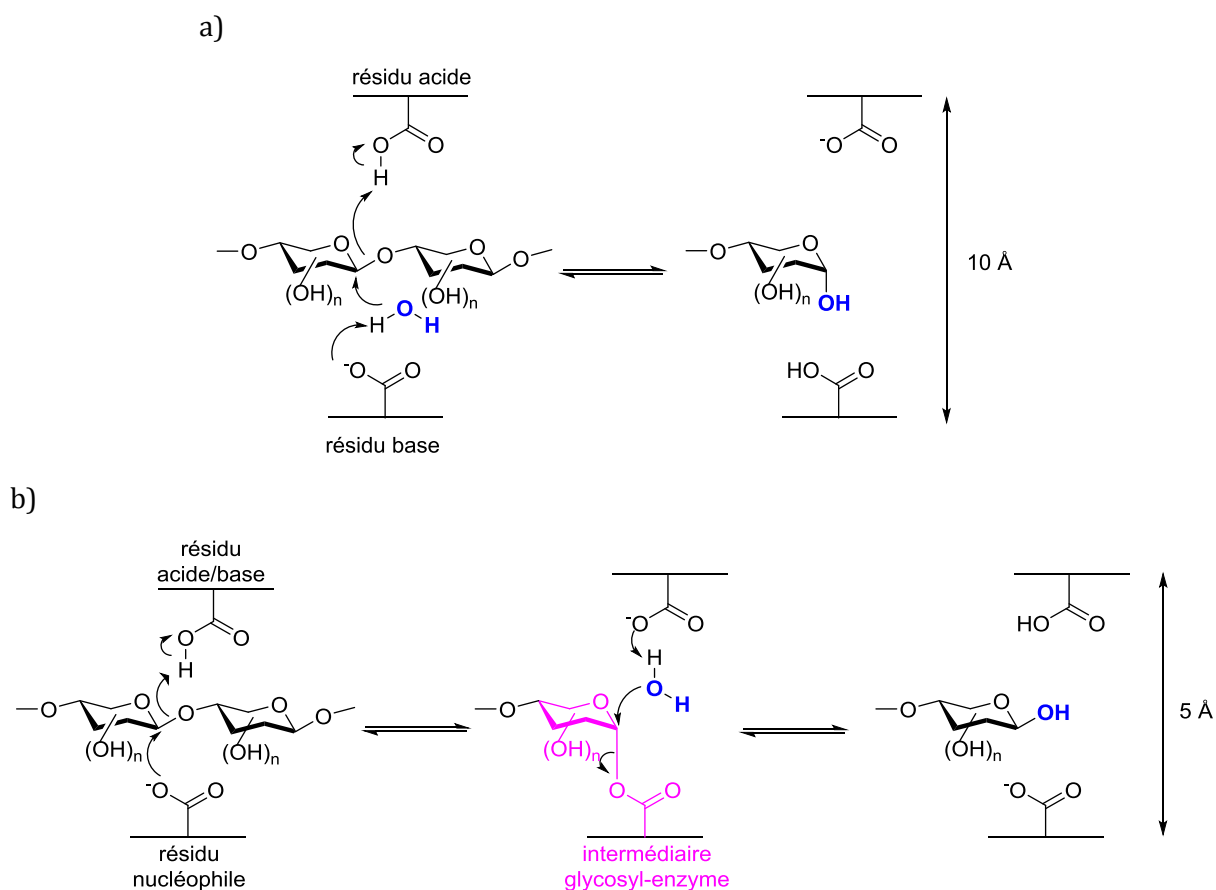


Figure 8. Mécanisme catalytique des glycoside hydrolases ; a) avec inversion de configuration anomérique et b) avec rétention de configuration anomérique.

II.1.3. Sous-sites catalytiques

Le site actif comporte également des résidus acides aminés qui entrent en interaction avec le ligand afin de faciliter sa reconnaissance et sa fixation (Torronen and Rouvinen 1997). Les acides aminés occupant le site actif sont regroupés en plusieurs sous-sites. Un sous-site est une région où les acides aminés sont en interaction avec le substrat par des liaisons faibles non covalentes de type liaison hydrogène, forces de Van der Waals ou « stacking ». Chaque sous-site interagit avec le substrat avec une affinité qui lui est propre (énergie d'interaction) (Thoma et al. 1970, Hiromi et al. 1973, Suganuma et al. 1978). La nomenclature pour les sous-sites est de $-n$ à $+n$, avec des nombres négatifs pour les sous-sites de l'extrémité non réductrice (partie glycone) et des nombres positifs pour l'extrémité réductrice (partie aglycone). Le clivage de la liaison glycosidique s'effectue entre les sous-sites -1 et $+1$ (Figure 9, a) (Davies et al. 1997). Le nombre de sous-sites varie d'une enzyme à une autre. La Figure 9, b) représente les interactions entre les six sous-sites d'une xylanase de la famille GH11 (Xyn11A) et un xylohexaose dans le site actif avec les résidus de la diade catalytique Glu78 et Glu171.

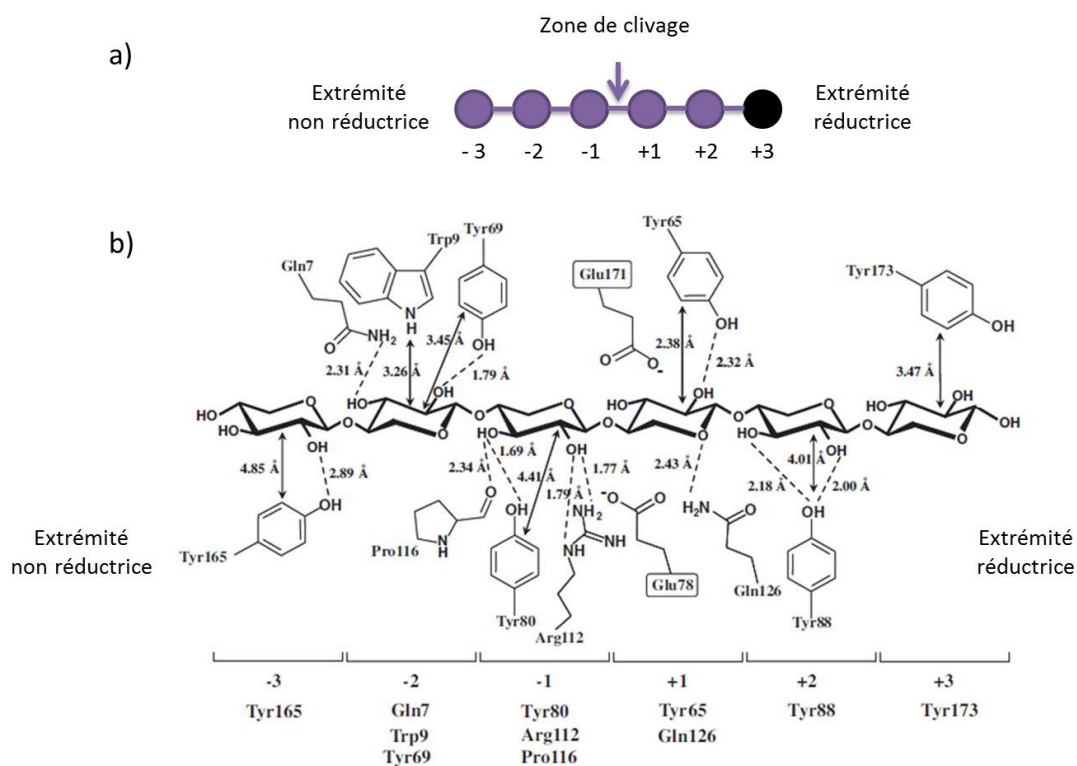


Figure 9. Théorie des sous-sites. a) Représentation des sous-sites (Davies et al. 1997) ; b) Représentation schématique du complexe xylohexaose-Xyn11A montrant les liaisons hydrogène (---) et les interactions de stacking (↔) entre les sous-sites et le substrat (Jommuengbout et al. 2009).

II.2. Les hémicellulases

La dépolymérisation complète des hémicelluloses nécessite l'action conjointe et synergique d'un large panel d'enzymes. Selon les types d'hémicelluloses, des enzymes différentes vont agir. Certaines auront pour rôle la dépolymérisation des chaînes principales constitutives des polysaccharides et d'autres seront des enzymes débranchantes qui vont éliminer les substitutions portées par les chaînes principales. Des glycoside hydrolases et des carbohydate estérases sont impliquées dans le fractionnement des hémicelluloses. Les GH vont hydrolyser les liaisons glycosidiques alors que les CE hydrolysent les liaisons esters des positions estérifiées par de l'acide acétique ou des acides phénoliques (acide férulique, acide *p*-coumarique).

La Figure 10 présente les activités hémicellulasiques requises pour dépolymériser les hémicelluloses présentées au § I.1.2 (xylanes, mannanes, ...).

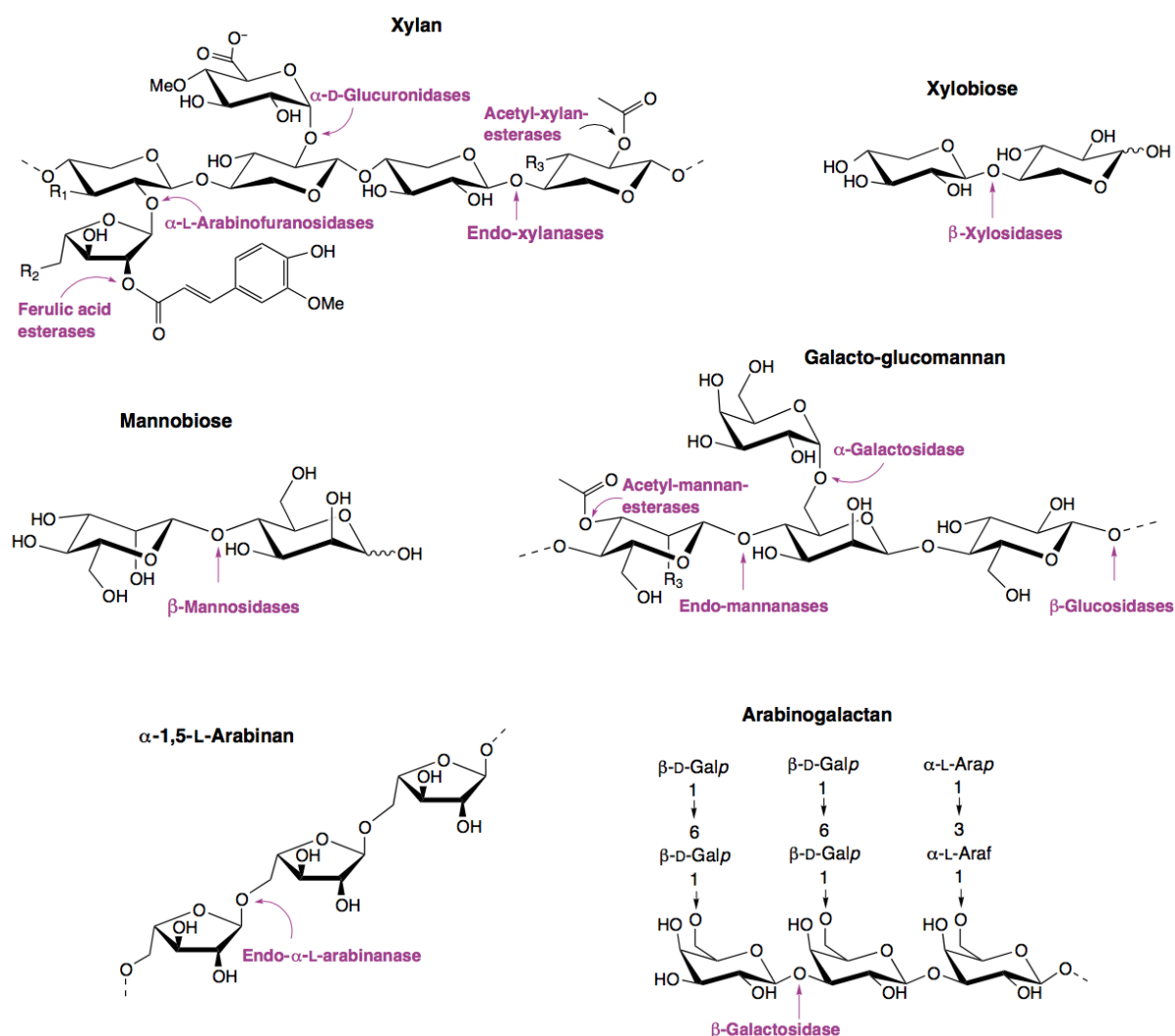


Figure 10. Les différentes hémicellulases intervenant dans la dépolymérisation des hémicelluloses (Shallom and Shoham 2003)

Seules les enzymes impliquées dans la dépolymérisation des xylanes seront présentées ci-dessous.

II.2.1. Les xylanases

L'une des principales activités requises pour la dépolymérisation des xylanes est l'activité xylanase. Les xylanases (EC 3.2.1.8) sont des *endo*-enzymes qui permettent l'hydrolyse des liaisons β -1,4 à l'intérieur des chaînes d'hétéroxylanes. Leur action conduit à la formation de xylo-oligosaccharides de DP variable qui peuvent être substitués. Certaines xylanases, telles que les xylanases de la famille GH10 produisent également du xylose. Selon CAZy, les xylanases sont classées en sept familles de GH : 5, 8, 10, 11, 30, 43 et 51. Les GH 5, 10, 11, 30 et 51 sont des enzymes à rétention de configuration anomérique alors que les GH 8 et 43 sont à inversion de configuration anomérique. Les familles 10 et 11 sont les plus répandues et étudiées, elles feront l'objet d'une description détaillée dans un paragraphe ultérieur (§ II.4.2).

II.2.2. Les β -xylosidases

Les β -xylosidases (EC 3.2.1.37) sont des *exo*-enzymes qui permettent l'hydrolyse de xylo-oligosaccharides (xylobiose, xylotriose) généralement produits par l'action des xylanases. Elles n'agissent pas sur les xylanes polymériques. Elles sont classées en dix familles : GH 1, 3, 30, 39, 43, 51, 52, 54, 116 et 120. Ce sont des enzymes nécessaires pour la production de monomères de D-xylose.

II.2.3. Les α -L-arabinofuranosidases

Le rôle des α -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55) est de cliver les liaisons osidiques α -1,2 et/ou α -1,3 entre un résidu arabinofuranose et un résidu xylopyranose de la chaîne principale des xylanes. Ces enzymes appartiennent aux familles GH 2, 3, 43, 51, 54 et 62.

II.2.3. Les α -glucuronidases

Les α -glucuronidases (EC 3.2.1.131) appartiennent aux familles GH67 et GH115. Elles sont responsables du clivage des liaisons entre l'acide glucuronique et son dérivé 4-*O*-méthylé positionnés en *O*-2 de certains résidus xylose de la chaîne principale de xylanes. Cependant, ce clivage s'effectue lorsque les acides glucuroniques sont attachés à l'extrémité non-réductrice des xylo-oligosaccharides (Puls 1997). Elles agissent donc après l'action des xylanases.

II.2.4. Les estérases

Les acétyl xylane estérases (EC 3.1.1.72) et les féruloyl estérases (EC 3.1.1.73) sont classifiées parmi les carbohydate estérases. Les acétyl xylane estérases sont responsables de l'hydrolyse des liaisons esters engageant les groupements acétates portés par certains résidus xylose en position *O*-2 et/ou *O*-3. Alors que les groupements acétates sont largement répandus au sein des divers xylanes, l'action des féruloyl estérases est plus limitée car celles-ci hydrolysent les liaisons esters des substituants arabinose estérifiés en position *O*-5 au sein des xylanes des plantes graminées.

II.3. Les xylanases GH10 et GH11

Les xylanases des familles GH10 et GH11 sont les plus répandues dans la nature et donc les mieux caractérisées. Ce sont des *endo*-enzymes qui clivent les liaisons β -1,4 à l'intérieur des chaînes de xylanes et qui agissent par rétention de configuration anomérique. Cependant, elles diffèrent de par leur structure tridimensionnelle, leur spécificité de substrat et leur mode d'action.

II.3.1. Structures tridimensionnelles et sites actifs des xylanases GH10 et GH11

Les xylanases GH10 font partie du clan GH-A avec une structure $(\beta/\alpha)_8$ qui a la forme d'un saladier (Figure 11, a). La forme peut varier d'une forme circulaire à elliptique (Pollet et al. 2010a).

Les xylanases GH11 font partie du clan GH-C avec une structure en β -*jelly roll* (Figure 11, b). La structure est hautement conservée et ressemble à une main droite partiellement fermée et consiste en deux feuillets β antiparallèles en torsion et une seule hélice α (Torronen and Rouvinen 1997). Les deux feuillets β constituent les « doigts » alors que la partie en torsion du feuillet β B et l'hélice α forme la « palme » de la main. La boucle entre les feuillets β B7 et B8 forme un « pouce ». Une « corde » composée d'une boucle entre les brins B6 et B9 relie les doigts et la base du pouce, fermant partiellement le site actif.

Le site actif des GH10 forme un sillon large et peu profond alors que celui des GH11 forme une crevasse profonde et structurée (présence de feuillets). Le sillon peu profond des xylanases GH10 leur permet d'être moins restrictives quant aux substrats et peut expliquer les différences catalytiques entre les xylanases GH10 et GH11 (Biely et al. 1997).

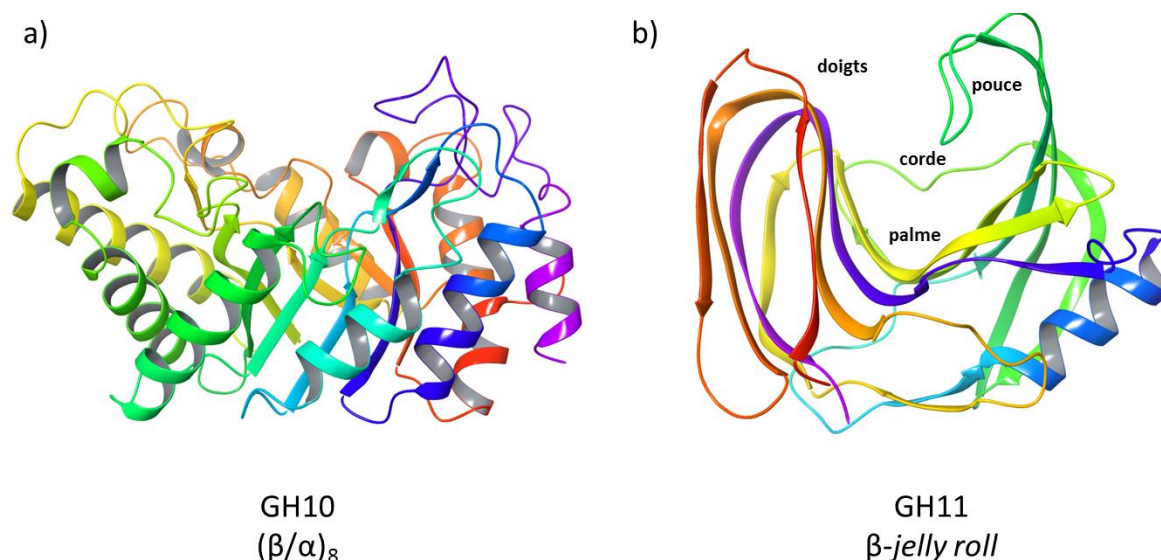


Figure 11. Structures tridimensionnelles des xylanases. a) Xylanase GH10 de *Trichoderma reesei* (PDB:4VX0) ; b) Xylanase GH11 de *Thermobacillus xylanilyticus*.

Les enzymes agissant par rétention de configuration anomérique passent par un intermédiaire glycosyl-enzyme et par deux états de transition. Afin de comprendre en détail le mécanisme et les caractéristiques structurales concernant l'intermédiaire glycosyl-enzyme formé durant la catalyse (étape de glycosylation), un inhibiteur, le 2',4'-dinitrophényl 2-désoxy-2-fluoro-xylobioside a été utilisé en présence de différentes xylanases GH10 et GH11 (Withers et al. 1987, Miao et al. 1994). L'intermédiaire formé est le 2-désoxy-2-fluoro-xylobiosyl-enzyme (2F-xylobiosyl-enzyme) (Figure 12). L'atome de fluor en position 2 permet de ralentir la formation et l'hydrolyse de l'intermédiaire (ion oxacarbénium) par déstabilisation de l'état de transition et en éliminant d'importantes interactions (liaisons hydrogènes) en position 2 (Sidhu et al. 1999). Cette stabilisation a permis d'obtenir des cristaux de l'intermédiaire glycosyl-enzyme piégé et ainsi d'en déterminer la structure conformationnelle.

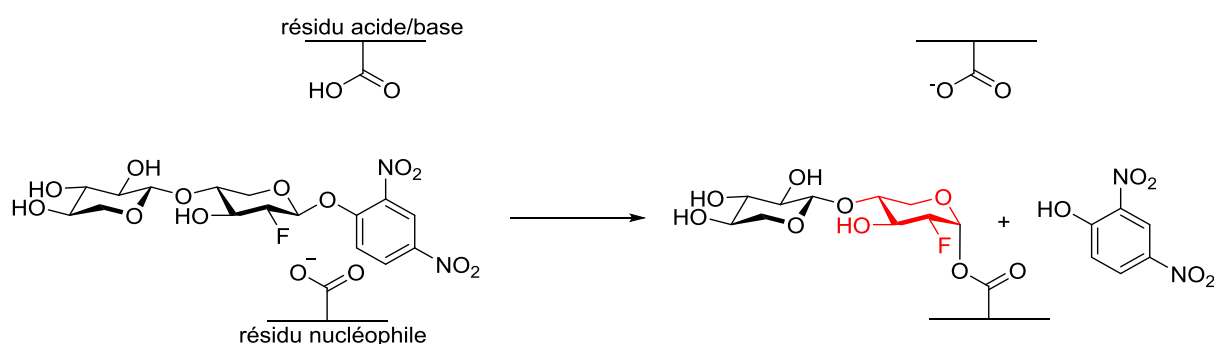


Figure 12. Formation de l'intermédiaire 2F-xylobiosyl-enzyme dans le site actif de différentes xylanases.

Lors de l'étape de glycosylation, les substrats localisés dans le sous-site -1 subissent des changements de conformation appelés distorsion du substrat afin d'optimiser les interactions enzyme-substrat et de permettre l'étape de glycosylation et de déglycosylation (Davies et al. 2012). Le rôle de la distorsion du substrat est controversé (Kankainen et al. 2004). D'après Notenboom *et al.* (Notenboom et al. 2000), les xylanases GH10 passent par un itinéraire classique : ${}^4C_1 \rightarrow {}^1S_3 \rightarrow {}^4H_3 \rightarrow {}^4C_1$ alors que les xylanases GH11 passent par l'itinéraire ${}^4C_1 \rightarrow {}^2H_3 \rightarrow {}^2S_0 \rightarrow {}^{2,5}B \rightarrow {}^4C_1$.

Les xylanases GH11, lors de la formation de l'intermédiaire glycosyl-enzyme, conduisent à une distorsion du sucre inhabituelle de type bateau ${}^{2,5}B$ (Figure 13, b) (Sabini et al. 1999, Sidhu et al. 1999). Cette conformation permet la coplanarité des positions C5, O5, C1 et C2, ce qui remplit les conditions stéréoelectroniques requises pour faciliter l'attaque nucléophile durant l'étape de déglycosylation (Sinnott 1990, Sabini et al. 1999, Notenboom et al. 2000, Sabini et al. 2001, Soliman et al. 2009). Les xylanases GH10 conduisent à un intermédiaire glycosyl-enzyme pour lequel le sucre adopte une conformation 4C_1 qui ne satisfait pas ce critère (Figure 13, a) (Davies et al. 1998, Andrews et al. 2000, Ducros et al. 2000).

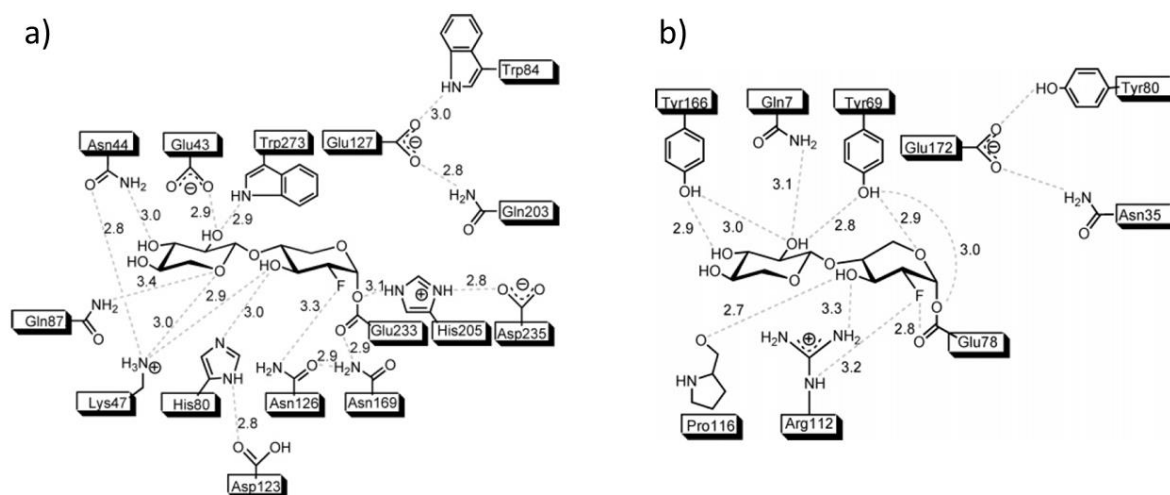


Figure 13. Schéma des interactions protéine-ligand dans le site actif du complexe 2F-xylobiosyl-enzyme. a) Complexe 2F-xylobiosyl-Cex (GH10) - Conformation de l'intermédiaire 4C_1 ; b) Complexe 2F-xylobiosyl-Bcx (GH11) - Conformation de l'intermédiaire $^{2,5}B$ (Wicki et al. 2007). [Cex = xylanase de *Cellulomonas fimi* ; Bcx = xylanase de *Bacillus circulans*]

II.3.2. Différences de modes d'action hydrolytique

a) Spécificité de substrat

L'activité des xylanases est affectée par le degré de substitution des xylanes. Les xylanases GH10 présentent une large spécificité de substrat et sont moins sensibles au taux de substitution des xylanes (Bonnin et al. 2006). Les xylanases GH11 sont plus restrictives quant aux substrats qu'elles peuvent utiliser. Les xylanases GH11 peuvent accepter des substituants de la chaîne principale sur la position *O*-2 du xylose lié au sous-site -2 et sur les positions *O*-2 et *O*-3 des xyloses liés au sous-site -3 et +2 (Vardakou et al. 2008, Dumon et al. 2012), alors que les GH10 tolèrent des xyloses substitués dans les sous-sites -3, -2, +1 et +2 sur les positions *O*-2 et/ou *O*-3 (Biely et al. 1997, Beaugrand et al. 2004, Pell et al. 2004, Pollet et al. 2010a). Les différences de liaisons des substrats aux sous-sites des xylanases GH10 et GH11 sont illustrées sur la Figure 14. De plus, Xie *et al.* ont montré que quatre xylanases GH10 sont plus actives sur un xylotriose substitué par un arabinose que sur un xylotriose non substitué, montrant que les substituants de la chaîne de xylanes contribueraient à la reconnaissance dans la liaison au substrat (Xie et al. 2006).

Les xylanases GH10 sont capables de cliver la liaison glycosidique à côté d'un xylose substitué ou doublement substitué vers l'extrémité non-réductrice et requièrent deux xyloses non substitués entre les résidus branchés (Pollet et al. 2010a). Les xylanases GH11 hydrolysent préférentiellement des régions non substituées, car elles ne peuvent pas cliver à côté d'un xylose substitué et nécessitent la présence de trois résidus xylopyranose consécutifs non substitués pour agir (Figure 15) (Katapodis et al. 2003, Vardakou et al. 2003, Pollet et al. 2010a).

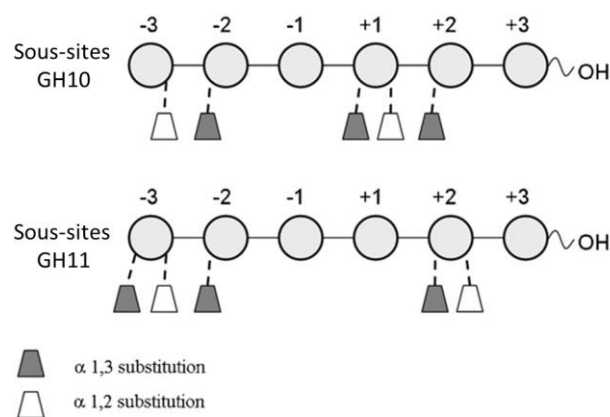


Figure 14. Capacité des sous-sites à se lier à des substituants de la chaîne principale de xylanes pour les xylanases GH10 et GH11.

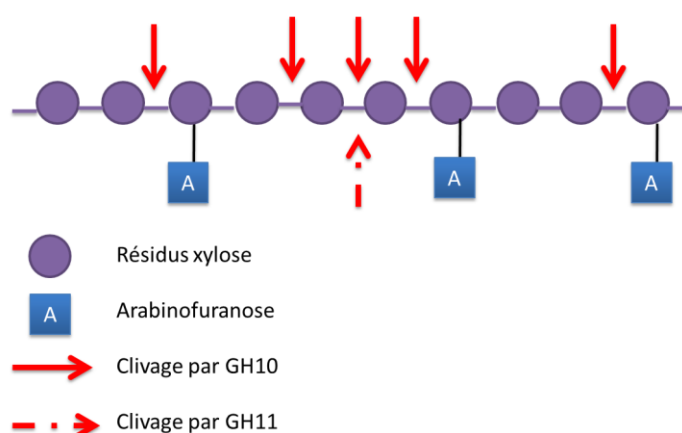


Figure 15. Clivage des liaisons glycosidiques des xylanases GH10 et GH11 (d'après Pollet et al. 2010).

De par leurs spécificités structurales, les xylanases GH10 produisent majoritairement du xylose et du xylobiose alors que les xylanases GH11 produisent essentiellement du xylobiose, du xylotriose et des XOS (xylo-oligosaccharides) de DP supérieurs substitués (Biely et al. 1997, Pollet et al. 2010a). La capacité des xylanases GH10 à produire du xylose et des XOS de faible DP peut être attribuée aux fortes liaisons des substrats avec les sous-sites -2, -1 et +1 (Fujimoto et al. 2004, Pollet et al. 2010a).

b) Solubilité du substrat

Plusieurs études ont permis de mettre en évidence que la solubilité du substrat a une influence sur l'activité des xylanases GH10 et GH11 (Courtin and Delcour 2001, Beaugrand et al. 2004, Maes et al. 2004, Bonnin et al. 2006). Deux enzymes de familles GH10 (Tx-xyn10) et GH11 (Tx-xyn11) provenant de *Thermobacillus xylanilyticus* ont été étudiées pour connaître leur mode d'action lors du fractionnement du son de blé désamidonné (Beaugrand et al. 2004). Après 24 h de traitement, plus de 50% d'arabinoxylanes sont libérés par la Tx-xyn11 alors que 25% seulement d'arabinoxylanes sont libérés par la Tx-xyn10. Le degré de substitution des

arabinoxylanes (AX) libérés et leur degré de polymérisation sont également différents. Dans le cas de la Tx-xyn10, les produits majoritairement libérés sont le xylose et le xylobiose et le ratio Ara : Xyl des produits libérés s'élève à 1:2,5. Dans le cas de la Tx-xyn11, les produits majoritaires sont le xylobiose, le xylotriose et le xylo-tétraose et le ratio Ara : Xyl des produits libérés est de 1:4. Cette étude montre bien que les xylanases GH10 sont moins sensibles au degré de substitution de la chaîne de xylanes. La vitesse d'hydrolyse est également différente. Après 1 h de réaction, le rendement d'hydrolyse des xylanes du son de blé est proche du maximum pour la Tx-xyn11 alors que la Tx-xyn10 présente une action plus progressive. L'action simultanée des deux xylanases Tx-xyn11 et Tx-xyn10 donne lieu à des produits d'hydrolyse présentant un ratio Ara : Xyl similaire à celui obtenu avec Tx-xyn11 seule (1:4). Il s'est avéré que les deux enzymes n'agissent pas en synergie afin de décomposer les xylanes du son de blé désamidonné mais qu'elles agissent à la suite l'une de l'autre. La Tx-xyn11 qui agit plus efficacement sur les xylanes insolubles libère des xylo-oligosaccharides solubles (fortement substitués par de l'arabinose) à partir du son de blé puis la Tx-xyn10 agit sur ces xylo-oligosaccharides produits par Tx-xyn11.

Pour conclure sur cette étude, ces deux enzymes ont des actions distinctes ; les xylanases de la famille des GH11 hydrolysent plus facilement les xylanes insolubles peu substitués alors que les GH10 hydrolysent les régions les plus substituées (Beaugrand et al. 2004).

II.3.3. Différences de modes d'action en transglycosylation

Les xylanases GH10 et les GH11 étant des enzymes à rétention de configuration anomérique, elles ont la capacité à catalyser des réactions de transglycosylation.

La plupart des xylanases décrites dans la littérature pour catalyser des réactions de transglycosylation sont des xylanases GH10 grâce à leur versatilité vis-à-vis des substrats. Une seule xylanase GH11 a été utilisée pour ses capacités de transglycosylation. Cette xylanase est décrite comme ayant la particularité d'accepter comme nucléophile uniquement des accepteurs de type polyphénols (Chiku et al. 2008, Chiku et al. 2009).

La synthèse de β -xylopyranosides par des xylanases sera développée au § III.4.3.

III. Synthèse des β -xylopyranosides

Cette partie a pour objectif de présenter les différentes méthodes chimiques et biotechnologiques développées jusqu'à présent pour synthétiser des β -xylopyranosides avec leurs avantages et leurs inconvénients. Selon les méthodologies, la matière première utilisée sera le xylose pour les synthèses chimiques et des xylosides activés en position anomérique, des oligoxylosides ou des xylanes d'origine végétale pour les synthèses enzymatiques.

III.1. Synthèse chimique des β -xylopyranosides

III.1.1. La glycosylation de Fischer

La glycosylation de Fischer (Fischer 1893) est la réaction d'un sucre non protégé chauffé à reflux avec un alcool en présence d'un catalyseur acide pour former le glycoside correspondant. En dépit de plusieurs limitations, la glycosylation de Fischer a été largement utilisée pour la synthèse de glycosides classiques tels que des alkyl ou des aryl glycosides (Demchenko 2008). Les principaux inconvénients de cette méthode sont la sensibilité des sucres aux conditions de réactions (catalyse acide fort, température) et, dans la plupart des cas, la formation d'un mélange d'isomères α/β de pyranosides et furanosides en fonction de la nature du sucre et du contrôle cinétique ou thermodynamique de la réaction (Bishop and Cooper 1962, Ferrier and Hatton 1968, Capon 1969).

D'un point de vue mécanistique, la réaction procède en quatre étapes successives : 1) la formation des furanosides, 2) l'anomérisation des furanosides, 3) l'expansion du cycle des furanosides aux pyranosides et 4) l'anomérisation des pyranosides. Dans le cas du D-xylose, l'isomère α -xylopyranoside, produit thermodynamique, est généralement le produit majoritaire car il est stabilisé par l'effet anomère (Ferrier and Hatton 1968) (Figure 16).

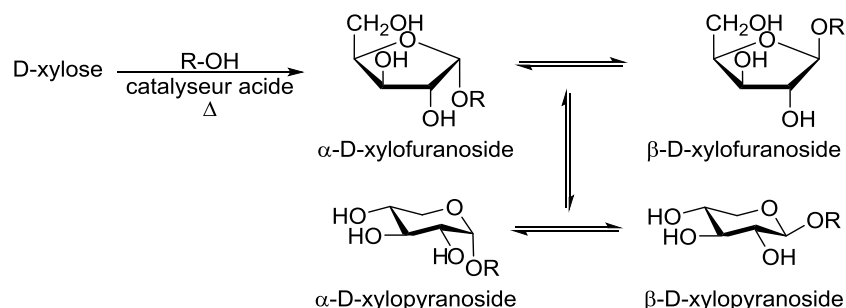


Figure 16. Synthèse de xylosides par la méthode de Fischer.

La glycosylation de Fischer a été utilisée pour la synthèse d'alkyl xylopyranosides à partir de D-xylose, mais également à partir d'hétéroxylanes ou directement à partir de la

biomasse lignocellulosique en une seule étape. Cette méthode permet d'obtenir principalement l'anomère α , mais certaines réactions conduisent à une quantité significative de β -xylopyranosides (Figure 17).

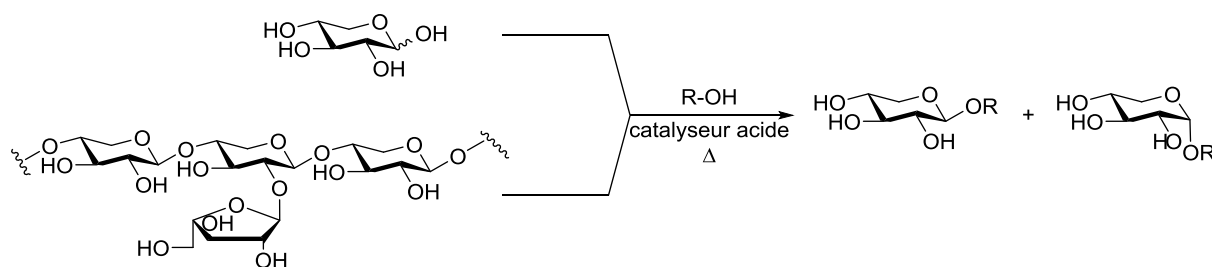


Figure 17. Synthèse d'alkyl xylopyranosides en une seule étape à partir de D-xylose ou d'hétéroxylanes.

Les méthyl xylosides ont été synthétisés à partir de D-xylose en présence de plusieurs catalyseurs acides comme l'acide chlorhydrique (Bishop and Cooper 1962, Ferrier and Hatton 1968, Capon 1969), l'acide sulfurique (Wu and Serianni 1991) ou une résine acide (Cadotte et al. 1952, McGeary et al. 2004, Roy and Bordoloi 2008) en présence de méthanol comme solvant. Dans ces réactions, des mélanges de méthyl xylofuranosides et méthyl xylopyranosides sont obtenus. Selon les conditions de la réaction, les pourcentages des isomères obtenus diffèrent. A température ambiante, sous contrôle cinétique, les xylofuranosides sont obtenus majoritairement (ratio fur/pyr : 93/7) avec un ratio 1:1 pour les anomères α/β . Lors d'un chauffage à reflux de la réaction, donc sous contrôle thermodynamique, un ratio opposé (fur/pyr : 8/92) est observé, l'anomère α -pyranoside étant le composé majoritaire (α/β : 2/1) (Tableau 6).

Tableau 6. Pourcentages de méthyl xylosides obtenus à partir de D-xylose. (Bishop and Cooper 1962, Wu and Serianni 1991)

Conditions	β -pyr	α -pyr	β -fur	α -fur
MeOH, H ₂ SO ₄ , 24 h à ta	4	2	50	43
MeOH, HCl, 20 h, reflux	32	60	6.5	1.5

(β -pyr: Méthyl β -D-xylopyranoside, α -pyr: Méthyl α -D-xylopyranoside, β -fur: Méthyl β -D-xylofuranoside, α -fur: Méthyl α -D-xylofuranoside)

Le Tableau 7 montre clairement que les éthyl xylofuranosides sont formés en premier lors de la réaction avec de l'éthanol à 35°C (fur/pyr: 93/7 après 2 h). Pour des temps plus longs, les xylopyranosides sont ensuite obtenus majoritairement (fur/pyr: 25/75 après 72 h, fur/pyr: 12/88 après 120 h).

Tableau 7. Pourcentages d'éthyl xylosides obtenus à partir de D-xylose avec du HCl dans l'éthanol à 35°C (Ferrier and Hatton 1968).

Temps (h)	β -pyr	α -pyr	β -fur	α -fur
2	2	1	54	43
12	13	7	47	34
72	49	26	14	11
120	56	32	7	5

(β -pyr: Ethyl β -D-xylopyranoside, α -pyr: Ethyl α -D-xylopyranoside, β -fur: Ethyl β -D-xylofuranoside, α -fur: Ethyl α -D-xylofuranoside)

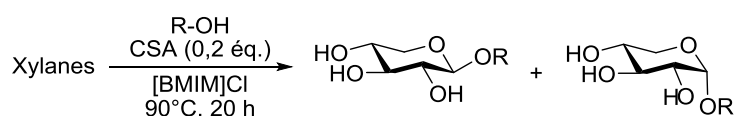
Plusieurs catalyseurs acides ont été utilisés en présence d'alcools gras pour synthétiser des xylosides en utilisant la méthode de Fischer : l'acide sulfurique ou l'acide *p*-toluènesulfonique (APTS) (Davis and Letton 1985, Damez et al. 2007), le chlorure d'acétyle (Ballou et al. 1951, Damez et al. 2007), une résine acide (Damez et al. 2007) ou une quantité catalytique d'acide de Lewis (Auge and Sizun 2009).

Les octyl xylopyranosides ont été synthétisés à partir d'une quantité catalytique d'acide de Lewis avec ou sans liquide ionique. La présence d'un liquide ionique comme solvant a permis une faible augmentation des rendements de la réaction sans toutefois modifier la sélectivité en α (Auge and Sizun 2009).

Les réactions de xylosylation par la méthode de Fischer peuvent être également réalisées directement à partir d'hétéroxylanes, ou de la biomasse lignocellulosique en une seule réaction pour la synthèse d'alkyl xylosides (Bouxin et al. 2010, Sekine et al. 2013).

Récemment, une conversion directe de xylanes a été réalisée pour la synthèse d'hexyl, d'octyl et de décyl xylopyranosides avec l'utilisation d'un catalyseur acide [acide 10-camphosulfonique (CSA)] dans un liquide ionique [le chlorure de 1-*n*-butyl-3-méthylimidazolium ([BMIM]Cl)]. Ce dernier permet de dissoudre les xylanes et ainsi d'améliorer leur conversion (Sekine et al. 2013). Les alkyl xylosides sont obtenus avec de bons rendements après l'extraction du brut de réaction dilué dans l'acétate d'éthyle, avec majoritairement l'anomère α (Tableau 8).

Tableau 8. Transglycosylation des xylanes avec des alcools gras en utilisant CSA dans le liquide ionique [BMIM]Cl



Alcools gras (equiv.)	Alkyl xylosides (mg par g de xylanes)	Ratio α/β
Hexanol (30)	395	65:35
Octanol (30)	690	65:35
Décanol (20)	285	60:40

Les alkyl xylosides ont également été synthétisés à partir de biomasse lignocellulosique comme le son et la paille de blé qui sont des co-produits agricoles riches en xylanes. Cette méthode a été développée par la Société ARD (Pomacle-Bazancourt). Une réaction en une seule étape est décrite avec l'obtention de bons rendements en présence d'acide sulfurique et d'alcools gras à 90-100°C (Marinkovic and Estrine 2010, Marinkovic et al. 2012, Seguin et al. 2012, Hausser et al. 2013). Cependant les alkyl xylosides ne sont pas isolés mais obtenus en mélange avec des L-arabinosides (Figure 18).

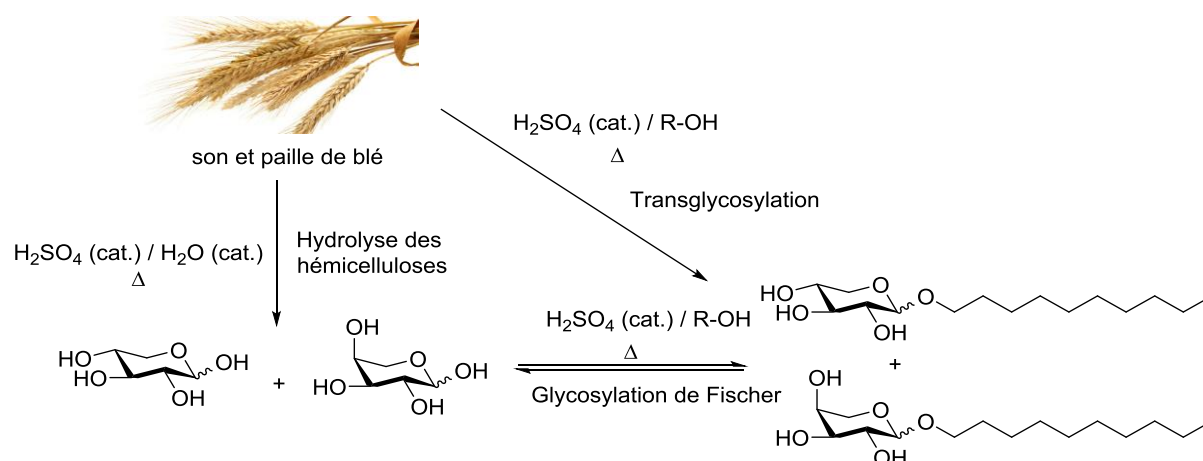


Figure 18. Illustration de la conversion du son et de la paille de blé en alkyl pentosides (les furanosides sont omis pour plus de clarté) (Marinkovic and Estrine 2010).

III.1.2. Synthèse à partir de xylose peracétylé

La réaction du 1,2,3,4-tétra-*O*-acétyl-β-D-xylopyranose en présence d'un acide de Lewis ($\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, SnCl_4 ,...) et d'un alcool est une méthode générale pour la synthèse de β-xylopyranosides (Figure 19). L'anomère β du xylose peracétylé est obtenu sous contrôle cinétique en présence de D-xylose et d'acétate de sodium dans l'anhydride acétique à 100°C (Konstantinovic et al. 2001, Oldham et al. 2013). L'anomère β est préféré à l'anomère α pour la réaction de glycosylation car il est plus réactif grâce à la participation du groupement voisin *trans*-acétate en position C-2 (Mabic et al. 1993, Liu et al. 1996, Mikata et al. 2001, Keyari and Polt 2010).

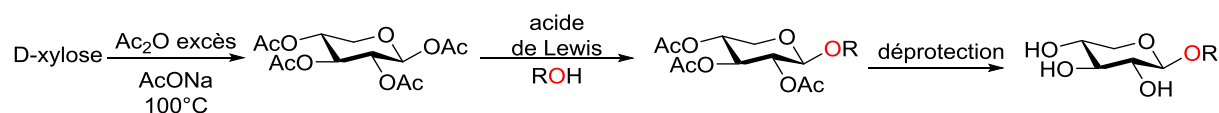


Figure 19. Synthèse de β-D-xylopyranosides *via* le 1,2,3,4-tétra-*O*-acétyl-β-D-xylopyranose.

Le mécanisme implique la formation d'un ion oxacarbénium et d'un cation ponté (Figure 20), conduisant sélectivement aux β-xylopyranosides sous conditions cinétiques (Contour et al. 1989, Konstantinovic et al. 2001). L'addition d'une quantité inférieure à 1 équivalent de

triéthylamine minimise l'anomérisation des réactifs et des produits et conduit à une bonne sélectivité en β (Yamaguchi et al. 1990, Johnsson et al. 2007a). Des co-produits peuvent être formés pendant la réaction comme le xylopyranoside désacétylé en position C-2 (Liu et al. 1996, Konstantinovic et al. 2001, Lefever et al. 2012).

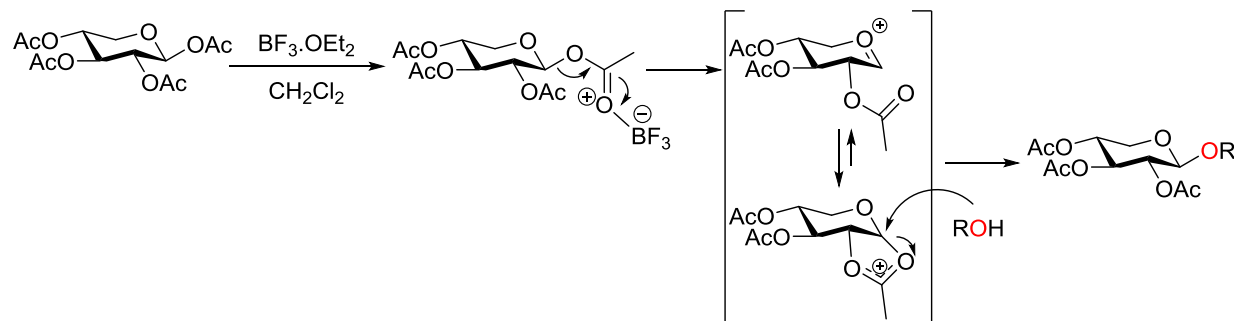


Figure 20. Mécanisme de glycosylation en présence de $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ *via* un cation ponté.

La glycosylation est effectuée le plus souvent avec du $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ comme acide de Lewis et le 1,2,3,4-tétra-*O*-acétyl- β -D-xylopyranose dans le dichlorométhane (CH_2Cl_2). Cette réaction permet la synthèse de xylopyranosides avec comme aglycones des chaînes alkyles (Lopez and Fernandez-Mayoralas 1994, Konstantinovic et al. 2001, Petrovic et al. 2006, Garcia-Garcia et al. 2011, Xu et al. 2012, Holmqvist et al. 2013, Oldham et al. 2013), des dérivés d'acides aminés (Keyari and Polt 2010, Lefever et al. 2012), des groupements naphtyles (Mani et al. 1998, Mani et al. 2004) et des groupements catéchyles (Mabic et al. 1993) avec des rendements de 33 à 79%. L'utilisation de 1,2,3,4-tétra-*O*-benzoyl- α -D-xylopyranose (Fletcher and Hudson 1947) minimise la formation de co-produits et augmente généralement les rendements obtenus (Xu et al. 2012).

De nombreux acides de Lewis ont été utilisés mais le triflate de scandium ($\text{Sc}(\text{OTf})_3$) et le tribromure d'indium (InBr_3) sont d'excellents promoteurs de la glycosylation du xylose peracétylé. Dans le cas de la Fmoc-L-Sérine (fluorénylméthoxycarbonyl-L-sérine), une bonne sélectivité en β et de bons rendements sont obtenus (68-97%) (Lefever et al. 2012). Le $\text{Sc}(\text{OTf})_3$ est utilisé en quantité stoechiométrique car il reste associé avec l'acétate pour produire un acide de Brönsted, alors que InBr_3 est utilisé en quantité catalytique car il peut se dissocier de l'acétate pour former l'acide acétique et régénérer l'acide de Lewis (Figure 21).

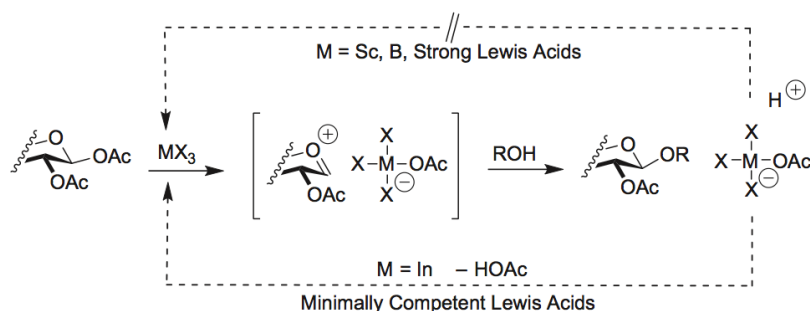


Figure 21. Réactions de glycosylation avec InBr_3 ou un acide de Lewis plus fort $\text{Sc}(\text{OTf})_3$ (Lefever et al. 2012).

Pour les alcools aromatiques, la réaction de glycosylation est généralement plus difficile.

Le phényl β -D-xylopyranoside acétylé a été obtenu à partir de xylose peracétylé et de phénol avec du APTS comme catalyseur car ce dernier favorise la formation sélective de l'anomère β (Montgomery et al. 1942, Lopez and Fernandez-Mayoralas 1994), contrairement aux acides de Lewis, pour lesquels la présence de phénol conduit à la formation d'un mélange d'anomères α et β de xylopyranosides acétylés.

La glycosylation du dihydroxynaphtalène est également une tâche difficile. Selon les positions des hydroxyles sur le cycle aromatique, une double glycosylation peut se produire conduisant à des bis-xylopyranosides avec des rendements de 22 à 96%. Dans certains cas, il n'y a pas de réaction de glycosylation à cause de la gêne stérique et des liaisons hydrogènes intramoléculaires avec les 1,8-, 2,3- et 1,2-dihydroxynaphtalènes, ce qui diminue la réactivité des groupements hydroxyles (Johnsson et al. 2007b). Pour obtenir une mono-xylosylation, il est nécessaire de protéger l'un des groupements hydroxyles (Mani et al. 2004, Johnsson et al. 2007a) ou d'utiliser une méthode sur support solide (Jacobsson and Ellervik 2002). Cette dernière stratégie est effectuée dans le CH_2Cl_2 sous activation avec $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$. Une réaction de désacétylation conduit à la déprotection du xylopyranoside et au clivage simultané de la liaison avec la résine. Les rendements obtenus sont raisonnables (6-42%) (Figure 22).

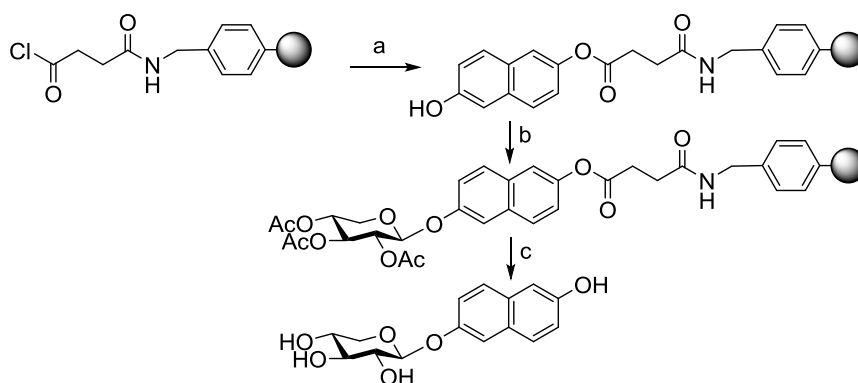


Figure 22. Synthèse du 2-(6-hydroxynaphtyl)-β-D-xylopyranoside (42%).

(a) 2,6-dihydroxynaphtalène, CH_2Cl_2 , pyridine, diméthylaminopyridine, ta, une nuit. (b) 1,2,3,4-tetra-*O*-acétyl-β-D-xylopyranose, CH_2Cl_2 , $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, ta, 45 min. (c) CH_2Cl_2 , MeOH, NaOMe/MeOH, ta, 1 h.

III.1.3. La réaction de Koenigs-Knorr

La réaction de Koenigs-Knorr consiste en la réaction d'un glycoside protégé avec un halogénure en position anomérique (halogénure de glycosyle) avec des sels de mercure ou d'argent en présence d'un alcool afin d'obtenir des glycosides. Les rendements et la composition des produits dépendent: a) de la stéréochimie et des groupements protecteurs de l'halogénure de glycosyle, b) de la structure de l'alcool, c) du promoteur utilisé et son contre-ion et d) du solvant utilisé (Wallace and Schroeder 1976, Garegg et al. 1985).

De nos jours, le mécanisme est encore discuté (Mydock and Demchenko 2010). Un mécanisme de type $\text{S}_\text{N}2$ est supposé compte-tenu de la haute stéréosélectivité de la réaction. Les sels d'argent ou de mercure participent au départ de l'halogénure en position anomérique du glycosyle ce qui induit une diminution de la densité électronique et rend plus facile une attaque nucléophile avec une inversion de configuration en C-1 (Figure 23, chemin a). Par cette voie de synthèse, seuls des β-xylopyranosides sont obtenus.

Cependant, ce mécanisme n'explique pas la formation observée de sous-produits tels que l'orthoester (Xu et al. 2012) et l'α-xylopyranoside (Satge et al. 2005, Sardzik et al. 2010). C'est pourquoi, un mécanisme de type $\text{S}_\text{N}1$ *via* un ion oxacarbénium peut également être proposé, avec ou sans la participation du groupement voisin: a) *sans*, le résultat est un mélange de α/β-xylopyranosides (Figure 23, chemin b) ; b) *avec*, la formation d'un cation ponté conduit à la formation d'orthoester et de β-xylopyranosides (Figure 23, chemin c). Le nucléophile peut attaquer deux positions du cation ponté, soit la position anomérique et ainsi former le β-xylopyranoside, soit le carbone impliqué dans la formation du cation ponté et expliquer la formation de l'orthoester.

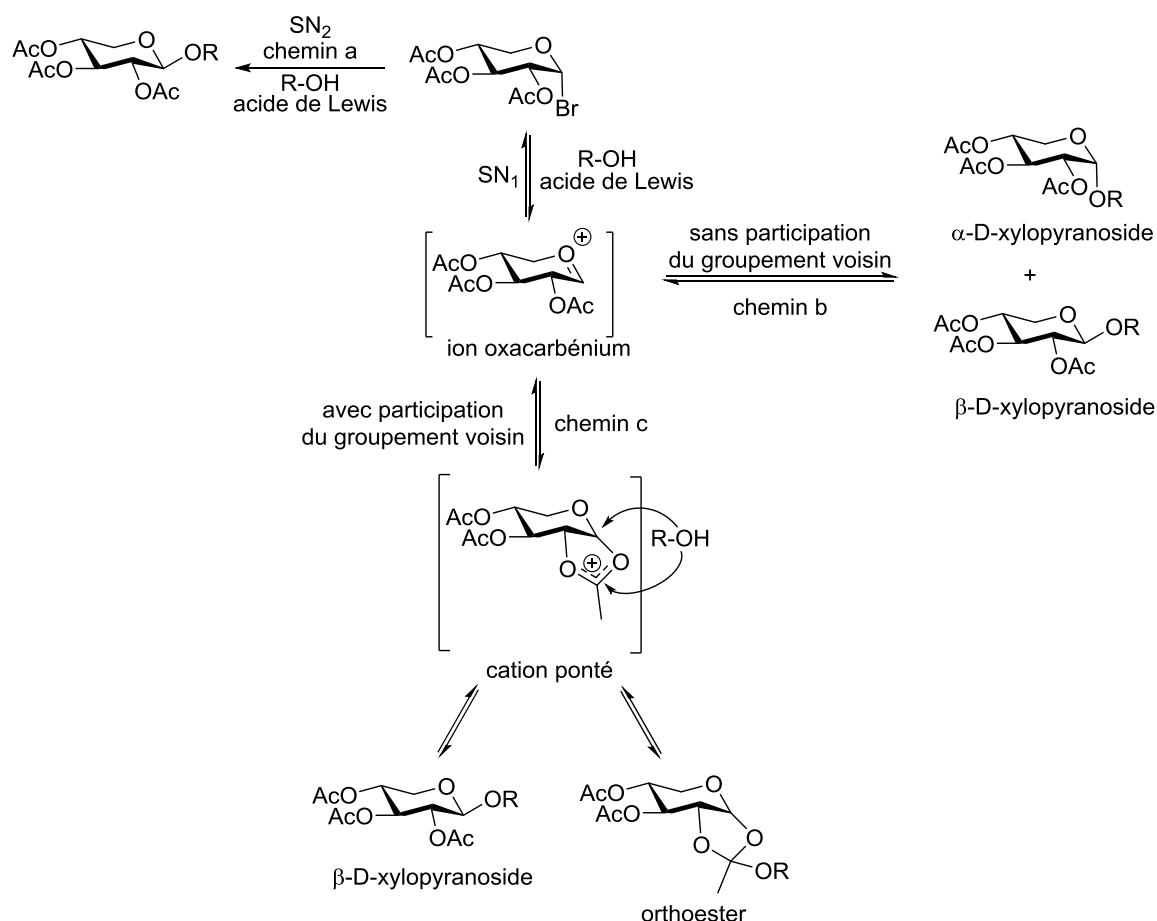


Figure 23. Mécanisme de la réaction de Koenigs-Knorr à partir du bromure de 2,3,4-tri-*O*-acétyl- α -D-xylopyranosyle.

L'halogénure de 2,3,4-tri-*O*-benzoyl- α -D-xylopyranosyle donne de meilleurs rendements que l'halogénure de 2,3,4-tri-*O*-acétyl- α -D-xylopyranosyle car la formation de l'orthoester est minimisée par la stabilisation de cation ponté (Garegg et al. 1985, Crich et al. 1999, Mitchell et al. 2001, Xu et al. 2012). Selon Wallace et Schroeder (Wallace and Schroeder 1976, Wallace and Schroeder 1977), la nature des groupements protecteurs est importante. Une stéréosélectivité élevée en β est observée pour les groupements esters alors que les groupements éthers conduisent à une stéréosélectivité variable. De plus, l'orthoester est connu pour être le produit cinétique et le β -xylopyranoside, le produit thermodynamique (Wallace and Schroeder 1976, Wallace and Schroeder 1977, Banoub and Bundle 1979, Crich et al. 1999).

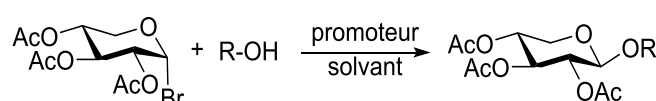
Les bromures de 2,3,4-tri-*O*-benzoyl- α -D-xylopyranosyle et 2,3,4-tri-*O*-acétyl- α -D-xylopyranosyle sont généralement utilisés pour la réaction de Koenigs-Knorr (Durette and Horton 1971, Mitchell et al. 2001).

Dans la littérature, de nombreuses synthèses de β -xylopyranosides ont été rapportées à partir du bromure de 2,3,4-tri-*O*-acétyl- α -D-xylopyranosyle avec une grande variété d'alcools (de Bruyne and van der Groen 1966, Schroeder et al. 1974, De Bruyn et al. 1975, Hadfield et al. 1979, Lacombe et al. 1988) (Tableau 9). Quand la structure de l'alcool est plus complexe (de

Bruyne and van der Groen 1966, Schroeder et al. 1974, De Bruyn et al. 1975, Hadfield et al. 1979) (alcools aromatiques et cycliques) (Tableau 9) les rendements diminuent (de Bruyne and van der Groen 1966).

Plusieurs études ont ciblé la synthèse du cyclohexyl 2,3,4-tri-*O*-acétyl- α -D-xylopyranosyle et ont démontré que les rendements obtenus (60-90%) sont dépendants de la nature du solvant et du promoteur utilisé (Tableau 9) (de Bruyne and van der Groen 1966, Schroeder et al. 1974, Crich and Dai 1999).

Tableau 9. Rendements de synthèse de différents β -D-xylopyranosides à partir du bromure de 2,3,4-tri-*O*-acétyl- α -D-xylopyranosyle.



Entrées	Alcool	Catalyseur	Solvant	Rdt (%)	Réf.
1	méthanol	HgO/HgBr ₂	CHCl ₃	83	(Schroeder et al. 1974)
2	éthanol	HgO/HgBr ₂	CHCl ₃	80	(Schroeder et al. 1974)
3	propanol	HgO/HgBr ₂	CHCl ₃	77	(Schroeder et al. 1974)
4	cyclohexanol	Ag ₂ O	CHCl ₃	64	(de Bruyne and van der Groen 1966)
5	cyclohexanol	HgO/HgBr ₂	CHCl ₃	77	(Schroeder et al. 1974)
6 ^a	cyclohexanol	Ag(OTf)	CH ₂ Cl ₂	90	(Schroeder et al. 1974)
7	alcool benzylique	Ag ₂ O	CHCl ₃	40	(de Bruyne and van der Groen 1966)

^aRéaction à partir du bromure de 2,3,4-tri-*O*-benzoyl- α -D-xylopyranosyle à -40°C

Dans certaines réactions, des co-produits sont obtenus comme de l'orthoester ou un mélange de α/β -xylopyranosides avec l'octanol, le (-)-citronellol (Satge et al. 2005) ou l'aminoéthanol (Sardzik et al. 2010). Les ratios des co-produits dépendent du promoteur utilisé.

D'autres espèces peuvent être utilisées comme promoteurs de la glycosylation à la place des sels d'argent ou de mercure (Satge et al. 2005, Xu et al. 2012) ; comme I₂ avec DDQ (2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone) (Xu et al. 2012) mais aussi la vitamine B₁₂ (Cyanocob(III)alamine) (Pattenden 1988, Petrovic et al. 2006).

Les aryl β -D-xylopyranosides peuvent être synthétisés à l'aide d'une catalyse par transfert de phase à partir du bromure de 2,3,4-tri-*O*-acétyl- α -D-xylopyranosyle dans des conditions basiques avec une inversion complète de la configuration anomérique *via* un mécanisme de type SN₂ (Figure 24). Les dérivés aryles conduisent à la formation d'alcoolates *in situ*. Fritz *et al.* ont synthétisé par cette méthode du phényl β -D-xylopyranoside, du naphtyl β -D-xylopyranoside et d'autres aryl β -D-xylopyranosides avec de la soude dans une solution aqueuse d'acétone, mais sans avoir renseigné les rendements obtenus. Des nitrophényl et naphtyl β -D-

xylopyranosides ont été synthétisés sous différentes conditions avec des rendements de 58 à 69% (Tableau 10).

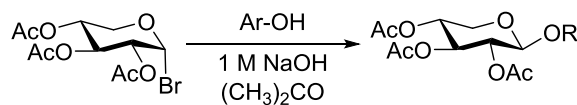


Figure 24. Catalyse par transfert de phase de dérivés aryl β -D-xylopyranosides à partir du bromure de 2,3,4-tri-*O*-acétyl- α -D-xylopyranosyle en présence de soude en solution aqueuse et d'acétone

Tableau 10. Rendements de synthèse d'aryl β -D-xylopyranosides par réaction par transfert de phase.

Entrées	Alcool	Conditions	Rdt (%)	Réf.
1	2-Nitrophénol	K ₂ CO ₃ , (CH ₃) ₂ CO (aq)	65	(Takeo et al. 1995)
2	Napht-1-ol	K ₂ CO ₃ , (CH ₃) ₂ CO (aq)	58	(Takeo et al. 1995)
3	4-Nitrophénol	K ₂ CO ₃ , (CH ₃) ₂ CO (aq)	69	(Takeo et al. 1995)
4	4-Nitrophénol	TBAHS, Na ₂ CO ₃ , EtOAc	67	(Kim and Roy 1997)

TBAHS = hydrogènesulfate de tétrabutylammonium

Johnson *et al.* ont utilisé une réaction par transfert de phase pour synthétiser des β -D-xylopyranosides avec comme alcool le dihydroxynaphtalène. Cette réaction conduit à des dihydroxynaphtalènes doublement xylosylés avec de faibles rendements (13-14%) (Johnsson et al. 2007b).

La réaction de Koenigs-Knorr peut permettre également la synthèse de xylopyranosides avec des DP>1 comme le nitrophényl β -D-xylobiosides (Purves 1929, Takeo et al. 1995, Ziser et al. 1995, Mechaly et al. 1997) et de l'umbelliféryl xylobioside (Kaneko et al. 2000, Goddard-Borger et al. 2012).

III.1.4. La méthode des trichloroacétimidates (« la glycosylation de Schmidt »)

La première utilisation des trichloroacétimidates (TCA) en synthèse a été rapportée par Sinaÿ (Pougny and Sinay 1976, Pougny et al. 1977). Leur utilisation pour la synthèse de glycosides a été développée par Schmidt et ses collaborateurs depuis 1980 (Schmidt and Michel 1980).

Actuellement, cette méthode est la plus populaire pour la synthèse de glycosides et d'oligosaccharides grâce aux remarquables propriétés des TCA de glycosyle en termes de facilité de formation, de réactivité élevée et d'applications variées. Les TCA de glycosyle sont chimiquement stables à température ambiante (Schmidt 1989). La configuration anomérique des produits obtenus dépend de la configuration du donneur, le glycosyle de TCA, de l'assistance anchimérique, de la nature des solvants et/ou des effets cinétiques et thermodynamiques (Schmidt 1986, Zhu and Schmidt 2009). La glycosylation avec un alcool requiert un catalyseur

acide tel que $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ ou TMSOTf (trifluorométhylsulfonate de triméthylsilyle), qui sont les plus utilisés. L'avantage de cette méthode est l'utilisation d'une quantité catalytique en promoteur comparé à la nécessité d'un équivalent pour les autres méthodes décrites précédemment (Lucas-Lopez et al. 2008). Les TCA de glycosyles peuvent posséder des groupes protecteurs tels que des esters ou des éthers.

Si le TCA de glycoside a un groupe participant en C-2, le β -D-xylopyranoside est obtenu uniquement quelle que soit la configuration anomérique du donneur. S'il n'y a pas de groupe voisin participant en C-2, il y a une inversion de la configuration anomérique avec $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ dans CH_2Cl_2 (Figure 25) (Schmidt and Michel 1980, Schmidt and Michel 1985, Schmidt 1986, Schmidt 1989, Schmidt and Kinzy 1994). L'anomère α du TCA de glycosyle avec une participation en C-2 est le réactif le plus souvent utilisé. Selon les conditions de réaction, la réaction passe soit par un mécanisme de type SN_2 avec inversion de configuration soit par un mécanisme de type SN_1 avec le passage par un ion oxacarbénium.

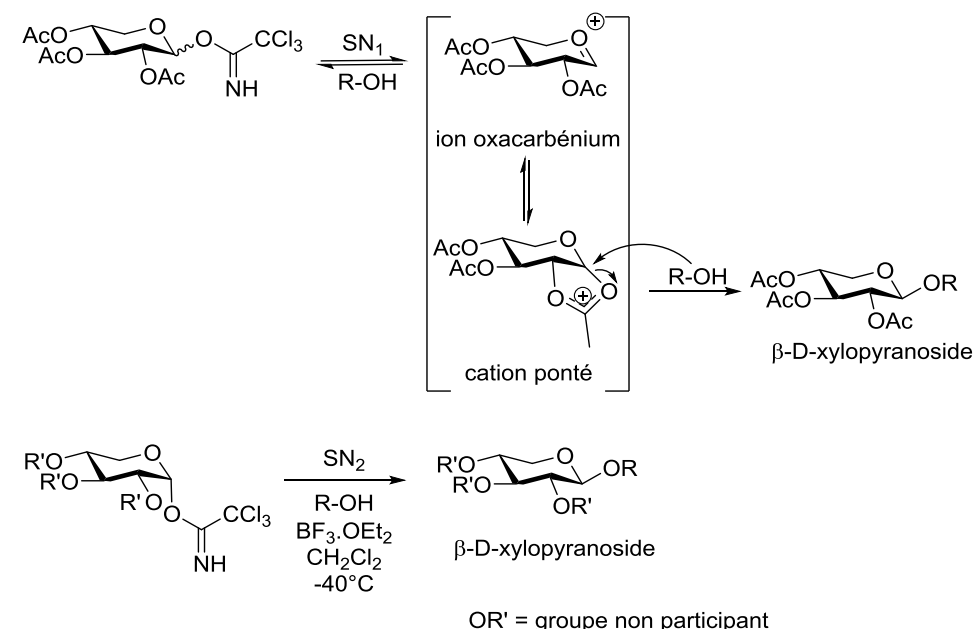


Figure 25. Mécanisme de la glycosylation de Schmidt à partir du trichloroacétimidate de 2,3,4-tri-*O*-acétyl- α / β -D-xylopyranosyle

Les TCA de glycosyle [trichloroacétimidate de 2,3,4-tri-*O*-acétyl- α -D- et β -D-xylopyranosyle (Mori et al. 1990) ou du trichloroacétimidate de 2,3,4-tri-*O*-benzoyl- α -D- et β -D-xylopyranosyle (Chen and Kong 2002)] ne sont pas utilisés pour la synthèse de β -xylopyranosides avec des parties aglycones simples (alkyl, allyl ou benzyl). Les méthodes décrites précédemment sont généralement utilisées. Les TCA de xylopyranosyle sont utilisés dans des synthèses avec des aglycones complexes et sensibles car ils peuvent être activés à faible température par une quantité catalytique d'acide de Lewis. Des anomères purs ou un mélange d'anomères de TCA de xylopyranosyle peuvent être synthétisés à partir de l'hémiacétal

avec l'utilisation des bases appropriées (Figure 26) (Schmidt and Michel 1980, Mori et al. 1990, Jacobsson et al. 2006b).

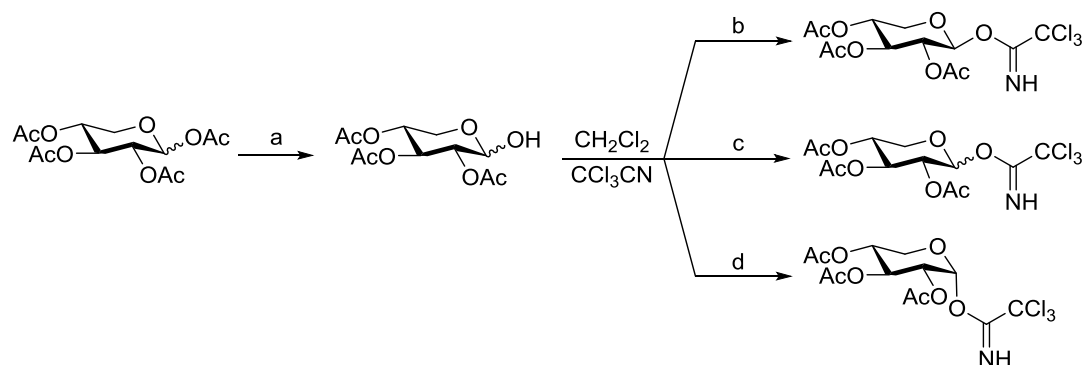


Figure 26. Synthèse des TCA de 2,3,4-tri-*O*-acétyl-α-D- et β-D-xylopyranosyles. (a) NH₂NH₂.AcOH, DMF (diméthylformamide), 15 min, 55°C (b) NaH, (c) DBU, (d) K₂CO₃

Des naphthyl β-D-xylopyranosides (Figure 15) (Mani et al. 2004), des xylopyranosides à motif sérine (Nakahara et al. 2001) et des bibenzyl β-D-xylopyranosides (Tajima et al. 2011) ont été synthétisés à partir du 2,3,4-tri-*O*-acétyl-α-D-trichloroacétimide de xylopyranosyle sous différentes conditions. Les produits sont obtenus avec une sélectivité β.

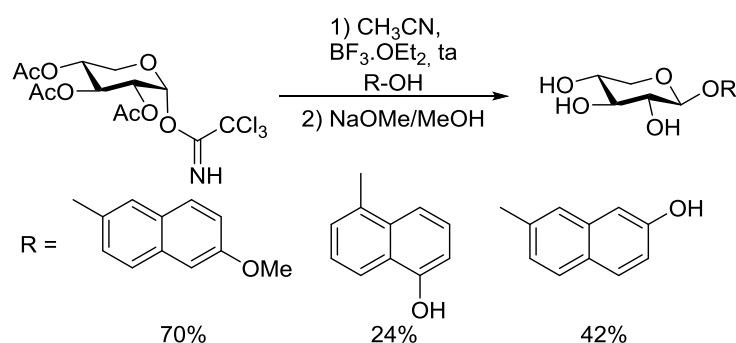


Figure 27. Synthèse des naphthyl β-D-xylopyranosides à partir du TCA de 2,3,4-tri-*O*-acétyl-α-D-xylopyranosyle.

La synthèse à partir du mélange d'anomères du TCA de 2,3,4-tri-*O*-acétyl-α/β-D-xylopyranosyle est stéréosélective. En présence de BF₃.OEt₂ dans du CH₂Cl₂ à faible température, les β-D-xylopyranosides sont les seuls produits obtenus avec un dérivé d'azidosphingosine (Wilstermann and Magnusson 1997) et du 1-hydroxy-*p*-carborane (Jacobsson et al. 2008).

Johnsson *et al.* ont synthétisé plusieurs dihydroxynaphtalènes doublement xylosylés à partir de xylose peracétylé avec d'assez bons rendements. Mais les 2,3-dihydroxynaphtalène bis-(2,3,4-tri-*O*-acétyl-β-D-xylopyranoside) et 1,2-dihydroxynaphtalène bis-(2,3,4-tri-*O*-acétyl-β-D-xylopyranoside) n'ont pas pu être obtenus par cette méthode. Ces produits sont obtenus

avec la méthode des TCA à partir du mélange d'anomères du TCA de 2,3,4-tri-*O*-acétyl- α/β -D-xylopyranosyle en présence de TMSOTf dans du CH_2Cl_2 . Les TCA sont connus pour être plus réactifs que leurs analogues acétylés et sont plus adaptés pour des phénols moins réactifs (Johnsson et al. 2007b).

L'utilisation d'autres catalyseurs variés a été décrite pour la synthèse de β -D-xylopyranosides comme le $\text{Pd}(\text{CH}_3\text{CN})_4(\text{BF}_4)_2$ en absence de groupe participant en C-2 (McKay et al. 2009), de TMSNTf₂ (triméthylsilyl bis(trifluorométhanesulfonyl)imide) avec des méthacrylates comme groupements protecteurs ou encore l'utilisation d'un dérivé de thiourée comme co-catalyseur (Geng et al. 2013).

Des xylobiosides ou xylotriosides peuvent être synthétisés par la méthode des TCA à partir comme le méthyl β -D-xylobioside et xylotrioside (Abad-Romero et al. 2009), ainsi que l'umbelliféryl β -D-xylobioside et xylotrioside (Vrsanska et al. 2008).

III.1.5. Autres méthodes

Dans cette partie, des méthodes moins classiques pour la synthèse de β -D-xylopyranosides sont rapportées.

La *O*-arylation directe en position anomérique de sucres non protégés est une tâche difficile due à la présence de nombreux groupements hydroxyles et à la formation possible de mélange de α/β -pyranosides et de α/β -furanosides. Certaines méthodes, cependant, ne requièrent pas de groupements protecteurs.

L'activation du groupement hydroxyle anomérique par la formation d'un sulfite 1,2-cyclique permet la *O*-arylation directe du D-xylose par action de l'alcoolate correspondant. Différents β -xylopyranosides ont été synthétisés par cette méthode avec plusieurs phénolates (38-50%) (El Arabi Aouad et al. 1994). Un exemple est illustré avec le 4-nitrophénolate (Figure 28).

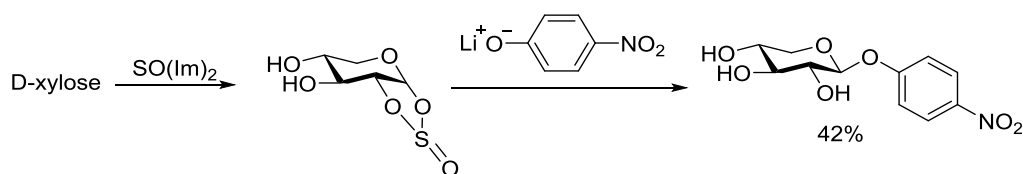


Figure 28. *O*-arylation du D-xylose par la formation d'un sulfite 1,2-cyclique.

La glycosylation du D-xylose *via* une réaction de télomérisation du butadiène catalysée par des complexes de palladium dans du DMF ou dans une solution aqueuse a été réalisée (Estrine et al. 2004, Estrine et al. 2005, Damez et al. 2006, Hadad et al. 2006, Bouquillon 2011). La réaction conduit à un mélange complexe composé de mono ou de polyoctadiényl xylopyranosides et de dimères de butadiène. Le greffage de la chaîne octadiényle commence

toujours par la position anomérique à cause de sa plus forte acidité. Les produits obtenus sont un mélange d' α/β -D-octadiényl xylopyranosides avec des dioctadiényl xylosides avec une conversion efficace du D-xylose, le 2-(E)-7-octadiényl- β -D-xylopyranoside étant le produit majoritaire (Figure 29) (Hadad et al. 2006).

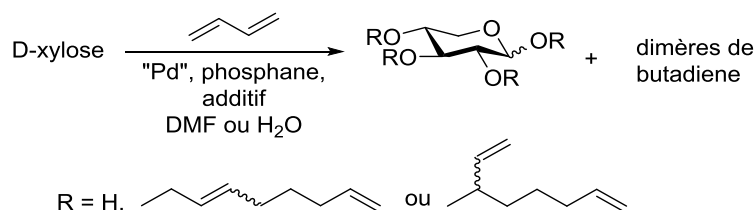


Figure 29. Réaction de télomérisation du butadiène avec du D-xylose.

III.2. Synthèse enzymatique de β -xylopyranosides

III.2.1. Introduction

Les méthodes chimiques pour la synthèse de β -xylopyranosides anomériquement purs nécessitent des étapes de protection et déprotection des groupements hydroxyles du sucre, l'utilisation d'un sucre activé et le contrôle des paramètres cinétiques et thermodynamiques. De plus, les réactions se produisent généralement dans des conditions sévères de pH et de température. Une alternative à l'approche chimique est la synthèse enzymatique, notamment avec des réactions impliquant les glycoside hydrolases.

Dans la nature, ces enzymes hydrolysent les liaisons glycosidiques par l'intermédiaire d'une catalyse acide-base. Par contre, en présence d'un nucléophile accepteur différent de l'eau, certaines GH à rétention de configuration peuvent catalyser des réactions d'hydrolyse inverse ou de transglycosylation pour conduire à la synthèse de glycosides. Cette stratégie permet la formation de β -glycosides anomériquement purs selon le mécanisme en 2 étapes décrit dans la Figure 30 (Davies and Henrissat 1995, Rye and Withers 2000, Withers 2001). De plus, les réactions sont réalisées à partir de sucres libres non protégés et dans des conditions (milieu aqueux) et des températures douces. Cette approche enzymatique largement développée pour la synthèse de glucosides (Ismail et al. 1999b, Ismail et al. 1999a, van Rantwijk et al. 1999) est moins répandue pour les xylosides. Cela est dû à une valorisation moindre des pentoses par rapport aux hexoses.

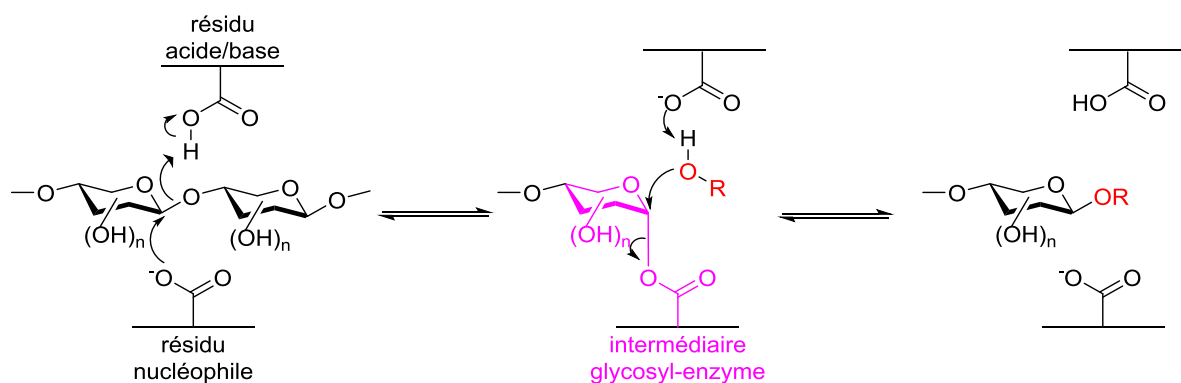


Figure 30. Mécanisme de transglycosylation par des GH à rétention de configuration.

L'hydrolyse inverse est thermodynamiquement contrôlée et implique une réaction entre un monosaccharide et un alcool (Figure 31, a). Dans ce cas, l'équilibre est déplacé vers la synthèse en limitant l'activité de l'eau, notamment en utilisant des concentrations élevées de substrats : sucre et alcool (solvant) (Drouet et al. 1994, Drouet et al. 1995, Ismail et al. 1999b). La deuxième voie, appelée transglycosylation, est cinétiquement contrôlée et est basée sur le transfert enzymatique d'une partie glycosyle d'un donneur saccharidique (poly- ou oligosaccharidique ou de sucres activés tels qu'un *p*-nitrophényl glycoside) à un accepteur nucléophile différent de l'eau (saccharides, alcools) (Figure 31, b). Lors de la transglycosylation, l'eau agit comme un nucléophile en compétition avec l'accepteur, ce qui peut conduire à l'hydrolyse primaire et secondaire des produits de transglycosylation (Figure 32).

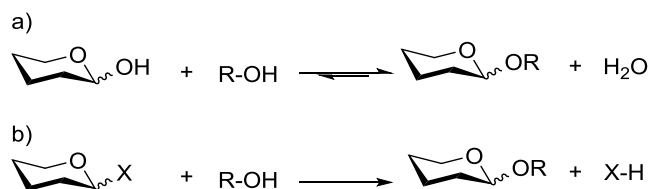


Figure 31. Glycosylation catalysée par des GH. a) Hydrolyse inverse, b) Transglycosylation (X = *O*-*p*NP (*O*-paranitrophényl), D-xylose ou xylooligosaccharides).

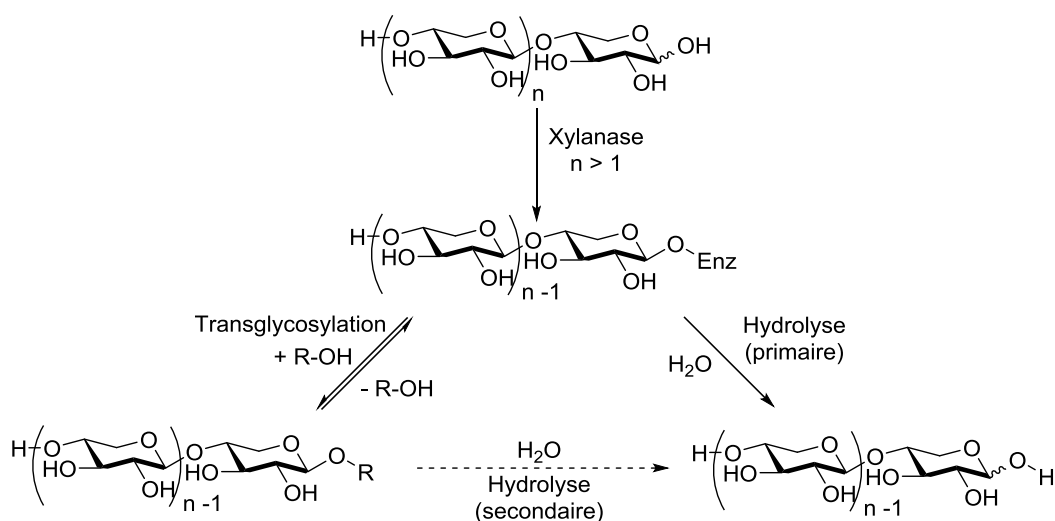


Figure 32. Schéma général des réactions d'hydrolyse et de transglycosylation catalysées par une xylanase.

III.2.2. Synthèse par les β -xylosidases

Le seul exemple de synthèse de β -xylopyranosides par hydrolyse inverse a été rapporté par Drouet *et al.* (Drouet *et al.* 1994, Drouet *et al.* 1995). Dans cette étude, la β -xylosidase de *Trichoderma reesei* a été utilisée en présence de D-xylose et de différents alcools aliphatiques (Figure 33). Dans le cas de l'hydrolyse inverse, les réactions durent plus de 6 jours pour atteindre le seuil maximal de rendements. Les rendements obtenus d'alkyl β -xylopyranosides sont très faibles (10%) en raison de l'évolution de la réaction en faveur de l'hydrolyse (Ismail *et al.* 1999b). Les longs temps de réaction et les faibles rendements de réaction sont les inconvénients majeurs dans le développement de cette méthode.

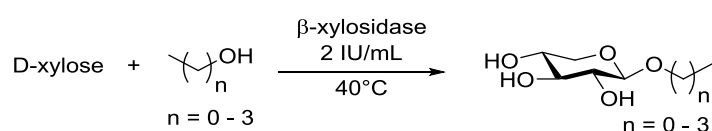


Figure 33. Synthèse enzymatique d'alkyl β -xylopyranosides par hydrolyse inverse.

Des réactions de transglycosylation pour la synthèse de xylopyranosides ont connu un développement plus important par rapport à l'hydrolyse inverse. Le substrat est soit un xylopyranoside activé comme le *p*NP-Xyl (*p*-nitrophényl β -D-xylopyranoside), soit des xylo-oligosaccharides de faibles DP tels que le xylobiose et xylotriase (Figure 34). En raison du mode d'action des β -xylosidases (mode *exo*), les produits obtenus comportent une partie glycone constituée d'une seule unité sucre (DP = 1). Les β -xylosidases utilisent préférentiellement des alcools primaires aliphatiques ayant des longueurs de chaîne de carbone inférieures à cinq atomes de carbone comme accepteurs (Kurakake *et al.* 2005, Muzard *et al.* 2009, Jain *et al.* 2014).

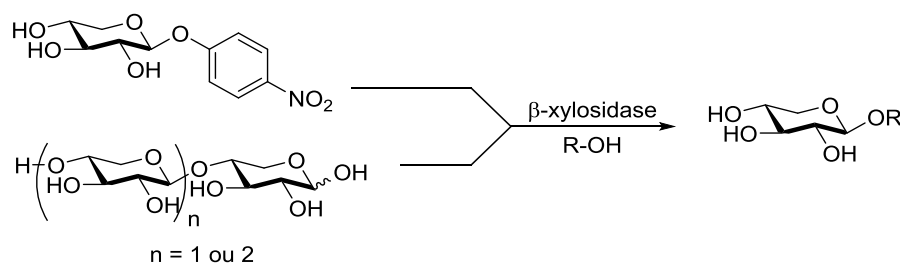


Figure 34. Réaction de transglycosylation à partir de différents donneurs par une β -xylosidase.

Shinoyama *et al.* ont été les premiers à rapporter l'utilisation d'une β -xylosidase (*Aspergillus niger*) pour produire des alkyl xylopyranosides à partir de xylobiose et de différents alcools (Shinoyama et al. 1988, Shinoyama and Yasui 1988, Shinoyama et al. 1991). Ils ont conclu que cette enzyme était très efficace pour la préparation d'alkyl xylopyranosides grâce à la simplicité de la méthode, la grande stabilité de la β -xylosidase dans un solvant organique et de sa forte activité de transglycosylation avec divers alcools (alcools primaires, secondaires et tertiaires). D'autres β -xylosidases d'origines microbiennes différentes ont été rapportées pour réaliser de la transxylosylation à partir de p NP-Xyl ou de xylobiose en présence de divers alcools (Drouet et al. 1994, Drouet et al. 1995, Li et al. 2000, Kurakake et al. 2005, Kurakake et al. 2011, Jain et al. 2014).

Les alcools ayant des longueurs de chaîne alkyle courtes (C1-C5) sont de meilleurs accepteurs pour la synthèse d'alkyl xylopyranosides (Kurakake et al. 2005, Muzard et al. 2009, Jain et al. 2014). Les alcools primaires sont les plus communément utilisés comparés aux alcools secondaires ou tertiaires en raison du faible encombrement stérique du groupement hydroxyle de l'alcool. Muzard *et al.* ont étudié la capacité d'une β -D-xylosidase de *Bacillus halodurans* pour catalyser des xylopyranosides à partir de différents donneurs (xylobiose, xylotriose et p NP-Xyl) et des alcools aliphatiques primaires (Muzard et al. 2009). Les meilleurs donneurs sont le p NP-Xyl et le xylotriose. Les rendements de la transxylosylation étaient optimaux dans le cas du n -propanol comme accepteur, conduisant à la synthèse de propyl β -D-xylopyranoside (Figure 35). Avec une chaîne alkyle plus courte, le groupement hydroxyle n'interagirait pas fortement avec le site actif alors que dans le cas d'une chaîne plus longue, il ne pourrait s'approcher du site actif à cause de l'hydrophobicité de l'alcool (Kurakake et al. 2005, Muzard et al. 2009).

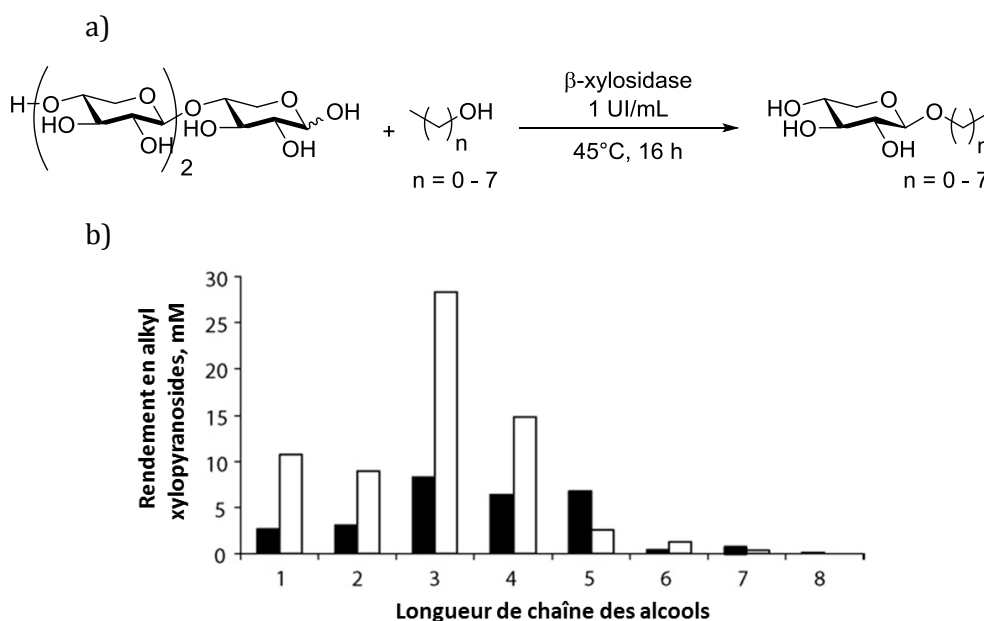


Figure 35. a) Transglycosylation du xylotriose (5 mM) avec des alcools aliphatiques (5% (v/v)) catalysée par la β -D-xylosidase de *Bacillus halodurans*; b) Effet de la longueur de chaîne de l'alcool sur le rendement d'alkyl- β -D-xylopyranosides en utilisant la β -D-xylosidase de *Bacillus halodurans* après 16 h en présence de xylotriose 5 mM (barres noires) ou d'hydrolysats contenant des xylo-oligosaccharides (dilués pour obtenir du xylotriose à 5 mM) (barres blanches) et d'alcools à 5% (v/v) (Muzard et al. 2009).

Une approche structure-fonction a été appliquée à cette enzyme dans le but d'améliorer la transxylosylation avec des alcools aliphatiques tel que le *n*-octanol (Ochs et al. 2013). Dans cette étude, trois résidus hydrophobes appartenant au sous-site impliqué dans la liaison à l'aglycone ont été mutés soit en Alanine soit en Sérine (Figure 36). Parmi les résidus ciblés, Phe116 (F116) s'est avéré être intéressant car sa mutation en Alanine a permis d'augmenter le rendement de la synthèse d'octyl β -D-xylopyranoside par un facteur de 1,7. La modélisation moléculaire a indiqué que la mutation de la position 116 conduit à un agrandissement de la poche catalytique du côté de l'extrémité réductrice (aglycone), facilitant l'arrivée d'alcools à longues chaînes aliphatiques, tel que l'octanol (Ochs et al. 2013).

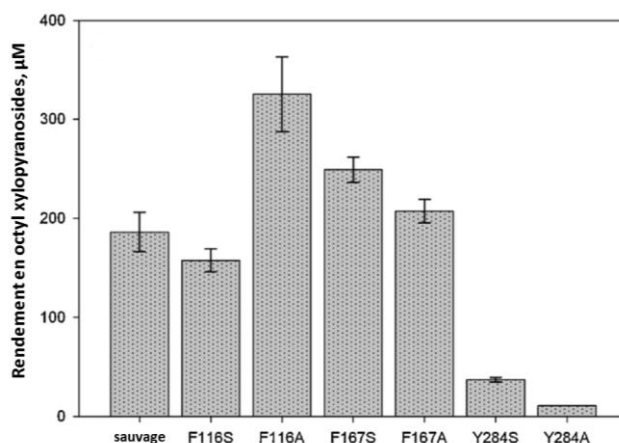


Figure 36. Synthèse d'octyl xylopyranosides par la β -D-xylosidase de *Bacillus halodurans* et ses mutants (Ochs et al. 2013).

Les synthèses enzymatiques mettant en œuvre des xylosidases concernent essentiellement la synthèse d'alkyl xylopyranosides et peu d'études concernent des aglycones autres qu'aliphatiques (Sulistyo et al. 1994, Kurakake et al. 2005). Parmi ces dernières, la xylosidase d'*Aspergillus pulverulentus* catalyse le transfert d'un résidu xylopyranosyle d'un xylobiose à une hydroquinone (Sulistyo et al. 1994).

III.2.3. Synthèse par les xylanases

Les réactions de transxylosylation catalysées par des xylanases conduisent à la synthèse d'une gamme plus large de xylopyranosides par rapport à des réactions catalysées par des xylosidases. En effet, ces enzymes utilisent comme donneurs des xylanes, conduisant à des xylopyranosides comprenant une partie glycone avec un DP égal ou supérieur à 1 (Figure 37). Cette particularité représente un avantage important par rapport à la synthèse chimique et la transglycosylation par des xylosidases. Les xylanases étant des *endo* enzymes, la zone du site de reconnaissance de la partie aglycone des xylanases est plus importante que celles des xylosidases (Dodd and Cann 2009), les xylanases peuvent donc utiliser des accepteurs de structures plus complexes que les alcools aliphatiques.

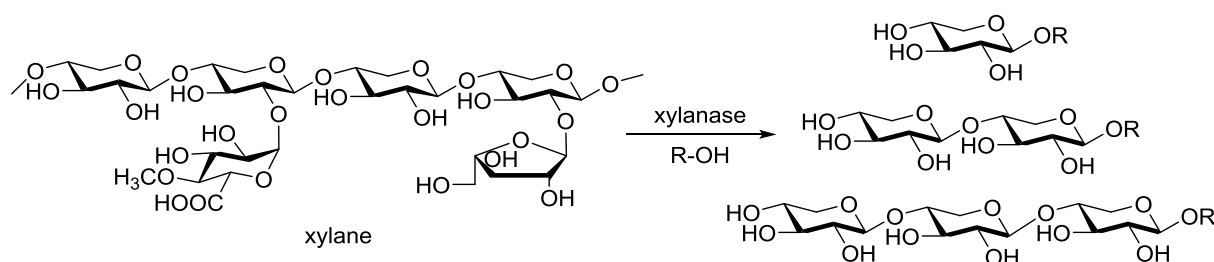


Figure 37. Réaction de transglycosylation à partir de xylanes par une xylanase.

Certaines xylanases ont été utilisées pour produire divers alkyl xylopyranosides à partir de xylanes et d'alcools aliphatiques. Matsumura *et al.* ont utilisé la xylanase isolée d'*Aureobasidium pullulans* pour la transxylosylation directe de xylanes avec de l'octan-1-ol et du 2-éthylhexanol (Matsumura et al. 1999). Avec le 2-éthylhexanol, des xylopyranosides de DP 1 et 2 ont été produits simultanément. Le rendement maximal du 2-éthylhexyl β -D-xylobiopyranoside est de 110 mg/g de xylanes après 12 h de réaction. Après 12 h, le rendement diminue légèrement, tandis que le rendement maximal du 2-éthylhexyl β -D-xylopyranoside s'élève à 54 mg/g de xylanes après 36 h de réaction. Des résultats similaires ont été observés avec l'octan-1-ol.

D'autres xylanases sont connues pour synthétiser des alkyl xylopyranosides avec des DP différents en présence de différents alcools (Matsumura et al. 1996, Matsumura et al. 1997, Nakamura et al. 2000, Jiang et al. 2004, Kadi and Crouzet 2008, Mamo et al. 2010, Ochs et al.

2011). La xylanase de *Thermotoga maritima* est unique dans sa capacité à synthétiser des xylopyranosides et xylobiopyranosides avec des alcools tertiaires (Figure 38).

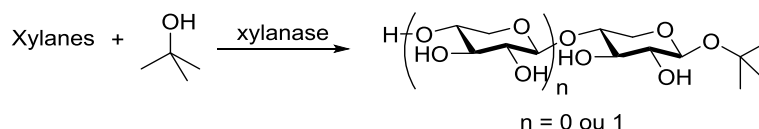


Figure 38. Synthèse enzymatique du *tert*-butyl β -D-xylopyranoside et xylobiopyranoside par la xylanase *Thermotoga maritima*.

Les xylanases peuvent aussi catalyser la synthèse de xylopyranosides contenant une partie aglycone cyclique (Kadi et al. 2002, Tramice et al. 2007, Chiku et al. 2008, Kadi and Crouzet 2008, Chiku et al. 2009). Comme la xylanase de *Trichoderma longibrachiatum*, qui est connue pour synthétiser des benzyl xylopyranosides à partir de xylanes en présence d'alcool benzylique (Kadi et al. 2002, Kadi and Crouzet 2008).

La xylanase isolée de *Hypsizygus marmoreus* a été étudiée en utilisant de nombreux composés aromatiques comme accepteurs. Cette enzyme catalyse la transxylosylation en présence de composés phénoliques et de composés aromatiques contenant à la fois des groupements hydroxyles phénoliques et non-phénoliques. Cependant, la réaction a lieu préférentiellement sur l'hydroxyle non-phénolique de l'accepteur, plutôt que sur la fonction hydroxyle phénolique (Nishizawa et al. 2002).

Chiku *et al.* ont étudié l'activité de transxylosylation de la xylanase *Bacillus sp. KT12* avec divers accepteurs contenant des groupements hydroxyles primaires ou phénoliques (Chiku et al. 2008). La réaction de transxylosylation a lieu uniquement en présence de polyphénols (Figure 39). Les auteurs ont attribué cette particularité à la nécessité pour l'accepteur de posséder deux groupements hydroxyles pour la transglycosylation. Un groupement hydroxyle serait nécessaire afin d'interagir avec l'enzyme et assurer la bonne orientation de l'accepteur dans le site actif, et le second groupement hydroxyle est censé réagir avec le C1 du xylose (intervient dans le mécanisme de la réaction). Cette xylanase a permis la génération de catéchyl et 4-hydroxyphényl oligoxylopyranosides. Les xylobiopyranosides sont dans ce cas les produits majoritaires (Chiku et al. 2008, Chiku et al. 2009).

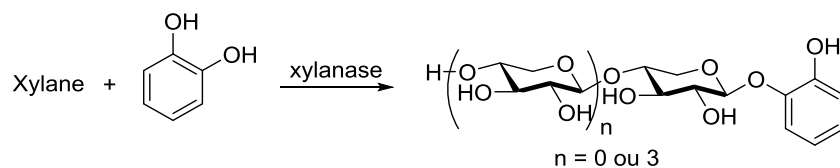


Figure 39. Synthèse enzymatique du catéchyl β -D-xylopyranoside (un accepteur polyphénol)

De nombreux paramètres peuvent influencer la synthèse de xylopyranosides avec des xylanases, tels que la composition et la concentration des xylanes, la concentration en alcool, la

quantité de xylanase, la durée de la réaction et la présence d'un co-solvant (Kadi and Crouzet 2008).

Les xylandes sont plus ou moins substitués, en fonction de leur origine, notamment par des groupements L-arabinofuranose. Les xylandes d'avoine ont une forte teneur en arabinose (L-Ara/D-Xyl = 0,12) en comparaison avec des xylandes de bouleau (L-Ara/D-Xyl = 0,003) (Ochs et al. 2011). Ce rapport peut fortement influencer la composition des xylopyranosides et certains groupements arabinose peuvent être présents dans la partie glycone lors de la synthèse. La xylanase de *Thermobacillus xylanilyticus* catalyse la transxylosylation de xylandes d'avoine avec du pentan-1-ol et a conduit un mélange xylopyranosides (DP1 à DP3) avec un xylobioside substitué par un L-arabinofuranosyle (Figure 40) (Ochs et al. 2011).

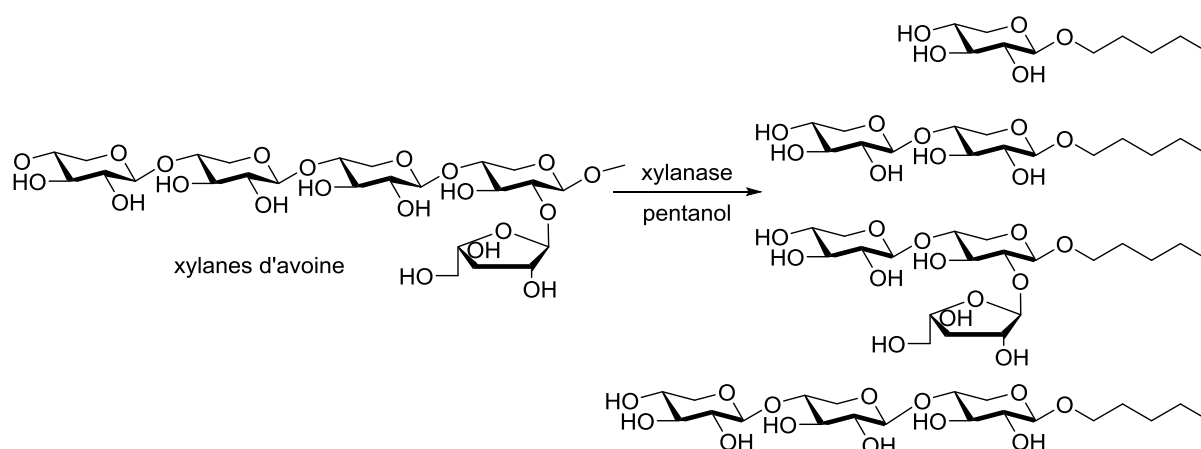


Figure 40. Synthèse de pentyl oligoarabinoxylopyranosides et de pentyl oligoxylopyranosides à partir de xylandes d'avoine (Ochs et al. 2011).

La teneur en xylandes a été étudiée lors de la synthèse d'octyl xylopyranosides par la xylanase *Thermotoga neapolitana* en présence d'octanol (Figure 41) (Mamo et al. 2010). De faibles concentrations en xylandes (0,5% (p/v)) conduisent à des rendements plus élevés (exprimés en mg/g de xylandes), comparés à des plus hautes teneurs en xylandes (5% (p/v)). Cependant, même si le taux de conversion des xylandes est plus faible dans le cas de forte teneur en xylandes (5% (p/v)), la concentration la plus élevée en octyl xylopyranosides a été obtenue dans ce cas et était de 2,18 mg/mL d'octyl xylobioside. La teneur en xylandes doit garantir l'homogénéité du milieu réactionnel pour un transfert de masse optimal (Mamo et al. 2010, Ochs et al. 2011).

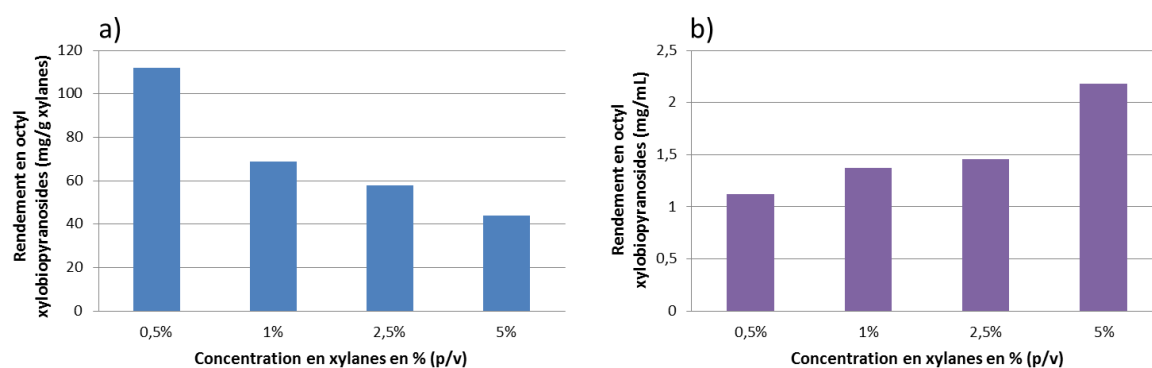


Figure 41. Effet de la concentration en xylanes sur la synthèse d'octyl xylobiopyranosides a) en mg/g de xylanes et b) en mg/mL (Mamo et al. 2010).

La quantité de xylanase est également un critère important car la réaction de transglycosylation est en compétition avec l'hydrolyse primaire et secondaire (Figure 32). L'augmentation de la quantité d'enzyme de 1 à 40 UI/mL a pour effet une augmentation des rendements globaux avec une xylanase commerciale et une xylanase de *Thermobacillus xylanilyticus* (Ochs et al. 2011). La quantité d'enzyme a également une influence sur les DP des produits obtenus (Mamo et al. 2010, Ochs et al. 2011). En effet, dans le cas d'une dose élevée de la xylanase de *Thermotoga neapolitana* (0,5 à 1 UI/ml), la production en octyl xylobiopyranoside diminue en raison de l'hydrolyse secondaire (Figure 42). Pour la même raison, le rendement en octyl xylotriopyranoside est plus élevé avec une dose d'enzyme de 0,05-0,1 UI/mL (Mamo et al. 2010). Une dose plus élevée en enzyme conduit à une augmentation de l'hydrolyse secondaire.

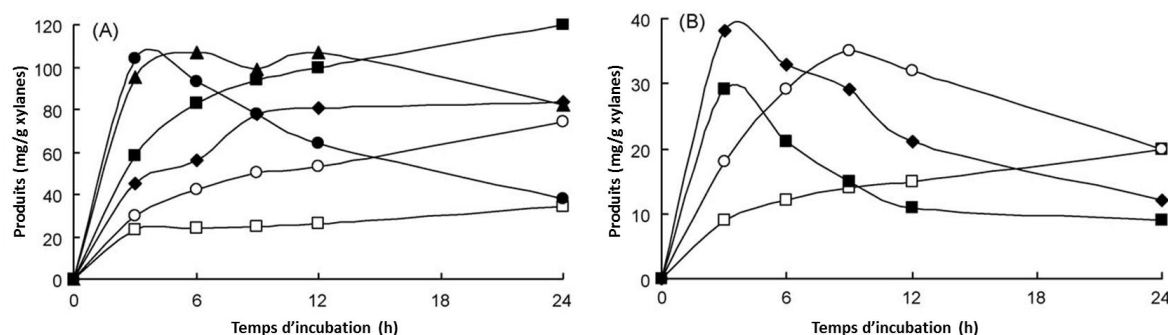


Figure 42. Effet de la concentration en xylanase de *Thermotoga neapolitana* sur les rendements en (A) *n*-octyl xylobiopyranosides et (B) *n*-octyl xylotriopyranosides en fonction du temps à partir de xylanes et d'octanol à 70°C. L'enzyme a été utilisée à des concentrations : 0,025 UI (□), 0,05 UI (○), 0,1 UI (▲), 0,25 UI (■), 0,5 UI (◆) et 1 UI/mL (●), respectivement avec 5% (p/v), 1,4 mL de *n*-octanol (Mamo et al. 2010).

La durée de la réaction régit également la répartition entre transxylosylation et hydrolyse secondaire. En général, des temps de réaction plus longs conduisent à l'hydrolyse secondaire des produits de transglycosylation et donc à des rendements plus faibles en synthèse. Ce résultat a été observé dans le cas de xylanases utilisées pour synthétiser des alkyl xylopyranosides à partir de xylanes (Matsumura et al. 1999, Mamo et al. 2010, Ochs et al. 2011). Dans le cas de la synthèse de pentyl oligoxylopyranosides, les rendements de transxylosylation diminuent après 1 h (Ochs et al. 2011). La durée de la réaction est aussi un critère important lors

du contrôle des DP des produits de la réaction. En effet, comme l'hydrolyse secondaire se produit, le DP moyen diminue quand la durée de réaction augmente (Mamo et al. 2010, Ochs et al. 2011).

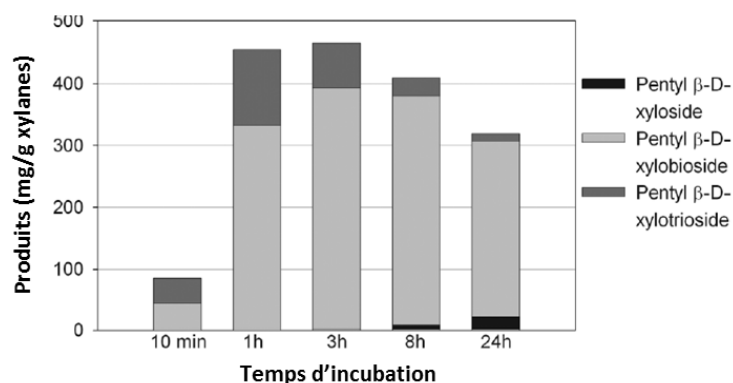


Figure 43. Influence du temps d'incubation sur la synthèse de pentyl β -D-xylopyranoside par une xylanase commerciale (NS 50030). Conditions : 5% (p/v) de xylanes de bouleau, 5% (v/v) de pentanol et 2 UI/mL de xylanase à 50°C, 1 h (Ochs et al. 2011).

Les concentrations en alcool influencent également les rendements de synthèse de xylopyranoside. Cet effet a été étudié dans le cas d'un alcool non miscible à l'eau (octan-1-ol). L'augmentation de la concentration en alcool a eu un effet positif sur le rendement jusqu'à 20% (v/v) de concentration en alcool (107 mg d'octyl-xylopyranoside/g de xylanes) (Ochs et al. 2011). Avec plus de 20% (v/v) d'alcool, les rendements en octyl oligoxylopyranosides ont diminué. Ce phénomène peut être expliqué par le rôle important que joue l'eau dans les réactions. Une faible activité de l'eau (concentration élevée d'alcool) serait favorable à la synthèse de produits. Cependant, de faibles concentrations en eau peuvent conduire à de nombreux inconvénients tels que l'insolubilité du substrat et de l'enzyme et l'inactivation de celle-ci (Mamo et al. 2010).

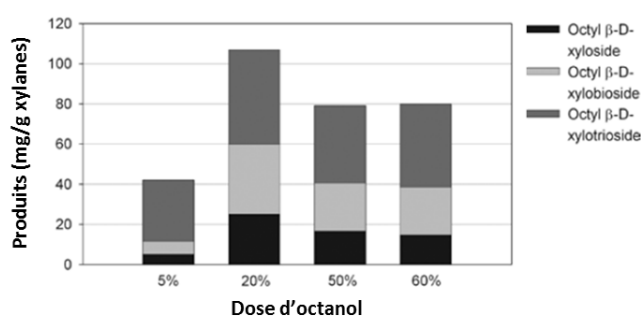


Figure 44. Influence de la dose d'octanol sur la synthèse d'octyl β -D-xylopyranoside par une xylanase de *Thermobacillus xylanilificus*. Conditions : 5% (p/v) de xylanes de bouleau et 2 UI/mL de xylanase à 50°C, 1 h (Ochs et al. 2011).

Une autre caractéristique importante est que les réactions peuvent se dérouler dans des milieux bi-phasiques dans le cas d'un alcool non miscible à l'eau. Dans ce cas, les sucres donneurs et les enzymes sont présents dans la phase aqueuse. Cette caractéristique pourrait considérablement affecter les rendements de synthèse. L'addition d'un co-solvant tel que

l'acétate d'éthyle, l'acétonitrile, le *tert*-butanol ou l'hexane peut être bénéfique. L'hexane a permis d'augmenter le rendement en produits avec la xylanase de *Trichoderma longibrachiatum* avec l'alcool benzylique, mais pas avec l'hexanol (Kadi and Crouzet 2008). L'utilisation de *tert*-butanol (20% (v/v)) conduit à un rendement plus élevé en octyl xylopyranoside en présence de 20% (v/v) de *n*-octanol (444 mg/g et 362 mg/g de xylanes, avec et sans co-solvant, respectivement) (Ochs et al. 2011).

IV. Applications

IV.1. Applications biologiques des xylosides

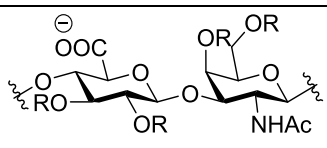
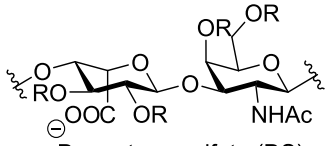
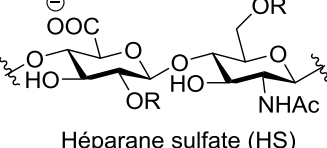
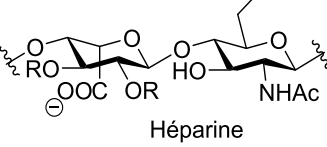
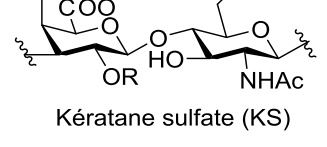
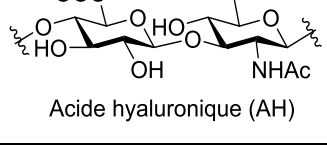
IV.1.1. β -xylopyranosides en tant qu'initiateurs de la synthèse de GAGs

a) Généralités

Les protéoglycanes (PG) sont des macromolécules qui se composent d'une protéine « cœur » sur laquelle sont fixées des chaînes de glycosaminoglycanes (GAGs). Ces molécules sont présentes dans presque tous les tissus des mammifères aux niveaux cellulaires et extracellulaires. Les PGs sont impliqués dans diverses fonctions biologiques telles que la modulation des voies de transduction du signal, la prolifération, l'adhérence et la migration cellulaire (Kamhi et al. 2013).

Il existe cinq grandes familles de GAGs qui diffèrent selon la nature de leurs unités disaccharidiques : les héparanes sulfates (HS)/héparine, les chondroïtines sulfates/dermatane sulfates (CS/DS), les kératanes sulfate (KS) et l'acide hyaluronique. L'acide hyaluronique est le seul GAG qui n'est pas lié de façon covalente à une protéine « cœur » pour former un PG et c'est la seule molécule qui n'est pas sulfatée. Pour les héparines/HS et CS/DS, les GAGs sont liés de manière covalente à une protéine « cœur » par une liaison *O*-glycosidique avec un résidu sérine alors que les KS peuvent être liés soit par une liaison *N*-glycosidique à un résidu asparagine (KS I), ou liés par une liaison *O*-glycosidique à une sérine ou une thréonine (KS II). De plus, ce sont les seuls qui possèdent un galactose au lieu d'un acide glucuronique ou L-iduronique dans leurs unités répétitives (Pomin 2015).

Tableau 11. Les différents types de GAGs

Nom et structure des GAGs	PG ou GAG libre	Unités disaccharidiques répétées	
 Chondroïtine sulfate (CS)	Liaison <i>O</i> -glycosidique à une sérine	Acide glucuronique (GlcA)	<i>N</i> -acétylgalactosamine (GalNAc)
 Dermatane sulfate (DS)	Liaison <i>O</i> -glycosidique à une sérine	Acide L-iduronique (IdoA)	<i>N</i> -acétylgalactosamine (GalNAc)
 Héparane sulfate (HS)	Liaison <i>O</i> -glycosidique à une sérine	Acide glucuronique (GlcA)	<i>N</i> -acétylglucosamine (GlcNAc)
 Héparine	Liaison <i>O</i> -glycosidique à une sérine	Acide L-iduronique (IdoA)	<i>N</i> -acétylglucosamine (GlcNAc)
 Kératane sulfate (KS)	Liaison <i>N</i> -glycosidique à une asparagine ou <i>O</i> - glycosidique à une sérine / thréonine	Galactose (Gal)	<i>N</i> -acétylglucosamine (GlcNAc)
 Acide hyaluronique (AH)	—	Acide glucuronique (GlcA)	<i>N</i> -acétylglucosamine (GlcNAc)

R = H ou SO₃[⊖]

La biosynthèse des chaînes d'héparine/HS et de CS/DS qui sont liées de manière covalente à une protéine « cœur », est naturellement amorcée par la xylosylation d'un résidu sérine catalysée par une xylosyltransférase (Schwartz 1995, Silbert and Sugumaran 1995). La seconde étape d'élongation est catalysée par une galactosyltransférase I (β 4GalT7), qui permet l'ajout d'un résidu D-galactopyranosyle sur la position *O*-4 du xylose. D'autres réactions enzymatiques catalysées par des glycosyl transférases permettent ensuite l'addition d'un deuxième résidu D-galactose puis d'un résidu acide D-glucuronique (Figure 45) (Silbert and Sugumaran 1995). A partir du lien tétrasaccharidique, les chaînes de GAGs sont formées par l'addition d'unités disaccharidiques constituées d'une hexosamine (*N*-acétylglucosamine ou *N*-acétylgalactosamine) et d'un acide hexuronique (acide D-glucuronique ou L-iduronique). Les GAGs sont divisés en différentes classes en fonction de la structure chimique de l'unité répétitive

du disaccharide et du lien anomérique entre les deux sucres (Tableau 11). La position et le degré de sulfatation des groupements hydroxyles contribuent également à la grande diversité de chaînes de GAG.

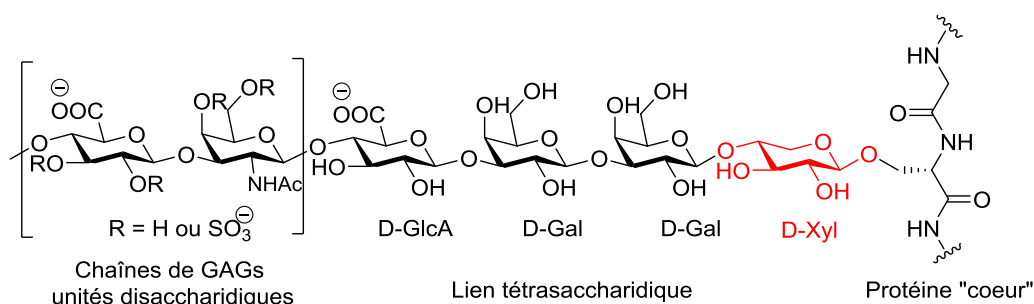


Figure 45. Structure d'un protéoglycane.

Depuis les années 70, il est connu que les β -xylopyranosides comportant des groupements aglycones hydrophobes (aliphatique, aromatique, polyaromatique) peuvent agir comme des accepteurs de la galactosyltransférase I ($\beta 4\text{GalT7}$) au cours de la première étape de galactosylation (Okayama et al. 1973). Les β -xylopyranosides sont ainsi en mesure d'amorcer la biosynthèse de chaînes de GAG libres, qui ne sont pas liés avec une protéine « cœur ». Cette biosynthèse exogène est en compétition avec la synthèse endogène des GAGs formant les PGs qui sont liés à la protéine « cœur » (Okayama et al. 1973, Kolset et al. 1990). La capacité des β -xylopyranosides à synthétiser les GAGs dépend non seulement de la nature des groupements aglycones, mais aussi de la nature de la liaison glycosidique, la distance et la nature du lien entre le xylose et la partie aglycone hydrophobe (Victor et al. 2009). Ces différentes caractéristiques déterminent le degré de stimulation de la synthèse des GAGs, ainsi que la longueur de la chaîne, le degré d'épimérisation de GlcA (acide glucuronique) en IdoA (acide L-iduronique), le degré de sulfatation et la nature des GAGs (Robinson et al. 1975, Lugemwa and Esko 1991, Takagaki et al. 1991). Les β -xylopyranosides avec des aglycones tels que des groupes méthyle, benzyle, umbelliféryle ou *p*-nitrophényle initient la synthèse de CS, tandis que les aglycones contenant deux noyaux aromatiques (naphtyle, oestradiyle) initient la synthèse de mélanges CS/DS ainsi que des HS (Fritz et al. 1994, Mani et al. 2004). Cette différence dans la nature des GAGs produits n'est pas encore complètement comprise. L'hypothèse est que les aglycones peuvent interférer avec le transport sélectif de xylopyranosides dans différents compartiments de l'appareil de Golgi, appelé GAGOSOMES, qui comporteraient différentes combinaisons d'enzymes et d'isoformes conduisant à la génération de chaînes GAGs avec des degrés distincts de sulfatation, d'épimérisation et d'élongation (Victor et al. 2009).

L'aptitude des β -xylopyranosides à agir comme accepteur de la $\beta 4\text{GalT7}$ dépend également de leur transport à travers la membrane plasmique et de leur transport intracellulaire (Sarkar and Esko 1995, Sarkar et al. 1995, Siegbahn et al. 2015). En effet, les

xylopyranosides doivent passer à travers la membrane plasmique et atteindre l'appareil de Golgi, où la β 4GalT7 est présente. Les aglycones non-polaires sont nécessaires pour le transport à travers la membrane cellulaire (Abrahamsson et al. 2008).

Avant le clonage de la β 4GalT7, l'exploration de biosynthèse de GAGs par les xylopyranosides a été limitée à la quantification et la nature des GAGs formés (Siegbahn et al. 2014, Saliba et al. 2015, Siegbahn et al. 2015). Le clonage de la β 4GalT7 a permis l'étude des exigences structurales pour les xylopyranosides à être de bons accepteurs de cette enzyme (Garcia-Garcia et al. 2011, Siegbahn et al. 2015). D'après ces études structure-fonction, des informations sur les structures des xylopyranosides ont été obtenues. En effet, les β -xylopyranosides doivent être liés à un fragment aglycone aromatique afin d'être efficacement galactosylés par la β 4GalT7 (Siegbahn et al. 2014).

Étant donné la grande variété des fonctions biologiques des GAGs dans les cellules, les β -xylopyranosides représentent des molécules intéressantes pour promouvoir la biosynthèse de GAGs et sont donc des molécules cibles pour des applications thérapeutiques et cosmétiques.

D'autre part, des modifications de la partie glycone peuvent conduire à l'inhibition de la β 4GalT7, ce qui représente une cible thérapeutique intéressante pour limiter la biosynthèse des GAGs souhaitable dans certains cas (Lugemwa et al. 1996, Garud et al. 2008, Tsuzuki et al. 2010, Siegbahn et al. 2014, Tran and Kuberan 2014, Siegbahn et al. 2015). En effet, les inhibiteurs de la synthèse des GAGs peuvent servir d'outils pour sonder les fonctions des GAGs dans les systèmes cellulaires et dans des organismes modèles comme un point de départ vers le développement de produits pharmaceutiques, en particulier d'agents anti-tumoraux (Saliba et al. 2015). Kuberan *et al.* ont utilisé la chimie « click » pour générer une bibliothèque de 4-désoxy-4-fluoro-xylosides et ont montré que la substitution de la position 4 du xylose par un atome de fluor conduit à des inhibiteurs de la synthèse de GAGs (Figure 46) (Garud et al. 2008, Tsuzuki et al. 2010).

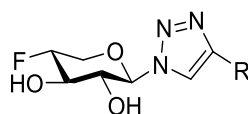
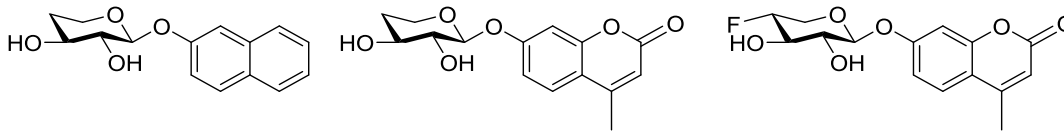


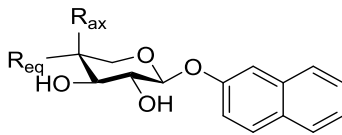
Figure 46. 4-désoxy-4-fluoro-xylosides : inhibiteurs de la synthèse de GAGs

Récemment, avec le clonage de la β 4GalT7, des études se sont portées sur l'inhibition de cette enzyme par les xylopyranosides et notamment ceux dont la position 4 du xylose a été modifiée. L'introduction de divers groupements sur la position 4, un atome de fluor par exemple, est susceptible de donner lieu à une inhibition de la β 4GalT7 (Lugemwa et al. 1996, Siegbahn et al. 2014, Saliba et al. 2015). Le pourcentage d'inhibition ainsi que les paramètres cinétiques d'inhibition de la β 4GalT7 varient selon la substitution en position 4 et la nature de l'aglycone (Tableau 12 et Tableau 13) (Siegbahn et al. 2014, Saliba et al. 2015).

Tableau 12. Paramètres cinétiques de la β 4GalT7 (Saliba et al. 2015)


The image shows the chemical structures of three xylopyranosides. 4H-Xyl-NP is a xylopyranose with a naphthyl group at the 4-position. 4H-Xyl-MU is a xylopyranose with a 4-methylumbelliferyl group at the 4-position. 4F-Xyl-MU is a xylopyranose with a 4-methylumbelliferyl group at the 4-position, where the hydroxyl group at the 2-position is replaced by a fluorine atom.

Composé	IC ₅₀ (mM)	K _i
4H-Xyl-NP	—	—
4H-Xyl-MU	1,28 ± 0,22	0,53 ± 0,10
4F-Xyl-MU	0,06 ± 0,02	0,03 ± 0,001

Tableau 13. Pourcentage d'inhibition de la β 4GalT7 (Siegbahn et al. 2014)


The image shows the chemical structure of a xylopyranoside with a naphthyl group at the 4-position. The substituents at the 2 and 3 positions are labeled R_{ax} and R_{eq} respectively.

R _{eq} , R _{ax}	Pourcentage d'inhibition (%)
Me, OH	40
F, H	40
H, H	10
H, OH	50
Et, OH	12

*Inhibition de la galactosylation de XylNap (OH, H) (% du contrôle sans ajout de xyloside)

b) Effet anti-prolifératif

Les xylopyranosides, par leurs propriétés d'activateurs de biosynthèse des GAGs, possèdent une activité anti-proliférative sur les cellules cancéreuses, en particulier les xylopyranosides permettant sélectivement la synthèse de HS. Les protéoglycanes comportant des chaînes HS (HSPG) dans les cellules tumorales participent à la croissance tumorale et peuvent influencer sur la progression tumorale, l'angiogénèse et la métastase (Cheng et al. 2009, Afratis et al. 2012). Par conséquent, la suppression de la synthèse de HSPG pourrait empêcher la signalisation des facteurs de croissance, notamment pour les cellules cancéreuses et aurait un effet anti-prolifératif (Mani et al. 1998, Mani et al. 2004).

L'inhibition de la croissance tumorale exercée par les xylopyranosides peut donc s'expliquer soit par l'inhibition de la synthèse de HSPG car les xylopyranosides entrent en compétition avec la biosynthèse endogène lors de la génération de chaînes de HS libres, soit par une activité antiproliférative des chaînes de HS libres (Mani et al. 2004).

Les naphthyl xylopyranosides ont été étudiés pour leur activité antiproliférative (Mani et al. 2004, Jacobsson et al. 2006a, Cheng et al. 2009, Nilsson et al. 2009, Nilsson et al. 2010, Siegbahn et al. 2011, Holmqvist et al. 2013). Cette activité est dépendante de la structure de l'aglycone et diffère en fonction de la lignée cellulaire (Tableau 14) (Jacobsson et al. 2006a, Holmqvist et al. 2013). Les résultats ont montré que la synthèse de HS par ces xylopyranosides

est nécessaire mais pas suffisante pour exercer une activité antiproliférative (Jacobsson et al. 2006a, Garcia-Garcia et al. 2011). En effet, la structure des HS synthétisés dépend de la nature de l'aglycone car les GAGs sont liés aux xylopyranosides, ce qui peut doter les HS de la possibilité de pénétrer dans le noyau et exercer une activité antiproliférative par apoptose (Kolset et al. 1990, Mani et al. 1998, Jacobsson et al. 2006a, Holmqvist et al. 2013).

Tableau 14. Activité antiproliférative (ED₅₀, µM) de naphthyl xylopyranosides sur les cellules HFL-1, T24, A31 3T3 et 3T3 SV40*

Composés	HFL-1 cells	T24 cells	3T3 A31	3T3 SV40
N₁	6	1	165	105
N₂	500	470	>500	>500
N₃	180	220	185	340

* Les cellules ont été incubées avec 0,001 à 0,5 mM de xylosides pendant 96 h. Chaque dose a été testée 5 fois. Les cellules normales HFL-1 (fibroblastes pulmonaires d'embryons humains), les cellules normales 3T3 A31 (fibroblastes 3T3 de souris), des cellules T24 (cellules humaines de carcinome de la vessie), et des cellules de 3T3 SV40 (virus SV40 de souris transformé dans les fibroblastes 3T3).

Le 2-(6-hydroxynaphthyl)-β-D-xylopyranoside (XylNapOH) (Figure 47) produit des chaînes de HS dans les cellules tumorales (cellules humaines de carcinome de la vessie T24), qui sont ré-internalisées et exercent une activité antiproliférative (Nilsson et al. 2010). Dans les cellules normales (fibroblastes pulmonaires d'embryons humains), XylNapOH conduit à la synthèse de chaînes libres de HS qui sont sécrétées dans le milieu extracellulaire et n'ont aucun effet antiprolifératif. Le traitement par XylNapOH inhibe la croissance des cellules tumorales (C6 gliome) de rat *in vivo* de 73% grâce à l'accumulation de HS synthétisés par les xylopyranosides dans le voisinage immédiat de la tumeur (Nilsson et al. 2010).

XylNapOH affiche une toxicité sélective sur les cellules tumorales qui dépend de l'amorçage des chaînes de GAGs solubles qui peuvent être transportés dans le noyau, où ils induisent une inhibition de croissance par apoptose (Nilsson et al. 2010, Siegbahn et al. 2011).

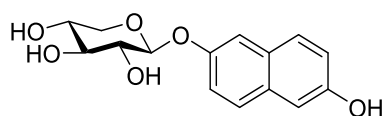


Figure 47. Un xylopyranoside antiprolifératif: le 2-(6-hydroxynaphthyl)-β-D-xylopyranoside.

Certains « click » xylosides affichent également une inhibition sélective sur la croissance de cellules cancéreuses (cellules de gliome U87MG) en induisant la synthèse de GAGs (Raman and Kuberan 2010). Les «click» xylosides les plus actifs, illustrés sur la Figure 48, provoquent 50% d'inhibition de la croissance des cellules de gliome U87MG à une concentration de 100 μ M.

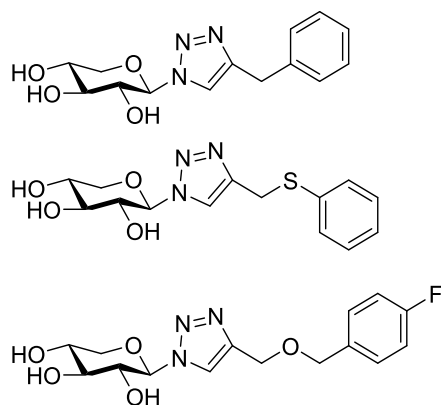


Figure 48. « Click » xylosides avec une activité antiproliférative.

Kuberan *et al.* ont synthétisé des « click » xylosides comportant le motif Arginine-Glycine-Aspartate (RGD), comme substituant du noyau triazole (Figure 49). Le motif RGD est connu pour se lier sélectivement à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, qui est une protéine abondamment exprimée sur la surface de nombreux types de cellules tumorales (Tran et al. 2010). Grâce à leur motif RGD, ces xylosides peuvent cibler les cellules cancéreuses et y induire une biosynthèse de GAGs. Les xylosides avec le motif RGD peuvent jouer un double rôle comme anticoagulant et comme agents anti-plaquettaire dans la lutte contre les complications thrombotiques, le cancer et d'autres états pathologiques.

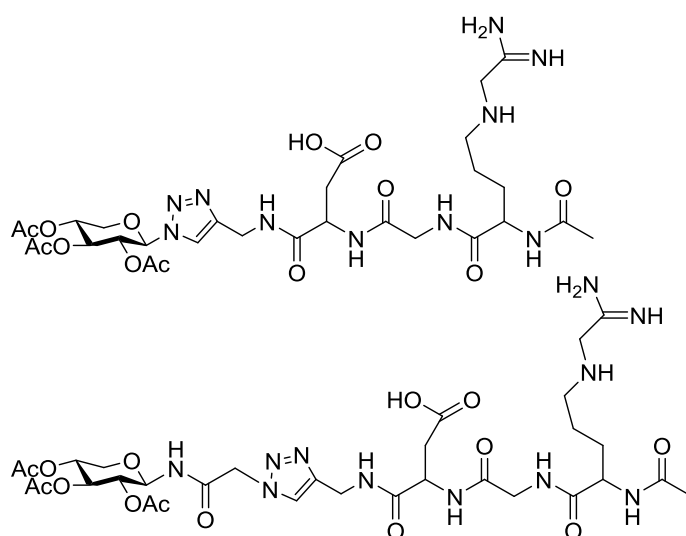


Figure 49. RGD-xylosides.

c) Activité anti-thrombotique

Les glycosaminoglycanes, tels que l'héparine, les CS ou DS présentent des effets anti-thrombotiques (Teien et al. 1976, Bellamy et al. 1993). Grâce à leur capacité à initier la synthèse de GAGs, certains xylopyranosides possèdent une activité anti-thrombotique.

Bellamy *et al.* sont les premiers à avoir démontré que des β -D-xylopyranosides dérivés de la benzophénone, du benzhydrol et du benzhydrile (Figure 50) exercent une activité anti-thrombotique (Bellamy et al. 1993). Des 1- β -D-thioxylopyranosides et 1,5- β -D-dithioxylopyranosides plus stables *in vivo* que leurs analogues oxygénés, ont été synthétisés (Figure 50) (Bellamy et al. 1995, Masson et al. 1995). Les 1,5- β -D-dithioxylosides ont permis la production de GAGs, en particulier des DS et CS. Ces molécules sont de meilleurs substrats pour la β 4GalT7 (responsable de la synthèse exogène à partir de xylosides) que les *O*-xylosides (Bellamy et al. 1995, Bondoux et al. 2009).

Odiparcil®, un 1,5- β -D-dithioxyloside, a été comparé à la warfarine, un anti-coagulant oral chronique. Odiparcil® montre une activité anti-thrombotique équivalente à celle de la warfarine, sans augmenter le potentiel hémorragique (Toomey et al. 2006). Odiparcil® permet de réduire la thrombose et conduit à une initiation de la biosynthèse des GAGs plus efficace (Figure 50). La saturation dans la formation de GAGs et la disponibilité d'un agent de neutralisation (sulfate de protamine) peuvent limiter le risque d'hémostase après une thérapie anti-thrombotique par les xylosides par rapport à la warfarine (Toomey et al. 2006, Myers et al. 2008). Une approche anti-thrombotique à base de xylopyranosides ou d'analogues *via* une activation de la biosynthèse de GAGs a le potentiel de se rapprocher de l'efficacité de la warfarine (Myers et al. 2008). Cependant, malgré la synthèse de bibliothèques de 1- β -D-thioxylopyranosides ou de 1,5- β -D-dithioxylopyranosides et des essais cliniques sur ces molécules, aucun xylopyranoside de ce type n'a été lancé sur le marché pharmaceutique en tant qu'agent anti-thrombotique.

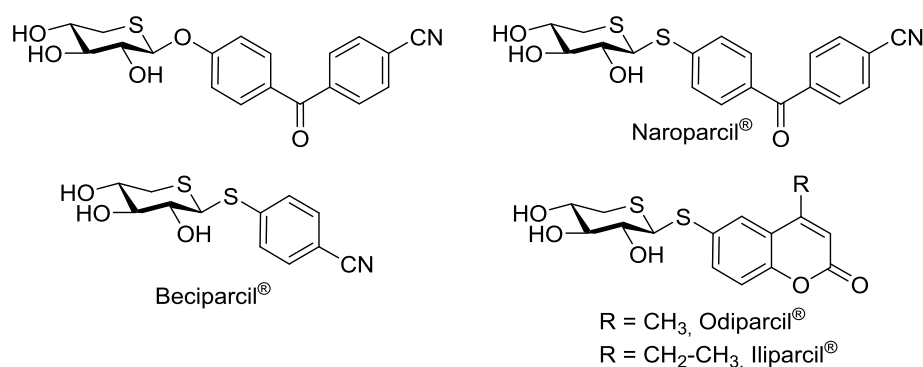


Figure 50. Dérivés de β -D-xylopyranoside à partir de benzophénone et des 1,5- β -D-dithioxylosides exerçant une activité anti-proliférative.

d) Effet anti-vieillesse

De nombreux changements se produisent au niveau des propriétés mécaniques et biologiques de la peau en fonction de l'âge, avec une détérioration progressive des propriétés fonctionnelles de la peau (Vuillermoz et al. 2005). Les propriétés mécaniques de la peau dépendent principalement de la matrice extracellulaire (MEC) du derme et de l'épiderme. Les PGs et les GAGs représentent deux des composants majeurs de la MEC et contribuent à la cohésion tissulaire et à l'hydratation. Ainsi, la diminution de la synthèse de GAGs a été corrélée au vieillissement cutané (Maquart et al. 2010).

Récemment, un C-xyloside, le Pro-Xylane®, a été synthétisé par les laboratoires de recherche L'Oréal pour le développement de produits cosmétiques anti-âge (Figure 51) (Cavezza et al. 2009). Ce xylopyranoside présente la particularité d'être stable envers les glycosidases en raison de la liaison C-glycosidique. Le Pro-Xylane® permet l'augmentation de la synthèse des GAGs (CS/DS) et impacte l'expression des HSPG (Pineau et al. 2008, Sok et al. 2008, Cavezza et al. 2009). De plus, le Pro-Xylane® contribue au renouvellement des GAGs de la peau et donc facilite le maintien de l'architecture de la MEC, une bonne hydratation et la fermeté de la peau. Le Pro-Xylane® permet la restauration de l'expression des PGs dans le derme atrophie (Sok et al. 2008) et par conséquent, il a des effets bénéfiques sur les jonctions défectueuses derme/épiderme en rétablissant ou en améliorant la solidité et la cohésion de ces jonctions (Pineau et al. 2008, Sok et al. 2008, Pineau et al. 2011). De nombreux C-xylosides, avec différentes structures d'aglycones, ont été brevetés par L'Oréal. La synthèse de tous les C-xylosides décrits est basée sur la méthodologie de Lubineau en utilisant un processus de «chimie verte» à partir de D-xylose (Rodrigues et al. 2000, Cavezza and Dalko 2010, Dalko and Cavezza 2010b, Dalko and Cavezza 2010a, Dalko and Boule 2014).

Le Pro-Xylane® est maintenant produit, à grande échelle, et commercialisé comme agent anti-âge dans un large éventail d'applications cosmétiques (Figure 52).

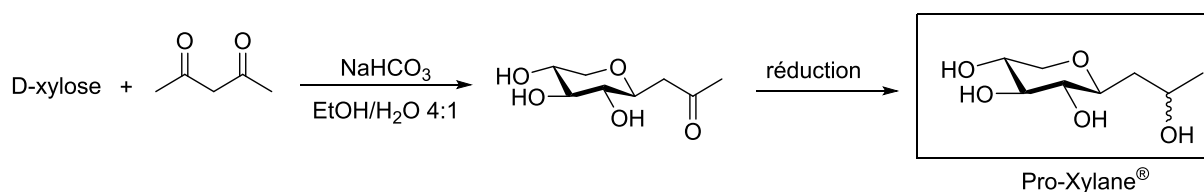


Figure 51. La synthèse du Pro-Xylane®



Figure 52. Exemples de produits cosmétiques ayant le Pro-Xylane® dans leur formulation

IV.1.2. β -xylopyranosides comme inhibiteurs d'enzymes

a) La tyrosinase

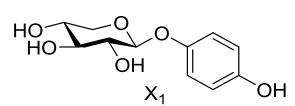
La tyrosinase (EC 1.14.18.1) est l'une des enzymes clés impliquée dans la synthèse de la mélanine. Un des principaux rôles de la mélanine est la photo-protection de la peau contre les rayons ultra-violet, mais une formation excessive de mélanine, correspondant à une augmentation de l'activité tyrosinase, provoque des effets d'hyperpigmentation qui aboutissent à l'apparition de coups de soleil, de lentigo ou de mélasma (Kim and Uyama 2005). Dans le cerveau, la dopamine et la DOPA quinone qui sont synthétisées par la tyrosinase, sont des molécules cytotoxiques spécifiques des neurones dopaminergiques. Ces molécules modifient la fonction de certaines protéines et provoquent la neurodégénérescence associée à la maladie de Parkinson (Asanuma et al. 2003). En alimentation, l'oxydation des composés phénoliques en quinones en présence de dioxygène et de tyrosinase est responsable du brunissement des fruits et légumes avec pour conséquence une couleur et un goût indésirables (Kim and Uyama 2005).

Ces exemples prouvent que des inhibiteurs de la tyrosinase présentent un intérêt dans l'industrie cosmétique comme agent de blanchiment pour la peau, dans l'industrie alimentaire ainsi qu'en médecine (Kim and Uyama 2005).

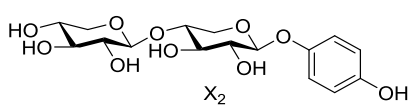
L'hydroquinone est un inhibiteur bien connu de la tyrosinase et le plus prescrit (Palumbo et al. 1991) mais son utilisation provoque des mutations de séquence spécifiques (Joseph et al. 1998) et d'autres effets secondaires (Charlin et al. 2008). Ces risques ont conduit à son interdiction dans la plupart des pays. Au cours des dernières années, des dérivés glycosidiques fonctionnalisés par des fragments de type polyphénols se sont avérés être de bons candidats pour remplacer l'hydroquinone (Funayama et al. 1995, Sugimoto et al. 2005, Jun et al. 2008, Seo et al. 2012). Comme agent alternatif pour la dépigmentation, la β -arbutine (4-hydroxyphényl β -D-glucopyranoside) est un puissant inhibiteur de la tyrosinase. La β -arbutine est un composé inoffensif, soluble dans l'eau. Des inhibiteurs de la tyrosinase avec des effets plus puissants et des propriétés hydrosolubles sont encore souhaitables. Dans ce contexte, deux études à base de dérivés de xylose ont été effectuées.

Chiku *et al.* ont développé une synthèse enzymatique de 4-hydroxyphényl β -D-xylopyranosides avec des DP variant de 1 à 4 à partir de xylanes, d'hydroquinone comme accepteur et d'une xylanase (Tableau 15) (Chiku et al. 2009). Des études sur l'activité de la tyrosinase de champignons ont montré une corrélation entre l'augmentation de l'inhibition et l'augmentation du DP des xylopyranosides (Tableau 15). Or, la tendance inverse a été mise en évidence avec des dérivés de glucose comme le 4-hydroxyphényl β -D-glucopyranosyl-(1-4)-O- β -D-glucopyranoside (DP = 2) (IC_{50} = 10 mM) et le 4-hydroxyphényl β -D-glucopyranoside (β -arbutine) (DP = 1) (IC_{50} = 6 mM) (Jun et al. 2008). De plus, le 4-hydroxyphényl β -D-xylopyranoside (**X₁**) est plus efficace que son équivalent en série glucose (β -arbutine) montrant un effet positif de la partie xylose.

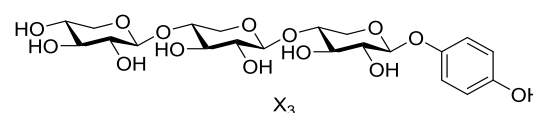
Tableau 15. Effets inhibiteurs des 4-hydroxyphényl β -D-oligoxylopyranosides et de la β -arbutine sur une tyrosinase de champignon.



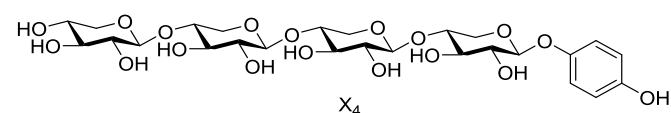
X₁



X₂



X₃

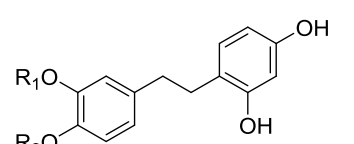


X₄

	X₁	X₂	X₃	X₄	β -arbutin
IC_{50} (mM)	3,7	0,74	0,48	0,18	6,3
Ki (mM)	-	0,20	0,29	0,057	-

Tajima *et al.* (Tajima et al. 2011) ont synthétisé des bibenzyl xylopyranosides qui ont été évalués comme inhibiteurs de la tyrosinase. Le bibenzyl xylobiopyranoside (**BZ₂**) est un inhibiteur particulièrement puissant (IC_{50} = 0,43 μ M), 17 fois plus efficace que l'acide kojique, témoin connu comme un inhibiteur de la tyrosinase (Kim and Uyama 2005) (Tableau 16). Les activités élevées des bibenzyl xylopyranosides ont suggéré que la tyrosinase pourrait posséder une cavité hydrophile dans son site actif.

Tableau 16. Activités inhibitrices de bibenzyl xylopyranosides et l'acide kojique sur une tyrosinase.



Bz_1 : R_1 = Xyl, R_2 = H
 Bz_2 : R_1 = H, R_2 = Xyl
 Bz_3 : R_1 = R_2 = Xyl

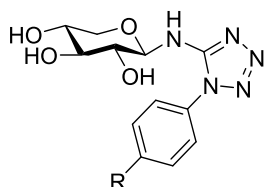
Composés testés	IC_{50} (μ M)
BZ₁	1,60 $\pm$ 0,43
BZ₂	0,43 $\pm$ 0,18
BZ₃	0,73 $\pm$ 0,11
Kojic acid	7,4 $\pm$ 1,4

b) Autres enzymes

Activité anti-hyaluronidase

La hyaluronidase, une enzyme qui dégrade principalement l'acide hyaluronique, joue un rôle clé dans de nombreux processus biologiques. Récemment, le développement de nouveaux médicaments pour cibler l'activité hyaluronidase a augmenté. L'acide hyaluronique est constitué d'un disaccharide répétitif composé de *N*-acétylglucosamine et d'acide glucuronique. Le 1-aminoxylose est un inhibiteur de la hyaluronidase, car il présente une structure analogue à la *N*-acétylglucosamine, il est donc reconnu par l'enzyme (Kato et al. 2015). La conception d'inhibiteurs de la hyaluronidase a conduit à la nécessité de deux exigences structurales: un hétérocycle contenant de l'azote lié à 1-aminoxylose. Kato *et al.* ont synthétisé des analogues triazole et tétrazole-xylopyranosides pour étudier l'inhibition de la hyaluronidase (Kato et al. 2015). Les tétrazole-xylopyranosides présentent une activité anti-hyaluronidase élevée à 5,0 mM (Tableau 17), tandis que les acétyltétrazole et acétyltriazole-xylopyranosides n'ont montré aucune activité anti-hyaluronidase. Ces résultats impliquent que la lipophilie des composés diminue leur efficacité.

Tableau 17. Taux d'inhibition de tétrazole-xylopyranosides à 5,0 mM sur une hyaluronidase.



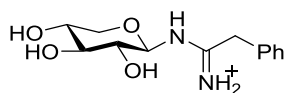
R	Taux d'inhibition (%)
H	33,2 ± 6,6
Cl	77,8 ± 4,6
NO ₂	89,8 ± 0,8

Inhibiteurs des β -glycosidases

Les glycosidases sont impliquées dans un certain nombre de processus physiologiquement importants, et la recherche d'inhibiteurs de glycosidases fait l'objet d'un intérêt croissant. La plupart des inhibiteurs ont été conçus pour mimer la charge et/ou la conformation de l'état de transition. Certaines glycosylamines sont rapportées comme étant des inhibiteurs de glycosidases puissants et sélectifs, mais elles sont connues pour être instables en raison de leur hydrolyse spontanée.

La β -D-xylosylamidine, qui est chimiquement plus stable, inhibe la β -glucosidase, mais a montré peu d'activité contre les α -glucosidases (Tableau 18) (Guo et al. 2001).

Tableau 18. Les activités inhibitrices de la β -D-xylosylamidine (K_i en μM).



Glycosidase	Origine	K_i
β -glucosidase	<i>A. niger</i>	11
	<i>T. viride</i>	13
	Almond	1100
β -xylosidase	<i>A. pulverulentus</i>	2,5
α -glucosidase	<i>A. niger</i>	*
α -galactosidase	<i>A. oryzae</i>	*

*pas d'inhibition.

IV.2. Applications physico-chimiques

IV.2.1. Tensioactifs

a) Généralités

Les tensioactifs, traditionnellement issus de la pétrochimie, sont largement utilisés dans une variété d'applications (en tant que détergent, en agrochimie, dans les industries agroalimentaire et cosmétique etc...). Au cours des dernières années, l'industrie a commencé à développer de nouvelles molécules à partir de matières premières renouvelables pour produire des tensioactifs qui présentent moins de toxicité biologique et environnementale, ainsi qu'une haute biodégradabilité. Dans ce contexte, les alkylpolyglycosides (APG) représentent une classe d'agents tensio-actifs qui répondent à tous ces critères (von Rybinski and Hill 1998, Dembitsky 2004, Martel et al. 2010). Les APG sont généralement obtenus par fonctionnalisation chimique (glycosylation de Fischer) d'un monosaccharide par un alcool gras pour obtenir une molécule amphiphile avec une tête polaire hydrophile et une queue lipophile non polaire. La nature de la tête polaire (nombre et nature des monosaccharides et le type de liaison glycosidique) ainsi que la nature du groupement aglycone des tensioactifs ont un effet important sur leurs propriétés physico-chimiques, à savoir, la concentration micellaire critique (CMC) et la tension de surface (γ) (Hadam et al. 2006). Alors que la plupart des APG sont généralement synthétisés à partir de glucose obtenu à partir d'amidon ou de saccharose en raison de leur grande disponibilité, une attention a récemment été portée sur les alkyl pentosides et en particulier les alkyl xylosides. En effet, les alkyl xylosides présentent de meilleures propriétés hydrophobes que les APG dues au nombre plus faible de groupements hydroxyles (3 pour les xylosides contre 4 pour les glucosides) et ont donc tendance à s'agréger à de plus faibles concentrations (Hadam et al. 2006, Marinkovic and Estrine 2010). Le type de liaison glycosidique a également un effet sur la CMC.

En effet, les α -alkyl xylosides montrent généralement une CMC légèrement inférieure à celle de leurs équivalents β parce qu'ils sont moins hydrophiles (Matsumura et al. 1990, Damez et al. 2007). L'augmentation de la longueur de la chaîne alkyle diminue la valeur de la CMC et a une influence beaucoup plus forte que la nature de la tête polaire (von Rybinski and Hill 1998). La glycosylation de Fischer conduit généralement à un mélange d'anomères et le DP moyen des APG est généralement voisin de 1 (Klai et al. 2015).

b) Synthèse et propriétés physico-chimiques

Comme décrit précédemment, les alkyl xylosides peuvent être synthétisés par la glycosylation de Fischer à partir de D-xylose (Klai et al. 2015), par la méthode des xylopyranoses peracétylés (Xu et al. 2012, Oldham et al. 2013) ou par la réaction de Koenigs-Knorr (Oldham et al. 2013). Récemment, Lehmler et ses collaborateurs ont synthétisé plusieurs alkyl, fluoroalkyl xylosides et des xylosides contenant un triazole comme groupement aglycone (Xu et al. 2012, Oldham et al. 2013) (Figure 53). Les propriétés de surface et les propriétés thermiques de ces composés ainsi que leur cytotoxicité ont été étudiées.

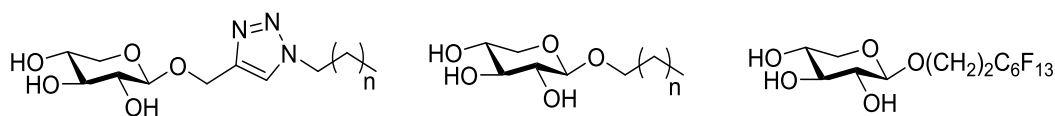


Figure 53. Les xylosides synthétisés par Lehmler et ses collaborateurs.

Les alkyl xylosides peuvent également être directement synthétisés à partir de xylanes ou de paille ou son de blé par glycosylation de Fischer (Bouxin et al. 2010, Marinkovic and Estrine 2010, Marinkovic et al. 2012, Sekine et al. 2013). Des études ont été réalisées afin de caractériser les activités de surface de mélanges bruts de pentosides obtenus à partir de xylanes ou de paille de blé par rapport à des alkyl xylosides purs.

Des mélanges d'alkyl pentosides obtenus par synthèse chimique à partir de xylanes (alkyl xylosides et alkyl arabinosides) ou de paille de blé (alkyl xylosides, alkyl arabinosides et alkyl glucosides) ont montré de bonnes propriétés de surface comparés aux alkyl xylosides purs (Tableau 19) (Bouxin et al. 2010, Marinkovic and Estrine 2010, Marinkovic et al. 2012).

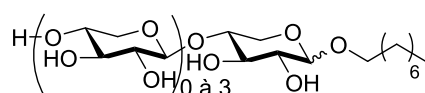
Des alkyl glycosides synthétisés à partir de paille de blé ont montré une CMC supérieure probablement due à la présence de polluants inorganiques, de protéines et de lignines probablement solubles et présents dans le mélange. Néanmoins, la production de mousse et la stabilité ne sont pas considérablement affectées par les impuretés, tandis que le pouvoir mouillant est légèrement inférieur. Ces synthèses à partir de paille de blé ou de xylanes permettent d'éviter des étapes de purification fastidieuses qui sont économiquement coûteuses pour les applications industrielles.

Tableau 19. Propriétés des tensioactifs selon la composition des glycosides à partir de D-xylose, de xylanes ou de paille de blé (Bouxin et al. 2010)

Composition des tensioactifs	CMC (mg/L)	γ_{CMC} (mN/m)
Décyl α/β -D-xylosides	301	28
Décyl D-glycosides à partir de xylanes	230	27
Décyl D-glycosides à partir de paille de blé	483	28

Alors que les approches chimiques conduisent à la synthèse d'alkyl α/β -D-xylopyranosides, des stratégies enzymatiques permettent la production d'alkyl β -D-xylopyranosides avec un DP moyen supérieur à 1 (Mamo et al. 2010, Ochs et al. 2011). La comparaison des propriétés physico-chimiques de ces tensioactifs indique qu'un mélange d'octyl α/β -D-xylosides présente de meilleures propriétés tensioactives que l'octyl β -D-xylopyranoside pur, tandis que l'augmentation du DP diminue les propriétés de surface (Tableau 20).

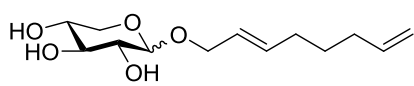
Tableau 20. Propriétés des tensioactifs des octyl xylosides.



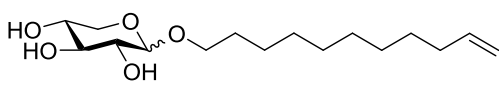
Composition des tensioactifs	CMC (mg/L)	γ_{CMC} (mN/m)
Octyl α/β -D-xyloside (Bouxin et al. 2010)	953	27
Octyl β -D-xylopyranoside (Matsumura et al. 1990)	1153	30
Octyl β -D-xylobiopyranoside (DP = 2) (Matsumura et al. 1990)	2364	33
Octyl β -D-xylopyranosides (DP>2) (Ochs et al. 2011)	4230	27

Les xylosides avec des chaînes alkyles insaturées peuvent également être synthétisés par la télomérisation du butadiène et par la glycosylation de Fischer à partir de D-xylose (Hadam et al. 2006, Damez et al. 2007, Bouquillon 2011). Ces molécules présentent de bonnes propriétés de surface, et l'anomère α présente généralement une meilleure activité que l'anomère β (Tableau 21).

Tableau 21. Propriétés des xylosides insaturés



2-(*E*)-7-octadiényl α/β-D-xylopyranoside



Undéc-10'-ényl α/β-D-xylopyranoside

Composition des tensioactifs	CMC (mg/L)	γ _{CMC} (mN/m)
2-(<i>E</i>)-7-octadiényl-β-D-xylopyranoside	-	-
2-(<i>E</i>)-7-octadiényl-α-D-xylopyranoside	500	31
Undéc-10'-ényl β-D-xylopyranoside	54	39
Undéc-10'-ényl α-D-xylopyranoside	48	36,5

Les xylosides insaturés ont également été utilisés pour produire des molécules amphiphiles bolaformes par des réactions de métathèse croisée, pour leurs propriétés physico-chimiques (Deleu et al. 2011, Deleu et al. 2012, Gatard et al. 2013) (Figure 54).

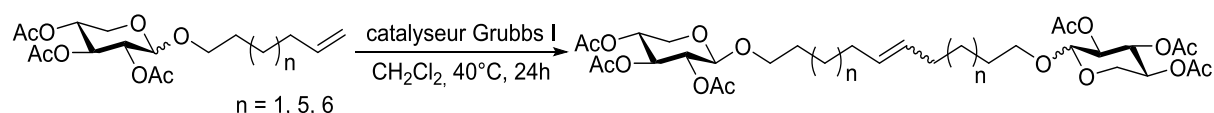


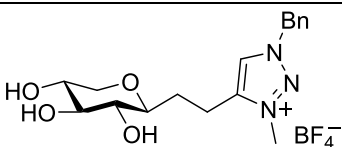
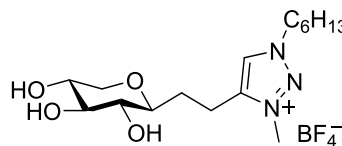
Figure 54. Molécule bolaforme.

IV.2.2. Activités diverses

a) Les liquides ioniques

Les liquides ioniques (LIs) ont attiré une attention considérable au cours des dernières années, grâce à leurs propriétés uniques (Wasserscheid and Welton 2008). Des LIs ont été préparés à partir de D-xylose par une voie originale et une réaction de « click chemistry » (Ferlin et al. 2013). Les paramètres de calorimétrie différentielle à balayage et d'analyse thermogravimétrique ont été mesurés pour deux LIs (Tableau 22). Les deux composés sont stables jusqu'à 120°C ou 150°C et ont montré une faible température de transition vitreuse positive.

Tableau 22. Propriétés des liquides ioniques.

LIs	T _g (°C)	T _{dec} (°C)
	4	150
	2,7	120

b) Glycodendrimères

Les dendrimères à base de D-xylose présentent la particularité d'être solubles dans l'eau et de s'associer à des ions métalliques tels que Au^{III} pour former des nanoparticules métalliques capables de catalyser des réactions effectuées dans l'eau (Figure 55) (Gatard et al. 2014)

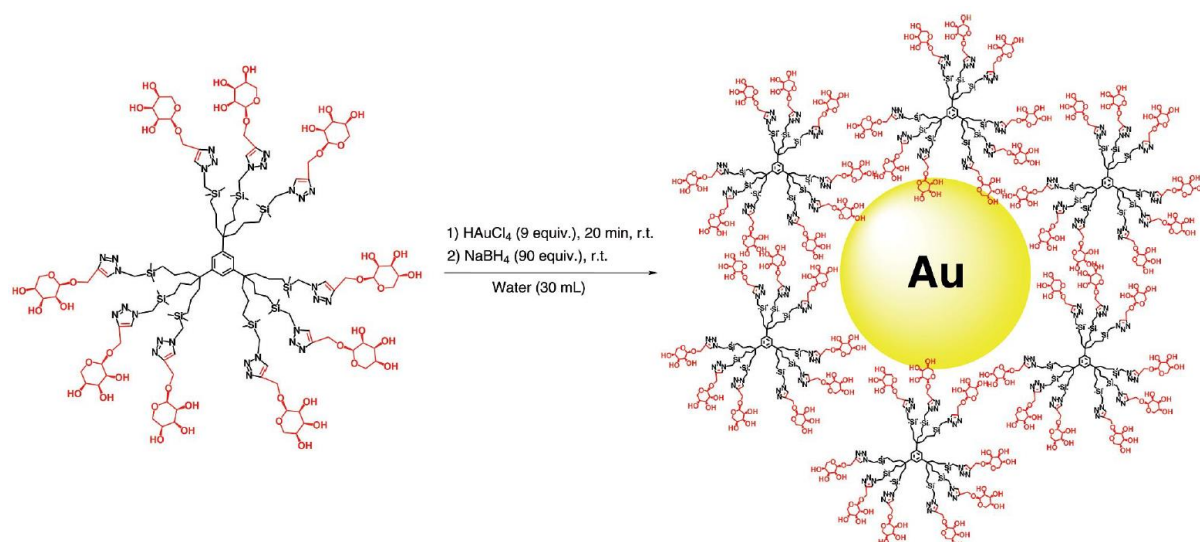


Figure 55. Préparation de nano-particules métalliques stabilisées par les glycodendrimères (Gatard et al. 2014).

Chapitre II :

Matériels et méthodes

I. Les xylanases

Au cours de cette thèse, toutes les enzymes utilisées sont des xylanases. Des enzymes recombinantes obtenues à partir de *Thermobacillus xylanilyticus* ont été utilisées pour nos études. *Thermobacillus xylanilyticus* est une bactérie hémicellulolytique stricte et thermophile qui a été isolée dans un sol du nord de la France sur lequel était entreposé un tas de compost.

Trois xylanases issues de cette bactérie ont été utilisées : la Tx-xyn10 His-Taggé (qui comporte un His-Tag à l'extrémité terminale) ainsi que la xylanase Tx-xyn11 pECXyl5 et un mutant ciblé lors de notre étude (W126A). Une xylanase commerciale de la société Novozymes® a également été utilisée, la NS 22083.

I.1. La xylanase commerciale

La xylanase utilisée dans le cadre de ce travail est la NS22083 fournie par la société Novozymes®, numéro de lot : VHN00002. Il s'agit d'une enzyme purifiée dont le pH et la température recommandés varient respectivement entre 4,5 et 6 et 35 à 55°C.

I.2. Production de xylanases Tx-xyn10 et Tx-xyn11 recombinantes

Trois xylanases recombinantes ont été produites et utilisées dans nos travaux : la xylanase Tx-xyn10 his-tagagée, la xylanase Tx-xyn11 recombinante et son mutant W126A.

I.2.1. Origine des xylanases Tx-xyn10 et Tx-xyn11 recombinantes

La xylanase Tx-xyn10 recombinante utilisée appartient à la famille 10 des glycoside hydrolases selon la classification CAZy. Le gène codant cette enzyme a été cloné à partir de *Thermobacillus xylanilyticus* et a été inséré dans le vecteur pET22b(+) lors de travaux antérieurs de l'UMR FARE (Beaugrand et al. 2004). Ce plasmide permet l'ajout d'une queue polyhistidine à l'extrémité C-ter de la protéine lors de son expression. En plus du gène d'intérêt, le plasmide présente le gène de résistance à l'ampicilline. L'ajout dans le milieu de culture de 50 µg/mL d'ampicilline permet de sélectionner uniquement les microorganismes possédant ce gène de résistance. Ainsi, seules les bactéries qui auront intégré le plasmide et qui posséderont le gène de résistance pourront se développer. L'expression de la xylanase Tx-xyn10 recombinante a été réalisée chez *E. coli*.

Le gène codant pour la xylanase Tx-xyn11 recombinante (pECXyl5) a été cloné à partir de *Thermobacillus xylanilyticus*. Le gène correspondant a été inséré dans le vecteur pRSETA lors d'une étude antérieure de l'UMR FARE (Paes and O'Donohue 2006). La mutation d'une asparagine en alanine en position 1 a permis d'obtenir une enzyme présentant une thermostabilité équivalente à celle de la xylanase Tx-xyn11 sauvage. Le plasmide contient le gène de résistance à l'ampicilline qui a par conséquent été ajoutée au milieu de culture lors de son expression par *E. coli*.

L'obtention du mutant Tx-xyn11 W126A est décrite dans la partie I.3.

I.2.2. Méthodes de culture pour l'obtention des xylanases Tx-xyn10 et Tx-xyn11 recombinantes

Sont décrites ici les méthodes de production des xylanases recombinantes Tx-xyn10, Tx-xyn11 et son mutant.

a) Milieux de culture

Milieux liquides

Le milieu de culture utilisé pour les cultures d'*E. coli* (souches XL1-Blue, BL21(DE3)) est le milieu LB, du nom de ses inventeurs Luria et Bertani. Il est composé de 10 g de tryptone, de 5 g d'extrait de levure et de 10 g de NaCl pour 1L de milieu. Le pH est ajusté à 7 avant autoclavage. L'ampicilline est ajoutée avant utilisation à température ambiante afin d'éviter sa dégradation.

Le milieu SOC est utilisé lors des transformations de cellules chimio-compétentes car il permet une meilleure efficacité de transformation des plasmides car c'est un milieu riche en nutriments adapté pour la croissance de cellules fragilisées. Il est composé d'une base de milieu SOB (Super Optimal Broth) (20 g/L tryptone, 5 g/L d'extrait de levure et 0,5 g/L de NaCl, du KCl à 2,5 mM en concentration finale ajusté à pH 7). Après autoclavage du milieu SOB, 10 µM de MgCl₂ et 20 µM de glucose en concentration finale sont ajoutés afin d'obtenir le milieu SOC.

Milieu solide

Pour la culture solide, sur boîte de Pétri, de l'agar est ajouté au milieu LB liquide avant autoclavage à une concentration finale de 15 g/L d'agar. La préparation des milieux en boîtes de Pétri nécessite de faire fondre le milieu LB Agar. Quand ce milieu est à une température raisonnable, la concentration souhaitée d'ampicilline est ajoutée (50 µg/mL pour Tx-xyn10 ou 100 µg/mL pour Tx-xyn11 et son mutant). En refroidissant, le milieu prend une consistance solide.

Les cultures sur milieu solide sont effectuées lors d'une remise en culture à partir d'un stock conservé à - 80°C, pour obtenir des clones après une transformation ou lorsque l'on souhaite conserver la souche à 4°C pour une utilisation proche.

b) Pré-cultures

Les pré-cultures sont réalisées à partir du prélèvement d'une colonie issue d'une boîte de Pétri ou d'une souche conservée à - 80°C. L'inoculum est ajouté dans quelques mL de milieu LB contenant de l'ampicilline à 50 µg/mL pour Tx-xyn10 ou 100 µg/mL pour Tx-xyn11 et son mutant. Après une croissance d'une nuit à 37°C sous agitation, les pré-cultures servent à inoculer des volumes de culture plus importants.

c) Cultures

La production d'enzyme est réalisée en erlenmeyer de 1L. Le milieu LB + ampicilline (50 µg/mL pour Tx-xyn10 ou 100 µg/mL pour Tx-xyn11 et son mutant) est inoculé à 0,1 unité de la densité optique (DO) finale à partir d'une pré-culture. Les cultures de Tx-xyn10 et Tx-xyn11 sont incubées à 37°C sous agitation pendant 24 h. Un suivi de croissance est réalisé par des lectures de DO à 600 nm. Dans le cas du mutant de la Tx-xyn11, une induction à 0,4 M d'IPTG (isopropyl β-D-thiogalactoside) est réalisée à 0,5-0,6 de DO où la culture est en phase exponentielle de croissance. A partir du moment d'induction, la culture est réalisée à température ambiante pendant 24 h.

I.3. Production du mutant Tx-xyn11 W126A

I.3.1. Souches utilisées

Différentes souches d'*E. coli* ont été utilisées. Afin d'amplifier le plasmide contenant le gène d'intérêt, la souche de propagation XL1-Blue a été utilisée. Pour produire la protéine d'intérêt, les souches d'expression BL21tuner(DE3) et BL21star(DE3) ont été employées. La mutation DE3 permet de produire une polymérase T7. Le vecteur pRSETA possède un promoteur T7 qui est fusionné à la région opératrice Lac, permettant la régulation de la transcription du gène d'intérêt. Le gène *LacI* présent sur le plasmide permet la production d'un répresseur de la région opératrice Lac qui se fixe sur cette région, empêchant la fixation de l'ARN polymérase T7 qui est produit par la souche DE3. Dans ce cas, la transcription du gène d'intérêt est inhibée. L'IPTG, ajouté lors de l'induction, se lie sur le répresseur LacI en changeant sa conformation, l'empêchant de se fixer sur la région opératrice Lac et permettant à l'ARN

polymérase d'assurer la transcription du gène. Les bactéries sont conservées au laboratoire à -80 °C.

I.3.2. Extraction et analyse de l'ADN à partir de la Tx-xyn11 recombinante

a) Extraction de l'ADN plasmidique

L'extraction de l'ADN est réalisée avec le kit *QIAprep® Spin Miniprep* de Quiagen. Dans un premier temps, 2,5 mL de culture bactérienne sont centrifugés (10 min, 6 000 rpm) afin d'obtenir un culot bactérien. Puis, une lyse alcaline des cellules bactériennes est réalisée comme suit afin de libérer les plasmides. Le culot est remis en suspension dans 250 µL du tampon P1 (Tris-Cl 50 mM pH 8, EDTA 10 mM, 100 µg/mL ARNase), puis la lyse est effectuée par 250 µL du tampon P2 (tampon de lyse, 200 mM NaOH, SDS 1%) et le milieu est neutralisé par 350 µL d'un milieu N3 (composition non connue). Après centrifugation (10 min, 13 000 rpm) afin d'éliminer les débris cellulaires, le surnageant est déposé sur une colonne de silice. L'ADN plasmidique s'adsorbe sur la colonne. Après lavage, afin d'enlever les impuretés avec différentes solutions de compositions non connues, l'ADN est élué par 40 µL d'eau ultrapure. La solution d'ADN obtenue est conservée à -20°C.

b) Analyse de l'ADN extrait

Dosage au Qubit®

L'ADN est quantifié en utilisant le kit *Quan-iT™ dsDNA HS* (High sensitivity) *Assay kit* et le fluorimètre Qubit® d'Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Ce kit permet de doser entre 0,2 et 100 ng d'ADN. Une solution de travail est réalisée puis 199 µL de cette solution et 1 µL de l'ADN sont mis en contact pendant 2 min à température ambiante. Dans la solution est contenu un réactif (un fluorophore, Quant-iT™ dsDNA HS reagent) qui est un intercalant d'ADN et permet une émission à une longueur d'onde de 530 nm après avoir été excité à 470 nm. La fluorescence mesurée est comparée à un étalon afin d'obtenir la concentration en ADN de l'échantillon.

Analyse sur gel d'agarose

Le gel d'agarose permet la vérification de la présence d'ADN et la taille du plasmide. Le gel d'agarose est préparé dans du tampon Tris 9 mM, borate 9 mM, EDTA 2 mM avec 1% d'agarose. Après une dissolution à chaud de l'agarose, 0,5 µg/mL de bromure d'éthidium (BET) en concentration finale est ajouté puis le gel est coulé entre des plaques d'électrophorèse. En refroidissant, le gel prend une consistance solide. Le BET est l'agent intercalant de l'ADN qui permet une visualisation de celui-ci lorsqu'il est exposé aux rayons ultra-violets (UV).

Les échantillons avant dépôt sur gel sont mélangés avec 1 goutte de tampon de charge GLB (glycérol 50%, bleu de bromophénol 0,125%, EDTA 0,5 M pH 8). Un marqueur de taille (SmartLadder ; Eurogentec) est également déposé afin d'estimer la taille des brins d'ADN d'intérêt. La migration se fait dans du tampon Tris 0,1 M, Borate 0,1 M, EDTA 2 mM, pH 8 sous tension de 100 V pendant environ 25 min. La lecture est réalisée sous UV à l'aide d'un appareil BioVision (Fisher Bioblock Scientific) grâce au logiciel Visiocapt Vs.

I.4.3. Obtention du mutant Tx-xyn11 pECXyl5 W126A

a) PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction) a pour but l'amplification d'un brin d'ADN en un grand nombre de copies par la répétition de cycles (30-40) comportant 3 étapes (Figure 56) avec des températures et des temps variables :

- Dénaturation (95°C, 30 s) : les brins d'ADN se séparent ;
- Hybridation (30 s à 55°C-68°C) : les amorces reconnaissent et s'apparient à leurs séquences complémentaires ;
- Elongation (2 min à 72°C) : l'ADN polymérase assemble les nucléotides (dNTP) dans le sens 5'→ 3' à partir des amorces afin de former la séquence complémentaire.

Pour réaliser une PCR, la matrice d'ADN (50 ng), deux amorces (sens et anti-sens), le tampon de la réaction, des nucléotides (dNTP) et l'ADN polymérase sont mis en mélange avant d'être mis dans un thermocycleur pour subir les trois étapes en un grand nombre de cycles. Dans le cas d'une PCR sur colonie afin d'amplifier un gène d'intérêt, une colonie est mise dans le mélange à la place de la matrice d'ADN avant d'effectuer les différents cycles.

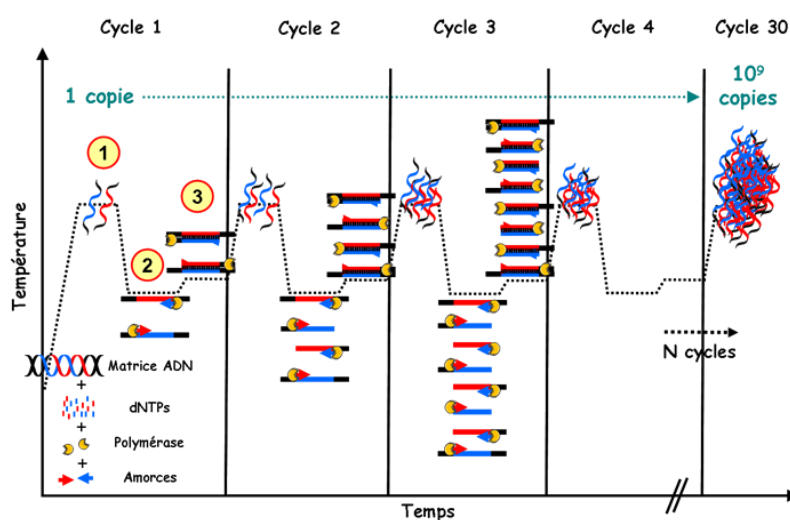


Figure 56. Principe de la PCR. 1) Dénaturation, 2) Hybridation et 3) Elongation.

b) Mutagénèse dirigée

La mutagénèse dirigée a été effectuée à l'aide d'un kit *QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit* d'Agilent-Technologies (Santa Clara, CA United States). Dans un premier temps, la synthèse des brins contenant la mutation est effectuée à l'aide d'une PCR puis dans un deuxième temps, le plasmide initial est digéré afin d'obtenir uniquement des brins nouvellement synthétisés contenant la mutation.

Le principe de la mutagénèse est présenté en Figure 57. Deux amorces complémentaires au vecteur pRSETA (sens et anti-sens) (Tableau 23) et contenant la mutation sont hybridées. Lors des différents cycles de PCR, la polymérase *PfuUltra* HF permet la formation du plasmide muté. Afin d'éliminer le plasmide parental, le produit de PCR est soumis à l'action d'une endonucléase *Dpn* I, celle-ci est spécifique et cible les brins méthylés et hémiméthylés. Le plasmide contenant la mutation et nouvellement synthétisé est resté intact. Une transformation est ensuite effectuée dans les cellules XL1-Blue.

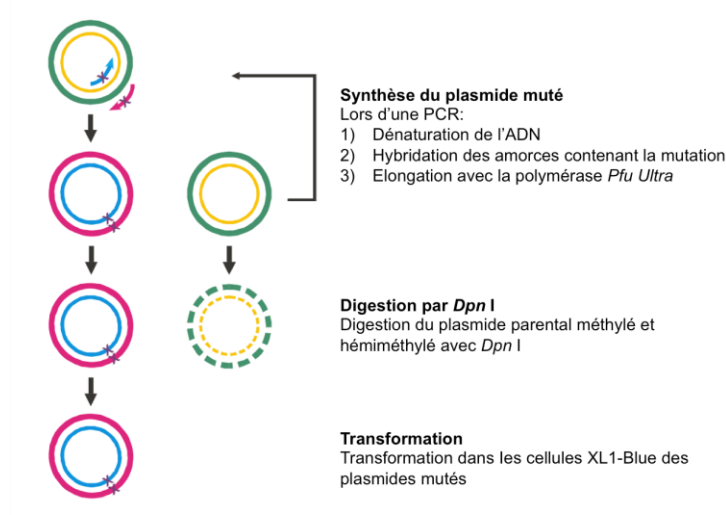


Figure 57. Principe de la mutagénèse dirigée

Tableau 23. Séquences des amorces pour la mutation W126A

	Séquences	Température hybridation	% GC	Taille (g/mol)
5' → 3' (sens)	cagacgttccaacaatacgcgagcggttcgtcagcaga	63,8°C	54,1	11352.4
5' → 3' (anti-sens)	tctgctgacgaacgctcgcgtattgttgaacgtctg	63,8°C	54,1	11387.4

La mutagénèse dirigée est réalisée dans un volume réactionnel de 50 µL d'eau contenant 50 ng d'ADN plasmidique de la Tx-xyn 11 pECXyl5, 200 ng d'amorces sens et anti-sens contenant la mutation, 5 µL du tampon de réaction, 1 µL dNTP mix et 1 µL d'ADN polymérase *PfuUltra* HF à 2,5 UI/µL. La PCR se compose de 16 cycles avec 30 s de dénaturation à 95°C, 1 min d'hybridation à 55°C puis 3 min d'élongation à 68°C (1 min/kb). Après la fin de la PCR, la digestion du

plasmide parental a été effectuée par 1 μL *Dpn* I à 10 UI/ μL pendant 1 h à 37°C. Une transformation est ensuite effectuée dans les cellules XL1-Blue.

c) Transformation des cellules chimiquement compétentes

Les cellules chimiocompétentes sont des cellules bactériennes traitées avec une solution très froide de chlorure de calcium qui leur permet de devenir aptes à intégrer de l'ADN plasmidique étranger lorsqu'elles subissent ce choc thermique.

L'ADN plasmidique à transformer (50 ng) est mis en contact avec 250 μL de cellules chimiocompétentes (*E. coli* XL1-Blue, BL21tuner(DE3) et BL21star(DE3)) pendant 30 min dans la glace. Ensuite, les cellules et l'ADN subissent un choc thermique, 45 s à 42°C, qui conduit à la fragilisation de la membrane cellulaire et à l'internalisation de l'ADN. Puis, le mélange est remis dans la glace pendant au moins 2 min. Enfin, 500 μL de milieu SOC est ajouté puis le tout est mis sous agitation pendant 1 h à 37°C pour permettre la réplication des cellules transformées. Les cellules sont ensuite étalées à l'aide de billes en verre sur une boîte de Pétri contenant le milieu LB solide contenant 100 $\mu\text{g/mL}$ d'ampicilline dans le cas de XL1-Blue et 50 $\mu\text{g/mL}$ pour BL21(DE3) (sélection des cellules). L'incubation de la boîte de Pétri dure 1 nuit à 37°C.

d) Séquençage et analyse bio-informatique des clones issus de la transformation dans XL1-Blue

Il faut s'assurer après transformation de l'ADN plasmidique issu de la mutagenèse dirigée dans la souche de propagation XL1-Blue que la mutation a bien été intégrée. Après étalement sur boîte de Pétri (LB solide avec 100 $\mu\text{g/mL}$ d'ampicilline) puis une nuit à 37°C, des clones sont analysés afin d'évaluer si la mutation a été intégrée.

Les clones obtenus lors de la transformation sont remis en culture (5 mL) pendant 1 nuit à 37°C sous agitation dans un milieu LB avec 100 $\mu\text{g/mL}$ d'ampicilline en concentration finale. Après obtention du culot cellulaire par centrifugation, l'ADN est extrait. L'ADN (30 ng environ) est séquençé par un prestataire de service (Eurofins, Allemagne). Les résultats du séquençage sont ensuite analysés par des outils bio-informatiques en lignes (Blast protéines et nucléotides, revseq et transeq). Si le séquençage est correct, l'ADN du clone est ensuite transformé dans les cellules d'expression *E. coli* BL21(DE3).

Afin de conserver les constructions bactériennes pour une longue durée, un stock glycérol est réalisé puis stocké à -80°C. Dans un cryotube, 750 μL de milieu récupéré après culture en milieu liquide des souches d'intérêt sont ajoutés et mélangés à 750 μL d'une solution aqueuse de glycérol à 50%, puis l'ensemble est congelé à - 80°C. Ces stocks seront utilisés pour inoculer des pré-cultures ou réaliser des cultures en milieu solide.

I.5. Extraction et purification des xylanases

I.5.1. Extraction des xylanases recombinantes

Les xylanases recombinantes produites par expression hétérologue chez *E. coli* (§ I.2.2) sont intracellulaires. Il est donc nécessaire de les extraire. Après culture, les cultures bactériennes sont centrifugées à 6 000 rpm pendant 30 min afin d'obtenir des culots cellulaires. Les culots sont ensuite remis en suspension dans du tampon Tris HCl 50 mM pH 8 pour la Tx-xyn11 et son mutant W126A et du tampon phosphate 50 mM, NaCl 500 mM, Imidazole 20 mM pH 7,4 pour la Tx-xyn10. Ensuite, les suspensions sont soumises à une lyse cellulaire par sonication avec un *Sonificateur Vibra Cell 72412* par l'action d'ultrasons pendant 5 s toutes les 5 s pendant 40 min à une température de 4°C. Les ultrasons conduisent à la lyse des parois des cellules bactériennes ce qui permet de libérer le milieu intracellulaire contenant les protéines recombinantes. L'efficacité de la lyse bactérienne peut se faire par observation d'un état frais au microscope. Les débris cellulaires sont ensuite enlevés par centrifugation 15 000 rpm pendant 20 min. Le surnageant est ensuite purifié.

I.5.2. Purification des xylanases

Purification de la xylanase Tx-xyn11 recombinante et du mutant W126A

La xylanase Tx-xyn11 ne possédant pas de queue polyhistidine, sa purification et celle de son mutant se fait en deux étapes par passages successifs sur deux résines différentes selon le protocole de Debeire-Gosselin *et al.* (Debeire-Gosselin *et al.* 1992).

La première colonne contient une résine Q Sépharose (échangeuse d'ions) équilibrée avec du Tris HCl 50 mM pH 8 qui permet de retenir la plupart de protéines présentes dans le jus de culture à l'exception de la protéine Tx-xyn11. L'éluat obtenu est ensuite passé sur une deuxième colonne qui contient une résine Phényl Sépharose CL4B (hydrophobe) équilibrée avec du Tris HCl 50 mM pH 8 qui retient la xylanase Tx-xyn11 jusqu'à son élution par du Tris HCl 50 mM pH 8 avec 25% d'éthylène glycol. La pureté des protéines est vérifiée par électrophorèse SDS-page.

Purification de la xylanase Tx-xyn10 avec une queue polyhistidine

La Tx-xyn10 présente une queue polyhistidine à l'extrémité C-ter. La purification est effectuée en utilisant une résine Histrap™ HP (GE HealthCare) de type IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography) sur un système AKA Prime (Amersham Biosciences) qui permet de faire un suivi de DO à 280 nm. La résine est une résine sépharose sur laquelle des ions Ni²⁺ sont immobilisés. Les résidus histidines de la queue polyhistidine de Tx-xyn10 sont chélatés par les

ions Ni^{2+} car ils présentent une forte affinité pour ces derniers, ce qui conduit à la fixation de la protéine d'intérêt sur la résine. Dans un premier temps, l'échantillon protéique dans le Tp tampon phosphate 50 mM, NaCl 500 mM, Imidazole 20 mM pH 7,4 est chargé sur la colonne puis lavé par une solution de tampon phosphate 50 mM, NaCl 500 mM, Imidazole 20 mM pH 7,4. Lorsque la DO redescend à 0 (ce qui signifie que les protéines non retenues ont toutes été éluées), une solution de tampon phosphate 100 mM, NaCl 500 mM, Imidazole 20 mM pH 7,4 est utilisée. Lorsque la DO à 280 nm remonte, la protéine est en train d'être éluee et la fraction est collectée, car l'imidazole entre en compétition avec les histidines et permet de décrocher les protéines d'intérêt. La pureté des protéines est vérifiée par électrophorèse SDS-page.

I.5.3. Electrophorèse SDS-page

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS-page (12% d'acrylamide) est un moyen utilisé pour la séparation et l'analyse qualitative des protéines afin de s'assurer de leur taille et de leur pureté. 5 μL de tampon de charge (Tris HCl 1 M pH 8, glycérol 20%, SDS 2%, DTT 40 mM, bleu de bromophénol 0,02%) sont ajoutés à 15 μL d'échantillon de protéines puis l'ensemble est chauffé à 95°C pendant 10 min. Suite au chauffage en présence de SDS, les protéines sont dénaturées et chargées négativement (fixation du SDS de façon proportionnelle à la masse moléculaire). La séparation se fait donc uniquement en fonction de la masse moléculaire.

Après dépôt des échantillons de protéines, la migration s'effectue dans un tampon Tris 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0,05%, pH 8,3 à une tension de 200 V pendant environ 45 min. Les protéines migrent selon leur taille qui peut être estimée par rapport à un marqueur de taille après coloration au bleu de Coomassie (0,1% (p/v)) et révélation par décoloration à l'acide acétique à 10% (v/v).

I.6. Caractérisation des xylanases

I.6.1. Dosage de l'activité xylanase

L'activité xylanase est déterminée par le dosage de Kidby et Davidson (Kidby and Davidson 1973). Il permet de doser les fonctions réductrices libérées lors de l'hydrolyse de xylanes en xylose et xylo-oligosaccharides par les xylanases. Il s'agit d'un dosage colorimétrique.

La réaction enzymatique est réalisée à 50°C (xylanase NS 22083) ou à 60°C (xylanases recombinantes) selon les conditions d'utilisation des enzymes. La réaction est initiée par l'ajout de 100 μL de la solution contenant l'enzyme dans 900 μL d'une solution à 0,5% (p/v) de xylanes de hêtre (Roth®) dans un tampon acétate de sodium 50 mM pH 5,8. La cinétique est réalisée ensuite par des prélèvements de 100 μL de la solution enzyme-substrat toutes les 2 min pendant 10 min qui sont ajoutés immédiatement dans 1,5 mL de réactif de Kidby (solution de

ferricyanure de potassium à 300 mg/L dans du tampon carbonate de sodium 10 g/L) afin de stopper la réaction. Ensuite, le réactif est chauffé pendant 5 min à 100°C. Sous l'action de la chaleur et en fonction de la quantité de fonctions réductrices libérées, le ferricyanure de potassium est réduit et conduit à une décoloration du réactif de Kidby, initialement jaune. La lecture au spectrophotomètre se fait à 420 nm. En parallèle, une gamme étalon de xylose est réalisée de 0 à 400 µg/mL, ajoutée au réactif de Kidby puis chauffée dans les mêmes conditions.

La pente de la droite représentant la quantité de fonctions réductrices libérées en µg/mL en fonction du temps est tracée grâce aux mesures d'absorbance réalisés à 420 nm et la gamme étalon de xylose. Cette dernière sera utilisée lors de l'équation du dosage.

L'activité enzymatique est ensuite calculée selon l'équation suivante :

$$A = \frac{\text{pente de la droite} \times V_{\text{tot}} \times d}{V_{\text{enz}} \times M(\text{xylose})}$$

A = l'activité enzymatique en UI/mL soit la quantité de produit libéré en µmol, par min, et par mL de solution enzymatique.

V_{tot} = volume de la réaction enzymatique, soit 1000 µL.

V_{enz} = volume de la solution d'enzyme ajoutée soit 100 µL.

d = dilution de l'enzyme

M(xylose) = masse molaire du xylose soit 150 g/mol.

I.6.2. Paramètres cinétiques de la xylanase Tx-xyn11 pECXyl5 et de son mutant W126A

Les paramètres cinétiques des xylanases Tx-xyn11 pECXyl5 et W126A ont été obtenus par le dosage de Kidby en utilisant des concentrations en xylanes de hêtre de 0,5–1–2–3–5–7–10 mg/mL à 60°C dans un tampon acétate de sodium 50 mM pH 5,8. La Tx-xyn11 et la Tx-xyn11 W126A sont utilisées à 1,11 et 3,26 µg/mL, respectivement. Les mesures ont été réalisées en triplicats. Les paramètres cinétiques de constante d'affinité (K_M) et de vitesse initiale (V_m) sont calculés d'après le modèle de Michaelis-Menten à l'aide du module Enzyme Kinetics du logiciel SigmaPlot 2000. La constante catalytique (k_{cat}) est calculée grâce à la formule $k_{\text{cat}} = V_{\text{m}}/E_{\text{tot}}$ où E_{tot} correspond à la quantité d'enzyme totale dans l'essai en µmol. L'efficacité catalytique (k_{cat}/K_M) correspond à la quantité de substrat consommé par µmol d'enzyme par unité de temps.

III. Synthèse des xylosides par réaction de transglycosylation

III.1. Sources de xylanes

III.1.1. Xylanes commerciaux

Les xylanes utilisés au cours de ce travail sont des xylanes de hêtre commercialisés par la société Carl Roth (Karlsruhe, Allemagne).

III.1.2. Analyse de la composition en sucres

La composition en sucres des xylanes commerciaux, est déterminée après hydrolyse acide, par chromatographie échangeuse d'anions de type HPAEC (High Performance Anion Exchange Chromatography), qui permet la séparation des monosaccharides et des oligosaccharides en fonction de leur pKa. La phase mobile étant fortement basique, les oligosaccharides se comportent comme des anions.

L'hydrolyse acide des xylanes est réalisée en pesant 10 mg de biomasse et en ajoutant 125 µL d'une solution de H₂SO₄ à 12 M à température ambiante pendant 2 h. Ensuite, 200 µL d'une solution de fucose à 10 g/L avec 675 µL d'eau sont ajoutés et ce mélange est laissé incubé pendant 1 h à 100°C pour que l'hydrolyse d'effectue.

Les hydrolysats obtenus sont ensuite filtrés sur membrane de porosité 0,2 µm puis injectés sur colonne Carbo-PA-1 (4 x 250mm, Dionex) et les monosaccharides sont élués par un gradient de NaOH-acétate de sodium. La sensibilité du signal est amplifiée par un post-colonne (NaOH 300 mM) et les monosaccharides sont détectés par ampérométrie pulsée (ED 40, Dionex). La quantification des monosaccharides est basée sur l'aire de l'étalon interne, le fucose.

III.2. Accepteurs

Les alcools utilisés lors des réactions de transglycosylation enzymatique ont été fournis par Sigma Aldrich® à l'exception de l'alcool *p*-coumarique.

L'alcool *p*-coumarique a été synthétisé à partir de l'acide *p*-coumarique en 2 étapes *via* la formation de l'ester méthylique correspondant (Figure 58) (Quideau and Ralph 1992).

Estérification de l'acide *p*-coumarique : De l'acide *p*-coumarique (10,04 g, 61,2 mmol) est mis en solution dans 20 mL de méthanol puis 20 gouttes de H₂SO₄ concentré sont ajoutées. La solution est chauffée à reflux pendant 24 h. Le méthanol en excès est évaporé sous vide puis la solution est versée dans 100 mL d'eau froide. L'acide est neutralisé par une solution saturée en

bicarbonate de sodium. Le précipité formé est filtré, redissout dans l'acétate d'éthyle (AcOEt) puis séché sur MgSO_4 . La solution est filtrée puis le solvant est évaporé sous vide. Le produit est purifié par chromatographie sur silice (Essence G : AcOEt 7:3). Le rendement est de 90% (9,78 g).

Réduction de l'ester méthylique de l'acide *p*-coumarique : 15 mL de LiAlH_4 1 M en solution dans du THF (15 mmol) et 25 mL de THF anhydre sont introduits dans un ballon de 250 mL sous atmosphère d'argon. Une solution de chlorure de benzyle (BnCl) (1,7 mL, 15 mmol) dans 10 mL de THF anhydre est ajoutée au goutte à goutte grâce à une ampoule à addition. La solution est agitée pendant 15 min. L'ester méthylique de l'acide *p*-coumarique (1,8 g, 10 mmol) est mis en solution dans 15 mL de THF anhydre puis additionné goutte à goutte. Après 1h30 d'agitation, de l'eau est additionnée à 0°C. La solution est filtrée, séchée sur MgSO_4 , et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit est purifié par chromatographie sur silice (Essence G : AcOEt 1:1). Le rendement est de 35% (686,6 mg).

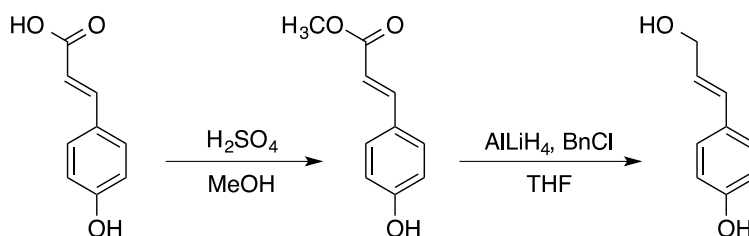


Figure 58. Synthèse de l'alcool *p*-coumarique à partir de l'acide *p*-coumarique en 2 étapes *via* l'ester.

III.3. Synthèse enzymatique et purification des produits de synthèse

L'analyse qualitative des mélanges réactionnels et le suivi des purifications des produits sont réalisés par Chromatographie sur Couche Mince (CCM) sur plaque de silice (Merck DC Alufolien Kieselgel 60 PF₂₅₄). Lors de l'analyse des mélanges bruts réactionnels de synthèse, un dépôt de 5 μL est effectué et élué avec des mélanges AcOEt : AcOH : eau (7:2:2) ou butanol : AcOH : eau (2:1:1), selon la polarité des produits. Lors du suivi des purifications, la phase mobile AcOEt : AcOH : eau (7:2:2) est utilisée ainsi que des mélanges AcOEt : méthanol dans différentes proportions. La révélation des produits se fait à 250°C avec 0,2% (m/v) d'orcinol dans l'acide sulfurique 20% (v/v).

III.3.1. Synthèse enzymatique

La synthèse enzymatique par les xylanases est réalisée dans de l'eau, en présence d'un donneur glucidique (xylanes ou xylo-oligosaccharides), d'un accepteur (une molécule d'alcool)

et en présence ou non de *tert*-butanol utilisé en tant que co-solvant. Selon les accepteurs mais aussi les produits souhaités, les conditions réactionnelles peuvent être très différentes et seront décrites dans le Chapitre IV. L'enzyme est ajoutée selon la dose souhaitée en UI/mL, l'accepteur en % (v/v) ou en concentration molaire (M) et le donneur en % (p/v). Les réactions en petits volumes (0,5-1 mL) sont réalisées dans des tubes en verre à vis sous agitation dans des bains à huile à des températures de 50°C ou 60°C selon l'enzyme utilisée et des temps d'incubation selon les conditions réactionnelles déterminées. Les réactions sont arrêtées par chauffage à 100°C pendant 20 min.

Les réactions en plus gros volume sont réalisées dans des bouteilles en verre de contenant adapté au volume avec un système d'agitation par hélice magnétique. Une réaction de 500 mL a été effectuée dans un réacteur 2L (IKA eurostat IKA Werke stirrer) à paroi thermostatée avec une pale d'agitation permettant une agitation vigoureuse.

Lors des synthèses enzymatiques, des xylanes résiduels insolubles subsistent. Une centrifugation de 10 min à 5 500 rpm permet d'éliminer les xylanes insolubles et ainsi récupérer le surnageant contenant les produits de synthèse. Le culot est rincé à l'eau puis centrifugé à nouveau. Les deux surnageants sont réunis.

III.3.2. Purification des produits de synthèse

a) Purification de propargyl xyloside et xylobioside

La purification du mélange réactionnel de la synthèse de propargyl oligoxylosides se fait en 2 étapes : une purification sur colonne de silice C18 (Polyprep® 60-50 C₁₈ Macherey-Nagel) afin d'éliminer facilement les produits d'hydrolyse puis passage sur colonne de silice (Kieselgel 60, 0,04-0,063 mm Merck) afin de séparer les produits selon leur DP.

Purification sur colonne de silice C18

Dans le cas d'une purification sur colonne de silice C18 (Polyprep® 60-50 C₁₈ Macherey-Nagel), le volume du brut réactionnel est concentré à moitié du volume initial avant dépôt.

Les produits d'hydrolyse sont élués en premier, puis les produits de synthèse (propargyl xyloside et xylobioside) sont élués en mélange avec comme éluant de l'eau.

Les fractions obtenues contenant les propargyl xyloside et xylobioside sont ensuite réunies et lyophilisées.

Purification sur colonne de silice

Les produits n'étant pas très solubles dans le mélange AcOEt : MeOH, un dépôt solide est réalisé. Il est ensuite déposé sur une colonne équilibrée avec de l'AcOEt puis élué par un mélange AcOEt : MeOH 9:1 puis 8:2. Les propargyl xyloside et xylobioside sont ainsi séparés.

b) Purification des aryl xylosides et xylobiosides

La purification des xylosides à aglycones aromatiques est effectuée par chromatographie sur colonne de silice (Kieselgel 60, 0,04-0,063 mm Merck). Le mélange brut réactionnel est lyophilisé ou concentré sous pression réduite afin d'éliminer l'eau. Les produits n'étant pas très solubles dans le mélange AcOEt : MeOH, un dépôt solide est réalisé. Il est ensuite déposé sur une colonne équilibrée dans l'AcOEt puis élué, selon la polarité des produits par une phase mobile AcOEt : MeOH 9:1 à 7:3.

IV. Synthèse des « click » xylosides et xylobiosides

La plupart des azotures utilisés sont des azotures commerciaux fournis par Sigma-Aldrich, excepté le phényl azoture. Ce dernier est synthétisé à partir d'aniline selon un mode opératoire décrit dans la littérature (Lu et al. 2010). Le sel de diazonium correspondant est formé à 0°C en milieu acide en présence de nitrite de sodium, puis l'ajout de l'azoture de sodium conduit à la formation de phényl azoture (Barral et al. 2007).

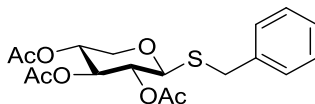
La réaction de cycloaddition est effectuée avec 0,6 mmol d'azoture, 0,5 mmol de propargyl xyloside ou xylobioside dans 4 mL d'un mélange *tert*-BuOH : H₂O 1:1, en présence de 0,05 mmol de sulfate de cuivre et de 0,1 mmol d'ascorbate de sodium. Après une nuit d'agitation à température ambiante, le brut réactionnel est directement déposé sur une colonne de silice (Kieselgel 60, 0,04-0,063 mm Merck) équilibrée par l'AcOEt ou par un mélange AcOEt : MeOH 9:1. L'élution est réalisée par un mélange AcOEt : MeOH 9:1 ou 8:2. Les « click » xylosides sont décrits dans le Chapitre IV.

Pour les produits **3h** et **4h**, une réaction de déprotection des groupements hydroxyles du xylopyranoside de l'aglycone est effectuée. Le produit **3g** (ou **4g**) est dissout dans du méthanol anhydre (10 mL) sous atmosphère d'argon. Une quantité catalytique de Na solide est ajoutée. La réaction est agitée 30 min à température ambiante puis est neutralisée par une résine échangeuse d'ions (Dowex® 50W X8, Fluka). La résine est filtrée et le méthanol est éliminé sous pression réduite. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur silice (AcOEt).

V. Synthèse des *S*- et *C*-xylosides

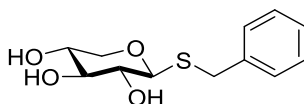
V.1 Synthèse du benzyl 1-thio- β -D-xylopyranoside

Benzyl 2,3,4-tri-*O*-acétyl-1-thio- β -D-xylopyranoside (Contour et al. 1989) :



Du 1,2,3,4-tétra-*O*-acétyl- β -D-xylopyranose (1,1 g, 3,46 mmol) est mis en solution dans du dichlorométhane (20 mL) et la solution est portée à -10°C sous argon. Le benzyl mercaptan (810 μ L, 6,92 mmol) puis l'acide de Lewis, ZrCl_4 (755 mg, 3,24 mmol), sont ajoutés. La réaction est laissée sous agitation pendant 6 h à -10°C. La réaction est stoppée par addition d'eau. Après extraction, la phase organique est lavée par une solution saturée de NaHCO_3 puis avec de l'eau. La phase organique est séchée sur MgSO_4 et le dichlorométhane est ensuite éliminé à l'évaporateur rotatif. Le produit brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (AcOEt : MeOH 9:1). Le benzyl 2,3,4-tri-*O*-acétyl-1-thio- β -D-xylopyranoside est obtenu avec 64% de rendement (844 mg)

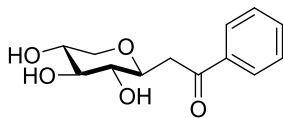
Benzyl 1-thio- β -D-xylopyranoside :



Le benzyl 2,3,4-tri-*O*-acétyl-1-thio- β -D-xylopyranoside (748 mg, 2,7 mmol) est dissout dans du méthanol anhydre (10 mL) sous atmosphère d'argon. Une quantité catalytique de Na solide est ajoutée. La réaction est agitée 30 min à température ambiante puis elle est neutralisée par une résine échangeuse d'ions (Dowex® 50W X8, Fluka). La résine est filtrée et le méthanol est éliminé sous pression réduite. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur silice (AcOEt). Le benzyl 1-thio- β -D-xylopyranoside obtenu est recristallisé dans un mélange éther de pétrole/acétate d'éthyle.

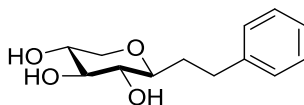
V.2. Synthèse du phényléthyl C-xyloside

1-Phényl-2-C-(β-D-xylopyranosyl)éthanone (Feng et al. 2011)



Du D-xylose (800 mg, 5,3 mmol), du dibenzoylméthane (1,12 g, 10 mmol) sont mis en solution dans 20 mL d'un mélange d'éthanol : eau (4:1). Puis NaHCO₃ solide (840 mg, 10 mmol) est ajouté et le mélange est chauffé à reflux pendant 15 h. Après refroidissement, la solution est neutralisée par une résine échangeuse d'ions (Dowex® 50W X8, Fluka). La résine est filtrée et l'éthanol est éliminé sous pression réduite. La solution aqueuse résiduelle est lavée par du dichlorométhane. Le volume de la solution aqueuse est réduit sous pression réduite puis déposé sur une colonne de silice équilibrée avec AcOEt (AcOEt puis AcOEt/MeOH). La 1-phényl-2-C-(β-D-xylopyranosyl)éthanone est éluée avec AcOEt : MeOH (9:1), puis recristallisée dans un mélange éther de pétrole/acétate d'éthyle (masse obtenue : 540 mg, 41%).

Phényléthyl β-C- xylopyranoside (Hashimoto and Takahashi 2009)



La 1-phényl-2-C-(β-D-xylopyranosyl)éthanone (200 mg, 0,76 mmol) est dissoute dans 2 mL d'acide trifluoroacétique. Après ajout de 20 mg de 10% Pd/C à température ambiante, le ballon est mis sous atmosphère d'hydrogène (ballon) sous agitation. Après une nuit, le catalyseur est filtré sur célite et rincé au méthanol. Le méthanol est éliminé sous pression réduite. Le phényléthyl C-xyloside est purifié par chromatographie par colonne de silice (AcOEt puis AcOEt/MeOH 9 :1) (masse obtenue : 114,5 mg, 63%).

VI. Caractérisation des produits

VI.1. Masse

Les spectres de masse basse et haute résolution ont été réalisés sur un appareil Q-TOF (Micromass Manchester) possédant une source électrospray au sein du Service Central d'Analyse de l'ICMR.

VI.2. RMN

Les spectres de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) du proton ^1H et du carbone ^{13}C , COSY et de corrélation ^1H - ^{13}C sont enregistrés sur un appareil Bruker à 500 MHz ou 600 MHz (^1H) et 125 MHz ou 150 MHz (^{13}C), à température ambiante dans D_2O , CD_3OD ou DMSO-d_6 avec comme référence interne le tétraméthylsilane dans CDCl_3 . Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm, les couplages en hertz et la multiplicité des signaux est symbolisée comme suit : s (singulet), d (doublet), dd (doublet de doublet), ddd (doublet de doublet de doublet), t (triplet), dt (doublet de triplet), td (triplet de doublet), q (quadruplet), qu (quintuplet), sex (sextuplet) et m (massif ou multiplet).

VI.3. Température de fusion

Les points de fusion (non corrigés) ont été déterminés en tube capillaire à l'aide d'un appareil Stuart SMP3.

VI.4. Pouvoir rotatoire

Les pouvoirs rotatoires ont été mesurés à l'aide d'un appareil Perkin-Elmer modèle 341 à la température et dans le solvant indiqués.

VI.5. Micro-analyse

Les analyses élémentaires ont été effectuées sur un appareil Perkin-Elmer CHN 2400 à l'ICMR par Sylvie Lanthony.

VII. Quantification par Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP)

Les propargyl xylopyranosides et les benzyl xylopyranosides synthétisés ont été analysés par CLHP. Les produits isolés et purifiés sont mis en solution dans l'eau à des concentrations de 1 à 100 mM afin de réaliser une gamme d'étalonnage puis sont injectés sur colonne RP-C18 (Kinetex 5 mm C18 100A, 150 x 4,6 mm, Phenomenex). Ainsi, la gamme d'étalonnage permet de déterminer la quantité de produits (en mM) des bruts réactionnels en fonction de l'aire des pics (Figure 59).

Avant injection, les mélanges réactionnels bruts et les standards sont filtrés sur membrane de porosité de 0,45 μm . Les propargyl xylopyranosides sont élués par un mélange

MeOH : H₂O 3:97 à un débit de 0,8 mL/min à 40°C alors que les benzyl xylopyranosides sont élués par un gradient de 5 à 50% de MeOH : H₂O (t_0 = 5:95 et t_{10} = 50:50) à un débit de 0,8 mL/min à 40°C. La détection se fait grâce à un détecteur à diffusion de lumière (DEDL) à 50°C (ELSD-LTII, Shimadzu).

Les chromatogrammes sont analysés par le logiciel Lab Solutions de Shimadzu.

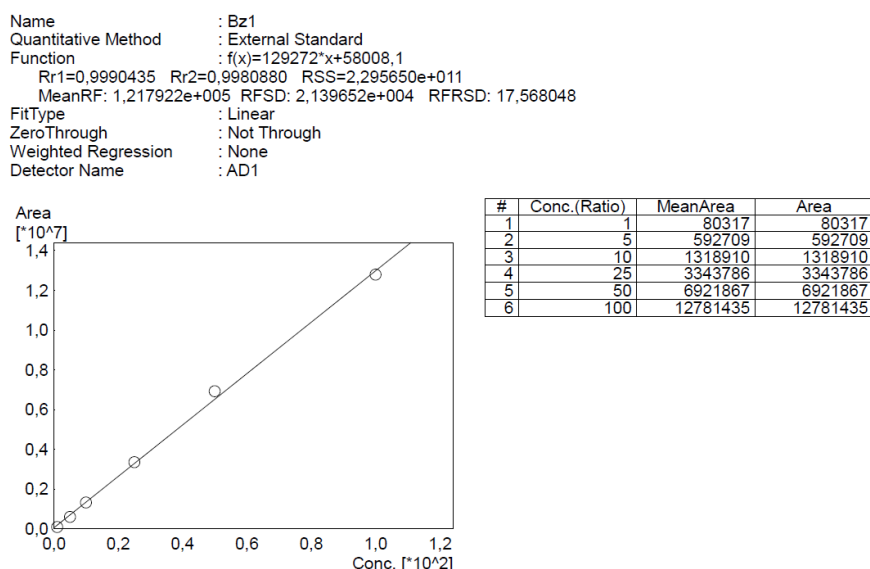


Figure 59. Gamme d'étalonnage du benzyl β -xylopyranoside de 1 à 100 mM par le logiciel Shimadzu.

VIII. Evaluation des propriétés biologiques

L'ensemble des tests d'évaluation biologique concernant l'activation de la biosynthèse des glycosaminoglycanes par les différents xylosides préparés a été effectué à la Faculté de Médecine de l'Université de Reims Champagne-Ardenne au sein de l'équipe de l'UMR URCA/CNRS 7369 MEDyC (équipe Dr. Y. Wegrowski, Dr. S. Brezillon) par Aurore Chatron-Colliet, Ingénieure de Recherche recrutée dans le cadre du projet XYLOCOS. La détermination des paramètres cinétiques de la β 4GalT7 a été effectuée à l'Université de Nancy au sein de l'équipe « MolCelTEG » UMR CNRS 7365.

VIII.1. Cellules et xylopyranosides

Les cellules CHO pgsA-745 sont obtenues par l'American Type Culture Collection (ATCC) (CRL-2242™). Ce sont des cellules ovariennes d'hamster déficientes en xylosyltransférase I qui ne permettent pas une production endogène de GAGs sulfatés.

Les xylopyranosides sont quasiment tous solubles dans l'eau et des concentrations mères ont été effectuées à 10 mM. Cependant, à cette concentration, certains xylopyranosides n'étaient pas solubles. Il a fallu donc préparer des solutions pour ces xylopyranosides (**4f**, **3g**, **HX**, **HX₂**, **CX**) à 100 mM dans du DMSO. En procédant ainsi, lorsqu'une concentration finale de

100 μM de xylopyranosides est introduite pour les différents tests, cela correspond à 0,1% de DMSO.

VIII.2. Viabilité cellulaire (tests MTT)

La viabilité cellulaire est déterminée à l'aide du test MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium, Sigma Aldrich) qui est un test colorimétrique qui permet de quantifier l'activité mitochondriale. Ce test est basé sur le clivage d'un sel de tétrazolium (MTT) par la succinate déshydrogénase mitochondriale en formazan qui forme un précipité violet dans la mitochondrie. La quantité de précipité formée est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes. Une dissolution du formazan par le DMSO est nécessaire avant une lecture de la DO à 560 nm qui permet de quantifier le formazan produit et permet de connaître la quantité relative de cellules vivantes et actives métaboliquement.

Les cellules sontensemencées à une densité de 1×10^4 cellules par puits (dans des plaques 96 puits) dans 100 μL de milieu DMEM + 10% SVF (Sérum de veau fœtal). Le lendemain, le milieu est remplacé par du milieu DMEM avec 2% de SVF et les xylopyranosides à 100 μM finale. Après 72h d'incubation, le MTT est ajouté à une concentration finale de 0,5 mg/mL, puis les cellules sont incubées pendant 3 h à 37°C. Le milieu de culture contenant le MTT est enlevé et 100 μL de DMSO sont ajoutés par puits afin de dissoudre les cristaux de formazan produits. Une lecture d'absorbance est faite à 560 nm à l'aide d'un spectrophotomètre de plaque.

VIII.3. Criblage des xylopyranosides pour leur capacité à amorcer la synthèse de GAGs sur les cellules CHO pgsA-745.

Les cellules CHO pgs-A745 sontensemencées pendant 24 h à 300 000 cellules/mL dans du milieu complet dans une plaque de 24 puits (NUNC) afin qu'elles adhèrent. Le milieu d'ensemencement DMEM, 2% SVF, $-\text{SO}_4$ est préparé comme suit : 150 μL cystéine 100X (Gibco), 150 μL méthionine 100X (Gibco), 150 μL HEPES 1M, 150 μL d'acide ascorbique à 1mg/mL, 300 μL de SVF dialysé et 14,1 mL de DMEM- SO_4 . Après 24 h, la couche cellulaire est rincée 2 fois avec 300 μL de PBS. Une solution de 300 μL contenant du milieu DMEM, 2% SVF, $-\text{SO}_4$ avec 10 $\mu\text{Ci/mL}$ de ^{35}S et une concentration finale en xylopyranosides de 100, 10 ou 1 μM est ajoutée dans les puits. Des témoins négatifs sont effectués avec l'ajout de 300 μL du milieu DMEM 2% SVF- SO_4 (témoin négatif sans radioactivité) et 300 μL de milieu DMEM 2% SVF $-\text{SO}_4$ + ^{35}S (témoin négatif de la synthèse de GAGs) dans les puits. Les cellules sont incubées pendant 24 h à 37°C.

50 μL de milieu de culture sont déposés sur papier Whatman® 3 MM et précipités par un sel d'ammonium quaternaire (CPC 1%, NaCl 1%, 0,5% (p/v) Na_2SO_4) comme décrit précédemment (Rapraeger and Bernfield 1985). Les échantillons sont ensuite introduits dans

des fioles à scintillation (Hidex 300SL) avec l'ajout de 2 mL de fluide à scintillation (Instagel®) puis la radioactivité est mesurée.

VIII.4. « Click-it inside »

Les cellules sontensemencées sur des lames (30 000 cellules/lames) pendant 24 h afin qu'elles adhèrent. Les cellules sont ensuite traitées avec 100 μ M de propargyl xylopyranoside (**1**) et xylobiopyranoside (**2**) pendant 1 h à 37°C. Puis, les cellules sont fixées avec 3,7% de formaldéhyde pendant 10 min, perméabilisées par 0,5% (v/v) de Triton X-100 dans du PBS pendant 20 min puis lavées 3 fois avec une solution de 3% de ABS (Albumine de Sérum bovin)/PBS. Le fluorophore Alexa488 (15 μ M), comportant une fonction azide, est ajouté aux cellules à température ambiante pendant 45 min en présence de 2 mM de Cu(I). La réaction de chimie « click » se produit entre la fonction alcyne des propargyl xylosides et l'azide « fluorescent », les xylosides sont marqués. Les lames sont rincées 3 fois avec 3% de ABS/PBS, les noyaux sont mis en évidence par un colorant : le DAPI qui est une sonde fluorescente qui se lie fortement à l'ADN. Des images des lames sont obtenues avec un microscope AxioImager Z1 (Zeiss) en utilisant un objectif $\times 20$.

VIII.5. Activité de la β -galactosyltransférase

Les paramètres cinétiques de Umb-Xyl et des xylosides (**3e** et **4e**) ont été déterminés comme précédemment décrits (Bui et al. 2010, Talhaoui et al. 2010, Saliba et al. 2015) avec les modifications suivantes. 400 ng de β -1,4-galactosyltransférase-7 produite et purifiée au sein de l'équipe « MolCelTEG » UMR 7365 de l'université de Nancy ont été incubés pendant 30 min à 37°C dans un tampon 50 mM de Bis-Tris, pH 7,2, MnCl_2 10 mM, 0,1% (p/v) de Triton X-100 à des concentrations de 0 à 5 mM de xylosides en présence d'une concentration fixe de 1 mM en UDP-Gal. La réaction d'incubation est arrêtée par addition de 5 μ L de HCl 6N dans la glace et a ensuite été centrifugée à 10 000 $\times$ g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant a été analysé par CLHP avec une colonne en phase inverse C18 (XBridge, 4,6 $\times$ 150 mm, 5 μ m, Waters) en utilisant un équipement Waters (Alliance Waters e2695) couplé à un détecteur UV (Shimadzu SPD-10A). La formation du produit de réaction est mesurée à une longueur d'onde de détection de 320 nm pour Umb-Xyl et 250 nm pour les composés **3e** et **4e**.

Chapitre III :

Etude *in silico* de la xylanase Tx-xyn11

I. Contexte

Certaines glycoside hydrolases sont capables de catalyser des réactions de transglycosylation en présence d'un sucre activé en position anomérique et d'un alcool (nucléophile) pour conduire à des glycosides comportant diverses parties aglycones selon la nature de l'alcool utilisé. Au sein du laboratoire, des travaux précédents ont été consacrés à la valorisation de pentoses issus de la biomasse lignocellulosique par le biais de réactions de transglycosylation. Une α -L-arabinofuranosidase (Remond et al. 2002, Remond et al. 2005), des xylosidases (Muzard et al. 2009, Ochs et al. 2013) et des xylanases (Ochs et al. 2011) ont été utilisées pour la production d'alkyl α -L-arabinofuranosides et alkyl β -D-xylopyranosides.

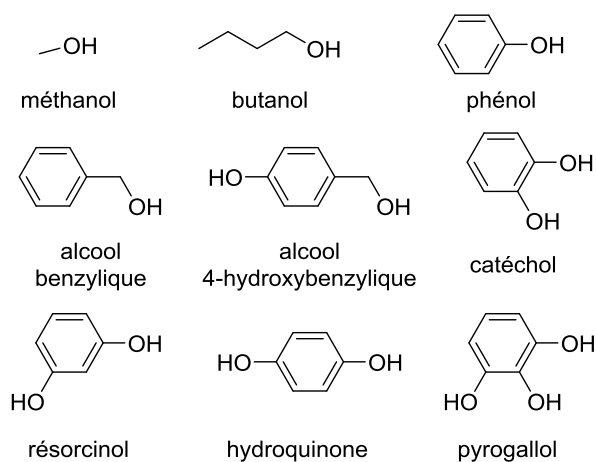
Mon travail de recherche s'inscrit dans la continuité de cette approche pour la synthèse de xylopyranosides. En vue d'obtenir des xylosides présentant un DP supérieur ou égal à 1, nous avons ciblé l'utilisation de xylanases qui catalysent des réactions de transglycosylation directement à partir de xylanes.

Le laboratoire de l'UMR FARE a pour objet d'étude une bactérie thermophile *Thermobacillus xylanilyticus* (*T. xylanilyticus*) qui décompose la biomasse lignocellulosique. Parmi les GH produites par *T. xylanilyticus*, deux xylanases des familles GH10 (Tx-xyn10) et GH11 (Tx-xyn11) ont été produites et purifiées (voir Matériels et Méthodes). Lors de la thèse de Marjorie Ochs (Ochs 2012), la synthèse de xylopyranosides et d'oligoxylopyranosides catalysée par la xylanase Tx-xyn10 a été étudiée. La xylanase Tx-xyn 11 n'a pas été testée durant cette étude. La plupart des études de la littérature concernant des réactions de transglycosylation catalysée par des xylanases concernent des xylanases de la famille GH10. Peu d'études ont été menées avec des xylanases GH11. Aucune étude ne porte sur la comparaison des xylanases de ces deux familles en tant que biocatalyseurs pour des réactions de transglycosylation.

Lors des réactions d'hydrolyse, Tx-xyn10 produit majoritairement du xylose et du xylobiose tandis que Tx-xyn11 conduit majoritairement à du xylobiose et xylotriose. Les structures tridimensionnelles de ces deux familles d'enzymes sont très différentes, les xylanases 10 font partie du clan GH-A de structure $(\beta/\alpha)_8$, alors que les xylanases 11 appartiennent au clan GH-C de structure β -jelly roll. Le site actif des GH10 forme un sillon large et peu profond, alors que celui des GH11 forme une crevasse profonde et structurée (présence de feuilletts) (Biely et al. 1997). Compte tenu des différences observées entre les xylanases des familles GH10 et GH11 (Chapitre 1, II.4. : (Beaugrand et al. 2004, Kolenova et al. 2006)), notre hypothèse est que ces deux familles peuvent catalyser la formation de différents produits de transglycosylation. Afin de tester notre hypothèse, nous avons comparé les capacités de transglycosylation des xylanases Tx-xyn10 et Tx-xyn11, avec des accepteurs alcools variés (aliphatiques, aromatiques, ...). Les réactions ont été réalisées en volume de 1 mL avec 10 UI/mL de xylanase, 10% (p/v) de xylanes et 0,5 M d'alcool pendant 24 h. Après arrêt des réactions, les bruts réactionnels sont déposés sur

CCM (Figure 60). Il faut noter que divers essais de concentrations en alcools et de doses d'enzymes ont été réalisés et donnent des résultats similaires.

a)



b)

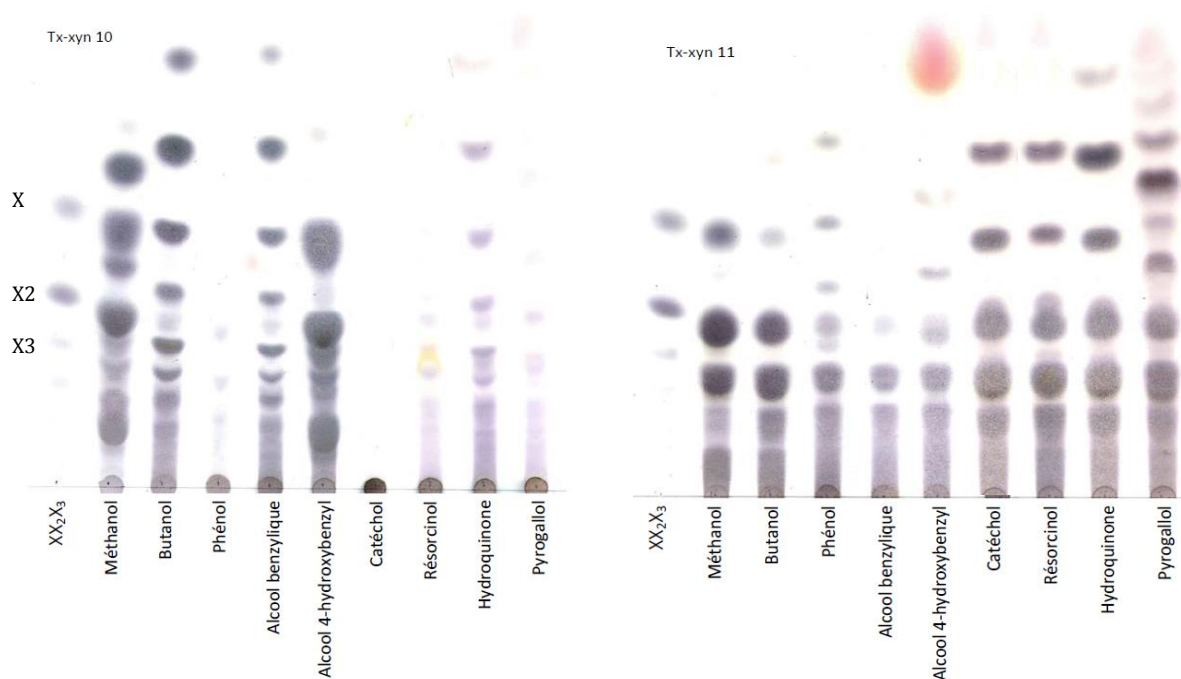


Figure 60. Evaluation de la capacité de transglycosylation des deux xylanases de *T. xylanilyticus*. a) Structures des accepteurs utilisés, b) CCM des réactions catalysées par Tx-xyn10 et Tx-xyn11 en présence de ces accepteurs (éluant BuOH : AcOH : H₂O 2:1:1).

L'analyse des résultats obtenus par CCM a permis de montrer des différences entre les réactions de transglycosylation selon la nature de l'accepteur alcool. Sur les CCM, XX2X3 correspond au témoin d'hydrolyse avec X correspondant au xylose, X2 au xylobiose et X3 au xylotriose. L'introduction d'une partie aglycone dans la structure des produits de transglycosylation diminue leur polarité et donc les xylosides synthétisés sont situés au-dessus du témoin xylose. La présence de « spots » au-dessus du xylose indique que la réaction de transglycosylation a bien eu lieu.

D'après la Figure 60, la xylanase Tx-xyn10 est capable d'utiliser comme accepteurs des alcools primaires tels que le méthanol, le butanol et l'alcool benzylique pour la synthèse de xylopyranosides mais pas ou peu de phénol ou polyphénols. La xylanase Tx-xyn11 catalyse des réactions de transglycosylation uniquement en présence d'accepteurs de type polyphénols, la synthèse avec le phénol étant faible. Cette particularité a déjà été rapportée par Chiku *et al.* dans les deux seules études de la littérature concernant une xylanase GH11 catalysant des réactions de transglycosylation, (Tableau 24) (Chiku et al. 2008, Chiku et al. 2009). Au vu de nos résultats, il semble que la xylanase Tx-xyn11 n'est pas capable d'utiliser des accepteurs simples tels que des alcools primaires aliphatiques ou l'alcool benzylique.

Tableau 24. Capacité de transglycosylation de la xylanase 11 *Bacillus sp.* KT12 (Chiku et al. 2008).

Acceptor	Transxylosylation	Acceptor	Transxylosylation
Phenolic hydroxyl groups		DOPA	+
Phenol	—	Trihydric phenols	
4-Methoxyphenol	+	Pyrogallol	++
Guaiacol	—	Hydroxy-hydroquinon	+
<i>o</i> -Nitrophenol	—	Phloroglucinol	+
Vanillin	—	Gallic acid	++
Dihydric phenols		Polyhydric phenols	
Catechol	++	Catechin	++
Hydroquinone	++	Alcoholic hydroxyl groups	
Resorcinol	+	Methanol	—
Caffeic acid	+	Ethanol	—
Ascorbic acid	+	Ethylene glycol	—
Dopamine	+	Glycerol	—

TLC detection of transxylosylation products was strong (++), weak (+), or not detected (—). Xylosylated products of the phenolic compounds were distinguished from the hydrolysis products by their larger R_f values and UV absorption at 254 nm.

Afin de mieux comprendre la forte spécificité de la xylanase Tx-xyn11 vis-à-vis d'accepteurs polyphénols et de lever les verrous qui empêchent la synthèse de xylosides avec des alcools aliphatiques et l'alcool benzylique, une approche par modélisation moléculaire a été entreprise avec la xylanase Tx-xyn11. Notre objectif était de mieux comprendre pour quelles raisons la xylanase Tx-xyn11 catalyse une réaction de transglycosylation uniquement en présence d'accepteurs polyphénoliques et comment se positionnent de tels accepteurs au sein du site actif de l'enzyme. De nombreuses études de modélisation moléculaire ont été réalisées sur les xylanases GH11 afin de comprendre leur mécanisme hydrolytique, mais à notre connaissance, aucune étude de modélisation moléculaire ne s'est intéressée à la transglycosylation par une xylanase GH11.

Dans un premier temps, nous avons construit l'intermédiaire glycosyl-enzyme généré lors du mécanisme catalytique de la xylanase Tx-xyn11. Ensuite, des études d'amarrage moléculaire avec cet intermédiaire et divers accepteurs ont été effectuées en vue de discriminer *in silico* les alcools susceptibles de donner lieu à une réaction de transglycosylation. Dans un deuxième temps, nous avons recherché la conformation optimale de la protéine compatible avec la catalyse des réactions de transglycosylation. Puis, nous avons réalisé des mutations *in silico* de

certaines acides aminés d'intérêt du site actif afin de modifier les interactions entre le glycosyl-enzyme et l'accepteur. Enfin, une approche par mutagenèse dirigée a ciblé un résidu du site actif de Tx-xyn11 identifié comme important par l'approche *in silico* pour la réaction de transglycosylation. Le mutant a été construit, exprimé, purifié et caractérisé. Des essais de transglycosylation ont finalement été réalisés avec le mutant produit afin de confirmer le rôle important du résidu ciblé par modélisation.

II. Résultats et discussion

Actuellement (juillet 2015), plus d'un millier de xylanases GH11 sont répertoriées dans la base CAZy (<http://www.cazy.org/>) et plus de 250 sont caractérisées. Paës *et al.* ont publié une revue sur les xylanases GH11 comportant une étude approfondie des relations entre leurs structures, leurs fonctions et leurs propriétés (Paës *et al.* 2012). D'après cette étude, les xylanases appartenant à la famille GH11 sont hautement conservées aussi bien par leurs séquences primaires que leurs structures tridimensionnelles.

II.1. Modélisation de la xylanase Tx-xyn11 de *T. xylanilyticus*

II.1.1. La xylanase Tx-xyn11 sous forme d'intermédiaire glycosyl-enzyme

Le mécanisme catalytique de la xylanase Tx-xyn11 est un mécanisme à rétention de configuration anomérique comportant un double déplacement et un passage par un intermédiaire glycosyl-enzyme (Figure 61). Cet intermédiaire est commun aux réactions d'hydrolyse et de transglycosylation. Lors de l'étape de déglycosylation, l'accepteur nucléophile (H_2O dans le cas d'une hydrolyse, alcool dans le cas d'une transglycosylation) activé par le résidu acide/base de la diade catalytique va attaquer cet intermédiaire (Ismail *et al.* 1999a).

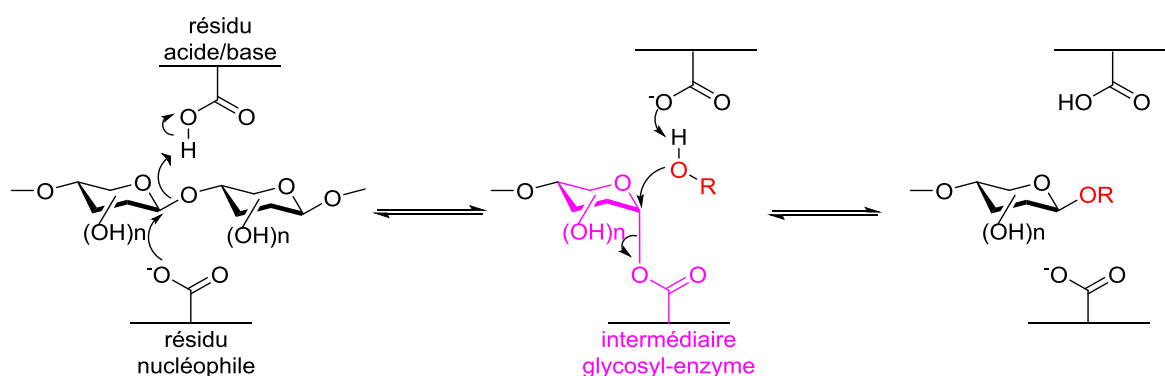


Figure 61. Mécanisme à rétention de configuration de Tx-xyn11.

La structure tridimensionnelle de la xylanase Tx-xyn11 a été résolue à 3,2 Å de résolution en 1997 par Harris *et al.* (Harris *et al.* 1997). Toutefois, la structure de l'intermédiaire glycosyl-enzyme de la xylanase Tx-xyn11 de *T. xylanilyticus* n'est pas connue. La liaison de la partie « glycosyl » à l'enzyme peut induire des changements conformationnels d'importance notamment au niveau des résidus bordant la poche catalytique. Ainsi, la première étape de notre étude a consisté à construire l'intermédiaire glycosyl-enzyme de la xylanase Tx-xyn11 *in silico*

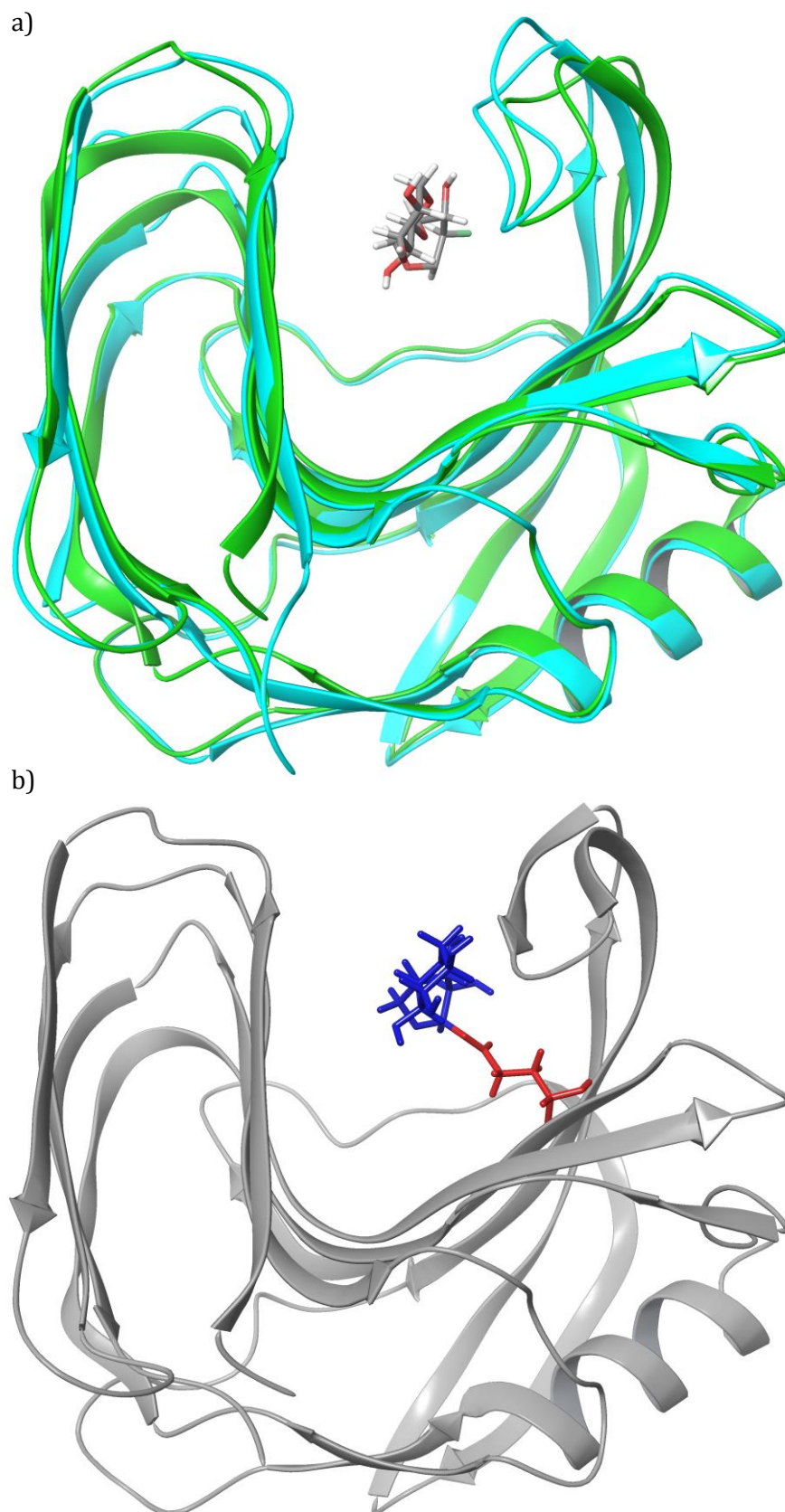


Figure 63. a) Superpositions des structures tridimensionnelles des xylanases GH11 de *T. xylanilyticus* (en vert) et de *B. circulans* (en bleu, PDB : 3VZM) avec le 2F-xylobiosyl représenté ; l'atome en vert correspond au fluor ; b) Représentation de Tx-xyn11 sous la forme glycosyl-enzyme ; le résidu glutamate 76 (E76) est représenté en rouge et est lié à un xylobiose en bleu.

II.1.2. Amarrage moléculaire de l'intermédiaire Tx-Xyn11 glycosyl-enzyme avec divers accepteurs

Lors de la réaction de transglycosylation, l'accepteur alcool entre dans le site actif de la xylanase et se positionne au sein des sous-sites accepteurs. Afin de modéliser les différentes positions possibles des accepteurs dans le site actif, la fonction d'amarrage moléculaire du logiciel Glide de la suite Schrödinger a été utilisée.

Cet outil repose sur le couplage d'un échantillonnage conformationnel et de la prédiction du placement optimal d'un ligand dans un espace de recherche centré sur la structure tridimensionnelle du site catalytique de l'enzyme. Chaque solution proposée par l'algorithme est évaluée selon une grille définie et génère un score qui permet de classer l'ensemble des solutions générées. Nous avons utilisé cette fonction de score en mode « extra-précision » qui, de façon empirique, estime l'affinité du ligand pour une cible donnée en sommant un ensemble de termes énergétiques : Van der Waals, électrostatique, désolvatation, entropie... De plus, un ensemble de critères permettant de valider/rejeter manuellement les solutions proposées a été défini. En effet, d'après le mécanisme catalytique, l'oxygène du groupement hydroxyle de l'accepteur attaque le carbone anomérique de l'intermédiaire glycosyl-enzyme alors que l'oxygène du résidu acide/base agit sur l'hydrogène du groupement hydroxyle de l'accepteur. Ce mécanisme implique que les atomes soient distants de 2 à 3 Å. Cependant, la mesure de la distance n'a pas été effectuée entre l'hydrogène de l'accepteur et l'oxygène du résidu acide/base mais entre les deux oxygènes (Figure 64). Cette distance maximale d'environ 3 Å correspond au critère qui fait consensus dans la détection des liaisons hydrogènes : 3 Å de distance et 20° entre un atome porteur de l'hydrogène et un accepteur. Si ce critère de distance maximale est respecté alors l'hydrogène porté pourra participer au mécanisme catalytique.

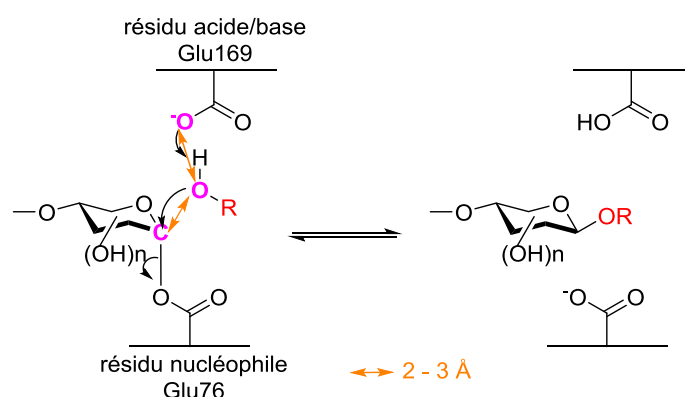


Figure 64. Réaction entre l'intermédiaire glycosyl-enzyme et un accepteur. Les flèches orange représentent les liaisons impliquées lors du mécanisme et la distance entre les atomes impliqués dans ces interactions est utilisée comme critère pour discriminer par modélisation les accepteurs permettant ou non une réaction de transglycosylation.

Si cette distance est supérieure à 3 Å, les interactions ne peuvent pas se faire et l'étape de déglycosylation lors de la transglycosylation n'a pas lieu. Ainsi, ce critère de distance a été pris en compte lors des essais d'amarrage moléculaire, et seuls les accepteurs permettant l'obtention d'une telle distance sont susceptibles de donner lieu à une réaction de transglycosylation. Le choix des accepteurs testés en amarrage moléculaire était basé sur nos résultats expérimentaux obtenus avec Tx-xyn11 lors de réactions de transglycosylation.

Nous avons testé le méthanol, le butanol, le pentanol et l'alcool benzylique comme accepteurs ne donnant pas lieu expérimentalement à une réaction de transglycosylation ainsi que les polyphénols qui conduisent à la synthèse de xylosides à aglycone polyphénolique. Tous les résultats *in silico* n'ont toutefois pas permis d'être concordants avec les résultats expérimentaux. En effet, à titre d'exemple, expérimentalement, des produits de transglycosylation sont obtenus avec l'hydroquinone en présence de Tx-xyn11. Or l'amarrage moléculaire a montré que l'hydroquinone se place effectivement dans le site actif de Tx-xyn11 mais selon nos critères (distances 3 Å), son positionnement ne permet pas une réaction de transglycosylation.

Nous avons donc opté pour une autre stratégie afin de poursuivre notre étude *in silico*. La structure tridimensionnelle d'une protéine n'est pas « figée », c'est une structure dynamique (Zhao 2009) et la 1^{ère} approche montre que le travail sur des structures figées a ses limites et que la prise en compte des relations structure-fonction(s)-dynamique est primordiale. En nous basant sur la conformation de la xylanase 11 de *Bacillus circulans* obtenue par cristallisation (PDB : 3VZM), nous ne pouvons pas être certains que cette conformation soit celle de la protéine lorsque cette dernière catalyse une réaction de transglycosylation. Afin de déterminer la conformation optimale de Tx-xyn11 lors de l'acte catalytique, des rotamères de certains résidus aminoacides ont été testés afin de trouver une conformation de l'intermédiaire glycosyl-enzyme de Tx-xyn11 susceptible d'effectuer la transglycosylation avec les polyphénols, accepteurs qui expérimentalement aboutissent à des produits de synthèse. Des rotamères correspondent aux différentes positions possibles de la chaîne latérale des acides aminés par rotation autour d'une simple liaison.

Les résidus des sous-sites de l'enzyme interagissent par des interactions faibles (stacking, liaisons hydrogènes, forces de van der Waals) avec le substrat et les accepteurs. Dans sa thèse, Gabriel Paës a modélisé un xylohexaose dans le site actif de Tx-xyn11 et a ainsi déterminé quels étaient les résidus des différents sous-sites impliqués dans les interactions avec ce substrat (Tableau 25) (Paës 2005).

Tableau 25. Bilan des interactions entre le substrat xylohexaose modélisé au sein des divers sous-sites de la xylanase Tx-xyn11 (Paës 2005)

Sous-sites	Modes d'arrimage		
	Stacking	Liaisons hydrogènes	Interactions de van der Waals
(-3)		O2---NE1 W7	S115
(-2)	W7	O3---OH Y163	Q5, S115, I116
		O2---OH Y67	
(-1)		O2---NH1 R110	W7, N33, V35, Y67, E76, Y78, P114, S115
(+1)		O---OE2 E169	N33, Y78, R110, Q124, W126, Y171
(+2)		O2---N T89	Y63, P88, T89, W126, Y171
(+3)	Y86	O2---ND2 N61	Y63, Y86, Y171

Lors de la transglycosylation, les accepteurs arrivent par l'extrémité réductrice et vont interagir avec les résidus des sous-sites +1 et +2, majoritairement. D'après les résultats de Paës 2005, et également par visualisation dans le logiciel Maestro, le positionnement des différents résidus du site actif, les résidus Y78, Q124, E169, W126 et Y63 ont été sélectionnés. Ces derniers sont situés dans les sous-sites +1 et +2 et peuvent potentiellement gêner l'arrivée des accepteurs et/ou empêcher les interactions impliquées dans le mécanisme lors de l'étape de déglycosylation (Figure 65). Nous avons ainsi généré différentes conformations correspondant aux rotamères des acides aminés identifiés en nous appuyant sur la librairie statistique de Dunbrack et *al.* implémentée dans PyMOL. Ensuite, nous avons effectué un cycle de minimisation-relaxation de la structure nouvellement modélisée. Puis, les amarrages moléculaires ont été effectués avec les différents accepteurs.

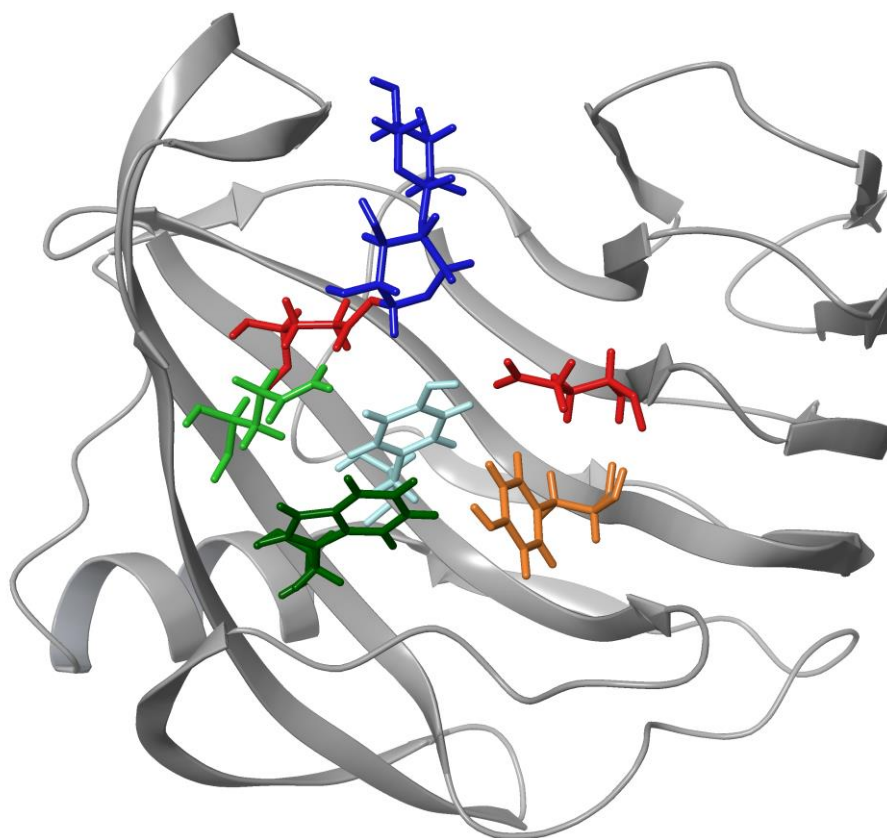


Figure 65. Représentation de l'intermédiaire glycosyl-enzyme de Tx-xyn11 vu de dessus. Les résidus ciblés sont représentés dans différentes couleurs ; vert clair = Q124, vert foncé = W126, turquoise = Y78, orange = Y63 et rouge = E169 ; le xylobiose est en bleu lié à E76.

Parmi les différents rotamères testés, un rotamère de la tyrosine 78 (Y78) positionné au sein du sous-site (+1) a permis de discriminer les accepteurs conduisant ou non à une réaction de transglycosylation. D'après la Figure 66, le rotamère Y78 a permis de libérer un certain espace dans le site actif permettant aux accepteurs de se rapprocher de l'intermédiaire glycosyl-enzyme et de permettre l'établissement des différentes liaisons impliquées dans le mécanisme. La Figure 67 représente l'une des positions de l'amarrage moléculaire en présence de l'hydroquinone, un accepteur qui expérimentalement donne lieu à une transglycosylation, avec des distances inférieures à 3 Å, répondant au critère imposé lors de la modélisation.

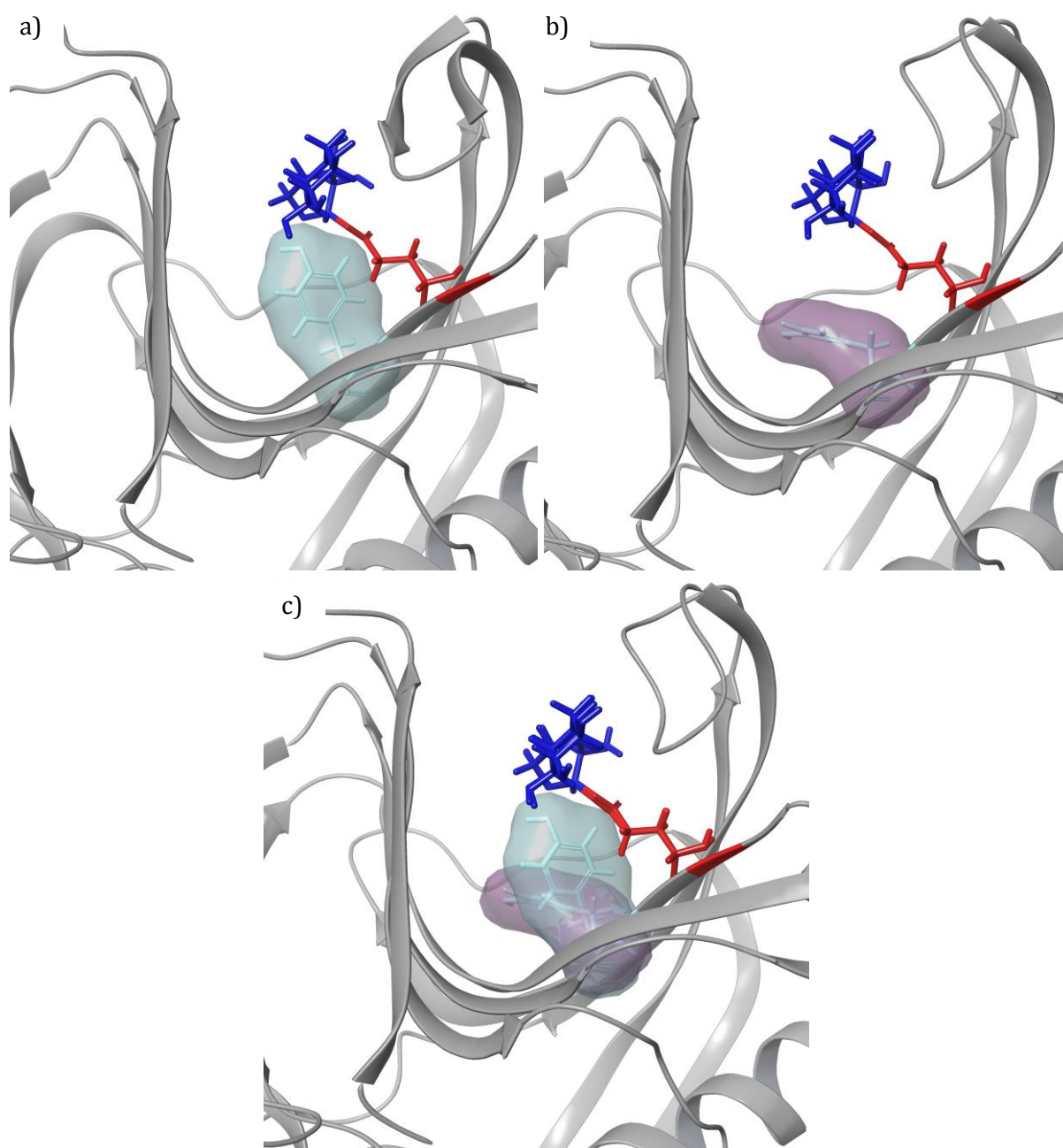


Figure 66. Structures tridimensionnelles de Tx-xyn11 avec la représentation en surface du résidu Y78 a) sur la configuration initiale, b) un rotamère de Y78, c) superposition des 2 rotamères de Y78. E76 est représenté en rouge et est lié à un xylobiose en bleu.

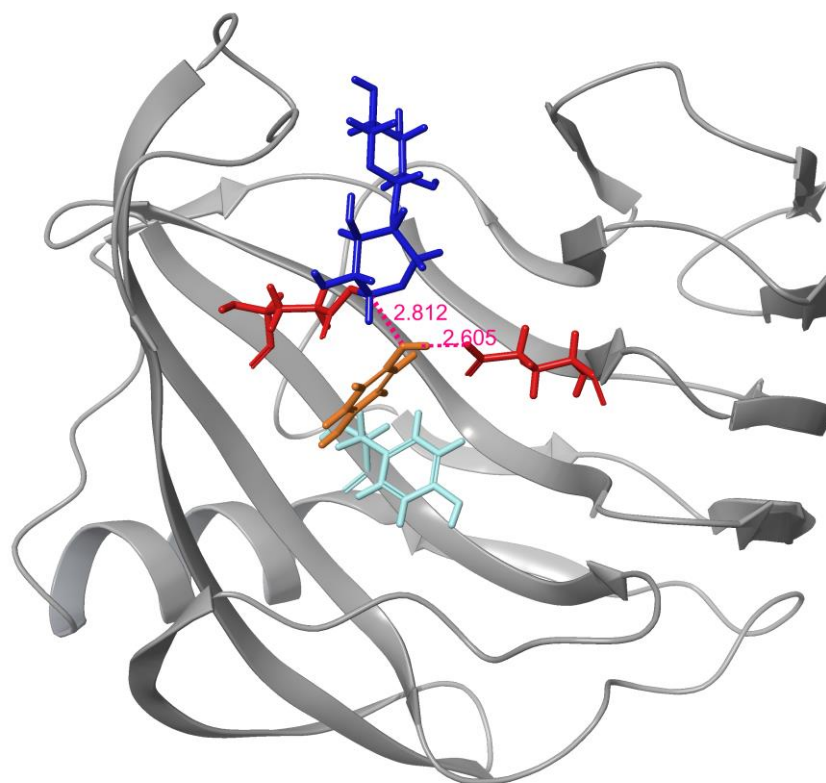


Figure 67. Amarrage moléculaire de l'hydroquinone avec les distances impliquées dans le mécanisme. L'hydroquinone est représentée en orange, le résidu Y78 en turquoise, la diade catalytique en rouge, le xylobiose en bleu et les distances sont indiquées en rose.

II.1.3. Interactions des résidus des sous-sites aglycones de Tx-xyn11 avec divers accepteurs

La démarche de modélisation moléculaire réalisée avec le rotamère du résidu Y78 a permis d'obtenir des résultats concordant par rapport aux résultats expérimentaux de transglycosylation. Cependant, la capacité de transglycosylation de Tx-xyn11 est sélective car elle ne fonctionne qu'avec les polyphénols, contrairement à la Tx-xyn10 qui permet des réactions de transglycosylation avec des accepteurs de type alcool primaire aliphatique mais également l'alcool benzylique. Dans cette partie de notre étude, nous avons étudié les interactions des résidus des sous-sites aglycones avec divers accepteurs en nous basant sur le rotamère Y78 de Tx-xyn11.

L'hypothèse de Chiku *et al.* pour expliquer la sélectivité des xylanases GH11 envers les accepteurs polyphénoliques serait que deux groupements hydroxyles sont nécessaires pour la catalyse : un des groupements hydroxyle permettrait de positionner correctement l'accepteur avec une liaison avec l'enzyme alors que l'autre interviendrait dans le mécanisme de transglycosylation (Chiku et al. 2008). Les interactions des résidus des sous-sites aglycones avec l'accepteur sont fondamentales pour expliquer la sélectivité de l'enzyme vis-à-vis des accepteurs. Nous avons étudié les interactions entre les résidus des sous-sites aglycones de Tx-

xyn11 avec divers accepteurs alcools testés en synthèse par le biais de diagrammes d'interactions avec le logiciel Maestro (Figure 68). D'après les diagrammes obtenus, différents acides aminés d'intérêt ont été sélectionnés lors de la modélisation car ils intervenaient de façon récurrente avec les accepteurs testés. Les résidus sélectionnés sont N33, Q124, W126, Y78 et Y63. Ces aminoacides ont fait l'objet d'une mutation *in silico* en alanine afin d'évaluer l'impact de cette mutation sur les interactions avec les accepteurs testés précédemment.

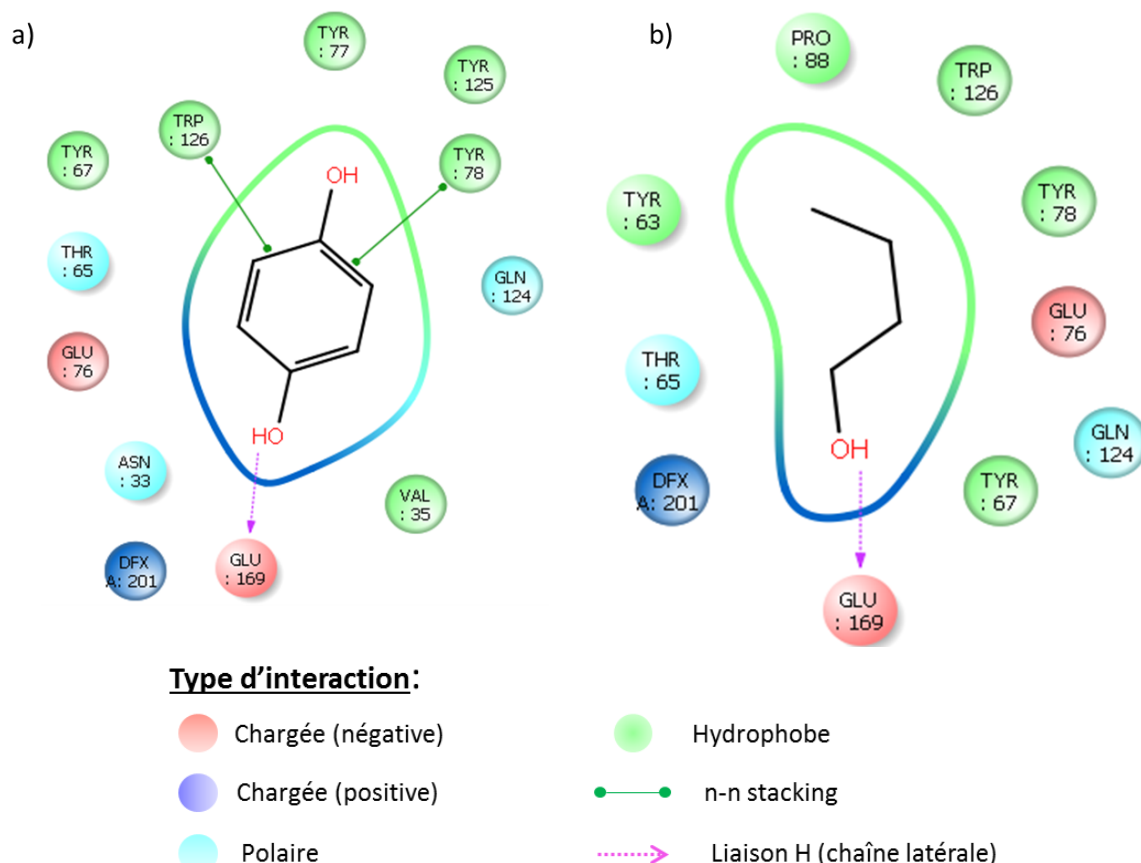


Figure 68. Diagramme d'interactions avec a) l'hydroquinone et b) le butanol.

Les résultats obtenus *in silico* ont montré que seul le mutant avec un tryptophane muté en alanine en position 126 (W126A) avait un impact important sur les amarrages moléculaires. En effet, les autres mutations ne permettaient pas que les accepteurs à alcools aliphatiques, ainsi que l'alcool benzylique puissent donner lieu à une réaction de transglycosylation selon les critères fixés. Les différents résultats obtenus au cours de cette étude sont présentés dans le Tableau 26. Le méthanol est la seule molécule qui ne permet pas de concilier les résultats *in silico* et expérimentaux. Il est sans doute difficile de trouver une explication mais la petite taille du méthanol est peut être un facteur qui ne permet pas de le discriminer. Nous observons que la mutation du résidu W126 en alanine permet de modifier les résultats obtenus en amarrage moléculaire avec les différents accepteurs. La mutation permettrait la transglycosylation des alcools aliphatiques (chaînes linéaires et alcool benzylique), mais limiterait la réaction de transglycosylation avec les polyphénols. La Figure 69 représente la structure tridimensionnelle

de la xylanase et son mutant W126A. La mutation permet vraisemblablement de diminuer l'encombrement stérique à l'intérieur du site actif et peut-être d'expliquer pourquoi les amarrages moléculaires fonctionnent avec les alcools aliphatiques et l'alcool benzylique.

Tableau 26. Résultats de transglycosylation ainsi que l'étude *in silico* des différents accepteurs.

Accepteurs	Transglycosylation (CCM)	Etude <i>in silico</i>	
	Tx-xyn11	Tx-xyn 11	Tx-xyn11 W126A
méthanol	-	++	-
butanol	-	-	++
pentanol	-	-	++
alcool benzylique	-	-	++
catéchol	++	++	+
résorcinol	++	+	++
hydroquinone	++	++	-

CCM : - : non détecté ou très faible ; + : faible ; ++ : intense

In silico : - : distances largement supérieures à 3 Å ; + : distances légèrement supérieures à 3 Å ; ++ : distances <3 Å

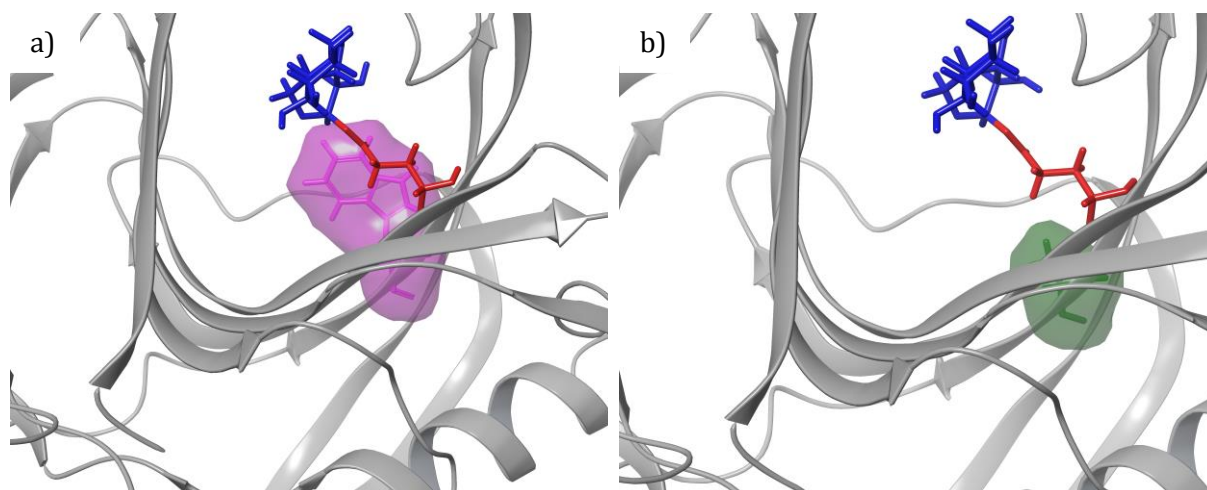


Figure 69. Site actif de Tx-xyn11 a) et de Tx-xyn11 W126A b).

W126 est représenté en violet, A126 en vert, E76 en rouge lié au xylobiose en bleu.

L'ensemble des résultats de modélisation moléculaire a permis de cibler l'acide aminé W126 en tant que résidu jouant un rôle important lors de l'étape de déglycosylation intervenant lors du mécanisme de transglycosylation. Nous avons donc ciblé ce résidu pour réaliser une mutagenèse (W126A) de la xylanase Tx-xyn11 et ainsi vérifier si son rôle est confirmé expérimentalement.

II.2. Mutagénèse, production et caractérisation du mutant Tx-xyn11 W126A

II.2.1. Choix de la construction

Lors de travaux précédemment réalisés au laboratoire, la xylanase Tx-xyn11 a été clonée dans une souche d'*Escherichia coli* entre les sites de restriction *EcoRI* et *NdeI* dans le plasmide pRSETA. Cependant, la xylanase recombinante exprimée chez *E. coli* aboutissait à une enzyme qui était moins thermostable que l'enzyme sauvage. La mutation d'une asparagine en position 1 en alanine (N1A) a permis de résoudre ce problème. Nous avons donc utilisé cette construction (pECXyl5) pour la réalisation de la mutagénèse dirigée du résidu W126.

II.2.2. Mutagénèse, transformation et expression

L'ADN plasmidique de pECXyl5 a été extrait puis grâce à un kit de mutagénèse, la mutation W126A a été effectuée (voir Matériels et Méthodes). Ensuite, le plasmide a été introduit dans la souche de propagation XL1-Blue puis dans les souches d'expression BL21star(DE3) et BL21tuner(DE3). Le plasmide pRSETA contenant un gène de résistance à l'ampicilline, 100 µg/mL d'ampicilline sont ajoutés lors des cultures liquides et solides afin de sélectionner les colonies. Cependant, lors de la transformation avec les souches BL21(DE3), la dose d'ampicilline a dû être diminuée à 50 µg/mL lors de l'étalement sur boîte de Pétri car une dose plus importante empêchait les colonies de se développer. Une fois, les colonies obtenues, elles ont été remises en culture liquide avec 100 µg/mL d'ampicilline. Cette culture a été utilisée afin de réaliser un stock glycérol et utilisée lors des essais d'expression.

Une mise au point des conditions a été nécessaire afin de trouver les meilleures conditions d'expression en vue de la production du mutant en quantité suffisante. Les transformations dans les souches d'expression BL21star(DE3) et BL21tuner(DE3) ont été effectuées à différentes conditions. Après une mise en culture à 37°C et une DO à 600 nm atteignant 0,5, une induction a été effectuée à différentes concentrations en IPTG (0 ; 0,1 ; 0,4 ; 1 mM) puis les cultures ont été poursuivies à 37°C pendant 24 h. D'autre part, des essais d'induction avec de l'IPTG à 0,4 mM ont été menés avec une culture à température ambiante (≈ 25°C).

Après une croissance de 24 h, les cellules ont été éclatées par sonication puis les surnageants sont déposés sur un gel d'électrophorèse SDS-page (Figure 70). On remarque que l'enzyme est mieux exprimée dans la souche d'expression BL21star(DE3). La meilleure condition est obtenue après une induction à 0,4 mM d'IPTG et une mise en culture à température ambiante. Il est connu que réduire la température de croissance peut diminuer la formation de corps d'inclusion et ainsi augmenter la solubilité de la protéine d'intérêt (Murby et al. 1996).

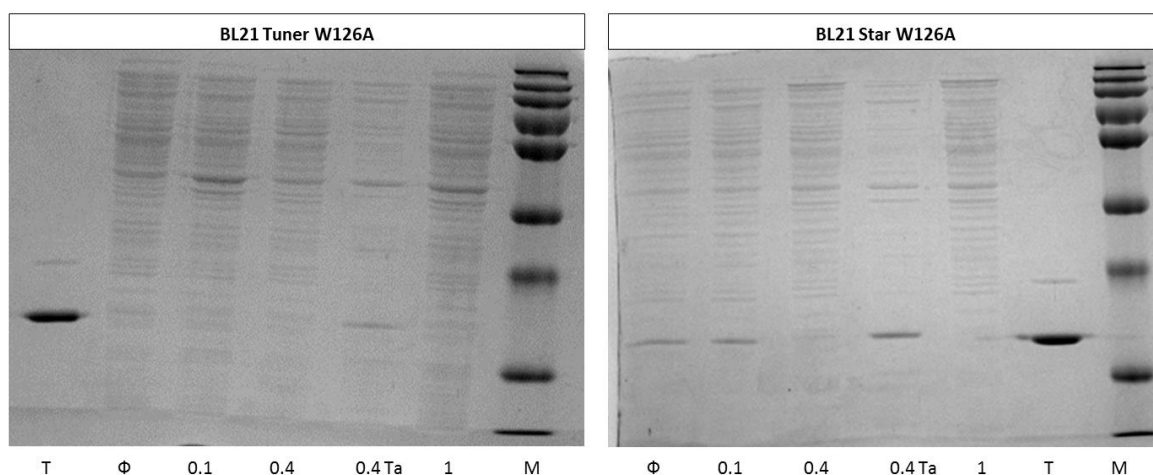


Figure 70. Electrophorèse SDS-page du surnageant des tests d'expression du mutant Tx-xyn11 W126A après sonication des cellules d'*E. coli*. T = témoin Tx-xyn11, Φ = sans induction, 0,1 ; 0,4 ; 1 = concentration en mM d'IPTG avec croissance à 37°C, 0,4 Ta = induction à 0,4 mM d'IPTG puis croissance à température ambiante, M = marqueur de taille.

II.2.3. Purification et caractérisation du mutant

En vue d'une production suffisante du mutant Tx-xyn11 W126A pour sa purification, une culture de 2 x 1L a été réalisée avec les cellules BL21star(DE3) (induction par IPTG 0,4 mM incubation à température ambiante pendant 24 h).

La purification a été réalisée en deux étapes. Ce protocole a été mis au point lors de la purification de la xylanase Tx-xyn11 sauvage (Debeire-Gosselin et al. 1992). Le surnageant de culture subit un passage successif sur deux résines : une résine Q sépharose (échangeuse d'ions) qui permet de retenir la plupart de protéines présentes dans le jus de culture à l'exception de la xylanase Tx-xyn11 puis l'éluat obtenu est ensuite passé sur une résine phényl sépharose CL4B (résine d'interactions hydrophobes) qui retient la xylanase Tx-xyn11 qui est ensuite éluée par de l'éthylène glycol. La pureté de la protéine est vérifiée par gel SDS-page (Figure 71).

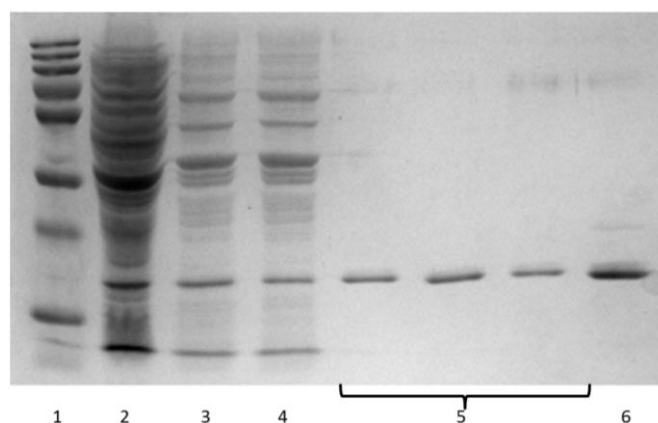


Figure 71. Electrophorèse SDS-page de la purification de Tx-xyn11 W126A. 1 = marqueur de taille, 2 = surnageant avant purification, 3 = éluat résine Q sépharose 4 = fraction non retenue par la résine phényl sépharose, 5 = fraction éluée par l'éthylène glycol, 6 = Tx-xyn11.

L'activité spécifique ainsi que les paramètres cinétiques de la Tx-xyn11 et de son mutant purifié sont déterminés sur l'hydrolyse de xylanes de hêtre à 60°C à pH 5,8. La gamme de concentration en xylanes utilisée pour les paramètres cinétiques est de 0,5 à 10 mg/mL. Au-delà de cette concentration, la solubilité des xylanes décroît et la solution devient hétérogène. Les résultats sont présentés dans le Tableau 27. Les coefficients d'extinction molaire ainsi que les poids moléculaires des enzymes sont les valeurs théoriques obtenues d'après les séquences en acides aminés (ExPASy ProtParam).

L'activité spécifique (AS) est la quantité d'enzyme transformant une μ mole de substrat par minute par mg de protéines. La mutation entraîne une diminution de l'AS qui est de 1064 UI/mg pour l'enzyme non mutée et de 503 UI/mg pour l'enzyme mutée, ce qui équivaut à une baisse de 47% de son activité spécifique.

Tableau 27. Paramètres cinétiques de la Tx-xyn11 et son mutant sur des xylanes de hêtre.

Xylanase	Activité spécifique (UI/mg)	K_M (mg/mL)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_M (mL s ⁻¹ mg ⁻¹)
Tx-xyn11	1064	1,39 ± 0,12	4617 ± 381	3311
W126A	503	3,71 ± 0,42	2837 ± 136	764

Concernant les paramètres cinétiques, la mutation a un impact important avec l'augmentation de la constante de Michaelis-Menten (K_M) d'un facteur 1,6, la diminution de la constante catalytique (k_{cat}) (turnover) d'un facteur 2,5 et la diminution de l'efficacité catalytique (k_{cat}/K_M) sur les xylanes de hêtre d'un facteur 4.

Une étude a été réalisée avec une xylanase 11 de *Bacillus subtilis* (BsXynA) sur l'hydrolyse de xylanes d'avoine (A/X : 0,15) avec des enzymes mutées (Pollet et al. 2010b). Lors de cette étude, un résidu tryptophane (W129) équivalent au résidu W126 de notre xylanase a été muté en alanine. Les résultats que nous avons obtenus sont concordants avec ceux décrits avec le mutant BsXynA W129A. En effet, dans le cas de ce mutant, la mutation du résidu W129 en alanine diminue de 51% l'AS, et entraîne une augmentation du K_M (d'un facteur 1,5), une diminution de la constante catalytique (d'un facteur 3) et une diminution de l'efficacité catalytique (d'un facteur 6). Les auteurs ont également étudié l'impact de la mutation en présence de xylanes hautement substitués (A/X : 0,33). Dans ce cas, la mutation a un effet négatif encore plus important. Selon Pollet *et al.*, le résidu W129 interagirait avec les substituants arabinose des chaînes de xylanes.

Les xylanes de hêtre utilisés dans notre étude sont peu substitués (A/X : 0,015). Malgré le faible taux de substitution des xylanes de hêtre, la mutation du résidu W126 impacte les paramètres cinétiques de la xylanase sur ces xylanes avec des facteurs équivalents à ceux obtenus par Pollet *et al.* avec le mutant W129A sur xylanes d'avoine.

II.3. Transglycosylation par Tx-xyn 11 et Tx-xyn11 W126A

II.3.1. Comparaison par CCM

Les réactions de transglycosylation sont réalisées avec Tx-xyn11 et Tx-xyn11 W126A dans les mêmes conditions réactionnelles (10% (p/v) xylanes, 0,5 M d'alcool et 10 UI/mL d'enzymes, 24 h à 60°C).

D'après la Figure 72, le mutant Tx-xyn11 W126A catalyse une réaction de transglycosylation en présence de butanol et de pentanol ce qui n'est pas le cas de la xylanase Tx-xyn11 non mutée. Toutefois, l'intensité des spots correspondants est faible indiquant un rendement de synthèse relativement faible. Tout comme la xylanase non mutée, le mutant ne catalyse pas de réaction de transglycosylation en présence de méthanol. Dans le cas de l'alcool benzylique, la réaction de transglycosylation semble plus efficace avec le mutant comparativement à la xylanase non mutée. Lorsque l'accepteur est un polyphénol, la mutation semble avoir diminuée l'efficacité de la transglycosylation par rapport à Tx-xyn11 non mutée pour laquelle les spots sont plus intenses.

Ces résultats indiquent que la mutation du résidu W126 a une influence sur la réaction de transglycosylation et notamment sur la sélectivité de la xylanase vis-à-vis des accepteurs. Le mutant W126A améliore la réaction de synthèse en présence de certains alcools aliphatiques tels que le butanol et le pentanol et surtout avec l'alcool benzylique.

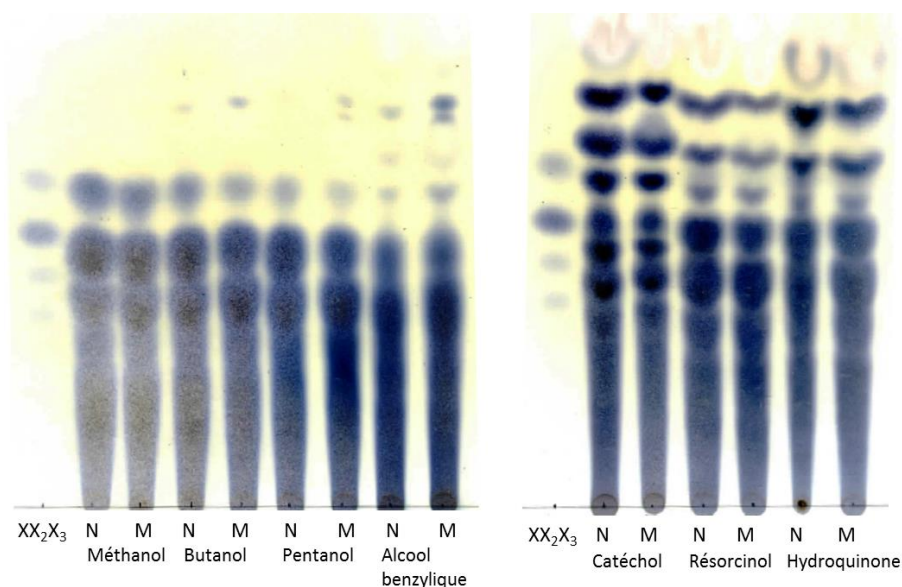


Figure 72. Réactions de transglycosylation avec Tx-xyn11 et Tx-xyn11 W126A et différents accepteurs. N = Tx-xyn11 et M = Tx-xyn11 W126A (éluant BuOH : AcOH : H₂O 2:1:1).

II.3.2. Résultats par CLHP

Ces résultats étant qualitatifs, nous avons poursuivi notre étude avec une quantification des produits de transglycosylation par CLHP. Les réactions de transglycosylation avec le pentanol ainsi que l'alcool benzylique ont été analysées par CLHP.

Lors de l'analyse CLHP, la quantification des pentyl xylopyranosides obtenus n'a pas été possible compte-tenu du faible rendement de synthèse comme observé par CCM.

Dans le cas des réactions réalisées en présence d'alcool benzylique et de la xylanase Tx-xyn11 ou de son mutant W126A, une quantification a été réalisée. Les résultats sont présentés dans le Tableau 28.

Tableau 28. Quantification des produits obtenus lors de la réaction de transglycosylation par Tx-xyn11 et Tx-xyn11 W126A en présence d'alcool benzylique

	Concentration en benzyl xylopyranoside (mM)	Concentration en benzyl xylobiopyranoside (mM)
Tx-xyn11	—	0,75
Tx-xyn11 W126A	—	1,57

Les conditions réactionnelles sont 10% (p/v) de xylanes, 0,5 M d'alcool benzylique et 10 UI/mL d'enzymes pendant 24 h à 60°C sous agitation.

La quantification du benzyl xylopyranoside n'a pas pu être déterminée car la synthèse de ce composé est très faible en lien avec le mécanisme catalytique de la xylanase Tx-xyn11 (produits majoritaires d'hydrolyse : X2 et X3). La quantification du benzyl xylobiopyranoside indique un rendement deux fois plus important pour le mutant W126A (1,57 mM) comparativement à Tx-xyn11 non mutée (0,75 mM).

La superposition des chromatogrammes obtenus avec Tx-xyn11 non mutée et le mutant W126A (Figure 73) permet de voir que l'aire du benzyl xylopyranoside est plus importante avec le mutant W126A. Les aires des produits que nous identifions de degré de polymérisation 3 et 4 compte-tenu de leur temps de rétention sont également plus importantes avec l'enzyme mutée.

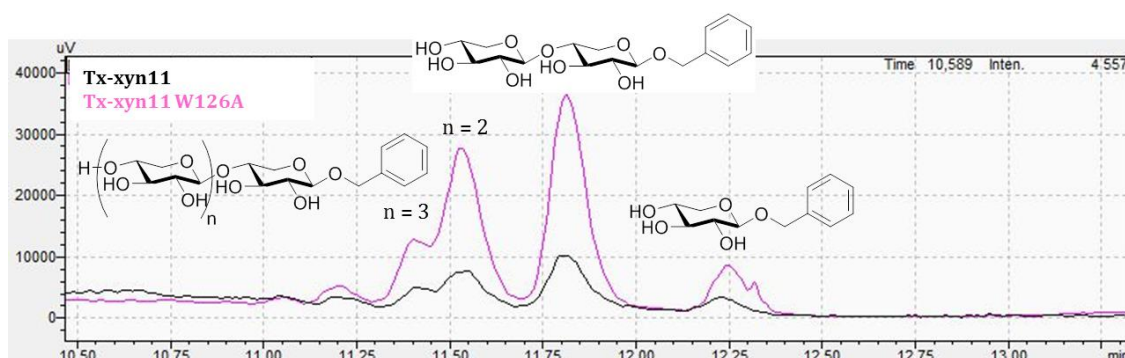


Figure 73. Chromatogrammes des mélanges bruts des réactions de transglycosylation avec Tx-xyn11 et Tx-xyn11 W126A et l'alcool benzylique.

Les conditions réactionnelles sont 10% (p/v) de xylanes, 0,5 M d'alcool benzylique et 10 UI/mL d'enzymes pendant 24 h à 60°C sous agitation.

Le Tableau 29 résume les données de transglycosylation de la xylanase Tx-xyn11 non mutée et du mutant W126A en présence de divers accepteurs, données obtenues par les approches expérimentales et des études *in silico*. Le mutant Tx-xyn11 W126A a permis d'améliorer la synthèse avec les alcools primaires aliphatiques comme le butanol et le pentanol (résultat CCM) mais également avec l'alcool benzylique avec un rendement deux fois plus important de benzyl xylobioside.

Toutefois, en présence de ces accepteurs, les synthèses ne semblent pas aussi importantes qu'en présence de polyphénols (au vu des CCM) malgré le fait que l'amarrage moléculaire avec le butanol, le pentanol et l'alcool benzylique lors de l'étude *in silico* respectait les critères fixés. La mutation *in silico* de Tx-xyn11 indiquait que la réaction de transglycosylation devait être peu ou pas efficace en présence de certains accepteurs de type polyphénols (catéchol, hydroquinone), or du point de vue expérimental, les réactions de transglycosylation sont effectivement moins importantes avec le mutant W126A (spots moins intenses en CCM que ceux obtenus avec Tx-xyn11 dans les mêmes conditions réactionnelles) mais demeurent malgré tout plus importantes qu'en présence du butanol, du pentanol et de l'alcool benzylique.

Tableau 29. Résultats de transglycosylation et de l'étude *in silico*.

Accepteurs	Transglycosylation (CCM)	Etude <i>in silico</i>		Transglycosylation (CCM)
	Tx-xyn11	Tx-xyn 11	Tx-xyn11 W126A	Tx-xyn11 W126A
méthanol	-	++	-	-
butanol	-	-	++	+
pentanol	-	-	++	+
alcool benzylique	-	-	++	+
catéchol	++	++	+	++
résorcinol	++	+	++	+
hydroquinone	++	++	-	++

CCM : - : non détecté ou très faible ; + : faible ; ++ : intense

In silico : - : distances largement supérieures à 3 Å ; + : distances légèrement supérieures à 3 Å ; ++ : distances <3 Å

La méthode *in silico* montre ici certaines limites. L'étude *in silico* permet de réaliser des prédictions et de fournir des hypothèses. L'expérimentation est ensuite nécessaire pour valider ou non ces hypothèses car une multitude de paramètres entrent en jeu. La modélisation étudie le modèle d'un système et non le système dans son ensemble, dans toute sa complexité.

III. Conclusion

Plusieurs études s'intéressent à l'amélioration des synthèses de glycosides par réactions de transglycosylation à l'aide de glycosidases car ce sont des enzymes produites facilement et qui utilisent des substrats peu chers et disponibles comparativement aux glycosyl transférases. Le changement des conditions de réactions (dose d'enzyme, concentration en alcool, temps, ...) sont des paramètres qui ont une influence sur les rendements de transglycosylation (Hansson and Adlercreutz 2001, Zeuner et al. 2014). Dans le cas de la xylanase Tx-xyn11, de multiples expériences ont été menées sans réussir à améliorer la synthèse avec certains accepteurs tels que les alcools primaires aliphatiques. Afin de mieux comprendre les facteurs limitant ce type de réaction, une approche par modélisation moléculaire a été menée lors de cette thèse. Une telle approche a déjà été mise en place pour optimiser les réactions de transglycosylation catalysées par des glycoside hydrolases. Zeuner *et al.* ont montré que la modification du sous-site accepteur de l'enzyme, le repositionnement de l'accepteur pour rendre l'attaque nucléophile plus favorable ainsi que la stabilisation de l'intermédiaire glycosyl-enzyme sont des clés pour améliorer la transglycosylation (Zeuner et al. 2014).

Lors de cette étude, nous avons, dans un premier temps, développé une approche par modélisation moléculaire de la xylanase Tx-xyn11 afin de mieux comprendre les verrous qu'elle présente lors de la transglycosylation vis-à-vis d'accepteurs non polyphénoliques. Nous avons ainsi modélisé l'intermédiaire glycosyl-enzyme de Tx-xyn11 et modifié la position du résidu Y78 en un rotamère fonctionnel. Ensuite, nous avons débuté une étude visant à tester des mutations virtuelles des sous sites +1 et +2 de Tx-xyn11 afin de déterminer si certaines permettaient l'utilisation par l'enzyme d'alcools autres que polyphénoliques lors de l'étape de déglycosylation. Ainsi, les résultats *in silico* de Tx-xyn11 mutée ont montré que le mutant W126A était le seul qui permettait de générer des amarrages moléculaires avec des alcools aliphatiques et l'alcool benzylique.

L'enzyme mutée a ensuite été construite et produite afin de réaliser les réactions de transglycosylation. Les résultats ont permis d'approuver le modèle construit. En effet, la mutation du résidu W126 a une influence importante sur la transglycosylation. Les mesures de l'activité spécifique et des paramètres cinétiques de Tx-xyn11 et de son mutant W126A ont permis de mettre en évidence l'importance du résidu W126 sur l'hydrolyse des xylanes de hêtre. En effet, la mutation diminue l'activité spécifique de 47% et l'efficacité catalytique de l'enzyme pour les xylanes de hêtre est quatre fois moins importante. La diminution de l'activité hydrolytique est supposée favoriser la réaction de transglycosylation car ces deux réactions sont en compétition. Ainsi, une glycoside hydrolase ayant une activité hydrolytique amoindrie présentera une hydrolyse secondaire des produits de transglycosylation limitée.

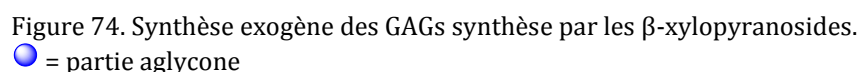
La mutation du résidu W126 en alanine a permis une augmentation d'un facteur 2 de la synthèse de benzyl xylobioside. Lors des études *in silico*, l'amarrage moléculaire de cet accepteur avait été rendu possible par la mutation. L'encombrement stérique réduit par la mutation du tryptophane en alanine ainsi que la réorientation des acides aminés adjacents par la minimisation conduit probablement à un positionnement optimisé de l'accepteur dans le site actif et pourrait expliquer cette amélioration.

L'étude *in silico* est un outil puissant qui permet de générer différentes hypothèses et qui a permis de cibler le résidu W126 comme jouant un rôle important lors de la catalyse de la réaction de transglycosylation avec certains accepteurs. Toutefois, notre approche était basée sur des structures protéiques figées ce qui présente certaines limites et peut conduire à des prédictions non vérifiées expérimentalement. Ainsi, il pourrait être intéressant de générer des conformations initiales de la protéine dans différents états en utilisant des méthodes comme la dynamique moléculaire et l'analyse des modes normaux.

Chapitre IV :

Synthèse et évaluation biologique de xylosides et des xylobiosides

Comme présenté dans le chapitre I, les β -xylopyranosides comportant des groupements aglycones hydrophobes (aliphatique, aromatique, polyaromatique) peuvent entrer dans les cellules humaines et animales et agir comme des accepteurs de la galactosyltransférase I (β 4GalT7) permettant ainsi d'amorcer une synthèse exogène de GAGs (Figure 74). La capacité des β -xylopyranosides à amorcer la synthèse de GAGs ainsi que la modulation des structures des GAGs dépendent non seulement de la nature de la partie aglycone, mais aussi de la nature de la liaison glycosidique, de la distance et de la nature du lien entre le xylose et la partie aglycone hydrophobe (Victor et al. 2009). Victor *et al.* ont émis l'hypothèse que la partie aglycone conduit à un transport sélectif des xylopyranosides vers des GAGOSOMES présents dans l'appareil de Golgi qui correspondent à des complexes possédant des arsenaux enzymatiques variés et pouvant ainsi conduire à l'obtention de GAGs différents selon les xylopyranosides utilisés (Victor et al. 2009).



A notre connaissance, les xylobiosides n'ont jamais été testés pour leur capacité à amorcer la synthèse de GAGs. Sarkar *et al.* ont toutefois rapporté qu'un disaccharide β -D-Gal(1-4)- β -D-Xyl-1-O-2-naphtyl pouvait agir en tant qu'initiateur de la synthèse et pouvait donc traverser la membrane plasmique (Sarkar and Esko 1995, Sarkar et al. 1995). De plus, récemment des études de cristallographie sur une β 4GalT7 de drosophile ont permis de montrer que le xylobiose se liait au site accepteur de cette enzyme (Tsutsui et al. 2013).

122

La transglycosylation par les xylanases est une manière de synthétiser des β -xylosides et β -xylobiosides. En effet, les xylanases sont des *endo* enzymes qui permettent de synthétiser, à partir de xylanes, des xylosides avec des DP ≥ 1 . La méthode présente plusieurs intérêts : une voie d'obtention directe en une seule étape dans l'eau à partir de matières premières d'origine végétale, l'accès à des molécules originales, la modularité de l'hydrophilie des molécules selon le degré de polymérisation de la tête sucre.

Deux grandes familles de molécules ont été ciblées. Des « click » xylosides et xylobiosides comportant un hétérocycle triazole substitué par un groupement aliphatique, aromatique ou fonctionnalisé ont été préparés par une méthode chimio-enzymatique en deux étapes. D'autre part, une série d'aryl xylosides et xylobiosides a été obtenue en une étape par une synthèse enzymatique avec divers alcools benzyliques ou phénoliques.

Les xylanases GH10 sont connues pour avoir une versatilité envers les accepteurs qu'elles peuvent prendre en charge lors de la réaction de transglycosylation, contrairement aux GH11. Une xylanase commerciale (NS22083 Novozymes) a été utilisée dans cette étude. La famille de GH à laquelle elle appartient n'est pas connue mais au vu de sa capacité à prendre en charge de nombreux accepteurs, cette enzyme présente des homologies avec la famille GH10.

Pour les « click » xylosides, une étude préliminaire (Ochs 2012) a permis de s'assurer de la faisabilité de cette méthode associant une cycloaddition 1,3-dipolaire entre un propargyl xyloside ou xylobioside avec divers azotures à une réaction préalable de transglycosylation enzymatique. Il est cependant nécessaire d'optimiser les conditions de synthèse des propargyl xyloside et xylobioside par la xylanase commerciale utilisée. Pour les aryl xylosides, la capacité de la xylanase à accepter des alcools aromatiques benzyliques, phénoliques ou polyphénoliques a été également étudiée.

En ce qui concerne l'évaluation biologique, l'objectif de ce travail est de faire un criblage systématique afin de comparer l'activité des xylosides et xylobiosides sur leur capacité à induire la biosynthèse des GAGs sur un modèle cellulaire. L'ensemble des tests d'évaluation biologique concernant l'activation de la biosynthèse des GAGs par les différents xylosides préparés ont été effectués à la Faculté de Médecine de l'Université de Reims Champagne-Ardenne au sein de l'équipe de l'UMR URCA/CNRS 7369 MEDyC « Matrice Extracellulaire et Dynamique Cellulaire » (équipe Dr. Y. Wegrowski, Dr. S. Brezillon) par Aurore Chatron-Colliet, Ingénieure de Recherche recrutée dans le cadre du projet XYLOCOS. La détermination des paramètres cinétiques de la β 4GalT7 a été effectuée à l'Université de Nancy au sein de l'équipe « MolCelTEG » (« Molecular, Cellular, Therapeutic Engineering and Glycosyltransferases » UMR CNRS 7365 (équipe de S. Fournel-Gigleux) par Isabelle Bertin-Jung.

Selon les résultats obtenus, la sélection d'une ou plusieurs molécules prometteuses permettra d'aller plus loin dans l'étude avec la détermination de la nature des GAGs synthétisés et le passage à des cellules humaines dermiques.

Dans une dernière étape, avec l'aide des partenaires industriels du projet XYLOCOS, ARD et SOLIANCE, la production de(s) molécule(s) d'intérêt à une échelle plus importante sera envisagée pour évaluer les éventuels coûts de production de ces xylosides. Des tests biologiques complémentaires directement reliés aux propriétés cosmétiques des xylosides sélectionnés sont également prévus au sein de la Société SOLIANCE.

II. Résultats et discussion

II.1. « Click » xylosides et xylobiosides

La chimie « click » est un concept développé par Sharpless *et al.* en 2001 pour générer des structures originales et développer une nouvelle approche en chimie organique pour la construction de molécules à partir de blocs élémentaires (Kolb *et al.* 2001).

La chimie « click » regroupe plusieurs catégories de transformations chimiques (Figure 75) :

- (i) la cycloaddition d'espèces insaturées : les réactions de cycloaddition 1,3-dipolaire et les réactions de Diels-Alder;
- (ii) la substitution nucléophile, impliquant les réactions d'ouverture de cycles électrophiles, comme les époxydes, aziridines et aziridinium et les ions episulfonium;
- (iii) la chimie des carbonyles, de type non-aldol comme la formation d'urée, de thiourées, d'hydrazones, etc.;
- (iv) les réactions d'addition sur des liaisons multiples carbone-carbone, comme l'époxydation, la dihydroxylation, l'aziridination, et les additions de Michael.

La chimie « click » doit répondre à certains critères : des rendements élevés, des réactifs facilement disponibles, des conditions expérimentales simples, des sous-produits inoffensifs, une réaction stéréospécifique, l'utilisation ou non d'un solvant mais celui-ci doit être non toxique et facilement éliminé et une purification simple (Kolb *et al.* 2001, Kolb and Sharpless 2003).

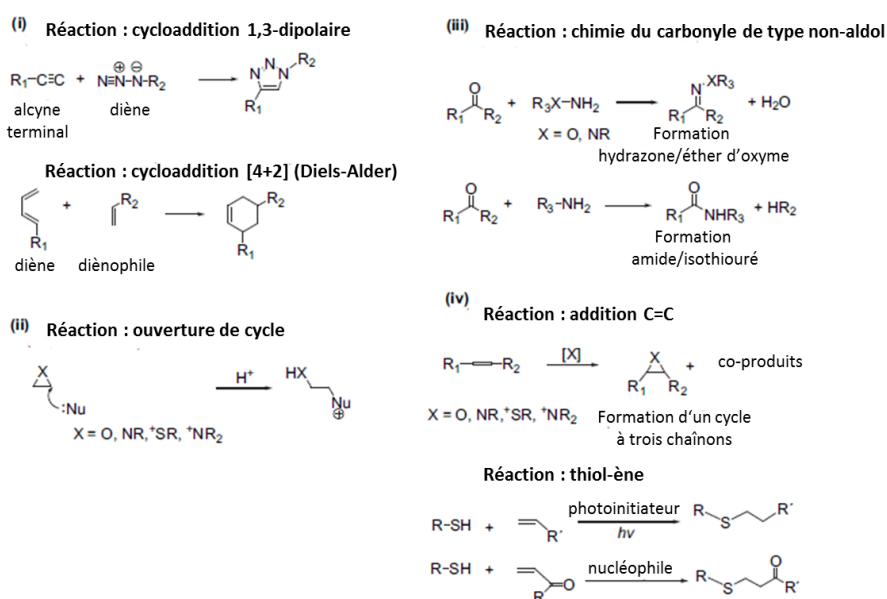


Figure 75. Les différentes catégories de la chimie « click »

Parmi ces réactions, la cycloaddition 1,3-dipolaire impliquant un alcyne terminal et un azoture pour former un noyau triazole est la plus développée. Cette cycloaddition 1,3-dipolaire, sous activation thermique, a été initialement décrite par Huisgen (Huisgen 1963a, Huisgen 1963b). Cependant, cette réaction n'est pas régiosélective et conduit à deux régioisomères avec la formation d'un hétérocycle triazole disubstitué en 1,4 ou en 1,5 (Figure 76).

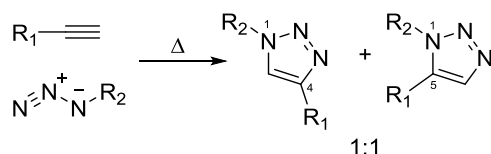


Figure 76. Réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen.

En 2002, les équipes de Meldal et Sharpless ont indépendamment décrit une réaction entre un alcyne terminal et un azoture catalysée par des sels de cuivre (I) (CuAAC) qui a permis de conduire régiosélectivement à un 1,2,3-triazole disubstitué en 1,4 (Rostovtsev et al. 2002, Tornøe et al. 2002). Le Cu(I) est préparé *in situ* par la réduction de sels de Cu(II) (CuSO₄) par l'ascorbate de sodium (Rostovtsev et al. 2002).

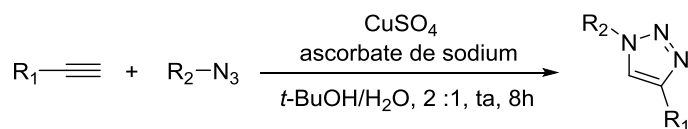


Figure 77. Cycloaddition catalysée par du Cu(I) entre un alcyne terminal et un azoture (CuAAC).

La chimie « click » entre un alcyne terminal et un azoture catalysée par du cuivre Cu(I) (CuAAC) est une méthode de synthèse employée dans plusieurs domaines notamment la recherche pharmacologique (Kolb and Sharpless 2003, Kushwaha et al. 2013). Cet engouement est dû à ses conditions douces d'utilisation, au groupement triazole stable biologiquement car résistant au clivage hydrolytique mais également aux blocs élémentaires (alcyne et azoture) qui sont inertes dans les conditions physiologiques (Kolb and Sharpless 2003, Aragao-Leoneti et al. 2010). La grande disponibilité des molécules portant une fonction azoture ou alcyne permet d'accéder facilement à un large spectre de molécules originales (Kushwaha et al. 2013). Cependant, comme toute méthode, celle-ci n'est pas parfaite notamment à cause de l'utilisation d'un métal comme le cuivre en tant que catalyseur. De plus, la biocompatibilité des triazoles doit être testée systématiquement (Hein et al. 2008).

La chimie « click » est largement utilisée dans la chimie des sucres grâce à la biocompatibilité de la réaction (Kushwaha et al. 2013).

Oldham *et al.* ont ainsi synthétisé, en 4 étapes à partir du D-xylose, des β -xylosides avec un noyau triazole afin de les tester pour leurs propriétés tensioactives (Figure 78) (Oldham et al. 2013).

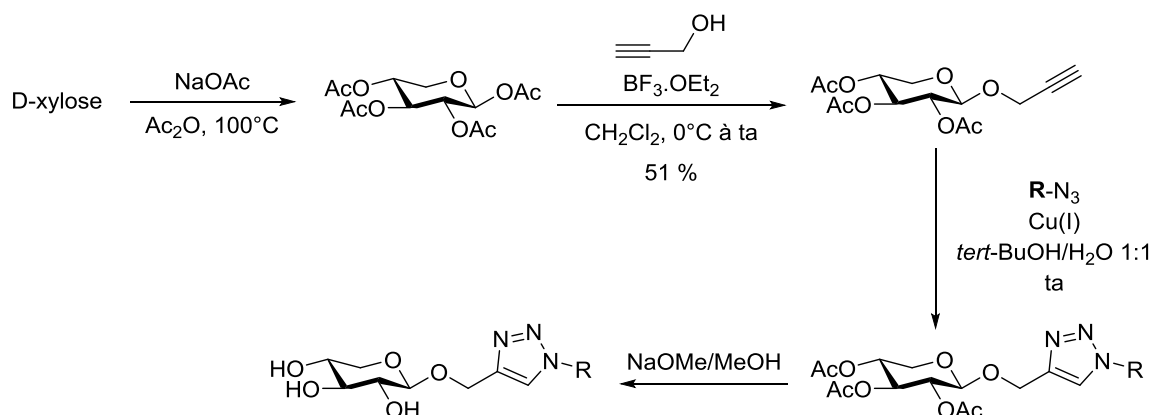


Figure 78. Synthèse de xylosides comportant un noyau triazole en 4 étapes à partir du D-xylose.

Kuberan *et al.* ont synthétisé de nombreux *N*-xylosides grâce à la chimie « click » et ont ainsi pu cribler ces xylosides pour leur capacité à synthétiser des GAGs (Kuberan et al. 2008, Victor et al. 2009, Raman and Kuberan 2010, Tran et al. 2010, Tran et al. 2013) (Figure 79).

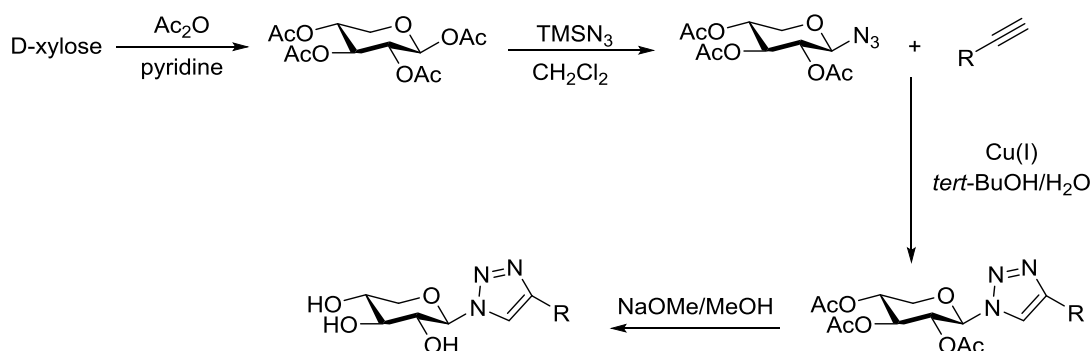


Figure 79. Voie de synthèse des *N*-xylosides de Kuberan *et al.*

Ces méthodes de synthèse chimique nécessitent cependant des étapes de protection et déprotection des groupements hydroxyles du xylose afin de garantir la sélectivité en β lors de la formation de l'azoture.

Lu *et al.* ont synthétisé par voie chimio-enzymatique une série de β -glucosides et de β -galactosides comportant un noyau triazole (Lu et al. 2010). Dans une première étape, une réaction de transglycosylation ou d'hydrolyse inverse catalysée par une β -glycosidase en présence de différents alcools comportant une fonction alcyne terminal a permis d'accéder à différents glycosides, avec l'avantage de permettre une synthèse à partir de sucres non protégés avec un contrôle total de la stéréosélectivité β . Une seconde étape de chimie « click » a ensuite

permis d'obtenir une grande variété de molécules grâce à la diversité des azotures disponibles, avec des rendements élevés (Figure 80).

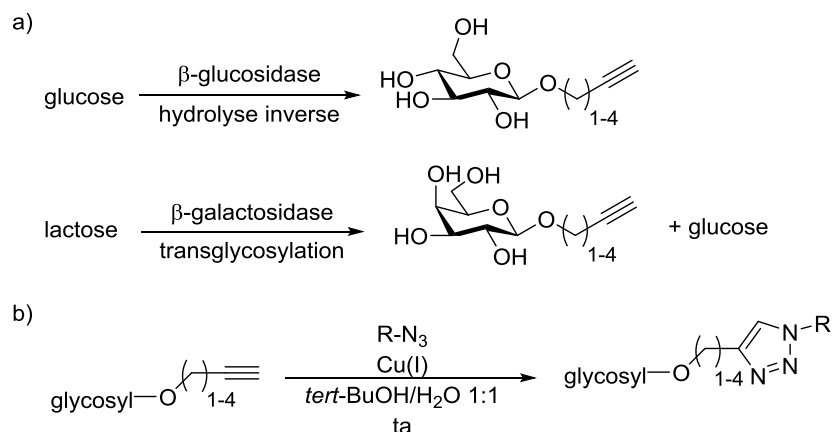


Figure 80. Synthèse chimio-enzymatique par Lu *et al.* 2010. a) Synthèse enzymatique, b) Réaction de « click »

C'est dans ce contexte que nous avons voulu mettre en place une synthèse chimio-enzymatique permettant d'accéder à la fois à des β -xylosides et xylobiosides à l'aide de xylanases (Figure 81). Une réaction de transglycosylation est réalisée à partir de xylanes, d'une xylanase commerciale et d'alcool propargylique afin de valoriser le xylose issu des hémicelluloses de la biomasse lignocellulosique et obtenir le xyloside **1** et le xylobioside **2** comportant une partie aglycone avec un alcyne terminal. Puis, une deuxième étape de chimie « click » entre l'alcyne de la partie aglycone et un azoture permet d'obtenir facilement une série de xylosides **3** et xylobiosides **4** portant un noyau triazole avec des substituants variables. Ces composés ont été ensuite évalués pour leur capacité à amorcer la biosynthèse de GAGs.

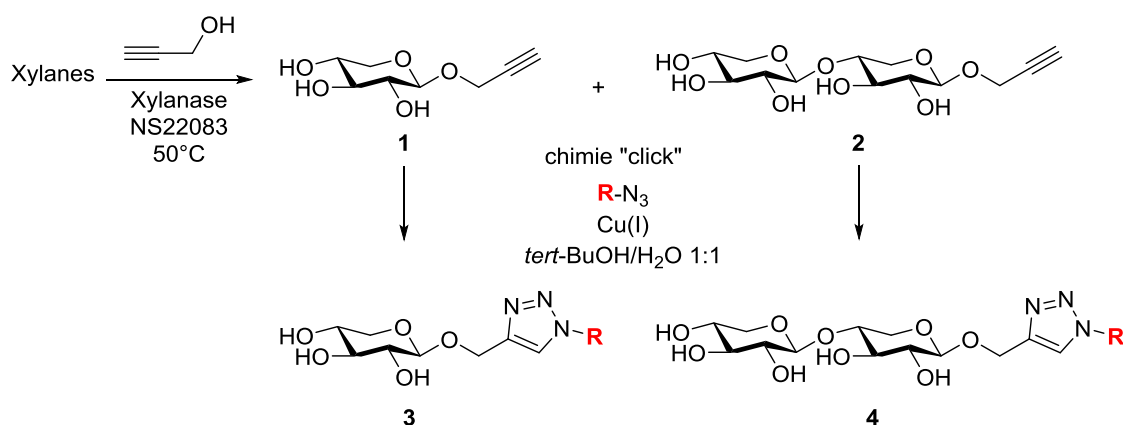


Figure 81. Schéma général de la synthèse chimio-enzymatique

Dans un premier temps, il a fallu optimiser l'étape de transglycosylation afin d'obtenir le maximum de propargyl xyloside **1** et xylobioside **2** en modulant les conditions de réaction, puis

réaliser la chimie « click » avec divers azotures. Le choix des azotures a été réfléchi et a permis de moduler l'hydrophilie et/ou l'hydrophobicité des aglycones.

Dans un deuxième temps, l'étude de la cytotoxicité et le criblage des différents xylosides et xylobiosides pour leur activité de biosynthèse des GAGs ont été effectués sur un modèle cellulaire. Pour finir, une approche *in cellulose* et des études d'activité de la galactosyltransférase I (β 4GalT7) en présence des « click » xylosides ont été mises en œuvre afin de mettre en lumière certains mécanismes d'action des « click » xylosides au niveau biologique.

II.1.1. Synthèse enzymatique de propargyl xyloside et xylobioside

Cette étape enzymatique est une réaction de transglycosylation de xylanes catalysée par une xylanase commerciale avec comme accepteur l'alcool propargylique (Figure 82). L'intérêt d'utiliser une xylanase comparé à une β -xylosidase comme outil de synthèse est qu'elle permet la synthèse de xylosides de DP>1.

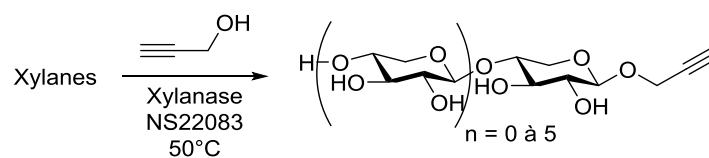


Figure 82. Transglycosylation par la xylanase commerciale NS22083 en présence d'alcool propargylique.

La xylanase commerciale utilisée, NS22083, hydrolyse naturellement les liaisons glycosidiques β -1,4 entre les résidus xylopyranosyles des xylanes en présence d'eau et conduit à la formation des produits d'hydrolyse. Cette enzyme fonctionne avec un mécanisme catalytique avec rétention de configuration anomérique. Lors de la réaction de transglycosylation, la xylanase va utiliser l'alcool propargylique comme accepteur et produire des propargyl β -xylosides avec différents DP. Comme la réaction se déroule en présence d'eau, milieu nécessaire à l'action de l'enzyme, les réactions de transglycosylation et d'hydrolyse ont lieu simultanément et entrent en compétition.

Lors de la réaction de transglycosylation représentée par **R** sur la Figure 83, des produits d'hydrolyse sont identifiés grâce au dépôt d'un témoin (**T** = mélange de xylose, xylobiose, xylotriose, xylotétraose). Les deux produits moins polaires identifiés sur la plaque de CCM correspondent aux principaux produits de transglycosylation : le propargyl β -xyloside **1** et le propargyl β -xylobioside **2**.

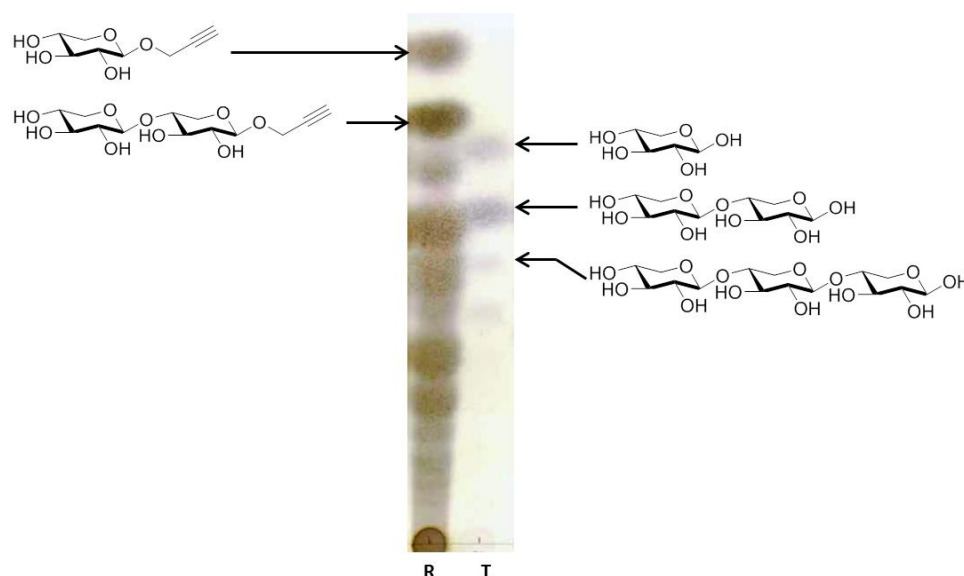


Figure 83. Transglycosylation à partir de xylanes de hêtre et d'alcool propargylique avec la xylanase NS22083 pendant 1 h à 50°C. Eluant BuOH : AcOH : H₂O 2:1:1.
T = témoin hydrolyse et R = réaction de transglycosylation

Le composé de DP=3, le propargyl xylotrioside, a également pu être isolé et caractérisé. Il est produit en faible quantité et sa polarité proche de celle du xylose rend sa purification difficile. Des propargyl xylosides avec des DP>3 (DP4 à DP6) sont produits en faible quantité et ont été uniquement détectés par spectrométrie de masse.

Dans la suite de cette étude, nous nous sommes intéressés uniquement à la production et à la purification de propargyl xyloside (DP1) et de propargyl xylobioside (DP2), produits majoritaires.

a) Optimisation des conditions de réaction

Dans un premier temps, nous avons fait des essais de synthèse sur 1 mL de milieu réactionnel en modifiant certains paramètres afin d'obtenir des résultats qualitatifs par CCM. Ensuite, nous avons étudié les différents paramètres un par un avec une quantification par CLHP.

La modification des différents paramètres de synthèse a pour but de définir les conditions les plus favorables à la réaction de transglycosylation en compétition avec la réaction d'hydrolyse. Les principaux paramètres étudiés sont : la concentration en xylanes, la concentration en alcool propargylique, la quantité d'enzyme et le temps de réaction. La température de la réaction est un paramètre qui n'a pas été étudié car Novozymes, le fournisseur de l'enzyme, a donné sa température optimale d'utilisation à 50°C.

Les essais ont été réalisés en volume de 1 mL à 50°C sous agitation dans des tubes en verre. Les produits DP1 et DP2 ont été quantifiés par CLHP grâce à des standards purifiés et

caractérisés au laboratoire. Les différents paramètres sont étudiés individuellement en fixant les autres variables.

Concentration en xylanes

Les xylanes sont des polymères linéaires de résidus xylopyranosyles liés par des liaisons β -1,4. Leur degré de polymérisation est d'environ 100 (Ebringerova and Heinze 2000, Zhong and Ye 2015). Dans le milieu réactionnel, une partie de la matière première utilisée est insoluble. Les xylanes de hêtre commercialisés par la Société Roth®, utilisés lors de cette étude, ne sont composés qu'à environ 63% de sucres dont 60% de D-xylose (Tableau 30), le reste étant des cendres ou des sels provenant de la méthode de production et d'extraction.

Tableau 30. Analyse des sucres composant les xylanes de hêtre commercialisés par la Société Roth.

Sucres	% MS
Arabinose	0,92
Galactose	1,10
Glucose	0,75
Xylose	60,0

L'augmentation de la quantité de xylanes dans la réaction conduit à une diminution du rendement en mg de produits/g de xylanes (Figure 84, a). Les rendements les plus élevés sont atteints avec les plus faibles concentrations en xylanes 0,5 et 1% (p/v) (290 et 280 mg/g de xylanes, respectivement). Le rendement obtenu pour ces concentrations en xylanes est donc de 27% si on considère que la matière première utilisée n'est constituée que de 60% d'unités de D-xylose. Ce calcul est basé sur le nombre de moles de DP1 et DP2 produits sur le nombre de moles en équivalent xylose présent dans les xylanes. Les xylanes sont constitués de résidus xylopyranosyles liés par des liaisons β -1,4 dont la formation conduit à la perte d'une molécule d'eau. La masse molaire d'une unité xylopyranosyle au sein des polymères de xylanes est donc de 132 g/mol (et non de 150 g/mol comme dans le cas du D-xylose). La baisse des rendements à haute teneur en xylanes indique que la conversion des xylanes est plus importante à faible concentration.

Cependant, la meilleure conversion des xylanes n'est pas notre objectif, qui reste l'obtention du maximum de produits DP1 et DP2 dans la réaction. C'est pour cela que nous avons ensuite exprimé le rendement en mg de produits/mL (Figure 84, b). Nous observons la tendance inverse, lorsque la quantité de xylanes augmente dans le milieu, la quantité de produits augmente dans le milieu réactionnel. Les concentrations les plus élevées permettent d'avoir 19 mg/mL de propargyl xyloside et xylobioside pour 10% (p/v) de xylanes et 22 mg/mL pour 20% (p/v) de xylanes, ce qui correspond respectivement à des rendements de 15 et 8% par rapport aux xylanes constitués de 60% de D-xylose. La quantité de produits est plus importante à haute

teneur en xylanes mais la conversion est faible. Si une concentration de 20% (p/v) de xylanes permet d'obtenir le rendement maximum en mg/mL, le ratio DP1/DP2 diminue et la réaction n'est pas homogène à cette concentration.

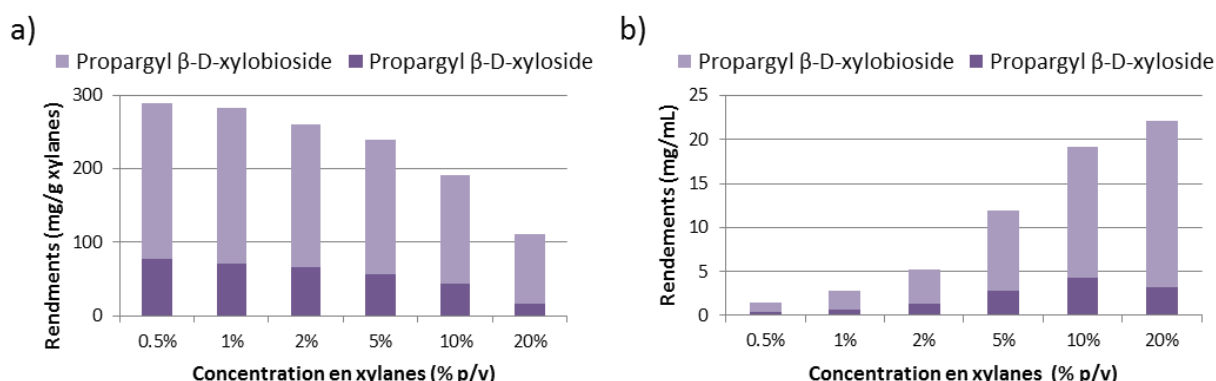


Figure 84. Influence de la concentration en xylanes en % (p/v) : a) sur le rendement en mg/g de xylanes et b) sur le rendement en mg/mL de propargyl xyloside et xylobioside. Les réactions sont réalisées en volume 1 mL, à 50°C sous agitation pendant 1 h avec 50 UI/mL de NS22083 et 10% (v/v) alcool propargylique.

Pour la suite, nous avons par conséquent choisi la concentration à 10% (p/v) de xylanes afin d'obtenir la quantité la plus importante de produits de synthèse, tout en conservant l'homogénéité du milieu réactionnel. Dans des études précédentes, la même décision avait été prise car la teneur en xylanes doit garantir l'homogénéité du milieu réactionnel pour un transfert de masse optimal (Mamo et al. 2010, Ochs et al. 2011, Zeuner et al. 2014).

Dose d'enzyme

L'effet de la dose d'enzyme a ensuite été évalué. L'augmentation de la dose d'enzyme de 2 à 100 UI/mL conduit à une augmentation des produits de transglycosylation de 8 à 175 mg de propargyl oligoxylosides/g de xylanes (Figure 85). A faible dose d'enzyme, il y a peu de produits de transglycosylation et le rendement maximal est atteint avec 50 UI/mL. Ces résultats sont en adéquation avec des résultats précédents qui montraient que l'augmentation de la dose d'enzyme entraînait une augmentation de la teneur des produits jusqu'à une certaine valeur puis diminuait (Mamo et al. 2010, Ochs et al. 2011).

La dose d'enzyme a un effet sur la réaction de transglycosylation qui est en compétition avec les réactions d'hydrolyse primaire et secondaire. A faible dose d'enzyme, les résultats indiquent que la xylanase catalyse principalement une réaction d'hydrolyse primaire. A 100 UI/mL, le rendement des oligoxylosides diminue avec une augmentation du ratio DP1/DP2. Il y a donc une hydrolyse secondaire plus importante à haute dose d'enzyme, qui modifie le DP moyen des produits. Des études antérieures ont montré que la dose de xylanase impacte le DP moyen des produits de transglycosylation. (Mamo et al. 2010, Ochs et al. 2011).

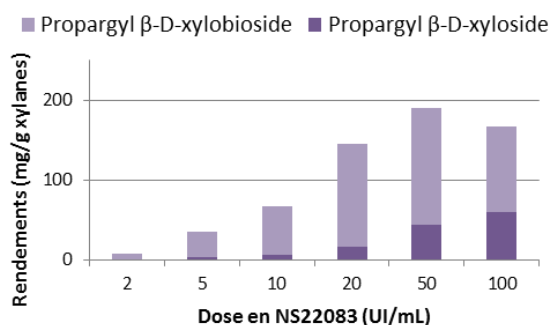


Figure 85. Influence de la dose de xylanase en UI/mL sur le rendement en mg/g de xylanes de propargyl xyloside et xylobioside.

Les réactions sont réalisées en volume 1 mL, à 50°C sous agitation pendant 1 h avec 10% (p/v) de xylanes et 10% (v/v) d'alcool propargylique.

Concentration en alcool

La concentration en alcool propargylique dans l'eau a été testée de 1 à 20% (v/v) (Figure 86). Le meilleur résultat est obtenu avec 20% (v/v) d'alcool dans le milieu avec 215 mg d'oligoxylosides/g de xylanes (soit 12% de rendement). Dans ces conditions, le DP moyen des xylosides est plus important (DP1/DP2 : 1/6) par rapport à la dose d'alcool de 10% (v/v) (DP1/DP2 : 1/3). Une plus faible teneur en eau (concentration élevée en alcool) est favorable à la synthèse de xylosides. Cependant, de faibles concentrations en eau peuvent conduire à de nombreux inconvénients tels que l'insolubilité du substrat et de l'enzyme et l'inactivation de celle-ci (Mamo et al. 2010) ce qui, dans notre cas, conduit à une hydrolyse secondaire moins efficace et donc à une diminution du ratio DP1/DP2. La diminution de la quantité de DP1 lorsque la réaction est catalysée avec 20% (v/v) d'alcool peut s'expliquer par la limitation de l'hydrolyse secondaire. L'objectif étant d'obtenir à la fois le propargyl xyloside et le propargyl xylobioside, nous avons opté pour une concentration d'alcool à 10% (v/v).

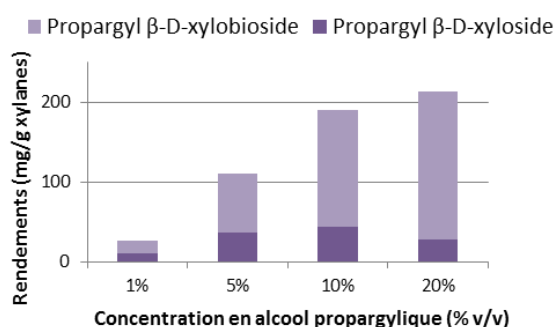


Figure 86. Influence de la concentration en alcool propargylique en % (v/v) sur le rendement en mg de propargyl xyloside et xylobioside /g de xylanes.

Les réactions sont réalisées en volume 1 mL, à 50°C sous agitation avec 50 UI/mL de NS22083 et 10% (p/v) de xylanes.

Durée d'incubation

Le temps d'incubation pour la réaction de transglycosylation a été testé de 5 min à 24 h (Figure 87). Le rendement maximum est atteint à 1 h puis il diminue. La xylanase commence par

produire essentiellement du DP2 (5 min) puis le ratio DP1/DP2 augmente avec le temps de 1:6 (5 min) à 4,5:1 (24 h). La teneur en DP1 augmente jusqu'à 8 h puis diminue à 24 h. A partir de 4h, on observe une diminution du rendement global de synthèse. Cette diminution peut s'expliquer par une hydrolyse secondaire qui conduit à une hydrolyse du xylobioside DP2 en xyloside DP1 mais également à une l'hydrolyse du xyloside DP1 en xylose et en alcool propargylique.

La durée de la réaction est un critère important lors du contrôle des DP des produits de la réaction. En effet, comme l'hydrolyse secondaire se produit, le DP moyen diminue quand la durée de réaction augmente (Matsumura et al. 1997, Mamo et al. 2010, Ochs et al. 2011).

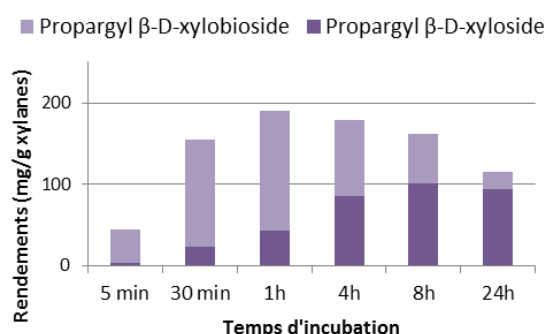


Figure 87. Influence du temps d'incubation sur le rendement en mg de propargyl xyloside et xylobioside /g de xylanes.

Les réactions sont réalisées en volume 1 mL, à 50°C sous agitation avec 50 UI/mL de NS22083, 10% (p/v) de xylanes et 10%(v/v) d'alcool propargylique.

b) Choix des conditions

En prenant en considération les résultats précédents, nous avons défini les conditions expérimentales suivantes pour réaliser les réactions de transglycosylation: 10% de xylanes de hêtre (p/v), 50 UI/mL d'enzyme, 10% d'alcool propargylique (v/v) pendant 1 h (Figure 88). Ces conditions conduisent à l'obtention de 45 mg de propargyl xyloside **1**/g de xylanes (DP1) et 145 mg de propargyl xylobioside **2**/g de xylanes (DP2), ce qui correspond à une conversion de 15% du potentiel xylose présent dans les xylanes (les xylanes de hêtre (Roth®) ne sont constitués que de 60% de D-xylose).

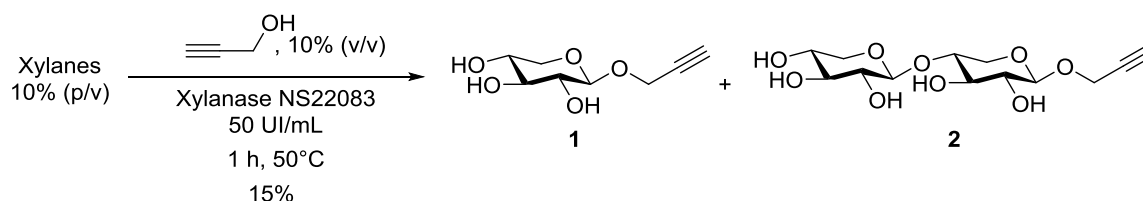


Figure 88. Conditions choisies pour l'optimisation de la synthèse de propargyl xyloside **1** et xylobioside **2**.

Ces conditions sont largement optimisées par rapport aux conditions précédentes (Ochs 2012). Les conditions étaient de 5% (p/v) de xylanes de bouleau (constitué de 70% d'unités D-xylose), de 5% (v/v) d'alcool propargylique, de 30 UI/mL d'une xylanase commerciale (comparable à NS22083) pendant 45 min à 50°C dans un volume réactionnel de 50 mL. Dans ces conditions, 0,9 g/L de propargyl xyloside et 2,8 g/L de propargyl xylobioside avaient été obtenus, ce qui correspond à un rendement de 5%. Dans la littérature, les réactions en présence d'alcool propargylique par hydrolyse inverse ou par transglycosylation ont permis d'obtenir des rendements supérieurs à 30% de propargyl glucoside et propargyl galactoside (Lu et al. 2010). Dans ce cas, les donneurs sont soit du glucose soit du lactose qui sont solubles dans l'eau, contrairement aux xylanes qui ne le sont pas à la teneur de 10% (v/v), ce qui peut expliquer ce plus fort rendement avec une haute conversion des sucres donneurs. De plus, la concentration en alcool dans le cas de l'hydrolyse inverse est de 45% (v/v) avec un co-solvant 45% (v/v) de CH₃CN, ce qui peut également expliquer l'efficacité de la synthèse, l'ajout d'alcool permettant d'améliorer le rendement (Mamo et al. 2010).

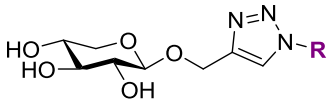
Finalement, une réaction sur un volume total de 500 mL a été réalisée dans un réacteur de 2L thermostaté dans les conditions de réaction précédemment définies, en augmentant le temps d'incubation à 4 h, compte-tenu du changement d'échelle (1 mL à 500 mL). Après purification par chromatographie sur colonne de silice C18 puis par flash chromatographie (voir Matériel et Méthodes), cette réaction a permis d'obtenir 2,1 g de propargyl xyloside **1** et 7,3 g de propargyl xylobioside **2** soit environ 10 g de produits de transglycosylation pour une réaction de 500 mL. Une amélioration des conditions de purification doit encore être envisagée pour un changement d'échelle plus important.

II.1.2. Réactions « click » avec divers azotures

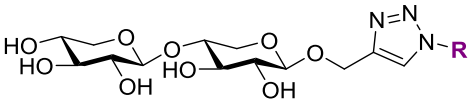
La réaction de chimie « click » a été réalisée entre différents azotures commerciaux et le propargyl xyloside **1** ou xylobioside **2**, isolés et purifiés, puis mis en solution dans un mélange *tert*-BuOH : H₂O 1:1 en présence de sulfate de cuivre et d'ascorbate et sodium pour générer du Cu(I) *in situ*. Cette réaction conduit à la formation de β-xylosides **3** ou β-xylobiosides **4** comportant un noyau triazole respectivement à partir respectivement du propargyl xyloside **1** et du propargyl xylobioside **2**.

Après 1 nuit, les réactions ont été arrêtées et les produits ont ensuite été purifiés par chromatographie sur silice. Les rendements obtenus (58-93%) pour chaque réaction sont présentés dans le Tableau 31. Les produits **3h** et **4h** sont obtenus par déprotection des groupements acétates de la partie aglycone des produits **3g** et **4g** avec 62 et 73% de rendement, respectivement (Brusa et al. 2014).

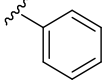
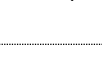
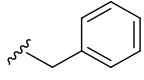
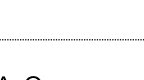
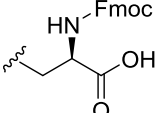
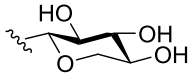
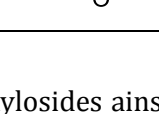
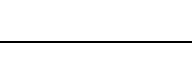
Tableau 31. Rendements de la réaction de chimie « click » sur les propargyl xyloside (**3**) ou xylobioside (**4**) en fonction de la nature des azides utilisés.



3



4

	R	Rdt (%)		R	Rdt (%)
3a		75	3e		88
4a		93	4e		73
3b		80	3f		70
4b		80	4f		70
3c		87	3g		91
4c		74	4g		90
3d		58	3h		Déprotection
4d		61	4h		de 3g et 4g

Les xylosides ainsi fonctionnalisés ont été testés pour leur capacité à initier la synthèse de GAGs (§ IV). Le choix du substituant du noyau triazole s'explique de la manière suivante :

- une chaîne linéaire carbonée avec ou sans hétéroatome, permettant de moduler la polarité des parties aglycones (séries **a**, **b**, **c**),
- une sérine protégée, avec pour objectif de mimer le motif xylose relié à la sérine de la protéine cœur au sein des PGs (série **d**),
- des aromatiques qui apportent de l'hydrophobicité aux molécules (séries **e** et **f**),
- un xyloside acétylé ou déprotégé (séries **g** et **h**), afin d'explorer la possibilité d'amorcer la synthèse de deux chaînes de GAGs à partir d'un même xyloside. En effet dans la littérature, des clusters de *N*-xylosides permettent une initiation de 2 à 3 chaînes de GAGs sur la même « plateforme » (Nguyen et al. 2013, Tran et al. 2013).

II.2. Aryl xylosides

Il existe de nombreux exemples de synthèse enzymatique d'alkyl xylosides par les xylosidases ou les xylanases. Les xylanases utilisées en présence d'alcool gras conduisent à des molécules amphiphiles grâce à la capacité d'obtenir des composés de DP>1 dans le but de produire des tensio-actifs (Matsumura et al. 1990, Ochs et al. 2011).

Peu d'études concernent la transglycosylation d'alcools aromatiques. Parmi les xylopyranosides connus pour initier la biosynthèse exogène de GAGs, les plus efficaces sont les molécules comportant une partie aglycone aromatique (Siegbahn et al. 2015). Des études de cristallographie ont montré que les xylopyranosides pour être efficacement galactosylés par la β 4GalT7 doivent être constitués d'un xylose lié à un aglycone aromatique. La poche du site actif entoure le xylose alors que l'aglycone se déploie à l'extérieur du site actif de l'enzyme qui est constitué majoritairement de résidus aromatiques (Siegbahn et al. 2015).

Seules deux études rapportent la synthèse enzymatique de xylosides avec une partie aglycone aromatique catalysée par une xylosidase à partir de xylobiose, avec comme accepteur de l'hydroquinone (Sulistyo et al. 1994) ou l'alcool hydroxybenzylique (Kurakake et al. 2005).

La réaction de transglycosylation à partir de xylanes et d'accepteurs aromatiques, catalysée avec des xylanases d'origines différentes a été étudiée (Kadi et al. 2002, Tramice et al. 2007, Chiku et al. 2008, Kadi and Crouzet 2008, Chiku et al. 2009). Nishizawa *et al.* ont étudié la capacité de transglycosylation d'une xylanase de *Hypsizigus marmoreus* pour une variété d'alcools aromatiques. Selon la structure des accepteurs, la transglycosylation est plus ou moins efficace montrant la spécificité du sous-site aglycone de cette enzyme (Nishizawa et al. 2002). Cette enzyme appartient à la famille GH10 comme nous le présumons pour la xylanase commerciale que nous utilisons. Si les structures tridimensionnelles des xylanases 10 sont conservées, les topologies de leurs sites actifs ne le sont pas, ce qui peut conditionner la spécificité d'une xylanase GH10 par rapport à une autre dans la prise en charge des accepteurs lors de la transglycosylation (Charnock et al. 1998).

L'objectif de ce travail est d'évaluer la capacité de transglycosylation de xylanes de hêtre par une xylanase commerciale en présence d'accepteurs alcools comportant une partie aromatique. Les accepteurs utilisés sont des alcools primaires possédant une partie aromatique ou des phénols et polyphénols. L'avantage d'utiliser une xylanase est l'obtention de xylosides et de xylobiosides en une seule réaction.

Les aryl xylosides et xylobiosides obtenus ont ensuite été évalués pour leur capacité à initier la biosynthèse exogène de GAGs sur un modèle cellulaire, afin d'étudier l'influence de la nature de la partie glycone et aglycone sur cette synthèse. Puis, l'influence de la nature de l'atome impliqué dans la liaison glycosidique (liaison *O*-, *S*- et *C*- glycosidique) sur l'affinité de la β 4GalT7, première enzyme impliquée dans la biosynthèse des GAGs, a également été étudiée. La nature de l'atome impliqué dans la liaison glycosidique est connu pour avoir un effet sur la capacité des xylosides à initier la synthèse des GAGs (Sobue et al. 1987, Jacobsson et al. 2007, Siegbahn et al. 2015).

II.2.1. Synthèse enzymatique avec les accepteurs aromatiques

Les conditions retenues pour la réaction de transglycosylation en présence d'alcool propargylique ont été utilisées sans optimisation : 10% (p/v) xylanes, 50 UI/mL de xylanase et 1 h de réaction à 50°C. Cependant, comme les accepteurs utilisés sont sous forme solide ou liquide et leurs masses moléculaires très variables, nous avons opté pour l'utilisation d'une concentration molaire fixe en alcools dans les réactions de 0,5 M.

Les conditions fixées sont donc 10% (p/v) xylane, 50 UI/mL de xylanase commerciale, 0,5 M d'alcool à 50°C sous agitation. Selon le volume des réactions et les résultats des essais préliminaires, les temps de réaction sont différents.

La réaction de transglycosylation est représentée dans la Figure 89. Comme précédemment, nous nous sommes intéressés aux xylosides (DP1) et aux xylobiosides (DP2). Les produits de DP supérieurs n'ont pas été isolés. Les différents accepteurs testés sont présentés dans le Tableau 32 et sont classés selon la nature de leur(s) groupement(s) hydroxyle(s). Si les conditions réactionnelles de la synthèse n'ont pas été optimisées pour chaque accepteur alcool utilisé, il a fallu cependant, dans certains cas, modifier des paramètres tels que la dose de xylanase ou le temps d'incubation pour améliorer les quantités de produits formés.

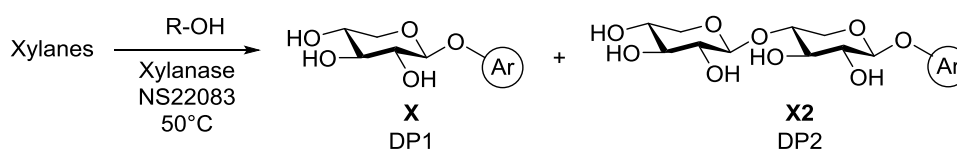
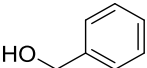
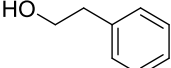
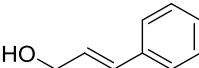
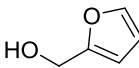
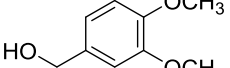
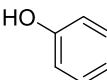
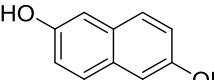
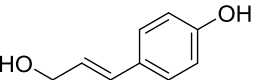
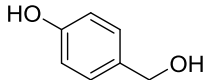
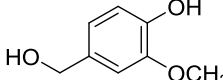
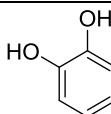
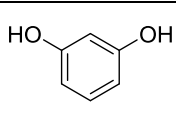


Figure 89. Réaction de transglycosylation en présence d'alcools aromatiques

Tableau 32. Les différents accepteurs aromatiques testés pour la transglycosylation avec la xylanase commerciale.

Accepteurs aromatiques avec une fonction alcool primaire		
		
Alcool benzylique	Alcool phénéthylque	Alcool cinnamique
		
Alcool furfurylique	Alcool vératrylique	
Accepteurs aromatiques avec une fonction phénol		
		
Phénol	2,6-dihydroxynaphtalène	
Accepteurs aromatiques avec une fonction alcool primaire et phénol		
		
Alcool <i>p</i> -coumarique	Alcool 4-hydroxybenzylique	Alcool vanillique
Accepteurs aromatiques avec deux fonctions phénols		
		
Catéchol	Résorcinol	

a) Synthèse et purification avec les accepteurs possédant une fonction alcool primaire

Des essais de synthèses ont au préalable été réalisés en volume de 1 mL pendant 1 h dans les conditions fixées afin de s'assurer de la présence des produits de transglycosylation. Pour tous les accepteurs testés, la transglycosylation est efficace avec observation de spots « intenses » correspondants aux DP1 et DP2 en CCM. Lors d'essais préliminaires, 20% (v/v) de *tert*-BuOH avaient été ajoutés dans certaines réactions pour améliorer la solubilité de l'accepteur mais cela impliquait une diminution de l'hydrolyse secondaire et un ratio DP1/DP2 plus faible. Par conséquent, les réactions sont finalement réalisées dans l'eau sans ajout de co-solvant.

Les réactions ont ensuite été effectuées en plus gros volume (50 ou 100 mL) afin d'obtenir la quantité nécessaire à la caractérisation des xylosides et xylobiosides obtenus et à leur évaluation biologique. Les rendements présentés dans les tableaux suivants (33 à 38) sont des rendements en produits purifiés après chromatographie. Cependant, la séparation des

produits de synthèse n'a pas toujours été optimisée et les rendements ne reflètent pas toujours l'efficacité de la réaction de transglycosylation.

Le Tableau 33 présente les différents rendements obtenus en DP1 et DP2 pour les accepteurs possédant une fonction alcool primaire.

Tableau 33. Rendements des xylosides purifiés obtenus.

	Conditions (tps, volume)	DP1		DP2	
		mg/g de xylanes	mg/mL	mg/g de xylanes	mg/mL
Alcool benzylique	4 h, 100 mL	52,7	5,3	53,4	5,3
Alcool phénéthylique	4 h, 50 mL	30,0	3,0	94,4	9,4
Alcool cinnamique	1 h, 50 mL	15,1	1,5	70,3	7,0
	4 h, 100 mL	36,5	3,7	12,0	1,2
Alcool vératrylique	4 h, 50 mL	44,6	4,5	—	—
Alcool furfurylique	2 h, 50 mL	33,5	3,5	14,9	1,5

Conditions : 10% (p/v) xylanes, 50 UI/mL de xylanase, 0,5 M alcool à 50°C sous agitation.

L'alcool phénéthylique est l'accepteur qui permet d'obtenir le maximum de produits de transglycosylation avec 124,4 mg de xylosides/g de xylanes, puis l'alcool benzylique (106,1 mg de xylosides/g de xylanes) et l'alcool cinnamique (85,4 mg de xylosides/g de xylanes). Les rendements pour l'alcool furfurylique (48,4 mg de xylosides/g de xylanes) et pour l'alcool vératrylique (44,6 mg de xylosides/g de xylanes) sont plus faibles. Le xylobioside obtenu par réaction avec l'alcool vératrylique n'a pas été isolé en quantité suffisante pour présenter un rendement. Il a cependant été caractérisé par RMN.

Une étude réalisée avec la xylanase de *Hypsizigus marmoreus* et portant sur l'efficacité de transglycosylation avec l'alcool phénéthylique, l'alcool benzylique et l'alcool cinnamique ne donnait pas les mêmes résultats (Nishizawa et al. 2002). Pour cette xylanase, l'alcool cinnamique est le meilleur accepteur, et l'alcool benzylique est un moins bon accepteur que les deux autres alcools. Nos résultats montrent clairement que l'alcool benzylique est un bon accepteur pour la xylanase commerciale comparé aux autres alcools. Ces deux xylanases appartiennent à la famille des GH10, dont les topologies des sites actifs ne sont pas conservées, contrairement à leurs structures tridimensionnelles (Charnock et al. 1998). Le nombre de sous-sites ainsi que leur nature peuvent expliquer les différences dans la prise en charge des accepteurs.

Les rendements obtenus pour l'alcool benzylique sont largement supérieurs à ceux de la littérature (Kadi et al. 2002). Une réaction de 10 mL avec 0,5% (p/v), 9 mL d'alcool benzylique soit 8,6 M, 3200 UI/mL de xylanase incubés pendant 3 h a conduit à 0,49 et 0,20 mg/mL de benzyl xyloside et benzyl xylobioside, respectivement (Tableau 34). Dans la thèse de Marjorie

Ochs (Ochs 2012), une réaction de 100 mL avec de l'alcool benzylique avec 5% (p/v) de xylanes de bouleau, 5% (v/v) d'alcool benzylique soit 0,5 M, 20 UI/mL d'une xylanase commerciale (équivalente à NS 22083) pendant 5 h a été réalisée (Tableau 34). Les rendements obtenus sont de 49 mg/g de xylanes pour DP1 et 108 mg/g de DP2 ou 2,5 et 5,4 mg/mL de DP1 et DP2, respectivement. La conversion des xylanes est plus efficace car la teneur en xylanes est plus faible. Dans notre synthèse, les rendements sont de 5,3 mg/g de xylanes pour les deux produits. La synthèse est donc améliorée et l'augmentation de la dose d'enzyme (50 UI/mL) a permis d'augmenter l'hydrolyse secondaire et le ratio DP1/DP2.

Tableau 34. Les rendements obtenus pour la synthèse de benzyl xyloside DP1 et xylobioside DP2 catalysée par des xylanases.

Conditions	DP1	DP2
10% (p/v) xylanes, 50 UI/mL de xylanase, 0,5 M alcool	5,3 mg/mL	5,3 mg/mL
	52,7 mg/g de xylanes	53,4 mg/g de xylanes
0,5% (p/v), 9 mL d'alcool benzylique soit 8,6 M, 3200 UI/mL de xylanase (Kadi et al. 2002)	0,49 mg/mL	0,20 mg/mL
5% (p/v) de xylanes de bouleau, 5% (v/v) d'alcool benzylique soit 0,5 M, 20 UI/mL de xylanase (Ochs 2012)	2,5 mg/mL	5,4 mg/mL
	49 mg/g de xylanes	108 mg/g xylanes

Le temps d'incubation conditionne le ratio DP1/DP2, comme précédemment démontré lors de la synthèse des propargyl oligoxylosides (Chapitre 4 § II.1.1.) et dans la littérature (Matsumura et al. 1997, Mamo et al. 2010, Ochs et al. 2011). En effet, ce ratio DP1/DP2 est de 0,2 pour une 1 h de réaction et de 3 pour 4 h de réaction avec l'alcool cinnamique. La nature de l'accepteur influence également ce ratio. Pour le même volume et le même temps de réaction (4 h, 100 mL), le ratio DP1/DP2 avec l'alcool benzylique est d'environ 1 alors qu'il est de 3 pour l'alcool cinnamique. L'augmentation de ce ratio DP1/DP2 peut indiquer que l'hydrolyse secondaire du xylobioside pour cette partie aglycone est plus importante, et qu'il se positionne facilement dans le site actif.

b) Synthèse et purification avec les accepteurs possédant une fonction phénol

Le 2,6-dihydroxynaphtalène a été mis dans cette catégorie car il possède deux fonctions phénol équivalentes.

La synthèse avec le phénol et le 2,6-dihydroxynaphtalène est très faible (Figure 90) et a nécessité des modifications des conditions de réaction afin d'obtenir une quantité suffisante des produits.

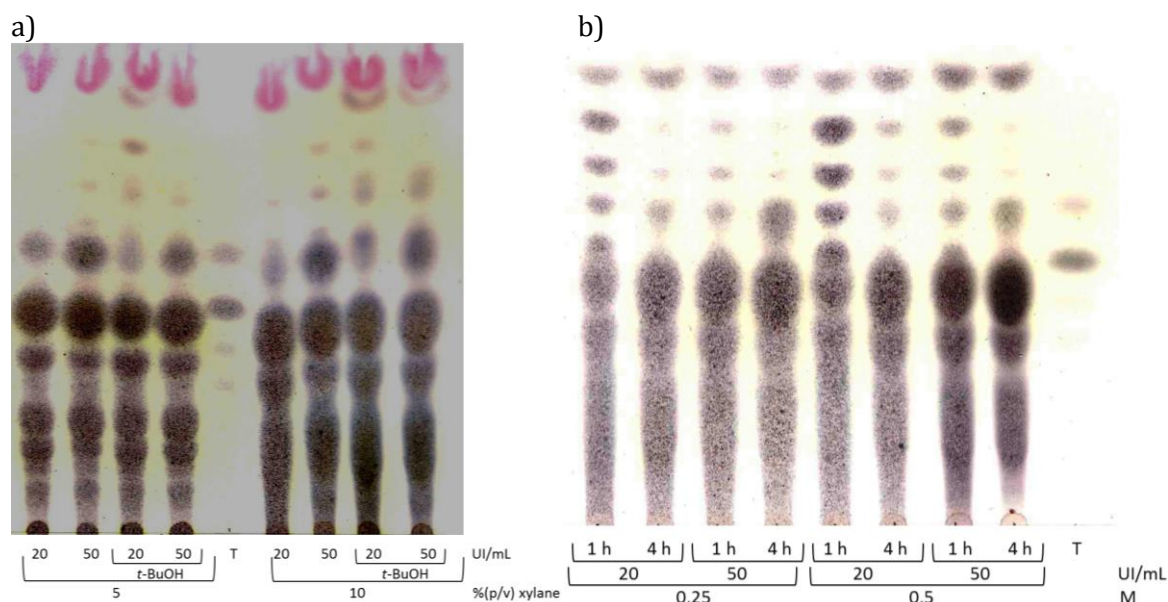


Figure 90. Réaction de transglycosylation. a) Synthèse avec 0,5 M de 2,6-dihydroxynaphtalène pendant 1 h avec la modification des paramètres de réaction comme la dose de xylanase et la teneur en xylenes de hêtre mais aussi l'ajout ou non de *tert*-BuOH, b) Synthèse avec le phénol avec 10% (p/v) de xylenes de hêtre et des modifications des paramètres de réaction comme le temps d'incubation, la concentration en alcool et la dose de xylanase. Eluant BuOH : AcOH : H₂O 2:1:1.

Le 2,6-dihydroxynaphtalène est une poudre et sa solubilité dans l'eau est très faible. L'ajout de 20% (v/v) de *tert*-BuOH, la modification de la teneur en xylenes ainsi que la diminution de la dose d'enzyme ont été testés (Figure 90, a). Les conditions retenues sont 10% (v/v) de xylenes, 0,5 M d'alcool, 20 UI/mL de xylanase et 20% (v/v) de *tert*-BuOH pendant 1 h ou 4 h. Les rendements sont présentés dans le Tableau 35. Lors des purifications des xylosides obtenus, le 2,6-dihydroxynaphtalène en excès a pu être récupéré. Dans la réaction, environ 8 g de cet accepteur avait été ajoutés et 7,4 g ont été isolés lors de la purification, ce qui montre que cet accepteur est très peu transféré sur la partie glycone. La faible solubilité du 2,6-dihydroxynaphtalène dans le milieu réactionnel aqueux, favorable à l'activité de la xylanase, limite la probabilité de contact entre l'accepteur et l'enzyme et peut expliquer ce résultat.

Les conditions réactionnelles en présence de phénol ont été optimisées en modifiant certains paramètres comme la dose d'alcool, le temps de réaction et la dose d'enzyme (Figure 90, b). Les conditions retenues sont 10% (v/v) de xylenes, 0,5 M d'alcool, 20 UI/mL de xylanase pendant 1 h ou 4 h. Les rendements obtenus, présentés dans le Tableau 35, restent faibles (1,1 à 2,3 mg/mL de xylosides). Le phénol n'est pas donc pas un bon accepteur.

Tableau 35. Rendements des xylosides purifiés obtenus

	Conditions (tps, volume)	DP1		DP2	
		mg/g de xylanes	mg/mL	mg/g de xylanes	mg/mL
Phénol	1 h, 50 mL	4,9	0,5	17,8	1,8
	4 h, 100 mL	16,7	1,1	—	—
2,6-dihydroxynaphtalène	4 h, 100 mL	5,5	0,5	—	—
	1 h, 100 mL	0,9	0,1	15,0	1,5

Conditions : 2,6-dihydroxynaphtalène : 10% (v/v) de xylanes, 0,5 M d'alcool, 20 UI/mL de xylanase et 20% (v/v) de *tert*-BuOH, phénol : 10% (v/v) de xylanes, 0,5 M d'alcool, 20 UI/mL de xylanase.

c) Synthèse et purification avec les accepteurs avec une fonction alcool primaire et une fonction phénol

Les synthèses avec ces accepteurs sont efficaces dans les conditions testées : 10% (p/v) xylanes, 0,5 M d'alcool, 50 UI/mL de xylanase. Les produits de transglycosylation obtenus sont des xylosides et des xylobiosides qui sont liés à la fonction alcool primaire. En CCM, des « spots » peu intenses sont visibles avec un R_f légèrement inférieur à ces produits et pourraient correspondre à des xylosides liés par la fonction phénol.

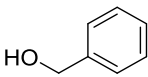
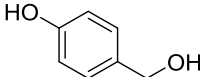
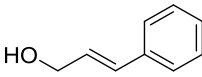
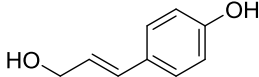
Tableau 36. Rendements en xylosides purifiés obtenus

	Conditions (tps, volume)	DP1		DP2	
		mg/g de xylanes	mg/mL	mg/g de xylanes	mg/mL
Alcool <i>p</i>-coumarique	4 h, 25 mL	23,0	5,3	100,3	10,3
Alcool 4-hydroxybenzylique	2 h, 50 mL	127,5	12,8	80,2	8,0
Alcool vanillique	4 h, 50 mL	38,9	3,9	—	—

Conditions : 10% (p/v) xylanes, 50 UI/mL de xylanase, 0,5 M alcool à 50°C sous agitation.

Si l'on compare l'alcool *p*-coumarique avec l'alcool cinnamique mais également l'alcool 4-hydroxybenzylique avec l'alcool benzylique, les réactions de transglycosylation sont plus efficaces avec les accepteurs comportant un deuxième groupement hydroxyle n'intervenant pas dans la réaction de transglycosylation (Tableau 37). Ces différences peuvent s'expliquer par une meilleure solubilité dans l'eau de ces accepteurs ou à une meilleure orientation dans le site actif grâce à la présence du deuxième groupement hydroxyle.

Tableau 37. Différences entre les accepteurs alcools et leurs analogues *para*-hydroxylés

Structures de l'accepteur	 Alcool benzylique		 Alcool 4-hydroxybenzylique	
Rendement en mg/g de xylanes	DP1 = 52,7	DP2 = 53,4	DP1 = 127,5	DP2 = 80,2
Structures de l'accepteur	 Alcool cinnamique		 Alcool <i>p</i> -coumarique	
Rendement en mg/g de xylanes	DP1 = 15,1	DP2 = 70,3	DP1 = 23,0	DP2 = 100,3

Conditions : 10% (p/v) xylanes, 50 UI/mL de xylanase, 0,5 M alcool à 50°C sous agitation.

d) Synthèse et purification avec les accepteurs avec deux fonctions phénol

Les conditions utilisées sont 10% (v/v) de xylanes, 0,5 M d'alcool, 20 UI/mL de xylanase pendant 4 h à 100 mL. Ces accepteurs comportant des fonctions phénol sont solubles dans l'eau et permettent d'obtenir de bons rendements (Tableau 38).

Tableau 38. Rendements des xylosides purifiés obtenus

	Conditions (tps, volume)	DP1		DP2	
		mg/g de xylanes	mg/mL	mg/g de xylanes	mg/mL
Catéchol	4 h, 100 mL	46,0	4,6	—	—
Résorcinol	4 h, 100 mL	12,5	1,2	27,0	2,7

Conditions : 10% (p/v) xylanes, 20 UI/mL de xylanase, 0,5 M alcool à 50°C sous agitation.

Contrairement au phénol, les rendements avec les polyphénols sont corrects. Le xylobioside dérivé du catéchol n'a pas été isolé lors de la purification mais le rendement pour le DP1 correspondant est de 46,0 mg/g de xylanes. Pour le résorcinol, 39,5 mg de xylosides/g de xylanes ont été obtenus, alors que pour le phénol, 22,7 mg/g de xylanes ont été obtenus. L'étude de la xylanase de *Hypsizigus marmoreus* a également montré que si avec le phénol la transglycosylation n'avait pas lieu, l'efficacité de transglycosylation des polyphénols est d'environ 14% (Nishizawa et al. 2002). Dans le cas d'une xylanase de la famille GH11, les polyphénols sont les seuls accepteurs qui fonctionnent correctement, probablement grâce à une meilleure orientation dans le site actif due à la présence du deuxième groupement hydroxyle (Chiku et al. 2008).

Tous les accepteurs testés permettent une synthèse de xylosides et de xylobiosides, mais selon la structure de l'accepteur, les rendements sont plus ou moins importants. Lorsque les accepteurs comportent une fonction alcool primaire, 50 UI/mL de xylanase sont utilisées et les rendements varient de 38,9 jusqu'à 124,4 mg de xylosides/g de xylanes. Pour les accepteurs possédant une fonction phénol, 20 UI/mL de xylanes sont utilisées et les rendements sont faibles (22,7 mg de xylosides/g de xylanes au maximum). Lorsqu'un accepteur possède deux fonctions phénols (catéchol et résorcinol), 20 UI/mL de xylanes sont utilisées et les rendements sont plus élevés (39,5 et 46,0 mg de xylosides/g de xylanes), montrant l'importance d'un deuxième groupement hydroxyle. La nature de l'accepteur a également une influence sur le ratio DP1/DP2, l'hydrolyse secondaire est donc affectée par la nature des aglycones.

La xylanase NS22083 présente une préférence pour catalyser une réaction de transglycosylation avec les alcools possédant une fonction alcool primaire comparé aux phénols. Cette observation a été confirmée lors de la synthèse avec l'alcool 4-hydroxybenzylique et l'alcool *p*-coumarique avec l'obtention de produits de transglycosylation sur la fonction primaire largement majoritaire.

L'ensemble de ces produits a été caractérisé et évalué pour leur capacité à initier la biosynthèse de GAGs.

II.3. Evaluation biologique

L'ensemble des tests biologiques a été effectué au sein de l'équipe MEDyC « Matrice Extracellulaire et Dynamique Cellulaire » à la Faculté de Médecine de Reims, par Aurore Chatron-Colliet, ingénieure de recherche recrutée dans le cadre du projet XYLOCOS.

Les cellules CHO pgsA-745 sont des cellules ovariennes de hamster qui sont déficientes en xylosyltransférase I (Esko et al. 1987). Cette transférase initie naturellement la synthèse de PGs par l'ajout d'un résidu xylopyranosyle sur un résidu sérine de la protéine « cœur ». Ces cellules étant déficientes en cette enzyme, elles ne peuvent donc pas amorcer une synthèse de GAGs endogènes.

En revanche, le reste de l'arsenal enzymatique est présent et notamment la galactosyltransférase I (β 4GalT7) qui, en présence de xylosides, permet une synthèse exogène des GAGs. Cette souche cellulaire est utilisée couramment comme modèle car elle permet de visualiser facilement l'effet d'un xyloside sur l'amorçage de la biosynthèse des GAGs.

II.3.1. Cytotoxicité

Avant de cribler la capacité des xylosides à amorcer la synthèse de GAGs, il est nécessaire de s'assurer que ces derniers n'ont pas d'effet cytotoxique sur les cellules et n'induisent pas une mortalité cellulaire.

La cytotoxicité des xylosides est déterminée à l'aide du test MTT qui est un test colorimétrique qui permet de quantifier l'activité mitochondriale. Ce test est basé sur le clivage d'un sel de tétrazolium (MTT) par la succinate déshydrogénase mitochondriale en formazan qui forme un précipité violet dans la mitochondrie (Figure 91). La quantité de précipité formé est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes. La quantification de formazan produit par une lecture de DO à 560 nm permet de connaître la quantité relative de cellules vivantes et actives métaboliquement. Lors des tests de cytotoxicité, les xylosides sont ajoutés à 100 μ M de concentration finale dans une culture de CHO pgsA-745 pendant 72 h.

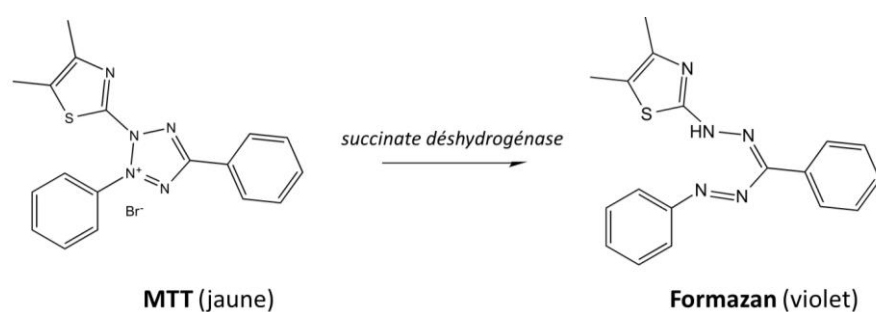


Figure 91. Le principe du test MTT

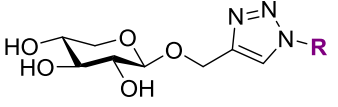
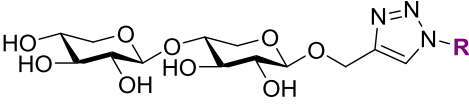
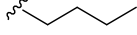
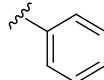
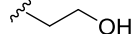
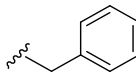
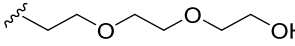
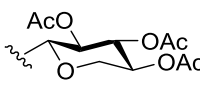
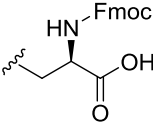
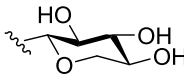
Comme ce test permet de connaître la quantité relative de cellules vivantes d'après une lecture de DO à 560 nm, des contrôles négatifs et positifs sont nécessaires. Le contrôle négatif est une culture sans ajout de xylosides, alors que les contrôles négatifs sont réalisés par un ajout d'une concentration de 2,5 et 10 μ M de doxorubicine. La doxorubicine est une molécule connue pour avoir un effet cytotoxique sur les cellules. Les résultats sont présentés sous forme de ratio selon la DO obtenue pour le contrôle négatif (conditions normales de croissance).

Sur les Figure 92 et Figure 93, le contrôle négatif est égal à 1 alors que les ratios des contrôles positifs sont à environ 0,6 et 0,3 selon la concentration en doxorubicine. Ainsi, de faibles ratios impliquent que les molécules sont cytotoxiques. Tous les xylosides ne sont pas totalement solubles dans l'eau lors de la préparation des solutions mères à 10 mM. Dans certains cas du DMSO a dû être ajouté, ce qui correspond à une concentration finale de 0,1% de DMSO lors des essais à 100 μ M. Nous avons vérifié que le DMSO ne présente pas d'effet cytotoxique en le testant à 0,1% (résultats non montrés).

a) Cytotoxicité des « click » xylosides

L'analyse des résultats présentés sur la Figure 92 montre qu'aucun des « click » xylosides (Tableau 39) n'est cytotoxique à 100 μ M de concentration finale sur les cellules CHO pgsA-745. Pour les composés **3e** et **4e**, les ratios sont légèrement inférieurs à tous les autres xylosides testés, cependant une observation microscopique des cellules montre que la morphologie et le nombre de cellules ne sont pas modifiés. Ils ne sont donc pas cytotoxiques.

Tableau 39. Rappel des groupements aglycones composant les « click » xylosides

 3  4	
R	R
3a  4a	3e  4e
3b  4b	3f  4f
3c  4c	3g  4g
3d  4d	3h  4h

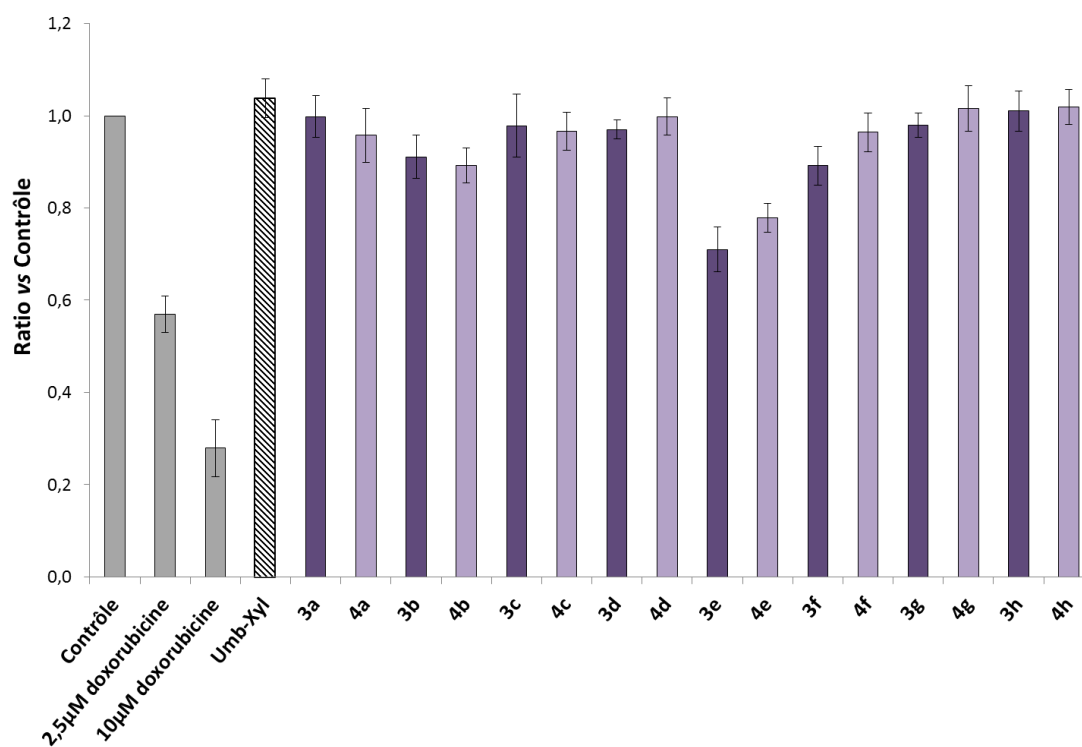
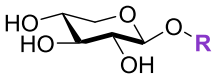
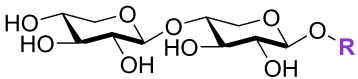
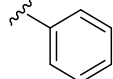
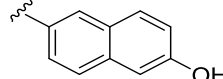
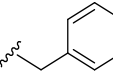
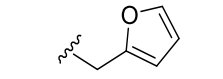
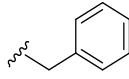
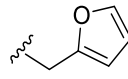
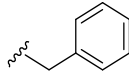
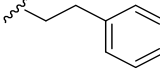
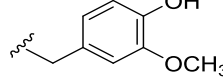
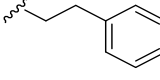
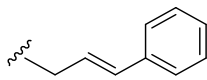
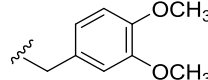
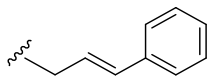
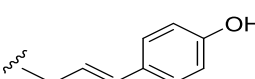
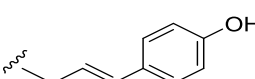


Figure 92. Résultats du test MTT en présence des « click » xylosides et xylobiosides

b) Cytotoxicité des aryl xylosides

Le Tableau 40 récapitule les noms donnés aux aryl xylosides pour la compréhension lors des évaluations biologiques.

Tableau 40. Noms donnés aux différents xylosides et xylobiosides avec des aglycones aromatiques.

 X  X2	
R	R
PX 	HX 
PX2 	HX2 
BZX 	FX 
BZX2 	
PTX 	VAX 
PTX2 	
CX 	VEX 
CX2 	
COX 	
COX2 	

La Figure 93 montre le test MTT pour les xylosides et xylobiosides comportant une partie aglycone aromatique. Aucun des composés synthétisés n'est cytotoxique.

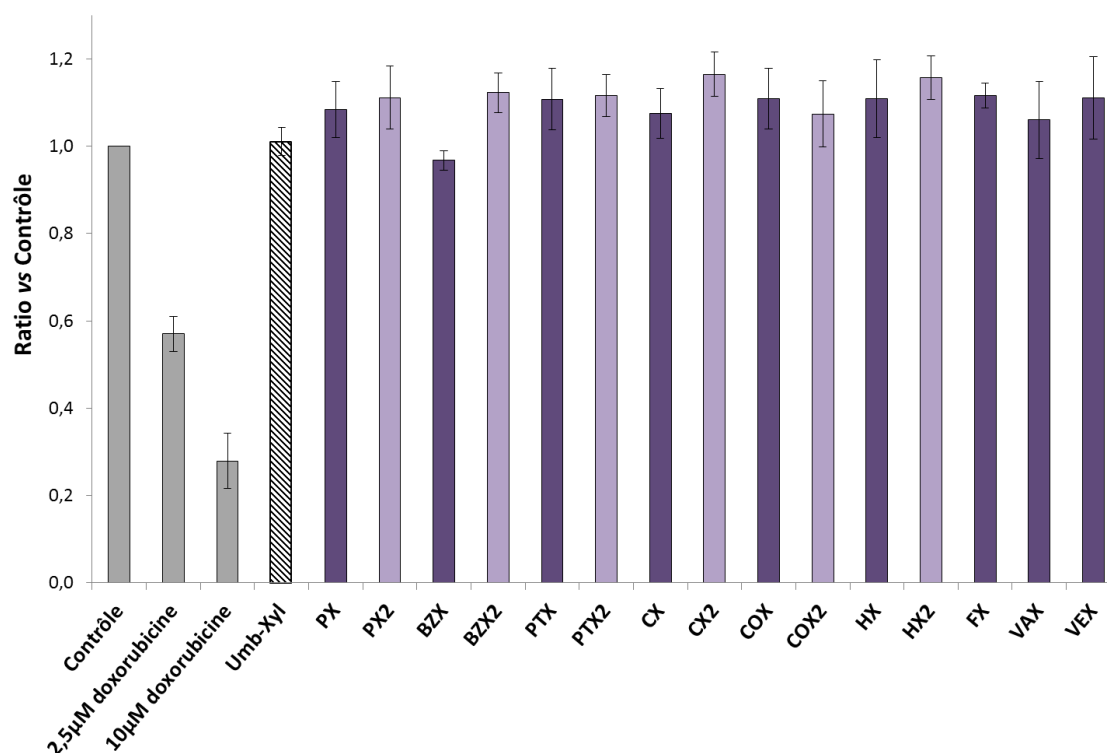


Figure 93. Résultats du test MTT en présence des aryl xylosides et xylobiosides.

II.3.2. Criblage des xylosides et xylobiosides

Les GAGs sont des molécules qui sont partiellement sulfatées sur les groupements hydroxyyles du disaccharide répétitif lors de leur maturation. Cette propriété est utilisée pour faire un marquage radioactif et ainsi permettre leur quantification.

Lors de la culture cellulaire des cellules CHO pgsA-745, les xylosides ont été introduits avec un milieu contenant du sulfate radioactif $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ pendant 24 h. Au cours de la biosynthèse amorcée par les xylosides, les GAGs vont incorporer dans leurs chaînes du soufre radioactif (^{35}S). Après élimination du ^{35}S en excès, la quantité de ^{35}S incorporé dans les GAGs produits est quantifiée à l'aide d'un compteur à scintillation.

Les GAGs sont des macromolécules qui sont présentes dans la MEC principalement. Ils sont produits dans la cellule, précisément dans l'appareil de Golgi, puis excrétés dans le milieu extracellulaire. Dans notre cas, ce milieu extracellulaire, est notre milieu de culture. Par conséquent, les résultats présentés correspondent à une quantification des GAGs présents dans le milieu de culture. Néanmoins, une quantification des GAGs du milieu intracellulaire a aussi été réalisée. Le taux de radioactivité à l'intérieur des cellules est inférieur d'un facteur 1000 à celui du milieu extracellulaire et n'a pas été pris en compte.

Pour discriminer le ^{35}S incorporé dans les GAGs et le ^{35}S résiduel (non incorporé) dans le milieu de culture, les GAGs sont précipités sur papier Whatman® 3 MM avec un sel d'ammonium quaternaire (Rapraeger and Bernfield 1985). Les GAGs précipités sont ensuite quantifiés.

Lors des différentes manipulations, le 4-méthylumbelliféryl- β -D-xylopyranoside (Umb-Xyl) a été utilisé comme contrôle positif car il est connu pour induire efficacement la synthèse exogène des GAGs (Okayama et al. 1973, Lugemwa and Esko 1991, Lugemwa et al. 1996) (Figure 94).

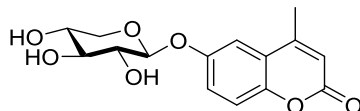


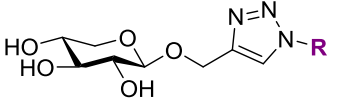
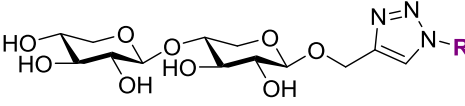
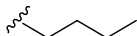
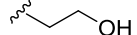
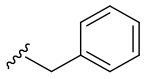
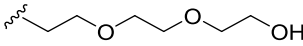
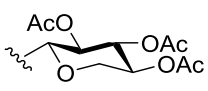
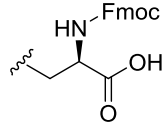
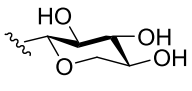
Figure 94. 4-méthylumbelliféryl- β -D-xylopyranoside (Umb-Xyl)

Lors des différents essais, et pour éviter les biais de la variabilité expérimentale, les résultats sont présentés selon l'incorporation relative de ^{35}S par les GAGs synthétisés à partir des xylosides, en comparaison des GAGs amorcés par le témoin Umb-Xyl. L'incorporation de ^{35}S pour le Umb-Xyl est définie à 100% ce qui permet de faire une comparaison entre les différents xylosides sans variabilité expérimentale.

a) « Click » xylosides

Les résultats de la synthèse de GAGs par les « click » xylosides sont présentés au niveau de la Figure 95. Le Tableau 41 présente un rappel des numéros attribués aux molécules.

Tableau 41. Rappel des groupements aglycones composant les « click » xylosides

 3		 4	
R		R	
3a		3e	
4a		4e	
3b		3f	
4b		4f	
3c		3g	
4c		4g	
3d		3h	
4d		4h	

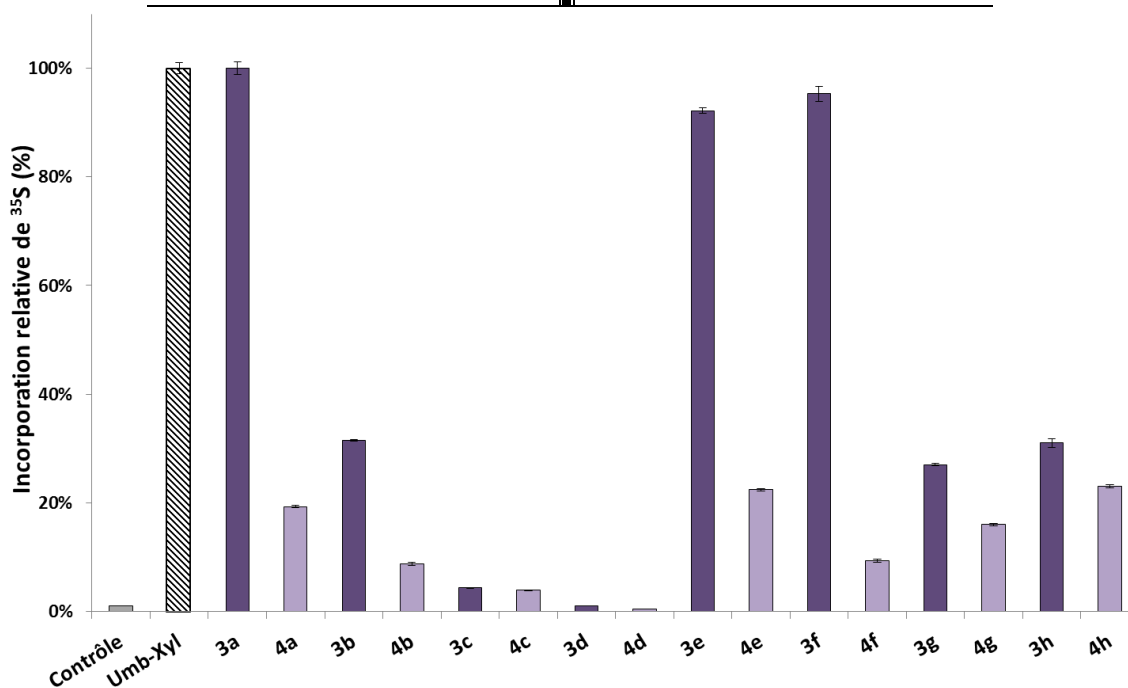


Figure 95. Amorçage de la biosynthèse de GAGs par les « click » xylosides et xylobiosides à 100 μ M dans le milieu de culture des cellules CHO pgsA-745.

Le contrôle correspond à la culture cellulaire sans xyloside. Comme attendu, les cellules CHO pgsA-745 déficientes en xylosyltransférase ne synthétisent pas de GAGs, alors que l'ajout dans le milieu de 100 μ M d'Umb-Xyl restaure une synthèse exogène importante. A l'exception des composés **3d** et **4d** pour lesquels les résultats sont comparables au contrôle, tous les autres xylosides **3** et xylobiosides **4** permettent un amorçage de la synthèse des GAGs à 100 μ M de concentration finale.

Avec une partie aglycone identique, les xylobiosides **4** sont toujours de moins bons initiateurs de la synthèse des GAGs que leurs équivalents xylosides **3**. L'effet de la partie glycone est donc important. Dans la littérature, Sarkar *et al.* insistent sur l'importance du nombre de groupements hydroxyles lors de la pénétration d'un glycoside dans la membrane plasmique (Sarkar et al. 1995). La Figure 96 présente une étude sur la pénétration de glycosides dans les cellules CHO et montre que le nombre de groupements hydroxyles influe sur la pénétration dans les cellules. Le xyloside (●) comportant trois groupements hydroxyles pénètre plus facilement que le galactoside (■) qui en comporte quatre. Les disaccharides comportant six groupements hydroxyles (Δ , $\blacktriangle$) ne peuvent pas pénétrer efficacement dans les cellules (Sarkar et al. 1995). Les auteurs ont ensuite acétylé certaines positions sur les disaccharides et ont pu observer que la présence de plus de cinq groupements hydroxyles libres limite fortement la pénétration d'un disaccharide dans la cellule. Les xylobiosides de notre étude comportent cinq groupements hydroxyles. Une première explication de leur efficacité moindre par rapport à leurs équivalents xylosides serait donc leur moindre pénétration dans la cellule.

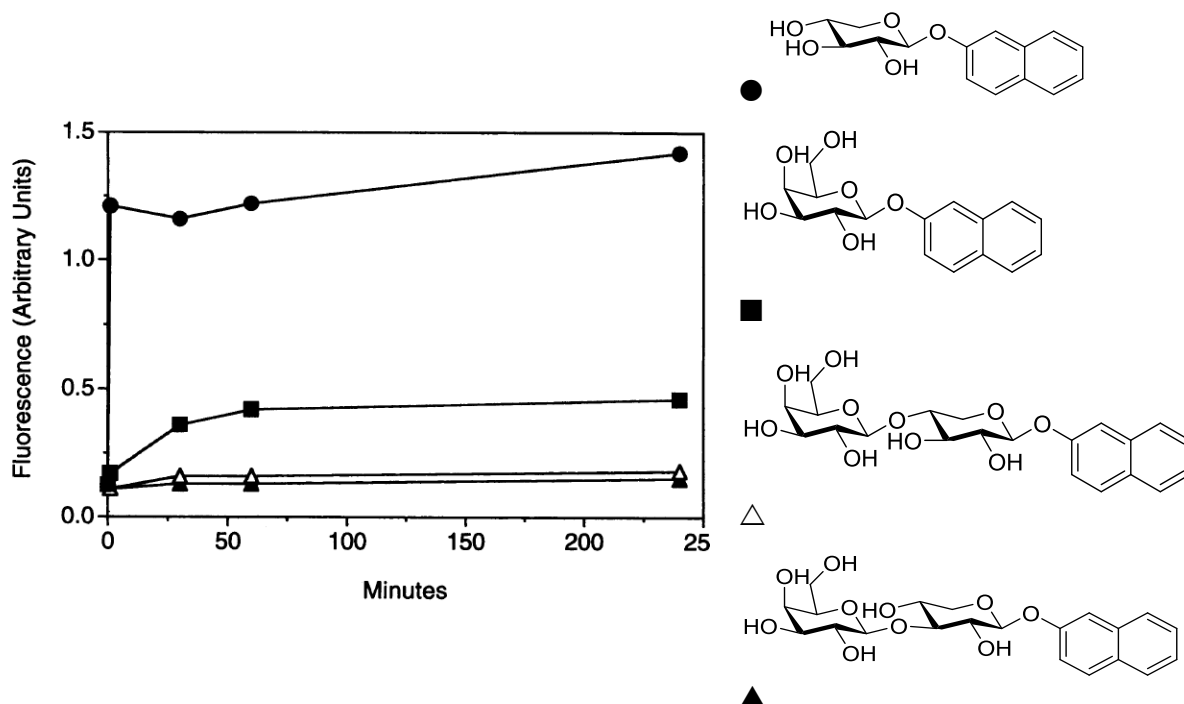


Figure 96. Pénétration de glycosides dans les cellules CHO à 100 μ M par suivi de fluorescence (Sarkar et al. 1995).

Selon la partie aglycone, le ratio d'incorporation de ^{35}S dans la structure des GAGs entre les xylosides et leurs équivalents xylobiosides varie. Alors que le xylobioside **4f** est 10 fois moins efficace que le xyloside correspondant **3f**, le facteur de baisse d'efficacité de **4h** par rapport à **3h** est seulement de 1,4. La partie aglycone a donc également une influence sur la synthèse des GAGs amorcée par les xylobiosides. Lorsque les groupements introduits sur l'hétérocycle triazole sont apolaires, le ratio est plus important entre **3** et **4** : **3a-4a** (5 fois moins efficace), **3e-4e** (4 fois moins efficace) et **3f-4f** (10 fois moins efficace), alors que le ratio pour les composés avec des groupements polaires comme **3b-4b** ou encore **3c-4c** est moins important (3 à 1,3 fois moins efficace).

Il n'y a quasiment pas de différence sur l'initiation de la synthèse de GAGs entre **3g** (27%) et **4g** (31%). Tran *et al.* ont synthétisé des clusters comportant plusieurs xylosides sur la même « plate-forme » et ont mis en évidence le fait que deux chaînes de GAGs peuvent être synthétisées à partir d'un cluster (Figure 97) (Tran et al. 2013). Ils ont ensuite testé la différence entre les clusters avec des xylosides totalement acétylés ou non acétylés. Les résultats ont montré que la synthèse des GAGs est toujours plus efficace lors de l'utilisation des clusters avec des groupements hydroxyles protégés par des acétates, grâce à leur pénétration plus efficace à travers la membrane plasmique. Les acétates sont clivés par des estérases intracellulaires et les xylosides sont donc sous forme déprotégée lors de la galactosylation (Sarkar et al. 1995).

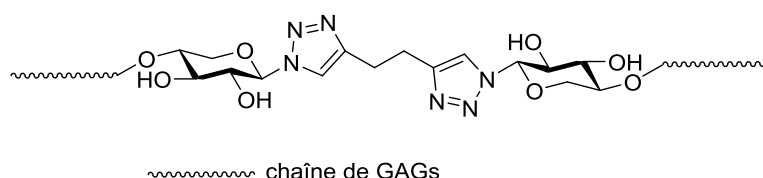


Figure 97. Un exemple de clusters de xylosides de Tran *et al.* (Tran et al. 2013)

Au sein des cellules, les deux xylosides **3g** et **3h** doivent avoir la même structure grâce à la déprotection des acétates par des estérases, donc avoir la même affinité pour la $\beta 4\text{GalT7}$ (Sarkar et al. 1995). L'acétylation d'un xylose aurait dû améliorer la pénétration de **3g** dans les cellules et donc permettre une synthèse de GAG plus efficace que pour **3h**, or il n'y a pas de différence entre le xyloside protégé ou non : **3g** et **3h**. Pour leurs équivalents xylobiosides (**4g** et **4h**), nous retrouvons la même tendance. La différence dans notre cas est que les xylosides ne sont pas totalement protégés, le résidu xylose de la partie glycone qui est lui sous forme déprotégé peut expliquer ce résultat.

Johnsson *et al.* ont également synthétisé des molécules comportant deux résidus xyloses, un 2,6-dihydroxynaphtalène mono- ou bis-xylosylé (Johnsson et al. 2007b) et comparé leur efficacité sur la synthèse des GAGs (Figure 98). L'élargissement de deux chaînes de GAGs se produit à partir de ces composés bis-xylosylés, qui sont en général, moins efficaces que les mono-

xylosylés. Cette efficacité diffère selon la position sur le motif aromatique des deux résidus xyloses. Il n'est donc pas exclu que **3g** et **3h** puissent permettre d'amorcer la synthèse de deux chaînes de GAGs, même si leur efficacité est faible.

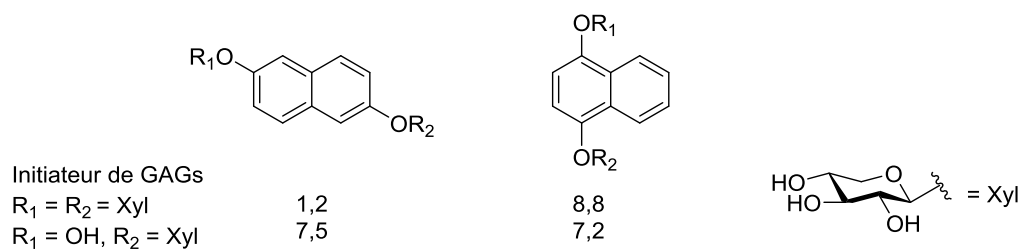


Figure 98. 2,6-dihydroxynaphtalène mono- ou bis-xylosylé (Johnsson et al. 2007b).

Les xylosides les plus efficaces sont les xylosides qui comportent des aglycones hydrophobes (**3a**, **3e**, **3f**) (90 à 100%). L'importance du caractère hydrophobe de la partie aglycone des xylosides pour amorcer efficacement la synthèse des GAGs a déjà été mise en évidence (Sarkar and Esko 1995, Kuberan et al. 2008).

Des études de dose-dépendance ont ensuite été réalisées sur les xylosides les plus efficaces (Figure 99). Les trois xylosides aussi efficaces que l'Umb-Xyl à 100 μM ont été testés à 10 μM (**3a**, **3e**, **3f**) (Figure 99, b) puis **3e** a été testé à 1 μM (Figure 99, c) afin de voir l'influence de la concentration sur l'initiation de la synthèse de GAGs par rapport à Umb-Xyl.

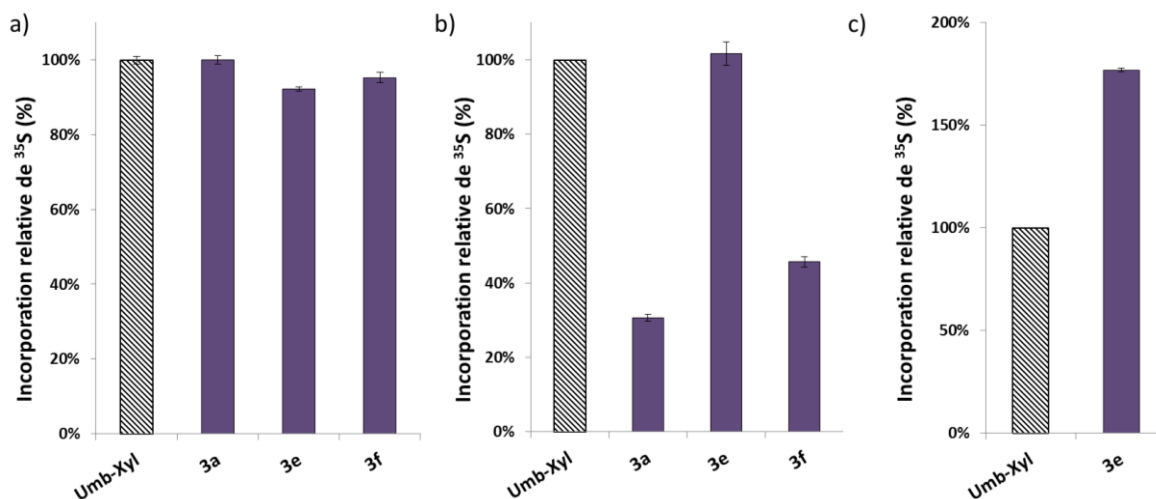


Figure 99. Dose-dépendance des xylosides à : a) 100 μM , b) 10 μM et c) 1 μM comparé à Umb-Xyl.

A 100 μM , les xylosides **3a**, **3e**, **3f** agissent avec la même efficacité sur la synthèse de GAGs que le témoin Umb-Xyl (Figure 99, a), alors qu'à 10 μM , seul **3e** agit aussi efficacement que Umb-Xyl. L'influence de la nature du substituant lié à l'hétérocycle triazole est important pour la capacité des xylosides à initier la synthèse de GAGs. Le substituant alkyle (**3a**) est un moins bon initiateur de la synthèse de GAGs que les substituants aromatiques. Le xyloside **3e** présente un

substituant phényle lié directement à l'hétérocycle triazole alors que le xyloside **3f** possède un substituant benzyle. Ils ne diffèrent que par la présence ou non d'un méthylène mais cette différence semble suffisante pour avoir un effet négatif sur la capacité à initier la synthèse de GAGs avec une diminution de 55% de l'incorporation de ^{35}S à 10 μM (Figure 99, b). La distance entre le xylose et l'aglycone est également connue pour être un facteur qui influence la capacité des xylosides à initier la synthèse de GAGs (Holmqvist et al. 2013). Cet effet sera vu plus en détails dans le § II.3.2 d).



Figure 100. Structures des xylosides **3e** et **3f**.

A 1 μM , **3e** est nettement plus efficace que l'Umb-Xyl avec 160% d'incorporation de ^{35}S . Sobue *et al.* avaient déjà mis en évidence que l'influence de la variation de l'aglycone sur l'amorçage de la synthèse de GAGs diminue avec l'augmentation de la concentration, en s'appuyant sur le fait que la diffusion passive est un facteur important de la synthèse des GAGs (Sobue et al. 1987).

D'après le criblage des « click » xylosides, le composé **3e** est donc le plus intéressant car à 1 μM , il permet une synthèse plus importante d'un facteur de 1,6 que Umb-Xyl.

Les deux principales propriétés qui permettent aux xylosides d'être initiateurs de la biosynthèse de GAGs sont :

- être capables de traverser la membrane plasmique par diffusion passive, puis traverser la membrane de l'appareil de Golgi (lieu où réside la $\beta 4\text{GalT7}$),
- être accepteurs de la galactosyltransférase I ($\beta 4\text{GalT7}$) afin d'amorcer la biosynthèse exogène des GAGs.

Cette étude a montré que les xylobiosides sont de moins bons initiateurs de la biosynthèse de GAGs que leurs équivalents xylosides. Ce résultat n'est donc pas dû à un effet de la partie aglycone mais à la partie glycone. La présence de deux résidus xylose (xylobiosides) au lieu d'un seul (xylosides) a un effet négatif.

Par des expériences complémentaires, nous avons voulu savoir si cet effet était dû à la pénétration dans la cellule qui se faisait moins efficacement pour les xylobiosides et/ou à une différence d'affinité de la $\beta 4\text{GalT7}$ pour les xylosides ou les xylobiosides.

b) « Click » xylosides vs « click » xylobiosides: impact du DP sur la pénétration dans la cellule et sur l'activité de la $\beta 4\text{GalT7}$

« Click-it inside »

Dans un premier temps, la pénétration des xylosides et xylobiosides dans les cellules a été évaluée. Les différents « click » xylosides **3** et **4** ne peuvent pas être marqués directement pour faire un suivi. Nous avons donc tiré parti des propargyl xyloside **1** et xylobioside **2** pour réaliser ce suivi car ils portent une fonction alcyne terminale qui peut être fonctionnalisée avec un azoture portant un marquage fluorescent. Dans un premier temps, il a fallu s'assurer de l'absence de cytotoxicité de ces produits et de leur capacité à amorcer la biosynthèse des GAGs. Les résultats sont présentés dans la Figure 101. Le propargyl xyloside (DP1, **1**) et le propargyl xylobioside (DP2, **2**) ne sont pas cytotoxiques (Figure 101, a), et initient bien une synthèse exogène de GAGs. La différence entre **1** et **2** au niveau de l'incorporation du ^{35}S est comparable aux résultats précédents (Figure 101, b).

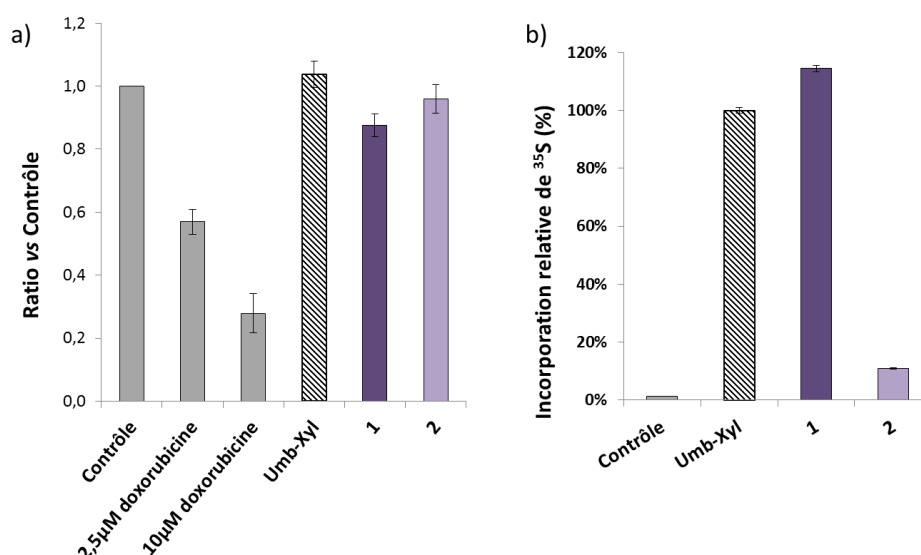


Figure 101. Evaluation biologique des propargyl xylosides : a) Tests MTT avec 100 μM de **1** et **2** et b) Amorçage de la biosynthèse de GAGs par les **1** et **2** à 100 μM dans le milieu de culture des cellules CHO pgsA-745.

La chimie « click » a ensuite été utilisée dans cette étude afin de marquer le xyloside **1** et le xylobioside **2** à l'aide de l'Alexa-488, un azoture commercial portant un groupement fluorescent (Figure 102). La réaction a lieu entre la fonction alcyne terminale de **1** et **2** et un azoture comportant un fluorophore (Alexa-488) en présence de Cu(I) (Figure 103).

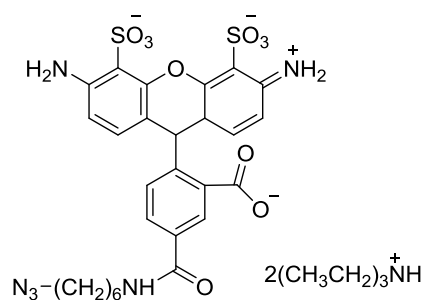


Figure 102. Le fluorophore : « Alexa Fluor® 488 azide »

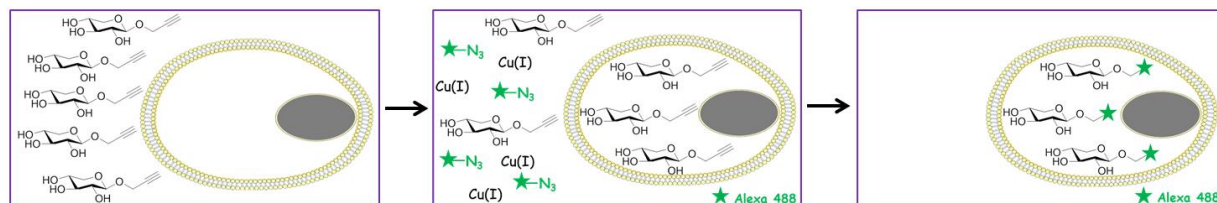


Figure 103. Principe de « click-it inside »

Une culture de cellules CHO pgsA-745 est réalisée sur lames puis les xylosides **1** ou les xylobiosides **2** sont ajoutés à une concentration finale de 100 μM . Après 1 h d'incubation, le milieu de culture est enlevé et les cellules sont lavées. Les cellules sont ensuite fixées avec du paraformaldéhyde. La fixation permet de figer tous les constituants du milieu intracellulaire ainsi que les xylosides présents. Les cellules sont ensuite perméabilisées afin que les réactifs utilisés (Alexa-488- N_3 et Cu(I)) puissent entrer dans les « cellules ». La réaction de « click » se produit et les xylosides sont maintenant marqués par fluorescence.

Par une observation des images d et g, la différence du marquage fluorescent est flagrante. La couleur verte est plus présente dans l'image d. La fusion des images permet de montrer la superposition des couleurs et donc de s'assurer que les xylosides marqués sont bien dans les cellules. Une analyse par le logiciel ImageJ (Figure 104, b) a permis de confirmer cette observation avec 30% d'intensité de fluorescence pour les cellules incubées avec le xyloside **1** et moins de 10% pour le xylobioside **2**.

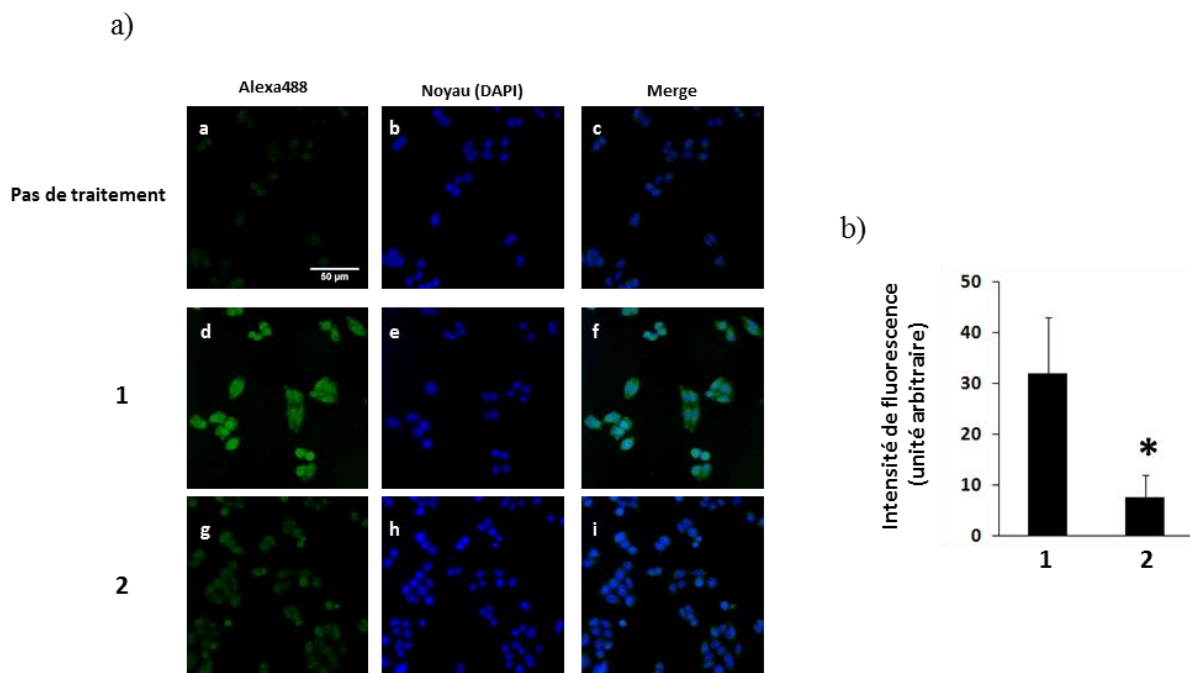


Figure 104. Entrée des propargyl xyloside **1** et xylobioside **2** dans les cellules, a) Observation microscopique (x 20) de cellules non traitées (a-c), de cellules traitées avec **1** (d-f) et avec **2** (g-i) ; b) Quantification de l'intensité de fluorescence avec le logiciel ImageJ. La quantification a été analysée par un test de Student et les résultats sont considérés comme significatif $p < 0,05$.

Après 1 h d'incubation, le xyloside **1** pénètre plus facilement dans les cellules que le xylobioside **2**. Nous pouvons conclure de cette étude que l'augmentation du DP de la partie glycone a une influence négative sur la pénétration dans les cellules. Par analogie, il est raisonnable de penser que les différences observées entre les xylosides **3** et xylobiosides **4** sur la capacité à amorcer la synthèse de GAGs pourraient être liées à la pénétration plus faible des xylobiosides au sein des cellules. Cette hypothèse est en accord avec les résultats de Sarkar *et al.* concernant la limitation de la pénétration dans les cellules de disaccharides (Sarkar and Esko 1995, Sarkar et al. 1995).

En revanche, cette étude ne donne aucune information sur le transport différentiel des xylosides ou des xylobiosides dans l'appareil de Golgi où réside la $\beta 4\text{GalT7}$. Contrairement au transport au travers de la membrane plasmique qui se fait par diffusion passive, l'entrée dans l'appareil de Golgi s'effectue par un transport vésiculaire (Fernandez and Warren 1998). Cependant, nous pouvons émettre l'hypothèse que si les xylobiosides sont en quantité moindre dans le cytosol, alors ils le seront également dans l'appareil de Golgi, le transport vésiculaire s'effectuant du cytosol vers l'appareil de Golgi.

Affinité de la $\beta 4\text{GalT7}$ pour les xylosides et les xylobiosides

Afin d'évaluer si la partie glycone des xylosides impacte l'efficacité de la $\beta 4\text{GalT7}$, les paramètres cinétiques de cette enzyme ont été déterminés en présence des molécules **3e** et **4e**, ainsi que de l'Umb-Xyl. La $\beta 4\text{GalT7}$ est une enzyme clé lors du processus de synthèse exogène

des GAGs initiée par les xylosides. Elle permet la galactosylation du xyloside en présence d'un UDP-Gal (Figure 105).

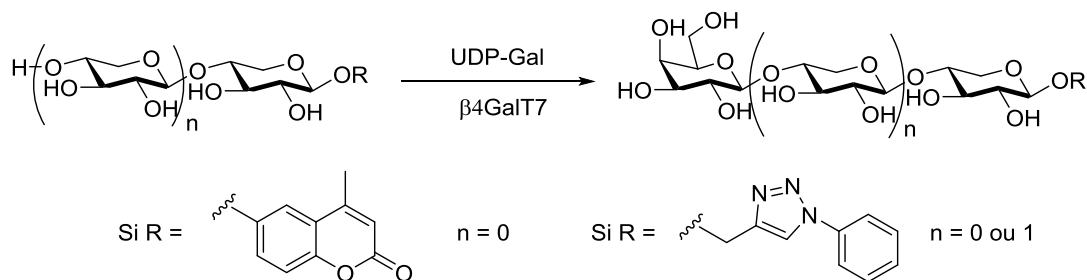


Figure 105. Réaction catalysée par la $\beta 4\text{GalT7}$

Cette étude a été réalisée sur le « click » xyloside le plus intéressant d'après les études précédentes sur l'activation de la biosynthèse des GAGs **3e** et l'équivalent xylobioside **4e** (Figure 106). Lors de l'étude sur l'activation de la biosynthèse des GAGs, **3e** est 4 fois plus efficace que **4e** et 1,6 fois plus efficace que Umb-Xyl à une concentration de 1 μM .

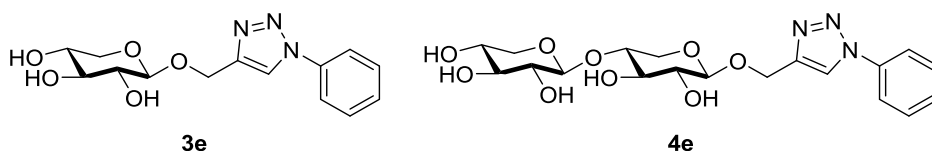


Figure 106. Les xyloside et xylobioside utilisés pour cette étude.

Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de S. Fournel-Gigleux « MolCelTEG » à l'Université de Nancy, les paramètres cinétiques de la $\beta 4\text{GalT7}$ en présence du xyloside **3e** et de l'équivalent xylobioside **4e** ont été déterminés et comparés avec ceux de l'Umb-Xyl. Ces tests ont été réalisés sur une $\beta 4\text{GalT7}$ recombinante produite et purifiée au sein de leur laboratoire. Les cinétiques ont été effectuées à 37°C pendant 30 min en présence de $\beta 4\text{GalT7}$, d'UDP-Gal et de 0 à 5 mM de xylosides **3e** ou **4e**. Des gammes étalons ont été réalisées avec les xylosides et la formation du produit de réaction a été suivie par UV à une longueur d'onde de détection de 320 nm pour Umb-Xyl et 250 nm pour les composés **3e** et **4e**.

Les paramètres cinétiques sont présentés dans le Tableau 42. Les valeurs de K_M de la $\beta 4\text{GalT7}$ pour **3e** sont équivalentes à celle de Umb-Xyl, mais le k_{cat} est légèrement supérieur ce qui conduit à une augmentation de 17% de l'efficacité catalytique (k_{cat}/K_M) comparé à Umb-Xyl. C'est un résultat intéressant sachant que Umb-Xyl est connu comme un des meilleurs substrats pour cette enzyme. Concernant, l'équivalent xylobioside **4e**, le K_M est 3 fois plus grand que **3e**, ce qui signifie que l'affinité pour ce substrat est nettement inférieure. L'efficacité catalytique pour **4e** est 4 fois moins importante que pour **3e**.

Tableau 42. Paramètres cinétiques de la β 4GalT7 recombinante avec les composés : **3e**, **4e** et Umb-Xyl.

	K_M mM	k_{cat} min ⁻¹	k_{cat}/K_M min ⁻¹ .mM ⁻¹
Umb-Xyl	0,44 ± 0,05	103,46 ± 10,52	237,44
3e	0,45 ± 0,18	129,79 ± 20,08	285,77
4e	1,56 ± 0,25	112,27 ± 9,60	72,01

Le xyloside **3e** et le xylobioside **4e** sont tous deux des substrats de la β 4GalT7 mais celle-ci a une affinité plus importante pour le xyloside. Tsutsui *et al.* ont cristallisé la β 4GalT7 de drosophile avec un xylobiose dans le site actif (Tsutsui et al. 2013). Ces travaux ont montré que le xylose de l'extrémité non-réductrice joue le rôle de l'accepteur et se fixe dans le site actif par le biais d'interactions hydrophobes. La Figure 107 montre le site actif d'une β 4GalT7 mutée (D211N) en présence d'un naphthyl xyloside (Siegbahn et al. 2015). Le résidu xylose est entouré par la poche catalytique tandis que l'aglycone s'étend à partir du site de liaison jusqu'à l'extérieur du site actif de l'enzyme constitué principalement de résidus aromatiques. Le xylose crée des liaisons hydrogènes avec les résidus du site actif (D212, L209, N211) et une interaction CH- π entre H5 et le noyau aromatique de Y177, alors que la partie naphthyle adopte une interaction de stacking avec Y179. L'environnement hydrophobe (Y177, Y179) dans le site actif suggère que les interactions de stacking sont un mode préférentiel pour les accepteurs. Dans le cas du xylobioside, le xylose lié à la partie aglycone pourrait se retrouver à l'extérieur du site actif où sont situés des résidus aromatiques (Saliba et al. 2015, Siegbahn et al. 2015)

Le xylose peut initier la synthèse de GAGs et être accepteur de la β 4GalT7, mais l'affinité de l'enzyme pour le xylose est moindre par rapport aux xylosides comportant des aglycones aromatiques (xylose K_M = 16 mM et *p*NP-xyl K_M = 1,27 mM) (Daligault et al. 2009, Pasek et al. 2010). L'affinité de la β 4GalT7 est donc influencée par la partie aglycone qui forme des interactions hydrophobes à l'extérieur de l'enzyme avec des résidus aromatiques (Saliba et al. 2015, Siegbahn et al. 2015). Dans notre cas, le second xylose doit moins bien s'accommoder dans cet environnement hydrophobe à l'extérieur du site actif par rapport à des aglycones aromatiques et entraîne une galactosylation moins efficace (Saliba et al. 2015).

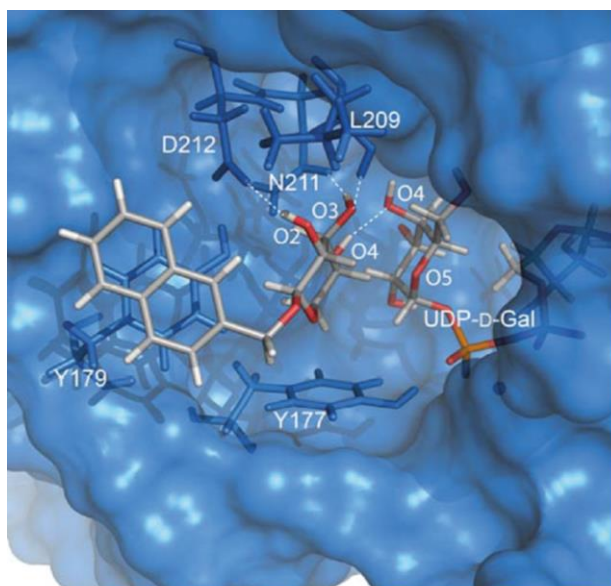


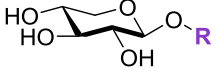
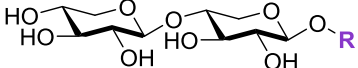
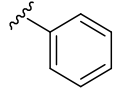
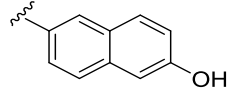
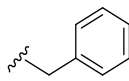
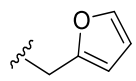
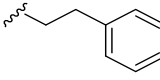
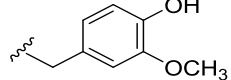
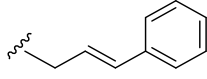
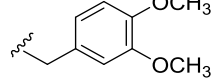
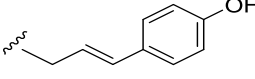
Figure 107. Un naphthyl xyloside dans le site actif de la $\beta 4\text{GalT}7$ (Siegbahn et al. 2015).

La comparaison des xylosides et xylobiosides lors de cette étude a montré que les xylosides traversent plus efficacement la membrane plasmique que leurs équivalents xylobiosides. Un xyloside et un xylobioside avec la même partie aglycone ont été testés sur l'activité de la $\beta 4\text{GalT}7$ et montrent que l'enzyme présente une affinité ainsi qu'une efficacité catalytique plus élevées pour le xyloside comparativement au xylobioside. Ces deux études permettent de conclure que la différence d'efficacité entre les xylosides et les xylobiosides pour initier la biosynthèse des GAGs est due à la fois à une pénétration moins efficace dans les cellules des xylobiosides et au fait qu'ils sont des moins bons substrats pour la $\beta 4\text{GalT}7$ que leurs équivalents xylosides.

c) Aryl xylosides

La capacité à amorcer la synthèse de GAGs des xylosides et des xylobiosides comportant une partie aglycone aromatique a été évaluée à une concentration finale de 100 μ M (Tableau 43 et Figure 108) de la même manière que pour les « click » xylosides. Pour rappel, les résultats sont présentés selon l'incorporation relative de 35 S par les GAGs synthétisés à partir des xylosides évalués en comparaison des GAGs synthétisés à partir de l'Umb-Xyl.

Tableau 43. Noms donnés aux différents xylosides et xylobiosides avec des aglycones aromatiques.

 X		 X2	
R		R	
PX		HX	
PX2		HX2	
BZX		FX	
BZX2			
PTX		VAX	
PTX2			
CX		VEX	
CX2			
COX			
COX2			

Tous les aryl xylosides initient la synthèse de GAGs, et six sont aussi efficaces que l'Umb-Xyl à 100 μ M (PX, BZX, PTX, CX, CX2, FX).

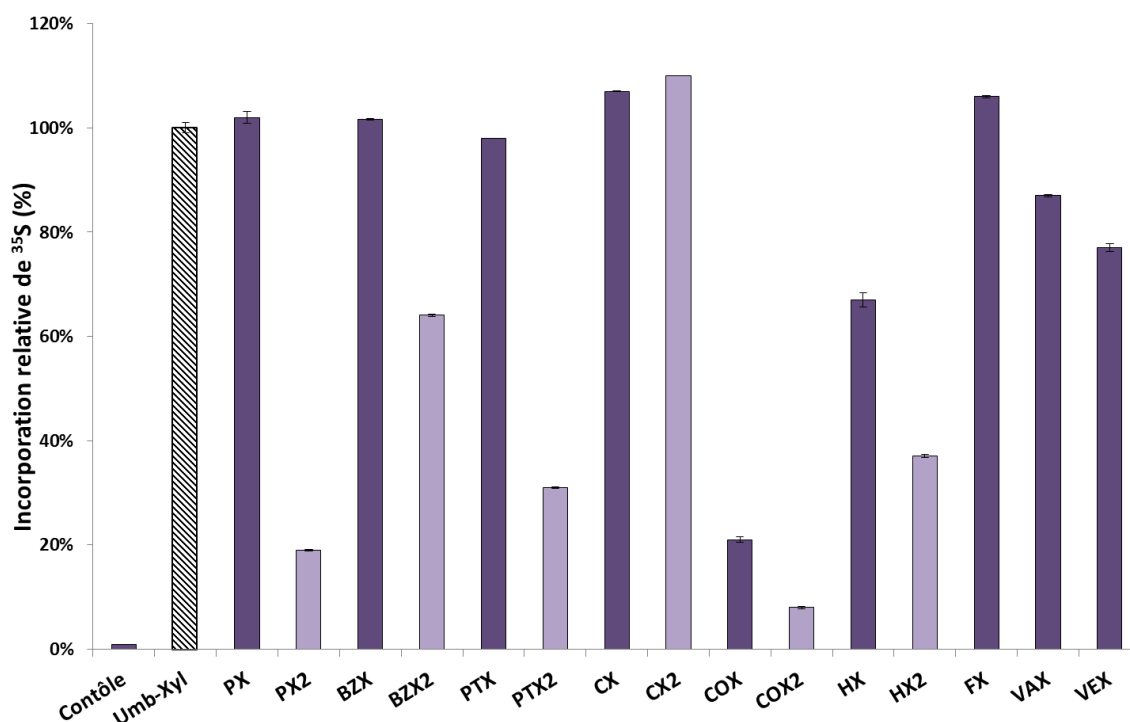


Figure 108. Amorçage de la biosynthèse de GAGs par les aryl xylosides et xylobiosides à 100 μ M dans le milieu de culture des cellules CHO pgsA-745.

Dans un premier temps, nous avons comparé les xylosides et les xylobiosides avec une même partie aglycone. Comme observé en série « click » xylosides, les xylobiosides sont de moins bons initiateurs de la biosynthèse des GAGs que les xylosides correspondants à l'exception des dérivés de l'alcool cinnamique, **CX** et **CX2**, qui initient la synthèse des GAGs à la même intensité. Pour les autres composés, la différence entre les xylosides et les xylobiosides varie d'un facteur 5 entre **PX** et **PX2** à un facteur 1,6 entre **BZX** et **BZX2**. Si nous comparons la Figure 95 et la Figure 108, les xylobiosides comportant un aglycone aromatique sont de meilleurs initiateurs de la synthèse des GAGs que ceux comportant un noyau triazole. Les meilleurs « click » xylobiosides sont moins efficaces que le témoin Umb-Xyl (20% d'incorporation de ³⁵S) alors que les aryl xylobiosides restent des amorceurs plus efficaces (100% pour **CX2**, 64% pour **BZX2**, 37% pour **HX2** et 31% pour **PTX2** d'incorporation de ³⁵S). L'ajout d'une partie aromatique peut moduler l'hydrophobie des xylobiosides et augmenter leur capacité à amorcer la synthèse des GAGs par une meilleure pénétration dans les cellules, mais également augmenter leur affinité pour la β 4GalT7. L'environnement hydrophobe à l'extérieur de l'enzyme est constitué de résidus aromatiques, la présence d'un aglycone aromatique peut améliorer les interactions hydrophobes entre le substrat et l'enzyme (Siegbahn et al. 2015).

A 100 μ M, les xylosides **PX**, **BZX**, **PTX**, **CX** et **FX** initient la synthèse de GAGs aussi bien que l'Umb-Xyl. **HX** est un peu moins efficace que Umb-Xyl (67% d'incorporation de ³⁵S). Ce xyloside est bien connu pour sa capacité à initier la synthèse de GAGs et possède un effet antiprolifératif sur des cellules cancéreuses (Mani et al. 2004, Jacobsson et al. 2006a, Jacobsson et al. 2007, Cheng et al. 2009, Nilsson et al. 2009, Siegbahn et al. 2014, Siegbahn et al. 2015).

L'affinité de la β 4GalT7 pour **HX** et **BZX** a été évaluée (Garcia-Garcia et al. 2011). L'efficacité catalytique est de $52,1 \text{ mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$ pour **HX** et $205,7 \text{ mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$ pour **BZX**, ce qui peut expliquer que **HX** soit moins efficace que **BZX** lors de l'incorporation de ^{35}S (Figure 108) (Garcia-Garcia et al. 2011).

Une étude de dose-dépendance est également indispensable afin de voir l'effet de la partie aglycone car une concentration élevée peut « lisser » les résultats comme vu précédemment (Figure 109) (Sobue et al. 1987, Fritz et al. 1994).

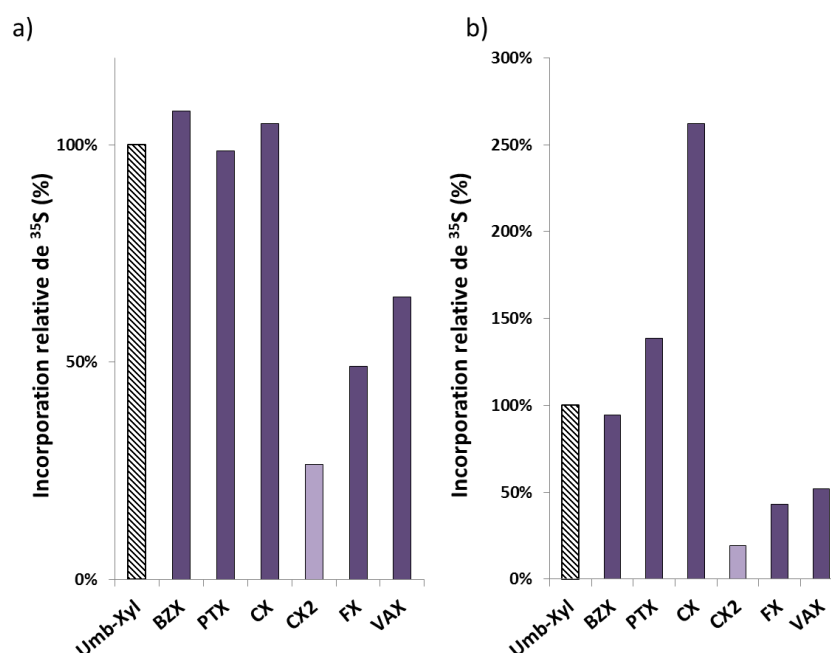


Figure 109. Dose-dépendance des xylosides à : a) 10 μM et c) 1 μM comparé à Umb-Xyl.

A 10 μM , **BZX**, **PTX**, **CX** initient la synthèse des GAGs de manière comparable à l'Umb-Xyl (Figure 109, a). Le xylobioside **CX2** a une efficacité moindre que l'équivalent xyloside **CX** à 10 μM . La concentration a donc bien un effet lors du criblage de la capacité des xylosides à initier la synthèse des GAGs (Fritz et al. 1994, Sarkar et al. 1995).

A 1 μM , **BZX** initie la synthèse des GAGs comme l'Umb-Xyl, mais **PTX** et **CX** initient la synthèse plus efficacement que le témoin Umb-Xyl, avec 138% et 260% d'incorporation de ^{35}S par rapport à l'Umb-Xyl, respectivement (Figure 109, b).

Dans cette étude, le xyloside le plus efficace comme initiateur de la synthèse de GAGs est **CX** qui provient de la réaction avec l'alcool cinnamique, mais **BZX** et **PTX** sont également intéressants.

d) Comparaison entre « click » et aryl xylosides

Tous les « click » et les aryl xylosides ont été évalués pour leur capacité à initier la biosynthèse exogène de GAGs. Cela a permis de sélectionner différentes molécules et de les comparer entre elles.

L'ajout d'un groupement hydroxyle diminue la capacité de synthèse des GAGs si l'on compare **CX** et **COX** (Figure 108). En effet, **CX** agit aussi efficacement que l'Umb-Xyl, alors que **COX**, qui ne diffère que par un groupement hydroxyle supplémentaire est moins efficace (21% d'incorporation de ^{35}S). L'ajout d'un groupement hydroxyle sur **3b** (en comparaison à **3a**) a également conduit à une diminution de 70% de son incorporation de ^{35}S (Figure 95). Or, l'ajout d'un groupement hydroxyle ne conduit pas toujours à la diminution de la synthèse de GAGs. En effet, l'efficacité de la $\beta 4\text{GalT7}$ est plus importante pour le 2,6-hydroxynaphtyl xyloside (**HX**) comparé au naphthyl xyloside (Siegbahn et al. 2015) et conduit à une meilleure efficacité pour la synthèse des GAGs (Holmqvist et al. 2013).

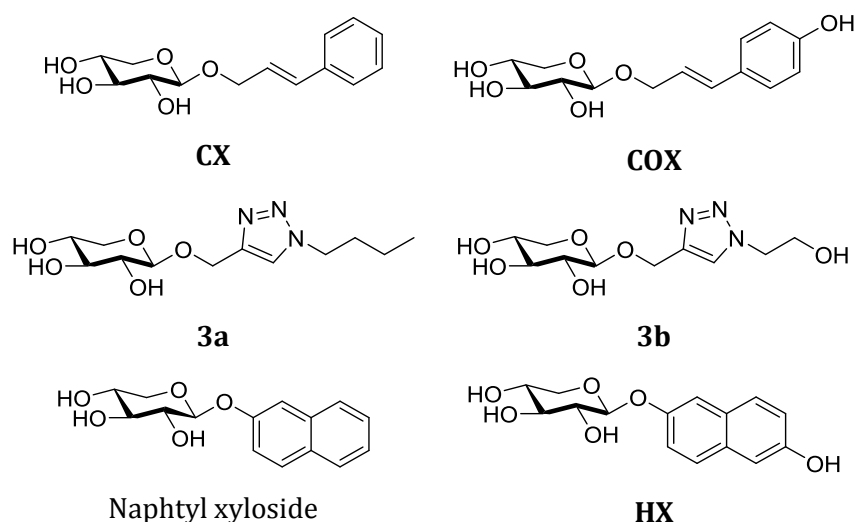


Figure 110. Rappel des structures d'aryl xylosides.

La distance entre le noyau aromatique et le xylose mais également la nature de l'espaceur sont des critères connus pour influencer la capacité des xylosides à initier la synthèse de GAGs (Victor et al. 2009, Holmqvist et al. 2013, Siegbahn et al. 2014). Dans la Figure 111, cinq xylosides sont comparés entre eux car ils contiennent tous dans leur partie aglycone un substituant phényle.

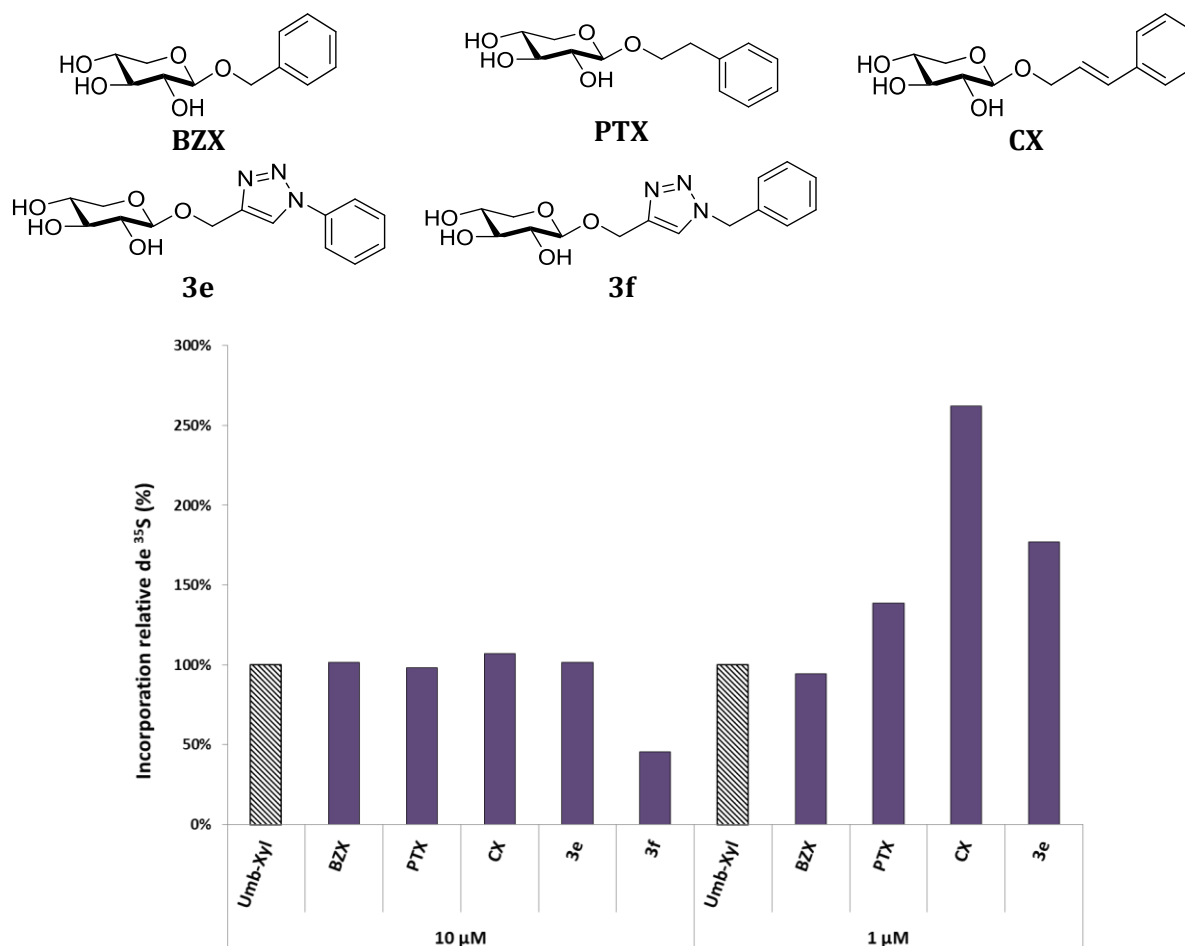


Figure 111. Comparaison des xylosides selon la distance xylose-substituant phényle.

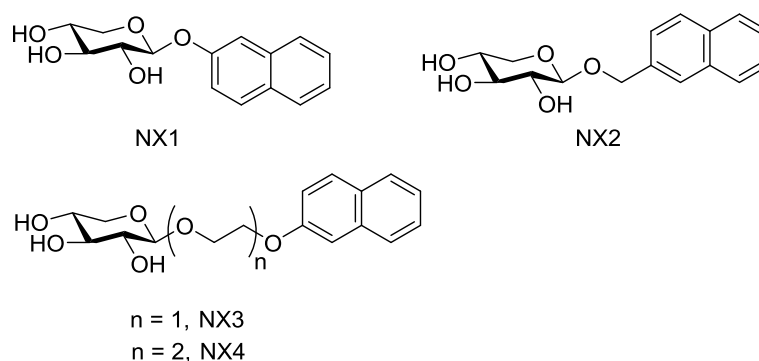
Ces xylosides comportent un substituant phényle à des distances variables de la partie glycone (xylose) et la nature du lien peut être modifiée par une insaturation ou par un noyau triazole.

Le xyloside **3e** comporte un substituant phényle lié à l'hétérocycle triazole et **3f** un substituant benzyle, ils ne diffèrent que d'un méthylène, mais cela conduit à une diminution de 55% de la capacité de **3e** à synthétiser les GAGs à 10 μM. Si nous comparons **3f** et **BZ**, le linker triazole a un effet négatif (baisse de 50% de l'activité).

Cependant, pour d'autres xylosides, l'augmentation de la distance entre le noyau aromatique et le xylose a une influence positive sur l'initiation de la synthèse de GAGs. En effet, plus la distance s'accroît **BZX** (2 atomes) > **PTX** (3 atomes) > **CX** (4 atomes) et plus la capacité des xylosides pour la synthèse de GAGs augmente. Mais **3e** qui est distant de 5 atomes et **3f** qui est distant de 6 atomes ont une activité moins importante que **CX**. La distance de 4 liaisons entre atomes est peut-être la distance optimale entre le noyau aromatique et le xylose pour une synthèse de GAGs efficace, mais la structure de l'espaceur est également à prendre en compte. L'insaturation peut avoir un effet positif (**CX**) et le lien triazole un effet négatif (**3e** et **3f**).

L'augmentation de la distance entre le xylose et un aglycone naphthyle a été testée pour la capacité des xylosides à initier la synthèse de GAGs et les paramètres cinétiques en présence de ces xylosides ont été étudiés (Tableau 44) (Holmqvist et al. 2013, Siegbahn et al. 2015).

Tableau 44. Efficacité catalytique de la $\beta 4\text{GalT7}$ en présence de xylosides et capacité des xylosides à initier la synthèse de GAGs (Holmqvist et al. 2013, Siegbahn et al. 2015).



	GAGs	$\beta 4\text{GalT7}$ (k_{cat}/K_M en $\text{mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$)
NX1	24	2,6
NX2	55	3,8
NX3	79	5,2
NX4	80	4,8
NX5	74	4,7

Les valeurs de l'initiation de la synthèse des GAGs sont exprimées comme la valeur des fractions en ^{35}S des cellules traitées avec des xylosides divisée par la valeur des fractions en ^{35}S des cellules non traitées. Cellules CCD-1095Sk

Comme dans le cas de nos résultats, l'augmentation de la distance entre le xylose et l'aglycone présente l'avantage de permettre une synthèse des GAGs plus efficace des xylosides jusqu'à une distance optimale correspondant à une chaîne de quatre atomes de carbone, ensuite pour une distance plus élevée l'efficacité de la galactosylation diminue (Holmqvist et al. 2013, Siegbahn et al. 2015).

II.4. Synthèse chimique et évaluation biologique des C- et S-xylosides

L'avantage de synthétiser des molécules en modifiant la nature de la liaison glycosidique par un atome de soufre ou de carbone est que ces molécules ont une meilleure stabilité enzymatique et chimique par rapport aux O-xylosides correspondants.

En 1987, Sobue *et al.* ont étudié la capacité à initier la biosynthèse des GAGs du phényl O- β -xyloside et de ses analogues S-, C-, N- β -xylosides (Sobue et al. 1987). Le O-xyloside et S-xyloside initient avec la même efficacité la synthèse des GAGs à 50 μM sur des cellules de la peau alors qu'à 100 μM , le O-xyloside est plus efficace. Les équivalents C- et N-xylosides sont eux peu efficaces.

Récemment, les paramètres cinétiques de la $\beta 4\text{GalT7}$, première enzyme impliquée dans la biosynthèse des GAGs, ont été étudiés pour des naphthyl O-, S- et C- β -xylosides (Siegbahn et al. 2015). L'efficacité catalytique pour ces substrats (k_{cat}/K_M en $\text{mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$) est de 9,4 pour le S-xyloside, 2,6 pour le O-xyloside et de 1,0 pour le C-xyloside. Comme dans l'étude de Sobue *et al.*, c'est le S-xyloside qui est le meilleur accepteur pour cette enzyme.

Dans cette thèse, nous avons également souhaité étudier l'influence de la nature de l'atome impliqué dans la liaison glycosidique du benzyl β -xyloside qui est connu pour initier la synthèse de GAGs de manière efficace (Robinson et al. 1975, Robinson and Lindahl 1981). La synthèse des analogues *S*- et *C*- β -xylosides du benzyl xyloside a donc été entreprise par voie chimique.

II.4.1. Synthèse chimique du *S*-xyloside

La synthèse de *S*-glycosides est possible par voie enzymatique mais nécessite de réaliser une mutation de la diade catalytique, notamment du résidu acide/base en un résidu neutre comme l'alanine, qui n'intervient plus dans le mécanisme de transglycosylation (Armstrong et al. 2010). Cette mutation conduit à l'appellation de l'enzyme sous le nom thioglycoligase. L'utilisation d'un donneur activé permet la formation de l'intermédiaire glycosyl-enzyme sans l'aide du résidu acide/base. Puis, un transfert efficace intervient entre un accepteur sucre comportant un thiol, plus nucléophile que son équivalent oxygéné et ne nécessitant pas l'assistance du résidu acide/base (Figure 112).

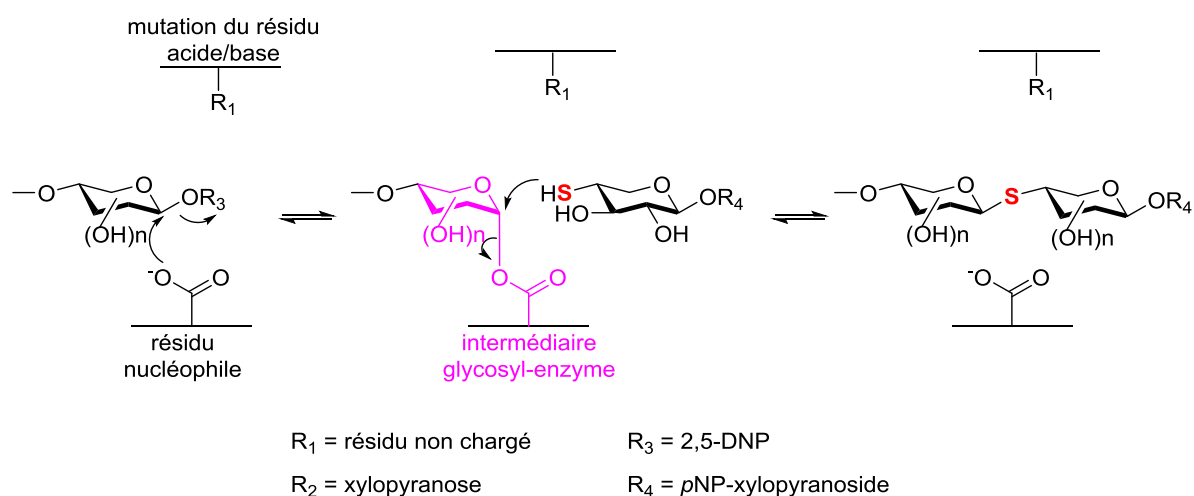


Figure 112. Transglycosylation par une thioglycoligase

Nous n'avons pas opté pour cette stratégie pour la synthèse du benzyl 1-thioxyloside, notamment car nous n'avons pas accès à la séquence primaire en acides aminés de la xylanase commerciale, et donc une mutagenèse dirigée n'est pas envisageable. Nous avons donc mis en œuvre une stratégie de synthèse chimique du *S*-xyloside.

La synthèse du benzyl 1-thio- β -D-xyloside est réalisée en 3 étapes à partir du D-xylose avec un rendement global de 47% (Figure 113).

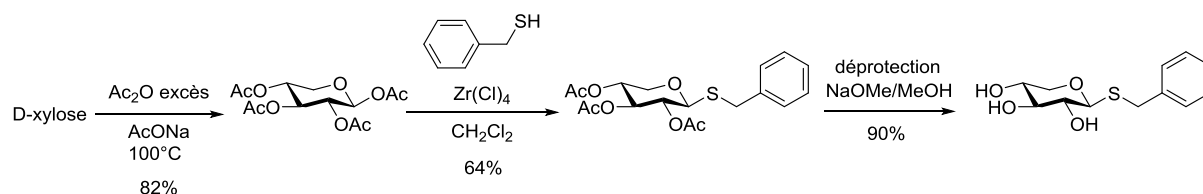


Figure 113. Synthèse du benzyl 1-thio-β-D-xyloside.

L'anomère β du xylose peracétylé est obtenu avec un rendement de 82% sous contrôle cinétique en présence de D-xylose et d'acétate de sodium dans l'anhydride acétique à 100°C (Konstantinovic et al. 2001, Oldham et al. 2013).

La réaction du 1,2,3,4-tétra-*O*-acétyl-β-D-xylopyranose en présence d'un acide de Lewis ($\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, SnCl_4 ,...) et d'un alcool ou un thiol est une méthode générale pour la synthèse de *O*-β- et *S*-β-xylopyranosides.

Le choix de l'acide de Lewis est déterminant pour le rapport anomérique (α/β) des *S*-β-D-xylopyranosides synthétisés par cette méthode (Contour et al. 1989). En effet, l'utilisation de $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ conduit à un mélange d'anomères avec l'anomère β comme composé majoritaire (Ferrier and Furneaux 1976, Connolly et al. 1980). Le chlorure de zirconium (IV) a été utilisé car c'est un catalyseur efficace pour la thioglycosylation avec une sélectivité complète en β avec 64% de rendement (Contour et al. 1989). La déprotection des groupements acétates a été effectuée par une solution de méthanolate de sodium dans le méthanol avec un rendement de 90%.

II.4.2. Synthèse chimique du *C*-xyloside

La synthèse de *C*-xylosides n'est pas possible par voie enzymatique. Une voie de synthèse du phényléthyl *C*-xyloside en 2 étapes à partir du xylose a été mise au point avec un rendement global de 26%. La première étape est la réaction de Lubineau en présence de D-xylose et de dibenzoylméthane en milieu basique qui conduit à une cétone intermédiaire. La seconde étape est une hydrogénation afin de réduire la fonction carbonyle (Figure 114).

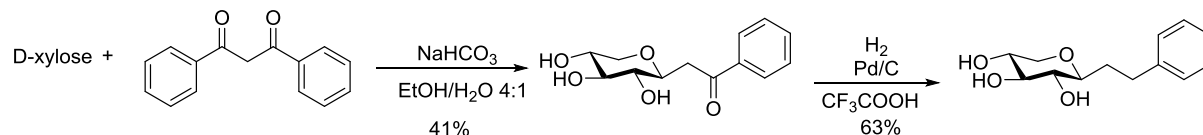


Figure 114. Synthèse du phényléthyl β-*C*-xyloside.

La réaction de Lubineau est utilisée pour former des *C*-glycosides en une seule étape à partir de sucres non protégés dans une solution aqueuse basique à chaud (Rodrigues et al. 2000). La formation d'un *C*-glycoside comprend la condensation d'une β-dicétone en milieu basique avec le sucre de départ, l'élimination d'une molécule d'eau en β, puis la cyclisation de

l'intermédiaire qui conduit au *C*-glycoside. Ce composé intermédiaire subit une réaction de Claisen rétro-aldol sous des conditions basiques (Rodrigues et al. 2000) (Figure 115). La réaction est thermodynamiquement contrôlée et conduit à un β -*C*-D-glycoside, en raison du faible effet anomère et de l'effet stérique (préférence de la chaîne latérale cétone en position équatoriale) (Postema 1992, Riemann et al. 2002).

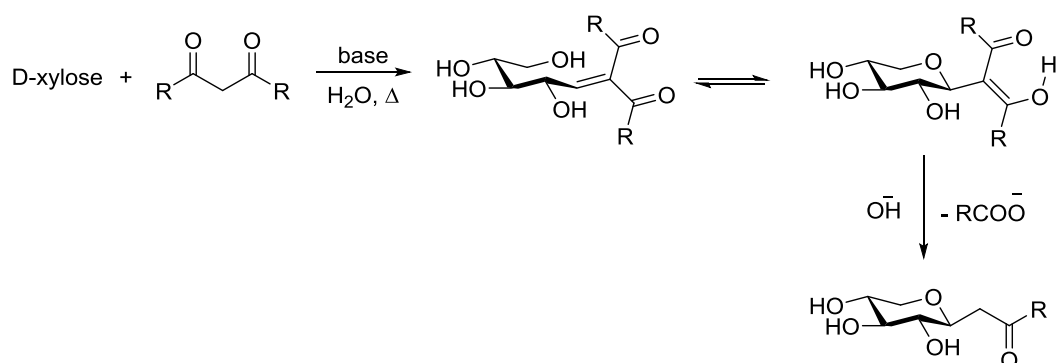


Figure 115. Mécanisme de la réaction de Lubineau.

Cette réaction a été utilisée pour la synthèse de Pro-Xylane® (L'Oréal) en présence de pentane-2,4-dione, suivie par la réduction de la fonction carbonyle (Figure 116) (Cavezza et al. 2009). Le Pro-Xylane® est une molécule connue pour initier la synthèse des GAGs et participe à la formulation de nombreux cosmétiques.

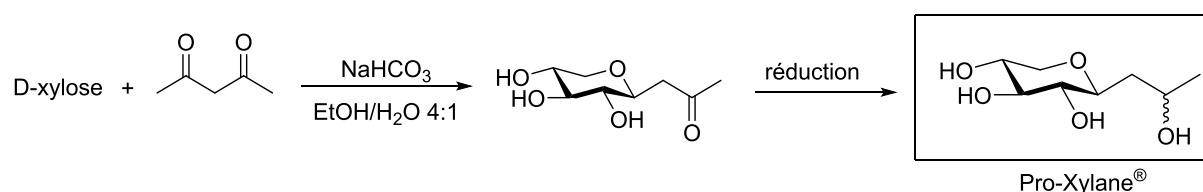


Figure 116. La synthèse du Pro-Xylane®

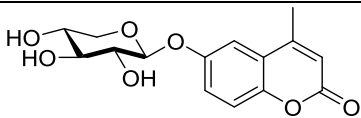
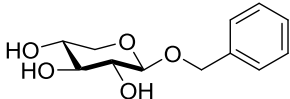
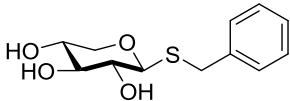
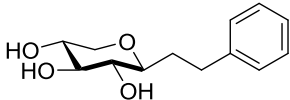
Feng *et al.* ont optimisé le rendement de cette réaction à partir de D-glucose et de dibenzoylméthane à l'aide d'une irradiation par micro-ondes, de l'utilisation d'un co-solvant et en faisant varier le rapport dibenzoylméthane (bicarbonate de sodium)/nombre de moles du glucose (2:1) (Feng et al. 2011). Dans les mêmes conditions, un rendement de 89% en *C*-xyloside est obtenu à partir de D-xylose (Feng et al. 2011). Dans notre cas, nous avons remplacé l'irradiation sous micro-ondes par un chauffage à reflux pendant 15 h. Le rendement obtenu est de 41%.

L'hydrogénation est effectuée dans des conditions décrites dans la littérature (Hashimoto and Takahashi 2009). Nous avons obtenu un rendement de 63% (voir Matériel et Méthodes).

II.4.3. Influence de la nature de l'atome impliqué dans la liaison glycosidique sur l'activité de la β 4GalT7

Les paramètres cinétiques de la β 4GalT7 ont été étudiés sur le benzyl β -xyloside (**BZX**) et ses analogues carboné (**C-BZX**) et soufré (**S-BZX**), synthétisés au laboratoire, en comparaison avec l'Umb-Xyl, molécule de référence (Tableau 45).

Tableau 45. Paramètres cinétiques de la β 4GalT7 recombinante avec l'umbélliferryl β -D-xyloside, le benzyl β -D-xyloside et ses analogues carboné et soufré.

	K_M mM	k_{cat} s ⁻¹	k_{cat}/K_M s ⁻¹ .mM ⁻¹
 Umb-Xyl	0,40	1,5	3,8
 BZX	3,83	2,3	0,6
 S-BZX	2,35	1,6	0,7
 C-BZX	35,76	3,4	0,1

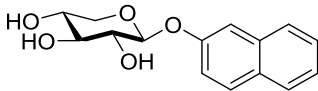
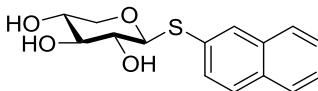
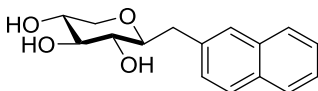
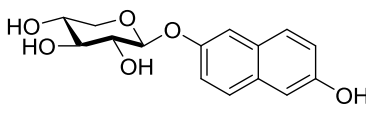
Tous les xylosides testés sont substrats de la β 4GalT7. L'affinité (K_M) de la β 4GalT7 pour les trois xylosides synthétisés est plus faible que l'affinité pour l'Umb-Xyl, alors que les constantes catalytiques (k_{cat}) sont quant à elles supérieures. Ces résultats conduisent à une faible efficacité catalytique (k_{cat}/K_M) pour les xylosides synthétisés en comparaison avec l'Umb-Xyl.

En série benzyle, la meilleure efficacité catalytique est obtenue pour le composé soufré (**S-BZX**) (0,7 s⁻¹.mM⁻¹). L'efficacité catalytique pour le composé oxygéné est légèrement plus faible (**BZX**) (0,6 s⁻¹.mM⁻¹) et beaucoup plus faible pour le composé carboné (**C-BZX**) (0,1 s⁻¹.mM⁻¹). L'enzyme a une affinité pour **S-BZX** 40% plus importante par rapport à **BZX**. En revanche, la constante catalytique est plus faible pour **S-BZX**, ce qui conduit au final à une faible différence

d'efficacité catalytique entre ces deux composés. Pour le *C*-xyloside (**C-BZX**), la faible efficacité catalytique est due à la très faible affinité de l'enzyme pour ce composé.

Récemment, Siegbahn *et al.* ont étudié l'influence de la variation de l'atome impliqué dans la liaison glycosidique et ont déterminé les paramètres cinétiques d'une β 4GalT7 pour le naphthyl xyloside et ses analogues soufré et carboné (Tableau 46) (Siegbahn et al. 2015). Les résultats obtenus montrent une efficacité catalytique de la β 4GalT7 pour les composés testés qui varie de la manière suivante : $S > O > C$. La présence d'un soufre dans la liaison glycosidique conduit à une augmentation de l'affinité de l'enzyme de 40% et de la constante catalytique de 30% par rapport au composé oxygéné. Pour le composé carboné, l'affinité est plus faible pour ce composé.

Tableau 46. Paramètres cinétiques d'une β 4GalT7 avec le naphthyl β -D-xyloside et ses analogues carboné et soufré et avec le 2,6-hydroxynaphthyl β -D-xyloside (**HX**) (Siegbahn et al. 2015)

	K_M mM	k_{cat} s ⁻¹	k_{cat}/K_M s ⁻¹ .mM ⁻¹
	0,58	1,5	2,6
	0,25	2,3	9,4
	2,4	2,5	1,0
 HX	0,31	1,6	5,2

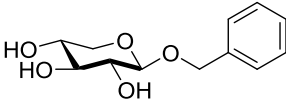
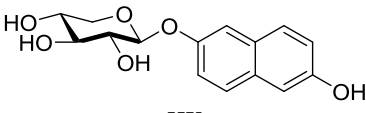
Si l'on compare nos résultats à ceux de la littérature (Siegbahn et al. 2015), l'influence de l'atome intervenant dans la liaison glycosidique conduit à un ordre d'efficacité catalytique similaire ($S > O > C$) entre les séries benzyle et naphthyle. Dans les deux cas, la présence d'un soufre permet une augmentation de l'affinité de l'ordre de 40%. Cependant, en série benzyle, la constante catalytique est inférieure pour le composé soufré et conduit à une différence d'efficacité catalytique moindre qu'en série naphthyle. Dans les deux séries, le *C*-xyloside présente la plus faible efficacité catalytique.

Les paramètres cinétiques de la β 4GalT7 pour **HX** ont été étudiés dans deux travaux de la littérature (Tableau 46 et Tableau 47) (Garcia-Garcia et al. 2011, Siegbahn et al. 2015). Pour le même composé HX, les résultats obtenus sont différents. Il semble donc difficile de comparer les paramètres cinétiques de la galactosyltransférase β 4GalT7 issus de différents travaux. De la

même manière, nos résultats obtenus avec **BZX** sont très différents de ceux obtenus par Garcia-Garcia et al (Garcia-Garcia et al. 2011).

Etant donné les différences importantes de valeurs de paramètres cinétiques obtenues selon les études, il est difficile de comparer directement les paramètres cinétiques de l'enzyme pour les séries benzyle (nos travaux) et naphthyle (travaux de Siegbahn) et d'affirmer que la β 4GalT7 présente une activité plus importante en séries naphthyle que benzyle.

Tableau 47. Paramètres cinétiques d'une β 4GalT7 (Garcia-Garcia et al. 2011)

	K_M mM	k_{cat} s ⁻¹	k_{cat}/K_M s ⁻¹ .mM ⁻¹
 BZX	0,28	50,7	205,7
 HX	0,58	30,2	52,1

Lors du criblage de la capacité des xylosides à amorcer la synthèse de GAGs, **BZX** a été testé. A 1 μ M, il conduit à un amorçage de la synthèse de GAGs avec une même intensité que l'Umb-Xyl (Figure 109). Malgré une efficacité catalytique de la β 4GalT7 six fois plus élevée pour l'Umb-Xyl que pour **BZX**, à 1 μ M de concentration, on n'observe pas de différence en terme de synthèse de GAGs.

En résumé, le remplacement de l'oxygène impliqué dans la liaison glycosidique par un soufre permet une augmentation de l'efficacité catalytique alors que son remplacement par un méthylène la diminue. Ces résultats sont conformes aux résultats de la littérature qui décrivent que les thioxylosides sont de meilleurs initiateurs de la synthèse de GAGs et ont une activité plus élevée que leurs analogues oxygénés (Sobue et al. 1987, Jacobsson et al. 2007) alors que les carbonés sont moins efficaces (Sobue et al. 1987, Malmberg et al. 2006).

Les thioglycosides plus stables *in vivo* que leurs analogues oxygénés sensibles à l'hydrolyse enzymatique peuvent représenter une famille de composés particulièrement intéressants pour des applications biologiques.

Il est indispensable d'étudier les analogues S- et C- benzyl xylosides pour leur capacité à initier la synthèse de GAGs. Pour aller plus loin dans l'interprétation de nos résultats, il pourrait être intéressant de développer une approche de modélisation moléculaire qui permettrait de comparer les séries naphthyle et benzyle afin d'obtenir des informations sur le positionnement de la partie aglycone dans le site catalytique de la galactosyltransférase. En effet, la présence d'un méthylène, en série benzyle, entre la partie aromatique et l'atome intervenant dans la liaison

glycosidique apporte un degré de liberté supplémentaire qui pourrait moduler les interactions entre les résidus du site catalytique et le substrat et justifier les différences observées sur les paramètres cinétiques.

III. Conclusion

Une bibliothèque de xylosides et xylobiosides originaux comportant une partie aglycone avec un hétérocycle triazole fonctionnalisé a été préparée par une approche de synthèse chimio-enzymatique. L'ensemble de ces composés a été étudié pour évaluer leurs propriétés d'activation de la biosynthèse des GAGs.

L'optimisation de la synthèse enzymatique des propargyl β -xyloside et β -xylobioside par une xylanase commerciale a permis d'obtenir un rendement global satisfaisant de 15% à partir des xylanes commerciaux. Comparé à une méthode de chimie organique, ces propargyl xyloside et xylobioside ont été obtenus en une seule étape avec un contrôle total de la stéréosélectivité en β . Puis, la réaction de chimie « click » avec différents azotures a permis la synthèse de nombreux xylosides et xylobiosides comportant un hétérocycle triazole diversement substitué avec des rendements élevés.

D'autre part, par une seule étape de synthèse enzymatique, des aryl xylosides et xylobiosides ont été synthétisés. Les conditions de synthèse n'ont pas été optimisées. Selon la structure de l'alcool aromatique, la transglycosylation est plus ou moins importante. La xylanase NS22083, utilise préférentiellement les accepteurs possédant une fonction alcool primaire par rapport aux phénols. En effet, la synthèse avec le phénol et le 2,6-dihydroxynaphtalène conduit à des rendements de transglycosylation faibles.

Afin d'évaluer l'influence de la nature de la liaison glycosidique, le benzyl xyloside obtenu par transglycosylation a été comparé à ses analogues *S*- et *C*-xylosides obtenus par synthèse chimique.

Des tests biologiques pour évaluer l'activité de l'ensemble de ces xylosides sur l'activation de la biosynthèse des GAGs ont été réalisés sur un modèle cellulaire (CHO pgsA-745) qui ne permet pas la synthèse endogène de GAGs. Les « click » et les aryl xylosides et xylobiosides ne sont pas cytotoxiques et permettent tous un amorçage de la biosynthèse des GAGs. L'efficacité de la synthèse des GAGs dépend essentiellement de la nature de la partie aglycone. En effet, pour les « click » xylosides, les substituants hydrophobes sur le noyau triazole ont conduit à une production de GAGs importante. Nous avons identifié le composé **3e**, porteur d'un substituant phényle sur l'hétérocycle triazole, comme un initiateur de chaîne de GAGs plus efficace que le Umb-Xyl à une faible concentration (1 μ M).

Les deux principales propriétés qui permettent aux xylosides d'être initiateurs de la synthèse de GAGs sont la capacité de traverser la membrane plasmique par diffusion passive et l'aptitude à être substrat de la β 4GalT7 afin d'amorcer la biosynthèse exogène des GAGs. Notre étude a montré que les « click » xylobiosides sont de moins bons initiateurs de la biosynthèse des GAGs que leurs équivalents xylosides. Nous avons réalisé, avec une expérience originale, une réaction « click » dans des cellules fixées et perméabilisées pour attester que la pénétration dans

les cellules est différente selon la partie glycone (DP1vs DP2). De plus, nous avons montré que les xylobiosides sont des substrats moins efficaces pour l'étape de galactosylation enzymatique catalysée par la β 4GalT7. Nous en avons conclu que le xylose lié à la partie aglycone ne doit pas bien s'accommoder dans l'environnement hydrophobe à l'extérieur du site actif qui comporte des résidus aromatiques ce qui pourrait expliquer la plus faible affinité de la β 4GalT7 pour les xylobiosides (Tsutsui et al. 2013, Saliba et al. 2015). Les aryl xylobiosides sont plus efficaces que les « click » xylobiosides lors de l'amorçage de la synthèse de GAGs, soit parce qu'ils pénètrent mieux dans la membrane plasmique (aglycone hydrophobe module la polarité) soit parce qu'ils sont de meilleurs accepteurs de la β 4GalT7. Le cinnamyl xylobioside (**CX2**) est même aussi efficace que l'Umb-Xyl à 100 μ M. Dans cette étude, trois aryl xylosides ont montré de très bonnes propriétés d'activation de la biosynthèse des GAGs, le benzyl xyloside (**BZX**), le phénéthyl xyloside (**PTX**) et le cinnamyl xyloside (**CX**). A 1 μ M, ils ont montré une efficacité sur l'initiation de la synthèse de GAGs égale ou supérieure au témoin Umb-Xyl. La distance entre le xylose et le noyau aromatique est un paramètre qui influence l'affinité de la β 4GalT7 pour ces composés et peut expliquer les différences entre ces trois composés (Holmqvist et al. 2013, Siegbahn et al. 2015).

En résumé, pour la première fois, le rôle du degré de polymérisation de xylosides dans l'initiation de la biosynthèse des GAGs a été étudié. Des études complémentaires devront maintenant être effectuées pour déterminer la nature et la composition des chaînes de GAGs produites selon le DP des xylosides synthétisés. Ces évaluations biologiques ont été réalisées sur un modèle cellulaire (CHO pgsA-745), modèle optimal pour réaliser un premier criblage mais qui ne reflète pas la complexité des réactions qui peuvent se produire *in vivo*. Dans le cadre d'applications cosmétiques, il faudra réaliser ces tests sur des fibroblastes, cellules humaines présentes dans le derme qui sécrètent des PGs et des GAGs. Contrairement au modèle utilisé, ces cellules sont capables de réaliser la synthèse de PGs et les xylosides vont alors être en compétition avec la synthèse endogène des GAGs. De plus, la pénétration des xylosides dans les cellules dépend de la nature des cellules donc cela peut modifier les résultats obtenus.

Soliance, partenaire industriel du projet, avait pour objectif le « scale-up » pour la production des xylosides d'intérêt à l'échelle de quelques centaines de grammes en fin de projet. D'après notre étude, le cinnamyl xyloside (**CX**) est le composé le plus intéressant. L'optimisation de la production de cinnamyl xyloside est actuellement en cours avec un changement d'échelle (réacteur de 3,5 L), une mise au point des conditions réactionnelles avec des sources de xylanes et de xylanase différentes ainsi qu'une modification des conditions de purification.

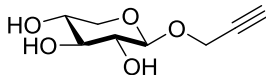
Des tests complémentaires de l'évaluation biologique du cinnamyl xyloside **CX** sont également en cours : évaluation de la cytotoxicité du produit sur fibroblastes dermiques

humains, analyse d'expression génique sur 90 gènes spécifiques de la fonction dermique. Des résultats préliminaires ont permis d'identifier un puissant effet anti-oxydant du produit.

IV. Caractérisation des produits

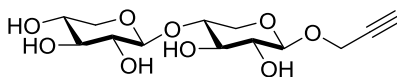
IV.1. Produits issus de la synthèse chimio-enzymatique

Prop-2-ynyl β -D-xyloside (1)



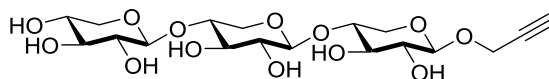
Solide blanc; $F = 132^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_D^{20} = -85.9$ (0,21, H_2O); RMN ^1H (D_2O , 500 MHz): δ 2.92 (1 H, s large, H alcyne), 3.28 (1 H, dd, $J_{2,1}$ 7.8, $J_{2,3}$ 9.2, 2-H), 3.33 (1 H, dd, $J_{5,4}$ 10.5, $J_{5,5}$ 11.6, 5-H), 3.45 (1 H, t, $J_{3,2} = J_{3,4}$ 9.2, 3-H), 3.62 (1 H, ddd, $J_{4,5}$ 5.4, $J_{4,3}$ 9.2, $J_{4,5}$ 10.5, 4-H), 3.97 (1 H, dd, $J_{5,4}$ 5.4, $J_{5,5}$ 11.6, 5-H), 4.44 (2 H, s large, OCH_2), 4.58 (1 H, d, $J_{1,2}$ 7.8, 1-H); RMN ^{13}C (D_2O , 125 MHz): δ 56.7 (OCH_2), 65.2 (C-5), 69.1 (C-4), 72.8 (C-2), 75.6 (C-3), 76.3 (C-H alcyne), 78.8 (C-alcyne), 101.5 (C-1); ESI-HRMS: m/z calculé pour $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{O}_5\text{Na}$: $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 211.0582, trouvé: 211.0585.

Prop-2-ynyl β -D-xylobioside (2)



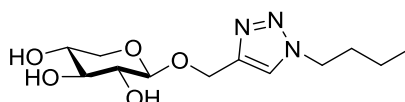
Solide blanc; $F = 95.5^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_D^{20} = -83.3$ (0,38, H_2O); RMN ^1H (D_2O , 500 MHz): δ 2.83 (1 H, s large, H alcyne), 3.18 (1 H, dd, $J_{2',1'}$ 7.9, $J_{2',3'}$ 9.2, 2'-H), 3.22-3.24 (1 H, m, 5'-H), 3.24 (1 H, dd, $J_{2,1}$ 7.7, $J_{2,3}$ 8.2, 2-H), 3.33 (1 H, dd, $J_{5,4}$ 9.2, $J_{5,5}$ 11.8, 5-H), 3.35 (1 H, dd, $J_{3',4'}$ 5.9, $J_{3',2'}$ 9.2, 3'-H), 3.50 (1 H, dd, $J_{3,2}$ 8.2, $J_{3,4}$ 9.8, 3-H), 3.54-3.56 (1 H, m, 4'-H), 3.71 (1 H, ddd, $J_{4,5}$ 5.2, $J_{4,5}$ 9.2, $J_{4,3}$ 9.8, 4-H), 3.89 (1 H, dd, $J_{5',4'}$ 5.5, $J_{5',5'}$ 11.6, 5'-H), 4.03 (1 H, dd, $J_{5,4}$ 5.2, $J_{5,5}$ 11.8, 5-H), 4.36 (2 H, s large, OCH_2), 4.38 (1 H, d, $J_{1',2'}$ 7.9, 1'-H), 4.53 (1 H, d, $J_{1,2}$ 7.7, 1-H); RMN ^{13}C (D_2O , 125 MHz): δ 56.6 (OCH_2), 62.8 (C-5), 65.1 (C-5'), 69.0 (C-4'), 72.5 (C-2), 72.6 (C-2'), 73.5 (C-3), 75.4 (C-3'), 76.1 (C-4), 76.2 (C-H alcyne), 78.5 (C-alcyne), 101.1 (C-1), 101.7 (C-1'); ESI-HRMS: m/z calculé pour $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_9\text{Na}$: $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 343.1005, trouvé: 343.0996.

Prop-2-ynyl β-D-xylotriose



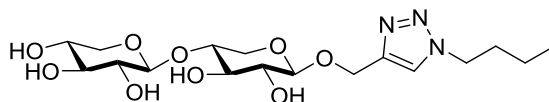
Solide amorphe; $[\alpha]_D^{20} = -68.6$ (0,38, H₂O); RMN ¹H (D₂O, 500 MHz): δ 2.91 (1 H, s large, H alcyne) 3.27 (1 H, dd, $J_{2'',1''} 7.9, J_{2'',3''} 9.2$, 2''-H), 3.29-3.37 (3 H, m, 2-H et 2'-H et 5''-H), 3.38-3.44 (2 H, m, 5'-H et 5-H), 3.45 (1 H, t, $J_{3'',2''} = J_{3'',4''} 9.2$, 3''-H), 3.57 (1 H, t, $J_{3',2'} = J_{3',4'} 9.2$, 3'-H), 3.60 (1 H, t, $J_{3,2} = J_{3,4} 9.2$, 3-H), 3.63 (1 H, ddd, $J_{4'',5''} 5.5, J_{4'',3''} 9.2, J_{4'',5''} 10.1$, 4''-H), 3.77-3.82 (2 H, m, 4'-H et 4-H), 3.98 (1 H, dd, $J_{5'',4''} 5.5, J_{5'',5''} 11.6$, 5''-H), 4.09-4.13 (2 H, m, 5'-H et 5-H), 4.44-4.45 (2 H, m, OCH₂), 4.47 (1 H, d, $J_{1'',2''} 7.9$, 1''-H), 4.49 (1 H, d, $J_{1',2'} 7.8$, 1'-H), 4.61 (1 H, d, $J_{1,2} 7.7$, 1-H); RMN ¹³C (D₂O, 125 MHz): δ 62.9 (C-5), 62.9 (C-5'), 65.2 (C-5''), 69.1 (C-4''), 72.6 (C-2 et C-2'), 72.7 (C-2''), 79.60 (C-3 et C-3'), 75.6 (C-3''), 76.2 (C-4'), 76.3 (C-4), 76.2 (C-H alcyne), 78.5 (C-alcyne), 101.3 (C-1''), 101.6 (C-1'), 101.8 (C-1); ESI-HRMS: m/z calculé pour C₁₈H₂₈O₁₃Na: [M+Na]⁺: 475.1428, trouvé: 475.1436.

3a



Laque jaune; $[\alpha]_D^{20} = -57.9$ (0,21, CH₃OH); RMN ¹H (CD₃OD, 600 MHz): δ 0.97 (3 H, t, J 7.4, triazole-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃), 1.34 (2 H, sex, J 7.4, triazole-CH₂-CH₂-CH₂), 1.89 (2 H, qu, J 7.4, triazole-CH₂-CH₂), 3.20 (1 H, dd, $J_{2,1} 7.5, J_{2,3} 9.0$, 2-H), 3.22 (1 H, dd, $J_{5,4} 10.3, J_{5,5} 11.5$, 5-H), 3.32-3.35 (1 H, m, 3-H), 3.49 (1 H, ddd, $J_{4,5} 5.4, J_{4,3} 9.0, J_{4,5} 10.3$, 4-H), 3.89 (1 H, dd, $J_{5,4} 5.4, J_{5,5} 11.5$, 5-H), 4.33 (1 H, d, $J_{1,2} 7.5$, 1-H), 4.41 (2 H, t, J 7.4, triazole-CH₂), 4.73 (1 H, d, J 12.4, OCH₂), 4.91 (1 H, d, J 12.4, OCH₂), 7.90 (1 H, s, H triazole); RMN ¹³C (CD₃OD, 150 MHz): δ 13.7 (triazole-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃), 20.6 (triazole-CH₂-CH₂-CH₂), 33.3 (triazole-CH₂-CH₂), 51.1 (triazole-CH₂), 63.0 (OCH₂), 67.0 (C-5), 71.2 (C-4), 74.9 (C-2), 77.8 (C-3), 104.3 (C-1), 125.1 (C-H triazole), 145.61 (C-triazole); ESI-HMRS: m/z calculé pour C₁₂H₂₁N₃O₅: [MH]⁺: 310.1379, trouvé: 310.1387.

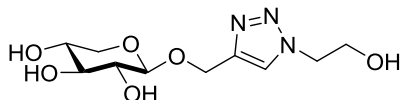
4a



Laque jaune; $[\alpha]_D^{20} = -63.9$ (1,55, CH₃OH); RMN ¹H (CD₃OD, 500 MHz): δ 0.92 (3 H, t, J 7.5, triazole-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃), 1.30 (2 H, sex, J 7.5, triazole-CH₂-CH₂-CH₂), 1.85 (2 H, qu, J 7.5, triazole-CH₂-CH₂), 3.16-3.23 (3 H, m, 2-H, 2'-H et 5'-H), 3.26-3.30 (2 H, m, 5-H et 3'-H), 3.41 (1 H, t, $J_{3,2} = J_{3,4} 8.8$, 3-H), 3.47 (1 H, ddd, $J_{4',5'} 5.4, J_{4',3'} 8.8, J_{4',5'} 10.3$, 4'-H), 3.62 (1 H, ddd, $J_{4,5} 5.3, J_{4,3} 8.8, J_{4,5} 10$, 4-H), 3.85 (1 H, dd, $J_{5',4'} 5.4, J_{5',5'} 11.5$, 5'-H), 4.00 (1 H, dd, $J_{5,4} 5.3, J_{5,5} 11.7$, 5-H), 4.29 (1 H, d,

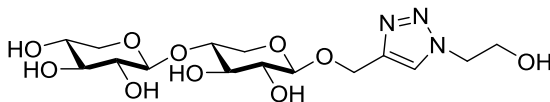
$J_{1,2}$ 7.7, 1'-H), 4.30 (1 H, d, $J_{1,2}$ 7.4, 1-H), 4.35 (2 H, t, J 7, triazole-CH₂), 4.69 (1 H, d, J 12.4, OCH₂), 4.87 (1 H, d, J 12.4, OCH₂), 7.94 (1 H, s, H triazole); RMN ¹³C (CD₃OD, 125 MHz): δ 13.7 (triazole-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃), 20.6 (triazole-CH₂-CH₂-CH₂), 33.3 (triazole-CH₂-CH₂), 51.1 (triazole-CH₂), 63.0 (OCH₂), 64.6 (C-5), 67.1 (C-5'), 71.1 (C-4'), 74.3 (C-2'), 74.6 (C-2), 75.8 (C-3), 77.6 (C-3'), 78.2 (C-4), 104.0 (C-1), 104.0 (C-1'), 124.1 (C-H triazole), 145.6 (C-triazole); ESI-HMRS: m/z calculé pour C₁₇H₃₀N₃O₉Na: [MH]⁺: 420.1982, trouvé: 420.1979.

3b

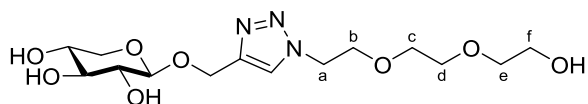


Solide jaune pâle; décomposition à T>188°C; $[\alpha]_D^{20} = -47.1$ (0,28, H₂O); RMN ¹H (D₂O, 500 MHz): δ 33.30 (1 H, dd, $J_{2,1}$ 7.8, $J_{2,3}$ 9.2, 2-H), 3.36 (1 H, dd, $J_{5,4}$ 10.5, $J_{5,5}$ 11.7, 5-H), 3.43 (1 H, t, $J_{3,2} = J_{3,4}$ 9.2, 3-H), 3.62 (1 H, ddd, $J_{4,5}$ 5.5, $J_{4,3}$ 9.2, $J_{4,5}$ 10.5, 4-H), 3.97 (1 H, dd, $J_{5,4}$ 5.5, $J_{5,5}$ 11.7, 5-H), 4.01 (2 H, t, J 5.0, triazole-CH₂-CH₂-OH), 4.51 (1 H, d, $J_{1,2}$ 7.8, 1-H), 4.57 (2 H, t, J 5.0, triazole-CH₂-CH₂-OH), 4.87 (1 H, d, J 12.6, OCH₂), 4.97 (1 H, d, J 12.6, OCH₂), 8.10 (1 H, s, H-triazole); RMN ¹³C (D₂O, 125 MHz): δ 52.5 (triazole-CH₂-CH₂-OH), 60.1 (triazole-CH₂-CH₂-OH), 62.0 (OCH₂), 65.2 (C-5), 69.1 (C-4), 72.9 (C-2), 75.6 (C-3), 102.2 (C-1), 125.7 (C-H triazole), 143.4 (C-triazole); ESI-HMRS: m/z calculé pour C₁₀H₁₇N₃O₆Na: [M+Na]⁺: 298.1015, trouvé: 298.1021.

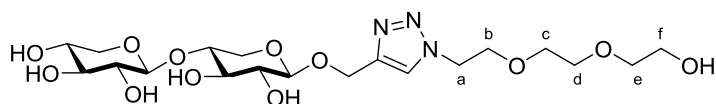
4b



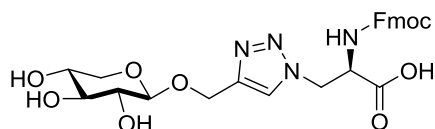
Solide jaune; décomposition à T>225°C; $[\alpha]_D^{20} = -65.7$ (0,28, H₂O); RMN ¹H (D₂O, 500 MHz): δ 3.28 (1 H, dd, $J_{2,1}$ 7.8, $J_{2,3}$ 9.1, 2-H), 3.31 (1 H, dd, $J_{2',1'}$ 7.9, $J_{2',3'}$ 9.2, 2'-H), 3.32 (1 H, dd, $J_{5',4'}$ 10.6, $J_{5',5'}$ 11.6, 5'-H), 3.41 (1 H, dd, $J_{5,4}$ 10.3, $J_{5,5}$ 11.8, 5-H), 3.44 (1 H, t, $J_{3',2'} = J_{3',4'}$ 9.2, 3'-H), 3.56 (1 H, t, $J_{3,2} = J_{3,4}$ 9.1, 3-H), 3.63 (1 H, ddd, $J_{4',5'}$ 5.5, $J_{4',3'}$ 9.2, $J_{4',5'}$ 10.6, 4'-H), 3.78 (1 H, ddd, $J_{4,5}$ 5.3, $J_{4,3}$ 9.1, $J_{4,5}$ 10.3, 4-H), 3.98 (1 H, dd, $J_{5',4'}$ 5.5, $J_{5',5'}$ 11.6, 5'-H), 4.02 (2 H, t, J 4.2, triazole-CH₂-CH₂-OH), 4.11 (1 H, dd, $J_{5,4}$ 5.3, $J_{5,5}$ 11.8, 5-H), 4.48 (1 H, d, $J_{1',2'}$ 7.9, 1'-H), 4.54 (1 H, d, $J_{1,2}$ 7.8, 1-H), 4.58 (2 H, t, J 5.1, triazole-CH₂-CH₂-OH), 4.88 (1 H, d, J 12.7, OCH₂), 4.97 (1 H, d, J 12.7, OCH₂), 8.10 (1 H, s, H triazole); RMN ¹³C (D₂O, 125 MHz): δ 52.5 (triazole-CH₂-CH₂-OH), 60.1 (triazole-CH₂-CH₂-OH), 62.0 (OCH₂), 62.9 (C-5), 65.2 (C-5'), 69.2 (C-4'), 72.7 (C-2'), 72.8 (C-2), 73.7 (C-3), 75.7 (C-3'), 76.3 (C-4), 101.8 (C-1'), 102.0 (C-1), 125.7 (C-H triazole), 143.4 (C-triazole); ESI-HMRS: m/z calculé pour C₁₅H₂₅N₃O₁₀Na: [M+Na]⁺: 430.1438, trouvé: 430.1434.

3c

Laque jaune; $[\alpha]_D^{20} = -32.1$ (0,12, H₂O); RMN ¹H (D₂O, 600 MHz): δ 3.27 (1 H, dd, $J_{2,1}$ 7.8, $J_{2,3}$ 10.0, 2-H), 3.31-3.35 (1 H, m, 5-H), 3.42 (1 H, t, $J_{3,2} = J_{3,4}$ 10.0, 3-H), 3.54-3.56 (2 H, m, e-CH₂), 3.59-3.61 (1 H, m, 4-H), 3.61-3.63 (2 H, m, c-CH₂), 3.62-3.64 (2 H, m, d-CH₂), 3.64-3.69 (2 H, m, f-CH₂), 3.96 (1 H, t, $J_{5,4} = J_{5,5}$ 10.0, 5-H), 3.99 (2 H, t, J 5, b-CH₂), 4.50 (1 H, d, $J_{1,2}$ 7.8, 1-H), 4.64 (2 H, t, J 5, a-CH₂), 4.85 (1 H, d, J 12.5, OCH₂), 4.95 (1 H, d, J 12.5, OCH₂), 8.11 (1 H, s, H triazole); RMN ¹³C (D₂O, 150 MHz): δ 50.0 (C-a), 60.3 (C-f), 62.0 (OCH₂), 65.2 (C-5), 68.7 (C-b), 69.1 (C-4), 69.3 (C-c), 69.6 (C-d), 71.8 (C-e), 72.9 (C-2), 75.6 (C-3), 102.2 (C-1), 125.7 (C-H triazole), 143.5 (C-triazole); ESI-HMRS: m/z calculé pour C₁₄H₂₅N₃O₈Na: [M+Na]⁺: 386.1539, trouvé: 386.1537.

4c

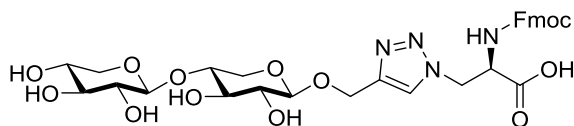
Laque jaune ; $[\alpha]_D^{20} = -19.1$ (0,49, H₂O); RMN ¹H (D₂O, 500 MHz): δ 3.27 (1 H, dd, $J_{2,1}$ 7.8, $J_{2,3}$ 9.0, 2-H), 3.29-3.33 (2 H, m, 2'-H et 5'-H), 3.41 (1 H, dd, $J_{5,4}$ 10.5, $J_{5,5}$ 12.0, 5-H), 3.44 (1 H, t, $J_{3',2'} = J_{3',4'}$ 9.3, 3'-H), 3.54-3.64 (3 H, m, 3-H et e-CH₂), 3.64-3.66 (1 H, m, 4'-H), 3.65-3.69 (6 H, m, c-CH₂, d-CH₂ et f-CH₂), 3.79 (1 H, ddd, $J_{4,5}$ 5.3, $J_{4,3}$ 9.0, $J_{4,5}$ 10.5, 4-H), 3.96-3.99 (1 H, m, 5'-H), 3.99-4.01 (2 H, m, b-CH₂), 4.11 (1 H, dd, $J_{5,4}$ 5.3, $J_{5,5}$ 12, 5-H), 4.47 (1 H, d, $J_{1,2}$ 7.8, 1-H), 4.53 (d, $J_{1',2'}$ 7.7, 1'-H), 4.65 (2 H, t, J 4.5, a-CH₂), 4.87 (1 H, d, J 12.5, 1 H OCH₂), 4.96 (1 H, d, J 12.5, 1 H OCH₂), 8.11 (1 H, s, H triazole); RMN ¹³C (D₂O, 125 MHz): δ 50.0 (C-a), 60.3 (C-f), 62.0 (OCH₂), 62.9 (C-5), 65.2 (C-5'), 68.7 (C-b), 69.2 (C-4'), 69.3 (C-c), 69.7 (C-d), 71.6 (C-e), 72.7 (C-2'), 72.8 (C-2), 73.7 (C-3), 75.6 (C-3'), 76.3 (C-4), 101.8 (C-1'), 102.0 (C-1), 125.7 (C-H triazole), 143.5 (C-triazole); ESI-HMRS: m/z calculé pour C₁₉H₃₃N₃O₁₂Na: [M+Na]⁺: 518.1962, trouvé: 518.1968.

3d

Solide blanc; décomposition à T>214°C; $[\alpha]_D^{20} = -91.8$ (0,39, H₂O); RMN ¹H (500 MHz, D₂O): δ 3.0 (1 H, t, $J_{2,1} = J_{2,3}$ 8.5, 2-H), 3.11-3.17 (1 H, m, 5-H), 3.36 (1 H, t, $J_{3,2} = J_{3,4}$ 8.5, 3-H), 3.41-3.45 (1 H, m, 4-H), 3.80 (1 H, dd, $J_{5,4}$ 5.3 Hz, $J_{5,5}$ 11.6, 5-H), 4.08 (1 H, m, NHCOOCH₂CH), 4.16-4.19 (1 H, m, 1H NHCOOCH₂), 4.30 (1 H, d, $J_{1,2}$ 8.5, 1-H), 4.33-4.41 (2 H, m, NHCOOCH₂ et CH₂CHCOOH), 4.54-4.60 (2 H, m, CH₂CHCOOH et OCH₂), 4.69 (1 H, d, J 11.9, OCH₂), 4.81-4.83 (1 H, m, CH₂CHCOOH); RMN ¹³C (D₂O, 125 MHz): δ 46.8 (NHCOOCH₂CH), 51.9 (CH₂CHCOOH), 56.0 (CHCOOH), 61.7

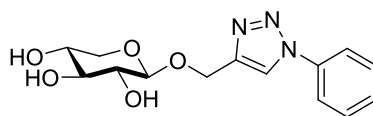
(OCH₂), 65.1 (C-5), 66.5 (NHCOOCH₂), 69.1 (C-4), 72.8 (C-2), 75.5 (C-3), 102.2 (C-1), 120.1 (C-H triazole), 125.1 (CH-Ph), 125.4 (CH-Ph), 127.4 (CH-Ph), 127.9 (CH-Ph), 140.9 (CH-Ph), 143.7 (C-Ph), 143.2 (C-triazole), 157.0 (OCONH), 174.4 (COOH); ESI-HMRS: *m/z* calculé pour C₂₆H₂₈N₄O₉Na: [M+Na]⁺: 563.1754, trouvé: 563.1747.

4d

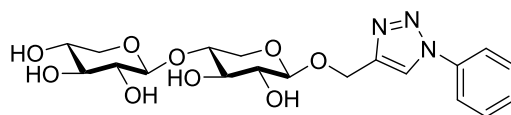


Solide blanc; décomposition à T>190°C; $[\alpha]_D^{20} = -42.1$ (0,19, H₂O); RMN ¹H (600 MHz, D₂O): δ 3.01-3.02 (1 H, t, *J*_{2,1} = *J*_{2,3} 9,0, 2-H), 3.16-3.22 (2 H, m, 2'-H et 5-H), 3.27-3.31 (1 H, m, 5'-H), 3.37-3.42 (3 H, m, 3-H, 3'-H et 4-H), 3.61 (1 H, ddd, *J*_{4',5'} 5.4, *J*_{4',3'} 9.5, *J*_{4',5'} 10.5, 4'-H), 3.80 (1 H, dd, *J*_{5,4} 5.0, *J*_{5,5} 12.6, 5-H), 3.96 (1 H, dd, *J*_{5',4'} 5.4, *J*_{5',5'} 11.3, 5'-H), 4.11-4.14 (2 H, m, NHCOOCH₂CH et NHCOOCH₂), 4.27 (1 H, d, *J*_{1',2'} 7.8, 1'-H), 4.29 (1 H, d, *J*_{1,2} 9.0, 1-H), 4.45-4.47 (1 H, m, CHCOOH), 4.49-4.51 (1 H, m, NHCOOCH₂), 4.55-4.58 (2 H, m, CH₂CHCOOH et OCH₂), 4.67 (1 H, d, *J* 12.4, OCH₂), 4.84-4.87 (1 H, m, CH₂CHCOOH); RMN ¹³C (D₂O, 125 MHz): δ 46.8 (NHCOOCH₂CH), 52.0 (CH₂CHCOOH), 56.0 (CHCOOH), 61.8 (OCH₂), 62.7 (C-5), 65.2 (C-5'), 66.5 (NHCOOCH₂), 69.1 (C-4'), 72.5 (C-2), 72.7 (C-2'), 73.4 (C-3), 75.5 (C-3'), 76.1 (C-4), 101.7 (C-1'), 102.0 (C-1), 120.1 (C-H triazole), 125.1 (CH-Ph), 125.2 (CH-Ph), 125.4 (CH-Ph), 125.5 (CH-Ph), 125.4 (CH-Ph), 127.4 (CH-Ph), 127.5 (CH-Ph), 128.0 (CH-Ph), 128.0 (CH-Ph), 140.9 (C-triazole), 143.3 (C-Ph), 143.6 (C-Ph), 143.9 (C-Ph), 157.1 (OCONH), 174.4 (COOH); ESI-HMRS: *m/z* calculé pour C₃₁H₃₆N₄O₁₃Na: [M+Na]⁺: 695.2177, trouvé: 695.2183.

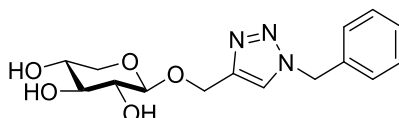
3e



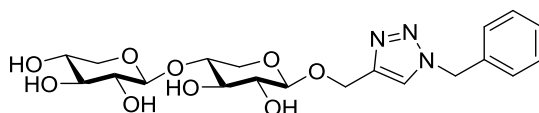
Solide jaune pâle; F = 128°C; $[\alpha]_D^{20} = -52.9$ (0,20, H₂O); RMN ¹H (CD₃OD, 500 MHz): δ 3.23-3.24 (1 H, m, 2-H), 3.24-3.26 (1 H, m, 5-H), 3.34 (1 H, t, *J*_{3,2} = *J*_{3,4} 8.9, 3-H), 3.52 (1 H, ddd, *J*_{4,5} 5.3, *J*_{4,3} 8.9, *J*_{4,5} 10.2, 4-H), 3.91 (1 H, dd, *J*_{5,4} 5.3, *J*_{5,5} 11.4, 5-H), 4.40 (1 H, d, *J*_{1,2} 7.3, 1-H), 4.82-4.84 (1 H, m, OCH₂), 5.00 (1 H, d, *J* 12.5, OCH₂), 7.50 (2 H, t, *J* 7.8, Ph), 7.58 (2 H, t, *J* 7.8, Ph), 7.83 (1 H, d, *J* 7.8, Ph), 8.53 (1 H, s, H triazole); RMN ¹³C (CD₃OD, 125 MHz): δ 63.0 (OCH₂), 67.0 (C-5), 71.2 (C-4), 74.9 (C-2), 77.7 (C-3), 104.4 (C-1), 126.6 (C-H Ph), 123.4 (C-H triazole), 130.1 et 131.0 (C-H Ph), 138.4 (C-Ph), 146.7 (C-triazole); ESI-HRMS: *m/z* calculé pour C₁₄H₁₈N₃O₅: [MH]⁺: 308.1246, trouvé: 308.1239.

4e

Solide jaune pâle; F = 162-168°C; $[\alpha]_D^{20} = -49.0$ (0,50, H₂O); RMN ¹H (CD₃OD, 500 MHz): δ 3.23-3.24 (1 H, m, 2'-H), 3.24-3.26 (1 H, m, 5'-H), 3.31-3.33 (1 H, m, 2-H), 3.37-3.39 (2 H, m, 5-H et 3-H), 3.49-3.51 (1 H, m, 3'-H), 3.52-3.54 (1 H, m, 4'-H), 3.68-3.70 (1 H, m, 4-H), 3.92 (1 H, dd, $J_{5',4'}$ 5.3, $J_{5',5'}$ 11.7, 5'-H), 4.08 (1 H, dd, $J_{5,4}$ 5.3, $J_{5,5}$ 11.7, 5-H), 4.36 (1 H, d, $J_{1',2'}$ 7.5, 1'-H), 4.43 (1 H, d, $J_{1,2}$ 7.5, 1-H), 4.86 (1 H, d, J 12.5, OCH₂), 5.02 (1 H, d, J 12.5, OCH₂), 7.52 (2 H, t, J 7.8, Ph), 7.61 (2 H, t, J 7.8, Ph), 7.86 (1 H, d, J 7.8, Ph), 8.56 (1 H, s, H triazole); RMN ¹³C (CD₃OD, 125 MHz): δ 63.0 (OCH₂), 64.6 (C-5), 67.1 (C-5'), 71.1 (C-4'), 74.3 (C-2'), 74.7 (C-2), 75.8 (C-3'), 77.6 (C-3), 78.2 (C-4), 104.0 (C-1'), 104.1 (C-1), 121.6 (C-H Ph), 123.4 (C-H triazole), 130.1 et 131.0 (C-H Ph), 138.4 (C-Ph), 146.6 (C-triazole); ESI-HRMS: m/z calculé pour C₁₉H₂₆N₃O₉: [MH]⁺: 440.1669, trouvé: 440.1681.

3f

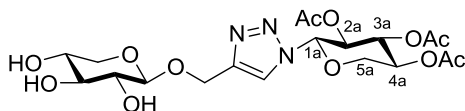
Solide blanc; F = 135.5°C; $[\alpha]_D^{20} = -33.9$ (0,22, H₂O); RMN ¹H (CD₃OD, 500 MHz): δ 3.16-3.23 (1 H, dd, $J_{2,1}$ 7.5, $J_{2,3}$ 9.0, 2-H), 3.18-3.26 (1 H, m, 5-H), 3.31 (1 H, t, $J_{3,2} = J_{3,4}$ 7.5, 3-H), 3.50 (1 H, ddd, $J_{4,5}$ 5.3, $J_{4,3}$ 9.0, $J_{4,5}$ 10.1, 4-H), 3.88 (1 H, dd, $J_{5,4}$ 5.3, $J_{5,5}$ 11.4, 5-H), 4.33 (1 H, d, $J_{1,2}$ 7.5, 1-H), 4.73 (1 H, d, J 12.4, OCH₂), 4.91 (1 H, d, J 12.4, OCH₂), 5.61 (2 H, s, CH₂-Ph), 7.31-7.43 (5 H, m, Ph), 7.99 (1 H, s, H triazole); RMN ¹³C (CD₃OD, 125 MHz): δ 53.5 (CH₂-Ph), 61.6 (OCH₂), 65.6 (C-5), 69.75 (C-4), 73.42 (C-2), 76.32 (C-3), 102.93 (C-1), 123.81 (C-H triazole), 127.72 (C-H Ph), 128.19 (C-H Ph), 128.62 (C-H Ph), 135.33 (C-Ph), 146.62 (C-triazole); ESI-HMRS: m/z calculé pour C₁₅H₁₉N₃O₅Na: [M+Na]⁺: 344.1222, trouvé: 344.1227.

4f

Solide blanc; décomposition à T>225.8°C; $[\alpha]_D^{20} = -61.8$ (0,18, DMSO); RMN ¹H (DMSO, 500 MHz): δ 2.98-3.04 (2 H, m, 2-H et 2'-H), 3.06-3.09 (1 H, m, 5'-H), 3.09-3.13 (1 H, m, 3'-H), 3.16-3.18 (1 H, m, 5-H), 3.21-3.25 (1 H, m, 3-H), 3.26-3.31 (1 H, m, 4'-H), 3.50 (1 H, dt, $J_{4,5}$ 5.5, $J_{4,3}$ 9.4, 4-H), 3.70 (1 H, dd, $J_{5',4'}$ 5.5, $J_{5',5'}$ 11.5, 5'-H), 3.88 (1 H, dd, $J_{5,4}$ 5.5, $J_{5,5}$ 11.5, 5-H), 4.23 (1 H, d, $J_{1',2'}$ 7.5, 1'-H), 4.26 (1 H, d, $J_{1,2}$ 7.5, 1-H), 4.59 (1 H, d, J 12.1, OCH₂), 4.77 (1 H, d, J 12.1, OCH₂), 5.00 (4 OH), 5.17 (1 OH), 5.59 (2 H, s, CH₂-Ph), 7.30-7.39 (5 H, m, Ph), 8.15 (1 H, s, H triazole); RMN ¹³C

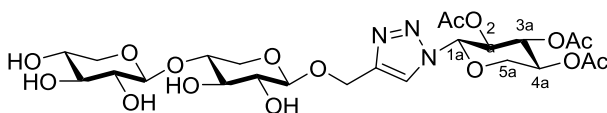
(DMSO, 125 MHz): δ 52.8 (CH₂-Ph), 61.6 (OCH₂), 63.3 (C-5), 65.8 (C-5'), 69.5 (C-4'), 72.6 (C-2'), 73.2 (C-2), 74.2 (C-3), 75.4 (C-4), 76.3 (C-3'), 102.0 (C-1'), 102.7 (C-1), 124.3 (C-H triazole), 127.9 (C-H Ph), 128.1 (C-H Ph), 128.8 (C-H Ph), 136.1 (C-Ph), 144.0 (C-triazole); ESI-HMRS: m/z calculé pour C₂₀H₂₇N₃O₉Na: [M+Na]⁺: 476.1645, trouvé: 476.1653.

3g

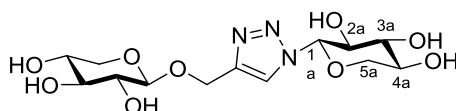


Solide jaune pâle; décomposition à T>180°C; $[\alpha]_D^{20} = -76.5$ (0,40, DMSO); RMN ¹H (DMSO, 500 MHz): δ 1,77 (3 H, s, COCH₃), 1,96 (3 H, s, COCH₃), 1,98 (3 H, s, COCH₃), 2,97 (1 H, dd, $J_{2,1}$ 7.6, $J_{2,3}$ 9.0, 2-H), 3,07-3,08 (1 H, m, 5-H), 3,10 (1 H, t, $J_{3,2} = J_{3,4}$ 9.0, 3-H), 3,28 (1 H, ddd, $J_{4,5}$ 5.4, $J_{4,3}$ 9.0, $J_{4,5}$ 10.1, 4-H), 3,71 (1 H, dd, $J_{5,4}$ 5.4, $J_{5,5}$ 11.4, 5-H), 3,77 (1 H, t, $J_{5a,4a} = J_{5a,5a}$ 10.0, 5a-H), 4,08 (1 H, dd, $J_{5a,4a}$ 5.6, $J_{5a,5a}$ 10.0, 5a-H), 4,13 (1 H, d, $J_{1,2}$ 7.6, 1-H), 4,61 (1 H, d, J 12.6, OCH₂), 4,74 (1 H, d, J 12.6, OCH₂), 5,09 (1 H, td, $J_{4a,3a} = J_{4a,5a}$ 10.0, $J_{4a,5a}$ 5.6, 4a-H), 5,42 (1 H, t, $J_{3a,2a} = J_{3a,4a}$ 10.0, 3a-H), 5,55 (1 H, t, $J_{2a,1a} = J_{2a,3a}$ 10.0, 2a-H), 6,13 (d, $J_{1a,2a}$ 10.0, 1a-H), 8,32 (1 H, s, H-triazole); RMN ¹³C (DMSO, 125 MHz): δ 20.4 (COCH₃), 20.8 (COCH₃), 20.9 (COCH₃), 61.5 (OCH₂), 64.8 (C-5a), 66.1 (C-5), 68.5 (C-4a), 69.9 (C-4), 70.7 (C-2a), 72.6 (C-3a), 73.5 (C-2), 76.7 (C-3), 85.2 (C-1a), 102.8 (C-1), 124.0 (C-H triazole), 144.8 (C-triazole), 169.5 (COCH₃), 170.5 (COCH₃), 170.5 (COCH₃); ESI-HMRS: m/z calculé pour C₁₉H₂₃N₃O₁₂: [MH]⁺: 490.1673, trouvé: 490.1659.

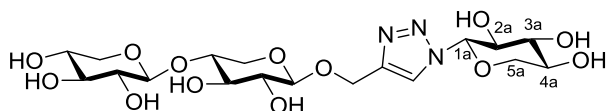
4g



Solide jaune pâle; F = 67°C; $[\alpha]_D^{20} = -91.8$ (0,39, CH₃OH); RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD): δ 1,87 (3 H, s, COCH₃), 2,04 (3 H, s, COCH₃), 2,07 (3 H, s, COCH₃), 3,19-3,29 (3 H, m, 2-H, 2'-H et 5-H), 3,33-3,36 (1 H, m, 3-H), 3,35-3,38 (1 H, m, 5'-H), 3,47 (1 H, t, $J_{3',2'} = J_{3',4'}$ 9.0, 3'-H), 3,52 (1 H, ddd, $J_{4,5}$ 5.3, $J_{4,3}$ 8.7, $J_{4,5}$ 10.3, 4-H), 3,68 (1 H, ddd, $J_{4',5'}$ 5.1, $J_{4',3'}$ 9.0, $J_{4',5'}$ 10.1, 4'-H), 3,79 (1 H, dd, $J_{5a,4a}$ 10.5, $J_{5a,5a}$ 11.5, 5a-H), 3,91 (1 H, dd, $J_{5,4}$ 5.4, $J_{5,5}$ 11.5, 5-H), 4,06 (1 H, dd, $J_{5',4'}$ 5.3, $J_{5',5'}$ 11.6, 5'-H), 4,27 (1 H, dd, $J_{5a,4a}$ 5.6, $J_{5a,5a}$ 11.5, 5a-H), 4,31 (1 H, d, $J_{1',2'}$ 7.5, 1'-H), 4,35 (1 H, d, $J_{1,2}$ 7.5, 1-H), 4,78 (1 H, d, J 12.7, OCH₂), 4,91 (1 H, d, J 12.7, OCH₂), 5,22 (1 H, ddd, $J_{4a,5a}$ 5.6, $J_{4a,3a}$ 9.4, $J_{4a,5a}$ 10.5, 4a-H), 5,52 (1 H, t, $J_{3a,2a} = J_{3a,4a}$ 9.4, 3a-H), 5,58 (1 H, t, $J_{2a,1a} = J_{2a,3a}$ 9.4, 2a-H), 6,05 (1 H, d, $J_{1a,2a}$ 9.4, 1a-H), 8,28 (1 H, s, H triazole); RMN ¹³C (CD₃OD, 125 MHz): δ 20.2 (COCH₃), 20.5 (COCH₃), 20.5 (COCH₃), 62.5 (OCH₂), 64.6 (C-5), 66.3 (C-5a), 67.1 (C-5'), 69.8 (C-4a), 71.1 (C-4'), 72.1 (C-2a), 73.7 (C-3a), 74.3 (C-2), 74.6 (C-2'), 75.7 (C-3), 77.6 (C-3'), 78.2 (C-4), 87.3 (C-1a), 103.6 (C-1'), 104.0 (C-1), 124.4 (C-H triazole), 146.0 (C-triazole), 170.5 (COCH₃), 171.4 (COCH₃), 171.5 (COCH₃); ESI-HMRS: m/z calculé pour C₂₄H₃₅N₃O₁₆Na: [M+Na]⁺: 644,1915, trouvé: 644.1921.

3h

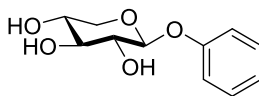
Solide blanc; décomposition à $T > 199^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D^{20} = -52.4$ (0,21, H_2O); RMN ^1H (D_2O , 500 MHz): δ 3.29 (1 H, dd, $J_{2,1}$ 7.8, $J_{2,1}$ 9.2, 2-H), 3.34 (1 H, dd, $J_{5,4}$ 10.6, $J_{5,5}$ 11.7, 5-H), 3.43 (1 H, t, $J_{3,2} = J_{3,4}$ 9.2, 3-H), 3.58-3.65 (2 H, m, 5a-H et 4-H), 3.68 (1 H, t, $J_{3a,2a} = J_{3a,4a}$ 9.3, 3a-H), 3.85 (1 H, ddd, $J_{4a,5a}$ 5.6, $J_{4a,3a}$ 9.3, $J_{4a,5a}$ 10.7, 4a-H), 3.98 (1 H, dd, $J_{5,4}$ 5.4, $J_{5,5}$ 11.6, 5-H), 4.03 (1 H, t, $J_{2a,1a} = J_{2a,3a}$ 9.2, 2a-H), 4.15 (1 H, dd, $J_{5a,4a}$ 5.5, $J_{5a,5a}$ 11.5, 5a-H), 4.52 (1 H, d, $J_{1,2}$ 7.8, 1-H), 4.91 (1 H, d, J 12.8, OCH_2), 5.00 (1 H, d, J 12.8, OCH_2), 5.71 (1 H, d, $J_{1a,2a}$ 9.2, 1a-H), 8.30 (1 H, s, H triazole); RMN ^{13}C (D_2O , 125 MHz): δ 61.9 (OCH_2), 65.2 (C-5), 68.0 (C-5a), 68.7 (C-4a), 69.1 (C-4), 72.1 (C-2a), 72.8 (C-2), 75.6 (C-3), 76.0 (C-3a), 88.0 (C-1a), 102.2 (C-1), 124.6 (C-H triazole), 143.9 (C triazole); ESI-HRMS: m/z calculé pour $\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_9\text{Na}$: $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 386.1175, trouvé: 386.1164.

4h

Solide blanc; décomposition à $T > 183^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D^{20} = -64.9$ (0,19, H_2O); RMN ^1H (D_2O , 500 MHz): δ 3.25-3.33 (3 H, m, 5'-H, 2-H et 2'-H), 3.36 (1 H, dd, $J_{5,4}$ 10.2, $J_{5,5}$ 11.9, 5-H), 3.43 (1 H, t, $J_{3,2} = J_{3,4}$ 9.2, 3-H), 3.56 (1 H, t, $J_{3',2'} = J_{3',4'}$ 9.5, 3'-H), 3.58-3.66 (2 H, m, 4'-H et 5a-H), 3.68 (1 H, t, $J_{3a,2a} = J_{3a,4a}$ 9.2, 3a-H), 3.79 (1 H, ddd, $J_{4,5}$ 5.3, $J_{4,3}$ 8.6, $J_{4,5}$ 9.9, 4-H), 3.86 (1 H, ddd, $J_{4a,5a}$ 5.5, $J_{4a,3a}$ 9.2, $J_{4a,5a}$ 10.4, 4a-H), 3.97 (1 H, dd, $J_{5',4'}$ 5.5, $J_{5',5'}$ 11.6, 5'-H), 4.03 (1 H, t, $J_{2a,1a} = J_{2a,3a}$ 9.2, 2a-H), 4.10 (1 H, dd, $J_{5,4}$ 5.3, $J_{5,5}$ 11.9, 5-H), 4.15 (1 H, dd, $J_{5a,4a}$ 5.5, $J_{5a,5a}$ 11.4, 5a-H), 4.47 (1 H, d, $J_{1',2'}$ 7.9, 1'-H), 4.54 (1 H, d, $J_{1,2}$ 7.8, 1-H), 4.90 (1 H, d, J 12.8, OCH_2), 5.00 (1 H, d, J 12.8, OCH_2), 5.71 (1 H, d, $J_{1a,2a}$ 9.2, 1a-H), 8.30 (1 H, s, H triazole); RMN ^{13}C (D_2O , 125 MHz): δ 61.9 (OCH_2), 62.9 (C-5), 65.2 (C-5'), 68.0 (C-5a), 68.7 (C-4a), 69.2 (C-4'), 72.1 (C-2a), 72.7 (C-2'), 72.8 (C-2), 73.6 (C-3'), 75.6 (C-3), 76.0 (C-3a), 76.3 (C-4), 88.0 (C-1a), 102.8 (C-1), 102.1 (C-1'), 124.7 (C-H triazole), 143.8 (C triazole); ESI-HRMS: m/z calculé pour $\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_{13}\text{Na}$: $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 518.1598, trouvé: 518.1602.

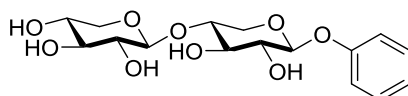
IV.2. Aryl xylosides

Phényl-β-D-xyloside (PX)



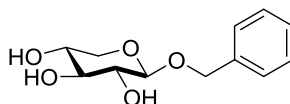
Solide blanc; F = 177°C; $[\alpha]_D^{20} = -45.7$ (0,14, CH₃OH); RMN ¹H (CD₃OD, 500 MHz): δ 3.37 (1 H, dd, $J_{5,4}$ 10.1, $J_{5,5}$ 11.4, 5-H), 3.40-3.46 (2 H, m, 2-H et 3-H), 3.57-3.61 (1 H, m, 4-H), 3.93 (1 H, dd, $J_{5,4}$ 5.3, $J_{5,5}$ 11.4, 5-H), 4.91-4.92 (1 H, m, 1-H), 7.01-7.07 (3 H, m, H Ph), 7.28-7.31 (2 H, m, H Ph); RMN ¹³C (CD₃OD, 125 MHz): δ 66.9 (C-5), 71.0 (C-4), 74.8 (C-2), 77.7 (C-3), 102.9 (C-1), 117.8 (C-H Ph), 123.5 (C-H Ph), 130.4 (C-H Ph), 158.9 (C Ph); ESI-HRMS: m/z calculé pour C₁₁H₁₄O₅Na: [M+Na]⁺: 249.0739, trouvé: 249.0733; Anal. pour C₁₁H₁₄O₅: C 58.40, H 6.24 ; trouvé, C 57.98, H 6.25.

Phényl-β-D-xylobioside (PX₂)

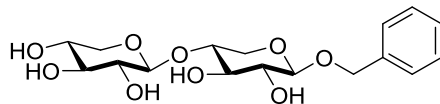


Solide blanc; F = 75°C; $[\alpha]_D^{20} = -78.6$ (0,20, CH₃OH); RMN ¹H (CD₃OD, 500 MHz): δ 3.26-3.29 (2 H, m, 2'-H et 5'-H), 3.34-3.36 (1 H, m, 3'-H), 3.46-3.56 (3 H, m, 5-H, 2-H et 4'-H), 3.60 (1 H, t, $J_{3,2} = J_{3,4}$ 8.8, 3-H), 3.77 (1 H, ddd, $J_{4,5}$ 5.3, $J_{4,3}$ 8.8, $J_{4,5}$ 10.1, 4-H), 3.95 (1 H, dd, $J_{5',4'}$ 5.4, $J_{5',5'}$ 11.4, 5'-H), 4.10 (1 H, dd, $J_{5,4}$ 5.3, $J_{5,5}$ 11.6, 5-H), 4.39 (1 H, d, $J_{1',2'}$ 7.5, 1'-H), 4.92 (1 H, d, $J_{1,2}$ 7.3, 1-H), 7.03-7.09 (3 H, m, H Ph), 7.29-7.31 (2 H, m, H Ph); RMN ¹³C (CD₃OD, 125 MHz): δ 64.5 (C-5), 67.1 (C-5'), 71.0 (C-4'), 74.3 (C-2'), 74.5 (C-2), 75.7 (C-3), 77.6 (C-3'), 77.9 (C-4), 102.6 (C-1), 103.9 (C-1'), 117.8 (C-H Ph), 123.5 (C-H Ph), 130.4 (C-H Ph), 158.8 (C Ph); ESI-HRMS: m/z calculé pour C₁₆H₂₂O₉Na: [M+Na]⁺: 381.1162, trouvé: 381.1178; Anal. pour C₁₆H₂₂O₉H₂O: C 51.06, H 6.43 ; trouvé, C 51.43, H 6.09.

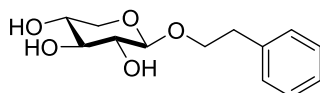
Benzyl-β-D-xyloside (BZX) (Kadi et al. 2002)



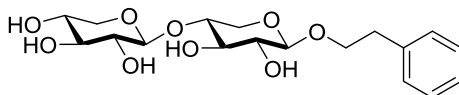
Solide blanc; RMN ¹H (D₂O, 500 MHz): δ 3.30-3.37 (2 H, m, 2-H et 5-H), 3.45 (1 H, t, $J_{3,2} = J_{3,4}$ 9.2, 3-H), 3.66 (1 H, ddd, $J_{4,5}$ 5.5, $J_{4,3}$ 9.2, $J_{4,5}$ 10.3, 4-H), 4.00 (1 H, $J_{5,4}$ 5.5, $J_{5,5}$ 11.6, 5-H), 4.52 (1 H, $J_{1,2}$ 7.9, 1-H), 4.76 (1 H, d, J 11.5, OCH₂), 4.92 (1 H, d, J 11.5, OCH₂), 7.40-7.50 (5 H, m, Ph); RMN ¹³C (D₂O, 125 MHz): δ 65.2 (C-5), 69.2 (C-4), 71.6 (OCH₂), 73.0 (C-2), 75.8 (C-3), 102.1 (C-1), 128.5 (C-Ph), 128.7 (C-Ph), 128.8 (C-Ph), 136.6 (C-Ph); ESI-HRMS: m/z calculé pour C₁₂H₁₆O₅Na: [M+Na]⁺: 263.0895, trouvé: 263.0904.

Benzyl-β-D-xylobioside (BZX₂) (Kadi et al. 2002)

Solide blanc; RMN ¹H (D₂O, 500 MHz): δ 3.29 (1 H, dd, *J*_{2',1'} 7.8, *J*_{2',3'} 9.2, 2'-H), 3.33 (1 H, m, 5'-H), 3.34-3.36 (1 H, m, 2-H), 3.42 (1 H, dd, *J*_{5,4} 10.1, *J*_{5,5} 11.8, 5-H), 3.46 (1 H, t, *J*_{3,2'} = *J*_{3',4'} 9.2, 3'-H), 3.57 (1 H, *J*_{3,2} = *J*_{3,4} 9.1, 3-H), 3.65 (1 H, ddd, *J*_{4',5'} 5.5, *J*_{4',3'} 9.2, *J*_{4',5'} 10.4, 4'-H), 3.81 (1 H, ddd, *J*_{4,5} 5.3, *J*_{4,3} 9.1, *J*_{4,5} 10.1, 4-H), 4.00 (1 H, *J*_{5',4'} 5.5, *J*_{5',5'} 11.5, 5'-H), 4.13 (1 H, *J*_{5,4} 5.3, *J*_{5,5} 11.8, 5-H), 4.49 (1 H, *J*_{1',2'} 7.8, 1'-H), 4.54 (1 H, *J*_{1,2} 7.8, 1-H), 4.76 (1 H, d, *J* 11.6, OCH₂), 4.92 (1 H, d, *J* 11.6, OCH₂), 7.40-7.50 (5 H, m, Ph); RMN ¹³C (D₂O, 125 MHz): δ 63.0 (C-5), 65.5 (C-5'), 69.2 (C-4'), 71.6 (OCH₂), 72.8 (C-2'), 72.9 (C-2), 73.8 (C-3), 75.6 (C-3'), 76.4 (C-4), 101.9 (C-1'), 102.0 (C-1); ESI-HRMS: *m/z* calculé pour C₁₇H₂₄O₉K: [M+K]⁺: 411.1057, trouvé: 411.1054.

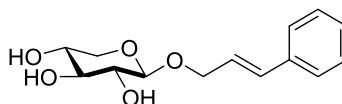
2-phényléthyl-β-D-xyloside (PTX)

Solide blanc; F = 80°C; [α]_D²⁰ -45.5° (0,20, H₂O); RMN ¹H (D₂O, 500 MHz): δ 2.93 (2 H, ddd, *J* 3.8, *J* 6.8, *J* 8.0, CH₂-Ph), 3.17-3.22 (2 H, m, 2-H et 5-H), 3.74-3.78 (1 H, m, 3-H), 3.48 (1 H, ddd, *J*_{4,5} 5.3, *J*_{4,3} 8.7, *J*_{4,5} 10.2, 4-H), 3.76 (1 H, ddd, *J* 6.8, *J* 8.0, *J* 9.7, OCH₂), 3.85 (1 H, dd, *J*_{5,4} 5.3, *J*_{5,5} 11.4, 5-H), 3.90 (1 H, ddd, *J* 6.8, *J* 8.0, *J* 9.7, OCH₂), 4.26 (1 H, d, *J*_{1,2} 7.5, 1-H), 7.18-7.30 (5 H, m, H Ph); RMN ¹³C (D₂O, 125 MHz): δ 37,2 (CH₂-Ph), 66.9 (C-5), 71.2 (C-4), 71.7 (OCH₂), 74.8 (C-3), 77.8 (C-2), 105.1 (C-1), 127.2 (C-H Ph), 129.4 (C-H Ph), 123.0 (C-H Ph), 130.3 (C-H Ph), 140.0 (C Ph); ESI-HRMS: *m/z* calculé pour C₁₃H₁₈O₅Na: [M+Na]⁺: 277.1052, trouvé: 277.1047; Anal. pour C₁₃H₁₈O₅·H₂O: C 57.34, H 7.14 ; trouvé, C 57.63, H 7.14.

2-phényléthyl-β-D-xylobioside (PTX₂)

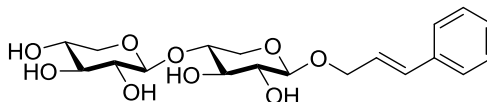
Solide blanc; F = 54°C; [α]_D²⁰ = -61.7 (0,21, H₂O); RMN ¹H (D₂O, 500 MHz): δ 2.93 (2 H, td, *J* 3.6, *J* 7.3, CH₂-Ph), 3.23-3.26 (4 H, m, 2-H, 2'-H, 5-H et 5'-H), 3.32-3.33 (1 H, m, 3'-H), 3.47 (1 H, t, *J*_{3,2} = *J*_{3,4} 8.7, 3-H), 3.51 (1 H, ddd, *J*_{4',5'} 5.4, *J*_{4',3'} 8.6, *J*_{4',5'} 10.3, 4'-H), 3.65 (1 H, ddd, *J*_{4,5} 5.3, *J*_{4,3} 8.7, *J*_{4,5} 10.0, 4-H), 3.74-3.78 (1 H, m, OCH₂), 3.92 (1 H, dd, *J*_{5',4'} 5.4, *J*_{5',5'} 11.5, 5'-H), 3.99-4.04 (2 H, m, OCH₂ et 5-H), 4.29 (1 H, d, *J*_{1,2} 7.5, 1-H), 4.34 (1 H, d, *J*_{1',2'} 7.6, 1'-H), 7.18-7.29 (5 H, m, H Ph); RMN ¹³C (D₂O, 125 MHz): δ 37.2 (CH₂-Ph), 64.8 (C-5), 67.1 (C-5'), 71.0 (C-4'), 71.7 (OCH₂), 74.3 (C-2'), 74.6 (C-2), 75.8 (C-3), 77.6 (C-3'), 78.2 (C-4), 104.0 (C-1), 104.8 (C-1'), 127.2 (C-H Ph), 129.3 (C-H Ph), 130.0 (C-H Ph), 140.0 (C Ph); ESI-HRMS: *m/z* calculé pour C₁₈H₂₆O₉Na: [M+Na]⁺: 409.1475, trouvé: 409.1477; Anal. calc pour C₁₈H₂₆O₉·H₂O: C 53.46, H 6.98 ; trouvé, C 53.69, H 6.79.

Cinnamyl-β-D-xyloside (CX)



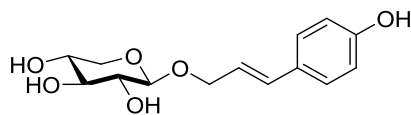
Solide blanc; F = 135°C; $[\alpha]_D^{20} = -60.0$ (0.22, H₂O); RMN ¹H (D₂O, 500 MHz): δ 3.12-3.15 (1 H, m, 2-H), 3.17 (1 H, dd, $J_{5,4}$ 10.3, $J_{5,5}$ 11.4, 5-H), 3.24-3.28 (1 H, m, 3-H), 3.43 (1 H, ddd, $J_{4,5}$ 5.4, $J_{4,3}$ 8.7, $J_{4,5}$ 10.3, 4-H), 3.81 (1 H, dd, $J_{5,4}$ 5.4, $J_{5,5}$ 11.4, 5-H), 4.22 (1 H, ddd, J 1.6, J 6.4, J 12.8, OCH₂), 4.24 (1 H, d, $J_{1,2}$ 7.6, 1-H), 4.40 (1 H, ddd, J 1.6, J 5.7, J 12.8, OCH₂), 6.29 (1 H, ddd, J 5.7, J 6.4, J 16. ?, OCH₂-CH), 6.61 (1 H, dt, J 1.6, J 16. ? OCH₂-CH=CH), 7.16-7.35 (5 H, m, H Ph); RMN ¹³C (D₂O, 125 MHz): δ 67.0 (C-5), 70.8 (OCH₂), 71.2 (C-4), 75.0 (C-2), 77.9 (C-3), 104.2 (C-1), 126.6 (OCH₂-CH), 127.5 (C-H Ph), 128.7 (C-H Ph), 129.6 (C-H Ph), 133.8 (OCH₂-CH=CH), 138.2 (C Ph); ESI-HRMS: m/z calculé pour C₁₄H₁₈O₅Na: [M+Na]⁺: 289.1052, trouvé: 289.1054; Anal. pour C₁₄H₁₈O₅: C 63.15, H 6.81 ; trouvé, C 62.99, H 6.80.

Cinnamyl-β-D-xylobioside (CX₂)



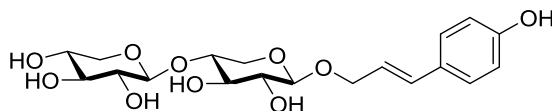
Solide blanc; F = 174°C; $[\alpha]_D^{20} = -75.6$ (0.24, H₂O); RMN ¹H (D₂O, 500 MHz): δ 3.27 (1 H, dd, $J_{2,1'}$ 7.9, $J_{2,3'}$ 9.2, 2'-H), 3.31 (1 H, dd, $J_{5',4'}$ 10.5, $J_{5',5'}$ 11.6, 5'-H), 3.34 (1 H, dd, $J_{2,1}$ 7.8, $J_{2,3}$ 9.1, 2-H), 3.39 (1 H, dd, $J_{5,4}$ 10.3, $J_{5,5}$ 11.8, 5-H), 3.45 (1 H, t, $J_{3',2'} = J_{3',4'}$ 9.2, 3'-H), 3.57 (1 H, t, $J_{3,2} = J_{3,4}$ 9.1, 3-H), 3.62 (1 H, ddd, $J_{4',5'}$ 5.5, $J_{4',3'}$ 9.2, $J_{4',5'}$ 10.5, 4'-H), 3.79 (1 H, ddd, $J_{4,5}$ 5.3, $J_{4,3}$ 9.1, $J_{4,5}$ 10.3, 4-H), 3.98 (1 H, dd, $J_{5',4'}$ 5.5, $J_{5',5'}$ 11.6, 5'-H), 4.09 (1 H, $J_{5,4}$ 5.3, $J_{5,5}$ 11.8, 5-H), 4.39 (1 H, ddd, J 1.3, J 6.9, J 12.7, OCH₂), 4.46 (1 H, d, $J_{1,2'}$ 7.9, 1'-H), 4.50 (1 H, d, $J_{1,2}$ 7.8, 1-H), 6.41 (1 H, dt, J 6.5, J 16. ? OCH₂-CH), 6.75 (2 H, d large, OCH₂-CH=CH), 7.35-7.54 (5 H, m, H Ph); RMN ¹³C (D₂O, 125 MHz): δ 62.9 (C-5), 65.2 (C-5'), 69.2 (C-4'), 70.4 (OCH₂), 72.7 (C-2'), 72.9 (C-2), 73.8 (C-3), 75.6 (C-3'), 76.4 (C-4), 101.8 (C-1), 107.8 (C-1'), 124.7 (OCH₂-CH), 126.6 (C-H Ph), 128.2 (C-H Ph), 128.9 (C-H Ph), 133.7 (OCH₂-CH=CH), 136.32 (C Ph); ESI-HRMS: m/z calculé pour C₁₉H₂₆O₉Na: [M+Na]⁺: 421.1475, trouvé: 421.1489; Anal. pour C₁₉H₂₆O₉: C 57.28, H 6.58 ; trouvé, C 57.02, H 6.57.

Coumaryl- β -D-xylobioside (COX)



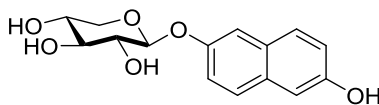
Solide blanc; décomposition à $T > 180^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D^{20} = -56.1$ (0,28, CH_3OH); RMN ^1H (CD_3OD , 600 MHz): δ 3.20 (1 H, dd, $J_{5,4}$ 10.3, $J_{5,5}$ 11.5, 5-H), 3.21 (1 H, dd, $J_{2,1}$ 7.6, $J_{2,3}$ 9.0, 2-H), 3.30-3.33 (1 H, m, 3-H), 3.50 (1 H, ddd, $J_{4,5}$ 5.4, $J_{4,3}$ 9.0, $J_{4,5}$ 10.3, 4-H), 3.86 (1H, dd, $J_{5,4}$ 5.4, $J_{5,5}$ 11.5, 5-H), 4.24 (1 H, ddd, $J_{1,5}$, $J_{6,8}$, $J_{12,3}$, OCH_2), 4.30 (1 H, $J_{1,2}$ 7.6, 1-H), 4.41 (1 H, ddd, $J_{1,5}$, $J_{6,0}$, $J_{12,3}$, OCH_2), 6.15 (1 H, ddd, $J_{6,0}$, $J_{6,8}$, $J_{15,8}$, $\text{OCH}_2\text{-CH}$), 6.57 (1 H, dd, $J_{1,5}$, $J_{15,8}$, $\text{OCH}_2\text{-CH=CH}$), 6.72 (2 H, dd, $J_{2,0}$, $J_{8,6}$, H Ph), 7.26 (2 H, dd, $J_{2,0}$, $J_{8,5}$, H Ph); ^{13}C RMN (CD_3OD , 150 MHz): δ 67.0 (C-5), 71.2 (OCH_2), 71.2 (C-4), 75.0 (C-2), 77.9 (C-3), 104.0 (C-1), 116.3 (2 C-H Ph), 123.3 ($\text{OCH}_2\text{-CH}$), 128.9 (2 C-H Ph), 129.7 (C-OH), 134.1 ($\text{OCH}_2\text{-CH=CH}$), 158.5 (C Ph); ESI-HRMS: m/z calculé pour $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_6\text{Na}$: $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 305.1001, trouvé: 305,1005; Anal. calc pour $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_6$, 0.33 H_2O : C 58.33, H 6.53 trouvé 58.66, H 6.21.

Coumaryl- β -D-xylobioside (COX₂)



Solide blanc; décomposition à $T > 96^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D^{20} = -74.3$ (0,24, CD_3OD); RMN ^1H (CD_3OD , 600 MHz): δ 3.42 (1 H, dd, $J_{2',1'}$ 7.9, $J_{2',3'}$ 9.1, 2'-H), 3.29-3.44 (3 H, m, 5'-H, 2-H et 5-H), 3.42 (1 H, t, $J_{4,5} = J_{4,5}$ 9.1, 3'-H), 3.54 (1 H, t, $J_{3',2'} = J_{3',4'}$ 9.1, 3'-H), 3.62 (1 H, ddd, $J_{4',5'}$ 5.5, $J_{4',3'}$ 9.1, $J_{4',5'}$ 10.6, 4'-H), 3.76 (1 H, ddd, $J_{4,5}$ 5.3, $J_{4,3}$ 9.2, $J_{4,5}$ 10.4, 4-H), 3.96 (1 H, dd, $J_{5',4'}$ 5.5, $J_{5',5'}$ 11.6, 5'-H), 4.07 (1 H, dd, $J_{5,4}$ 5.3, $J_{5,5}$ 11.8, 5-H), 4.33 (1 H, m, OCH_2), 4.44 (1 H, $J_{1',2'}$ 7.9, 1'-H), 4.43-4.48 (1 H, m, OCH_2), 4.49 (1 H, $J_{1,2}$ 7.9, 1-H), 6.22 (1 H, dt, $J_{7,0}$, $J_{16,0}$, $\text{OCH}_2\text{-CH}$), 6.65 (1 H, d, $J_{16,0}$, $\text{OCH}_2\text{-CH=CH}$), 6.88 (2 H, d, $J_{8,6}$, H Ph), 7.26 (2 H, $J_{8,6}$, H Ph); ^{13}C RMN (CD_3OD , 150 MHz): δ 62.9 (C-5), 65.2 (C-5'), 69.1 (C-4'), 70.6 (OCH_2), 72.7 (C-2'), 72.9 (C-2), 73.8 (C-3), 75.5 (C-3'), 76.3 (C-4), 101.6 (C-1), 101.8 (C-1'), 115.6 (2 C-H Ph), 122.1 ($\text{OCH}_2\text{-CH}$), 128.2 (2 C-H Ph), 128.8 (C-OH), 133.7 ($\text{OCH}_2\text{-CH=CH}$), 155.6 (C Ph); ESI-HRMS: m/z calculé pour $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_{10}\text{Na}$: $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 437.1424, trouvé: 437.1423; Anal. calc pour $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_{10}$, 1.33 H_2O : C 52.05, H 6.59 ; trouvé, C 52.24, H 6.35.

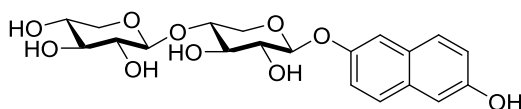
2-(6-hydroxynaphthyl)- β -D-xyloside (HX) (Jacobsson and Ellervik 2002)



RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz): δ 3.41 (1 H, dd, $J_{5,4}$ 9.9, $J_{5,5}$ 11.3, 5-H), 3.45 (1 H, m, 3-H), 3.47 (1 H, m, 2-H), 3.60 (1 H, ddd, $J_{4,5}$ 5.2, $J_{4,3}$ 8.4, $J_{4,5}$ 9.9, 4-H), 3.96 (1 H, dd, $J_{5,4}$ 5.2, $J_{5,5}$ 11.3, 5-H), 4.94 (1 H, d, $J_{1,2}$ 7.0, 1-H), 7.04 (1 H, dd, $J_{2,3}$, $J_{8,7}$, 7-H Naph), 7.07 (1 H, d, $J_{2,3}$, 5-H Naph), 7.19 (1 H, dd, $J_{2,2}$,

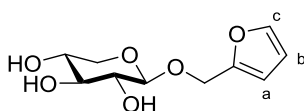
J 8.9, 3-H Naph), 7.34 (1 H, d, *J* 2.2, 1-H Naph), 7.57 (1 H, d, *J* 8.9, 4-H Naph), 7.62 (1 H, d, *J* 8.9, 8-H Naph); RMN ¹³C (CD₃OD, 125 MHz): δ 67.0 (C-5), 71.1 (C-4), 74.8 (C-2), 77.8 (C-3), 103.4 (C-1), 110.0 (C-5 Naph), 112.5 (C-1 Naph), 119.7 (C-7 Naph), 120.4 (C-3 Naph), 128.4 (C-4 Naph), 129.6 (C-8 Naph), 130.4 (C-Naph), 132.7 (C-Naph); ESI-MS: *m/z* calculé pour C₁₅H₁₆O₆Na: [M+Na]⁺: 315.28, trouvé: 315.1.

2-(6-hydroxynaphthyl)-β-D-xylobioside (HX₂)



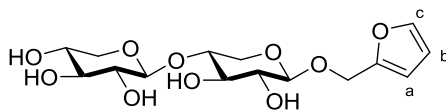
Solide gris; décomposition à T>220°C; [α]_D²⁰ = - 74,0 (0,20, CH₃OH); RMN ¹H (CD₃OD + ε DMSO d₆, 500 MHz): δ 3.27-3.29 (1 H, m, 5'-H), 3.50-3.52 (1 H, m, 2-H), 3.53-3.55 (1 H, m, 4'-H), 3.54-3.56 (1 H, m, 5-H), 3.60-3.62 (1 H, m, 3'-H), 3.64-3.66 (1 H, m, 3-H), 3.80 (1 H, ddd, *J*_{4,5} 5.2, *J*_{4,3} 8.5, *J*_{4,5} 9.8, 4-H), 3.94 (1 H, dd, *J*_{5',4'} 5.3, *J*_{5',5'} 11.4, 5'-H), 4.14 (1 H, dd, *J*_{5,4} 5.2, *J*_{5,5} 11.5, 5-H), 4.42 (1 H, d, *J*_{1',2'} 7.5, 1'-H), 5.04 (1 H, d, *J*_{1,2} 7.3, 1-H), 7.12 (1 H, dd, *J* 2.5, *J* 8.8, 7-H Naph), 7.14 (1 H, d, *J* 2.5, 5-H Naph), 7.25 (1 H, dd, *J* 2.4, *J* 8.9, 3-H Naph), 7.40 (1 H, d, *J* 2.4, 1-H Naph), 7.66 (1 H, d, *J* 8.9, 4-H Naph), 7.71 (1 H, d, *J* 8.9, 8-H Naph); RMN ¹³C (CD₃OD + ε DMSO d₆, 125 MHz): δ 64.6 (C-5), 67.2 (C-5'), 71.0 (C-2), 73.8 (C-3), 74.2 (C-2'), 74.6 (C-4'), 77.6 (C-4), 102.9 (C-1), 103.8 (C-1'), 110.0 (C-5 Naph), 112.4 (C-1 Naph), 120.0 (C-7 Naph), 120.5 (C-3 Naph), 128.7 (C-4 Naph), 129.7 (C-8 Naph), 130.2 (C-Naph), 132.5 (C-Naph); ESI-MS: *m/z* calculé pour C₂₀H₂₄O₁₀Na: [M+Na]⁺: 447.1267, trouvé: 447.1275; Anal. calc pour C₂₀H₂₄O₁₀: C 54.30, H 5.92, trouvé: C 54.30, H 5.93.

2-furanylméthyl-β-D-xyloside (FX)



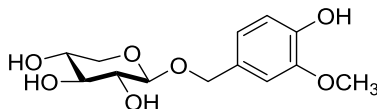
Solide blanc; F = 114°C; [α]_D²⁰ = -69.9 (0,19, H₂O); RMN ¹H (D₂O, 500 MHz): δ 3.28 (1 H, dd, *J*_{2,1} 7.8, *J*_{2,3} 9.2, 2-H), 3.33 (1 H, dd, *J*_{5,4} 10.7, *J*_{5,5} 11.7, 5-H), 3.42 (1 H, t, *J*_{3,2} = *J*_{3,4} 9.2, 3-H), 3.62 (1 H, ddd, *J*_{4,5} 5.5, *J*_{4,3} 9.2, *J*_{4,5} 10.6, 4-H), 3.97 (1 H, dd, *J*_{5,4} 5.5, *J*_{5,5} 11.7, 5-H), 4.48 (d, *J*_{1,2} 7.8, 1-H), 4.72 (1 H, dd, *J* 13.0, OCH₂), 4.82 (1 H, dd, *J* 13.0, OCH₂), 6.48 (1 H, dd, *J*_{b,c} 1.9, *J*_{b,a} 3.3, b-H), 6.54 (1 H, d, *J*_{a,b} 3.3, a-H), 7.57 (1 H, d, *J*_{c,b} 1.9, c-H); ¹³C RMN (D₂O, 125 MHz) δ 63.1 (OCH₂), 65.2 (C-5), 69.1 (C-4), 72.9 (C-2), 75.7 (C-3), 101.7 (C-1), 110.6 (C-b), 110.8 (C-a), 143.8 (C-c), 150.1 (OCH₂-C); ESI-HRMS: *m/z* calculé pour C₁₀H₁₄O₆Na: [M+Na]⁺: 253.0688, trouvé: 253.0678; Anal. pour C₁₀H₁₄O₆: C 52.17, H 6.13, trouvé: C 52.36, H 6.20.

2-furanylméthyl-β-D-xylobioside (FX₂)



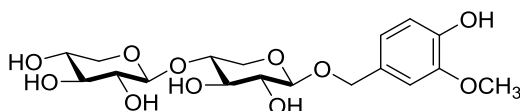
Solide blanc; F = 80°C; $[\alpha]_D^{20} = -75,0$ (0,16, H₂O); RMN ¹H (D₂O, 500 MHz): δ 3.25-3.36 (3 H, m, 2'-H, 2-H et 5'-H), 3.40 (1 H, dd, $J_{5,4}$ 10.3, $J_{5,5}$ 11.8, 5-H), 3.44 (1 H, t, $J_{3',2'} = J_{3',4'}$ 9.2, 3'-H), 3.55 (1 H, t, $J_{3,2} = J_{3,4}$ 9.1, 3-H), 3.63 (1 H, ddd, $J_{4',5'}$ 5.5, $J_{4',3'}$ 9.2, $J_{4',3'}$ 10.6, 4'-H), 3.78 (1 H, ddd, $J_{4,5}$ 5.3, $J_{4,3}$ 9.1, $J_{4,5}$ 10.5, 4-H), 3.98 (1 H, dd, $J_{5',4'}$ 5.5, $J_{5',5'}$ 11.6, 5'-H), 4.08 (1 H, $J_{5,4}$ 5.3, $J_{5,5}$ 11.8, 5-H), 4.47 (1 H, d, $J_{1',2'}$ 7.9, 1'-H), 4.50 (1 H, d, $J_{1,2}$ 7.8, 1-H), 4.74 (1 H, dd, J 13.0, OCH₂), 4.84 (1 H, dd, J 13.0, OCH₂), 6.48 (1 H, dd, $J_{b,c}$ 1.9, $J_{b,a}$ 3.3, b-H), 6.54 (1 H, d, $J_{a,b}$ 3.3, a-H), 7.57 (1 H, d, $J_{c,b}$ 1.9, c-H); RMN ¹³C (D₂O, 125 MHz): δ 62.9 (OCH₂), 63.1 (C-5), 65.2 (C-5'), 69.2 (C-4'), 72.7 (C-2'), 72.8 (C-2), 73.8 (C-3), 75.6 (C-3'), 76.3 (C-4), 101.6 (C-1), 101.8 (C-1'), 110.6 (C-b), 110.8 (C-a), 143.9 (C-c), 150.1 (OCH₂-C); ESI-HRMS: m/z calculé pour C₁₅H₂₂O₁₀Na: [M+Na]⁺: 385.1111, trouvé: 385.1113; Anal. pour C₁₅H₂₂O₁₀, H₂O: C 47.37, H 6.36 ; trouvé, C 47.19, H 6.07.

(4-hydroxy-3-méthoxyphényl)méthyl-β-D-xyloside (VAX)



Solide blanc; F = 162°C; $[\alpha]_D^{20} = -92.8$ (0,19, CH₃OH); RMN ¹H (CD₃OD, 500 MHz): δ 3.18 (1 H, dd, $J_{5,4}$ 10.3, $J_{5,5}$ 11.5, 5-H), 3.22 (1 H, dd, $J_{2,1}$ 7.5, $J_{2,3}$ 9.0, 2-H), 3.27-3.30 (1 H, m, 3-H), 3.50 (1 H, ddd, $J_{4,5}$ 5.4, $J_{4,3}$ 9.0, $J_{4,5}$ 10.3, 4-H), 3.85 (3 H, s, OCH₃), 3.89 (1 H, dd, $J_{5,4}$ 5.4, $J_{5,5}$ 11.5, 5-H), 4.27 (1 H, d, $J_{1,2}$ 7.5, 1-H), 4.53 (1 H, d, J 11.4, OCH₂), 4.75 (1 H, d, J 11.4, OCH₂), 6.75 (1 H, d, J 8.0, H Ph), 6.80 (1 H, dd, J 1.9, J 8.0, H Ph), 7.02 (1 H, d, J 1.9, H Ph); RMN ¹³C (CD₃OD, 125 MHz): δ 56.4 (OCH₃), 67.0 (C-5), 71.3 (C-4), 71.9 (OCH₂), 74.9 (C-2), 77.8 (C-3), 103.7 (C-1), 113.2 (C-H Ph), 115.8 (C-H Ph), 122.3 (C-H Ph), 130.3 (C Ph), 147.4 (C-OCH₃), 148.9 (C-OCH₃); ESI-HRMS: m/z calculé pour C₁₃H₁₈O₇Na: [M+Na]⁺: 309.0950, trouvé: 309.0948; Anal. calc pour C₁₃H₁₈O₇: C 54.54, H 6.34 ; trouvé, C 54.33, H 6.32.

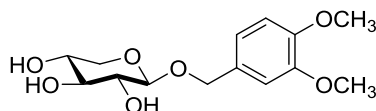
(4-hydroxy-3-méthoxyphényl)méthyl-β-D-xylobioside (VAX₂)



Solide blanc; RMN ¹H (D₂O, 600 MHz): δ 3.25 (1 H, dd, $J_{2,1}$ 7.9, 10.3, $J_{2,3}$ 9.2, 2'-H), 3.28-3.32 (2 H, m, 2-H et 5'-H), 3.37 (1 H, dd, $J_{5,4}$ 10.3, $J_{5,5}$ 11.9, 5-H), 3.42 (1 H, t, $J_{3',2'} = J_{3',4'}$ 9.2, 3'-H), 3.53 (1 H, t, $J_{3,2} = J_{3,4}$ 9.1, 3-H), 3.62 (1 H, ddd, $J_{4',5'}$ 5.4, $J_{4',3'}$ 5.4, $J_{4',5'}$ 9.2, 4'-H), 3.77 (1 H, ddd, $J_{4,5}$ 5.3, $J_{4,3}$ 9.1, $J_{4,5}$

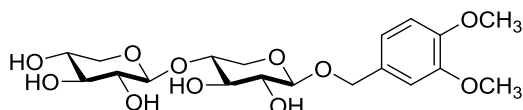
10.3, 4-H), 3.87 (3 H, s, OCH₃), 3.97 (1 H, dd, $J_{5',4'} 5.4$, $J_{5',5'} 11.6$, 5'-H), 4.09 (1 H, dd, $J_{5,4} 5.3$, $J_{5,5} 11.9$, 5-H), 4.46 (1 H, d, $J_{1,2} 7.9$, 1-H), 4.47 (1 H, d, $J_{1',2'} 7.9$, 1'-H), 4.64 (1 H, d, $J 11.4$, OCH₂), 4.79-4.81 (1 H, m, OCH₂), 6.91-6.93 (2 H, m, H Ph), 7.11 (1 H, d, $J 1.6$, H Ph); RMN ¹³C (D₂O, 150 MHz): δ 55.9 (OCH₃), 62.9 (C-5), 65.2 (C-5'), 69.1 (C-4'), 71.5 (OCH₂), 72.7 (C-2'), 72.9 (C-2), 73.8 (C-3), 75.6 (C-3'), 76.4 (C-4), 101.6 (C-1), 101.8 (C-1'), 113.1 (C-H Ph), 115.3 (C-H Ph), 122.1 (C-H Ph), 129.1 (C Ph), 144.9 (C-OH), 147.4 (C-OCH₃); ESI-HRMS: m/z calculé pour C₁₈H₂₆O₁₁Na: [M+Na]⁺: 441.1373, trouvé: 441.1374.

(3,4-diméthoxyphényl)méthyl-β-D-xyloside (VEX)



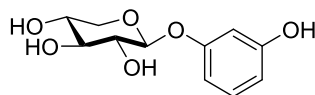
Solide blanc; F = 122°C ; $[\alpha]_D^{20} = -62.4$ (0.17, CH₃OH); RMN ¹H (CD₃OD, 500 MHz): δ 3.19 (1 H, dd, $J_{5,4} 10.3$, $J_{5,5} 11.6$, 5-H), 3.23 (1 H, dd, $J_{2,1} 7.5$, $J_{2,3} 9.0$, 2-H), 3.28-3.31 (1 H, m, 3-H), 3.50 (1 H, ddd, $J_{4,5} 5.4$, $J_{4,3} 9.0$, $J_{4,5} 10.3$, 4-H), 3.82 (3 H, s, OCH₃), 3.83 (3 H, s, OCH₃), 3.89 (1H, dd, $J_{5,4} 5.4$, $J_{5,5} 11.6$, 5-H), 4.27 (1 H, d, $J_{1,2} 7.5$, 1-H), 4.57 (1 H, d, $J 11.6$, OCH₂), 4.78 (1 H, d, $J 11.6$, OCH₂), 6.89-6.99 (2 H, m, H Ph), 7.06 (1 H, d, $J 1.5$, H Ph); RMN ¹³C (CD₃OD, 125 MHz): δ 56.4 (OCH₃), 56.5 (OCH₃), 67.0 (C-5), 71.3 (C-4), 71.7 (OCH₂), 74.9 (C-2), 77.9 (C-3), 103.8 (C-1), 112.6 (C-H Ph), 113.3 (C-H Ph), 121.9 (C-H Ph), 131.7 (C Ph), 150.2 (C-OCH₃), 150.5 (C-OCH₃); ESI-HRMS: m/z calculé pour C₁₄H₂₀O₇Na: [M+Na]⁺: 323.1107, trouvé: 311.1104; Anal. calc pour C₁₄H₂₀O₇: C 55.99, H 6.71 ; trouvé, C 55.64, H 6.81.

(3,4-diméthoxyphényl)méthyl-β-D-xylobioside (VEX₂)



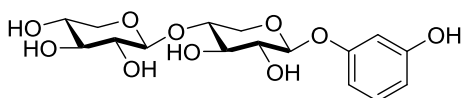
Solide blanc; RMN ¹H (D₂O, 600 MHz): δ 3.25 (1 H, dd, $J_{2,1} 7.9$, 10.3, $J_{2,3} 9.2$, 2'-H), 3.30-3.32 (2 H, m, 2-H et 5'-H), 3.37 (1 H, dd, $J_{5,4} 10.3$, $J_{5,5} 11.8$, 5-H), 3.42 (1 H, t, $J_{3',2'} = J_{3',4'} 9.3$, 3'-H), 3.52 (1 H, t, $J_{3,2} = J_{3,4} 9.2$, 3-H), 3.62 (1 H, m, 4'-H), 3.77 (1 H, m, 4-H), 3.86 (6 H, s, 2 OCH₃), 3.97 (1 H, dd, $J_{5',4'} 5.6$, $J_{5',5'} 11.7$, 5'-H), 4.09 (1 H, dd, $J_{5,4} 5.3$, $J_{5,5} 11.8$, 5-H), 4.46 (1 H, d, $J_{1,2} 7.5$, 1-H), 4.47 (1 H, d, $J_{1',2'} 7.5$, 1'-H), 4.66 (1 H, d, $J 11.5$, OCH₂), 4.79-4.81 (1 H, m, OCH₂), 7.03-7.05 (2 H, m, H Ph), 7.11 (1 H, d, $J 1.6$, H Ph); RMN ¹³C (D₂O, 150 MHz): δ 55.6 (OCH₃), 55.7 (OCH₃), 62.9 (C-5), 65.2 (C-5'), 69.1 (C-4'), 71.3 (OCH₂), 72.7 (C-2'), 72.9 (C-2), 73.8 (C-3), 75.6 (C-3'), 76.4 (C-4), 101.7 (C-1), 101.8 (C-1'), 111.6 (C-H Ph), 112.3 (C-H Ph), 121.8 (C-H Ph), 129.6 (C Ph), 148.1 (C-OCH₃), 148.1 (C-OCH₃); ESI-HRMS: m/z calculé pour C₁₉H₂₈O₁₁Na: [M+Na]⁺: 455.1529, trouvé: 455.1519.

3-hydroxyphényl β-D-xyloside



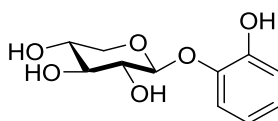
Solide gris ; RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz): δ 3.33 (1 H, dd, $J_{5,4}$ 10.2, $J_{5,5}$ 11.4, 5-H), 3.43-3.44 (2 H, m, 2-H et 3-H), 3.57 (1 H, ddd, $J_{4,5}$ 5.3, $J_{4,3}$ 8.8, $J_{4,5}$ 10.2, 4-H), 3.94 (1 H, dd, $J_{5,4}$ 5.4, $J_{5,5}$ 11.4, 5-H), 4.83-4.84 (1 H, m, 1-H), 6.48 (1 H, ddd, J 0.8, J 2.3, J 8.1, H Ph), 6.54-6.57 (2 H, m, H Ph), 7.09 (1 H, t, J 8.1, H Ph); RMN ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz): δ 66.9 (C-5), 71.0 (C-4), 74.7 (C-2), 77.7 (C-3), 102.8 (C-1), 105.1 (C-H Ph), 108.9 (C-H Ph), 110.5 (C-H Ph), 130.8 (C-H Ph), 158.9 (C-OH); 160.1 (C Ph).

3-hydroxyphényl β-D-xylobioside



Solide blanc; RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz): δ 3.25-3.31 (2 H, m, 2'-H et 5'-H), 3.36 (1 H, t, $J_{3,2'} = J_{3,4'}$ 9.0, 3'-H), 3.48 (1 H, dd, $J_{5,4}$ 10.0, $J_{5,5}$ 11.7, 5-H), 3.50 (1 H, dd, $J_{2,1}$ 7.6, $J_{2,3}$ 9.0, 2-H), 3.55 (1 H, ddd, $J_{4',5'}$ 5.4, $J_{4',3'}$ 9.0, $J_{4',5'}$ 10.3, 4'-H), 3.59 (1 H, t, $J_{3,2} = J_{3,4}$ 9.0, 3-H), 3.76 (1 H, ddd, $J_{4,5}$ 5.2, $J_{4,3}$ 9.0, $J_{4,5}$ 10.0, 4-H), 3.95 (1 H, dd, $J_{5',4'}$ 5.4, $J_{5',5'}$ 11.5, 5'-H), 4.10 (1 H, $J_{5,4}$ 5.2, $J_{5,5}$ 11.7, 5-H), 4.39 (1 H, d, $J_{1',2'}$ 7.6, 1'-H), 4.86 (1 H, m, 1-H), 6.48 (1 H, ddd, J 0.8, J 2.3, J 8.1, H Ph), 6.54-6.57 (2 H, m, H Ph), 7.10 (1 H, t, J 8.1, H Ph); RMN ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz): δ 64.5 (C-5), 67.1 (C-5'), 71.1 (C-4'), 74.3 (C-2'), 74.5 (C-2), 75.8 (C-3), 77.6 (C-3'), 77.9 (C-4), 102.6 (C-1), 104.0 (C-1'), 105.2 (C-H Ph), 108.9 (C-H Ph), 110.6 (C-H Ph), 130.8 (C-H Ph), 159.6 (C-OH); 160.0 (C Ph); ESI-HRMS: m/z calculé pour $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_{10}\text{Na}$: $[M+\text{Na}]^+$: 397.1111, trouvé: 397.1112.

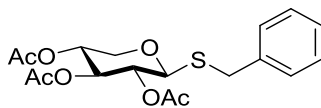
2-hydroxyphényl β-D-xyloside



Solide blanc ; RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz): δ 3.44 (1 H, dd, $J_{5,4}$ 10.4, $J_{5,5}$ 11.6, 5-H), 3.57 (1 H, t, $J_{3,2} = J_{3,4}$ 9.0, 3-H), 3.63 (1 H, dd, $J_{2,1}$ 7.6, $J_{2,3}$ 9.0, 2-H), 3.73 (1 H, ddd, $J_{4,5}$ 5.4, $J_{4,3}$ 9.0, $J_{4,5}$ 10.4, 4-H), 4.02 (1 H, dd, $J_{5,4}$ 5.4, $J_{5,5}$ 11.6, 5-H), 5.04 (1 H, d, $J_{1,2}$ 7.6, 1-H), 7.00-7.15 (4 H, m, H Ph) ; RMN ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz): δ 65.2 (C-5), 69.0 (C-4), 72.7 (C-2), 75.4 (C-3), 101.7 (C-1), 116.6 (C-H Ph), 117.0 (C-H Ph), 121.0 (C-H Ph), 124.3 (C-H Ph), 144.2 (C-OH), 145.7 (C Ph).

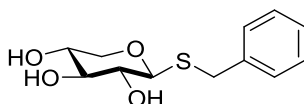
IV.3. C et S-xyloside

Benzyl 2,3,4-tri-*O*-acétyl-1-thio-β-D-xyloside



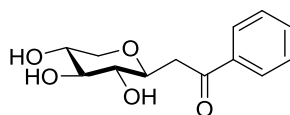
Solide blanc; F = 94°C; $[\alpha]_D^{20} = -123$ (0,23, CHCl₃); RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz): δ 2.01 (3 H, s, COCH₃), 2.01 (3 H, s, COCH₃), 2.02 (3 H, s, COCH₃), 3.31 (1 H, dd, $J_{5,4}$ 9.0, $J_{5,5}$ 11.7, 5-H), 3.80 (1 H, d, J 12.8, SCH₂), 3.88 (1 H, d, J 12.8, SCH₂), 4.22 (1 H, dd, $J_{5,4}$ 5.0, $J_{5,5}$ 11.7, 5-H), 4.38 (1 H, d, $J_{1,2}$ 8.3, 1-H), 4.90-4.94 (1 H, m, 4-H), 4.96 (1 H, t, $J_{2,1}=J_{2,3}$ 8.3, 2-H), 5.09 (1 H, t, $J_{3,2}=J_{3,4}$ 8.3, 3-H), 7.22-7.31 (5 H, m, C-H Ph); RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz): δ 20.9 (COCH₃), 34.2 (SCH₂), 65.4 (C-5), 66.8 (C-4), 69.8 (C-2), 72.13 (C-3), 82.6 (C-1), 127.5 (C-H Ph), 128.7 (C-H Ph), 129.2 (C-H Ph), 137.0 (C Ph), 169.6 (C=O), 169.9 (C=O), 170.1 (C=O); ESI-HRMS: m/z calculé pour C₁₈H₂₂O₇NaS: [M+Na]⁺: 405.0984, trouvé: 405.0991; Anal. calc pour C₁₈H₁₈O₄: C 56.53, H 5.44, S 8.38 ; trouvé, C 56.45, H 5.80, S 8.61.

Benzyl 1-thio-β-D-xyloside



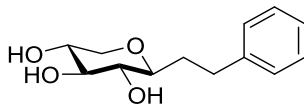
Solide blanc; F = 160°C; $[\alpha]_D^{20} = -137$ (0,23, H₂O); RMN ¹H (D₂O, 500 MHz): δ 3.21 (1 H, t, $J_{5,4}=J_{5,5}$ 11.1, 5-H), 3.37 (2 H, m, 2-H et 3-H), 3.58 (1 H, ddd, $J_{4,5}$ 5.6, $J_{4,3}$ 8.5, $J_{4,5}$ 11.1, 4-H), 3.92-3.94 (3 H, m, 2 H SCH₂ et 5-H), 4.26 (1 H, d, $J_{1,2}$ 7.3, 1-H), 7.31-7.35 (1 H, m, C-H Ph), 7.35-7.41 (4 H, m, C-H Ph); RMN ¹³C (D₂O, 125 MHz): δ 33.6 (SCH₂), 68.6 (C-5), 69.1 (C-4), 72.0 (C-2), 77.2 (C-3), 84.9 (C-1), 127.4 (C-H Ph), 128.8 (C-H Ph), 129.0 (C-H Ph), 137.8 (C Ph); ESI-HRMS: m/z calculé pour C₁₂H₁₆O₄NaS: [M+Na]⁺: 279.0667, trouvé: 279.0660; Anal. calc pour C₁₈H₂₂O₇, 0.20 H₂O: C 55.45, H 6.36, S 12.33 ; trouvé, C 55.70, H 6.49, S 12.47.

1-Phényl-2-C-(β-D-xylosyl)éthanone (Feng et al. 2011)



Solide blanc; F = 154°C; $[\alpha]_D^{20} = -30.3$ (0,20, H₂O); RMN ¹H (D₂O, 600 MHz): δ 3.22-3.26 (2 H, m, 5-H et 1 H CH₂), 3.33 (1 H, t, $J_{2,1}=J_{2,3}$ 9.4, 2-H), 3.44 (1 H, t, $J_{3,2}=J_{3,4}$ 9.4, 3-H), 3.55 (1 H, dd, J 2,7, J 16,7, 1 H CH₂), 3.60 (1 H, ddd, $J_{4,5}$ 5.5, $J_{4,3}$ 9.4, $J_{4,5}$ 10.9, 4-H), 3.85 (1 H, dd, J 2,7, J 16,7, H-1), 3.87 (1 H, dd, $J_{5,4}$ 5.5, $J_{5,5}$ 11.5, 5-H), 7.55 (2 H, t, J 7,7, C-H Ph), 7.69 (1 H, t, J 1,5s, J 7,7, C-H Ph), 7.98 (2 H, t, J 1,5, J 7,7, C-H Ph); RMN ¹³C (D₂O, 150 MHz): δ 41.0 (CH₂), 68.9 (C-5), 69.4 (C-4), 73.1 (C-2), 76.7 (C-1), 77.3 (C-3), 128.3 (2 C-H Ph), 128.9 (2 C-H Ph), 134.2 (C-H Ph), 136.2 (C Ph), 202.4 (C=O); Anal. calc pour C₁₃H₁₆O₅, 0.17 H₂O: C 61.17, H 6.45 ; trouvé, C 61.47, H 6.56.

Phényléthyl β -C-xyloside



Solide blanc; F = 165°C; $[\alpha]_D^{20} = -60.6$ (0,13, H₂O); RMN ¹H (D₂O, 500 MHz): δ 1.60-1.67 (1 H, m, CH₂-CH₂-Ph), 2.09-2.15 (1 H, m, CH₂-CH₂-Ph), 2.55 (1 H, m, CH₂-Ph), 2.63 (1 H, ddd, *J* 7.3, *J* 10.0, *J* 13.5, CH₂-Ph), 2.81 (1 H, ddd, *J* 4.6, *J* 10.0, *J* 13.5, 1 H CH₂-CH₂-Ph), 3.00-3.07 (2 H, m, 1-H et 5-H), 3.10 (1 H, t, *J*_{2,1} = *J*_{2,3} 9.0, 2-H), 3.21 (1 H, t, *J*_{3,2} = *J*_{3,4} 9.0, 3-H), 3.45 (1 H, ddd, *J*_{4,5} 5.5, *J*_{4,3} 9.0, *J*_{4,5} 10.5, 4-H), 3.89 (1 H, *J*_{5,4} 5.5, *J*_{5,5} 11.1, 5-H), 7.13 (1 H, t, *J* 7.5, C-H Ph), 7.16-7.19 (2 H, m, C-H Ph), 7.24 (2 H, t, *J* 7.5, C-H Ph); RMN ¹³C (D₂O, 125 MHz): δ 32.5 (CH₂-Ph), 35.1 (CH₂-CH₂-Ph), 71.0 (C-5), 71.7 (C-4), 75.51 (C-2), 79.9 (C-1), 80.7 (C-3), 126.7 (C-H Ph), 129.3 (C-H Ph), 129.5 (C-H Ph), 143.5 (C Ph); ESI-HRMS: *m/z* calculé pour C₁₃H₁₈O₄Na:[M+Na]⁺: 261.1097, trouvé: 261.1103; Anal. calc pour C₁₃H₁₈O₄, 0.25 H₂O : C 64.31, H 7.68 ; trouvé, C 64.68, H 7.78.

Conclusion générale et *perspectives*

Le développement des bioraffineries présente un intérêt majeur pour limiter notre dépendance aux ressources fossiles ainsi que pour limiter l'impact environnemental des activités humaines. En effet, l'utilisation de la biomasse végétale comme matière première renouvelable représente un moyen alternatif permettant d'obtenir des molécules d'intérêt, des biomatériaux et des biocarburants. Ce développement se base notamment sur une optimisation de l'utilisation de l'ensemble des constituants des végétaux.

La Région Champagne-Ardenne est la première région agricole de France et elle a basé son développement économique sur la valorisation des agro-ressources (blé, betterave, vigne...). La valorisation non alimentaire des co-produits des agro-ressources comme le son et la paille de blé est une thématique de recherche privilégiée en Région Champagne-Ardenne. Ces co-produits sont riches en hémicelluloses, essentiellement constituées d'hétéroxylanes, qui sont des macromolécules polysaccharidiques complexes riches en pentoses (D-xylose et L-arabinose).

Les β -D-xylopyranosides sont des molécules qui connaissent un intérêt grandissant grâce à leurs nombreuses applications en tant qu'initiateurs de la biosynthèse de GAGs (effet anti-prolifératif, applications cosmétiques, ...) et grâce à leurs propriétés physico-chimiques (tensio-actifs). Dans la plupart des cas, ces molécules d'intérêt sont obtenues à partir de D-xylose par une séquence réactionnelle chimique multi-étapes. L'abondance du D-xylose contenu dans la biomasse végétale et la volonté de proposer des conditions de synthèse mettant en œuvre des méthodologies de biotechnologies blanches ont conduit à des études sur la valorisation des hémicelluloses vers des molécules d'intérêt par synthèse enzymatique.

Dans ce contexte, les xylanases sont des biocatalyseurs intéressants car elles permettent de catalyser des réactions de transglycosylation en présence d'accepteurs nucléophiles (alcools) à partir de xylanes et d'obtenir en une seule étape des molécules originales ($DP \geq 1$) avec une stéréosélectivité contrôlée β , difficiles à obtenir par synthèse chimique. L'un des objectifs de ce travail de thèse était de mettre au point la production, par synthèse enzymatique ou chimio-enzymatique, de nouveaux β -xylosides et β -xylobiosides fonctionnalisés par des aglycones de différentes natures puis d'évaluer leur capacité à initier la biosynthèse des glycosaminoglycanes. L'ensemble de ce travail a été réalisé dans le cadre d'un projet de recherche pluridisciplinaire et multi-partenaires, le projet XYLOCOS, financé par la Région Champagne-Ardenne et le FEDER.

Utilisation des xylanases en synthèse :

Parmi les différentes familles de xylanases, les familles 10 et 11 sont les plus connues et les plus étudiées. Au laboratoire, deux enzymes recombinantes Tx-xyn10 et Tx-xyn11 dont les gènes ont été clonés à partir de *Thermobacillus xylanilyticus* sont disponibles et ont été comparées pour leur capacité de transglycosylation. La xylanase de la famille 10 permet une transglycosylation avec des accepteurs variés (Ochs 2012) contrairement à la xylanase 11 qui catalyse la transglycosylation uniquement en présence d'accepteurs de type polyphénols. Cette

particularité avait déjà été mise en avant par Chiku *et al.* avec une xylanase 11 (Chiku et al. 2008, Chiku et al. 2009).

C'est dans ce contexte que nous avons développé une étude structure-fonction de la Tx-xyn11 en vue de cibler une amélioration de ses capacités de transglycosylation. L'objectif de ce travail était de moduler la spécificité de la xylanase Tx-xyn11 envers les accepteurs afin qu'elle puisse catalyser des réactions de transglycosylation avec des alcools aliphatiques et l'alcool benzylique. Une étude *in silico* nous a conduit à sélectionner un résidu du site actif, le tryptophane 126 car sa mutation en alanine permettait la transglycosylation avec des alcools primaires (chaînes linéaires et alcool benzylique). Parallèlement, nous avons observé la limitation de la réaction de transglycosylation avec les polyphénols. Cette enzyme mutée a été produite afin d'étudier le rôle du résidu W126 lors de la transglycosylation. L'étude du mutant Tx-xyn11 W126A en comparaison à la Tx-xyn11 a montré l'importance du résidu W126 sur l'activité hydrolytique de l'enzyme avec une diminution de 47% de l'activité spécifique de cette enzyme et la diminution de l'efficacité catalytique (k_{cat}/K_M) sur les xylanes de hêtre d'un facteur 4. Le mutant Tx-xyn11 W126A a permis d'améliorer la transglycosylation avec les alcools primaires aliphatiques comme le butanol et le pentanol mais également avec l'alcool benzylique avec un rendement de synthèse deux fois plus important en benzyl xylobioside comparativement au rendement obtenu avec la xylanase non mutée. Cette amélioration de la réaction de transglycosylation pourrait s'expliquer par la diminution de l'activité hydrolytique en faveur de la transglycosylation ou par la diminution de l'encombrement stérique au sein du site actif qui permettrait un positionnement amélioré des accepteurs alcools aliphatiques.

L'étude in silico est un outil puissant qui permet de générer différentes hypothèses et qui a permis de cibler le résidu W126 comme jouant un rôle important lors de la catalyse de la réaction de transglycosylation avec certains accepteurs. Toutefois, notre approche était basée sur des structures protéiques figées ce qui présente certaines limites et peut conduire à des prédictions non vérifiées expérimentalement. Ainsi, il serait intéressant de générer des configurations initiales de la protéine dans différents états en utilisant des méthodes comme la dynamique moléculaire et l'analyse des modes normaux.

Nous avons également montré que la xylanase commerciale (NS22083) que nous avons identifiée comme une GH10 était capable de réaliser des réactions de transglycosylation avec de nombreux alcools aromatiques mais, selon la structure de l'alcool, la réaction de transglycosylation est plus ou moins efficace. La xylanase catalyse préférentiellement des réactions en présence d'alcools aromatiques comportant une fonction alcool primaire plutôt qu'une fonction phénol. La structure de l'alcool influe également sur le ratio DP1/DP2 pour des conditions de réactions identiques. L'hydrolyse secondaire est donc impactée par la nature de l'aglycone.

Ces réactions doivent être optimisées ainsi que la purification des produits de transglycosylation. Ces résultats montrent que la xylanase est un biocatalyseur intéressant car elle permet la synthèse d'une variété de xylosides comportant des aglycones aromatiques. D'autres synthèses pourraient être développées avec des alcools directement issus des agro-ressources comme le resvératrol qui connaît un intérêt grandissant (anti-oxydant, anti-tumoral, ...).

Une utilisation directe de la biomasse lignocellulosique, son ou paille de blé par exemple, n'est pas adaptée à une fonctionnalisation directe par transglycosylation à l'aide des xylanases. Une étape de prétraitement de la biomasse est indispensable, soit pour extraire les xylanes sous formes polymériques, soit pour libérer les xylo-oligosaccharides qui pourront être utilisés comme donneurs glucidiques par les xylanases. Dans notre étude, les réactions de transglycosylation ont été effectuées en présence de xylanes de hêtre commerciaux. Un hydrolysât riche en xylo-oligosaccharides obtenu à partir de son de blé traité par voie hydrothermale devra être réalisé avec une optimisation du prétraitement pour améliorer le rendement de production des oligosaccharides et optimiser le DP moyen des oligosaccharides obtenus.

Nous avons synthétisé des xylosides et des xylobiosides comportant un hétérocycle triazole par synthèse chimio-enzymatique. C'est une méthode de synthèse originale qui permet de combiner l'avantage de la réaction de transglycosylation (stéréosélectivité β en une étape, $DP \geq 1$, sucres non protégés) et de la réaction de « click » qui permet facilement d'accéder à de nombreuses molécules avec des rendements élevés grâce à la diversité des azotures disponibles. La réaction de transglycosylation en présence d'alcool propargylique a été optimisée en modifiant les paramètres expérimentaux comme la teneur en xylanes, la concentration en alcool, la dose de xylanase et le temps d'incubation et a permis d'obtenir un rendement satisfaisant de 15% en propargyl xyloside et xylobioside. Puis, la réaction de chimie « click » a permis la synthèse de nombreux xylosides et xylobiosides comportant un hétérocycle triazole avec des rendements élevés.

Cette stratégie de synthèse chimio-enzymatique est encore peu développée actuellement. Or, elle présente un potentiel intéressant pour la valorisation des agro-ressources grâce à l'utilisation de deux réactions combinées respectant les principes de la chimie verte. Il serait donc particulièrement intéressant de tester la capacité de transglycosylation de la xylanase commerciale avec d'autres alcools fonctionnalisés (hydroxyesters, alcools halogénés, carbonate de glycérol, ...). Après une étape chimique ultérieure de fonctionnalisation de la partie aglycone, cette stratégie permettra d'accéder à une variété de xylosides et xylobiosides originaux.

Ce travail a également permis de mettre en évidence que les xylanases des familles 10 et 11 qui ont été particulièrement étudiées pour leur capacité d'hydrolyse présentent des capacités de transglycosylation très différentes. La xylanase commerciale qui peut être assimilée à une

GH10 est capable de catalyser des réactions de transglycosylation avec des accepteurs aromatiques très variés mais également avec des accepteurs aliphatiques, alors que la xylanase Tx-xyn11 est spécifique des polyphénols. Non seulement la topologie du site actif des enzymes en lien avec la structure de l'accepteur influence les réactions de transglycosylation mais les conditions réactionnelles jouent également un rôle important notamment sur la compétition hydrolyse/transglycosylation. L'optimisation de ces conditions favorise la réaction de transglycosylation (temps, concentration en alcool, dose d'enzyme, ...). L'ingénierie moléculaire est également un moyen d'augmenter la transglycosylation avec la mutagenèse ou l'évolution dirigée.

*Une approche d'amélioration des capacités de transglycosylation de la xylanase Tx-xyn11 pourrait être envisagée par évolution dirigée. Cette technique a été développée sur une β -glycosidase de *Thermus Thermophilis* pour améliorer le ratio transglycosylation sur hydrolyse en orientant la sélection de mutants (Feng et al. 2005). Ainsi, dans notre cas, nous pourrions sélectionner les mutants qui ont une activité de transglycosylation plus élevée pour des alcools comportant une fonction alcool primaire et identifier ensuite les résidus impliqués, afin d'élargir notre compréhension sur la spécificité de la xylanase 11 pour les polyphénols.*

Evaluation biologique des xylosides et xylobiosides produits:

Depuis plus de 40 ans, les β -xylopyranosides sont connus pour être des initiateurs de la biosynthèse de GAGs. La nature de la partie aglycone a une influence sur la capacité de synthèse et sur la nature des GAGs produits, le degré de sulfatation, ... L'objectif de la thèse était de produire des β -xylosides et β -xylobiosides fonctionnalisés par des aglycones de différentes natures puis d'évaluer leur capacité à initier la biosynthèse des glycosaminoglycanes pour des applications dans le domaine cosmétique. A notre connaissance, pour la première fois, le rôle du degré de polymérisation des xylosides dans l'initiation de la biosynthèse des GAGs a été étudié.

Ces xylosides et xylobiosides ont été testés pour leur capacité à initier la biosynthèse par voie exogène de GAGs sur un modèle cellulaire (CHO pgsA-745), déficient en xylosyltransférase. Tous les xylosides et xylobiosides testés sont des amorceurs de la biosynthèse de GAGs. Les composés à aglycones hydrophobes et notamment ceux comportant un résidu aromatique sont les plus efficaces pour initier la synthèse des GAGs. Une augmentation de la polarité de la partie aglycone conduit à une diminution importante de cette biosynthèse. De façon générale, les xylobiosides sont moins efficaces que leurs équivalents xylosides, donc l'augmentation du degré de polymérisation de la partie glycone a une influence sur la synthèse des GAGs. Notre étude a montré que les xylobiosides pénétraient moins efficacement dans les cellules et qu'ils étaient des substrats moins efficaces pour l'étape de galactosylation enzymatique catalysée par la β 4GalT7. En accord avec des données récentes de la littérature, nous avons conclu que la diminution de l'efficacité catalytique de la β 4GalT7 pour les xylobiosides pourrait être expliquée par le xylose

lié à l'aglycone qui ne s'accommoderait pas aussi bien dans l'environnement hydrophobe à l'extérieur du site actif que la partie aglycone de certains xylosides (Tsutsui et al. 2013, Saliba et al. 2015).

Lors de l'évaluation biologique, l'étude de dose-dépendance est indispensable car l'influence de la variation de l'aglycone sur l'amorçage de la synthèse de GAGs diminue avec l'augmentation de la concentration. En effet, à 100 μ M, de nombreux xylosides amorcent la synthèse de GAGs de manière équivalente à la molécule de référence Umb-Xyl. Cette étude a permis d'identifier quatre xylosides intéressants (Figure 117): le composé **3e**, porteur d'un substituant phényle sur l'hétérocycle triazole, mais également le cinnamyl xyloside (**CX**), le phénéthyl xyloside (**PTX**) ainsi que le benzyl xyloside (**BZX**) car à faible concentration (1 μ M), ils sont aussi voire plus efficaces que l'Umb-Xyl.

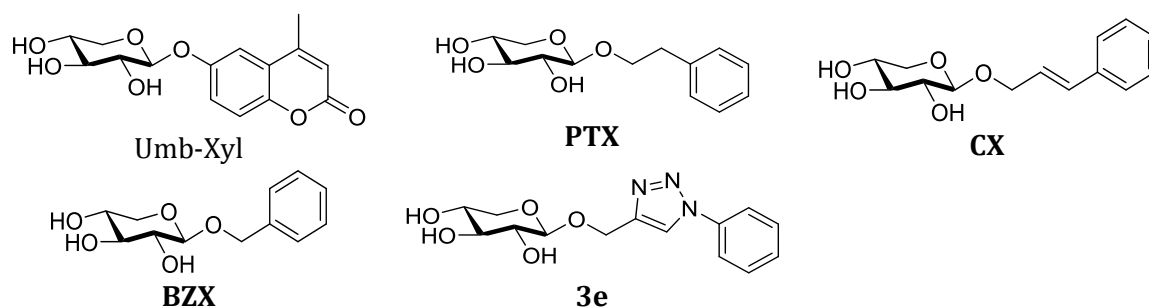


Figure 117. Structures des xylosides sélectionnés pour leur capacité élevée à amorcer la synthèse de GAGs et le témoin Umb-Xyl.

Les procédés de synthèse de ces xylosides qui permettent un amorçage très efficace de la biosynthèse de GAGs doivent être améliorés, notamment la méthode de purification par chromatographie, dans le but d'une valorisation à l'échelle industrielle.

Tous les tests biologiques de ces xylosides sélectionnés (cytotoxicité, criblage) devront être maintenant réalisés sur des fibroblastes, cellules humaines présentes dans le derme qui sécrètent des PGs et des GAGs afin de cibler une application cosmétique. Des études complémentaires devront être effectuées pour déterminer la nature et la composition des chaînes de GAGs produites selon la partie aglycone et le DP des xylosides synthétisés. En effet, selon la nature des GAGs, les applications divergent (anti-thrombotique, antiprolifératif, cosmétique, ...), il est donc nécessaire de connaître la nature des GAGs synthétisés par les xylosides pour viser une application cosmétique.

BIBLIOGRAPHIE

ABAD-ROMERO, B., MEREITER, K., SIXTA, H., HOFINGER, A. and KOSMA, P., Synthesis of regioselectively sulfated xylodextrins and crystal structure of sodium methyl β -D-xylopyranoside 4-O-sulfate hemihydrate. - *Carbohydrate Research* - 2009, 344 (1), 21-28.

ABRAHAMSSON, C. O., ELLERVIK, U., ERIKSSON-BAJTNER, J., JACOBSSON, M. and MANI, K., Xylosylated naphthoic acid-amino acid conjugates for investigation of glycosaminoglycan priming. - *Carbohydrate Research* - 2008, 343 (9), 1473-1477.

AFRATIS, N., GIALELI, C., NIKITOVIC, D., TSEGENIDIS, T., KAROUSOU, E., THEOCHARIS, A. D., PAVAO, M. S., TZANAKAKIS, G. N. and KARAMANOS, N. K., Glycosaminoglycans: key players in cancer cell biology and treatment. - *FEBS Journal* - 2012, 279 (7), 1177-1197.

AGBOR, V. B., CICEK, N., SPARLING, R., BERLIN, A. and LEVIN, D. B., Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. - *Biotechnology Advances* - 2011, 29 (6), 675-685.

ANDREWS, S. R., CHARNOCK, S. J., LAKEY, J. H., DAVIES, G. J., CLAEYSSSENS, M., NERINCKX, W., UNDERWOOD, M., SINNOTT, M. L., WARREN, R. A. J. and GILBERT, H. J., Substrate specificity in glycoside hydrolase family 10 - Tyrosine 87 and Leucine 314 play a pivotal role in discriminating between glucose and xylose binding in the proximal active site of pseudomonas cellulosa xylanase 10A. - *The Journal of biological chemistry* - 2000, 275 (30), 23027-23033.

ARAGAO-LEONETI, V., CAMPO, V. L., GOMES, A. S., FIELD, R. A. and CARVALHO, I., Application of copper(I)-catalysed azide/alkyne cycloaddition (CuAAC) 'click chemistry' in carbohydrate drug and neoglycopolymer synthesis. - *Tetrahedron* - 2010, 66 (49), 9475-9492.

ARMSTRONG, Z., REITINGER, S., KANTNER, T. and WITHERS, S. G., Enzymatic Thioxyloside Synthesis: Characterization of Thioglycoligase Variants Identified from A Site-Saturation Mutagenesis Library of Bacillus Circulans Xylanase. - *ChemBiochem* - 2010, 11 (4), 533-538.

ASANUMA, M., MIYAZAKI, I. and OGAWA, N., Dopamine- or L-DOPA-induced neurotoxicity: The role of dopamine quinone formation and tyrosinase in a model of Parkinson's disease. - *Neurotoxicity Research* - 2003, 5 (3), 165-176.

AUGE, J. and SIZUN, G., Ionic liquid promoted atom economic glycosylation under Lewis acid catalysis. - *Green Chemistry* - 2009, 11 (8), 1179-1183.

BALLOU, C. E., ROSEMAN, S. and LINK, K. P., Reductive Cleavage of Benzyl Glycosides for Relating Anomeric Configurations. Preparation of Some New Benzyl Pentosides. - *Journal of the American Chemical Society* - 1951, 73 (3), 1140-1144.

BANOUB, J. and BUNDLE, D. R., 1,2-orthoacetate intermediates in silver trifluoromethanesulfonate promoted Koenigs-Knorr synthesis of disaccharide glycosides. - *Canadian Journal of Chemistry* - 1979, 57 (16), 2091-2097.

BANSAL, P., VOWELL, B. J., HALL, M., REALFF, M. J., LEE, J. H. and BOMMARIUS, A. S., Elucidation of cellulose accessibility, hydrolysability and reactivity as the major limitations in the enzymatic hydrolysis of cellulose. - *Bioresource Technology* - 2012, 107, 243-250.

BEAUGRAND, J., CHAMBAT, G., WONG, V. W. K., GOUBET, F., REMOND, C., PAES, G., BENAMROUCHE, S., DEBEIRE, P., O'DONOHUE, M. and CHABBERT, B., Impact and efficiency of GH10 and GH11 thermostable endoxylanases on wheat bran and alkali-extractable arabinoxylans. - *Carbohydrate Research* - 2004, 339 (15), 2529-2540.

BELLAMY, F., BARBEROUSSE, V., MARTIN, N., MASSON, P., MILLET, J., SAMRETH, S., SEPULCHRE, C., THEVENIAUX, J. and HORTON, D., Thioxyloside derivatives as orally-active venous antithrombotics. - *European Journal of Medicinal Chemistry* - 1995, 30, S101-S115.

BELLAMY, F., HORTON, D., MILLET, J., PICART, F., SAMRETH, S. and CHAZAN, J. B., Glycosylated derivatives of benzophenone, benzhydrol, and benzhydryl as potential venous antithrombotic agents. - *Journal of Medicinal Chemistry* - 1993, 36 (7), 898-903.

BERLIN, A., BALAKSHIN, M., GILKES, N., KADLA, J., MAXIMENKO, V., KUBO, S. and SADDLER, J., Inhibition of cellulase, xylanase and β -glucosidase activities by softwood lignin preparations. - *Journal of Biotechnology* - 2006, 125 (2), 198-209.

BIELY, P., VRSANSKA, M., TENKANEN, M. and KLUEPFEL, D., Endo- β -1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. - *Journal of Biotechnology* - 1997, 57 (1-3), 151-166.

BISHOP, C. T. and COOPER, F. P., Glycosidation of sugars. I. Formation of methyl D-xylosides. - *Canadian Journal of Chemistry* - 1962, 40, 224-232.

BONAWITZ, N. D. and CHAPPLE, C., The genetics of lignin biosynthesis: connecting genotype to phenotype. - *Annual review of genetics* - 2010, 44, 337-363.

BONDOUX, M., MIGNON, L., OU, K., RENAUT, P., THOMAS, D. and BARBEROUSSE, V., Palladium-catalyzed C-C coupling: efficient preparation of new 5-thio- β -D-xylopyranosides as oral venous antithrombotic drugs. - *Tetrahedron Letters* - 2009, 50 (27), 3872-3876.

BONNIN, E., DAVIET, S., SORESENSEN, J. F., SIBBESEN, O., GOLDSOHN, A., JUGE, N. and SAULNIER, L., Behaviour of family 10 and 11 xylanases towards arabinoxylans with varying structure. - *Journal of the Science of Food and Agriculture* - 2006, 86 (11), 1618-1622.

BOUQUILLON, S., D-Xylose and L-Arabinose-based surfactants: Synthesis, reactivity and physico-chemical properties. - *Comptes Rendus Chimie* - 2011, 14 (7-8), 716-725.

BOUXIN, F., MARINKOVIC, S., LE BRAS, J. and ESTRINE, B., Direct conversion of xylan into alkyl pentosides. - *Carbohydrate Research* - 2010, 345 (17), 2469-2473.

BRUSA, C., OCHS, M., REMOND, C., MUZARD, M. and PLANTIER-ROYON, R., Chemoenzymatic synthesis of "click" xylosides and xylobiosides from lignocellulosic biomass. - *RSC Advances* - 2014, 4 (18), 9330-9338.

BUI, C., TALHAOU, I., CHABEL, M., MULLIERT, G., COUGHTRIE, M. W. H., OUZZINE, M. and FOURNEL-GIGLEUX, S., Molecular characterization of beta 1,4-galactosyltransferase 7 genetic mutations linked to the progeroid form of Ehlers-Danlos syndrome (EDS). - *FEBS Letters* - 2010, 584 (18), 3962-3968.

CADOTTE, J. E., SMITH, F. and SPRIESTERSBACH, D., A new synthesis of glycosides. - *Journal of the American Chemical Society* - 1952, 74 (6), 1501-1504.

CAPON, B., Mechanism in carbohydrate chemistry. - *Chemical Reviews* - 1969, 69 (4), 407-498.

CARVALHEIRO, F., DUARTE, L. C. and GIRIO, F. M., Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. - *Journal of Scientific & Industrial Research* - 2008, 67 (11), 849-864.

CASTOLDI, R., BRACHT, A., DE MORAIS, G. R., BAESSO, M. L., CORREA, R. C. G., PERALTA, R. A., MOREIRA, R., POLIZELI, M., DE SOUZA, C. G. M. and PERALTA, R. M., Biological pretreatment of Eucalyptus grandis sawdust with white-rot fungi: Study of degradation patterns and saccharification kinetics. - *Chemical Engineering Journal* - 2014, 258, 240-246.

CAVEZZA, A., BOULLE, C., GUEGUINIAT, A., PICHAUD, P., TROUILLE, S., RICARD, L. and DALKO-CSIBA, M., Synthesis of Pro-Xylane: a new biologically active C-glycoside in aqueous media. - *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* - 2009, 19 (3), 845-849.

CAVEZZA, A. and DALKO, M. Preparation of C-xyloside oxime compounds and their cosmetic use. FR2939138A1, 2010.

CHARLIN, R., BARCAUI, C. B., KAC, B. K., SOARES, D. B., RABELLO-FONSECA, R. and AZULAY-ABULAFIA, L., Hydroquinone-induced exogenous ochronosis: a report of four cases and usefulness of dermoscopy. - *International Journal of Dermatology* - 2008, 47 (1), 19-23.

CHARNOCK, S. J., SPURWAY, T. D., XIE, H. F., BEYLOT, M. H., VIRDEN, R., WARREN, R. A. J., HAZLEWOOD, G. P. and GILBERT, H. J., The topology of the substrate binding clefts of glycosyl hydrolase family 10 xylanases are not conserved. - *Journal of Biological Chemistry* - 1998, 273 (48), 32187-32199.

CHEN, H. Z. and LIU, Z. H., Steam explosion and its combinatorial pretreatment refining technology of plant biomass to bio-based products. - *Biotechnology Journal* - 2015, 10 (6), 866-885.

CHEN, L. Q. and KONG, F. Z., An efficient and practical synthesis of β -(1 $\rightarrow$ 3)-linked xylooligosaccharides. - *Carbohydrate Research* - 2002, 337 (21-23), 2335-2341.

CHENG, F., JOHNSON, R., NILSSON, J., FRANSSON, L. A., ELLERVIK, U. and MANI, K., Potentiation of naphthoxyloside cytotoxicity on human tumor cells by difluoromethylornithine and spermine-NONOate. - *Cancer Letters* - 2009, 273 (1), 148-154.

CHIKU, K., DOHI, H., SAITO, A., EBISE, H., KOUZAI, Y., SHINOYAMA, H., NISHIDA, Y. and ANDO, A., Enzymatic synthesis of 4-hydroxyphenyl β -D-oligoxylosides and their notable tyrosinase inhibitory activity. - *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* - 2009, 73 (5), 1123-1128.

CHIKU, K., UZAWA, J., SEKI, H., AMACHI, S., FUJII, T. and SHINOYAMA, H., Characterization of a novel polyphenol-specific oligoxyloside transfer reaction by a

family 11 xylanase from *Bacillus* sp KT12. - *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* - 2008, 72 (9), 2285-2293.

CHUNDAWAT, S. P. S., BECKHAM, G. T., HIMMEL, M. E. and DALE, B. E. (2011). Deconstruction of Lignocellulosic Biomass to Fuels and Chemicals. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering, Vol 2*. J. M. Prausnitz. 2: 121-145.

CONNOLLY, D. T., ROSEMAN, S. and LEE, Y. C., Preparation of anomeric pairs of 1-thioglycosides - Use of anomerization catalyzed by boron-trifluoride. - *Carbohydrate Research* - 1980, 87 (2), 227-239.

CONTOUR, M.-O., DEFAYE, J., LITTLE, M. and WONG, E., Zirconium(IV) chloride-catalyzed synthesis of 1,2-trans-1-thioglycopyranosides. - *Carbohydrate Research* - 1989, 193 (0), 283-287.

COURTIN, C. M. and DELCOUR, J. A., Relative activity of endoxylanases towards water-extractable and water-unextractable arabinoxylan. - *Journal of Cereal Science* - 2001, 33 (3), 301-312.

CRICH, D. and DAI, Z. M., Direct synthesis of β -mannosides. Synthesis of β -D-Xyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-man-(1 $\rightarrow$ 4)- α -D-Glc-OMe: a trisaccharide component of the *Hyriopsis schlegelii* glycosphingolipid. Formation of an orthoester from a xylopyranosyl sulfoxide. - *Tetrahedron* - 1999, 55 (6), 1569-1580.

CRICH, D., DAI, Z. M. and GASTALDI, S., On the role of neighboring group participation and ortho esters in β -xylosylation: C-13 NMR observation of a bridging 2-phenyl-1,3-dioxalenium ion. - *Journal of Organic Chemistry* - 1999, 64 (14), 5224-5229.

DALIGAULT, F., RAHUEL-CLERMONT, S., GULBERTI, S., CUNG, M. T., BRANLANT, G., NETTER, P., MAGDALOU, J. and LATTARD, V., Thermodynamic insights into the structural basis governing the donor substrate recognition by human beta 1,4-galactosyltransferase 7. - *Biochemical Journal* - 2009, 418, 605-614.

DALKO, M. and BOULLE, C. New carboxyl C-xyloside compounds and use in cosmetics. FR2999076A1, 2014.

DALKO, M. and CAVEZZA, A. Preparation of aryl C-xyloside compounds and their use in cosmetics as antiaging agents. FR2939797A1, 2010a.

DALKO, M. and CAVEZZA, A. Preparation of C-xyloside amino acids and cosmetic use as antiaging agents. WO2010063953A2, 2010b.

DAMEZ, C., BOUQUILLON, S., HARAKAT, D., HÉNIN, F., MUZART, J., PEZRON, I. and KOMUNJER, L., Alkenyl and alkenoyl amphiphilic derivatives of D-xylose and their surfactant properties. - *Carbohydrate Research* - 2007, 342 (2), 154-162.

DAMEZ, C., ESTRINE, B., BESSMERTNYKH, A., BOUQUILLON, S., HENIN, F. and MUZART, J., Effects of the reactants concentration in the butadiene telomerization with D-xylose and parallel influence of triethylamine as additive. - *Journal of Molecular Catalysis a-Chemical* - 2006, 244 (1-2), 93-98.

DAVIES, G. and HENRISSAT, B., Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. - *Structure* - 1995, 3 (9), 853-859.

DAVIES, G. J., MACKENZIE, L., VARROT, A., DAUTER, M., BRZOZOWSKI, A. M., SCHULEIN, M. and WITHERS, S. G., Snapshots along an enzymatic reaction coordinate: Analysis of a retaining β -glycoside hydrolase. - *Biochemistry* - 1998, 37 (34), 11707-11713.

DAVIES, G. J., PLANAS, A. and ROVIRA, C., Conformational Analyses of the Reaction Coordinate of Glycosidases. - *Accounts of Chemical Research* - 2012, 45 (2), 308-316.

DAVIES, G. J., WILSON, K. S. and HENRISSAT, B., Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. - *Biochemical Journal* - 1997, 321, 557-559.

DAVIS, J. E. and LETTON, J. C. Alkyl glycosides. EP132043A1, 1985.

DE BRUYN, A., ANTEUNIS, M. J., AERTS, G. and SAMAN, E., A conformational study of some benzyl β -D-xylopyranoside derivatives. - *Carbohydrate Research* - 1975, 41 (1), 290-294.

DE BRUYNE, C. K. and VAN DER GROEN, G., Synthesis of β -D-xylopyranosides of cyclic and aromatic alcohols. - *Carbohydrate Research* - 1966, 2 (2), 173-175.

DEBEIRE-GOSSELIN, M., LOONIS, M., SAMAIN, E. and DEBEIRE, P. (1992). Purification and properties of a 22 kDa endoxylanase excreted by a new strain of thermophilic *Bacillus*. In Xylans and xylanases. J. Visser, G. Beldman, M. A. Kusters-van Someren and A. G. J. Voragen, eds, Amsterdam: Elsevier Science Publisher: pp. 463-466.

DELEU, M., DAMEZ, C., GATARD, S., NOTT, K., PAQUOT, M. and BOUQUILLON, S., Synthesis and physico-chemical characterization of bolaamphiphiles derived from alkenyl D-xylosides. - *New Journal of Chemistry* - 2011, 35 (10), 2258-2266.

DELEU, M., GATARD, S., PAYEN, E., LINS, L., NOTT, K., FLORE, C., THOMAS, R., PAQUOT, M. and BOUQUILLON, S., D-xylose-based bolaamphiphiles: Synthesis and influence of the spacer nature on their interfacial and membrane properties. - *Comptes Rendus Chimie* - 2012, 15 (1), 68-74.

DEMBITSKY, V. M., Astonishing diversity of natural surfactants: 1. Glycosides of fatty acids and alcohols. - *Lipids* - 2004, 39 (10), 933-953.

DEMCHENKO, A. V., *Handbook of chemical glycosylation: advances in stereoselectivity and therapeutic relevance*. John Wiley & Sons: 2008.

DEUTSCHMANN, R. and DEKKER, R. F. H., From plant biomass to bio-based chemicals: Latest developments in xylan research. - *Biotechnology Advances* - 2012, 30 (6), 1627-1640.

DIAS, A. A., FREITAS, G. S., MARQUES, G. S. M., SAMPAIO, A., FRAGA, I. S., RODRIGUES, M. A. M., EVTUGUIN, D. V. and BEZERRA, R. M. F., Enzymatic saccharification of biologically pre-treated wheat straw with white-rot fungi. - *Bioresource Technology* - 2010, 101 (15), 6045-6050.

DROUET, P., ZHANG, M. and LEGOY, M. D., Enzymatic-synthesis of alkyl β -D-xylosides by transxylosylation and reverse hydrolysis. - *Biotechnology and Bioengineering* - 1994, 43 (11), 1075-1080.

DROUET, P., ZHANG, M. and LEGOY, M. D. (1995). Production of alkyl β -D-xylosides with the trichoderma-reesei β -xylosidase. *Enzyme Engineering* Xii. M. D. Legoy and D. Thomas. New York, New York Acad Sciences. 750: 306-311.

DUCROS, V., CHARNOCK, S. J., DEREWENDA, U., DEREWENDA, Z. S., DAUTER, Z., DUPONT, C., SHARECK, F., MOROSOLI, R., KLUEPFEL, D. and DAVIES, G. J., Substrate specificity in glycoside hydrolase family 10 - Structural and kinetic analysis of the streptomyces lividans xylanase 10A. - *The Journal of biological chemistry* - 2000, 275 (30), 23020-23026.

DUMON, C., SONG, L. T., BOZONNET, S., FAURE, R. and O'DONOHUE, M. J., Progress and future prospects for pentose-specific biocatalysts in biorefining. - *Process Biochemistry* - 2012, 47 (3), 346-357.

DURETTE, P. L. and HORTON, D., Conformational studies on pyranoid sugar derivatives by N.M.R. spectroscopy. The conformational equilibria of some peracylated aldopentopyranosyl halides in solution. - *Carbohydrate Research* - 1971, 18 (1), 57-80.

EBRINGEROVA, A. and HEINZE, T., Xylan and xylan derivatives - biopolymers with valuable properties, 1 - Naturally occurring xylans structures, procedures and properties. - *Macromolecular Rapid Communications* - 2000, 21 (9), 542-556.

EBRINGEROVA, A., HROMADKOVA, Z. and HEINZE, T. (2005). Hemicellulose. *Polysaccharides 1: Structure, Characterization and Use*. T. Heinze. 186: 1-67.

EL ARABI AOUAD, M., EL MESLOUTI, A., UZAN, R. and BEAUPERE, D., A stereoselective O-aryl glycosylation procedure via 1,2-cyclic sulfite. - *Tetrahedron Letters* - 1994, 35 (34), 6279-6282.

ESKO, J. D., WEINKE, J. L., TAYLOR, W. H., EKBORG, G., RODEN, L., ANANTHARAMAIAH, G. and GAWISH, A., Inhibition of chondroitin and heparan-sulfate biosynthesis in Chinese-Hamster Ovary cell mutants defective in galactosyltransferase-I. - *Journal of Biological Chemistry* - 1987, 262 (25), 12189-12195.

ESTRINE, B., BOUQUILLON, S., HENIN, F. and MUZART, J., Telomerization of butadiene with L-arabinose and D-xylose in DMF: Selective formation of their monooetadienyl glycosides. - *European Journal of Organic Chemistry* - 2004, (13), 2914-2922.

ESTRINE, B., BOUQUILLON, S., HENIN, F. and MUZART, J., Telomerization of butadiene with pentoses in water: selective etherifications. - *Green Chemistry* - 2005, 7 (4), 219-223.

FENG, H. Y., DRONE, J., HOFFMANN, L., TRAN, V., TELLIER, C., RABILLER, C. and DION, M., Converting a β -glycosidase into a β -transglycosidase by directed evolution. - *Journal of Biological Chemistry* - 2005, 280 (44), 37088-37097.

FENG, W., FANG, Z., YANG, J., ZHENG, B. and JIANG, Y., Microwave-assisted efficient synthesis of aryl ketone β -C-glycosides from unprotected aldoses. - *Carbohydrate Research* - 2011, 346 (2), 352-356.

FERLIN, N., GATARD, S., VAN NHIEU, A. N., COURTY, M. and BOUQUILLON, S., Click Reactions as a Key Step for an Efficient and Selective Synthesis of D-Xylose-Based ILs. - *Molecules* - 2013, 18 (9), 11512-11525.

FERNANDEZ, C. J. and WARREN, G., In vitro synthesis of sulfated glycosaminoglycans coupled to inter-compartmental Golgi transport. - *Journal of Biological Chemistry* - 1998, 273 (30), 19030-19039.

FERREIRA-LEITAO, V., PERRONE, C. C., RODRIGUES, J., FRANKE, A. P. M., MACRELLI, S. and ZACCHI, G., An approach to the utilisation of CO₂ as impregnating agent in steam pretreatment of sugar cane bagasse and leaves for ethanol production. - *Biotechnology for Biofuels* - 2010, 3.

FERRIER, R. J. and FURNEAUX, R. H., Synthesis of 1,2-trans-related 1-thioglycoside esters. - *Carbohydrate Research* - 1976, 52 (1), 63-68.

FERRIER, R. J. and HATTON, L. R., Studies with radioactive sugars : Part I. Aspects of the alcoholysis of D-xylose and D-glucose; the role of the acyclic acetals. - *Carbohydrate Research* - 1968, 6 (1), 75-86.

FISCHER, E., Ueber die Glucoside der Alkohole. - *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* - 1893, 26 (3), 2400-2412.

FLETCHER, H. G., JR. and HUDSON, C. S., 1,5-Anhydro-xylitol. - *Journal of the American Chemical Society* - 1947, 69 (4), 921-924.

FRITZ, T. A., LUGEMWA, F. N., SARKAR, A. K. and ESKO, J. D., Biosynthesis of heparan-sulfate on β -D-xylosides depends on aglycone structure. - *The Journal of biological chemistry* - 1994, 269 (1), 300-307.

FUJIMOTO, Z., KANEKO, S., KUNO, A., KOBAYASHI, H., KUSAKABE, I. and MIZUNO, H., Crystal structures of decorated xylooligosaccharides bound to a family 10 xylanase from *Streptomyces olivaceoviridis* E-86. - *The Journal of biological chemistry* - 2004, 279 (10), 9606-9614.

FUNAYAMA, M., ARAKAWA, H., YAMAMOTO, R., NISHINO, T., SHIN, T. and MURAO, S., Effects of α -arbutin and β -arbutin on activity of tyrosinases from mushroom and mouse melanoma. - *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* - 1995, 59 (1), 143-144.

GARCIA-GARCIA, J. F., CORRALES, G., CASAS, J., FERNANDEZ-MAYORALAS, A. and GARCIA-JUNCEDA, E., Synthesis and evaluation of xylopyranoside derivatives as "decoy acceptors" of human β -1,4-galactosyltransferase 7. - *Molecular Biosystems* - 2011, 7 (4), 1312-1321.

GAREGG, P. J., KONRADSSON, P., KVARNSTROM, I., NORBERG, T., SVENSSON, S. C. T. and WIGILIUS, B., Studies on Koenigs-Knorr glycosidations. - *Acta Chemica Scandinavica Series B-Organic Chemistry and Biochemistry* - 1985, 39 (7), 569-577.

GARUD, D. R., TRAN, V. M., VICTOR, X. V., KOKETSU, M. and KUBERAN, B., Inhibition of heparan sulfate and chondroitin sulfate proteoglycan biosynthesis. - *The Journal of biological chemistry* - 2008, 283 (43), 28881-28887.

GATARD, S., NASIR, M. N., DELEU, M., KLAI, N., LEGRAND, V. and BOUQUILLON, S., Bolaamphiphiles Derived from Alkenyl L-Rhamnosides and Alkenyl D-Xylosides: Importance of the Hydrophilic Head. - *Molecules* - 2013, 18 (5), 6101-6112.

GATARD, S., SALMON, L., DERAEDT, C., RUIZ, J., ASTRUC, D. and BOUQUILLON, S., Gold Nanoparticles Stabilized by Glycodendrimers: Synthesis and Application to the Catalytic Reduction of 4-Nitrophenol. - *European Journal of Inorganic Chemistry* - 2014, (16), 2671-2677.

GENG, Y. Q., KUMAR, A., FAIDALLAH, H. M., ALBAR, H. A., MHKALID, I. A. and SCHMIDT, R. R., Cooperative Catalysis in Glycosidation Reactions with O-Glycosyl Trichloroacetimidates as Glycosyl Donors. - *Angewandte Chemie-International Edition* - 2013, 52 (38), 10089-10092.

GIRIO, F. M., FONSECA, C., CARVALHEIRO, F., DUARTE, L. C., MARQUES, S. and BOGEL-LUKASIK, R., Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. - *Bioresource Technology* - 2010, 101 (13), 4775-4800.

GODDARD-BORGER, E. D., SAKAGUCHI, K., REITINGER, S., WATANABE, N., ITO, M. and WITHERS, S. G., Mechanistic Insights into the 1,3-Xylanases: Useful Enzymes for Manipulation of Algal Biomass. - *Journal of the American Chemical Society* - 2012, 134 (8), 3895-3902.

GUO, W. F., HIRATAKE, J., OGAWA, K., YAMAMOTO, M., MA, S. J. and SAKATA, K., β -D-glycosylamidines: Potent, selective, and easily accessible β -glycosidase inhibitors. - *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* - 2001, 11 (4), 467-470.

HADAD, C., DAMEZ, C., BOUQUILLON, S., ESTRINE, B., HENIN, F., MUZART, J., PEZRON, I. and KOMUNJER, L., Neutral pentosides surfactants issued from the butadiene telomerization with pentoses: preparation and amphiphilic properties. - *Carbohydrate Research* - 2006, 341 (11), 1938-1944.

HADFIELD, A. F., LAZO, J. S. and SARTORELLI, A. C., Synthesis and cytotoxic activity of some haloacetamidoalkyl β -D-xylopyranosides. - *Carbohydrate Research* - 1979, 77 (DEC), 51-59.

HANSSON, T. and ADLERCREUTZ, P., Enhanced transglucosylation/hydrolysis ratio of mutants of *Pyrococcus furiosus* beta-glucosidase: Effects of donor concentration, water content, and temperature on activity and selectivity in hexanol. - *Biotechnology and Bioengineering* - 2001, 75 (6), 656-665.

HARRIS, G. W., PICKERSGILL, R. W., CONNERTON, I., DEBEIRE, P., TOUZEL, J. P., BRETON, C. and PEREZ, S., Structural basis of the properties of an industrially relevant thermophilic xylanase. - *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* - 1997, 29 (1), 77-86.

HASHIMOTO, M. and TAKAHASHI, M., Effective Friedel-Crafts acylation of O- and C-aryl-glycosides with triflic acid. - *Heterocycles* - 2009, 77 (1), 227-231.

HAUSSER, N., MARINKOVIC, S. and ESTRINE, B., New method for lignocellulosic biomass polysaccharides conversion in butanol, an efficient route for the production of butyl glycosides from wheat straw or poplar wood. - *Cellulose* - 2013, 20 (5), 2179-2184.

HEIN, C. D., LIU, X. M. and WANG, D., Click chemistry, a powerful tool for pharmaceutical sciences. - *Pharmaceutical Research* - 2008, 25 (10), 2216-2230.

HENRISSAT, B., A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid-sequence similarities. - *Biochemical Journal* - 1991, 280, 309-316.

HENRISSAT, B. and DAVIES, G., Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. - *Current Opinion in Structural Biology* - 1997, 7 (5), 637-644.

HIMMEL, M. E., DING, S.-Y., JOHNSON, D. K., ADNEY, W. S., NIMLOS, M. R., BRADY, J. W. and FOUST, T. D., Biomass recalcitrance: Engineering plants and enzymes for biofuels production. - *Science* - 2007, 315 (5813), 804-807.

HIROMI, K., NITTA, Y., NUMATA, C. and ONO, S., Subsite affinities of glucoamylase: examination of the validity of the subsite theory. - *Biochimica et Biophysica Acta* - 1973, 302 (2), 362-375.

HOLMQVIST, K., PERSSON, A., JOHNSON, R., LÖFGREN, J., MANI, K. and ELLERVIK, U., Synthesis and biology of oligoethylene glycol linked naphthoxylosides. - *Bioorganic & Medicinal Chemistry* - 2013, 21 (11), 3310-3317.

HSU, T. A., LADISCH, M. R. and TSAO, G. T., Alcohol from cellulose. - *Chemtech* - 1980, 10 (5), 315-319.

HUISGEN, R., 1,3-Dipolar Cycloadditions. Past and Future. - *Angewandte Chemie International Edition in English* - 1963a, 2 (10), 565-598.

HUISGEN, R., Kinetics and Mechanism of 1,3-Dipolar Cycloadditions. - *Angewandte Chemie International Edition in English* - 1963b, 2 (11), 633-645.

ISMAIL, A., SOULTANI, S. and GHOU, M., Enzymatic-catalyzed synthesis of alkylglycosides in monophasic and biphasic systems. I. The transglycosylation reaction. - *Journal of Biotechnology* - 1999a, 69 (2-3), 135-143.

ISMAIL, A., SOULTANI, S. and GHOU, M., Enzymatic-catalyzed synthesis of alkylglycosides in monophasic and biphasic systems. II. The reverse hydrolysis reaction. - *Journal of Biotechnology* - 1999b, 69 (2-3), 145-149.

JACOBSSON, M. and ELLERVIK, U., Synthesis of naphthoxylosides on solid support. - *Tetrahedron Letters* - 2002, 43 (37), 6549-6552.

JACOBSSON, M., ELLERVIK, U., BELTING, M. and MANI, K., Selective antiproliferative activity of hydroxynaphthyl- β -D-xylosides. - *Journal of Medicinal Chemistry* - 2006a, 49 (6), 1932-1938.

JACOBSSON, M., MALMBERG, J. and ELLERVIK, U., Aromatic O-glycosylation. - *Carbohydrate Research* - 2006b, 341 (10), 1266-1281.

JACOBSSON, M., MANI, K. and ELLERVIK, U., Effects of oxygen-sulfur substitution on glycosaminoglycanpriming naphthoxylosides. - *Bioorganic & Medicinal Chemistry* - 2007, 15 (15), 5283-5299.

JACOBSSON, M., WINANDER, C., MANI, K. and ELLERVIK, U., Xylose as a carrier for boron containing compounds. - *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* - 2008, 18 (7), 2451-2454.

JACQUET, N., MANIET, G., VANDERGHEM, C., DELVIGNE, F. and RICHEL, A., Application of Steam Explosion as Pretreatment on Lignocellulosic Material: A Review. - *Industrial & Engineering Chemistry Research* - 2015, 54 (10), 2593-2598.

JAIN, I., KUMAR, V. and SATYANARAYANA, T., Applicability of recombinant β -xylosidase from the extremely thermophilic bacterium *Geobacillus thermodenitrificans* in synthesizing alkylxylosides. - *Bioresource Technology* - 2014, 170, 462-469.

JOHNSSON, R., MANI, K. and ELLERVIK, U., Evaluation of fluorescently labeled xylopyranosides as probes for proteoglycan biosynthesis. - *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* - 2007a, 17 (8), 2338-2341.

JOHNSSON, R., MANI, K. and ELLERVIK, U., Synthesis and biology of bis-xylosylated dihydroxynaphthalenes. - *Bioorganic & Medicinal Chemistry* - 2007b, 15 (8), 2868-2877.

JOMMUENGBOUT, P., PINITGLANG, S., KYU, K. L. and RATANAKHANOKCHAI, K., Substrate-Binding Site of Family 11 Xylanase from *Bacillus firmus* K-1 by Molecular Docking. - *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* - 2009, 73 (4), 833-839.

JOSEPH, P., KLEIN-SZANTO, A. J. P. and JAISWAL, A. K., Hydroquinones cause specific mutations and lead to cellular transformation and in vivo tumorigenesis. - *British Journal of Cancer* - 1998, 78 (3), 312-320.

JUN, S. Y., PARK, K. M., CHOI, K. W., JANG, M. K., KANG, H. Y., LEE, S. H., PARK, K. H. and CHA, J., Inhibitory effects of arbutin- β -glycosides synthesized from enzymatic transglycosylation for melanogenesis. - *Biotechnology Letters* - 2008, 30 (4), 743-748.

KADI, N., BELLOY, L., CHALIER, P. and CROUZET, J. C., Enzymatic synthesis of aroma compound xylosides using transfer reaction by *Trichoderma longibrachiatum* xylanase. - *Journal of Agricultural and Food Chemistry* - 2002, 50 (20), 5552-5557.

KADI, N. and CROUZET, J., Transglycosylation reaction of endoxylanase from *Trichoderma longibrachiatum*. - *Food Chemistry* - 2008, 106 (2), 466-474.

KAMHI, E., JOO, E. J., DORDICK, J. S. and LINHARDT, R. J., Glycosaminoglycans in infectious disease. - *Biological Reviews* - 2013, 88 (4), 928-943.

KANEKO, S., KITAOKA, M., KUNO, A. and HAYASHI, K., Syntheses of 4-methylumbelliferyl- β -D-xylobioside and 5-bromo-3-indolyl- β -D-xylobioside for sensitive detection of xylanase activity on agar plates. - *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* - 2000, 64 (4), 741-745.

KANKAINEN, M., LAITINEN, T. and PERAKYLA, M., Recognition of reactive high-energy conformations by shape complementarity and specific enzyme-substrate interactions in family 10 and 11 xylanases. - *Physical Chemistry Chemical Physics* - 2004, 6 (21), 5074-5080.

KATAPODIS, P., VRSANSKA, M., KEKOS, D., NERINCKX, W., BIELY, P., CLAEYSSENS, M., MACRIS, B. J. and CHRISTAKOPOULOS, P., Biochemical and catalytic properties of an endoxylanase purified from the culture filtrate of *Sporotrichum thermophile*. - *Carbohydrate Research* - 2003, 338 (18), 1881-1890.

KATO, Y., NINOMIYA, M., YAMAGUCHI, Y. and KOKETSU, M., Synthesis of triazole- and tetrazole-xyloside analogues as potent hyaluronidase inhibitors. - *Medicinal Chemistry Research* - 2015, 24 (3), 1180-1188.

KEYARI, C. M. and POLT, R., Serine and Threonine Schiff Base Esters React with β -Anomeric Peracetates in the Presence of $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ to Produce β -Glycosides. - *Journal of Carbohydrate Chemistry* - 2010, 29 (4), 181-206.

KIDBY, D. K. and DAVIDSON, D. J., A convenient ferricyanide estimation of reducing sugars in the nanomole range. - *Analytical biochemistry* - 1973, 55 (1), 321-325.

KIM, J. M. and ROY, R., Phase Transfer Catalyzed Anomeric Nucleophilic Substitutions with D-Xylopyranosyl Halides. - *Journal of Carbohydrate Chemistry* - 1997, 16 (9), 1281-1292.

KIM, Y. J. and UYAMA, H., Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. - *Cellular and Molecular Life Sciences* - 2005, 62 (15), 1707-1723.

KLAI, N., BIDJOU-HAIOUR, C. and BOUQUILLON, S., D-Xylose-based surfactants: Synthesis, characterization and molecular modeling studies. - *Comptes Rendus Chimie* - 2015, 18 (6), 599-606.

KOLB, H. C., FINN, M. G. and SHARPLESS, K. B., Click chemistry: Diverse chemical function from a few good reactions. - *Angewandte Chemie-International Edition* - 2001, 40 (11), 2004-2021.

KOLB, H. C. and SHARPLESS, K. B., The growing impact of click chemistry on drug discovery. - *Drug Discovery Today* - 2003, 8 (24), 1128-1137.

KOLENOVA, K., VRSANSKA, M. and BIELY, P., Mode of action of endo- β -1,4-xylanases of families 10 and 11 on acidic xylooligosaccharides. - *Journal of Biotechnology* - 2006, 121 (3), 338-345.

KOLSET, S. O., SAKURAI, K., IVHED, I., OVERVATN, A. and SUZUKI, S., The effect of β -D-xylosides on the proliferation and proteoglycan biosynthesis of monoblastic U-937 cells. - *Biochemical Journal* - 1990, 265 (3), 637-645.

KONSTANTINOVIC, S., PETROVIC, Z., SPASOJEVIC, A. and MOJSILOVIC, B., Synthesis of C-7-C-16-alkyl glycosides: Part II - Synthesis of alkyl D-xylopyranosides in the presence of tin(IV) chloride as a Lewis acid catalyst. - *Indian Journal of Chemistry Section B-Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry* - 2001, 40 (7), 614-618.

KOSHLAND, D. E., Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions. - *Biological Reviews* - 1953, 28 (4), 416-436.

KUBERAN, B., ETHIRAJAN, M., VICTOR, X. V., TRAN, V., NGUYEN, K. and DO, A., "Click" xylosides initiate glycosaminoglycan biosynthesis in a mammalian cell line. - *Chembiochem* - 2008, 9 (2), 198-200.

KUMAR, P., BARRETT, D. M., DELWICHE, M. J. and STROEVE, P., Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. - *Industrial & Engineering Chemistry Research* - 2009, 48 (8), 3713-3729.

KURAKAKE, M., FUJII, T., YATA, M., OKAZAKI, T. and KOMAKI, T., Characteristics of transxylosylation by β -xylosidase from *Aspergillus awamori* K4. - *Biochimica et Biophysica Acta* - 2005, 1726 (3), 272-279.

KURAKAKE, M., ITO, Y. and KOMAKI, T., Synthesis of sugar fatty acid esters using a β -xylosidase from *Aspergillus awamori* for transxylosylation. - *Biotechnology Letters* - 2011, 33 (12), 2453-2456.

KUSHWAHA, D., DWIVEDI, P., KUANAR, S. K. and TIWARI, V. K., Click Reaction in Carbohydrate Chemistry: Recent Developments and Future Perspective. - *Current Organic Synthesis* - 2013, 10 (1), 90-135.

LACOMBE, J. M., RAKOTOMANOMANA, N. and PAVIA, A. A., A new approach to the synthesis and selective hydrolysis of tert-butyl glycosides. - *Carbohydrate Research* - 1988, 181 (0), 246-252.

LANGE, J. P., Lignocellulose conversion: an introduction to chemistry, process and economics. - *Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr* - 2007, 1 (1), 39-48.

LEFEVER, M. R., SZABÒ, L. Z., ANGLIN, B., FERRACANE, M., HOGAN, J., COONEY, L. and POLT, R., Glycosylation of α -amino acids by sugar acetate donors with InBr_3 . Minimally competent Lewis acids. - *Carbohydrate Research* - 2012, 351 (0), 121-125.

LI, J. B., HENRIKSSON, G. and GELLERSTEDT, G., Carbohydrate reactions during high-temperature steam treatment of aspen wood. - *Applied Biochemistry and Biotechnology* - 2005, 125 (3), 175-188.

LI, Y. K., YAO, H. J. and CHO, Y. T., Effective induction, purification and characterization of *Trichoderma koningii* G-39 β -xylosidase with high transferase activity. - *Biotechnology and Applied Biochemistry* - 2000, 31, 119-125.

LIU, M. Z., FAN, H. N., GUO, Z. W. and HUI, Y. Z., One-step glycosylation and selective deprotection of peracetylated monosaccharides for facile syntheses of allyl glycosides with a free C-2 hydroxyl group. - *Carbohydrate Research* - 1996, 290 (2), 233-237.

LOPEZ, R. and FERNANDEZ-MAYORALAS, A., Enzymatic β -galactosidation of modified monosaccharides - study of the enzyme selectivity for the acceptor and its application to the synthesis of disaccharides. - *Journal of Organic Chemistry* - 1994, 59 (4), 737-745.

LU, W. Y., SUN, X. W., ZHU, C., XU, J. H. and LIN, G. Q., Expanding the application scope of glycosidases using click chemistry. - *Tetrahedron* - 2010, 66 (3), 750-757.

LUCAS-LOPEZ, C., MURPHY, N. and ZHU, X. M., Catalytic glycosylation with glycosyl thioimide donors. - *European Journal of Organic Chemistry* - 2008, (26), 4401-4404.

LUGEMWA, F. N. and ESKO, J. D., Estradiol β -D-xyloside, an efficient primer for heparan-sulfate biosynthesis. - *The Journal of biological chemistry* - 1991, 266 (11), 6674-6677.

LUGEMWA, F. N., SARKAR, A. K. and ESKO, J. D., Unusual β -D-xylosides that prime glycosaminoglycans in animal cells. - *The Journal of biological chemistry* - 1996, 271 (32), 19159-19165.

MABIC, S., BENEZRA, C. and LEPOITTEVIN, J.-P., Direct synthesis of mono-glycosylated catechols from glycosylacetates or imidates using BF₃.OEt₂ as catalyst. - *Tetrahedron Letters* - 1993, 34 (28), 4531-4534.

MAES, C., VANGENEUGDEN, B. and DELCOUR, J. A., Relative activity of two endoxylanases towards water-unextractable arabinoxylans in wheat bran. - *Journal of Cereal Science* - 2004, 39 (2), 181-186.

MALMBERG, J., MANI, K., SAWEN, E., WIREN, A. and ELLERVIK, U., Synthesis of aromatic C-xylosides by position inversion of glucose. - *Bioorganic & Medicinal Chemistry* - 2006, 14 (19), 6659-6665.

MAMO, G., KASTURE, S., FARYAR, R., HASHIM, S. and HATTI-KAUL, R., Surfactants from xylan: Production of n-octyl xylosides using a highly thermostable xylanase from *Thermotoga neapolitana*. - *Process Biochemistry* - 2010, 45 (5), 700-705.

MANI, K., BELTING, M., ELLERVIK, U., FALK, N., SVENSSON, G., SANDGREN, S., CHENG, F. and FRANSSON, L. A., Tumor attenuation by 2(6-hydroxynaphthyl)- β -D-xylopyranoside requires priming of heparan sulfate and nuclear targeting of the products. - *Glycobiology* - 2004, 14 (5), 387-397.

MANI, K., HAVSMARK, B., PERSSON, S., KANEDA, Y., YAMAMOTO, H., SAKURAI, K., ASHIKARI, S., HABUCHI, H., SUZUKI, S., KIMATA, K., MALMSTROM, A., WESTERGREN-THORSSON, G. and FRANSSON, L. A., Heparan/chondroitin/dermatan sulfate primer 2-(6-hydroxynaphthyl)-O- β -D-xylopyranoside preferentially inhibits growth of transformed cells. - *Cancer Research* - 1998, 58 (6), 1099-1104.

MAQUART, F. X., BRÉZILLON, S. and WEGROWSKI, Y. (2010). Proteoglycans in Skin Aging. *Textbook of Aging Skin* M. A. Farage, H. I. Maibach and K. W. Miller. Berlin, Springer-Verlag: 109-120.

MARINKOVIC, S. and ESTRINE, B., Direct conversion of wheat bran hemicelluloses into n-decyl-pentosides. - *Green Chemistry* - 2010, 12 (11), 1929-1932.

MARINKOVIC, S., LE BRAS, J., NARDELLO-RATAJ, V., AGACH, M. and ESTRINE, B., Acidic Pretreatment of Wheat Straw in Decanol for the Production of Surfactant, Lignin and Glucose. - *International Journal of Molecular Sciences* - 2012, 13 (1), 348-357.

MARTEL, F., ESTRINE, B., PLANTIER-ROYON, R., HOFFMANN, N. and PORTELLA, C., Development of agriculture left-overs: fine organic chemicals from wheat hemicellulose-derived pentoses. - *Topics in Current Chemistry* - 2010, 294, 79-115.

MASSON, P. J., COUP, D., MILLET, J. and BROWN, N. L., The effect of the β -d-xyloside naroparil on circulating plasma glycosaminoglycans - an explanation of its known antithrombotic activity in the rabbit. - *The Journal of biological chemistry* - 1995, 270 (6), 2662-2668.

MATHEWS, S. L., PAWLAK, J. and GRUNDEN, A. M., Bacterial biodegradation and bioconversion of industrial lignocellulosic streams. - *Applied Microbiology and Biotechnology* - 2015, 99 (7), 2939-2954.

MATSUMURA, S., IMAI, K., YOSHIKAWA, S., KAWADA, K. and UCHIBORI, T., Surface-activities, biodegradability and antimicrobial properties of normal-alkyl glucosides,

mannosides and galactosides. - *Journal of the American Oil Chemists Society* - 1990, 67 (12), 996-1001.

MATSUMURA, S., SAKIYAMA, K. and TOSHIMA, K., One-pot synthesis of alkyl β -D-xylobioside from xylan and alcohol by acetone powder of *Aureobasidium pullulans*. - *Biotechnology Letters* - 1997, 19 (12), 1249-1253.

MCGEARY, R. P., RASOUL AMINI, S., TANG, V. W. S. and TOTH, I., Nucleophilic Substitution Reactions of Pyranose Polytosylates. - *Journal of Organic Chemistry* - 2004, 69 (8), 2727-2730.

MCKAY, M. J., NAAB, B. D., MERCER, G. J. and NGUYEN, H. M., Selective Formation of β -O-Aryl Glycosides in the Absence of the C(2)-Ester Neighboring Group. - *Journal of Organic Chemistry* - 2009, 74 (13), 4705-4711.

MECHALY, A., BELAKHOV, V., SHOHAM, Y. and BAASOV, T., An efficient chemical-enzymatic synthesis of 4-nitrophenyl β -xylobioside: a chromogenic substrate for xylanases. - *Carbohydrate Research* - 1997, 304 (2), 111-115.

MENG, X. Z. and RAGAUSKAS, A. J., Recent advances in understanding the role of cellulose accessibility in enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates. - *Current Opinion in Biotechnology* - 2014, 27, 150-158.

MIAO, S. C., ZISER, L., AEBERSOLD, R. and WITHERS, S. G., Identification of glutamic-acid-78 as the active-site nucleophile in *Bacillus-Subtilis* xylanase using electrospray tandem mass-spectrometry. - *Biochemistry* - 1994, 33 (23), 7027-7032.

MIKATA, Y., SHINOHARA, Y., YONEDA, K., NAKAMURA, Y., ESAKI, K., TANAHASHI, M., BRUDZINSKA, I., HIROHARA, S., YOKOYAMA, M., MOGAMI, K., TANASE, T., KITAYAMA, T., TAKASHIBA, K., NABESHIMA, K., TAKAGI, R., TAKATANI, M., OKAMOTO, T., KINOSHITA, I., DOE, M., HAMAZAWA, A., MORITA, M., NISHIDA, F., SAKAKIBARA, T., ORVIG, C. and YANO, S., Sugar-Pendant Diamines. - *Journal of Organic Chemistry* - 2001, 66 (11), 3783-3789.

MITCHELL, S. A., PRATT, M. R., HRUBY, V. J. and POLT, R., Solid-Phase Synthesis of O-Linked Glycopeptide Analogues of Enkephalin. - *Journal of Organic Chemistry* - 2001, 66 (7), 2327-2342.

MONTGOMERY, E. M., RICHTMYER, N. K. and HUDSON, C. S., The Preparation and Rearrangement of Phenylglycosides. - *Journal of the American Chemical Society* - 1942, 64 (3), 690-694.

MORI, M., ITO, Y. and OGAWA, T., Total synthesis of the mollu-series glycosyl ceramides - α -D-manp-(1-3)- β -D-manp-(1-4)- β -D-glcp-(1-1)-cer and α -D-manp-(1-3)- β -D-xylp-(1-2)- β -D-manp-(1-4)- β -D-glcp-(1-1)-cer. - *Carbohydrate Research* - 1990, 195 (2), 199-224.

MORJANOFF, P. J. and GRAY, P. P., Optimization of steam explosion as a method for increasing susceptibility of sugarcane bagasse to enzymatic saccharification. - *Biotechnology and Bioengineering* - 1987, 29 (6), 733-741.

MURBY, M., UHLEN, M. and STAHL, S., Upstream strategies to minimize proteolytic degradation upon recombinant production in *Escherichia coli*. - *Protein Expression and Purification* - 1996, 7 (2), 129-136.

MUZARD, M., AUBRY, N., PLANTIER-ROYON, R., O'DONOHUE, M. and REMOND, C., Evaluation of the transglycosylation activities of a GH 39 β -D-xylosidase for the synthesis of xylose-based glycosides. - *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* - 2009, 58 (1-4), 1-5.

MYDOCK, L. K. and DEMCHENKO, A. V., Mechanism of chemical O-glycosylation: from early studies to recent discoveries. - *Organic & Biomolecular Chemistry* - 2010, 8 (3), 497-510.

MYERS, A. L., UPRETI, V. V., KHURANA, M. and EDDINGTON, N. D., Characterization of total plasma glycosaminoglycan levels in healthy volunteers following oral administration of a novel antithrombotic odiparcil with aspirin or enoxaparin. - *Journal of Clinical Pharmacology* - 2008, 48 (10), 1158-1170.

NAKAHARA, Y., ANDO, S., ITO, Y., HOJO, H. and NAKAHARA, Y., New allyl ester linker and solid-phase block synthesis of the serglycin core region. - *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* - 2001, 65 (6), 1358-1368.

NGUYEN, T. K. N., TRAN, V. M., SORNA, V., ERIKSSON, I., KOJIMA, A., KOKETSU, M., LOGANATHAN, D., KJELLEN, L., DORSKY, R. I., CHIEN, C. B. and KUBERAN, B., Dimerized Glycosaminoglycan Chains Increase FGF Signaling during Zebrafish Development. - *ACS Chemical Biology* - 2013, 8 (5), 939-948.

NILSSON, U., JACOBSSON, M., JOHNSON, R., MANI, K. and ELLERVIK, U., Antiproliferative effects of peracetylated naphthoxylosides. - *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* - 2009, 19 (6), 1763-1766.

NILSSON, U., JOHNSON, R., FRANSSON, L. A., ELLERVIK, U. and MANI, K., Attenuation of Tumor Growth by Formation of Antiproliferative Glycosaminoglycans Correlates with Low Acetylation of Histone H3. - *Cancer Research* - 2010, 70 (9), 3771-3779.

NISHIZAWA, K., AMANO, Y., ISOBE, T., NOZAKI, K., SHIROISHI, M. and KANDA, T., Aglycone specificity in transglycosylation of a xylanase produced from basidiomycete, *Hypsizygus marmoreus* during the mushroom cultivation. - *Journal of Applied Glycoscience* - 2002, 49 (2), 137-143.

NOTENBOOM, V., WILLIAMS, S. J., HOOS, R., WITHERS, S. G. and ROSE, D. R., Detailed structural analysis of glycosidase/inhibitor interactions: Complexes of Cex from *Cellulomonas fimi* with xylobiose-derived aza-sugars. - *Biochemistry* - 2000, 39 (38), 11553-11563.

OCHS, M. Synthèse de xylosides et d'oligoxylosides par voie enzymatique. Thesis, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, 2012.

OCHS, M., BELLOY, N., DAUCHEZ, M., MUZARD, M., PLANTIER-ROYON, R. and REMOND, C., Role of hydrophobic residues in the aglycone binding subsite of a GH39 β -xylosidase in alkyl xylosides synthesis. - *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* - 2013, 96, 21-26.

OCHS, M., MUZARD, M., PLANTIER-ROYON, R., ESTRINE, B. and REMOND, C., Enzymatic synthesis of alkyl β -D-xylosides and oligoxylosides from xylans and from hydrothermally pretreated wheat bran. - *Green Chemistry* - 2011, 13 (9), 2380-2388.

OKAYAMA, M., KIMATA, K. and SUZUKI, S., The Influence of α -Nitrophenyl β -D-Xyloside on the Synthesis of Proteochondroitin Sulfate by Slices of Embryonic Chick Cartilage. - *Journal of Biochemistry* - 1973, 74 (5), 1069-1073.

OLDHAM, E. D., SEELAM, S., LEMA, C., AGUILERA, R. J., FIEGEL, J., RANKIN, S. E., KNUTSON, B. L. and LEHMLER, H. J., Synthesis, surface properties, and biocompatibility of 1,2,3-triazole-containing alkyl β -D-xylopyranoside surfactants. - *Carbohydrate Research* - 2013, 379, 68-77.

OTIENO, D. O. and AHRING, B. K., The potential for oligosaccharide production from the hemicellulose fraction of biomasses through pretreatment processes: xylooligosaccharides (XOS), arabinooligosaccharides (AOS), and mannoooligosaccharides (MOS). - *Carbohydrate Research* - 2012, 360, 84-92.

PAËS, G. Etude structure/fonction d'hémicellulases thermostables: la xylanase GH-11 et l'arabinofuranosidase GH-51 de *Thermobacillus xylanilyticus*. Thesis, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, 2005.

PAES, G., BERRIN, J. G. and BEAUGRAND, J., GH11 xylanases: Structure/function/properties relationships and applications. - *Biotechnology Advances* - 2012, 30 (3), 564-592.

PAES, G. and O'DONOHUE, M. J., Engineering increased thermostability in the thermostable GH-11 xylanase from *Thermobacillus xylanilyticus*. - *Journal of Biotechnology* - 2006, 125 (3), 338-350.

PALUMBO, A., DISCHIA, M., MISURACA, G. and PROTA, G., Mechanism of inhibition of melanogenesis by hydroquinone. - *Biochimica et Biophysica Acta* - 1991, 1073 (1), 85-90.

PASEK, M., BOEGGEMAN, E., RAMAKRISHNAN, B. and QASBA, P. K., Galectin-1 as a fusion partner for the production of soluble and folded human beta-1,4-galactosyltransferase-T7 in *E. coli*. - *Biochemical and Biophysical Research Communications* - 2010, 394 (3), 679-684.

PATTENDEN, G., Cobalt-mediated radical reactions in organic-synthesis. - *Chemical Society Reviews* - 1988, 17 (4), 361-382.

PELL, G., SZABO, L., CHARNOCK, S. J., XIE, H. F., GLOSTER, T. M., DAVIES, G. J. and GILBERT, H. J., Structural and biochemical analysis of *Cellvibrio japonicus* xylanase 10C - How variation in substrate-binding cleft influences the catalytic profile of family GH-10 xylanases. - *The Journal of biological chemistry* - 2004, 279 (12), 11777-11788.

PENG, F., PENG, P., XU, F. and SUN, R. C., Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. - *Biotechnology Advances* - 2012, 30 (4), 879-903.

PEREZ, J., MUNOZ-DORADO, J., DE LA RUBIA, T. and MARTINEZ, J., Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. - *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology* - 2002, 5 (2), 53-63.

- PETROVIC, Z. D., ANDJELKOVIC, D. and SPASOJEVIC, A., Vitamin B-12 and BF₃-etherate as catalysts in synthesis of some C-4-C-12-alkyl β -D-xylopyranosides. - *Indian Journal of Chemistry Section B-Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry* - 2006, 45 (1), 272-275.
- PINEAU, N., BERNERD, F., CAVEZZA, A., DALKO-CSIBA, M. and BRETON, L., A new C-xylopyranoside derivative induces skin expression of glycosaminoglycans and heparan sulphate proteoglycans. - *European Journal of Dermatology* - 2008, 18 (1), 36-40.
- PINEAU, N., CARRINO, D. A., CAPLAN, A. I. and BRETON, L., Biological evaluation of a new C-xylopyranoside derivative (C-Xyloside) and its role in glycosaminoglycan biosynthesis. - *European Journal of Dermatology* - 2011, 21 (3), 359-370.
- POLLET, A., DELCOUR, J. A. and COURTIN, C. M., Structural determinants of the substrate specificities of xylanases from different glycoside hydrolase families. - *Critical Reviews in Biotechnology* - 2010a, 30 (3), 176-191.
- POLLET, A., LAGAERT, S., ENEYSKAYA, E., KULMINSKAYA, A., DELCOUR, J. A. and COURTIN, C. M., Mutagenesis and subsite mapping underpin the importance for substrate specificity of the aglycon subsites of glycoside hydrolase family 11 xylanases. - *Biochimica et Biophysica Acta* - 2010b, 1804 (4), 977-985.
- POMIN, V. H., Keratan sulfate: An up-to-date review. - *International Journal of Biological Macromolecules* - 2015, 72, 282-289.
- POPPER, Z. A., Evolution and diversity of green plant cell walls. - *Current Opinion in Plant Biology* - 2008, 11 (3), 286-292.
- POSTEMA, M. H. D., Recent developments in the synthesis of C-glycosides. - *Tetrahedron* - 1992, 48 (40), 8545-8599.
- POUGNY, J. R., JACQUINET, J. C., NASSR, M., DUCHET, D., MILAT, M. L. and SINAY, P., Novel synthesis of 1,2-cis-disaccharides. - *Journal of the American Chemical Society* - 1977, 99 (20), 6762-6763.
- POUGNY, J. R. and SINAY, P., Reaction of glucopyranosyl with acetonitrile - Applications to synthesis. - *Tetrahedron Letters* - 1976, (45), 4073-4076.
- PULS, J., Chemistry and biochemistry of hemicelluloses: Relationship between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis. - *Macromolecular Symposia* - 1997, 120 (1), 183-196.
- PURVES, C. B., Relations between rotatory power and structure in the sugar group. xxi. β -thiophenol glycosides of glucose, xylose, lactose and cellobiose. - *Journal of the American Chemical Society* - 1929, 51 (12), 3619-3627.
- QUIDEAU, S. and RALPH, J., Facile large-scale synthesis of coniferyl, sinapyl, and para-coumaryl alcohol. - *Journal of Agricultural and Food Chemistry* - 1992, 40 (7), 1108-1110.
- RAHIKAINEN, J., MIKANDER, S., MARJAMAA, K., TAMMINEN, T., LAPPAS, A., VIKARI, L. and KRUIUS, K., Inhibition of Enzymatic Hydrolysis by Residual Lignins From Softwood-Study of Enzyme Binding and Inactivation on Lignin-Rich Surface. - *Biotechnology and Bioengineering* - 2011, 108 (12), 2823-2834.

- RAKOTOARIVONINA, H., HERMANT, B., CHABBERT, B., TOUZEL, J. P. and REMOND, C., A thermostable feruloyl-esterase from the hemicellulolytic bacterium *Thermobacillus xylanilyticus* releases phenolic acids from non-pretreated plant cell walls. - *Applied Microbiology and Biotechnology* - 2011, 90 (2), 541-552.
- RAKOTOARIVONINA, H., HERMANT, B., MONTHE, N. and REMOND, C., The hemicellulolytic enzyme arsenal of *Thermobacillus xylanilyticus* depends on the composition of biomass used for growth. - *Microbial Cell Factories* - 2012, 11.
- RAMAN, K. and KUBERAN, B., Click-xylosides mitigate glioma cell invasion in vitro. - *Molecular Biosystems* - 2010, 6 (10), 1800-1802.
- RAPRAEGER, A. and BERNFIELD, M., Cell-surface proteoglycan of mammary epithelial-cells - protease releases a heparan sulfate-rich ectodomain from a putative membrane-anchored domain. - *Journal of Biological Chemistry* - 1985, 260 (7), 4103-4109.
- REMOND, C., BOUKARI, I., CHAMBAT, G. and O'DONOHUE, M., Action of a GH 51 alpha-L-arabinofuranosidase on wheat-derived arabinoxylans and arabino-xylooligosaccharides. - *Carbohydrate Polymers* - 2008, 72 (3), 424-430.
- REMOND, C., FERCHICHI, M., AUBRY, N., PLANTIER-ROYON, R., PORTELLA, C. and O'DONOHUE, M. J., Enzymatic synthesis of alkyl arabinofuranosides using a thermostable alpha-L-arabinofuranosidase. - *Tetrahedron Letters* - 2002, 43 (52), 9653-9655.
- REMOND, C., PLANTIER-ROYON, R., AUBRY, N. and O'DONOHUE, M. J., An original chemoenzymatic route for the synthesis of beta-D-galactofuranosides using an alpha-L-arabinofuranosidase. - *Carbohydrate Research* - 2005, 340 (4), 637-644.
- RIEMANN, I., FESSNER, W.-D., PAPADOPOULOS, M. A. and KNORST, M., C-Glycosides by Aqueous Condensation of β -Dicarbonyl Compounds with Unprotected Sugars. - *Australian Journal of Chemistry* - 2002, 55 (2), 147-154.
- ROBINSON, H. C., BRETT, M. J., TRALAGGAN, P. J., LOWTHER, D. A. and OKAYAMA, M., Effect of D-xylose, β -D-xylosides and β -D-galactosides on chondroitin sulfate biosynthesis in embryonic chicken cartilage. - *Biochemical Journal* - 1975, 148 (1), 25-34.
- ROBINSON, H. C. and LINDAHL, U., Effect of cycloheximide, β -D-xylosides and β -D-galactosides on heparin biosynthesis in mouse mastocytoma. - *Biochemical Journal* - 1981, 194 (2), 575-586.
- RODRIGUES, F., CANAC, Y. and LUBINEAU, A., A convenient, one-step, synthesis of β -C-glycosidic ketones in aqueous media. - *Chemical Communications* - 2000, (20), 2049-2050.
- ROSTOVTSEV, V. V., GREEN, L. G., FOKIN, V. V. and SHARPLESS, K. B., A stepwise Huisgen cycloaddition process: Copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. - *Angewandte Chemie-International Edition* - 2002, 41 (14), 2596-+.
- ROY, D. K. and BORDOLOI, M., Montmorillonite K-10 as a Reusable Catalyst for Fischer Type of Glycosylation under Microwave Irradiation. - *Journal of Carbohydrate Chemistry* - 2008, 27, 300-307.

RYE, C. S. and WITHERS, S. G., Glycosidase mechanisms. - *Current Opinion in Chemical Biology* - 2000, 4 (5), 573-580.

SABINI, E., SULZENBACHER, G., DAUTER, M., DAUTER, Z., JORGENSEN, P. L., SCHULEIN, M., DUPONT, C., DAVIES, G. J. and WILSON, K. S., Catalysis and specificity in enzymatic glycoside hydrolysis: a 2,5B conformation for the glycosyl-enzyme intermediate revealed by the structure of the *Bacillus agaradhaerens* family 11 xylanase. - *Chemistry & Biology* - 1999, 6, 483-492.

SABINI, E., WILSON, K. S., DANIELSEN, S., SCHULEIN, M. and DAVIES, G. J., Oligosaccharide binding to family 11 xylanases: both covalent intermediate and mutant product complexes display (2,5)B conformations at the active centre. - *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* - 2001, 57, 1344-1347.

SALIBA, M., RAMALANJAONA, N., GULBERTI, S., BERTIN-JUNG, I., THOMAS, A., DAHBI, S., LOPIN-BON, C., JACQUINET, J.-C., BRETON, C., OUZZINE, M. and FOURNEL-GIGLEUX, S., Probing the Acceptor Active Site Organization of the Human Recombinant β 1,4-Galactosyltransferase 7 and Design of Xyloside-based Inhibitors. - *The Journal of biological chemistry* - 2015, 290 (12), 7658-7670.

SANCHEZ, M. M., PASTOR, F. I. J. and DIAZ, P., Exo-mode of action of cellobiohydrolase Cel48C from *Paenibacillus* sp BP-23 - A unique type of cellulase among Bacillales. - *European Journal of Biochemistry* - 2003, 270 (13), 2913-2919.

SARDZIK, R., NOBLE, G. T., WEISSENBORN, M. J., MARTIN, A., WEBB, S. J. and FLITSCH, S. L., Preparation of aminoethyl glycosides for glycoconjugation. - *Beilstein Journal of Organic Chemistry* - 2010, 6, 699-703.

SARKAR, A. K. and ESKO, J. D., Synthesis and glycosaminoglycan priming activity of three disaccharides related to the linkage region tetrasaccharide of proteoglycans. - *Carbohydrate Research* - 1995, 279, 161-171.

SARKAR, A. K., FRITZ, T. A., TAYLOR, W. H. and ESKO, J. D., Disaccharide uptake and priming in animal-cells - Inhibition of sialyl Lewis X by acetylated Gal β -1-4GlcNac β -O-naphthalenemethanol. - *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* - 1995, 92 (8), 3323-3327.

SARKAR, N., GHOSH, S. K., BANNERJEE, S. and AIKAT, K., Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. - *Renewable Energy* - 2012, 37 (1), 19-27.

SATGE, C., LE BRAS, J., HENIN, F. and MUZART, J., DMF promoted xylosylation of terpenols. - *Tetrahedron* - 2005, 61 (35), 8405-8409.

SCHMIDT, R. R., New methods for the synthesis of glycosides and oligosaccharides - Are there alternatives to the koenigs-knorr method. - *Angewandte Chemie-International Edition in English* - 1986, 25 (3), 212-235.

SCHMIDT, R. R., Recent developments in the synthesis of glycoconjugates. - *Pure and Applied Chemistry* - 1989, 61 (7), 1257-1270.

SCHMIDT, R. R. and KINZY, W., Anomeric-oxygen activation for glycoside synthesis - The trichloroacetimidate method. - *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* - 1994, 50, 21-123.

SCHMIDT, R. R. and MICHEL, J., Facile synthesis of α -O-glycosyl and β -O-glycosyl imidates - Preparation of glycosides and disaccharides. - *Angewandte Chemie-International Edition in English* - 1980, 19 (9), 731-732.

SCHMIDT, R. R. and MICHEL, J., Glycosylimidates. 17.O-(α -D-glucopyranosyl)trichloroacetimidate as a glucosyl donor. - *Journal of Carbohydrate Chemistry* - 1985, 4 (2), 141-169.

SCHROEDER, L. R., COUNTS, K. M. and HAIGH, F. C., Stereoselectivity of Koenigs-Knorr syntheses of alkyl β -D-galactopyranoside and β -D-xylopyranoside peracetates promoted by mercuric bromide and mercuric oxide. - *Carbohydrate Research* - 1974, 37 (2), 368-372.

SCHWARTZ, N. B., Xylosylation - The first step in synthesis of proteoglycan. - *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* - 1995, 7 (37), 429-445.

SEGUIN, A., MARINKOVIC, S. and ESTRINE, B., New pretreatment of wheat straw and bran in hexadecanol for the combined production of emulsifying base, glucose and lignin material. - *Carbohydrate Polymers* - 2012, 88 (2), 657-662.

SEKINE, M., KIMURA, T., KATAYAMA, Y., TAKAHASHI, D. and TOSHIMA, K., The direct and one-pot transformation of xylan into the biodegradable surfactants, alkyl xylosides, is aided by an ionic liquid. - *RSC Advances* - 2013, 3 (43), 19756-19759.

SELIG, M. J., VIAMAJALA, S., DECKER, S. R., TUCKER, M. P., HIMMEL, M. E. and VINZANT, T. B., Deposition of lignin droplets produced during dilute acid pretreatment of maize stems retards enzymatic hydrolysis of cellulose. - *Biotechnology Progress* - 2007, 23 (6), 1333-1339.

SEO, D. H., JUNG, J. H., LEE, J. E., JEON, E. J., KIM, W. and PARK, C. S., Biotechnological production of arbutins (α - and β -arbutins), skin-lightening agents, and their derivatives. - *Applied Microbiology and Biotechnology* - 2012, 95 (6), 1417-1425.

SHALLOM, D. and SHOHAM, Y., Microbial hemicellulases. - *Current Opinion in Microbiology* - 2003, 6 (3), 219-228.

SHARMA, S. K., KALRA, K. L. and GREWAL, H. S., Enzymatic saccharification of pretreated sunflower stalks. - *Biomass & Bioenergy* - 2002, 23 (3), 237-243.

SHINOYAMA, H., KAMIYAMA, Y. and YASUI, T., Enzymatic-synthesis of alkyl β -xylosides from xylobiose by application of the transxylosyl reaction of aspergillus-niger β -xylosidase. - *Agricultural and Biological Chemistry* - 1988, 52 (9), 2197-2202.

SHINOYAMA, H., TAKEI, K., ANDO, A., FUJII, T., SASAKI, M., DOI, Y. and YASUI, T., Enzymatic-synthesis of useful alkyl β -glucosides. - *Agricultural and Biological Chemistry* - 1991, 55 (6), 1679-1681.

SHINOYAMA, H. and YASUI, T., Superiority of Aspergillus-niger β -xylosidase for the enzymatic-synthesis of alkyl β -xylosides in the presence of a variety of alcohols. - *Agricultural and Biological Chemistry* - 1988, 52 (9), 2375-2377.

SIDHU, G., WITHERS, S. G., NGUYEN, N. T., MCINTOSH, L. P., ZISER, L. and BRAYER, G. D., Sugar ring distortion in the glycosyl-enzyme intermediate of a family G/11 xylanase. - *Biochemistry* - 1999, 38 (17), 5346-5354.

SIEGBAHN, A., AILI, U., OCHOCINSKA, A., OLOFSSON, M., RÖNNOLS, J., MANI, K., WIDMALM, G. and ELLERVIK, U., Synthesis, conformation and biology of naphthoxylosides. - *Bioorganic & Medicinal Chemistry* - 2011, 19 (13), 4114-4126.

SIEGBAHN, A., MANNER, S., PERSSON, A., TYKESSON, E., HOLMQVIST, K., OCHOCINSKA, A., ROENNOLS, J., SUNDIN, A., MANI, K., WESTERGREN-THORSSON, G., WIDMALM, G. and ELLERVIK, U., Rules for priming and inhibition of glycosaminoglycan biosynthesis; probing the β 4GalT7 active site. - *Chemical Science* - 2014, 5 (9), 3501-3508.

SIEGBAHN, A., THORSHEIM, K., STAAHLE, J., MANNER, S., HAMARK, C., PERSSON, A., TYKESSON, E., MANI, K., WESTERGREN-THORSSON, G., WIDMALM, G. and ELLERVIK, U., Exploration of the active site of β 4GalT7: modifications of the aglycon of aromatic xylosides. - *Organic & Biomolecular Chemistry* - 2015, 13 (11), 3351-3362.

SILBERT, J. E. and SUGUMARAN, G., Intracellular membranes in the synthesis, transport, and metabolism of proteoglycans. - *Biochimica et Biophysica Acta* - 1995, 1241 (3), 371-384.

SINNOTT, M. L., Catalytic mechanisms of enzymatic glycosyl transfer. - *Chemical Reviews* - 1990, 90 (7), 1171-1202.

SOBUE, M., HABUCHI, H., ITO, K., YONEKURA, H., OGURI, K., SAKURAI, K., KAMOHARA, S., UENO, Y., NOYORI, R. and SUZUKI, S., β -D-xylosides and their analogues as artificial initiators of glycosaminoglycan chain synthesis. Aglycone-related variation in their effectiveness in vitro and in ovo. - *Biochemical Journal* - 1987, 241 (2), 591-601.

SOK, J., PINEAU, N., DALKO-CSIBA, M., BRETON, L. and BERNERD, F., Improvement of the dermal epidermal junction in human reconstructed skin by a new c-xylopyranoside derivative. - *European Journal of Dermatology* - 2008, 18 (3), 297-302.

SOLIMAN, M. E., RUGGIERO, G. D., PERNIA, J. J., GREIG, I. R. and WILLIAMS, I. H., Computational mutagenesis reveals the role of active-site tyrosine in stabilising a boat conformation for the substrate: QM/MM molecular dynamics studies of wild-type and mutant xylanases. - *Organic & Biomolecular Chemistry* - 2009, 7 (3), 460-468.

SUGANUMA, T., MATSUNO, R., OHNISHI, M. and HIROMI, K., Study of Mechanism of Action of Taka-Amylase-A on Linear Oligosaccharides by Product Analysis and Computer Simulation. - *Journal of Biochemistry* - 1978, 84 (2), 293-316.

SUGIMOTO, K., NOMURA, K., NISHIMURA, T., KISO, T. K., SUGIMOTO, K. and KURIKI, T., Syntheses of α -arbutin- α -glycosides and their inhibitory effects on human. - *Journal of Bioscience and Bioengineering* - 2005, 99 (3), 272-276.

SULISTYO, J., KAMIYAMA, Y., ITO, H. and YASUI, T., Enzymatic-synthesis of hydroquinone β -xyloside from xylooligosaccharides. - *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* - 1994, 58 (7), 1311-1313.

SUN, Y. and CHENG, J. Y., Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. - *Bioresource Technology* - 2002, 83 (1), 1-11.

TAJIMA, R., OOZEKI, H., MURAOKA, S., TANAKA, S., MOTEGI, Y., NIHEI, H., YAMADA, Y., MASUOKA, N. and NIHEI, K., Synthesis and evaluation of bibenzyl glycosides as potent tyrosinase inhibitors. - *European Journal of Medicinal Chemistry* - 2011, 46 (4), 1374-1381.

TAKAGAKI, K., NAKAMURA, T., KON, A., TAMURA, S. and ENDO, M., Characterization of β -D-xyloside induced glycosaminoglycans and oligosaccharides in cultured human skin fibroblasts. - *Journal of Biochemistry* - 1991, 109 (4), 514-519.

TAKEO, K., OHGUCHI, Y., HASEGAWA, R. and KITAMURA, S., Synthesis of 2- and 4-nitrophenyl β -glycosides of β -(1 $\rightarrow$ 4)-D-xylo-oligosaccharides of DP 2-4. - *Carbohydrate Research* - 1995, 277 (2), 231-244.

TALHAOU, I., BUI, C., ORIOL, R., MULLIERT, G., GULBERTI, S., NETTER, P., COUGHTRIE, M. W. H., OUZZINE, M. and FOURNEL-GIGLEUX, S., Identification of Key Functional Residues in the Active Site of Human beta 1, 4-Galactosyltransferase 7 a major enzyme in the glycosaminoglycan synthesis pathway. - *Journal of Biological Chemistry* - 2010, 285 (48), 37342-37358.

TEIEN, A. N., ABILDGAARD, U. and HOOK, M., Anticoagulant effect of heparan sulfate and dermatan sulfate. - *Thrombosis Research* - 1976, 8 (6), 859-867.

THOMA, J. A., BROTHERS, C. and SPRADLIN, J., Subsite mapping of enzymes. Studies on *Bacillus subtilis* amylase. - *Biochemistry* - 1970, 9 (8), 1768-1775.

TOOMEY, J. R., ABOUD, M. A., VALOCIK, R. E., KOSTER, P. F., BURNS-KURTIS, C. L., PILLARISSETTI, K., DANOFF, T. M. and ERHARDT, J. A., A comparison of the β -D-xyloside, odiparcil, to warfarin in a rat model of venous thrombosis. - *Journal of Thrombosis and Haemostasis* - 2006, 4 (9), 1989-1996.

TORNOE, C. W., CHRISTENSEN, C. and MELDAL, M., Peptidotriazoles on solid phase: 1,2,3 -triazoles by regiospecific copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. - *Journal of Organic Chemistry* - 2002, 67 (9), 3057-3064.

TORRONEN, A. and ROUVINEN, J., Structural and functional properties of low molecular weight endo-1,4- β -xylanases. - *Journal of Biotechnology* - 1997, 57 (1-3), 137-149.

TRAMICE, A., PAGNOTTA, E., ROMANO, I., GAMBACORTA, A. and TRINONE, A., Transglycosylation reactions using glycosyl hydrolases from *Thermotoga neapolitana*, a marine hydrogen-producing bacterium. - *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* - 2007, 47 (1-2), 21-27.

TRAN, V. M. and KUBERAN, B., Synthesis of Fluorophore-Tagged Xylosides That Prime Glycosaminoglycan Chains. - *Bioconjugate Chemistry* - 2014, 25 (2), 262-268.

TRAN, V. M., NGUYEN, T. K. N., SORNA, V., LOGANATHAN, D. and KUBERAN, B., Synthesis and Assessment of Glycosaminoglycan Priming Activity of Cluster-xylosides for Potential Use as Proteoglycan Mimetics. - *ACS Chemical Biology* - 2013, 8 (5), 949-957.

TRAN, V. M., VICTOR, X. V., YOCKMAN, J. W. and KUBERAN, B., RGD-xyloside conjugates prime glycosaminoglycans. - *Glycoconjugate Journal* - 2010, 27 (6), 625-633.

- TSUTSUI, Y., RAMAKRISHNAN, B. and QASBA, P. K., Crystal Structures of beta-1,4-Galactosyltransferase 7 Enzyme Reveal Conformational Changes and Substrate Binding. - *Journal of Biological Chemistry* - 2013, 288 (44), 31963-31970.
- TSUZUKI, Y., NGUYEN, T. K. N., GARUD, D. R., KUBERAN, B. and KOKETSU, M., 4-Deoxy-4-fluoro-xyloside derivatives as inhibitors of glycosaminoglycan biosynthesis. - *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* - 2010, 20 (24), 7269-7273.
- VAN DYK, J. S. and PLETSCHE, B. I., A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes-Factors affecting enzymes, conversion and synergy. - *Biotechnology Advances* - 2012, 30 (6), 1458-1480.
- VAN RANTWIJK, F., OOSTEROM, M. W. V. and SHELDON, R. A., Glycosidase-catalysed synthesis of alkyl glycosides. - *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* - 1999, 6 (6), 511-532.
- VARDAKOU, M., DUMON, C., MURRAY, J. W., CHRISTAKOPOULOS, P., WEINER, D. P., JUGE, N., LEWIS, R. J., GILBERT, H. J. and FLINT, J. E., Understanding the structural basis for substrate and inhibitor recognition in eukaryotic GH11 xylanases. - *Journal of Molecular Biology* - 2008, 375 (5), 1293-1305.
- VARDAKOU, M., KATAPODIS, P., SAMIOTAKI, M., KEKOS, D., PANAYOTOU, G. and CHRISTAKOPOULOS, P., Mode of action of family 10 and 11 endoxylanases on water-unextractable arabinoxylan. - *International Journal of Biological Macromolecules* - 2003, 33 (1-3), 129-134.
- VICTOR, X. V., NGUYEN, T. K. N., ETHIRAJAN, M., TRAN, V. M., NGUYEN, K. V. and KUBERAN, B., Investigating the Elusive Mechanism of Glycosaminoglycan Biosynthesis. - *The Journal of biological chemistry* - 2009, 284 (38), 25842-25853.
- VOGEL, J., Unique aspects of the grass cell wall. - *Current Opinion in Plant Biology* - 2008, 11 (3), 301-307.
- VON RYBINSKI, W. and HILL, K., Alkyl polyglycosides - Properties and applications of a new class of surfactants. - *Angewandte Chemie-International Edition* - 1998, 37 (10), 1328-1345.
- VRANSKA, M., NERINCKX, W., CLAEYSSENS, M. and BIELY, P., An alternative approach for the synthesis of fluorogenic substrates of endo- β -(1 $\rightarrow$ 4)-xylanases and some applications. - *Carbohydrate Research* - 2008, 343 (3), 541-548.
- VUILLERMOZ, B., WEGROWSKI, Y., CONTET-AUDONNEAU, J. L., DANOUX, L., PAULY, G. and MAQUART, F. X., Influence of aging on glycosaminoglycans and small leucine-rich proteoglycans production by skin fibroblasts. - *Molecular and Cellular Biochemistry* - 2005, 277 (1-2), 63-72.
- VUONG, T. V. and WILSON, D. B., Glycoside Hydrolases: Catalytic Base/Nucleophile Diversity. - *Biotechnology and Bioengineering* - 2010, 107 (2), 195-205.
- WALLACE, J. E. and SCHROEDER, L. R., Koenigs-Knorr reactions. Part 1. Effects of a 2-O-acetyl substituent, the promoter, and the alcohol concentration on the stereoselectivity of reactions of 1,2-cis-glucopyranosyl bromide. - *Journal of the Chemical Society, Perkins Transactions 1* - 1976, (18), 1938-1941.

WALLACE, J. E. and SCHROEDER, L. R., Koenigs-Knorr reactions. Part 3. Mechanistic study of mercury(II) cyanide promoted reactions of 2-O-acetyl-3,4,6-tri-O-methyl- α -D-glucopyranosyl bromide with cyclohexanol in benzene-nitromethane. - *Journal of the Chemical Society, Perkins Transactions 2* - 1977, (6), 795-802.

WAN, C. X. and LI, Y. B., Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. - *Biotechnology Advances* - 2012, 30 (6), 1447-1457.

WASSERSCHIED, P. and WELTON, T., *Ionic liquids in synthesis*. Wiley Online Library: 2008; Vol. 1.

WICKI, J., SCHLOEGL, J., TARLING, C. A. and WITHERS, S. G., Recruitment of both uniform and differential binding energy in enzymatic catalysis: Xylanases from families 10 and 11. - *Biochemistry* - 2007, 46 (23), 6996-7005.

WILSTERMANN, M. and MAGNUSSON, G., Synthesis of Xyl β Cer, Gal β 1-4Xyl β Cer, NeuAc α 2-3Gal β 1-4Xyl β Cer and the corresponding lactone and lactam trisaccharides. - *Journal of Organic Chemistry* - 1997, 62 (23), 7961-7971.

WITHERS, S. G., Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolases. - *Carbohydrate Polymers* - 2001, 44 (4), 325-337.

WITHERS, S. G., STREET, I. P., BIRD, P. and DOLPHIN, D. H., 2-Deoxy-2-fluoroglucosides - A novel class of mechanism-based glucosidase inhibitors. - *Journal of the American Chemical Society* - 1987, 109 (24), 7530-7531.

WU, J. and SERIANNI, A. S., D-Penturonic acids: solution studies of stable-isotopically enriched compounds by ^1H - and ^{13}C -n.m.r. spectroscopy. - *Carbohydrate Research* - 1991, 210 (0), 51-70.

XIE, H. F., FLINT, J., VARDAKOU, M., LAKEY, J. H., LEWIS, R. J., GILBERT, H. J. and DUMON, C., Probing the structural basis for the difference in thermostability displayed by family 10 xylanases. - *Journal of Molecular Biology* - 2006, 360 (1), 157-167.

XU, W. J., OSEI-PREMPEH, G., LEMA, C., OLDHAM, E. D., AGUILERA, R. J., PARKIN, S., RANKIN, S. E., KNUTSON, B. L. and LEHMLER, H. J., Synthesis, thermal properties, and cytotoxicity evaluation of hydrocarbon and fluorocarbon alkyl β -D-xylopyranoside surfactants. - *Carbohydrate Research* - 2012, 349, 12-23.

YAMAGUCHI, M., HORIGUCHI, A., FUKUDA, A. and MINAMI, T., Novel synthesis of aryl 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-D-glucopyranosides. - *Journal of the Chemical Society, Perkins Transactions 1* - 1990, (4), 1079-1082.

ZEUNER, B., JERS, C., MIKKELSEN, J. D. and MEYER, A. S., Methods for Improving Enzymatic Trans-glycosylation for Synthesis of Human Milk Oligosaccharide Biomimetics. - *Journal of Agricultural and Food Chemistry* - 2014, 62 (40), 9615-9631.

ZHAO, Q. Y., Protein Thermodynamic Structure. - *IUBMB Life* - 2009, 61 (6), 600-606.

ZHAO, X. B., ZHANG, L. H. and LIU, D. H., Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. - *Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr* - 2012a, 6 (4), 465-482.

ZHAO, X. B., ZHANG, L. H. and LIU, D. H., Biomass recalcitrance. Part II: Fundamentals of different pre-treatments to increase the enzymatic digestibility of lignocellulose. - *Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr* - 2012b, 6 (5), 561-579.

ZHONG, R. Q. and YE, Z. H., Secondary Cell Walls: Biosynthesis, Patterned Deposition and Transcriptional Regulation. - *Plant and Cell Physiology* - 2015, 56 (2), 195-214.

ZHU, X. M. and SCHMIDT, R. R., New Principles for Glycoside-Bond Formation. - *Angewandte Chemie-International Edition* - 2009, 48 (11), 1900-1934.

ZIFCAKOVA, L. and BALDRIAN, P., Fungal polysaccharide monooxygenases: new players in the decomposition of cellulose. - *Fungal Ecology* - 2012, 5 (5), 481-489.

ZISER, L., SETYAWATI, I. and WITHERS, S. G., Syntheses and testing of substrates and mechanism-based inactivators for xylanases. - *Carbohydrate Research* - 1995, 274, 137-153.

Xylosides à aglycones aromatiques ou fonctionnalisés : synthèse enzymatique ou chimio-enzymatique et évaluation de leurs propriétés d'activation de la biosynthèse des glycosaminoglycanes.

La bioraffinerie, avec l'utilisation de la biomasse végétale comme matière première renouvelable, est un moyen alternatif aux ressources fossiles qui s'amenuisent pour l'obtention de molécules d'intérêt, de biomatériaux ou de biocarburant nécessaires à notre vie quotidienne. Les hémicelluloses constituent 20 à 45% de la biomasse végétale et sont riches en pentoses (D-xylose en particulier) dans le cas des xylanes.

Dans le cadre du projet multi-partenaires XYLOCOS, financé par la Région Champagne-Ardenne et le FEDER, l'objectif de cette thèse consiste en l'utilisation d'une xylanase pour mettre au point la préparation par voie enzymatique ou chimio-enzymatique de nouveaux β -xylosides et β -xylobiosides présentant des aglycones de différentes natures et d'évaluer leurs propriétés biologiques.

L'étude d'une xylanase GH11 a d'abord été réalisée pour améliorer son activité de transglycosylation en présence de divers accepteurs. Une étude de modélisation *in silico* a été effectuée et a conduit à cibler la mutation du résidu W126. Les paramètres cinétiques et les propriétés de transglycosylation de la xylanase sauvage et du mutant ont été comparés et ont montré que le mutant a une capacité de transglycosylation améliorée.

La synthèse de séries de xylosides et xylobiosides comportant une partie aglycone aromatique par voie enzymatique ou présentant des hétérocycles triazoles diversement fonctionnalisés par voie chimio-enzymatique a été effectuée. L'influence de la nature de la partie aglycone mais également du degré de polymérisation des différents xylosides sur leur capacité à amorcer la biosynthèse de glycosaminoglycanes a été étudiée en présence d'un modèle cellulaire. L'ensemble des xylosides et xylobiosides synthétisés amorce la biosynthèse des GAGs. Les résultats obtenus montrent que les xylosides sont plus efficaces que leurs analogues xylobiosides. Certains xylosides à aglycones hydrophobes représentent de bons candidats pour des applications cosmétiques.

Mots clés: synthèse enzymatique, xylopyranosides, xylanases, chimie « click », transglycosylation, glycosaminoglycanes.

Xylosides featuring aromatic or functionalized aglycones: enzymatic or chemo-enzymatic synthesis and evaluation as primers of the biosynthesis of glycosaminoglycans.

Biorefinery, with the use of plant biomass as a renewable raw material, is an alternative means to fossil resources for obtaining molecules of interest, biomaterials or biofuel. Hemicelluloses represent about 20 to 45% of the plant biomass and are rich in pentoses (D-xylose in particular) in the case of xylans.

XYLOCOS is a multi-partner project funded by the Champagne-Ardenne Region and the FEDER. In this context the objective of this work consists in the use of a xylanase to develop the enzymatic or chemo-enzymatic synthesis of new β -xylosides and β -xylobiosides featuring different kinds of aglycone moieties and to assess their biological properties.

First, the study of a GH11 xylanase was carried out to improve its transglycosylation activity in the presence of various acceptors. A *in silico* study was performed and led to target the mutation of W126 residue. Kinetic parameters and transglycosylation properties of the wild and mutant xylanases were compared and showed that the mutant has an improved capacity for transglycosylation.

The synthesis of xylosides and xylobiosides bearing an aromatic aglycone part by an enzymatic transformation or functionalized triazole heterocycles by a chemo-enzymatic pathway was performed. The influence of the nature of the aglycone part but also the degree of polymerization of different xylosides was studied through their ability to initiate the biosynthesis of glycosaminoglycans in the presence of a cell model. All the xylosides and xylobiosides prepared act as GAGs primers. The obtained results show that xylosides are more efficient primers than the corresponding xylobiosides. Xylosides carrying hydrophobic aglycones represent good candidates for cosmetic applications.

Keywords: enzymatic synthesis, xylopyranoside, xylanase, "click" chemistry, transglycosylation, glycosaminoglycans.

Discipline: Chimie spécialité Biochimie

**Institut de Chimie Moléculaire de Reims
(ICMR), CNRS UMR 7312**

**UMR614 INRA-URCA Fractionnement des
AgroRessources et Environnement**

UFR Sciences Exactes et Naturelles, Bâtiment 18
Europol'Agro, BP 1039, 51687 Reims

2 rue Esplanade Roland-Garros, 51100 Reims

