Glycochimie Des polymères à la biocatalyse

L. Legentil, L. Lemiegre, Sylvain Tranchimand, S. Cammas-Marion, C. Nugier-Chauvin, T. Benvegnu, V. Ferrières

▶ **To cite this version:**

L. Legentil, L. Lemiegre, Sylvain Tranchimand, S. Cammas-Marion, C. Nugier-Chauvin, et al.. Glycochimie Des polymères à la biocatalyse. L'Actualité Chimique, 2020, 450, pp.25-33. hal-02569950

HAL Id: hal-02569950

https://univ-rennes.hal.science/hal-02569950

Submitted on 8 Nov 2021

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

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

Glycochimie Des polymères à la biocatalyse

recherche et développement

Résumé Étendre la gamme des produits biosourcés au moyen de procédés présentant un moindre impact sur l'environnement constitue actuellement l'un des enjeux majeurs de développement pour nos sociétés. La variété des polysaccharides marins combinée à celle des lipides ouvre la voie à une grande diversité de glycolipides dont les propriétés physico-chimiques et biologiques sont ajustées pour des applications en santé/bien-être et santé des plantes. Dans ce contexte, des exemples de synthèse de composés amphiphiles originaux issus d'ulvanes, d'alginates et de β-(1,3)-glucanes, selon des réactions sans solvant ou dans l'eau, catalysés par des acides biocompatibles, sont décrits. Ces composés ont été élaborés pour leurs propriétés tensioactives, gélifiantes, ou comme bioprotecteurs des plantes. Ces approches de chimie durable ont plus récemment été complétées par une thématique biocatalyse, avec notamment l'utilisation d'enzymes pour produire des glycolipides ou des polymères, mais aussi des glycoconjugués rares, ces derniers étant obtenus à l'aide d'enzymes spécifiques de sucres furanosidiques.
Mots-clés Glycochimie, sucres marins, lipides, amphiphiles, chimie durable, biocatalyse.

Abstract Glycochemistry: from polymers to biocatalysis
Extending the range of bio-based products using processes that have a lower impact on the environment is currently one of the major challenges for our societies. The variety of marine polysaccharides combined with that of lipids offers the opportunity to create a great diversity of glycolipids whose physicochemical and biological properties are tuned for applications in health/well-being and plant health. In this context, examples of synthesis of new amphiphilic compounds derived from ulvans, alginates and β-(1,3)-glucans, according to reactions without solvent or in water, catalyzed by biocompatible acids, are described. These compounds have been developed for their surfactant, gelling properties or as plant bioprotectors. These sustainable chemistry approaches have been more recently supplemented by development in biocatalysis, with in particular the use of enzymes suitable for producing glycolipids or polymers, but also rare glycoconjugates, the latter being obtained using biocatalysts to specifically recognizing furanosidic sugars.
Keywords Glycochemistry, marine carbohydrates, lipids, amphiphiles, sustainable chemistry, biocatalysis.

De l'algue à la fiole.

Les sucres, tous les êtres vivants en produisent et en utilisent ! Les sucres et leurs dérivés sont en effet indispensables à la vie. Présents dans l'ADN et l'ARN, ribose et 2-désoxyribose contribuent au code génétique. De subtiles modulations structurales à partir du seul glucose conduisent à des polysaccharides variés, parmi lesquels l'amidon, la cellulose, les β-(1→3)-glucanes. La substitution de fonctions hydroxyle par des groupements acétamide fournit des polymères naturels aux propriétés physico-chimiques très différentes. Ainsi, la chitine, constituée d'un enchainement d'unités β-(1→4)-*N*-acétylglucosamine, est un matériau dur constitutif des carapaces de crustacés ou des ailes de papillons. Fucose, galactose, *N*-acétylglucosamine et *N*-acétylgalactosaminepermettent de définir les groupes sanguins. D'autres unités sucres, sous forme oxydée, ou fonctionnalisées par des groupes sulfates, ou encore conjuguées à des protéines, conduisent à des macromolécules complexes (GAG, mucines), aujourd'hui intensément étudiées pour leurs rôles de structuration et pour des applications dans le traitement des maladies articulaires par exemple. Les algues sont capables de produire des polysaccharides avec des fonctions semblables, et on retrouve ces produits d'extraction dans l'alimentation, la cosmétique, la détergence, la santé. De plus petites structures glycosylées tapissent les membranes cellulaires et sont impliquées dans des phénomènes d'interactions variés : communication cellulaire, interactions hôte-pathogène, reproduction, formation de biofilms, cancers, maladies rares… Glycochimie, glycobiologie, glycoenzymologie, glycomatériaux, glycomique se retrouvent aujourd'hui dans le vaste domaine des glycosciences.
La thématique sucres s'est installée à Rennes au début des années 1980 avec la synthèse de glycolipides et le souci de répondre à des critères préfigurant les actions de valorisation de bioressources et de chimie verte, toujours développées dans notre équipe. Nos travaux visent à proposer des alternatives aux méthodes traditionnelles de synthèse. Des exemples sur la production de polymères amphiphiles, de tensioactifs biosourcés, de biostimulants pour les plantes sont présentés ici. La biocatalyse est venue enrichir les approches synthétiques et s'est particulièrement focalisée sur des sucres rares, les furanosides. Nous décrirons comment les outils de la biologie moléculaire implantés au laboratoire ont permis de synthétiser des produits originaux et de proposer des alternatives à la synthèse de dérivés dissymétriques du tréhalose.

Les polysaccharides d'algues comme bioressources

L'intérêt des algues marines comme sources de polysaccharides naturels possédant des structures chimiques originales et des activités biologiques prometteuses ne cesse d'attirer l'attention des industries, notamment pour des applications dans les domaines médical, pharmaceutique et biotechnologique [1]. Notre approche vise à développer de nouveaux composés glycosylés biosourcés pour des applications prédéfinies pour la cosmétique ou l'agrochimie.

Algues vertes

Parmi les trois classes d'algues marines brunes, vertes et rouges, les polysaccharides des algues vertes, et spécifiquement des genres *Ulva* et *Enteromorpha*, restent largement non exploités dans ces domaines [2]. Une possible justification de cette évolution limitée peut revenir à la structure complexe et particulière des ulvanes, principaux polysaccharides sulfatés formant la paroi cellulaire de ces deux genres d'algues vertes. L'alginate est un polysaccharide polyanionique naturel qui se trouve dans la paroi cellulaire de toutes les algues brunes comme composé majoritaire (jusqu'à 45 % de la matière sèche) [3]. Il est classé parmi les hydrocolloïdes grâce à sa solubilité importante dans l'eau où il se dissout pour former un gel avec des propriétés rhéologiques particulières [4]. Ainsi, les alginates ont pu trouver des applications dans de nombreux domaines allant de l'industrie textile à l'industrie alimentaire, en plus de l'imprimerie, la médecine, les biotechnologies et la cosmétologie [1]. Ils sont formés de ponts glycosidiques (1→4) entre les deux monomères β-D-mannuronate (M) et son épimère en C-5, l'α-L-guluronate (G). Ces motifs M et G sont arrangés d'une façon irrégulière, par des blocs homopolymères (MMMM ou GGGG) séparés par des blocs alternés (MGMG) tout le long de la chaine de l'alginate. Concernant l'ulvane, ce polysaccharide est trouvé comme composé majoritaire formant la paroi des algues vertes de genre *Ulva* ou *Enteromorpha* (environ 8 à 29 % de la matière sèche de l'algue verte) [2] ; il joue un rôle nutritionnel en tant que fibre alimentaire digestive. C'est un polysaccharide complexe sulfaté formé de teneurs variables en acides uroniques, incluant les acides D-glucuronique et L-iduronique, en alternance avec des sucres neutres comme le L-rhamnose, le D-xylose et le D-glucose. Ces motifs sucres sont arrangés majoritairement en une séquence de deux unités disaccharidiques glucuronorhamnose 3-sulfate et iduronorhamnose 3-sulfate. L'ulvane a démontré des activités biologiques et des propriétés physico-chimiques et gélifiantes très importantes liées à sa structure chimique particulière, ce qui permet d'ouvrir plusieurs perspectives pour des applications industrielles, notamment alimentaire, pharmaceutique, biomédicale et cosmétique [5].

Notre laboratoire s'intéresse depuis plusieurs années à la transformation de ces deux polysaccharides d'origine marine, l'alginate et l'ulvane, en macromolécules amphiphiles et/ou tensioactifs monosaccharidiques anioniques ou non ioniques entièrement biosourcés. Deux voies de synthèse ont été développées selon la famille de (macro)molécules amphiphiles visée :

- des amines grasses d'origine végétale (par exemple l'octylamine, *figure 1*) sont greffées sur la chaine de l'alginate ou de l'ulvane sans entrainer de dégradation de ces polysaccharides selon une méthode de couplage par l'agent EDC-HCl dans un milieu aqueux et à température ambiante [6] ;
- l'alginate est dépolymérisé en ses monomères et les alcools ou amines grasses (*figure 2*) viennent se greffer sur les motifs L-guluronate et D-mannuronate pour former des compositions tensioactives uronates (tensioactifs anioniques) ou uronamides (tensioactifs non ioniques) selon une approche de chimie bleue, sans avoir recours à l'utilisation d'un solvant.

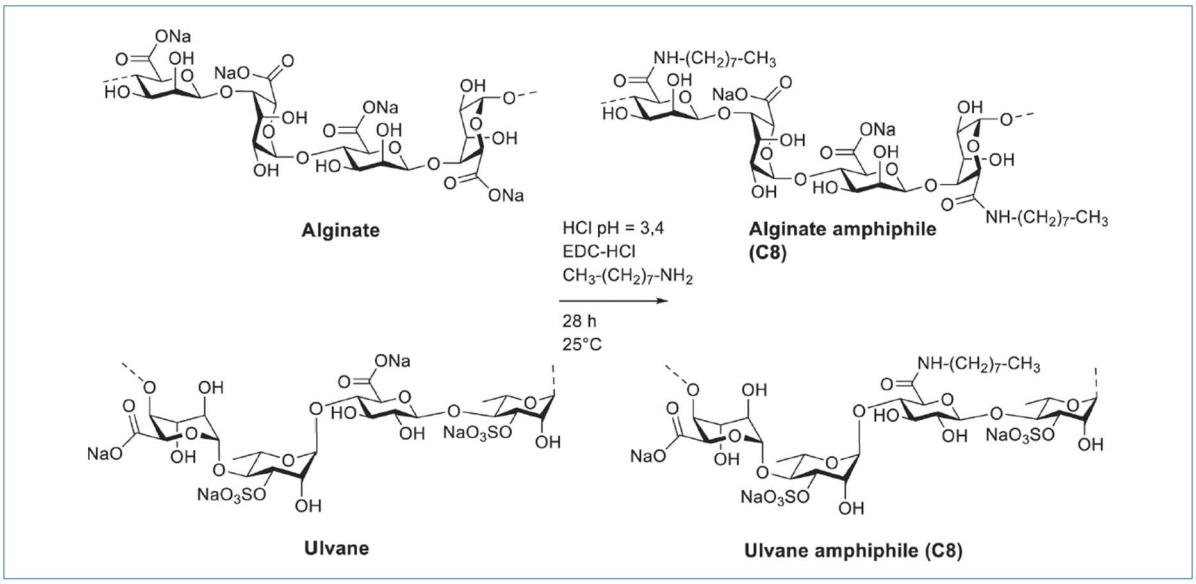


Figure 1 - Synthese des alginate et ulvane amphiphiles dérivés de la dodécylamine par l'agent de couplage EDC-HCl. Alginate amphiphile : Rdt = 41 % ; masse molaire = 233 600 g mol-1. Ulvane amphiphile : Rdt = 43 % ; masse molaire = 706 100 g mol-1.

La préparation des structures tensioactives monosaccharidiques issues de l'alginate débute par une dépolymérisation (hydrolyse/butanolyse, glycosylation et estérification one-pot en présence d'acide mathane sulfonique (AMS), *figure 2*). Cette étape est suivie par des réactions de transestérification/transglycosylation et saponification (ajout de l'alcool gras) [7] ou d'aminolyse (ajout de l'amine grasse) [8] effectuées dans le même milieu réactionnel (one-pot), sans isolement ni purification des intermédiaires réactionnels.

L'introduction de chaines lipophiles sur les polysaccharides alginate et ulvane se traduit par une augmentation très nette de la viscosité dynamique par rapport à celle des polysaccharides natifs, permettant ainsi d'améliorer grandement les propriétés rhéologiques en créant des associations hydrophobes dans la solution aqueuse du polysaccharide amphiphile. Ces comportements rhéologiques prometteurs ont été étudiés dans des conditions épaississantes, c'est-à-dire dans une solution NaCl (0,1 M) pour l'alginate modifié, et dans des conditions gélifiantes, c'est-à-dire dans une solution H_3BO_3 (7 mM) et $CaCl_2$ (7 mM) pour l'ulvane modifié. D'autre part, ces polysaccharides amphiphiles uronamides à chaine courte en C8 présentent de bonnes propriétés de surface en diminuant la tension superficielle air/eau à des valeurs de l'ordre de 30 mN/m. Des applications de ces polysaccharides modifiés pour la formation d'hydrogels comme systèmes d'encapsulation et de délivrance de principes actifs sont en cours de développement au laboratoire.

En ce qui concerne les performances des structures monosaccharidiques dérivées de l'alginate, les compositions tensioactives anioniques sans sulfate et sans éthylène glycol permettent un abaissement de la tension superficielle à des valeurs inférieures à 30 mN/m à des concentrations jusqu'à dix à quinze fois plus faibles que les tensioactifs pétrochimiques de référence (sodium lauryl éther sulfate par exemple). D'autre part, selon la nature de la chaine grasse, ces produits conduisent à la formation de mousses stables et fines, ont un pouvoir dégraissant prometteur sur des surfaces salies par des matières grasses (99 % des salissures éliminées) et une capacité à stabiliser des émulsions à température ambiante et à 70 °C à des concentrations trois à six fois plus faibles que celles de références anioniques [7]. Les propriétés émulsionnantes des versions non ioniques uronamides sont également très prometteuses puisque la stabilité des émulsions formées (eau/huile et

huile/eau), en présence ou non d'électrolytes, est nettement supérieure à celles observées avec des références commerciales de type APG [8]. Une autre caractéristique attractive pour le secteur cosmétique concerne les propriétés sensorielles observées à partir de ces tensioactifs innovants. Des touchers riches et non gras ont été obtenus dans le cas de formulations lavantes et de soin pour les mains et le corps. Ces technologies sont en cours de développement industriel au sein de la société SurfactGreen [9].

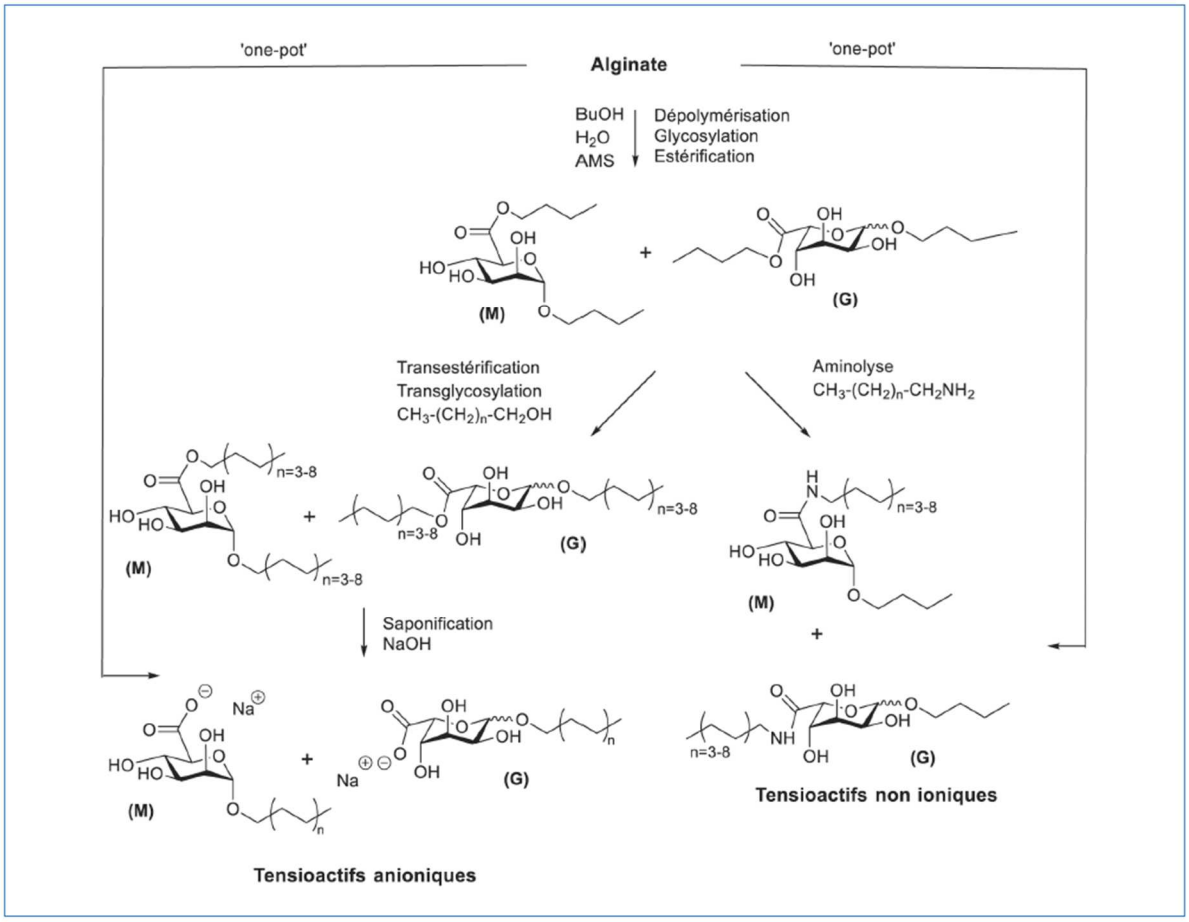


Figure 2 - Synthese des tensioactifs monosaccharides dérivés de l'alginate par l'agent de couplage EDC-HCl. Tensioactifs anioniques : Rdt global (one-pot) = 42-45 % ; tensioactifs non ioniques : Rdt global (one-pot) = 40-45 %.

Algues brunes

La laminarine, composante de la famille des β-(1→3)-glucanes, est extraite de l'algue brune *Laminaria digitata*. Des activités bénéfiques ont été démontrées, comme par exemple des activités anticancéreuses, anti-inflammatoires, anticoagulantes et antioxydantes [10]. Le système immunitaire des plantes est également impacté positivement. Cependant, les effets de biostimulation (activation de l'immunité de la plante), voire de bioprotection (action directe contre le parasite, ici *Plasmopara viticola*, *Pv*), diffèrent significativement entre les études contrôlées sous serre et les essais grandeur réelle en champs. Nous avons conçu, synthétisé et étudié des laminarines plus ou moins hydrophobisées (**AL1** : 1,6 chaine ; **AL2** : 4,6 chaines ; **AL3** : 7,6 chaines ; **PAL** : laminarine peracétylée ; **PML** : laminarine perméthylée) dans le but d'accroitre les interactions avec la membrane cuticulaire (*figure 3*). Formulation, solubilisation, pénétration à travers les feuilles, biostimulation et bioprotection ont ainsi fait l'objet d'études avec l'équipe des Laboratoires Goëmar [11] et les collègues de l'INRA de Dijon [12].

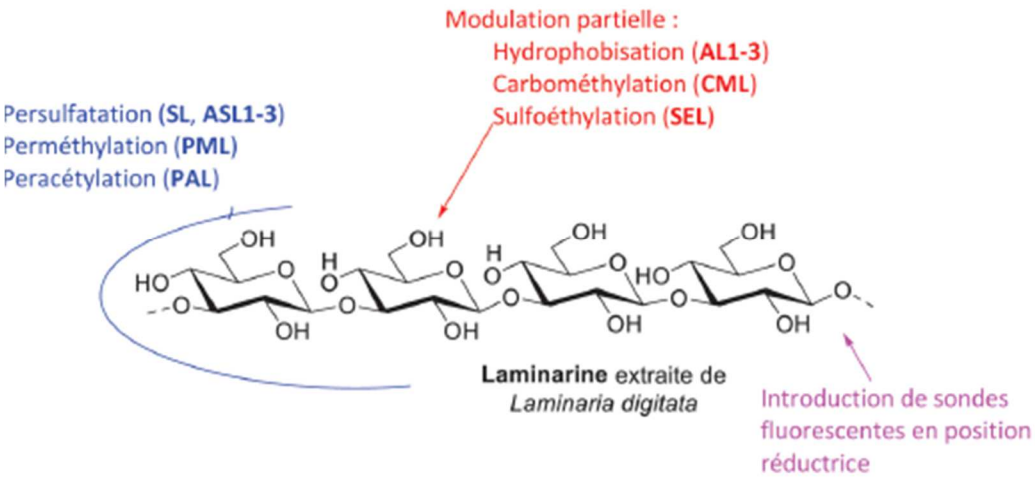


Figure 3 - Structure des laminarines modifiées.

Dans un premier temps, à l'aide de laminarines fluorescentes, il a été montré que la pénétration est nettement favorisée par pulvérisation sur la face inférieure des plantes et lorsque les produits sont formulés avec le Dehscofix®, un tensioactif hautement éthoxylé [13]. Dans un second temps, l'hydrophobisation de la laminarine tend à diminuer les effets biostimulants pour accroitre les effets bioprotecteurs. Quant à la persulfatation (**SL** : laminarine sulfatée ; **ASL** : laminarines acylées et persulfatées), elle tend à faire perdre les propriétés de biostimulation mais à l'inverse renforce les activités de toxicité directe contre les pathogènes étudiés [14]. Les tests réalisés tendent à montrer que le mode de pénétration des polysaccharides étudiés implique essentiellement les stomates présents sur la face inférieure des feuilles de la plante, quel que soit le degré d'hydrophobisation ou de charges négatives présenté par les composés. Les modulations structurales ont en revanche un effet évident sur la balance activation du système immunitaire des plantes (activité élicitrice)/action directe contre le parasite (activité bioprotectrice) (voir *tableau*).

Tableau - Effet des modulations structurales sur les activités biologiques.

Composé	Efficacité de protection	Production de H_2O_2	Production de stilbènes	Production d'espèces oxydantes	Toxicité directe contre le parasite *Pv*
NL	+	+++	++	+++	+
SL	+++	0	++	0	++/+++
AL1	0	+++	/	/	++
AL2	+	/	/	/	/
AL3	+++	+	/	/	+++
ASL1	++	+++	/	/	++/+++
ASL2	++	/	/	/	++/+++
ASL3	+++	+	+	/	++/+++
PAL	+	/	/	/	/
PML	+++	+	+++	/	/
CML	+	/	/	++	/
SEL	+	/	/	++	/
Acide laurique	+++	+	/	/	+++

Approches enzymatiques

Le développement d'approches écoresponsables au laboratoire passe aussi par le développement de biocatalyseurs. Ces approches sont basées sur l'utilisation d'enzymes commerciales (lipases) pour la synthèse d'esters glucidiques, mais aussi pour la préparation de polymères précurseurs de nanoparticules. Les outils de biologie moléculaire permettant par ailleurs de faire évoluer les activités catalytiques d'enzymes d'intérêt, des exemples de réactions sélectives de thioglycosylation et d'acylation sont présentés ci-après.

Acylation 100 % enzymatique du tréhalose

Parmi les procédés de synthèse impliquant une étape enzymatique, l'utilisation de lipases fait partie des plus étudiés avec l'idée principale de réduire l'emploi de chlorures d'acyle ou d'agents de couplage toxiques [15]. Les lipases sont efficaces dans de nombreuses transformations comme la résolution cinétique de composés asymétriques [16], l'hydrolyse ou l'alcoolyse de triglycérides [17], la modification de sucres [18] et de polysaccharides [19]. Ces deux derniers exemples illustrent l'importance de ce type de transformation conduisant ici à des molécules biologiquement actives.
Pourtant, l'estérification enzymatique est souvent peu efficace tant le processus est réversible. On lui préfèrera alors la transestérification enzymatique avec un ester d'alkyle ou de vinyle, dans un milieu organique. La transestérification est alors bien plus efficace, déplaçant l'équilibre vers la formation de l'ester désiré.
Cependant, elle implique aussi une étape chimique pour accéder aux esters activés (ester d'alkyle ou de vinyle), réduisant parfois lourdement l'intérêt du processus enzymatique.
Récemment, notre groupe s'est intéressé à cette problématique en proposant une stratégie d'estérification/transestérification 100 % enzymatique [20]. Cette étude a été faite dans le cadre de l'estérification du tréhalose pour lequel les composés 6,6'-diacylés présentent un intérêt à la fois dans un contexte biologique [21] et comme molécules amphiphiles [22]. Jusqu'à maintenant, ce type de produits nécessitait plusieurs étapes de synthèse [23] et l'estérification enzymatique était peu efficace, conduisant principalement à une monoestérification [24].
Notre stratégie comprend deux étapes enzymatiques consécutives à partir des plus simples produits initiaux, des acides gras, le tréhalose et une lipase [20]. Dans un premier temps, l'ester gras du 2,2,2-trifluoroéthyle est préparé par une estérification enzymatique, puis cet ester est engagé dans une étape de transestérification enzymatique conduisant au glycolipide final (*figure 4*). Les esters de trifluoroéthyle présentent plusieurs avantages : en termes de réactivité, puisque le trifluoroéthanol est un bon groupe partant, et en termes l'accès à partir de trifluoroéthanol lui-même. Le défi consistait à développer un accès enzymatique efficace aux esters de 2,2,2-trifluoroéthyle, et à contrôler le processus de transestérification en vue de la préparation sélective des diacyles et/ou des monoacyltréhaloses, ouvrant alors l'accès à des dérivés dissymétriques.

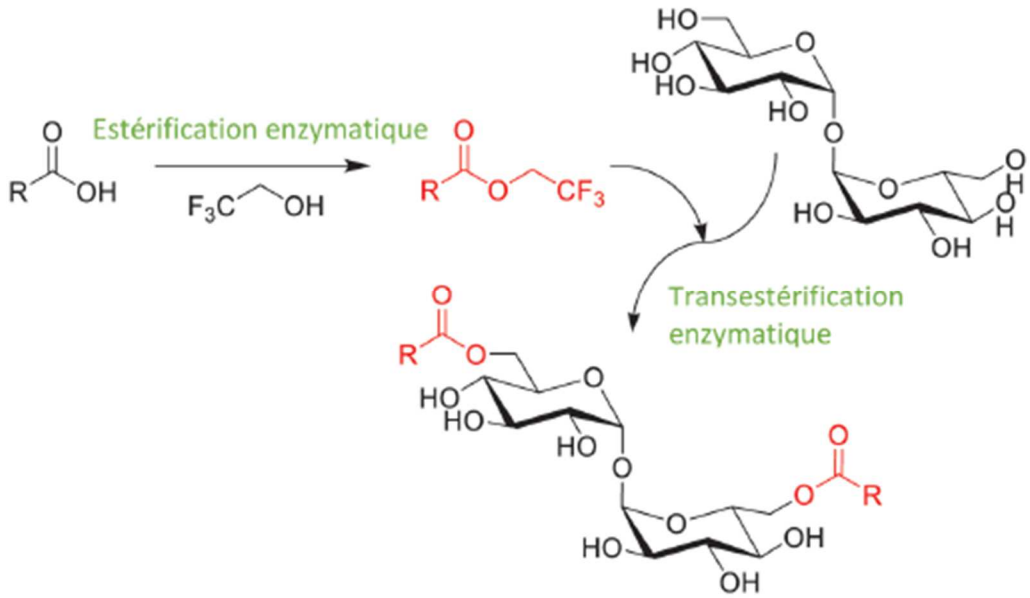


Figure 4 - Stratégie 100 % enzymatique pour l'acces aux acyltréhaloses.

Concernant l'estérification d'acide gras par le 2,2,2-trifluoroéthanol, la recherche des conditions optimales nous a conduits à mettre en réaction cinq équivalents d'alcool dans le *t*-BuOH ou le *n*-hexane en présence de la lipase CAL-B immobilisée (Novozyme 435). Ces conditions sont très efficaces, notamment lors d'une activation micro-onde (180 W, 46 °C), conduisant ainsi aux esters gras correspondants avec 59 à 82 % de rendement (*figure 5*).

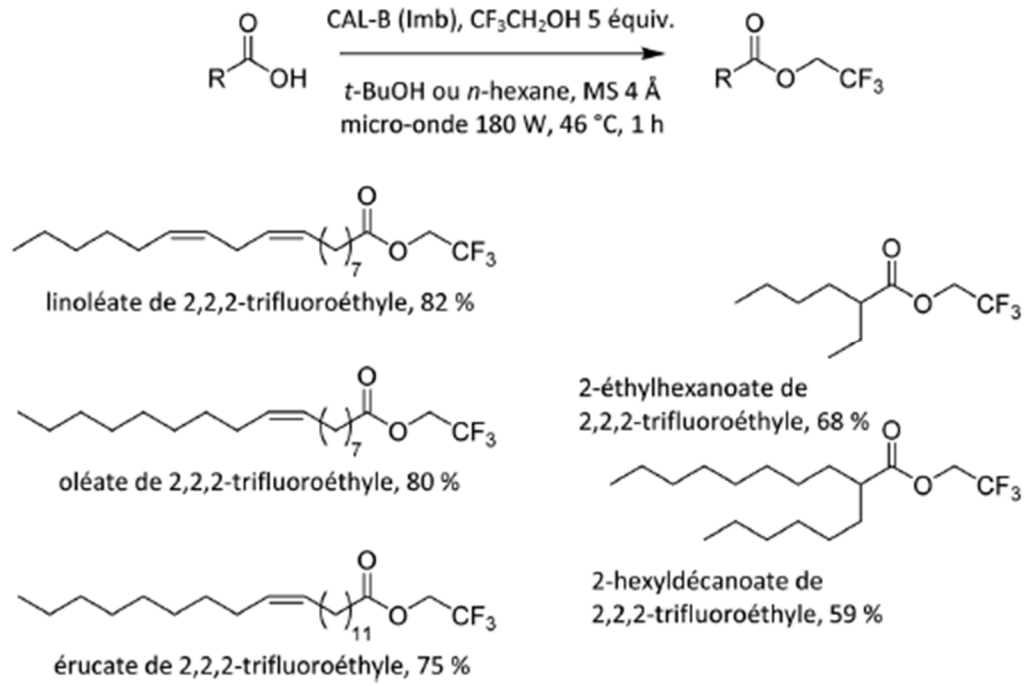


Figure 5 - Préparation des esters gras de 2,2,2-trifluoroéthyle.

En engageant les esters de trifluoroéthyle dans les réactions de transestérification en présence de tréhalose, nous avons pu préparer facilement les dérivés diacylés. L'acylation s'opère sélectivement sur les positions primaires 6 et 6' du sucre, permettant d'obtenir la double réaction avec des rendements allant de 33 à 92 %, là encore au moyen d'une activation micro-onde (*figure 6*).

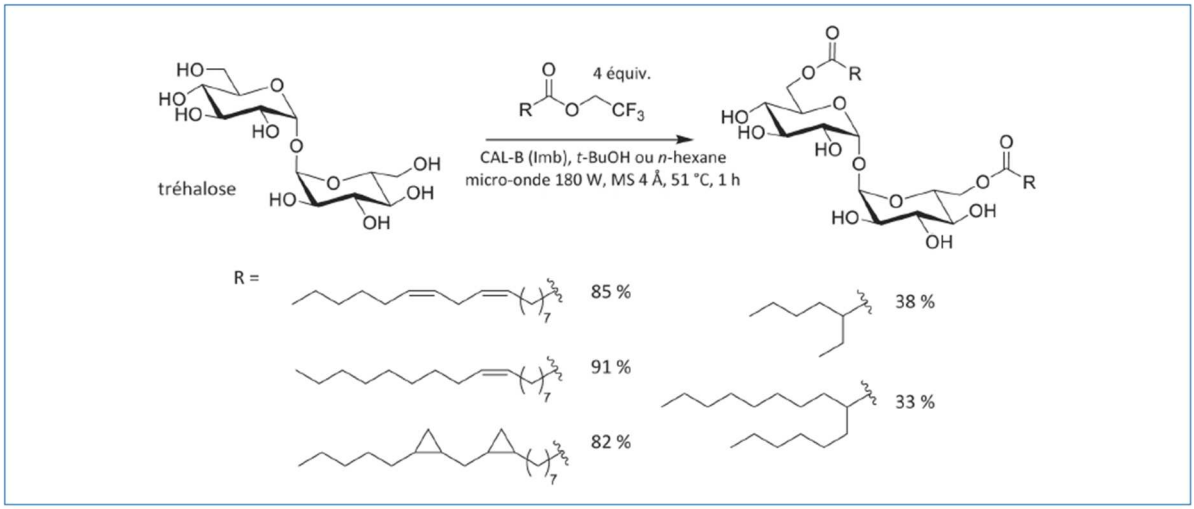


Figure 6 - Préparation des diacyltréhaloses.

Il faut noter ici que les deux acylations s'effectuent en deux temps ; il est alors possible d'isoler le dérivé monoacylé en réduisant la quantité d'agent acylant à 1,1 équivalent (73 %). Ce dernier peut être engagé dans une autre réaction de transestérification avec un autre ester gras, ouvrant l'accès aux dérivés diacylés dissymétriques (*figure 7*).

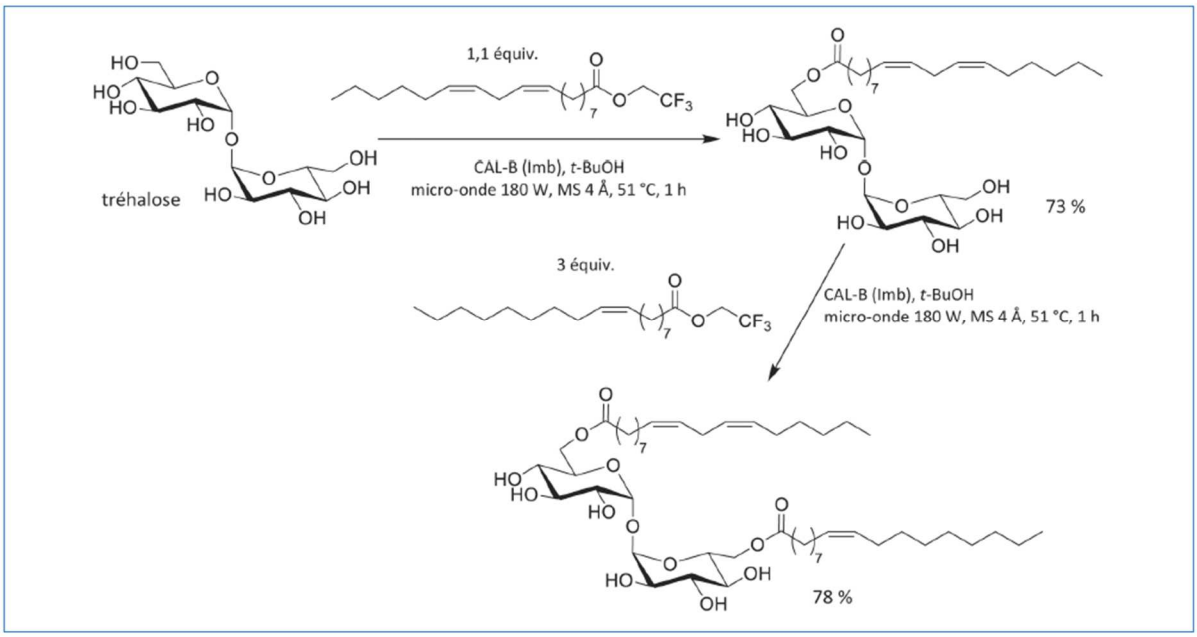


Figure 7 - Préparation des diacyltréhaloses dissymétriques.

Cette stratégie 100 % enzymatique permet donc la synthèse simple et efficace de dérivés acylés du tréhalose, qui représentent une classe importante de molécules biologiquement actives. Le diacyltréhalose final est obtenu par une transestérification enzymatique à partir d'esters gras de 2,2,2-trifluoroéthyle. Ce choix était particulièrement approprié car il a permis de développer un processus enzymatique d'accès aux esters gras de 2,2,2-trifluoroéthyle, de sorte qu'un biocatalyseur unique a été utilisé pour une réaction d'estérification/transestérification en deux étapes. Ce travail renouvelle l'accès aux composés de type diacyltréhalose symétriques et dissymétriques d'une manière plus respectueuse de l'environnement, en évitant toute étape d'estérification classique.

Polymères biodégradables

L'utilisation de lipases a été étendue à la polymérisation de malolactonates afin d'obtenir des dérivés du poly(acide malique). Cette volonté de développer une voie de synthèse enzymatique alternative aux méthodes classiques provient des applications biomédicales souhaitées pour ces polymères. En effet, grâce à leurs remarquables propriétés de (bio)dégradabilité et de biocompatibilité, le poly(acide malique) et ses dérivés sont utilisés comme vecteurs de principes actifs, mais leur voie de synthèse classique met en jeu des amorceurs chimiques dont la présence, même à l'état de traces dans les matériaux finaux, peut être à l'origine d'effets toxiques [25]. La première phase de ce travail était donc de prouver la faisabilité de cette synthèse enzymatique en obtenant des poly(malate de benzyle), PMLABe, répondant à un cahier des charges établi en tenant compte des applications potentielles de ce type de polymères dans le domaine de la vectorisation de principes actifs.

Les premiers essais de polymérisation du malolactonate de benzyle (MLABe) par des lipases (*figure 8*) de pancréas de porc (PPL) ont permis de prouver la faisabilité de cette polymérisation et d'obtenir des oligomères (cinq unités de répétition). La PPL est mise en suspension dans du tampon Tris-HCl et ajoutée au mélange contenant le MLABe dilué dans du toluène. La réaction a lieu à 60 °C pendant 72 h (300 rpm). Des essais complémentaires et une étude bibliographique [26] ont permis de choisir six paramètres à optimiser (ratio PPL/MLABe, ratio tampon/toluène, vitesse d'agitation, concentration en MLABe dans le toluène, température et concentration du tampon). Un plan d'expérience a alors été réalisé pour obtenir les meilleures conditions expérimentales pour la synthèse de polymères de masse molaire élevée. Les résultats obtenus montrent que la masse molaire des polymères dépend principalement de la concentration en MLABe dans le toluène. Plus le MLABe est concentré dans le toluène, plus la masse molaire des polymères est élevée. En extrapolant ce résultat, la réaction de polymérisation a été réalisée sans solvant organique. Ce changement de conditions opératoires a permis la synthèse de polymères ayant un nombre d'unités supérieur à 50 (≈ 65).

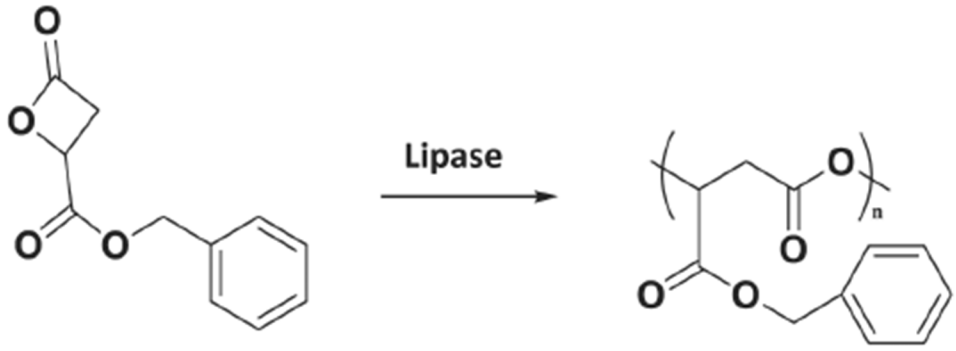


Figure 8 - Polymérisation par ouverture du cycle du MLABe.

Une banque de plusieurs lipases, issues de différents règnes du vivant (bactéries, champignons, végétaux et animaux), a ensuite été testée dans les conditions expérimentales déterminées par le plan d'expérience. Les lipases les plus intéressantes sont celles issues de *Penicillium roqueforti*, du pancréas de porc et de *Mucor javanicus*. D'autres lipases provenant de champignons comme *Aspergillus* et *Rhizopus* présentent également des propriétés intéressantes. Les lipases des levures *Candida,* pourtant très décrites dans la littérature, ont une réactivité assez faible avec le MLABe. Ainsi, un plan d'expérience de cent essais et l'extrapolation de celui-ci ont permis de montrer qu'il est possible d'obtenir des poly(malate de benzyle) avec une masse molaire supérieure à 10 000 g/mol et une dispersité de 1,5, le tout avec une conversion du monomère supérieure à 95 % [27]. Forts de ce succès, nous nous sommes penchés sur les différences de propriétés physico-chimiques observées entre les polymères synthétisés par voie chimique et ceux synthétisés par voie enzymatique. Les températures de fusion mesurées pour les polymères synthétisés par voie enzymatique à partir de monomère racémique semblent indiquer une organisation du polymère, alors que les polymères synthétisés par voie chimique à partir du même monomère n'ont pas de températures de fusion. Ce résultat surprenant nous a amenés à réfléchir sur le rôle de l'enzyme et sur son mécanisme d'action. Des études mécanistiques et cinétiques sont en cours pour essayer de mieux comprendre le mécanisme de la polymérisation.
Finalement, nous nous sommes intéressés aux applications des différents polymères synthétisés. En effet, nous voulions comparer les activités biologiques de différentes formulations à partir de polymères obtenus soit par voie chimique, soit par voie enzymatique, sur des cellules d'hépatome HepaRG. Ainsi, la captation, la toxicité aigüe et la toxicité chronique ont été étudiées sur un lot de sept formulations préparées à partir de sept polymères différents. Notre postulat de départ concernant une plus faible toxicité des formulations préparées avec les polymères enzymatiques s'est révélé inexact. Toutefois, l'étude a permis de mettre en relief certains paramètres de polymérisation pouvant jouer sur la toxicité des formulations correspondantes, tels que la masse molaire des polymères et la configuration du centre asymétrique de la chaine principale. L'étude de l'influence de la nature du polymère sur la morphologie des nanoparticules par microscopie électronique à transmission (TEM) s'annonce très intéressante et pourrait démontrer des relations entre la nature du polymère composant la nanoparticule – la morphologie de la nanoparticule –, la captation et la toxicité de la nanoparticule. Ces résultats [28] ouvrent de nouvelles perspectives et les nanoparticules les plus intéressantes seront utilisées pour des tests in vivo.

Modulation de l'activité catalytique des arabinofuranosidases [29] C'est particulièrement le cas en ce qui concerne les enzymes reconnaissant des substrats glycosylés comme les glycosyltransférases et les glycosylhydrolases [30]. Les premières reconnaissent des nucléotides sucres comme donneur et nécessitent la présence de cofacteur. Le coût et la faible stabilité de ces substrats limitent souvent leur utilisation en biocatalyse. Les deuxièmes sont plus abondantes, plus stables, et donc plus faciles à utiliser. Leur rôle principal est de dégrader les polysaccharides par rupture de la liaison glycosidique. Cependant, il est possible de moduler cette activité catalytique pour les utiliser en synthèse en faisant varier les paramètres opératoires ou par mutation d'acides aminés catalytiques [31].
Dans ce contexte, notre objectif a été de développer une nouvelle méthodologie d'accès à des galactofuranoconjugués possédant des liaisons anomères rares, comme les liaisons *S*-glycosidiques et les liaisons esters. La présence de galactofuranose a été identifiée chez des micro-organismes souvent pathogènes comme les mycobactéries, dont *Mycobacterium tuberculosis* responsable de la tuberculose, ou encore chez les leishmanies, responsables d'infections cutanées ou viscérales [32]. Des molécules dérivées du galactofuranose,

capables d'interférer avec l'anabolisme et le catabolisme de tels galactofuranoconjugués, constituent donc une cible de choix puisqu'elles sont xénobiotiques chez les mammifères.
Le choix du catalyseur enzymatique s'est porté sur l'arabinofuranosidase de *Ruminiclostridium thermocellum* ou *Ct*Araf51. Cette enzyme catalyse la rupture des liaisons α-(1,3)-, (1,5)- et (1,2)- entre le motif L-arabinofuranose terminal et le squelette hémicellulosique chez les plantes [33]. De plus, elle reconnait, même partiellement, le substrat D-galactofuranose, dont la structure présente une forte analogie avec le L-arabinofuranose. Des études préliminaires ont montré que la *Ct*Araf51 est un catalyseur de transglycosylation performant sur les donneurs arabino- et galactofuranoses [34]. La mutation du résidu acido-basique E173 est cruciale car elle permet de diminuer de manière drastique la cinétique de l'attaque des fonctions alcool d'un sucre accepteur ou de l'eau. Cela permet une compétition en faveur d'autres nucléophiles plus forts comme les thiols. Après mutation, l'enzyme présente en effet une bonne activité de thioligation et catalyse le transfert du motif furanose sur différents thiophénols (*figure 9*) [35]. Le donneur utilisé dans ce cas, l'arabinofuranoside de thioimidoyle, est activé selon un mécanisme d'activation à distance jusqu'alors inédit. Ce résultat prometteur étend la stratégie décrite par Withers *et al.* à la série furanose [36]. Un crible large de différents nucléophiles a ensuite été réalisé avec pour objectif de mettre à jour des activités catalytiques inédites pour le mutant Araf51 E173A. Parmi l'ensemble des nucléophiles faibles testés, seuls l'azoture de sodium et l'acide *p*-méthoxybenzoïque ont été glycosylés en présence de l'enzyme mutée. La stabilité du *p*-méthoxybenzoyl d'arabinofuranose, isolé avec un rendement de 78 % sous forme d'un seul diastéréoisomère 1,2-*trans*, est particulièrement bonne car aucune migration d'acyle ni d'hydrolyse n'a été constatée à l'inverse de ce qui est décrit pour les esters de glycopyranosyle [37] (*figure 10*).

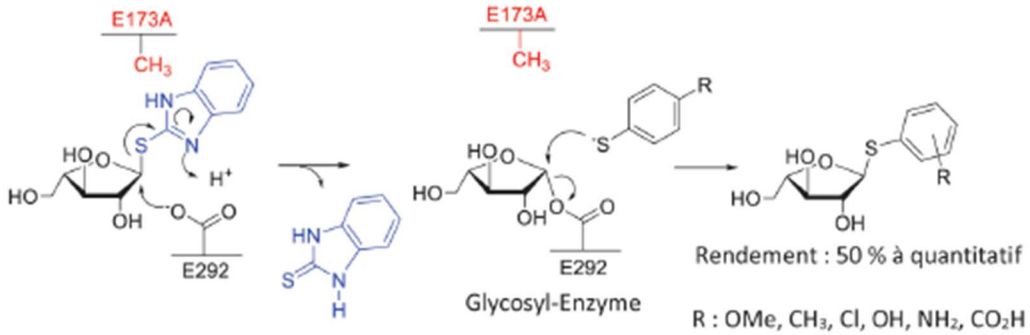


Figure 9 - Réaction de thioligation catalysée par le mutant *Ct*Ara*f*51 E173A.

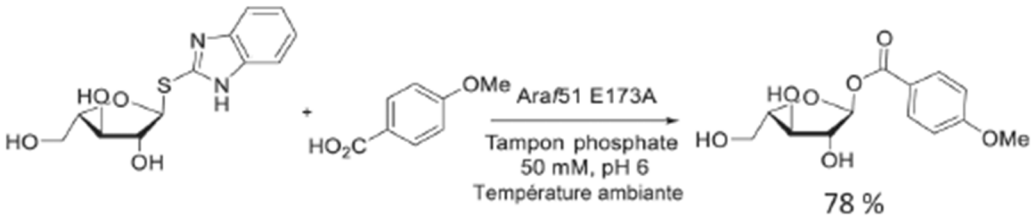


Figure 10 - Synthese du 4-méthoxybenzoyl d'α-L-arabinofuranose catalysée par *Ct*Ara*f*51 E173A.

Les esters de glycosyle sont une famille osidique présentant un intérêt croissant pour l'industrie agroalimentaire ou pharmaceutique. En effet, les sucres acylés par des acides carboxyliques de types aryle [38], saponines [39] ou acides gras [40] sont connus comme des conservateurs, des tensioactifs, ou encore des additifs alimentaires (le stévioside par exemple) [41]. Leur synthèse est souvent longue et fastidieuse et le développement d'alternatives plus efficaces est requis.
Pour valider l'intérêt de la méthode mise au point plus haut, une large gamme d'acides carboxyliques ont alors été criblés comme accepteur de la réaction d'acylation (*figure 11*). Parmi les acides choisis, on trouvera des acides aryliques, aliphatiques, des acides aminés, ou encore des médicaments comme l'ibuprofène. La majorité des substrats ont été convertis en acyle d'arabinofuranose, avec des rendements compris entre 18 et 83 %. La présence de groupements électroattracteurs ou encombrants réduit fortement le rendement obtenu. Par ailleurs, l'existence d'une charge positive sur l'accepteur acide (comme un ammonium) ne permet pas à l'enzyme de catalyser la réaction. Pour les acides aliphatiques ou aromatiques, l'acylation est stéréospécifique mais aussi chimiosélective. En effet, des éventuelles fonctions phénol ou alcool pendantes ne rentrent pas en compétition avec l'acide carboxylique. Par cette méthode, il a également été possible de glycosyler l'ibuprofène et la *N*-Boc phénylalanine, ce qui confirme la possibilité d'étendre la réaction à des médicaments et à des acides aminés.

Pour résumer, une voie d'accès originale aux esters de glycosyle a été mise au point en utilisant une glycosylhydrolase mutée comme catalyseur. Cette réaction a l'avantage d'être menée dans des conditions douces à partir de substrats facilement accessibles et d'un catalyseur sélectif. Elle fonctionne sur une large gamme d'acides carboxyliques avec des rendements plutôt bons et une excellente sélectivité [29]. Cette étude souligne la plasticité des glycosylhydrolases, et de l'arabinofuranosidase en particulier, pour catalyser des réactions variées. Par ailleurs, l'utilisation de cette méthodologie d'acylation est transposable à la synthèse d'acyle de galactofuranose potentiellement bioactif au regard du mimétisme existant entre le L-arabinose et le D-galactofuranose [42].

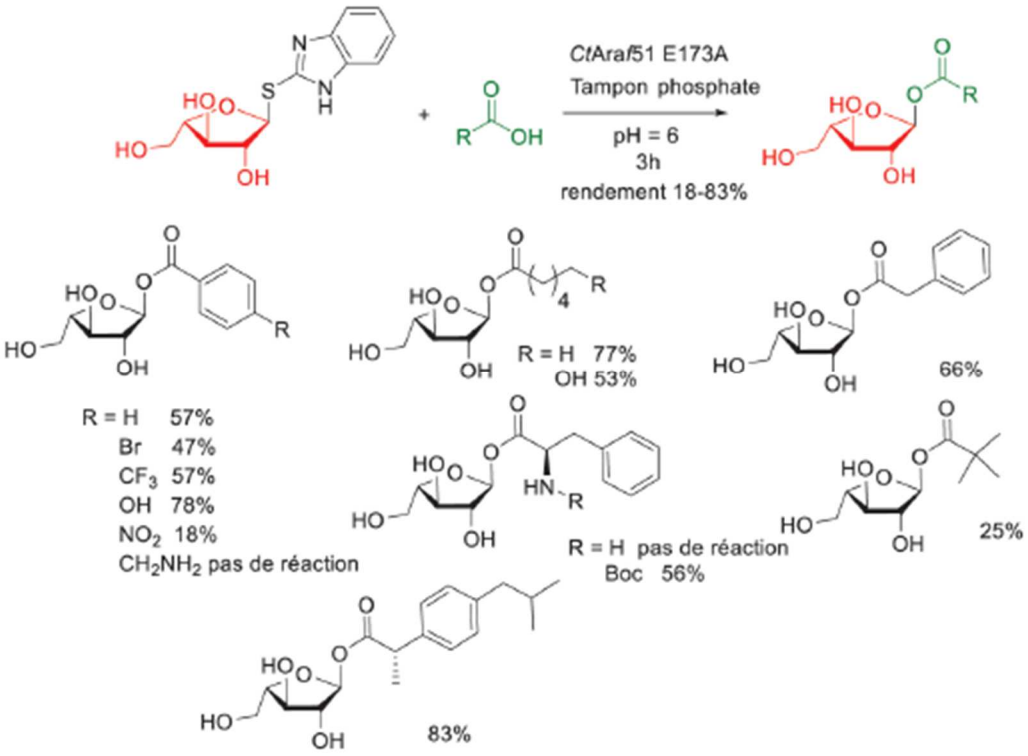
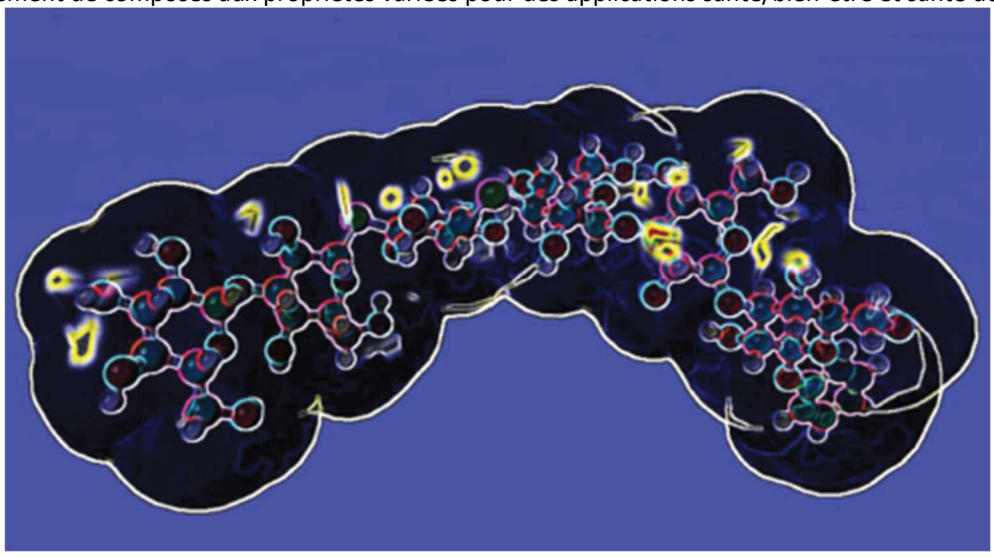


Figure 11 - Extension de la réaction d'acylation a des acides carboxyliques variés.

C'est bon pour la santé !

Ce travail se situe à l'interface de plusieurs domaines que sont la chimie des bioressources, la physico-chimie, la biocatalyse et la biologie cellulaire. C'est cette interdisciplinarité qui fait son originalité et sa richesse pour le développement de composés aux propriétés variées pour des applications santé/bien-être et santé des plantes.



[1] Alves A., Sousa R.A., Reis R.L., A pratical perspective on ulvan extracted from green algae, *J. Appl. Phycol.*, **2013**, *25*, p. 407.

[2] Lahaye M., Robic A., Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds, *Biomacromolecules*, **2007**, *8*, p. 1765.
[3] Benvegnu T., Sassi J.-F., Oligomannuronates from seaweeds as renewable sources for the development of green surfactants, in *Carbohydrates in Sustainable Development. Renewable Resources for Chemistry and Biotechnology*, vol. 294, A.P. Rauter, P. Vogel, Y. Queneau (eds), Springer, **2010**, p. 143 ; Yabur R., Bashan Y., Hernández-Carmona G., Alginate from the macroalgae *Sargassum sinicola* as a novel source for microbial immobilization material in wastewater treatment and plant growth promotion, *J. Appl. Phycol.*, **2007**, *19*, p. 43.
[4] Vincent E., Les alginates et leurs applications en pharmacie et en ingénierie : application a la construction d'un biomatériau, These Univ. de Lorraine, **2010** ; Penman G.R., Sanderson A., A method for the determination of uronic acid sequence in alginates, *Carbohydr. Res.*, **1972**, *25*, p. 273.
[5] Robic A. *et al.*, Seasonal variability of physicochemical and rheological properties of ulvan in two *Ulva* species (Chlorophyta) from the Brittany coast, *J. Phycol.*, **2009**, *45*, p. 9.
[6] Sari-Chmayssem N., Taha S., Mawlawi H., Guégan J.-P., Jeftić J., Benvegnu T., Extracted ulvans from green algae *Ulva linza* of Lebanese origin and amphiphilic derivatives: evaluation of their physico-chemical and rheological properties, *J. Appl. Phycol.*, **2013**, *25*, p. 407.
[7] Benvegnu T. *et al.*, Process for preparing compositions comprising alkyl-(alkylglucoside)uronates, said compositions and use thereof as a surfactant, Brevet WO 2017/098175 A1, **2017**.
[8] Sari-Chmayssem N., Pessel F., Guégan J.-P., Taha S., Mawlawi H., Benvegnu T., Direct and one-pot conversion of polyguluronates and alginates into alkyl L-guluronamide based surfactant compositions, *Green Chem.*, **2016**, *18*, p. 6573.
[9] www.surfactgreen.com
[10] Legentil L. *et al.*, Molecular interactions of β-(1,3)-glucans with their receptors, *Molecules*, **2015**, *20*, p. 9745 ; Descroix K., Ferrieres V., Jamois F., Yvin J.-C., Plusquellec D., Recent progress in the field of β-(1,3)-glucans and new applications, *Mini-Rev. Med. Chem.*, **2006**, *6*, p. 1341.
[11] Lecollinet G., Joubert J.M., Laboratoires Goëmar, Saint-Malo.
[12] Daire X., Trouvelot S., Agroécologie, AgroSup Dijon, CNRS, INRA, Université Bourgogne Franche-Comté, Dijon.
[13] Paris F. *et al.*, An ethoxylated surfactant enhances the penetration of the sulphated laminarin through leaf cuticle and stomata, leading to increased induced resistance against grapevine downy mildew, *Physiol. Plant.*, **2016**, *156*, p. 338.
[14] Paris F. *et al.*, Hydrophobized laminarans as new biocompatible anti-oomycete compounds for grapevine protection, *Carbohydr. Polym.*, **2019**, *225*, 115224.
[15] Otera J., Nishikido J., *Esterification: Methods, Reactions, and Applications*, 2nd ed., Wiley-VCH, **2010**, p. 363.
[16] Bertau M., Jeromin G.E., Resolution of alcohols, acids, and esters by hydrolysis, in *Biocatalysis in Organic Synthesis*, K. Faber, W.-D. Fessner, N.J. Turner (eds), Georg Thieme Verlag, **2015**, p. 129 ; de Souza R.O.M.A. *et al.*, Kinetic resolution of rac-1-phenylethanol with immobilized lipases: a critical comparison of microwave and conventional heating protocols, *J. Org. Chem.*, **2009**, *74*, p. 6157 ; Engstroem K. *et al.*, Dynamic kinetic resolution of β-amino esters by a heterogeneous system of a palladium nanocatalyst and *Candida antarctica* lipase A, *Eur. J. Org. Chem.*, **2011**, *10*, p. 1827 ; Izquierdo D.F. *et al.*, An efficient microwave-assisted enzymatic resolution of alcohols using a lipase immobilised on supported ionic liquid-like phases (SILLPs), *RSC Adv.*, **2013**, *3*, p. 13123 ; Kim M.-J. *et al.*, Dynamic kinetic resolution of secondary alcohols by enzyme-metal combinations in ionic liquid, *Green Chem.*, **2004**, *6*, p. 471.
[17] Chen C.-C. *et al.*, Study of microwave effects on the lipase-catalyzed hydrolysis, *Enzyme Microb. Technol.*, **2016**, *82*, p. 164 ; Tan T. *et al.*, Biodiesel production with immobilized lipase: a review, *Biotechnol. Adv.*, **2010**, *28*, p. 628 ; Yu D.-H. *et al.*, Microwave-assisted fatty acid methyl ester production from soybean oil by Novozym 435,*Green Chem.*, **2010**, *12*, p. 844.
[18] Abdul Rahman M.B. *et al.*, Microwase assisted enzymatic synthesis of fatty acid sugar ester in ionic liquid-*tert*-butanol biphasic solvent system, *Asian J. Chem.*, **2012**, *24*, p. 5058 ; Kobayashi T., Lipase-catalyzed syntheses of sugar esters in non-aqueous media, *Biotechnol. Lett.*, **2011**, *33*, p. 1911 ; Lay L. *et al.*, Regioselective acylation of disaccharides by enzymatic transesterification, *Carbohydr. Res.*, **1996**, *291*, p. 197 ; Magrone P. *et al.*, Exploiting enzymatic regioselectivity: a facile methodology for the synthesis of polyhydroxylated hybrid compounds, *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, *8*, p. 5583 ; Martinez-Montero S. *et al.*, *Eur. J. Org. Chem.*, **2012**, 5483 ; Shi Y.-G. *et al.*, Enzyme-catalyzed regioselective synthesis of sucrose-based esters, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **2011**, *86*, p. 1457 ; Du L.-H., Luo X.-P., Lipase-catalyzed regioselective acylation of sugar in microreactors, *RSC Adv.*, **2012**, *2*, p. 2663 ; Galletti P. *et al.*, Enzymatic acylation of levoglucosan in acetonitrile and ionic liquids, *Green Chem.*, **2007**, *9*, p. 987 ; Rodriguez-Perez T. *et al.*, Novel and efficient chemoenzymatic synthesis of D-glucose 6-phosphate and molecular modeling studies on the selective biocatalysis, *Eur. J. Org. Chem.*, **2007**, 2769.
[19] Adak S., Banerjee R., A green approach for starch modification: esterification by lipase and novel imidazolium surfactant, *Carbohydr. Polym.*, **2016**, *150*, p. 359.
[20] Prabhakar S., Vives T., Ferrieres V., Benvegnu T., Legentil L., Lemiegre L., Fully enzymatic esterification/transesterification sequence for the preparation of symmetrical and unsymmetrical trehalose diacyl conjugates, *Green Chem.*, **2017**, *19*, p. 987.
[21] Guiard J. *et al.*, Synthesis of diacylated trehalose sulfates: candidates for a tuberculosis vaccine, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, p. 9734 ; Indrigo J. *et al.*, Influence of trehalose 6,6'-dimycolate (TDM) during mycobacterial infection of bone marrow macrophages, *Microbiology (Reading, U.K.)*, **2002**, *148*, p. 1991 ; Lima V.M.F. *et al.*, Role of trehalose dimycolate in recruitment of cells and modulation of production of cytokines and NO in tuberculosis, *Infect. Immun.*, **2001**, *69*, p. 5305 ; Sakamoto K. *et al.*, Mycobacterial trehalose dimycolate reprograms macrophage global gene expression and activates matrix metalloproteinases, *Infect. Immun.*, **2013**, *81*, p. 764 ; Stocker B.L., Timmer M.S.M., Trehalose diesters, lipoteichoic acids and α-GalCer: using chemistry to understand immunology, *Carbohydr. Res.*, **2014**, *389*, p. 3.

[22] Franzetti A. *et al.*, Production and applications of trehalose lipid biosurfactants, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **2010**, *112*, p. 617 ; Hibert G. *et al.*, Organogels from trehalose difatty ester amphiphiles, *Soft Matter*, **2019**, *15*, p. 956.
[23] Paul N.K. *et al.*, Direct synthesis of maradolipids and other trehalose 6-monoesters and 6,6'-diesters, *J. Org. Chem.*, **2013**, *78*, p. 363 ; Stocker B.L. *et al.*, On one leg: trehalose monoesters activate macrophages in a mincle-dependent manner, *ChemBioChem*, **2014**, *15*, p. 382 ; Taher S.G. *et al.*, Synthesis of wax esters and related trehalose esters from *Mycobacterium avium* and other mycobacteria, *Tetrahedron*, **2016**, *72*, p. 3863 ; Taher S.G. *et al.*, Synthetic trehalose esters of cis-alkene and diene α'-mycolic acids of mycobacteria, *Chem. Phys. Lipids*, **2015**, *189*, p. 28.
[24] Csuk R. *et al.*, Synthesis of a maradolipid without using protecting groups, *Tetrahedron Lett.*, **2013**, *54*, p. 2274 ; Hsieh S.-W. *et al.*, Enzymatic synthesis, purification and identification of bioactive trehalose ester derivatives for health applications, *Food Bioprod. Process*, **2015**, *95*, p. 163.
[25] Tanzi M.C. *et al.*, Cytotoxicity of some catalysts commonly used in the synthesis of copolymers for biomedical use, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **1994**, *5*, p. 393.
[26] Lohith K. *et al.*, Influence of buffer and L-phenylalanine concentration in the *Rhizomucor miehei* lipase catalysed synthesis of L-phenylalanyl-D-glucose ester investigated through response surface methodology, *Eur. Food Res. Technol.*, **2006**, *224*, p. 219 ; Makareviciene V. *et al.*, Optimisation of enzymatic transesterification of linseed oil and pork lard mixture with ethanol using response surface methodology, *J. Renew. Sustain. Energy*, **2015**, *7*, 053119.
[27] Casajus H. *et al.*, Optimization of lipase-catalyzed polymerization of benzyl malolactonate through a design of experiment approach, *J. Appl. Polym. Sci.*, **2017**, *134*, 44604.
[28] Casajus H. *et al.*, Cell uptake and biocompatibility of nanoparticles prepared from poly(benzyl malate) (co)polymers obtained through chemical and enzymatic polymerization in human HepaRG cells and primary macrophages, *Polymers*, **2018**, *10*, 1244.
[29] Pavic Q., Tranchimand S., Lemiegre L., Legentil L., Diversion of a thioglycoligase for the synthesis of 1-O-acyl arabinofuranoses, *Chem. Commun.*, **2018**, *54*, p. 5550.
[30] Schmaltz R.M. *et al.*, Enzymes in the synthesis of glycoconjugates, *Chem. Rev.*, **2011**, *111*, p. 4259.
[31] Legentil L., Ferrieres V., Regioselective glycosylation: what's new?, in *RSC Carbohydrate Chemistry*, A.P. Rauter, T. Lindhorst, Y. Queneau (eds), Royal Society of Chemistry, **2018**, p. 104-134.
[32] Cabezas Y. *et al.*, Leishmania cell wall as a potent target for antiparasitic drugs: a focus on the glycoconjugates, *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, *13*, p. 8393.
[33] Numan M.T., Bhosle N.B., α-L-arabinofuranosidases: the potential applications in biotechnology, *J. Indus. Microbiol. Biotechnol.*, **2006**, *33*, p. 247.
[34] Chlubnova I. *et al.*, Enzymatic synthesis of oligo-D-galactofuranosides and L-arabinofuranosides: from molecular dynamics to immunological assays, *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, *8*, p. 2092.
[35] Almendros M. *et al.*, Exploring the synthetic potency of the first furanothioglycoligase through original remote activation, *Org. Biomol. Chem.*, **2011**, *9*, p. 8371.
[36] Müllegger J. *et al.*, Engineering of a thioglycoligase: randomized mutagenesis of the acid-base residue leads to the identification of improved catalysts, *Prot. Eng. Design Select.*, **2005**, *18*, p. 33.
[37] Meo F.D. *et al.*, Acylglucuronide in alkaline conditions: migration vs. hydrolysis, *J. Mol. Model.*, **2013**, *19*, p. 2423.
[38] Baderschneider B., Winterhalter P., Isolation and characterization of novel benzoates, cinnamates, flavonoids, and lignans from Riesling wine and screening for antioxidant activity, *J. Agri. Food Chem.*, **2001**, *49*, p. 2788.
[39] Podolak I. *et al.*, Saponins as cytotoxic agents: a review, *Phytochem. Rev.*, **2010**, *9*, p. 425.
[40] Li J.-F. *et al.*, Glycoside modification of oleanolic acid derivatives as a novel class of anti-osteoclast formation agents, *Carbohydr. Res.*, **2009**, *344*, p. 599.
[41] Ceunen S., Geuns J.M.C., Steviol glycosides: chemical diversity, metabolism, and function, *J. Nat. Prod.*, **2013**, *76*, p. 1201.
[42] Pavic Q., Pillot A., Tasseau O., Legentil L., Tranchimand S., Improvement of the versatility of an arabinofuranosidase against galactofuranose for the synthesis of galactofuranoconjugates, *Org. Biomol. Chem.*, **2020**, *18*, p. 1462.

Laurent LEGENTIL, chargé de recherche au CNRS, **Loïc LEMIÈGRE**, maitre de conférences, **Sylvain TRANCHIMAND**, maitre de conférences, **Sandrine CAMMAS-MARION**, chargée de recherche au CNRS, **Caroline NUGIER-CHAUVIN**, maitre de conférences, **Thierry BENVEGNU**, professeur, **Vincent FERRIÈRES***, professeur à l'Université de Rennes, École Nationale Supérieure de Chimie de Rennes (ENSCR), Institut des Sciences Chimiques de Rennes (ISCR, UMR CNRS 6226), équipe Chimie Organique et Interfaces (CORINT).
*vincent.ferrieres@ensc-rennes.fr
https://iscr.univ-rennes1.fr/organic-chemistry-interfaces-corint
www.ensc-rennes.fr/recherche/equipe-cos