

N° d'ordre

UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

ECOLE DOCTORALE : SCIENCES, TECHNOLOGIES, SANTE

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR

Discipline : Chimie

Présentée et soutenue publiquement par

Damien MONNET

**Etude de l'évolution des propriétés mécaniques de matériaux
amylacés par sélection et/ou modifications structurales dirigées**

Soutenue le 16 Décembre 2008 devant le jury composé de :

Pr Christophe LEN	Professeur des Universités, Poitiers et UTC	Président du jury
Dr Serge PEREZ	Directeur de Recherche CNRS, CERMAV Grenoble	Rapporteur
Dr Yves QUENEAU	Directeur de Recherche CNRS, Université Lyon I	Rapporteur
Pr Xavier COQUERET	Professeur des Universités, URCA	Examineur
Dr Patrice DOLE	Chargé de Recherche INRA, Reims	Examineur
Dr Christophe BLIARD	Chargé de Recherche CNRS, URCA	Directeur de thèse

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du laboratoire « Isolement, Structure, Transformation et Synthèse de Substances Naturelles » unité CNRS FRE 2715 dirigé initialement par le Dr Jean-Marc Nuzillard, que je remercie de m'avoir accueilli, puis par le Pr Janos Sapi. Ce laboratoire a ensuite fusionné avec le GRECI et l'UMR 6519 pour donner naissance à l'Institut de Chimie Moléculaire de Reims (ICMR) dirigé par le Pr Xavier Coqueret que je tiens par ailleurs à remercier pour sa participation au jury de thèse.

Je remercie vivement messieurs Serge Perez, Directeur de Recherche au CNRS et à l'INRA au CERMAV de Grenoble, et Yves Queneau, Directeur de Recherche à l'université Claude Bernard de Lyon I, d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail.

Je tiens également à remercier monsieur Christophe Len, Professeur des universités à Poitiers détaché à L'UTC au sein de l'Institut de Chimie Verte et Développement Durable de Picardie, pour l'intérêt qu'il a porté à mon travail et sa participation au jury de thèse.

Je remercie sincèrement messieurs Christophe Bliard, Chargé de Recherche au CNRS, et Patrice Dole, Directeur de Recherche à l'UMR FARE-INRA 614, de m'avoir confié ce travail et de m'avoir fait confiance pour le mener à bien en étant mes deux co-directeurs de thèse. Ils m'ont tous deux permis d'acquérir une expérience dans le domaine des polymères naturels ainsi que dans le domaine des matériaux. Je tiens à les remercier tout particulièrement pour leur gentillesse, leur disponibilité et leur écoute.

Je souhaite remercier Mr Richard-Mollard pour sa suggestion de sélection de grains d'amidon par tamisage à sec.

Je tiens à remercier madame Catherine Joly, Maître de Conférences à l'université de Reims, pour l'aide précieuse qu'elle m'a apportée dans le domaine de la DSC.

Je veux aussi remercier ici monsieur Jacques Douglade, Professeur des universités à Reims pour l'aide essentielle qu'il m'a fournie lors des analyses par diffraction des rayons X.

Je veux remercier vivement Arnaud Haudrechy pour la relecture finale du manuscrit.

Je remercie Jean-François Lacoste pour son aide essentielle dans la gestion des références bibliographiques.

Je ne peux pas oublier de remercier messieurs Alain Lemaître (enfin Pol !!), Technicien au sein de l'UMR FARE-INRA 614, pour sa gentillesse, son humour mais surtout pour l'aide essentielle qu'il m'a apportée dans le domaine de la formulation, du casting et de l'extrusion des matériaux et monsieur Bernard Richard (ou plutôt Nanard !!), Technicien au sein de la FRE 2715, pour sa sympathie et l'aide qu'il m'a apportée dans le domaine de l'extraction de substances naturelles.

J'aimerais associer tous les membres de la FRE 2715 avec qui j'ai passé de très bons moments pendant ces années de thèse. Je les remercie pour la sympathie et la gentillesse dont ils ont fait preuve.

J'aimerais également remercier pour leur contribution à ce travail les stagiaires que j'ai pu encadrer pour des périodes comprises entre 1 et 18 semaines et pour des niveaux allant de la 3^{ème} à la licence professionnelle en passant par la 1^{ère} S, le BTS 1^{ère} année et les DUT 1^{ère} et 2^{ème} année. Dans l'ordre chronologique : Hervé Ruffin, Florie Rabelle, Yohan Quenot, Quentin Breik, Aline Froment, Déborah Deloince, Victor Labuzan, Julien Fagot, Lorenzo Lieddu, Charly Macciot et enfin Jean-Charles Delabre.

Le soutien financier nécessaire à la réalisation de ce travail a été apporté par le conseil général de la Marne via l'EUROPOL'AGRO.

Je ne peux terminer sans adresser tous mes remerciements, toute ma reconnaissance et tout mon amour à mes parents sans qui je n'aurais jamais pu en arriver là. J'y associe bien entendu toute ma famille.

A Louis, tu me manques
A Eliane, je ne t'oublierai jamais
A Lucien et Anita

SEMPER ET UNDIQUE

Introduction Générale	8
I) L'amidon	11
1) Composition chimique.....	12
a) L'amylose	12
b) Amylopectine.....	14
c) Le matériel intermédiaire.....	15
2) Structure cristalline des amidons	16
a) Le grain d'amidon.....	16
b) La zone cristalline.....	17
c) La zone amorphe.....	19
3) Propriétés hydrothermiques	20
a) La gélatinisation.....	20
b) La rétrogradation	22
c) L'amidon matériau.....	24
α) Le casting	25
β) L'extrusion	25
d) Le vieillissement.....	26
α) Le vieillissement physique.....	27
β) Le vieillissement par recristallisation.....	28
II) Facteurs d'influence des propriétés mécaniques des matériaux amylicés simples	29
1) L'origine botanique	29
2) Le plastifiant	32
3) Le vieillissement.....	36
a) Rétrogradation	36
b) Vieillissement physique.....	38
4) La mise en forme	39
5) Modifications structurales des amidons	40
a) Modifications chimiques.....	40
b) Modifications enzymatiques.....	41
Conclusion	42
III) Modulation de la structure de l'amidon.....	45
A) Fractionnement physique.....	46
1) Isolement de fortes masses par précipitation fractionnée	47
a) Amidon d'igname	49
b) Amidon de blé	50
c) Conclusion	51
2) Ultra-filtration frontale agitée.....	52
a) Conditions de solubilisation.....	53
b) Taille des pores	53
c) Conclusion	55
3) Fractionnement à sec de l'amidon natif.....	56
B) Couplage spécifique en bout de chaîne.....	59
1) Couplage à partir de l'extrémité non-réductrice.....	61
2) Couplages à partir de l'extrémité réductrice en milieu organique.....	63
a) Couplage par acylglycosylation.....	64
b) Désacétylation sélective	66
α) Déprotection chimique	66
β) Déprotection enzymatique.....	68
3) Couplages à partir de l'extrémité réductrice en milieu aqueux	70
a) Diamination réductrice	70

α) Rappels bibliographiques	70
β) Couplage sur modèle maltose.....	72
γ) Couplage sur modèle dextrane.....	73
δ) Couplage sur l'amylose	76
ε) Couplage sur l'amidon.....	78
b) Couplage par amination réductrice suivie d'une réaction de métathèse	79
α) Synthèse du dérivé éthylénique.....	81
β) Choix du catalyseur	82
γ) Synthèse du catalyseur cible	83
C) Modifications par attaque enzymatique	86
1) Propriétés physico-chimiques des dextrines limites.....	87
2) Cinétique d'hydrolyse enzymatique par β-Amylase	90
a) Cinétique.....	90
b) Dégradations	91
3) Etude de la recristallisation des dextrines partielles.....	99
a) Etude par DSC	99
b) Etude par diffraction des rayons X.....	102
Conclusion	104
IV) Matériaux à base d'amidons modifiés.....	106
A) Amidons natifs et dextrines limites	107
1) Propriétés mécaniques des amidons natifs et de leur dextrine limite.....	107
2) Etude comparative du vieillissement d'un amidon natif et de sa dextrine limite.....	112
B) Propriétés mécaniques des amidons modifiés.....	116
1) Présentation de la méthode	116
2) Amidons natifs fractionnés.....	117
a) Amidon de blé.....	118
b) Amidon de pomme de terre	122
3) Amidon partiellement dégradé	125
4) Amidons natifs couplés	132
Conclusion	140
V) Matériels	142
1) Les amidons.....	142
2) Les dextrans	142
3) Le plastifiant.....	142
4) Les agents de couplage.....	142
5) L'enzyme.....	143
VI) Méthodes	144
1) Traitements initiaux sur les amidons.....	144
a) Déprotéination et dégraissage.....	144
α) Déprotéination d'un amidon : méthode de E. Bertoft ^[99]	144
β) Dégraissage d'un amidon	144
b) Séparation Amylose/Amylopectine : méthode de Gilbert ^[98]	145
c) Tamisage.....	145
α) Amidon de blé.....	145
β) Amidon de pomme de terre	146
d) Dégradation enzymatique	146
α) Dégradation partielle.....	146
β) Dégradation limite.....	147
2) Chromatographie d'exclusion stérique (SEC).....	147

3) Ultra-filtration frontale agitée.....	148
4) Modifications chimiques	150
a) Synthèse de l'undécylénate d' α - <i>O</i> -heptaacétylmaltosyle :	150
b) Synthèse de l'icosyl-10-énate de di- α - <i>O</i> -heptaacétylmaltosyle :.....	151
c) Synthèse de l'azélate de di- α -heptaacétylmaltosyle.....	152
d) Diamination réductrice sur le maltose	153
e) Couplage des dextrans	154
α) Dextrine 10 KDa	154
β) Dextrine 40 KDa	155
γ) Dextrine 70 KDa	155
f) Couplage de l'amylose à l'ortho-diaminobenzène.....	155
g) Synthèse du PEG diaminé	156
α) Tosylation des groupements hydroxyles d'extrémités de chaînes	156
β) Synthèse de l'azido-PEG.....	156
γ) Synthèse du diamino-PEG	157
h) Couplages de l'amidon	157
5) Mise en œuvre des matériaux	158
a) Le casting	158
b) L'extrusion.....	158
6) Analyses.....	159
a) Des solutions.....	160
α) Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).....	160
β) Infra-Rouge (IR).....	160
γ) Ultra-Violet (UV).....	160
δ) Viscosité	160
b) Des matériaux	162
α) Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)	162
β) Diffraction des rayons X	163
7) Conditionnement	164
8) Tests mécaniques.....	164
Conclusion générale.....	167

Introduction Générale

Depuis quelques années maintenant, les experts prédisent l'épuisement des ressources pétrolières. La baisse de la disponibilité du pétrole entraîne la flambée de son prix et la hausse du tarif de tous les produits dérivés. De ce fait, un des enjeux majeurs de la chimie actuelle est le remplacement des produits dérivés du pétrole par des produits dont l'origine est renouvelable, des carburants aux synthons de la chimie organique, en passant par les matériaux plastiques.

Par ailleurs, l'essor de l'industrie depuis la fin de la seconde guerre mondiale a été tel que la quantité de gaz à effet de serre dégagée dans l'atmosphère commence à provoquer les modifications climatiques que l'on connaît : réchauffement global de la planète, fonte des glaciers, augmentation du niveau des océans... Pour enrayer ce phénomène, sous l'égide des Nations Unies, différents accords (Rio de Janeiro, Kyoto...) ont été signés par une grande majorité de pays industrialisés afin de diminuer les émissions de gaz à effet de serre. Ceci a pour conséquence de modifier très singulièrement l'approche de l'industrie par rapport à l'impact de ses activités. Il faut désormais répondre aux mêmes besoins en respectant l'environnement. Concernant les matériaux une voie à privilégier est l'utilisation des agro-ressources comme matière première puisqu'elles libèrent lors de leur destruction le carbone qu'elles ont consommé initialement pour leur développement.

Parallèlement à cela, dans les années 90, la Champagne-Ardenne, région agricole par excellence, a été confrontée à une surproduction qu'elle souhaitait valoriser. De ce fait, en 1994, sous l'impulsion de la Chambre d'Agriculture de la Marne, coordonnés par Europol'agro, l'université de Reims Champagne-Ardenne et des industriels de la région ont lancé un programme de recherche visant à la valorisation non- alimentaire des agro-ressources, appelé « nouveaux matériaux d'emballages biodégradables issus de matières premières végétales régionales ». L'un des objectifs était d'étudier la faisabilité de nouveaux matériaux à partir des polymères naturels. Ce projet a été suivi en 2000 par le programme AMIVAL, concentré exclusivement sur la valorisation de l'amidon. Une tâche du programme AMIVAL fut de se concentrer sur l'établissement de relations formulation/propriétés et structure/propriétés. Il est donc apparu que cette thématique de recherche s'est retrouvée en adéquation avec la problématique actuelle. En effet, aujourd'hui, de nombreuses équipes

tendent d'améliorer les propriétés des matériaux d'origines naturelles afin de substituer à terme une partie des matériaux d'origines fossiles.

Ce travail de thèse s'inscrit donc dans ce programme AMIVAL. L'étude concerne l'amidon matériau et ses propriétés mécaniques. Intrinsèquement, elles sont faibles par rapport aux matériaux plastiques actuellement utilisés. Ses lacunes sont essentiellement dues à une forte affinité pour l'eau que ses hydrates de carbone constitutifs lui confèrent, un temps de vie très court lié à une forte capacité à recristalliser et enfin à la structure même de l'amylopectine, son principal constituant macromoléculaire. Après deux programmes CPER, les laboratoires participant au projet ont acquis une expérience reconnue dans le domaine des amidons matériaux. Différentes stratégies ont été mises en œuvre pour moduler les propriétés mécaniques à rupture :

- La réalisation d'esters d'amidon (limitation de l'hydrophilie et plastification interne)
- La photoréticulation (générant un réseau tridimensionnel faiblement réticulé)
- La réalisation de mélanges de polymères hydrophiles/hydrophiles et hydrophiles/hydrophobes
- La modification de la nature et du taux de plastifiant s'appuyant sur des modèles d'interaction

Il ressort globalement que les propriétés mécaniques atteintes via des stratégies quelquefois complexes peuvent être beaucoup plus simplement obtenues en modifiant le taux et/ou la nature du plastifiant. A partir de ce résultat une carte des propriétés mécaniques à rupture exprimant la contrainte en fonction de l'allongement a pu être proposée. Cette carte met en évidence une zone de propriétés, dans laquelle on retrouve l'ensemble des matériaux amylicés produits, superposable à la « courbe référence » de plastification.

L'objectif de ce travail a donc été de produire des matériaux dont les propriétés mécaniques à rupture s'éloignent de façon significative de cette « courbe référence ». Pour ce faire, ce travail de thèse s'est principalement basé sur une hypothèse : l'augmentation des interactions longues distances entre les chaînes doit permettre d'améliorer les propriétés. Ceci implique la réalisation de macromolécules dont la longueur et l'enchevêtrement des chaînes sont augmentés. Ces caractéristiques peuvent permettre l'obtention d'un réseau orienté.

Dans ce mémoire sera d'abord proposé un rappel sur les propriétés générales de l'amidon puis les facteurs influençant les propriétés mécaniques à rupture des matériaux amylicés. Dans un second temps, seront présentées les différentes modulations de structure que nous avons apportées aux amidons pour ensuite proposer une analyse des comportements mécaniques observés sur ces amidons modifiés.

I) L'amidon

Dans le monde végétal, l'amidon est synonyme de réserve énergétique. En effet, qu'il s'agisse de légumineuses, de céréales ou de tubercules, la source d'énergie est toujours l'amidon. Il s'agit principalement d'un mélange de deux familles d'homopolymères d' α -D-glucopyranose de conformation 4C_1 (thermodynamiquement la plus stable) liés soit par des liaisons $\alpha(1-4)$ soit par des liaisons $\alpha(1-6)$: l'Amylose et l'Amylopectine. Elles ne diffèrent que par le nombre de branchements $\alpha(1-6)$ présents et par leur structure primaire. L'amylose est une macromolécule « linéaire » tandis que l'amylopectine est ramifiée.

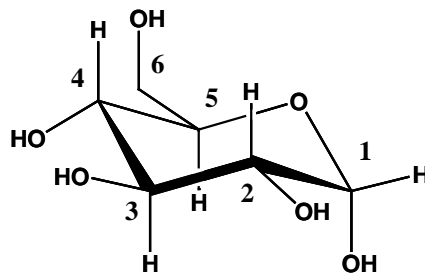


Figure 1 : α -D-glucose de conformation 4C_1

Par ailleurs, selon l'origine botanique de l'échantillon d'amidon étudié, on ne retrouve pas le même ratio amylose/amylopectine, cette observation concernant d'ailleurs aussi quelques composés très minoritaires tels que les lipides, les protéines ou encore les phosphates. Une des particularités de l'amidon réside dans sa structure au sein même de la plante puisqu'il est organisé sous forme de grains qui peuvent avoir différentes tailles mais aussi différentes formes.

Amidons	amylose	lipides	protéines	cendres	phosphore
maïs normal	28	0,65	0,3	0,1	0,015
maïs cireux	<1	0,23	0,1	0,1	0,003
maïs riche en amylose	65-70	1,11	0,5	0,2	0,03
blé	25-28	0,24	0,33	0,3	0,05
pomme de terre	19-22	0,09	0,05	0,3	0,04
pois lisse	33-35	0,19	0,18	0,05-0,22	0,04

Tableau 1 : Composition de différents amidons exprimée en % d'amidon sec^[1]

1) Composition chimique

a) L'amylose

L'amylose est l'un des deux polysaccharides constituant l'amidon. Il s'agit d'un polyholoside essentiellement linéaire de glucose puisqu'il possède moins de 1% de branchement $\alpha(1-6)$ [2, 3]. Par ailleurs, les chaînes d'amylose ont un Degré de Polymérisation (DP) dépendant de l'origine botanique, qui en moyenne est de 500 [4] mais sous ce nombre se cache une très grande polydispersité avec des chaînes pouvant aller de 300 à 10^4 unités glucoses [5]. Ainsi, la masse molaire moyenne de l'amylose peut aller de $3,4 \times 10^5$ g/mol pour un amylose de maïs à $1,05 \times 10^6$ g/mol pour celui du manioc [6].

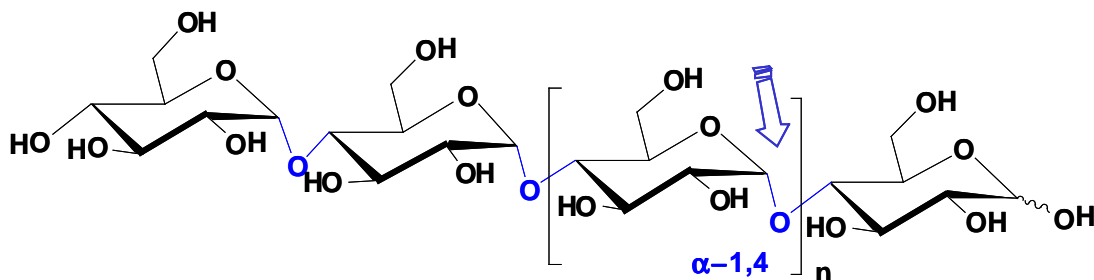


Figure 2 : chaîne d'amylose

L'existence de ces chaînes linéaires ainsi que la flexibilité induite par les liaisons $\alpha(1-4)$ donne à l'amylose la capacité de complexer de nombreuses molécules hydrophobes telles que de petites chaînes hydrocarbonées de type butanol ^[7], acides gras, l'iode moléculaire ou encore des agents tensioactifs ^[8]. Cette complexation implique une structure particulière de la chaîne d'amylose. Lorsque l'on place en solution ce type de molécules et de l'amylose, il y a instantanément un arrangement en hélice de la chaîne glucidique créant une cavité hébergeant la molécule hydrophobe. En effet, lors de la formation de l'hélice, tous les hydroxyles en position équatoriale des glucoses se trouvent à l'extérieur de l'hélice et de ce fait se crée, au cœur de celle-ci, une cavité hydrophobe de 4,5 Å de diamètre capable d'accepter de petites molécules.

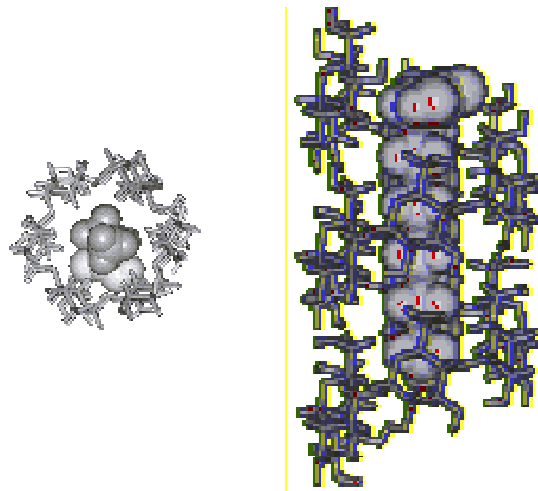


Figure 3 : Complexation d'un acide gras par l'amylose^[7]

C'est d'ailleurs grâce à cette capacité de complexation que l'on peut caractériser analytiquement l'amylose. La complexation de l'iode moléculaire par l'amylose (jusqu'à 20 mg d'iode pour 100 mg d'amylose), donne naissance à une entité colorée dont le λ_{max} est fonction de la taille de l'ion polyiodo-iodure au sein de la cavité, et est compris entre 620 et 640 nm ^[9]. De cette manière, on peut remonter à la longueur moyenne des chaînes d'amylose d'un échantillon.

b) Amylopectine

L'amylopectine est le composant majoritaire de l'amidon puisqu'il représente en moyenne 70 à 80 % de l'amidon sec. Cette macromolécule est, tout comme l'amylose, un homopolymère constitué de glucose majoritairement liés en $\alpha(1-4)$ mais comptant 5 à 6 % de liaisons $\alpha(1-6)$ ^[3], ce qui lui confère une structure primaire ramifiée. Cette structure, au nombre important de chaînes reliées les unes aux autres par les liaisons $\alpha(1-6)$, de 180 à 1800 par molécule^[10], engendre des masses molaires moyennes beaucoup plus élevées que celles de l'amylose, variant entre 10^7 et 10^9 en fonction du cultivar^[2].

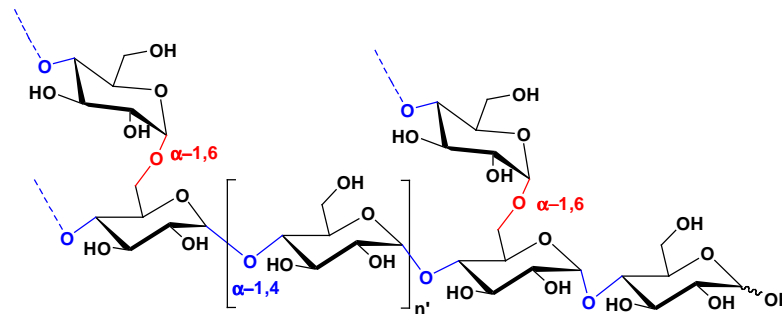


Figure 4 : Amylopectine avec les branchements $\alpha(1-6)$

A ce jour, après de nombreux modèles envisagés^[7, 11-13], le modèle du cluster (grappe) est considéré comme le modèle le plus représentatif pour la communauté scientifique travaillant sur la détermination structurale de l'amylopectine. Au sein de l'amylopectine, on différencie 3 types distincts de chaînes :

- Des chaînes courtes S (short) de DP moyen 15-20
- Des chaînes longues L (long) de DP moyen 40-45
- Des chaînes de DP moyen supérieur à 60

Les chaînes ayant un DP supérieur à 60 sont beaucoup moins nombreuses que les deux autres. En fonction du cultivar, c'est le rapport L/S qui varie. Dans les tubercules, le ratio est de 5 tandis qu'il est plutôt de 8-10 dans les céréales.^[13, 14]

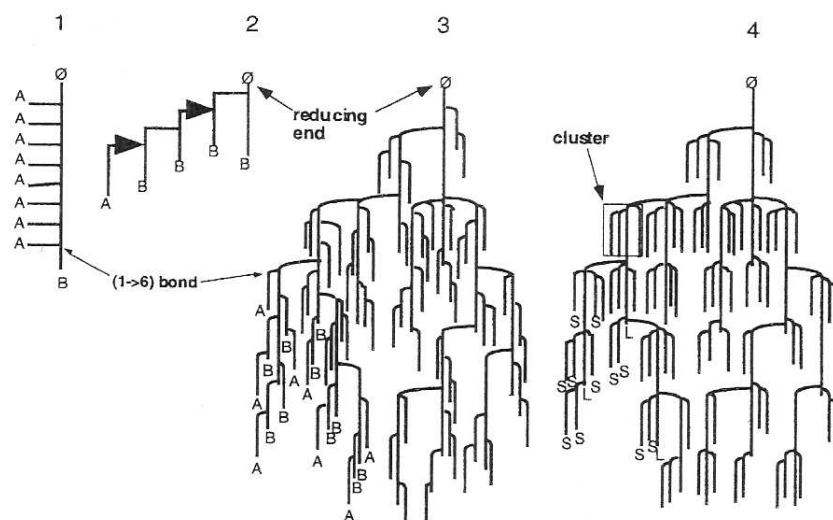


Figure 5 : Différents modèles proposés par (1) Haworth, (2) Staudinger, (3) Meyer, (4) Meyer version du cluster^[7]

Dans le modèle du cluster, Robin montre que dans le cas des amylopectines de maïs, chaque chaîne L porte 1,44 grappes constituées de 3,22 chaînes S. En outre, chaque grappe est séparée de la suivante par en moyenne 22 glucoses^[15]. Ceci montre bien que le nombre de chaînes courtes S est plus important que celui des chaînes longues. De ce fait la capacité de l'amylopectine à complexer l'iode moléculaire est nettement moindre que celle de l'amylose. Elle ne peut fixer qu'au maximum 1 mg d'iode pour 100 mg d'amylopectine et conduit à un λ_{\max} situé autour de 540 nm^[9]. Une deuxième propriété engendrée par ce rapport L/S est le faible taux de dégradation par β -amylase. Cette dégradation est quasiment égale à 100% dans le cadre de l'amylose tandis qu'elle ne dépasse pas 50-60% pour l'amylopectine.

c) Le matériel intermédiaire

Ce qui est communément appelé matériel intermédiaire est un matériel qui possède des propriétés intermédiaires entre celle de l'amylose (fixation importante de l'iode moléculaire) et celle de l'amylopectine (faible pourcentage de dégradation β -amylolytique)^[2]. On explique la capacité de fixer l'iode par un rapport L/S faible. Il n'y a pas, comme dans le cas de l'amylose, de longs complexes avec de grands ions polyiodo-iodures mais un nombre important de petits complexes. Pour la même raison, le matériel intermédiaire est plus sensible à la β -amylolyse

que l'amylopectine mais moins que l'amylose, étant donné que son taux de branchement est supérieur à celui de l'amylose.

Par ailleurs, encore une fois, la quantité de matériel intermédiaire dans les amidons est dépendante de l'origine botanique. Dans un amidon de céréale ou de tubercule, dans lequel le taux d'amylose est compris entre 20 et 30%, on observe une faible proportion de matériel intermédiaire de l'ordre de 5 à 7%, tandis qu'il peut atteindre un taux supérieur à 10% pour un cultivar possédant un fort taux d'amylose tel que celui des légumineuses comme le pois ridé^[2, 16].

Ce qui semble ressortir du peu d'études dont le matériel intermédiaire a fait l'objet, est qu'il pourrait s'agir en fait d'une amylopectine qui aurait rencontré un dysfonctionnement dans sa biosynthèse. Par conséquent, puisqu'on le retrouve en grande quantité dans les amidons dont la proportion en amylose est élevée, il s'agirait en fait d'un amidon pauvre en amylopectine et non d'un amidon riche en amylose.

2) Structure cristalline des amidons

a) Le grain d'amidon

Au sein des plantes, l'amidon synthétisé est stocké sous forme de grains. En fonction du cultivar, les grains n'ont pas les mêmes caractéristiques morphologiques. En effet, la position du hile ainsi que la forme (sphérique, lenticulaire ou polyédrique par exemple) du grain sont déterminées génétiquement. Globalement le grain est une entité semi-cristalline extrêmement ordonnée à différents niveaux et différentes échelles, dont la taille est comprise entre 1 et 100 μm . Il présente une cohésion radiale covalente correspondant à l'axe longitudinal des macromolécules et une cohésion tangentielle complexe^[17].

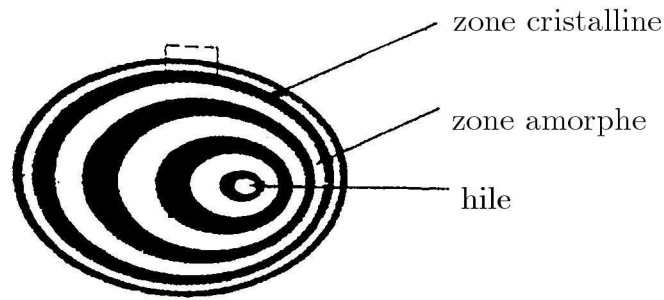


Figure 6 : Ultrastructure cristalline d'un grain d'amidon^[18]

Ces différentes zones cristallines sont séparées sans limites marquées entre elles par des zones complètement désordonnées, amorphes. French en 1981 parlera du modèle de « fringed micelle » ou « micelles frangées »^[19].

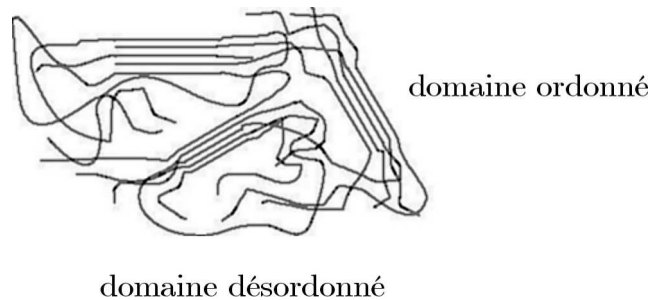


Figure 7 : modèle de fringed micelle

b) La zone cristalline

La zone cristalline est quasi exclusivement constituée d'amylopectine mais il en existe plusieurs formes. La diffraction des rayons X montre l'existence de 4 allomorphes A, B, C et V, la structure V étant issue de la complexation par l'amylose de molécules hydrophobes telles que le butanol, l'iode ou le thymol. Le type A est caractéristique des amidons de céréales tandis que le type B est plutôt caractéristique des amidons de tubercules, d'amidons rétrogradés ou de céréales riches en amylose^[7]. Le type C est quant à lui caractéristique des légumineuses et son diffractogramme correspond au mélange des cristallites A et B.

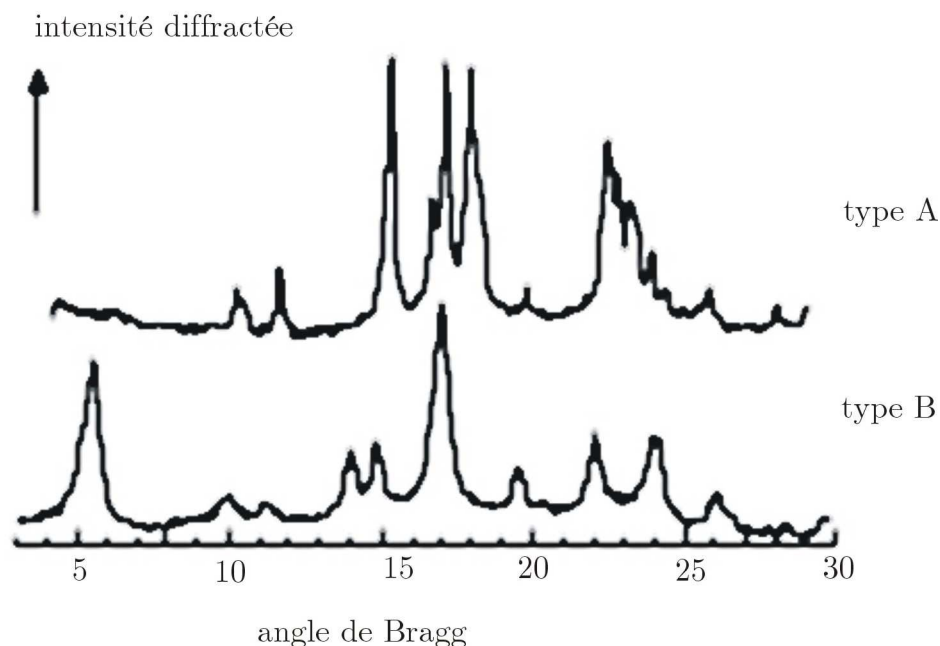


Figure 8 : Diffractogrammes des deux allomorphes A et B

Les chaînes linéaires d' α -D-glucose s'organisent sous forme de doubles hélices comptant 6 unités anhydroglucoses par tour. Chaque hélice est parallèle à sa voisine avec un décalage d'un demi pas dans l'axe de l'hélice. En fait les deux allomorphes A et B ne diffèrent que par leur agencement au sein de la maille cristalline. Le type A correspond à une maille de type monoclinique ($a=2,124$ nm, $b=1,172$ nm, $c=1,069$ nm, $\gamma=123^\circ$) tandis que le type B correspond à une maille hexagonale ($a=b=1,85$ nm, $c=1,4$ nm). Une autre différence majeure entre ces deux formes est la quantité d'eau que la maille contient. En effet, dans une maille monoclinique d'amidon, 4 molécules d'eau sont fixées tandis qu'une maille hexagonale en compte 36. Ainsi, une forte humidité et une température basse engendre principalement la formation de l'allomorphe B. *A contrario* dans le cas de la pousse d'un cultivar à une température élevée et une humidité relative faible, l'allomorphe A est majoritairement synthétisé.

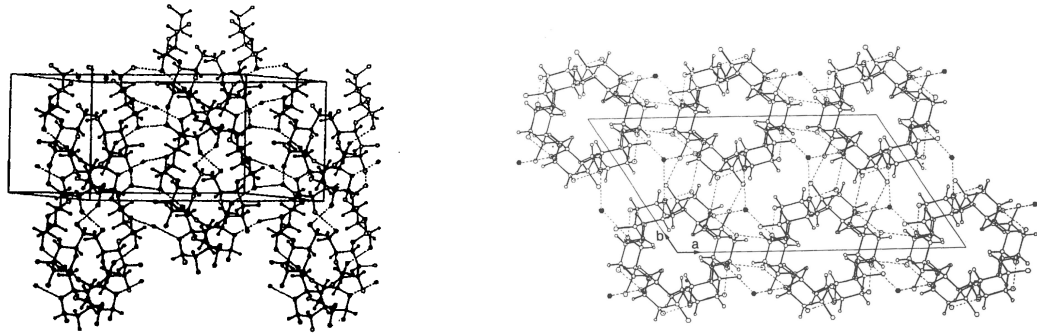


Figure 9 : Structure tridimensionnelle et plane de l'allomorphe A avec les molécules d'eau (●)
[20].

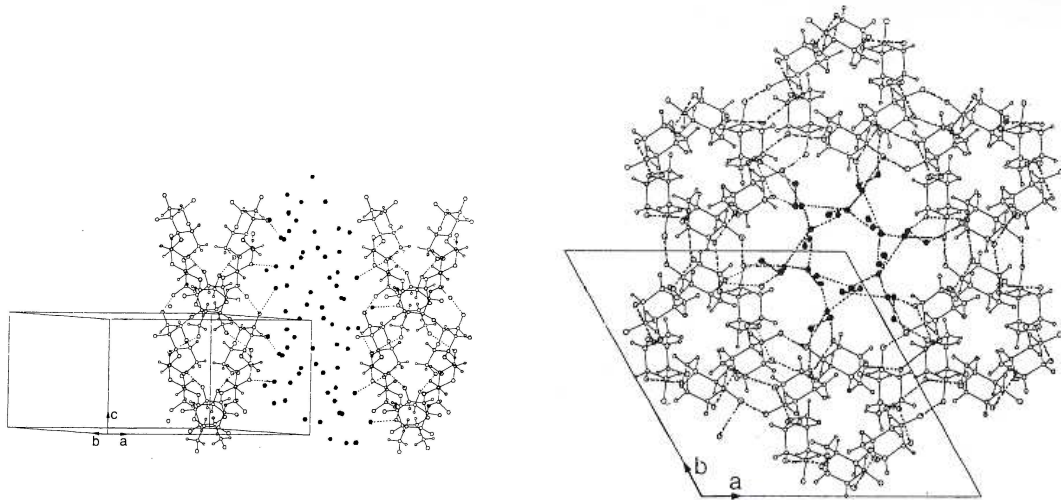


Figure 10 : Structure tridimensionnelle et plane de l'allomorphe B avec les molécules d'eau (●)^[21].

c) La zone amorphe

Il n'existe pas de limite bien marquée entre les zones cristallines et amorphes car des macromolécules participent alternativement aux deux phases. La proportion de la zone amorphe au sein du grain est mal connue et dépend de l'origine botanique et de la quantité d'eau au sein du grain.

Quoi qu'il en soit, dans ce travail nous avons été amenés à déstructurer les grains d'amidons avant de faire quelques modifications que ce soit, tant pour de la sélection que pour de la modification chimique/enzymatique des macromolécules.

3) Propriétés hydrothermiques

Que ce soit pour la cristallinité des amidons ou leurs propriétés thermiques, l'eau joue un rôle majeur. En effet, à température ambiante les grains d'amidon sont insolubles. Par contre à des températures plus élevées, le grain d'amidon va passer par différents états caractéristiques successifs. A température ambiante, l'humidité relative de l'atmosphère influe sur la cristallinité ce qui montre bien la perméabilité du grain vis-à-vis de l'eau. C'est le phénomène de sorption. Dès que l'on atteint une température avoisinant 50-60°C, le phénomène d'empesage se produit. Enfin, en revenant à température ambiante, il y a gélification par rétrogradation de l'amidon.

a) La gélatinisation

Lorsque les grains d'amidons, en présence d'un excès d'eau, sont chauffés à une température suffisante, de l'eau pénètre en masse et engendre un gonflement de ceux-ci ^[22]. Par la suite lorsque le chauffage se poursuit, débute une lixiviation des molécules d'amylose qui s'échappent du grain. Jane et Shen ont montré que les « petits » amyloses étaient libérés plus facilement ^[23, 24] tandis que pour avoir une dispersion totale, y compris celle des amyloses participant à la cristallisation de l'amylopectine, il fallait parfois atteindre des températures de 90°C ^[2, 24]. Encore une fois, la température à partir de laquelle la dispersion des amyloses commence est fonction de l'origine botanique et du type de cristallinité présente au sein du grain.

Origine botanique	Température de gélatinisation (°C)
Blé	50-80
Pomme de terre	55-78
Maïs cireux	64-82
Amylomaïs	66-120

Tableau 2 : Evolution de la température de gélatinisation en fonction du cultivar^[25]

Au final, cette étape de dispersion a lieu dans un intervalle de température de 5 à 15°C selon le cultivar, mais dans un intervalle de 0,5 à 1°C pour un grain^[3]. Pendant cette étape de dispersion, une perte de la cristallinité au sein du grain se produit, il s'agit de l'empesage. L'état final est appelé empois d'amidon. L'obtention d'empois d'amidon est donc une déstructuration irréversible du grain conduisant à une solution comprenant des granules gonflés (fantômes de grains) et des macromolécules solubilisées. Ces macromolécules solubilisées étant principalement des amyloses, la caractérisation des empois par l'iode paraît logique.

Empiriquement il est facile d'observer la transition entre l'étape « grains insolubles » et l'étape « empois d'amidon ». A l'œil effectivement, on voit la solution se troubler puis apparaît la solution blanchâtre, plus visqueuse dénommée empois (cette propriété de viscosité croissante en présence d'eau à température moyennement élevée est utilisée dans le domaine de l'alimentaire en tant qu'épaississant ou gélifiant).

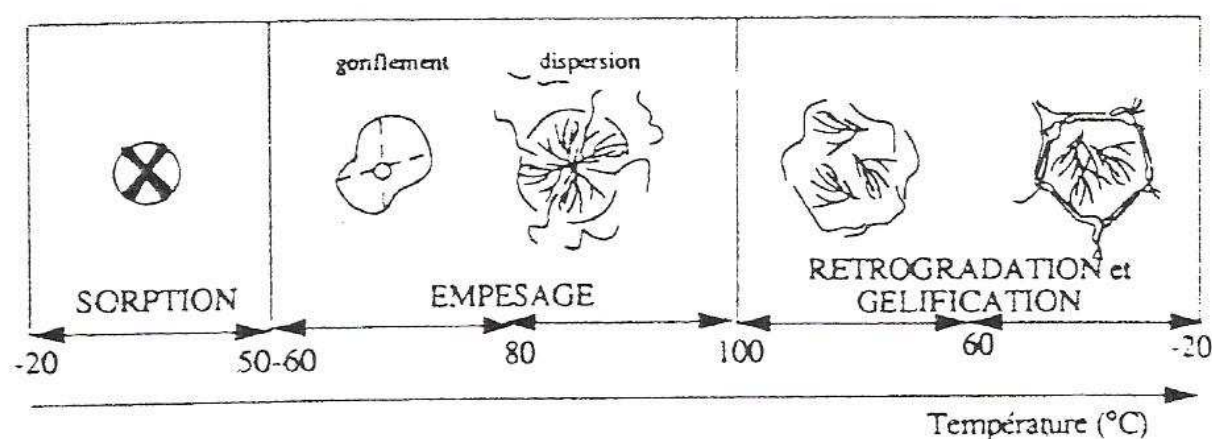


Figure 11 : Evolution d'un grain en fonction de la température^[3]

Pour suivre le changement d'état de façon plus précise, il existe deux méthodes. La première consiste à regarder au microscope la biréfringence des grains sous lumière polarisée. Dans ce cas pour un grain normal, une croix de polarisation (croix de Malte) est visible à l'état initial et lors de l'élévation de température, celle-ci disparaît accompagnant la diminution de la cristallinité au sein de l'architecture granulaire. La deuxième méthode, plus analytique, consiste à suivre par analyse enthalpique différentielle (DSC) les températures initiales et finales de gélatinisation. Celles-ci sont déterminées par lecture directe des thermogrammes présentant une endotherme délimitée par les températures caractéristiques du cultivar et dont la surface correspond à l'enthalpie de gélatinisation. De cette façon, Zobel a montré que la diffraction des rayons X corrélait les résultats obtenus par DSC^[26].

b) La rétrogradation

Selon Buléon et collaborateurs, la gélatinisation de l'amidon correspond au passage d'un état cinétiquement métastable à un état instable, où les chaînes se réorganisent^[3]. C'est lorsque l'on redescend en température que l'amidon gélatinisé se réorganise, ou plus précisément que les chaînes d'amylose et d'amylopectine se réorganisent entre elles pour qu'énergétiquement l'ensemble soit plus stable. En effet, les chaînes, après être sorties du grain, se recombinaient sous forme de double hélice mais de manière aléatoire. La recristallisation se fait de proche en proche. Cette recristallisation inévitable des empois d'amidon lors de leur retour à température ambiante est le phénomène de rétrogradation.

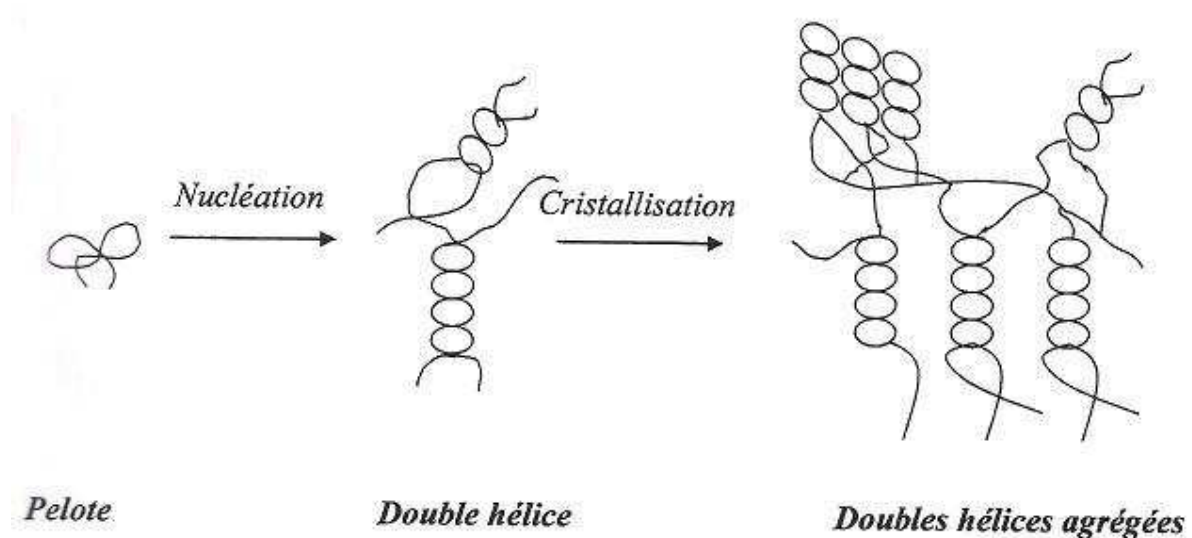


Figure 12 : Principe de la recristallisation^[3]

De ce fait, la solubilité de l'empois diminue pour finalement donner un gel blanc et opaque, mélange d'amylose et d'amylopectine, plus ou moins visqueux ^[27]. Dans le gel d'amidon, s'ils sont en concentration suffisante (respectivement 1% et 10%) l'amylose et l'amylopectine, ne recristallisent pas à la même vitesse. L'amylose recristallise plus rapidement que l'amylopectine. Ring a démontré que cette différence de temps de recristallisation entre les deux familles de macromolécules est due aux chaînes de DP moyen de 15 de l'amylopectine qui sont les seules à subir cette transformation (les branchements étant des freins à la recristallisation ^[28]) tandis que les amyloses plus mobiles peuvent tous recristalliser ^[29]. De ce fait, le taux de cristallinité entre les différentes zones, soit riches en amylose soit riches en amylopectine, entraîne une différence majeure dans les températures de fusion de ces zones. Bien évidemment, les zones riches en amylose seront plus cristallines que celles riches en amylopectine. Par conséquent l'énergie nécessaire pour rompre la cristallinité sera beaucoup plus importante dans le cas des zones riches en amylose. Il s'en suit, de fait, une différence dans les températures de fusion (Tf) de ces différentes zones. La Tf dans une zones riche en amylose sera de l'ordre de 120°C tandis qu'elle n'est que de 45°C pour les zones riches en amylopectine ^[3].

Avec les facteurs de concentration et de temps ayant une influence sur la recristallisation des empois d'amidon, un autre facteur majeur dans le phénomène est la quantité d'eau contenue dans le gel. Par ailleurs, comme montré précédemment, des molécules d'eau entrent dans les mailles cristallines de l'amidon et leur nombre varie en fonction du type de maille. Pour voir une rétrogradation efficace et rapide, un taux d'eau de 40 à 70% est nécessaire et il y a toujours formation d'une maille de type B. L'eau joue le rôle de plastifiant pour le matériau formé. C'est donc à partir de substrats présentant une cristallinité B que nous avons été amenés à travailler.

Le dernier facteur important dans ce phénomène de recristallisation est la température. En effet, en fonction de la température choisie, il y aura naissance plus ou moins facile de la cristallinité et par suite une plus ou moins bonne propagation de cette cristallisation le long des chaînes. Il est bon de noter que l'amylopectine et l'amylose sont incompatibles en solution. Il en résulte, à des températures inférieures à 90°C, une séparation de phase polymère-solvant avec des zones composées à 70% d'un des deux polymères, emprisonnant l'autre sous forme de gouttelettes de polymère ^[30].

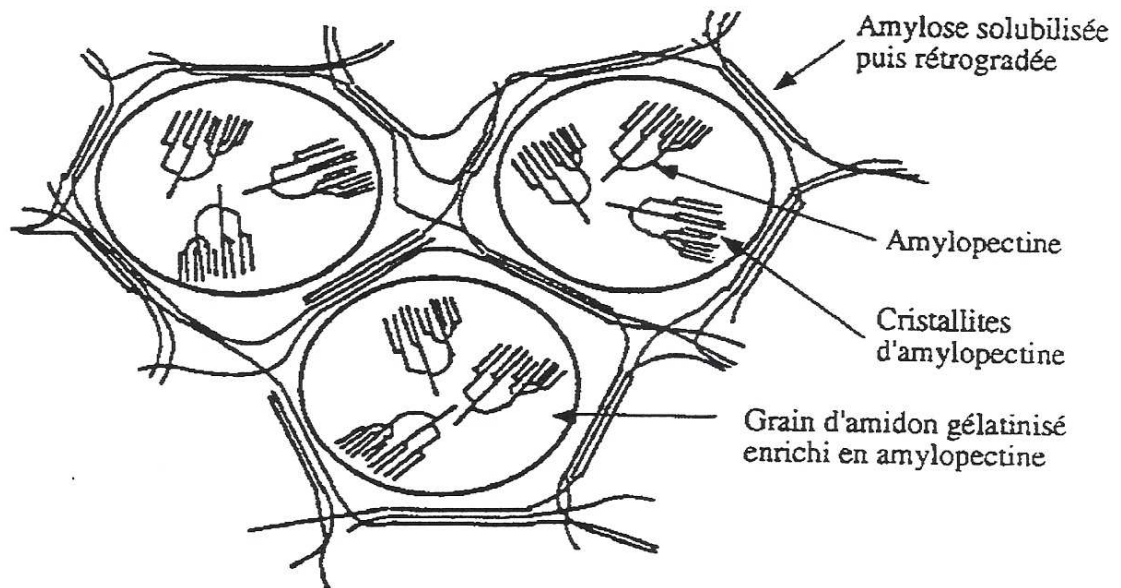


Figure 13 : Schéma d'un gel d'amidon recristallisé^[31]

C'est selon cette disposition que peuvent naître des cristaux dans le gel. Ensuite viendra ou non la propagation de la cristallinité. Chaque polymère, naturel ou non, possède une température à partir de laquelle la mobilité (translationnelle ou rotationnelle) des macromolécules est très restreinte. Cette température caractéristique est nommée Température de transition vitreuse (T_g). Pour $T < T_g$, le matériau se trouve à l'état vitreux et à ces températures les chaînes ne possèdent que très peu de mobilité, ne permettant que très peu la formation de cristaux, et en tout état de cause, ceux-ci ne se propageront pas. Par contre pour $T_g < T < T_f$, le matériau est à l'état caoutchoutique. Dans ces conditions, les chaînes possèdent une réelle mobilité. De ce fait, il y aura naissance et propagation de la cristallinité du polymère. Il est bon de noter qu'en outre, la T_g est dépendante du taux de plastifiant présent au sein du matériau, l'eau dans le cas présent^[32]. Pour un amidon sec, la T_g est de 227°C tandis qu'en présence de plus de 30% d'eau, la T_g se situe autour de 64°C ^[33].

c) L'amidon matériau

L'amidon en tant que tel ne peut être considéré comme un matériau puisqu'il se trouve sous forme de poudre, une fois qu'il est extrait et purifié de la céréale, du tubercule ou de la légumineuse dont il est issu. Intrinsèquement, l'amidon ne possède pas de bonnes propriétés

mécaniques à rupture et doit être au préalable plastifié. Il peut par ailleurs être formulé avec différents additifs tels que des fibres ou des co-polymères. Les matériaux amylicés peuvent alors être mis en œuvre soit par casting soit par extrusion.

α) Le casting

Cette méthode, de loin la plus simple à mettre en place à l'échelle du laboratoire avec très peu d'équipement, consiste à mettre de l'amidon en solution, à température élevée, avec les différents additifs nécessaires, selon une formulation connue et préétablie afin d'obtenir un film^[34]. Dans le cas du casting, la méthode la plus utilisée est celle qui utilise un réacteur sous haute pression. Ainsi, sous pression élevée et atmosphère inerte à 120-140°C^[35, 36], l'amidon est solubilisé et mélangé avec les additifs. La solution obtenue est par la suite coulée dans un moule afin de faire évaporer le solvant (l'eau) soit à température ambiante soit à température plus élevée ($\approx 70^\circ\text{C}$) pour accélérer le processus sans toutefois provoquer de bulles ou encore une recristallisation trop importante du matériau.

β) L'extrusion

Cette méthode d'écoulement forcé du matériau à l'aide d'une ou de deux vis d'Archimède au travers d'un fourreau chauffé à une température contrôlée et sous forte pression permet la gélatinisation, la plastification et enfin l'obtention du matériau amylicé à la sortie de l'extrudeuse en un temps beaucoup plus court qu'avec la méthode de casting. Au sein du fourreau, la ou les vis permettent non seulement de faire avancer la matière mais aussi de la travailler en appliquant plus ou moins de cisaillement selon leur profil.

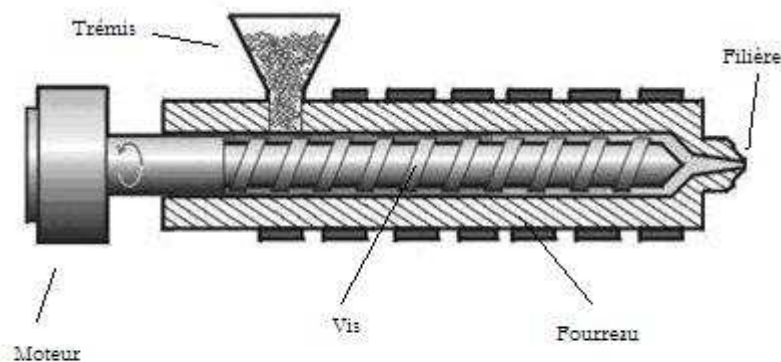


Figure 14 : Schéma d'une extrudeuse

Le système se décompose en trois parties : l'alimentation, la compression et la sortie par la filière. Pour l'alimentation, l'amidon natif ou plastifié est disposé dans la trémie puis par le simple fait de la rotation de la (ou des) vis, maîtrisée par le moteur, il est entraîné dans le fourreau. Au fur et à mesure que l'amidon avance, la forme conique ainsi que le profil des vis permet, par augmentation de la pression, la fusion et l'homogénéisation du polymère. Au sein du fourreau, la température peut être contrôlée par le biais de thermocouples. C'est aussi le cas pour la teneur en eau et la pression en différents points. A la sortie de l'extrudeuse, la filière peut avoir plusieurs formes : soit un simple trou permettant l'obtention d'un jonc soit une fente permettant l'obtention d'une bande ou un film. En outre, l'extrudeuse peut aussi servir de réacteur chimique pour mettre en œuvre des réactions de modifications chimiques ou même enzymatiques^[37].

d) Le vieillissement

Une fois obtenu, l'amidon matériau connaît au cours du temps des modifications physico-chimiques ayant de fortes répercussions sur les propriétés de celui-ci. Ces modifications dépendantes du temps, de la température et de l'humidité relative du milieu dans lequel le matériau est stocké sont à l'origine des difficultés rencontrées par l'amidon en tant que matériau au niveau industriel. Deux types de vieillissement peuvent intervenir, en fonction du fait que le matériau se trouve au-dessus ou en-dessous de sa température de transition vitreuse

Tg. En-dessous de Tg il s'agit d'un vieillissement physique tandis qu'au-dessus de cette même Tg, le vieillissement est dit « par recristallisation ».

α) Le vieillissement physique

Le vieillissement physique est un phénomène irréversible qui se produit lorsque le matériau vieillit à une température en deçà de la Tg. Lors d'un refroidissement, le matériau devient de plus en plus visqueux jusqu'à atteindre la température Tg à partir de laquelle la mobilité des chaînes est excessivement restreinte et lente. En effet, mis à part une mobilité des extrémités des chaînes, le matériau est figé.

Perez et collaborateurs ont montré que lors du vieillissement en-dessous de la Tg, le matériau se trouve dans un état B où l'enthalpie libre n'est pas minimale mais tend à y accéder (état C) par des mouvements moléculaires locaux^[38]. Ainsi, il n'y a aucune dégradation des molécules mais une réorganisation spatiale des macromolécules les unes par rapport aux autres. Ceci se traduit macroscopiquement par une diminution du volume spécifique V et de l'enthalpie H du matériau. Ils décrivent que la relaxation de volume implique une compacité accrue du matériau et une interaction moléculaire plus forte.

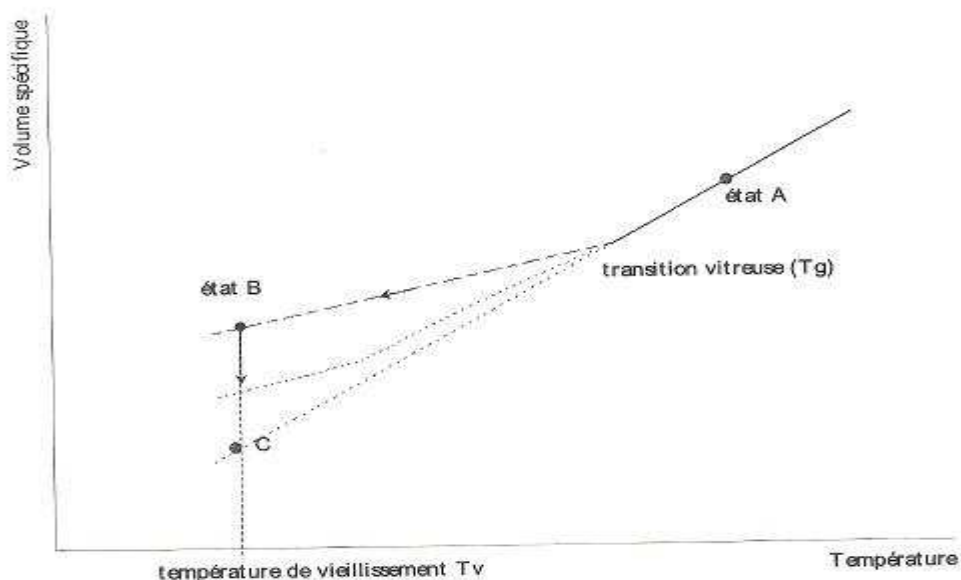


Figure 15 : Evolution du volume spécifique en fonction du temps à la température de vieillissement inférieure à Tg^[38]

Le temps nécessaire pour atteindre l'état le plus stable est fonction de la température de vieillissement. En effet, il a été montré que plus l'on descend en température, moins les mouvements locaux sont possibles. De ce fait, le vieillissement physique se fera à plus long terme. *A contrario*, plus le matériau est proche de sa Tg, plus il subira le phénomène de vieillissement physique rapidement. Struik ^[39] a estimé de façon empirique le temps pour atteindre l'équilibre à : $t_{\text{équilibre}} \approx 100 \times 10^{(T_g - T_v)/3}$.

Ainsi, pour jouer sur le temps de retour à l'équilibre, il est possible de jouer soit sur la différence (Tg-Tv) en augmentant ou diminuant Tv, soit sur Tg elle-même. Pour jouer sur Tg, il suffit de modifier la formulation initiale du matériau puisque le taux de plastifiant est cruciale dans sa détermination ^[40, 41]. Dans le cas de l'amidon les plastifiants peuvent être l'eau, des polyols, l'urée ^[42, 43] ...

β) Le vieillissement par recristallisation

Ce type de vieillissement, contrairement au vieillissement physique, précédemment décrit, s'établit à Tv supérieure à Tg c'est-à-dire à l'état caoutchoutique. Pour être dans ces conditions, les matériaux amylicés sont formulés avec leurs plastifiants de telle sorte que Tg soit ramenée sous la température ambiante ^[44]. Cette recristallisation est un phénomène appelé rétrogradation dans le cas des matériaux amylicés très hydrophiles dont le degré de cristallinité est évolutif au cours du temps ^[45].

II) Facteurs d'influence des propriétés mécaniques des matériaux amylicés simples

De très nombreuses études sur les matériaux amylicés ont été menées depuis de nombreuses années [25, 34, 46-49]. Leurs objets furent tout d'abord l'étude des propriétés de matériaux « basiques » puis l'étude des facteurs pouvant les influencer. Ainsi, il a été mis en lumière que l'origine botanique, la structure chimique de l'amidon utilisé ou encore le choix du plastifiant peuvent faire évoluer les propriétés mécaniques à rupture du matériau dans une large gamme de contrainte et d'allongement. De ce fait, une connaissance précise des modifications qu'induisent chacun de ces facteurs permet d'envisager les propriétés finales d'un matériau au cours du temps. Dans ce chapitre, un bilan bibliographique entre autres à propos de l'influence de l'origine botanique (par conséquent le ratio amylose/amylopectine et la structure), du plastifiant, de l'humidité relative à laquelle le matériau est conservé, du vieillissement et du mode de mise en œuvre du matériau est présenté.

1) L'origine botanique

Il est d'usage dans le langage commun de parler de l'amidon en général mais il existe en fait autant d'amidons différents que d'origines botaniques. En effet, comme cela a été précisé plus tôt, pour chaque source, le ratio S/L et le DP moyen des chaînes d'amylopectine [50, 51] varient ainsi que le ratio amylose/amylopectine [52]. A l'échelle supérieure, c'est-à-dire au niveau du grain lui-même, la taille et la forme sont aussi des caractéristiques de l'origine botanique et même du cultivar au sein d'une même espèce [53-55].

Hulleman et collaborateurs ont montré que dans des conditions similaires de plastification (30% de glycérol) et d'humidité (20% d'eau) les propriétés mécaniques des matériaux amylicés étaient sensiblement différentes.

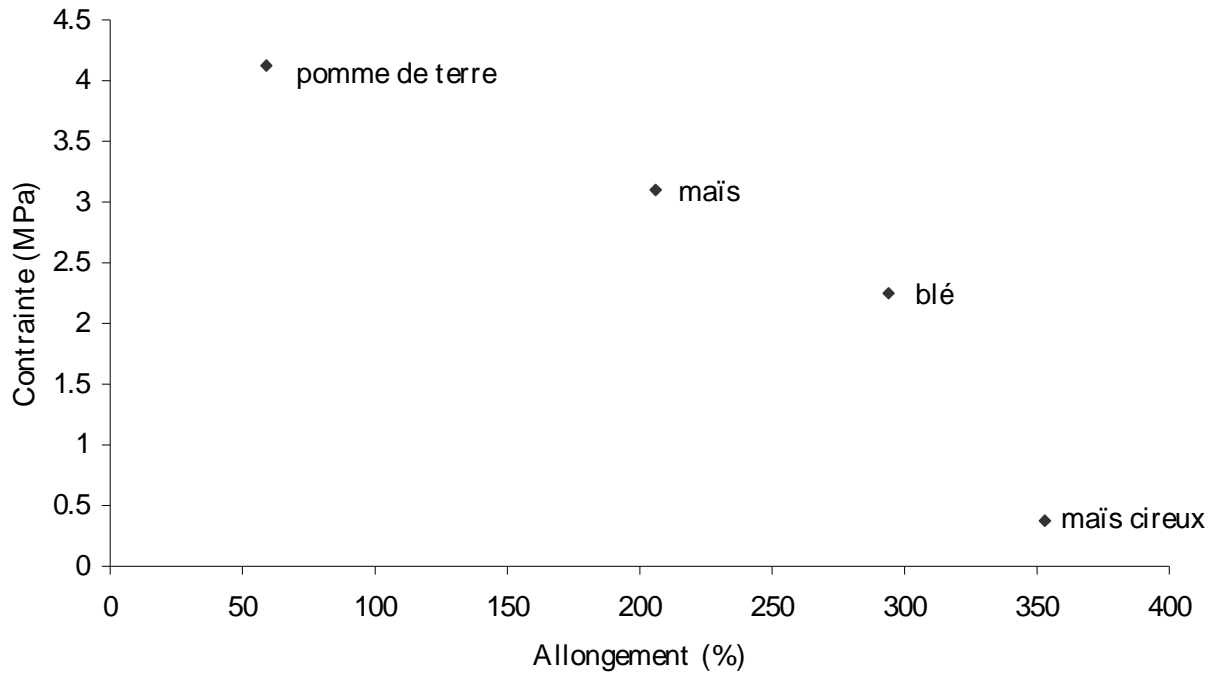


Figure 16 : Contrainte/ Allongement de films d'amidons plastifiés ^[52, 56]

Sur la figure 16, il apparaît nettement que les matériaux présentés possèdent des allongements très variables passant de 50% pour un amidon de pomme de terre à 350% pour le maïs cireux. En ce qui concerne la contrainte à rupture, il apparaît qu'elle diminue à mesure que l'allongement augmente. Ainsi, l'amidon de maïs présente une contrainte supérieure à celle du blé. Le ratio amylopectine/amylose est le premier élément permettant l'interprétation de la figure. Le maïs cireux (ou waxy maïs) est un maïs composé à 99% d'amylopectine, il présente un allongement très important mais *a contrario* une extrêmement faible contrainte à rupture. La longueur des chaînes permet un très bon enchevêtrement, ce qui induit un très bon allongement à rupture mais l'absence d'amylose, recristallisant très vite, ne lui confère que très peu de rigidité. Par conséquent, la contrainte à rupture s'effondre par rapport à un maïs « classique » composé à 25% d'amylose. Pour comparer les trois amidons de pomme de terre, de maïs et de blé (tous les 3 présentent une composition assez similaire autour de 75/25 dans leur ratio amylopectine/amylose) il faut regarder le ratio L/S de chaque échantillon ainsi que les DP moyens des chaînes. La pomme de terre, comme tout les tubercules, possède plus de chaînes L que les céréales, ce qui induit une cristallinité beaucoup plus importante lors du vieillissement. De ce fait, une chute drastique de l'allongement s'accompagne d'une augmentation de la contrainte. Le tableau 3 donne par ailleurs une idée des DP moyens des chaînes amylopectines de ces trois amidons.

Origine botanique	DP moyen
Pomme de terre	23
Maïs	22
Blé	20

Tableau 3 : DP moyen des chaînes d'amylopectine en fonction de l'origine botanique de l'amidon^[50]

Ces différences de structure impliquent également des différences physico-chimiques. La température de transition vitreuse permet de visualiser très rapidement ces différences. Le tableau 4 ci-après représente, à teneur en glycérol équivalente, les T_g du maïs, du manioc et de l'igname à 20°C et 64% d'humidité relative. Il permet aussi de comparer leurs propriétés mécaniques à rupture.

Amidon	T_g (°C)	Contrainte (Mpa)	Allongement (%)
Maïs	35,12 ± 6,85	17 ± 6	9 ± 5
Manioc	42,42 ± 1,75	10 ± 3	33 ± 1
Igname	39,26 ± 3,47	30 ± 5	13 ± 5

Tableau 4 : T_g , contrainte et allongement à 20°C et 64% d'humidité relative pour différentes origines botaniques plastifiés à 20% de glycérol^[57]

Il apparaît que pour des T_g similaires, la contrainte entre l'amidon de maïs (céréale) et celui d'igname (tubercule) est nettement plus élevée pour l'amidon de tubercule. Par contre, pour deux amidons de tubercules, les T_g peuvent être similaires et pourtant engendrer des propriétés mécaniques complètement inverses. Cela montre que la structure des macromolécules joue un rôle important dans les propriétés mécaniques de ces amidons.

2) Le plastifiant

L'amidon, de par sa structure chimique, possède un réseau cristallin solide mais également un très grand nombre de liaisons hydrogène qui lui confèrent, à l'état natif, de très mauvaises propriétés mécaniques : il est très cassant. En réduisant la contribution des liaisons hydrogènes à la rigidité du système, les propriétés mécaniques à rupture peuvent être améliorées. C'est le rôle du plastifiant. Il s'agit généralement de petites molécules hydrophiles capables de s'insérer entre les chaînes d'amylose et/ou d'amylopectine en cassant le réseau de liaisons hydrogènes et engendrant une augmentation de l'espace entre celles-ci. La viscosité du système amidon/plastifiant diminue donc avec la quantité de plastifiant introduite et permet alors un mouvement plus facile des chaînes les unes par rapport aux autres. Le plastifiant joue donc un rôle majeur dans l'étude des propriétés mécaniques des amidons pour lesquels il influence directement la température de transition vitreuse T_g .

Le premier des plastifiants, et même le plus « naturel », est l'eau. En effet, l'amidon étant très hydrophile, il se comporte comme une « éponge » et est capable d'absorber de l'eau issue de l'atmosphère ambiante. Kalichevsky et collaborateurs ont montré qu'un apport suffisant en eau permettait le passage de l'amidon de maïs cireux d'un état vitreux à un état caoutchoutique à température constante ^[40]. L'inconvénient majeur de ce type de plastification est qu'elle est dépendante de l'humidité relative de l'atmosphère ambiante. De ce fait, l'ajout d'autres plastifiants a été réalisé et des polyols de type glycérol ou D-sorbitol, de petits sucres tels que le D-glucose ou le D-xylitol, ou encore des amines comme l'urée ou l'éthanolamine ont été très largement étudiés comme co-plastifiants ^[42, 43, 58, 59]. Par ailleurs, des études de mélanges de plastifiants ont aussi été réalisées ^[60]. Néanmoins, le glycérol reste le plastifiant le plus utilisé. Le rôle du co-plastifiant est de maintenir une plastification plus ou moins constante au cours du temps au matériau.

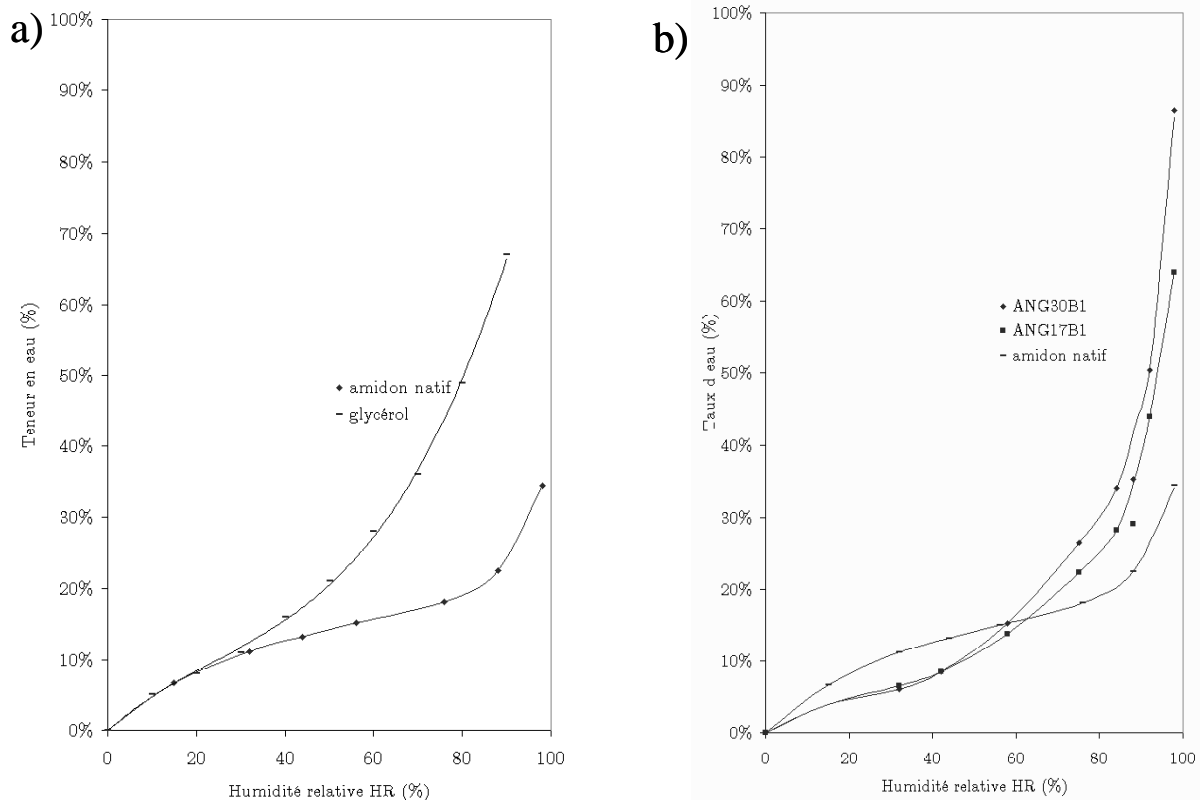


Figure 17 : a) Isothermes de sorption d'eau du glycérol et de l'amidon natif de blé.^[61] b) isothermes de sorption d'eau de l'amidon de blé et d'amidon plastifié à 17 et 30% de glycérol à 20°C en fonction de l'humidité relative^[62]

Sur la figure 17 **a)**, il apparaît que jusqu'à 20% d'humidité le glycérol et l'amidon natif possèdent une hydrophilie similaire mais qu'au-delà de cette valeur le glycérol est capable d'absorber une quantité d'eau bien supérieure. Toutefois, la figure 17 **b)** montre que l'amidon plastifié présente dans un premier temps une sorption d'eau nettement inférieure à celle de l'amidon natif. Ceci s'explique par le fait qu'à faible humidité le glycérol occupe les sites de sorption d'eau. Pour des humidités supérieures à 60%, l'eau peut de nouveau pénétrer la structure mais cette fois-ci non pas à cause de l'hydrophilie de l'amidon mais bel et bien grâce à celle du glycérol.

La température de transition vitreuse étant fonction du taux de plastifiant et d'eau au sein du système, ces deux facteurs influencent inévitablement les propriétés mécaniques à rupture des matériaux amylicés. La figure 18 représente l'évolution de la contrainte et de l'allongement d'un matériau de blé en fonction de la quantité de glycérol introduite. Dans le cas de l'amidon

de blé, une chute de la contrainte et une augmentation de l'allongement sont observées. Le même phénomène se retrouve pour l'amidon de pomme de terre. La figure 19 représente l'évolution des propriétés mécaniques de la pomme de terre proposées par Lourdin et collaborateurs^[63].

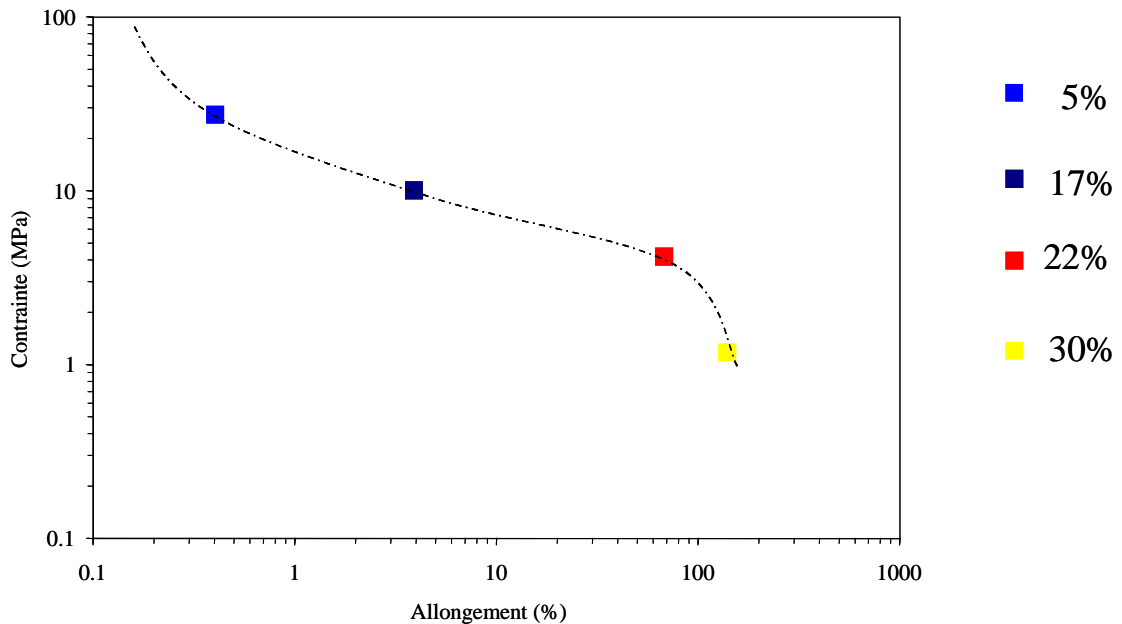


Figure 18 : Evolution des propriétés mécaniques à rupture de l'amidon de blé à 20°C et 57% d'humidité relative en fonction du taux de glycérol^[64]

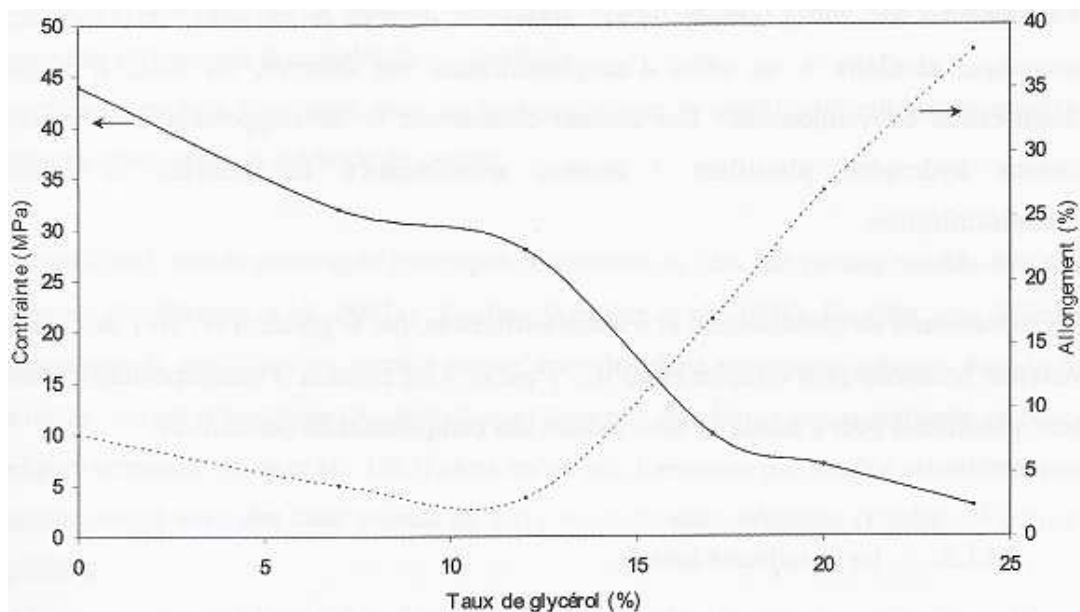


Figure 19 : Evolution des propriétés mécaniques d'un film de pomme de terre, contrainte (—) et allongement (...), en fonction du taux de glycérol^[63].

Le tableau 5 montre que cette tendance n'est pas dépendante de l'origine botanique puisque dans tous les cas, lorsqu'il y a augmentation du taux de glycérol, ce phénomène se produit de manière plus ou moins importante.

Amidon	Glycérol (%)	Contrainte (Mpa)	Allongement (%)
Maïs	0	37 ± 5	3 ± 0,7
	20	17 ± 6	9 ± 5
	40	9 ± 1	28 ± 6
Manioc	0	26 ± 5	6 ± 0,6
	20	10 ± 3	33 ± 1
	40	4 ± 0,2	46 ± 2
Igname	0	49 ± 2	3 ± 0,7
	20	30 ± 5	13 ± 5
	40	10 ± 1	25 ± 8

Tableau 5 : Evolution de la contrainte et de l'allongement des matériaux à base de maïs, de manioc et d'igname en fonction du taux de plastifiant à 20°C et 64% d'humidité relative^[57]

Lorsque le plastifiant change (éthanolamine, D-sorbitol, D-xylitol...), le principe reste le même mais l'impact sur T_g change, influençant donc aussi les propriétés mécaniques. Néanmoins, le sens de la variation des propriétés est le même, avec dans tous les cas une perte de contrainte pour une augmentation de l'allongement^[58].

En résumé, le plastifiant joue un rôle majeur dans l'évolution des propriétés physico-chimiques et mécaniques à rupture des matériaux amylicés, mais l'eau y contribue également en grande partie^[65-67]. En effet, toute modification de la teneur en plastifiant engendre une modification de la sorption d'eau du matériau et donc de sa T_g et toute modification de l'humidité relative de l'environnement du matériau (à taux constant de plastifiant) conduit également à une modification de T_g .

3) Le vieillissement

a) Rétrogradation

Comme cela a été présenté plus tôt dans le chapitre, l'organisation des chaînes d'amylose et d'amylopectine varie au cours du temps. Ce phénomène, appelé vieillissement, est dépendant de la température à laquelle le matériau est conservé et de sa température de transition vitreuse. En effet, si le matériau est à l'état caoutchoutique, c'est-à-dire à une température au-dessus de sa T_g , il subit le phénomène de recristallisation du fait de la bonne mobilité des chaînes les unes par rapport aux autres. Par contre, s'il est à l'état vitreux, c'est-à-dire à une température en-dessous de T_g , alors il subit un vieillissement physique. Dans les deux cas, comme l'ont montré Follain et collaborateurs, les propriétés mécaniques à rupture sont modifiées mais pas dans les mêmes proportions ni à la même vitesse^[65].

Lors d'un vieillissement par recristallisation, Shi et collaborateurs ont montré par une étude de diffraction des rayons X que les chaînes se réorganisent en réseau cristallin de type B et/ou V et que les propriétés tendaient vers une augmentation de la contrainte et une diminution de l'allongement. En fait, la cristallinité engendre de la rigidité dans le système. De ce fait, la cristallinité initiale du matériau est importante puisque d'elle dépend l'amplitude du phénomène de recristallisation : un matériau très cristallin avant son vieillissement recristallisera bien moins qu'un matériau amorphe, dans les mêmes conditions de température et d'humidité relative (H.R).

Le tableau 6 présente les vitesses de recristallisation (obtenues par Roos et Karel en 1991 et présentées dans une revue de Catherine Savary et collaborateurs) en fonction de la température à laquelle le matériau est conservé.

T-T_g (°C)	Vitesse de cristallisation à T (% cristallinité/min)
3	10
7	100
11	1000

Tableau 6 : Evolution des vitesses de cristallisation en fonction de la température^[68]

Toutefois, Wang et collaborateurs ont montré qu'un amidon de maïs plastifié à l'éthanolamine ne présente par diffraction des rayons X aucune recristallisation après 90 jours de vieillissement à 50% d'humidité relative^[48]. Selon Wang, l'éthanolamine formerait des liaisons hydrogènes plus fortes avec les molécules amylopectines que le glycérol. De ce fait, l'éthanolamine solidement lié est un frein à la formation de nouvelles liaisons hydrogènes inter- et intramoléculaires.

Le tableau 7 montre quant à lui l'évolution de T_g et des propriétés mécaniques à rupture des amidons de maïs, de manioc et d'igname, étudiés par Mali et collaborateurs, après 90 jours de vieillissement à 20°C et 64% d'humidité relative.

Amidon	Glycérol (%)	T_g (°C)	Contrainte (Mpa)	Allongement (%)
Maïs	0	44,64 ± 4,93	48 ± 4	2 ± 0,6
	20	29,57 ± 2,93	13 ± 2	11 ± 5
	40	25,98 ± 2,60	9 ± 1	27 ± 7
Manioc	0	39,6 ± 1,61	39 ± 2	3 ± 1
	20	38,17 ± 0,35	11 ± 3	21 ± 2
	40	27,34 ± 3,83	3 ± 0,3	49 ± 9
Igname	0	47,69 ± 2,11	60 ± 5	2 ± 0,1
	20	26,52 ± 4,16	29 ± 5	9 ± 3
	40	21,34 ± 2,38	9 ± 1	20 ± 5

Tableau 7: Evolution de T_g et des propriétés mécaniques à rupture pour différents amidons à 20°C et après 90 jours à 64% d'humidité relative.^[57]

La comparaison des tableau 4, 5 et 7 montre dans tous les cas une diminution de T_g après 90 jours de vieillissement, mais également une très forte augmentation de la contrainte lorsque le matériau n'est pas plastifié. Dans le même temps, son allongement reste quasiment identique. Par contre, dans les cas où il y a plastification, la contrainte n'évolue que très peu par rapport à la perte en allongement. Il est à noter qu'en 90 jours l'effet du vieillissement est plus important sur les amidons de tubercules que sur celui d'origine céréalière. Plus généralement, des matériaux ayant des compositions massiques similaires (ratio amylose/amylopectine similaire) présentent dans des conditions identiques de vieillissement un allongement à rupture très proche, mais le temps nécessaire pour atteindre cet état d'équilibre est quant à lui différent. Forssell et collaborateurs l'ont démontré lors d'une étude sur l'orge et l'avoine. Le matériau à base d'orge atteint l'équilibre à 20°C et 50% d'humidité relative en 2 mois tandis qu'il en faut 8 pour un matériau à base d'avoine^[69]. Van Soest et collaborateurs ont montré qu'une période d'une semaine à humidité contrôlée était nécessaire pour que le matériau stabilise sa quantité d'eau^[70]. Finalement, ressort de cette étude que toute augmentation de la plastification engendre une diminution de T_g responsable de l'augmentation pour le matériau de sa capacité à recristalliser.

b) Vieillissement physique

Lors d'un vieillissement physique, l'échantillon est sous T_g et la mobilité des chaînes est très réduite^[38] donc c'est la température qui sera le facteur le plus influent et surtout, comme présenté dans le tableau 6, l'écart entre T et T_g . Plus cet écart est faible, plus le vieillissement est intense. Ainsi en jouant sur T et/ou sur T_g , ce phénomène peut être plus ou moins maîtrisé.

Follain et collaborateurs ont représenté sur un graphique, la contrainte en fonction de l'allongement de différents amidons de différentes origines botaniques qui résume très bien l'influence des types de vieillissement sur les propriétés mécaniques^[65].

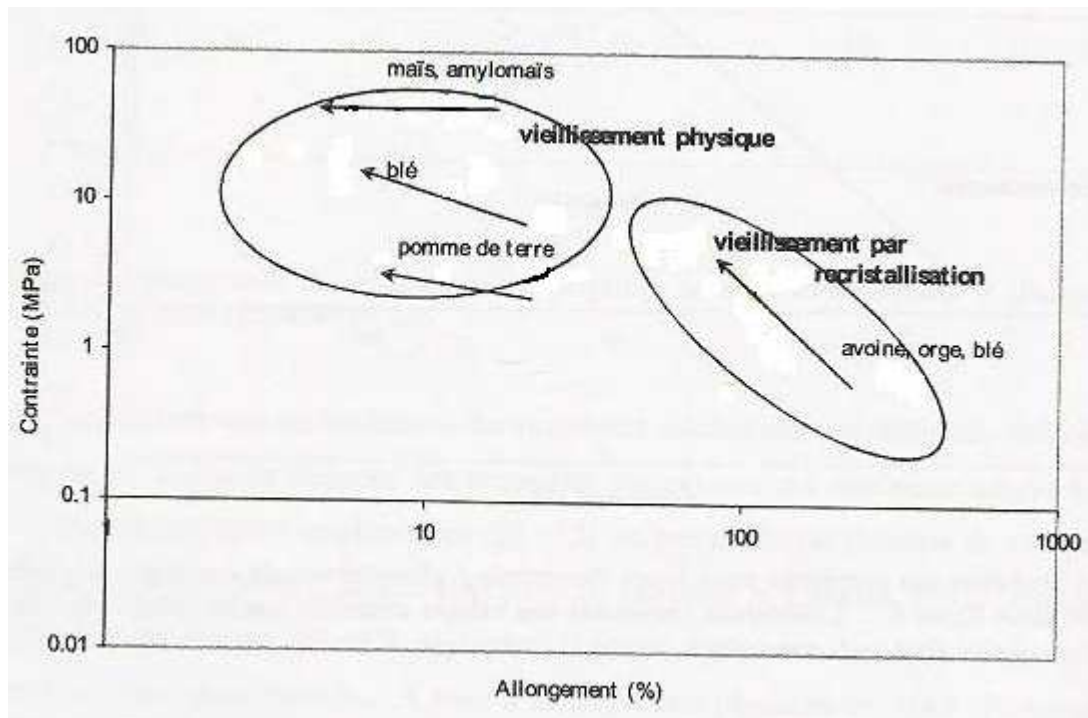


Figure 20 : Evolution des propriétés mécaniques à rupture par type de vieillissement pour différentes sources d'amidon selon Follain et collaborateurs^[65].

4) La mise en forme

La méthode de mise en forme des matériaux amylicés influence également grandement les propriétés mécaniques à rupture. En effet, selon que le matériau est obtenu par casting ou par extrusion, le taux et le type de cristallinité s'avère différent.

En extrudeuse, le temps de gélification est très court et le temps de passage dans le fourreau l'est également. De plus, la température y est élevée ce qui provoque une évaporation de l'eau initialement présente dans l'amidon. Par ailleurs, le cisaillement que subit le gel peut provoquer une légère dégradation des chaînes amylicées^[71]. Ainsi, dans ces conditions où l'eau est peu présente, le matériau peut ne pas recristalliser si la température est suffisante et la fusion des grains complète. Toutefois si une cristallinité résiduelle est présente, alors elle est de type V, typique de la recristallisation de l'amylose avec le plastifiant^[44].

Lors de la mise en forme par casting, le gel d'amidon, très riche en eau, sèche pendant une période relativement longue. De ce fait, les chaînes amylicées ont le temps nécessaire pour

leur réorganisation ce qui, par diffraction des rayons X, se caractérise par une proportion importante de cristaux de type B.

La cristallinité initiale d'un matériau dépend donc aussi de la méthode de mise en forme. Lorsqu'il est obtenu par extrusion, la cristallinité dépend de la température, de la vitesse de rotation de la (ou des) vis ainsi que du temps de passage.

5) Modifications structurales des amidons

Comme cela a été montré précédemment, la cristallinité et la structure macromoléculaire d'un matériau sont les principaux facteurs influençant les propriétés mécaniques. Afin de modifier les propriétés, différentes modifications structurales ont été faites sur les amidons. Celles-ci ont pu être chimiques ou enzymatiques. En modifiant les structures chimiques des macromolécules, leurs propriétés mécaniques ainsi que l'impact du vieillissement ont été modifiés.

a) Modifications chimiques

Après avoir compris les différents phénomènes régissant les lois du vieillissement des matériaux amylicés, de nombreuses équipes ont souhaité travailler en amont du matériau et ont réalisé des modifications chimiques sur les amidons qu'ils utilisaient afin d'essayer de diriger les propriétés mécaniques vers des domaines qu'ils avaient choisis comme cibles. Deux principales modifications chimiques ont jusqu'à présent été énormément testées. D'une part, le matériau a été rendu hydrophobe par estérification ou éthérification de chaînes grasses sur les groupements hydroxyles libres ^[72-74] (ceci peut aussi être assimilé à une forme de plastification) et d'autre part il a été réticulé ^[75-77].

Différentes méthodes de réticulations ont déjà été réalisées ^[78]. Elles ont été faites soit par rayonnement soit classiquement en solution. Delville et collaborateurs ont montré qu'un matériau ayant subi un rayonnement UV en présence d'un photo-amorceur tel que le benzoate de sodium permettait d'augmenter de 40% la contrainte mais engendrait une diminution de 60% de l'allongement ^[79]. Ils ont également démontré que la réticulation sous rayonnement

permettait de retarder le phénomène de vieillissement puisqu'après 6 semaines à 80% d'humidité, un amidon photoréticulé et formulé à 17% de glycérol ne voit sa contrainte diminuer que de 25% par rapport à un amidon natif^[80, 81].

En ce qui concerne la réticulation chimique, l'épichlorhydrine^[75, 82-86], les phosphates (Sodium TriMetaPhosphate, STMP, et Sodium TriPolyPhosphate, STPP)^[77, 87] ou des dialdéhydes^[88] ont largement été utilisés. Ces agents de couplages permettent de coupler différentes macromolécules entre elles mais plus généralement de réaliser des greffages en intramoléculaire. De manière générale, la réticulation augmente la contrainte des matériaux tandis qu'elle diminue l'allongement à rupture. Les seuls travaux de réticulation présentant une augmentation de la contrainte sans perte d'allongement sont ceux de Zhao et collaborateurs. Ces auteurs ont montré une augmentation de la contrainte jusqu'à 250% tout en conservant une augmentation de l'allongement jusqu'à 20 fois^[46, 89]. Ils ont réalisé une réaction de couplage classique sur des matériaux riches en amylose suivi d'une étape d'extension du matériau. Ainsi, les macromolécules se retrouvent orientées toutes dans le même sens permettant l'amélioration drastique des propriétés mécaniques à rupture de ce type de matériaux.

b) Modifications enzymatiques

La synthèse de l'amidon étant enzymatique, il est par définition également un très bon substrat pour différentes enzymes. Ne seront abordées ici que deux types particuliers d'enzymes, les α -amylases et les β -amylases. Ces deux enzymes ne sont capables d'hydrolyser que les liaisons $\alpha(1-4)$ et ne reconnaissent pas les liaisons $\alpha(1-6)$. Toutefois, elles diffèrent par leur mode d'action^[90]. Les α -amylases sont des endoenzymes, c'est-à-dire qu'elles peuvent reconnaître et hydrolyser une liaison quelle que soit sa position dans la chaîne amyliacée. Par contre les β -amylases, elles, sont des exoenzymes et ne sont capables d'hydrolyser que les liaisons $\alpha(1-4)$ d'unités maltose situées aux extrémités non-réductrices des chaînes. Ce type d'enzyme ne peut donc libérer que du maltose dans le milieu tandis que les α -amylases peuvent produire des chaînes de plus ou moins grand DP possédant ou non des ramifications $\alpha(1-6)$. En général, la dégradation enzymatique de l'amidon permet d'utiliser les petits oses formés dans l'industrie des sirops par exemple, pour la synthèse de cyclodextrines ou encore celle de l'éthanol vert mais il est aussi possible d'utiliser les sous-produits que sont les dextrines obtenues après

dégradation. Ces dextrines possèdent des chaînes plus courtes et surtout voient leur structure modifiée de façon notable par rapport à un amidon natif. Betoft a réalisé de nombreuses études sur la structure de l'amidon et plus particulièrement de l'amylopectine à partir de dégradations enzymatiques par des α - ou des β -amylases de grains ou de gels d'amidon [91-93]. Dans ce travail de thèse, les propriétés mécaniques de dextrines particulières seront testées et par conséquent les petits oses ou osides de dégradation ne seront que des produits secondaires.

Conclusion

Ce rappel bibliographique non exhaustif autour des facteurs influençant les propriétés mécaniques des amidons permet dans un premier temps de constater qu'un nombre important d'équipes travaillent sur cette problématique. Il montre aussi que beaucoup de choses ont été déjà faites pour tenter d'améliorer les propriétés mécaniques à rupture de ce genre de matériaux. Il apparaît que la structure chimique est la cause de la relativement mauvaise qualité des amidons en tant que matériaux thermoplastiques. Lorsque l'origine botanique change, la structure change, que ce soit au niveau des longueurs de chaînes (DP moyen, rapport L/S) ou de la valeur du ratio amylose/amylopectine. Ceci a un impact direct sur les propriétés mécaniques de l'amidon.

A ces facteurs présentés, doivent être ajoutées les modifications réalisées au niveau structural. Ainsi, il a été montré que des modifications chimiques telles que la réticulation engendrait une modification non négligeable des propriétés à rupture. L'allongement est réduit tandis que la contrainte, elle, augmente nettement.

Toutefois, Follain et collaborateurs, après un travail de bibliographie important ont pu mettre en évidence que lorsque les propriétés mécaniques étaient rapportées sur un graphique commun représentant la contrainte en fonction de l'allongement, les propriétés mécaniques se cantonnent dans une même zone du graphique.

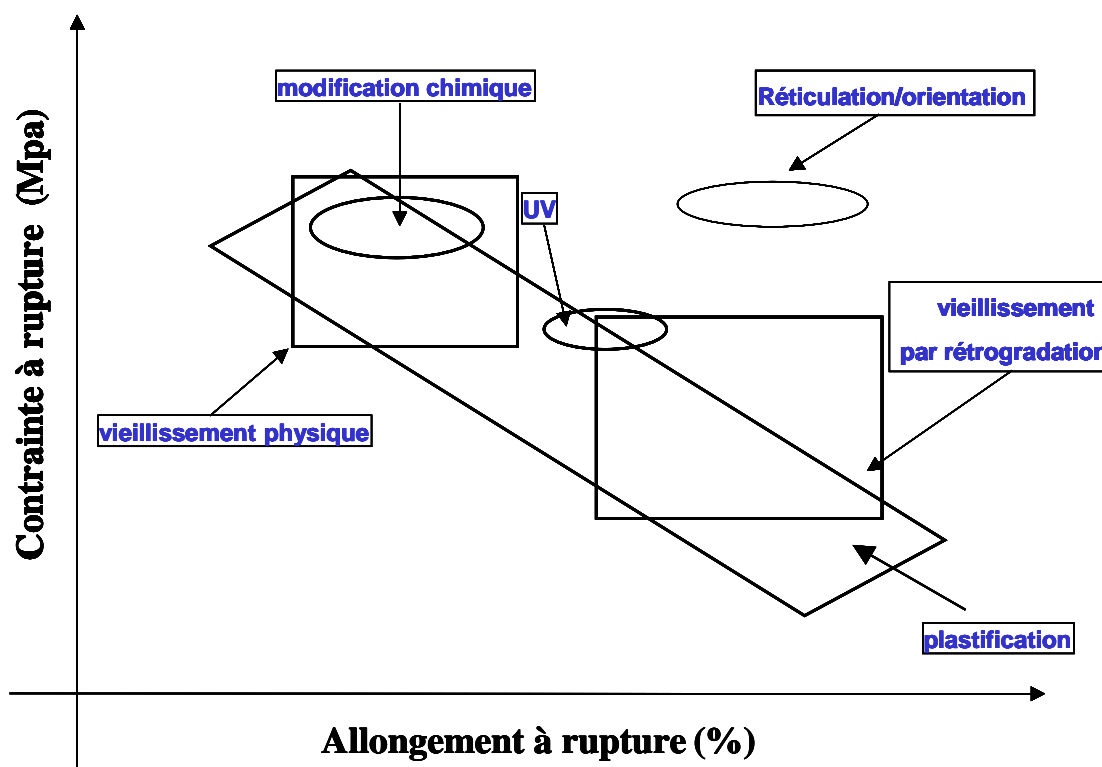


Figure 21 : Schématisation des propriétés mécaniques selon les différents facteurs d'influence [56].

Il apparaît très nettement sur la figure 21 que les propriétés mécaniques engendrées par les différentes modifications se situent toutes autour de la zone de propriétés uniquement accessibles par variation du seul taux de plastifiant. Ceci revient donc à dire que dans l'absolu, il est possible d'atteindre tous les matériaux ayant déjà été testés uniquement en jouant sur le taux et la nature du plastifiant du matériau. En jouant sur les origines botaniques ou bien même sur la phase cristalline du matériau, les propriétés mécaniques obtenues restent toujours accessibles par une simple plastification. De la même façon, lorsque des modifications ont été apportées sur la phase amorphe par réticulation par exemple, les propriétés restent dans la zone de plastification. Seuls des matériaux issus d'une réticulation couplée à une extension à partir de matériaux riche en amylose sortent de la courbe de plastification.

De ce fait, il peut être supposé que pour aboutir à des matériaux originaux, il faut travailler d'une part sur la longueur des chaînes et leur orientation mais aussi sur sa capacité à rétrograder. Ce sont ces deux conclusions qui sont à l'origine de ce travail de thèse. L'idée est que si la phase amorphe pouvait proposer un enchevêtrement plus important, cela permettrait certainement un gain important en allongement. L'isolement des plus longues chaînes ou

même leur rallongement via des couplages choisis permettrait probablement d'atteindre ce premier objectif. Puisque quelles que soient les structures proposées jusqu'à présent, il n'a pas été permis de sortir de la zone de plastification, il faut proposer des structures complètement différentes. Cela provoquera (ou non) plus ou moins de cristallinité ou d'enchevêtrement mais quoi qu'il en soit, même après les modifications déjà apportées, l'amidon reste un matériau de mauvaise qualité. Il faut donc proposer de nouvelles choses. L'utilisation d'une enzyme telle que la β -amylase peut aussi permettre d'atteindre cet objectif et ainsi proposer de nouvelles structures originales.

III) Modulation de la structure de l'amidon

L'objectif de ce travail est de mettre en relation les propriétés mécaniques à rupture de matériaux amylicés avec la taille des macromolécules qui le composent. L'influence de l'origine botanique ^[53, 54, 94-97] (maïs, blé, riz, pomme de terre, manioc...), de la nature du plastifiant ^[40, 98] pour le cas des matériaux solides (maltose, D-glucose, glycérol...), de la formulation ^[75], de la réticulation a été étudié mais en aucun cas l'influence de la taille des macromolécules. De ce fait, le besoin premier est l'isolement de ces longues macromolécules au sein de l'amidon natif préalablement dégraissé et déprotéiné. Une nouvelle fois, dans ce domaine la littérature montre un vide important. On sait très bien par exemple séparer, dans la pomme de terre, le blé ou le maïs, l'amylose de l'amylopectine depuis fort longtemps ^[99] mais en revanche, le fractionnement préparatif en fonction de la taille au sein d'une de ces familles de molécules n'a jamais été fait. C'est pourquoi il sera question, dans ce premier chapitre de résultats expérimentaux, de fractionnement physique d'amidon, et ceci pour différentes origines botaniques choisies en fonction des tailles apparentes des macromolécules de leur amylopectine. Il sera également question de modifications chimiques ciblées et contrôlées des chaînes amylicées afin de réaliser du rallongement de chaînes.

La deuxième problématique découle directement de la première. L'une des caractéristiques des matériaux amylicés est leur capacité à vieillir très rapidement au cours du temps. Ce vieillissement est dû à une réorganisation spontanée des chaînes polymaltosidiques conduisant à une recristallisation qui se répercute directement sur les propriétés mécaniques. En particulier cette recristallisation a été bien étudiée dans le cas des amyloses ^[2, 7, 29, 30, 35, 44, 99]. Dans l'amylopectine, cette capacité à la recristallisation est due à la proximité des chaînes et leur mobilité en solution.

Il sera proposé dans ce chapitre de limiter, voire même de maîtriser complètement la recristallisation des macromolécules amylicées via une méthode d'élagage enzymatique spécifique utilisant une β -amylase.

Il peut apparaître comme une contradiction entre les deux axes proposés puisqu'il s'agit de favoriser d'une part un rallongement des chaînes et d'autre part une dégradation de ces dites

longues chaînes. En fait, il n'en est rien. En effet, l'action de la β -amylase est destinée à l'élagage des chaînes latérales responsables d'une grande partie de la cristallinité, sans pour autant diminuer la longueur totale de la macromolécule dans son ensemble. De plus, si un couplage spécifique tête-à-tête ou tête-à-queue peut être réalisé, la légère perte de longueur est bien négligeable face à la longueur supplémentaire apportée par celui-ci.

A) Fractionnement physique

La question qui se pose dans ce chapitre est de savoir s'il est envisageable de réaliser une séparation efficace au sein des molécules amylicées de l'amidon uniquement sur des facteurs physico-chimiques. Cette séparation est par ailleurs envisagée en solution ou pas. Un élément essentiel du travail important à prendre en compte est le fait que les différentes fractions isolées sont destinées à être formulées puis testées mécaniquement et que ces méthodes sont très gourmandes en quantité de matière. Ainsi, le fractionnement nécessite d'être réalisé sur des quantités importantes de substrat. Ce point est crucial car il conditionne énormément les modes opératoires mis en œuvre pour réaliser le fractionnement, plus particulièrement en terme de concentration massique des solutions utilisées. Il a été nécessaire de travailler avec des volumes importants par rapport aux équipements de laboratoire classiques disponibles.

Les différentes propriétés physico-chimiques choisies pour mettre en œuvre ce fractionnement sont le gradient de solubilité en présence d'un co-solvant (éthanol) et la taille apparente des macromolécules lorsque la séparation s'effectue en solution. Dans le premier cas, la technique employée est la précipitation fractionnée tandis que dans le deuxième il s'agit d'ultrafiltration frontale agitée. Ces deux méthodes ont le même objectif de fractionnement mais la première fait précipiter les grosses molécules en laissant les petites en solution alors que la seconde, quant à elle, élimine les petites de la solution pour enrichir le concentrat en macromolécules de tailles plus importantes.

Une troisième méthode de fractionnement peut être proposée. Cette méthode correspond à un fractionnement physique des granules d'amidon en fonction de leurs tailles. La question posée était la suivante : Existe-t-il une relation entre taille des granules et taille moyenne des macromolécules qui les composent ? Par ailleurs, cette technique tente de répondre également à d'autres questions : existe-t-il un lien entre la taille des grains et l'organisation structurale de

ceux-ci ? La taille moyenne des macromolécules est-elle en corrélation avec la taille des grains ou influence-t-elle l'organisation même du grain ?

1) Isolement de fortes masses par précipitation fractionnée

La méthode de fractionnement de l'amidon par précipitation fractionnée est une méthode simple à mettre en œuvre puisqu'une méthode similaire a été décrite par Bertoft pour une précipitation fractionnée d' α -dextrines^[100] ou encore dans le cadre d'études sur des arabino-xylo-oligosaccharides^[101] et sur des hémicelluloses^[102]. Ainsi, par ajout progressif d'un non-solvant miscible à l'eau tels que le méthanol ou l'éthanol, les polysaccharides les plus lourds précipitent les premiers, atteignant leur limite de solubilité avant les plus petits. Par analogie, pour recueillir les macromolécules les plus lourdes d'un amidon, l'ajout d'éthanol absolu (moins toxique que le méthanol) a été réalisé.

Le deuxième facteur majeur de cette étude est la taille même des macromolécules présentes initialement dans l'amidon que l'on veut fractionner. Il paraît clair que le fait de partir d'un substrat peu polydisperse ou ayant une faible proportion de grandes masses molaires, ne permet pas de tirer un meilleur profit de la méthode. C'est pourquoi il a été préféré de commencer par faire une étude bibliographique sur les masses molaires et les rayons de giration (R_g) rapportés pour des amidons de différentes espèces botaniques.

	Amylopectine		Amylose		Amidon	
	\overline{M}_w (10^8 g.mol^{-1})	\overline{R}_G (nm)	\overline{M}_w (10^6 g.mol^{-1})	\overline{R}_G (nm)	\overline{M}_w (10^8 g.mol^{-1})	\overline{R}_G (nm)
Blé	1,17	149	4,97	133	1,41	298
Pomme de terre	0,90	127	4,91	64	0,75	170
Waxy Maïs	2,46	196			3,41	319
Manioc	1,72	169	26,17	129	1,43	195
Igname Kangba	6,06	246	8,69	141	3,10	309
Igname Esculenta	3,12	192	9,91	60	1,88	279

Tableau 8 : Etude des masses molaires et des tailles au sein d'amidons d'origines botaniques variées ^[53, 95]

Dans le tableau 8, les différences structurales existant au sein des différents amidons sont proposées sous l'angle des masses molaires des macromolécules par rapport à leur rayon de giration. Il apparaît que les amylopectines de pomme de terre et de blé ont des masses molaires moyennes assez proches, comparativement à celles de l'igname Kangba. Par contre, la différence de rayon de giration moyen entre ces trois amylopectines différentes est moins importante que celle qui existe entre les masses molaires. Cela peut laisser penser que l'amylopectine d'igname Kangba est plus dense que les deux autres. La deuxième espèce d'igname présente aussi des amylopectine très lourdes mais dans des proportions un peu moins importantes. Par ailleurs, ces deux ignames possèdent également des amyloses beaucoup plus lourds que ceux du blé ou de la pomme de terre, cependant très nettement plus petites que l'amylose de manioc. Lorsque l'amidon est considéré dans sa globalité, les deux ignames présentent des masses molaires moyennes supérieures à celles du blé ou de la pomme de terre pour des rayons de giration soit supérieurs, soit équivalents. Par contre, le manioc présente des masses molaires moyennes assez proches du blé mais un rayon de giration bien moins grand.

Les amidons d'igname et de blé ont été choisis comme référence pour cette étude, les différentes fractions obtenues seront ensuite caractérisées par viscosimétrie afin de constater

s'il existe des différences significatives pouvant laisser penser que la taille de macromolécules ou leur réticulation influent sur cette caractéristique physico-chimique^[83].

a) Amidon d'igname

Dans le cas de l'amidon d'igname, l'addition successive de quatre portions de 100 ml d'éthanol à 1,8 litre de solution à 50 g/l et 1 mol/l de soude a permis de récupérer 4 fractions. Le tableau 9 montre que la masse des fractions recueillies augmente pour des volumes ajoutés identiques, ce qui indique que l'ajout progressif d'éthanol diminue bien la solubilité globale du système.

Volume total d'éthanol versé (ml)	Masse récupérée (g)
100	2,5
200	3,8
300	4,5
400	10

Tableau 9 : masse de précipité d'igname en fonction du volume d'éthanol versé en solution

La figure 22 présente les résultats des analyses par viscosimétrie capillaire réalisée pour caractériser les différentes fractions.

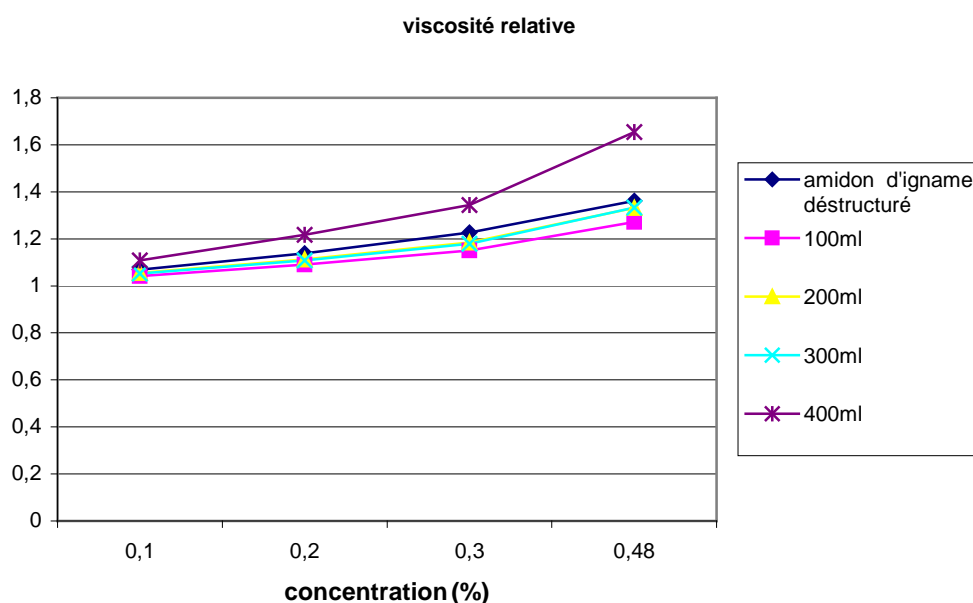


Figure 22 : viscosité relative des différentes fractions d'igname obtenues par précipitation fractionnée à l'éthanol

Les résultats de la figure 22 indiquent une très légère progression de la viscosité avec l'ajout croissant d'éthanol, qui reste dans tous les cas inférieure à la viscosité relative du substrat déstructuré. Toutefois, la viscosité intrinsèque (viscosité à la concentration zéro) est la même. Ces résultats semblent indiquer que dans le cas de l'amidon d'igname, la nature intrinsèque des fractions est probablement très semblable. La méthode ne semble donc pas sélective dans ce cas.

b) Amidon de blé

Pour 600 ml de solution à 16 g/l en amidon à une concentration en soude de 3 mol/l, l'amidon de blé n'a pas été solubilisé. Dans ces conditions, 1,5 g d'insolubles ont été isolés avant l'addition de l'éthanol. Les insolubles, la fraction recueillie après l'ajout de 40 ml d'éthanol (2,5 g) et l'amidon déstructuré ont été comparés par viscosimétrie.

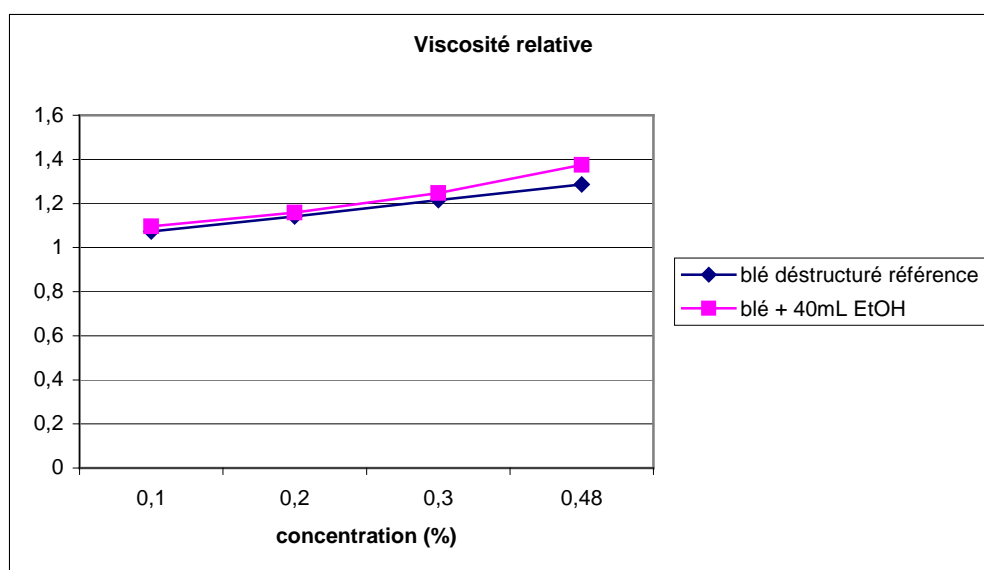


Figure 23 : Comparaison des viscosités relatives de la première fraction isolée par précipitation fractionnée à l'éthanol de l'amidon de blé et le blé déstructuré référence

La figure 23 montre que la viscosité de la première fraction est du même ordre de grandeur (voire très légèrement supérieure) que celle de l'amidon déstructuré. La viscosité relative de la fraction insoluble n'est pas représentée mais elle est en tout point superposable avec les deux

courbes présentées. De la même manière que pour l'amidon d'igname, la méthode semble ne pas avoir été sélective.

c) Conclusion

Au vu de ces deux exemples, aucune séparation significative n'est possible par la méthode de précipitation fractionnée. Afin de constater si la différence de masse et de structure entre l'amylose et l'amylopectine induit des viscosités capillaires distinctes, la séparation de ces deux familles de macromolécules par la méthode de Bertoft^[100] et Gilbert^[99] a été réalisée.

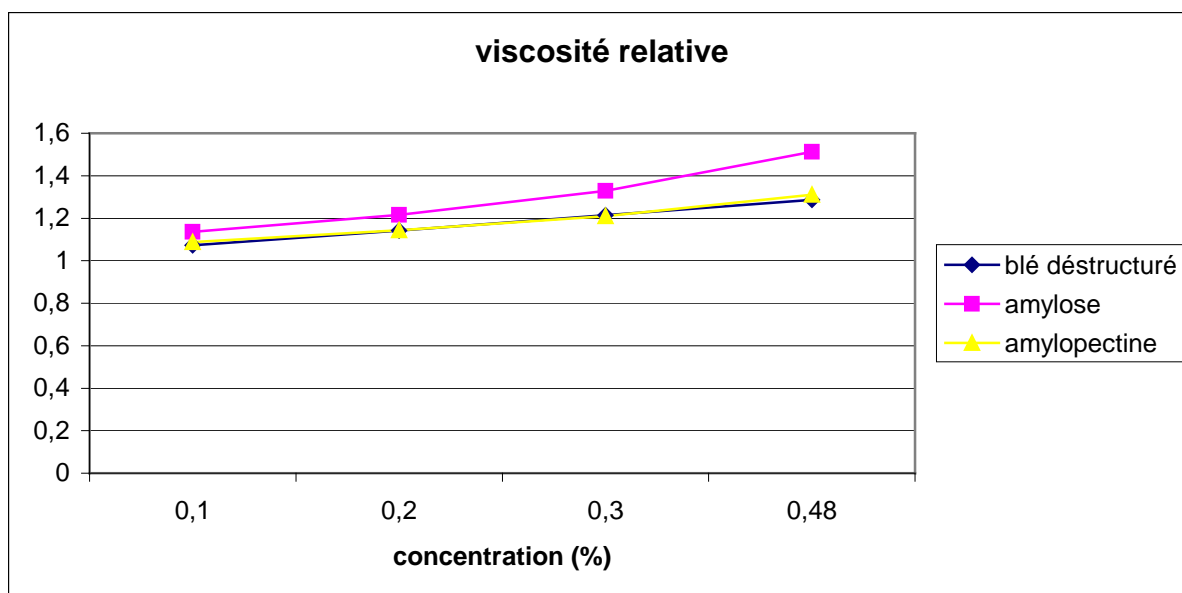


Figure 24 : Viscosité relative de l'amidon de blé déstructuré, de son amylose et de son amylopectine

La figure 24 montre bien que la viscosité relative d'un amylose est légèrement supérieure à celle de l'amylopectine et de l'amidon déstructuré. Par ailleurs, la viscosité globale d'un amidon est déterminée par celle de son amylopectine. Ceci peut s'expliquer peut-être par la différence de compacité qu'il peut y avoir entre l'amylose et l'amylopectine, macromolécule fortement ramifiée. En effet, à DP équivalent, une molécule d'amylopectine ramifiée présente un volume dynamique apparent moins important qu'une molécule linéaire telle qu'une molécule d'amylose. Ces résultats mettent en lumière deux contradictions : l'amylose, bien que plus petite, présente une viscosité relative supérieure à celle de l'amylopectine pourtant très

grosse en milieu aqueux, et de fait laisse supposer que peut-être l'amylose aurait en terme de qualité une moins bonne solubilisation que l'amylopectine. En effet, il semble que l'amylose, lorsque sa concentration augmente, aurait plus de difficultés à se déplier, casser les agrégats en solution que l'amylopectine (molécule qui dans l'eau se solubilise aussi beaucoup plus vite).

Ces résultats remettent complètement en question la méthode choisie et la mesure de la viscosité relative ne semble pas être la méthode adéquate pour comparer la taille et/ou la masse de macromolécules amylicées obtenues par précipitation fractionnée. En effet, les premières fractions obtenues par précipitation fractionnée devraient révéler des valeurs de viscosité relative tellement proche de celle de l'amidon déstructuré qu'il deviendrait impossible de voir une différence avec le produit de départ.

En conclusion, on peut donc dire que les fractions isolées n'ont pu être caractérisées de façon formelle par la mesure de la viscosité relative. Par conséquent, il faut trouver une méthode capable d'identifier et caractériser précisément la nature des fractions isolées. Dans le cadre de notre étude, l'utilisation de cette méthode de fractionnement n'a donc pas été poursuivie.

2) Ultra-filtration frontale agitée

Une autre méthode utilisée pour réaliser le fractionnement physique d'un amidon en solution est l'ultra-filtration frontale agitée. L'amidon possédant une très grande distribution de masse, l'utilisation successive de « tamis » de tailles différentes permet d'isoler des fractions ayant des distributions en masse plus restreintes ^[101, 103]. Dans le même temps, les ultraconcentrats sont enrichis en macromolécules de tailles plus importantes par élimination des plus petites. Les membranes d'ultra-filtration disponibles commercialement sont calibrées sur des protéines globulaires dont la taille (rayon de giration) est fonction de leur masse. De ce fait, leur seuil de coupure sera exprimé en kilodaltons (KDa), équivalent à la masse des plus petites protéines qu'elles peuvent retenir.

a) Conditions de solubilisation

Afin de pouvoir réaliser ce type de filtration, il faut dans un premier temps parfaitement solubiliser l'amidon. C'est pourquoi une étude sur les meilleures conditions de concentration et de solubilisation à utiliser est nécessaire en amont de toute filtration. L'utilisation du DMSO étant délibérément refusée (dans un souci de facilité de récupération des fractions), la solubilisation de l'amidon de blé en milieu aqueux basique est retenue. En fin de protocole, une simple neutralisation au CO₂, une congélation suivie d'une lyophilisation permet de récupérer simplement la matière. Il faut donc prendre en compte la concentration massique maximale en amidon pour une concentration en soude donnée. Il apparaît que pour des volumes importants (de l'ordre de 2,5 l), l'utilisation de solutions de 20 à 30 g/l en amidon pour des concentrations de 0,1 à 0,5 mol/l en soude permet une solubilisation rapide conduisant à des solutions limpides.

b) Taille des pores

Dans un second temps, il faut établir la (ou les) taille(s) de pore(s) adéquate(s) à la filtration. Après de nombreuses tentatives partant d'un seuil de coupure faible pour remonter jusqu'à un seuil de coupure pouvant permettre effectivement un fractionnement, il apparaît que pour toutes les membranes allant de 1 KDa jusqu'à 500 Kda, la totalité de l'amidon est retenue. Les membranes de seuils supérieurs, disponibles commercialement, ne sont pas exprimés en seuil de coupure massique mais en diamètre moyen de pores. Les membranes disponibles, de tailles de pores 0,2, 0,45 et 1 µm ont donc été utilisées pour cette étude. Il s'agit de tamis au sens propre du terme puisque la taille des pores est cette fois bien définie et mesurable par microscopie optique. On parle alors de microfiltration.

Manipulations	Masses échantillons (g)	Ultraconcentrats					
		1 µm		0,45 µm		0,2 µm	
		masse (g)	%	masse (g)	%	masse (g)	%
A0	20,11			19,56	100,0	0,00	0,0
AGS0,1	10,00			8,79	99,7	0,03	0,3
	20,02			19,20	99,5	0,10	0,5
AGS0,5	20,05			23,59	98,3	0,41	1,7
	20,01			24,82	98,4	0,40	1,6
AS0,5	20,02			21,57	91,5	2,02	8,5
	19,84			21,21	94,4	1,26	5,6
	20,00	21,82	90,6	2,25	9,4		

% exprimés par rapport à la somme des masses totales d'ultraconcentrats

Tableau 10 : Résultats des fractionnements issus de l'ultra-filtration (La somme des masses obtenues supérieure à la masse introduite correspond à la fraction minérale Na₂CO₃ résiduelle après lyophilisation)

Lors de cette étude, une solution d'amidon, préalablement déstructuré, à différentes concentrations en soude (0,1 et 0,5 mol/l) a dans un premier temps été filtrée sur une membrane dont le seuil de coupure est de 0,45 µm. Mais il est apparu que réaliser la gélatinisation de l'amidon puis de diluer le gel avec une solution basique pour obtenir les concentrations massique (en amidon) et molaire (en soude) requises permettait un gain de temps non négligeable. De cette façon, la lyophilisation intermédiaire coûteuse en temps est évitée.

Les résultats du tableau 10 montrent qu'une concentration en soude plus forte ainsi que la gélatinisation réalisée préalablement à l'ultra-filtration permettent d'obtenir un meilleur fractionnement des macromolécules. Celui-ci restant trop faible (maximum < 10%) le passage sur une membrane dont le seuil de coupure est de 1µm est nécessaire. Malheureusement, dans ces nouvelles conditions, le fractionnement reste très faible.

Une étude par RMN des fractions issues de AS0,5 révèle un taux de branchement de 3,5% pour la fraction majoritaire alors que pour la fraction passée au travers de la membrane, le taux n'est que de 2,4%. Cela traduit un passage préférentiel de macromolécules ayant un taux de branchement plus faible au travers de la membrane, ce qui peut être mis en relation avec une

taille des macromolécules plus faible et donc une masse plus faible comme celle des amyloses et d'amylopectines de faible masse.

c) Conclusion

Une solution d'amidon gélatinisé étant une suspension de résidus de granules gonflés (agrégats) et de macromolécules solubilisées (essentiellement l'amylose), il se peut que ces agrégats ne soient pas détruits lors de la mise en solution, même à forte concentration de soude, engendrant de fait un mauvais fractionnement. Pour remédier à cela, un test a été réalisé avec une solution d'amidon déstructuré diluée avec une solution de DMSO / (10% p/p) LiCl ^[104], mais la très forte viscosité de la solution n'a pas permis un écoulement correct du solvant (tableau 10). Par ailleurs, le produit n'a pu être lyophilisé car il n'a pas pu être congelé dans des conditions classiques à -20°C.

Les seuils de coupure utilisés étant très nettement supérieurs à la taille des macromolécules, même des plus grandes, on ne peut pas mettre en relation, de façon claire, la taille des pores et la masse ou la taille des macromolécules retenues par le filtre même s'il semble que les taux de branchement des fractions concentrées et filtrées aillent dans le bon sens en postulant que les macromolécules les plus ramifiées sont les plus lourdes et les plus longues.

A posteriori, la méthode de séparation physique de l'amidon en solution, soit par précipitation fractionnée ou par ultrafiltration, est critiquable. La méthode de caractérisation par mesure de la viscosité relative a montré ses limites pour le cas des macromolécules amylicées. De plus, la précipitation fractionnée joue sur la solubilité des plus grosses macromolécules dans leur milieu. Or de grandes difficultés de solubilisation ont été rencontrées initialement. Ainsi, il est envisageable que la solubilisation n'est en réalité que partielle et certainement très « fragile ». Par conséquent, l'ajout d'éthanol qui provoque une très légère modification du milieu voit son impact sur la solubilité de l'amidon beaucoup plus important que s'il s'agissait de molécules parfaitement solubles. Cette analyse tend à être confirmée par l'ultra-filtration frontale agitée. Par cette méthode, il a été mis en évidence que globalement les fractions retenues correspondent à des agrégats puisque la taille des pores est très nettement supérieure à la taille des molécules malgré des conditions de solubilisation apparemment correctes.

Il est donc envisageable que les conditions de solubilisation ne soient pas suffisantes pour mettre en place une séparation efficace, à une échelle importante, des macromolécules d'amidon lorsqu'elles sont en solution. Le fait de réaliser ce fractionnement à une grande échelle est essentiel puisque l'objectif final est de réaliser des tests mécaniques sur les fractions qui auraient du être obtenues. Or pour réaliser ces tests mécaniques, des quantités importantes, sont nécessaires (de l'ordre de la dizaine de grammes).

De ce fait, une méthode de fractionnement à sec des amidons natifs sous forme de poudre a été envisagée. Par ailleurs, cette technique permettra peut-être d'apporter quelques réponses sur une organisation structurale particulière des grains en fonction de la population des macromolécules qui les composent.

3) Fractionnement à sec de l'amidon natif

Pour ce fractionnement de l'amidon à sec, seules deux origines botaniques ont été testées afin de ne pas multiplier les facteurs pouvant induire des modifications de comportement au niveau des tests à rupture. Le blé et la pomme de terre étant bien connus au laboratoire et représentatifs des céréales d'une part et des tubercules d'autre part, l'étude s'est limitée à ces deux origines botaniques. Par ailleurs, l'objectif ici est de voir s'il existe une corrélation entre « taille des grains » et « taille des macromolécules » de ces mêmes grains ou plus généralement s'il y a des différences structurales entre les grains lorsque leur taille varie.

Dans ce chapitre, ne sera abordée que la partie concernant le fractionnement et une analyse par RMN pour discuter de l'existence ou non de différences structurales majeures au sein des différentes populations de grain. Plus loin dans ce document, les résultats des tests mécaniques réalisés sur les différentes fractions seront traités.

En ce qui concerne l'amidon de blé, le tamisage montre l'existence de deux fractions majoritaires. La première, la plus importante en terme de quantité de matière retenue, correspond à des tailles de grains compris entre 25 et 38 μm de diamètre. La deuxième, minoritaire, regroupe les grains dont la taille n'excède pas 25 μm de diamètre. Chaque barre dans les histogrammes des figures 25 et 26 représente un tamisage.

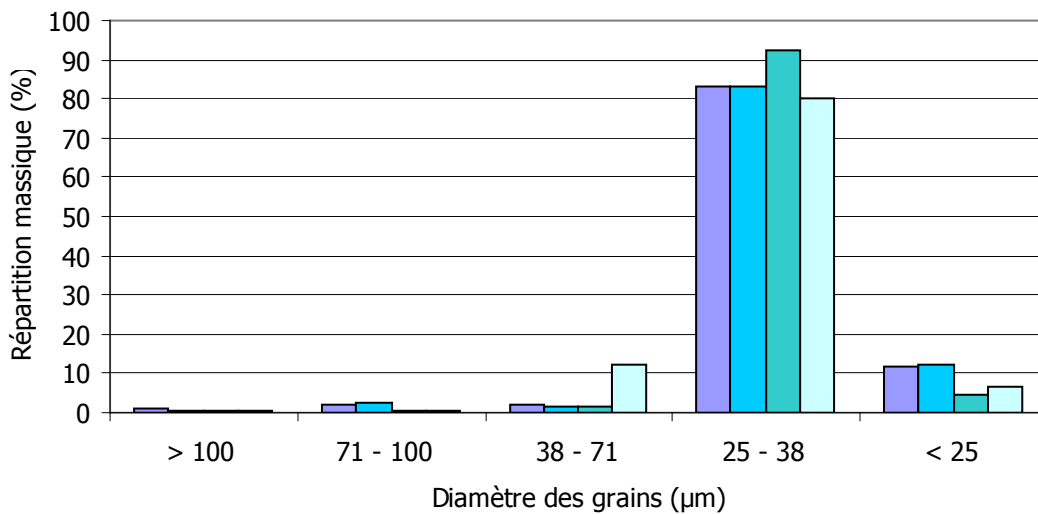


Figure 25 : Tamisage d'amidon de blé natif (une couleur représente un tamisage)

Les grains sont globalement plutôt homogènes puisque la fraction majoritaire représente 80% de la quantité des grains d'amidon de blé. Ceci correspond à ce qui est communément décrit dans la littérature ^[55, 97, 105]. En effet, les plus grands grains, d'une taille supérieure à 25 μm, correspondent aux grains de type A tandis que les grains de type B correspondent à la fraction dont le diamètre est inférieur à 25 μm (même si la réelle séparation entre les deux types de grains se fait autour de 10 μm). La séparation à 25 μm correspond quant à elle à la valeur nominale du tamis utilisé.

En ce qui concerne l'amidon de pomme de terre, la distribution n'est pas du tout la même que celle des grains de blé. Les résultats sont rapportés dans la figure 26.

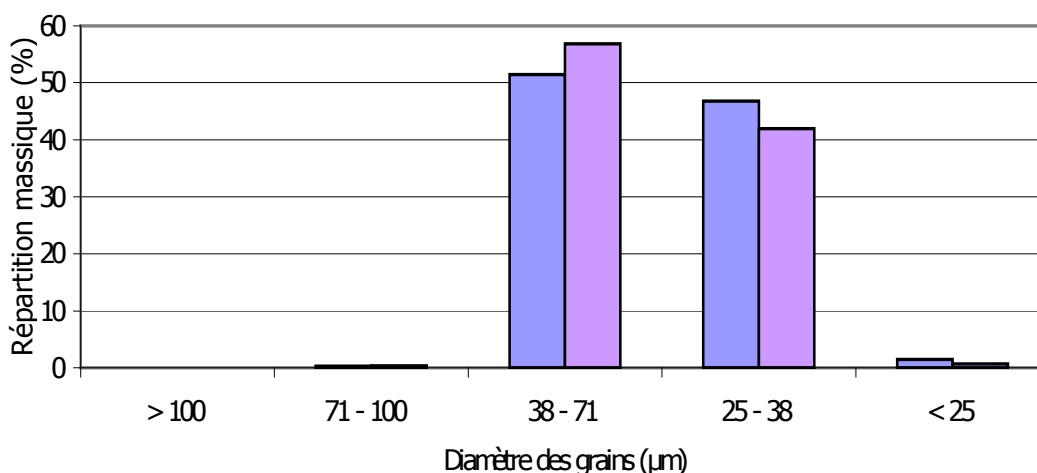


Figure 26 : Tamisage d'amidon de pomme de terre natif (une couleur représente un tamisage)

Ici le tamisage montre clairement que les grains au sein de l'amidon de pomme de terre ont un diamètre compris entre 25 et 71 µm pour plus de 98% d'entre eux. Dans le même temps, force est de constater que les proportions des deux fractions majoritaires sont très proches et autour de la valeur médiane de 38 µm. Encore une fois les résultats obtenus sont en accord avec la littérature ^[23] décrivant les amidons de tubercules puisque n'apparaît clairement qu'une seule famille de grain.

Lors du fractionnement à sec des amidons de blé et de pomme de terre, les résultats sont en accord avec la littérature. Traditionnellement, le blé est fractionné pour l'industrie du papier dans le cas des grains de type A ou encore pour l'alimentation mais très peu pour l'obtention de matériaux solides. Ici l'approche est originale dans le sens où l'objectif est de voir la corrélation entre la taille des grains et les propriétés mécaniques qui en découlent. Pour cette étude, ont été testées, dans les deux cas, les deux fractions majoritaires obtenues, ainsi que les amidons natifs correspondants, en guise de référence.

En conclusion de cette première partie concernant le fractionnement physique de l'amidon, les méthodes envisagées n'ont pas permis de réaliser un fractionnement efficace des macromolécules en fonction de la masse molaire. La précipitation fractionnée a conduit à des fractions dont les viscosités relatives étaient très proches les unes des autres ainsi que de celles

du substrat de départ. Outre les difficultés rencontrées dans la solubilisation de l'amidon, les résultats obtenus lors des essais de fractionnement utilisant la technique de l'ultra-filtration frontale agitée ont conduit à la rétention de la majeure partie du substrat. Ce résultat semble indiquer que celui-ci doit encore se trouver sous la forme d'agrégats. Ainsi, il n'est pas possible de mettre en relation la taille des pores des membranes de filtration avec la taille et/ou la masse des macromolécules retenues. L'un des moyens utilisable pour vérifier ce phénomène consisterait à travailler à grande dilution. Enfin, le tamisage a permis d'obtenir un fractionnement.

L'autre méthode pour atteindre l'objectif des macromolécules de grande taille a été le rallongement chimique ciblé. Dans cette seconde partie, le rallongement des chaînes amyliques a été réalisé par couplages chimiques spécifiques des extrémités de chaîne.

B) Couplage spécifique en bout de chaîne

Puisque les différentes méthodes de fractionnement physique mises en œuvre ne permettent pas l'isolement des plus longues chaînes d'amylopectine ou d'amylose à partir d'un amidon donné, l'obtention de longues chaînes amyliques est envisagée, dans ce deuxième chapitre, par voies chimiques. La littérature révèle l'existence de nombreuses études dans le domaine de la réticulation d'oligosaccharides^[106, 107] et de polysaccharides : amylose^[108], amidons (blé^[75], maïs^[88, 109], pomme de terre^[110], tapioca^[111], riz^[77, 112]...), cellulose^[113] ou même chitines^[114]. L'objectif final étant la réalisation de matériaux et *in fine* l'étude de leurs propriétés à ruptures, la réalisation de couplages chimiques doit être en accord avec le postulat initial préférant de longues chaînes capables de « coulisser » les unes par rapport aux autres lorsqu'on les étire plutôt que de gros amas polysaccharidiques.

Nous aborderons donc ici les différents couplages chimiques suivant ce point de vue. Le couplage devra exclusivement être intermoléculaire et non intra-moléculaire. Deux voies sont envisageables pour réaliser ce couplage intermoléculaire. Elles découlent directement de la structure chimique des polysaccharides. Comme décrit précédemment, dans l'amidon, l'amylopectine se présente sous la forme de clusters et l'amylose sous forme de chaînes^[7]. Ainsi, chaque chaîne d'amylose compte une unique extrémité réductrice (fonction hémiacétalique) et pour les chaînes strictement linéaires une extrémité dite non-réductrice alors

que chaque molécule d'amylopectine ne comporte toujours qu'une seule et unique extrémité réductrice mais possède une terminaison non-réductrice de plus que le nombre de branchements qu'elle porte. Cette multitude d'extrémités non-réductrices correspondent aux D-glucoses terminaux de chaque chaîne. Chacun de ces D-glucoses terminaux présente la caractéristique structurale d'avoir trois groupements hydroxyles secondaires en C₂, C₃ et C₄ et un groupement primaire en C₆. Les deux sites possibles pour envisager un couplage intermoléculaire sont donc d'une part les extrémités non-réductrices, très nombreuses, et d'autre part l'extrémité réductrice. La différence de nature chimique entre ces deux « extrémités » de chaîne implique l'utilisation de voies de couplage mettant en jeu des réactions différentes. L'objectif ultime est de pouvoir faire du couplage tête-à-queue entre deux macromolécules ce qui ouvrirait les portes à une polycondensation de l'amylopectine. Cela reviendrait à proposer un « super polymère » dont les motifs seraient une molécule d'amylopectine, elle-même polymère de D-glucose.

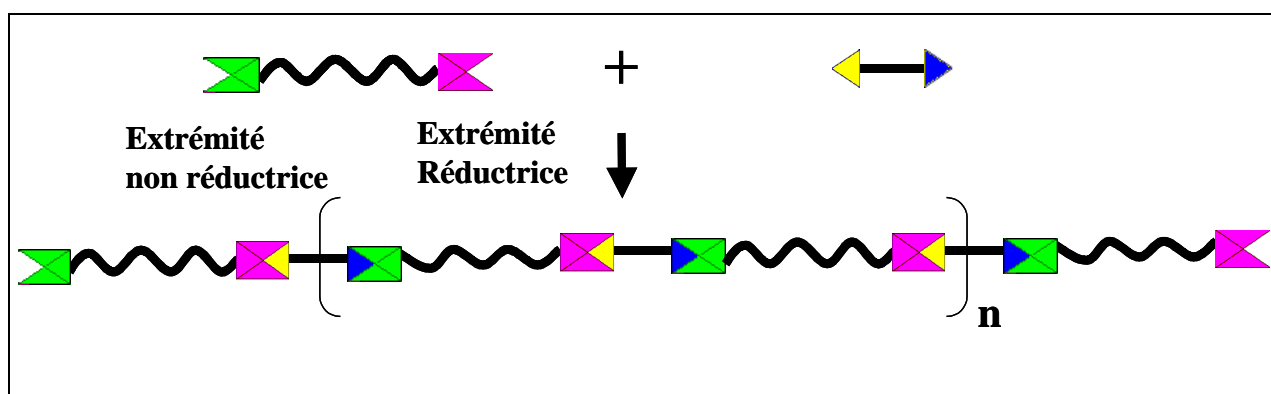


Figure 27 : Schématisation du couplage tête-à-queue

Nous présenterons dans ce chapitre une voie d'accès à un couplage par les extrémités non-réductrices et deux voies pour un couplage à partir de l'extrémité réductrice.

Un inconvénient de l'amidon en tant que substrat de réaction est sa faible capacité à se solubiliser. En effet, l'amidon natif n'est soluble que dans des solutions de soude ^[73, 115, 116] ou dans le DMSO ^[117, 118]. Toutefois pour son estérification ^[72], l'amidon peut être utilisé dans des solvants permettant sa gélatinisation et qui par ailleurs solubilisent très bien les produits des réactions.

Ainsi, deux voies seront proposées pour réaliser le couplage via l'extrémité réductrice: une en phase organique qui ouvre un panel large de réactions sur l'hémiacétal et une en phase aqueuse réduisant le nombre de réactions possibles mais qui permet l'utilisation de l'amidon déstructuré, ce qui réduit le nombre d'étapes à réaliser. Pour la première voie, l'acylglycosylation suivie ou non d'une réaction de métathèse a été envisagée tandis qu'en milieu aqueux, c'est l'amination réductrice qui a été étudiée.

1) Couplage à partir de l'extrémité non-réductrice

De prime abord, envisager un couplage chimique intermoléculaire de l'amidon via les extrémités non-réductrices semble être le plus raisonnable. En effet, le très grand nombre d'extrémités non-réductrices apparaît comme un atout puisque le nombre important de sites d'attaque chimique est en faveur d'une grande réactivité. L'intérêt dans cette approche réside dans le fait de pouvoir réaliser le couplage sur le seul hydroxyle en C₄ d'une chaîne amyliacée.

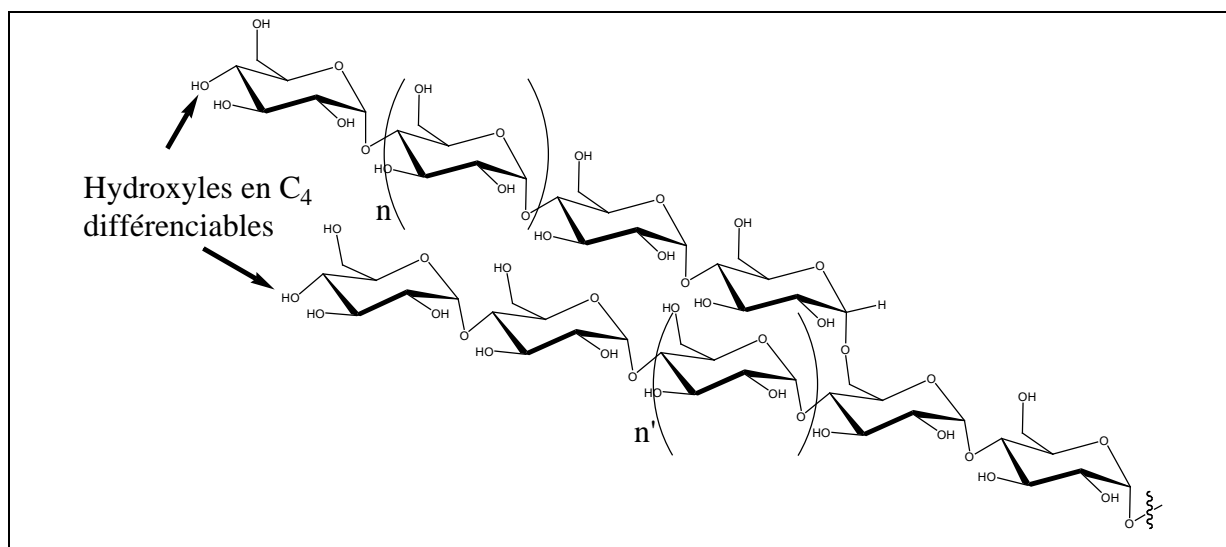


Figure 28 : Représentation d'une partie d'une molécule d'amylopectine

Comme le montre la figure 28, pour chaque chaîne il n'y a qu'un seul et unique hydroxyle porté par un C₄ puisque tous les autres sont engagés dans une liaison glycosidique. Le problème est donc de réaliser le couplage sur cet hydroxyle. En effet, bien qu'il soit unique sur la chaîne, il n'en reste pas moins un alcool secondaire comme le sont tous les hydroxyles de la chaîne lorsqu'ils sont portés par C₂ ou C₃. Or tout l'intérêt de la méthode est de réaliser un

couplage ciblé sur cette extrémité non-réductrice pour éviter le plus possible la réticulation en intra. Il faut de ce fait le différencier d'un point de vue chimique des autres hydroxyles de la molécule. La méthode qui a été proposée est la synthèse d'un intermédiaire de type benzylidène fonctionnalisé sur le dernier D-glucose.

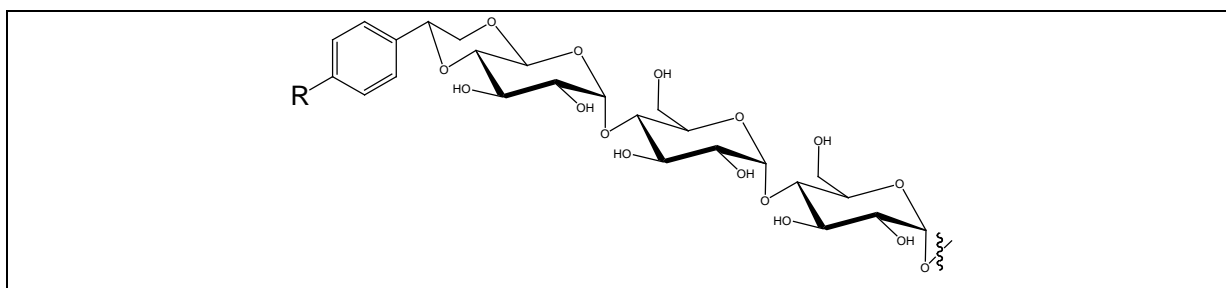
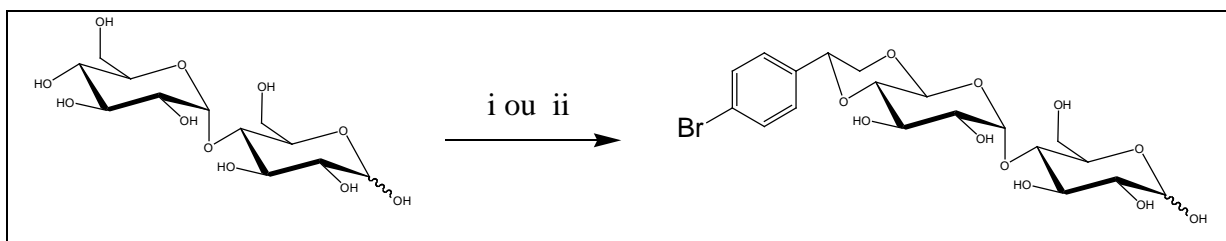


Figure 29 : Benzylidène fonctionnalisé en bout de chaîne

La réaction de transacétalisation nécessaire à l'obtention d'un oligosaccharide portant un groupement benzylidène en bout de chaîne a déjà été décrite par Lindhorst ^[119] et collaborateurs pour un maltose et un maltotriose. Avant de pouvoir réaliser la fonctionnalisation par le benzylidène d'une amylopectine ou même d'un amidon, des tests ont été réalisés initialement sur le maltose.



i) *p*-bromobenzaldéhyde, DMF, APTS ii) *p*-bromobenzaldéhyde, triméthylorthoformiate, DMF, APTS

Figure 30 : Synthèse du 4',6'-*O*-parabromobenzylidène maltose

Dans les deux protocoles envisagés, la réaction n'a permis que l'obtention de mélanges comprenant le produit souhaité. Une analyse par RMN montre clairement la présence du pic caractéristique du proton acétalique du groupement benzylidène à 5,7 ppm. Un inconvénient de cette voie est le temps de réaction par rapport aux rendements obtenus. Lindhorst décrit des réactions de 6 à 8 heures respectivement avec le maltose et le maltotriose pour des rendements annoncés à 40 et 30% ^[119]. Il est donc raisonnable de penser que pour des polysaccharides de

taille plus importante, le temps de réaction et les rendements évolueront tous deux dans le mauvais sens, vers des temps beaucoup plus longs et des rendements beaucoup plus faibles. En ce qui concerne le rendement, cela peut dans un sens être moins important puisqu'un rendement faible impliquerait un nombre d'extrémités moins important et diminuerait alors peut-être la possibilité de réticulations intramoléculaires ultérieures.

Quoi qu'il en soit, il n'est pas envisageable à ce stade d'avoir différentes étapes de purification puisqu'il ne s'agit que de modèles et que le protocole doit être transposable aux gros, voire très gros polysaccharides. Par exemple, une purification par HPLC n'est en aucun cas intéressante ici, bien qu'elle permettrait facilement d'obtenir les produits purs désirés. Il faut uniquement des méthodes simples, efficaces et surtout préparatives. La fonctionnalisation du dernier hydroxyle en C₄ des chaînes par un groupement benzylidène a donc été mise de côté parce qu'elle risque de présenter beaucoup plus de difficulté dans le passage à l'échelle supérieure.

Cette voie de synthèse proposée est ambitieuse et élégante mais la réalité de la paille en a montré les limites. La très grande multiplicité des groupes hydroxyles en C₄ est à la fois un avantage pour la réactivité mais un inconvénient pour la même raison. En effet, même avec de bons rendements, le couplage intramoléculaire aurait été difficile à éviter (excepté sur l'amylose). Par ailleurs, lors de l'étape de couplage, aucune méthode n'aurait permis de faire la différence entre un couplage intra- et un couplage intermoléculaire. Le fait d'abandonner l'idée de fonctionnaliser le côté non-réducteur des macromolécules induit automatiquement l'impossibilité de réaliser une polymérisation des macromolécules entre elles. Il faut alors s'attarder sur le couplage via l'extrémité réductrice des polysaccharides afin de pouvoir réaliser un couplage tête-à-tête qui permettrait d'obtenir au maximum un doublement des masses molaires.

2) Couplages à partir de l'extrémité réductrice en milieu organique

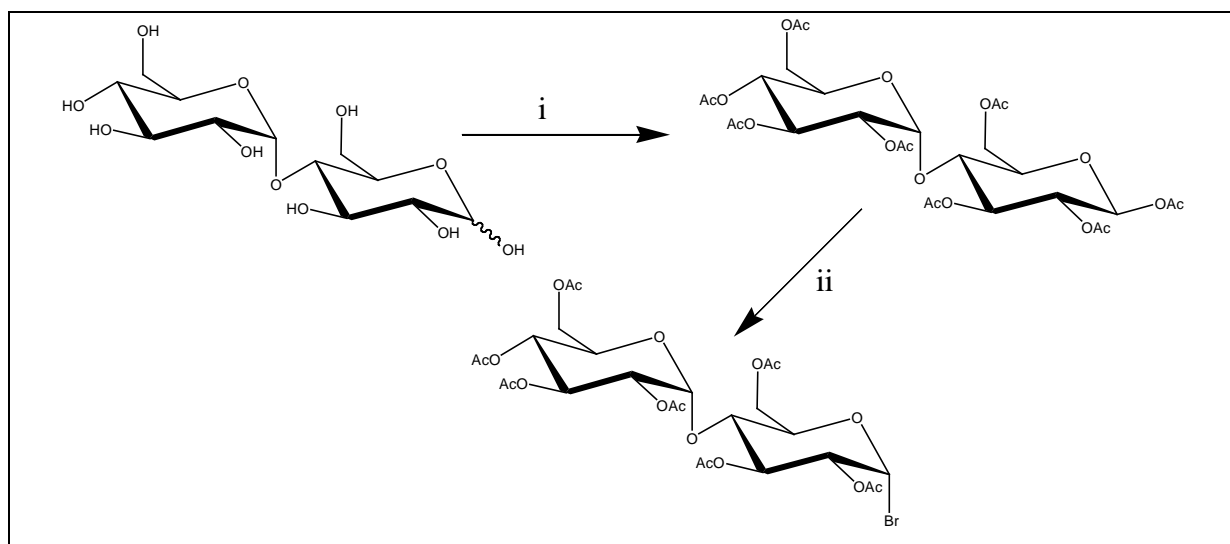
Dans une stratégie de couplage via l'extrémité réductrice des chaînes amyliques d'amidon, on se trouve complètement à l'opposé de la stratégie via les extrémités non réductrices. Dans ce cas il y a unicité du site cible pour chaque macromolécule ce qui interdit tout couplage intermoléculaire à quelque étape de la synthèse que ce soit mais aussi, et surtout, une différenciation importante au niveau chimique de l'extrémité réductrice par rapport au reste de

la molécule cible. La fonction hémiacétalique, comme décrite précédemment est équivalente à un aldéhyde masqué ce qui permet d'envisager des réactions spécifiques et par conséquent ciblées. En l'occurrence, ici la voie de synthèse choisie est l'acylglycosylation. Avant de réaliser les modifications sur de l'amidon, des tests ont été effectués sur le modèle du maltose.

a) Couplage par acylglycosylation

Le premier exemple qui a été testé était basé sur une réactivité particulière de la fonction hémiacétalique déjà utilisée au laboratoire, dans le cadre du travail de la thèse de S. Nazabadioko sur la synthèse de saponosides. Au cours de ce travail, le couplage par acylglycosylation d'acides gras sur des oligosaccharides a été réalisé par transfert de phase. La déprotection sélective des acétates avait été effectuée sans rupture de la liaison acylglycoside [120].

La première étape dans toute cette partie concernant la chimie en milieu organique est la peracétylation du maltose dans la pyridine afin de permettre sa solubilisation puis la bromation classique du carbone anomère par de l'acide bromhydrique à 33% dans l'acide acétique. Ces deux réactions permettent d'obtenir facilement et sur de grosses quantités le 1-bromo-2,3,6,2',3',4',6'-O-heptaacétylmaltose [121].



i) anhydride acétique, pyridine. ii) HBr 33% dans AcOH, CH₂Cl₂

Figure 31 : Synthèse du 1-bromo-2,3,6,2',3',4',6'-O-heptaacétylmaltose.

C'est donc le 1-bromo-2,3,6,2',3',4',6'-O-heptaacétylmaltose qui est le substrat réel de l'acylglycosylation, étape clé de la stratégie. Cette réaction spécifique d'un acide sur la position anomérique bromée d'un sucre peracétylé, est choisie du fait de l'expérience acquise au sein du laboratoire quant à sa mise en œuvre.

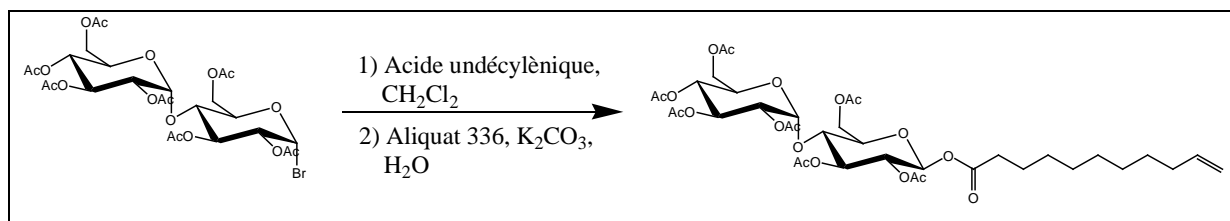


Figure 32 : Synthèse de l'undécylénate d' α -heptaacétylmaltosyle

Le rendement de cette réaction d'acylglycosylation par l'acide undécylénique est de 42%. Il est peu élevé mais s'explique par la légère instabilité du dérivé bromé qui lorsqu'il n'est plus conservé à froid, s'hydrolyse pour donner le 1-hydroxy-2,3,6,2',3',4',6'-O-heptaacétylmaltose. Le choix de l'acide undécylénique s'explique par la longueur de la chaîne carbonée qui après couplage créera un bras espaceur de 20 atomes de carbone. D'autre part la bifonctionnalité avec la présence de la double liaison terminale est un élément important de la stratégie puisqu'elle permet de réaliser dans un second temps le couplage par réaction de métathèse.

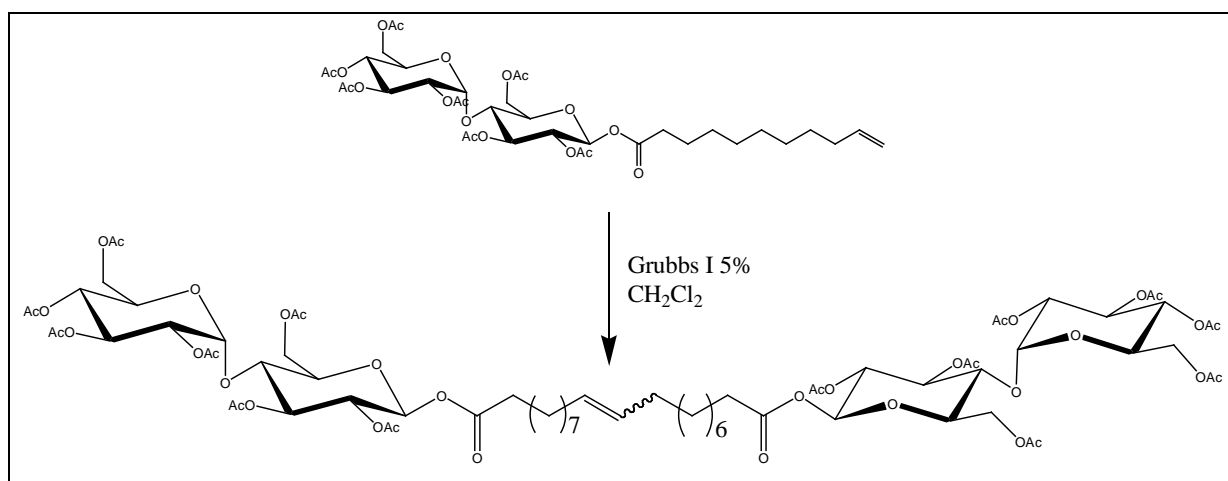


Figure 33 : Couplage par réaction de métathèse

La réaction de métathèse a permis l'obtention de l'icosyl-10-ène de di- α -heptaacétylmaltosyle avec un bon rendement de 63%. La première étape de couplage sur le modèle maltose est donc facilement réalisée en 4 étapes.

Après avoir réalisé la réaction d'acylglycosylation sur un monoacide, elle a été réalisée sur un diacide gras à 9 carbones, l'acide azélaïque, ce qui permet de réaliser le couplage en une seule et même étape. On obtient dans les mêmes conditions l'azélate de di- α -heptaAcétylmaltosyle avec un bon rendement de 61%.

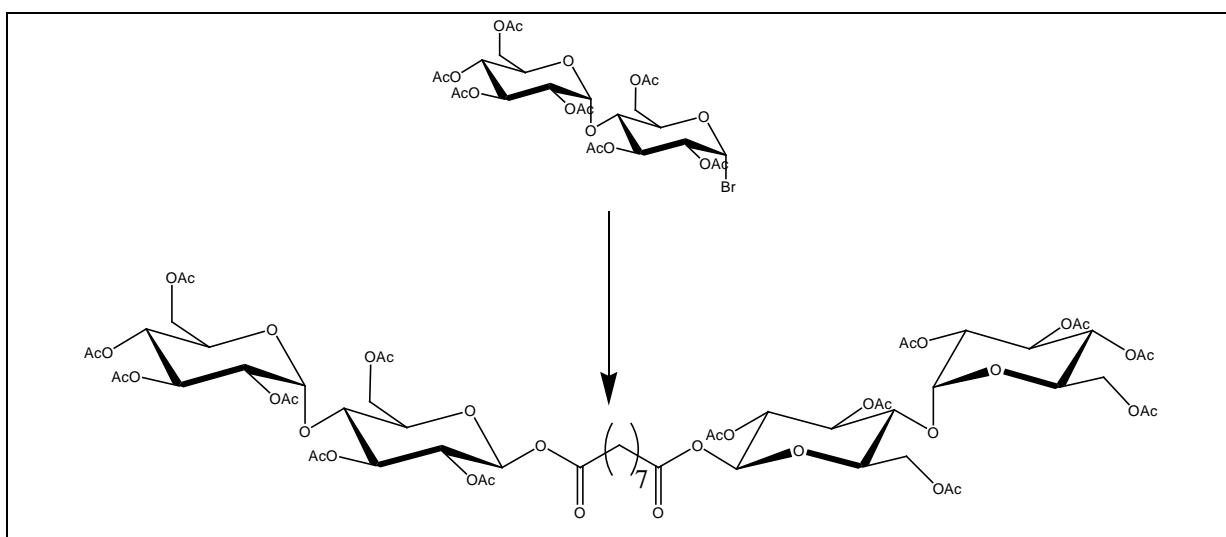


Figure 34 : Couplage par diacylglycosylation

b) Désacétylation sélective

α) Déprotection chimique

La dernière étape de la synthèse est la déprotection sélective des 14 groupements protecteurs acétates. La difficulté de cette déprotection consiste ici à cliver sélectivement les groupements acétates sans toucher à la fonction acylglycoside. Plusieurs méthodes ont été décrites dans la littérature^[120] et utilisées avec succès au laboratoire sur des substrats acyl-glycosides.

Dans un premier temps, pour mettre au point la réaction, cette déprotection a été étudiée sur l'undécylénate d' α -heptaacétylmaltosyle.

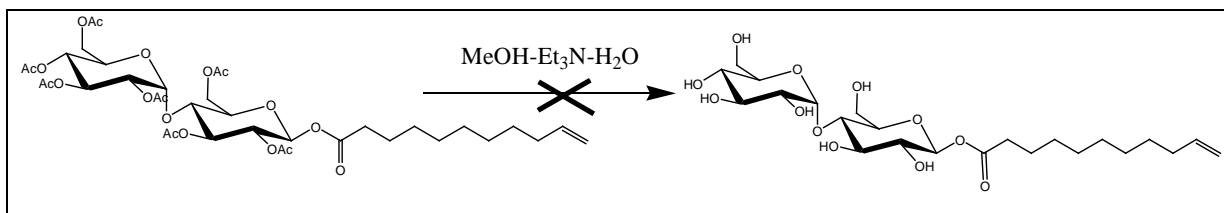


Figure 35 : Désacétylation sélective

Par la méthode proposée, très rapidement lors du suivi de la réaction on voit par chromatographie sur couche mince l'apparition d'une tache correspondant au produit de désacétylation qu'est le 1-hydroxy-2,3,6,2',3',4',6'-O-heptaacétylmaltose puis lorsque la réaction avance, la désacétylation complète se produit et par analyse RMN, le maltose est identifié comme étant le produit final de la réaction.

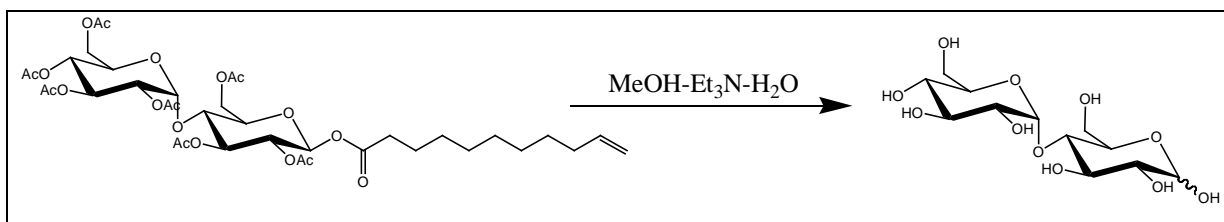


Figure 36 : Désacétylation complète

Une explication proposée pour la non-sélectivité de la méthode est le non-encombrement en α de la fonction acyle de la chaîne carbonée. En effet, dans le cadre des saponosides (acyl-glycosides fréquemment rencontrés lors d'études sur les métabolites secondaires des plantes), le carbone en α est quaternaire et ne permet sans doute pas l'attaque nucléophile sur le carbonyle. Dans le cas présent, la différence structurale et spatiale est trop faible pour permettre à la méthode d'être sélective. Une autre méthode a donc été envisagée.

β) Déprotection enzymatique

La seconde méthode envisagée pour réaliser la déprotection sélective des acétates est une méthode enzymatique. L'intérêt d'une réaction enzymatique réside dans la spécificité de la reconnaissance structurale du substrat à hydrolyser. L'enzyme qui a été retenue pour notre étude est l'acétyl estérase de peau d'orange^[122] car elle a été décrite comme étant active sur des substrats sucres acétylés^[123]. Cette enzyme n'étant pas disponible au moment de l'étude, nous l'avons extraite et purifiée au laboratoire.

Après l'extraction d'une acétyl estérase (EC 3.1.1.6) de peaux d'oranges selon la méthode décrite par Gary Williamson^[122], et une étude sur ses conditions optimales d'utilisation en suivant l'hydrolyse de l'acétate de p-nitrophénol, l'enzyme est testée sur le D-glucose, le maltose puis sur l'undécylénate d' α -heptaacétylmaltosyle.

Le problème récurrent rencontré lors de cette réaction est l'insolubilité des produits acétylés dans le tampon NaCl à pH 6,2. Même après un long temps de réaction, il apparaît que la déprotection ne s'amorce pas tant que le substrat n'est pas solubilisé. De nouvelles conditions ont été mises en place avec un co-solvant. Le co-solvant choisi est le DMSO car il solubilise le D-glucose et le maltose peracétylé sans inhiber complètement l'enzyme. Après une semaine de réaction, les chromatographies sur couches minces montrent que l'hydrolyse des acétates a lieu. Pour autant l'undécylénate ne se solubilise pas dans le DMSO ce qui impose un changement de co-solvant. Le nouveau co-solvant choisi est le DMF.

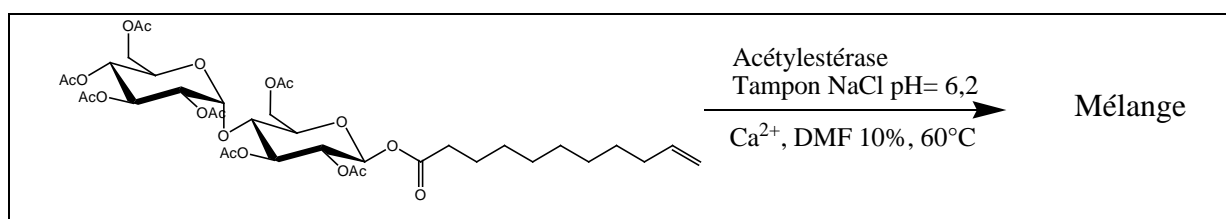


Figure 37 : Désacétylation partielle via l'acétyl estérase

Après 15 jours de réaction, le suivi par chromatographie sur couche mince indique qu'une déprotection partielle a bien eu lieu mais conduit à un mélange complexe de produits de polarité supérieure. Une analyse par RMN montre la résistance de la chaîne grasse à l'hydrolyse mais aussi l'absence de 1-hydroxy-2,3,6,2',3',4',6'-O-heptaacétylmaltose. Les

hypothèses qui peuvent être proposées pour expliquer ce résultat sont d'une part que la quantité d'enzyme mise en jeu dans la réaction n'est pas assez importante pour engendrer une cinétique plus rapide. D'autre part, en postulant que l'enzyme hydrolyse plus facilement les acétates portés par des carbones primaires, une migration des acétates du sucre terminal vers la position primaire est envisageable.

En effet, Queneau et collaborateurs ont montré qu'en milieu aqueux et/ou organique, en présence d'une base, les esters en positions C₆' étaient plus stables que ceux en C₂ ou en C₃ et qu'une migration des esters vers la position C₆' était observée^[124]. Par ailleurs Waldmann et collaborateurs ont montré que l'enzyme est active sur le 6-*O*-acétyl-1,2 :3,4-di-*O*-isopropylidène- α -D-galactopyranose^[123] puisqu'elle désacétyle en position 6 avec un très bon rendement de 73%. Dans le même temps, ils montrent qu'un D-glucose peracétylé donne exclusivement des produits déprotégés en position anomérique après 20% de conversion et en position 1 et 2 après 40% de conversion. En aucun cas, ils ne retrouvent de 6-hydroxy dans le milieu malgré la capacité vérifiée de l'acétyl estérase à hydrolyser l'acétate en position primaire. Il serait intéressant de voir si pour 60% de conversion ils trouveraient exclusivement du 1,2,3-trihydroxy-4,6-*O*-diacétylglucopyranose dans le milieu réactionnel en plus des deux premiers produits déjà observés.

Ceci vient tout à fait corroborer l'hypothèse proposée dans le cas de la déprotection de l'undécylénate consistant à dire que les acétates hydrolysés sur D-glucose terminal peuvent migrer jusqu'à la position primaire tandis que ceux du glucose réducteur ne le peuvent pas. De ce fait, et par la cinétique très lente de la réaction d'hydrolyse et celle de migration des acétates, un mélange de nombreux produits partiellement déprotégés est obtenu.

En raison des difficultés rencontrées dans la solubilisation du substrat, cette désacétylation n'a pas été réalisée sur des polysaccharides protégés, mais dans le cas d'une solubilité suffisante, il serait intéressant de regarder si, en conduisant cette déprotection sélective, on observerait une désacétylation sélective des carbones primaires ainsi que ceux du dernier D-glucose non-réducteur de la chaîne. De ce fait, la méthode consistant à réaliser le couplage en phase organique a été laissée de côté. Afin de s'affranchir ainsi des problèmes rencontrés au cours de la déprotection, la voie suivante développée est une méthode permettant de réaliser directement le couplage à partir de l'extrémité réductrice en milieu aqueux.

3) Couplages à partir de l'extrémité réductrice en milieu aqueux

La deuxième voie proposée pour réaliser le couplage spécifiquement sur l'extrémité réductrice a été une voie en phase aqueuse. La réaction choisie est l'amination réductrice. La chimiosélectivité de cette réaction permet d'envisager une diamination réductrice sur la position anomérique du sucre réducteur. Une deuxième méthode sera proposée, il s'agit d'une mono amination réductrice suivie d'une réaction de métathèse en milieu aqueux. La première option impose un temps de réaction long puisque l'amination réductrice est une réaction lente ^[125]. La seconde nécessite la synthèse d'un catalyseur de métathèse croisée soluble et efficace dans l'eau. Les réactions seront testées sur le maltose et des dextrines avant de passer à l'amylose puis l'amidon.

a) Diamination réductrice

α) Rappels bibliographiques

L'objectif du couplage est l'obtention d'une amine en position anomère. Différentes méthodes ont été proposées dans la littérature pour y parvenir. Des couplages avec un groupement urée comme bras espaceur ont été testés par Steyermark ^[126] (action du phosgène sur la β -D-glucopyranosylamine), Helm ^[127] (amination réductrice de l'urée sur le D-glucose) ou Ichikawa ^[128] (oxydation d'un isonitrile pour former un isocyanate anomère couplé ensuite avec un 6-amino-D-glucose). Par ailleurs la taille du bras espaceur peut être grande puisque des protéines ont été couplées sur des pentaoses par amination réductrice ^[107]. Enfin, l'amination réductrice a également permis le couplage d'oligosaccharides avec des protéines en milieu aqueux en présence de cyanoborohydrure de sodium ^[106].

Le fait que la réaction d'amination réductrice ait pu être réalisée sur des oligosaccharides avec des amines de la taille de protéines ^[106, 107], permet de l'envisager sur des polysaccharides tels que des amidons. De plus, l'espaceur utilisé sera dans un premier temps de petite taille puisqu'il s'agit de l'hydrazine, de l'ortho-diaminobenzène ou la benzidine ce qui permet un accès facile en théorie à l'extrémité réductrice des polysaccharides.

Il est possible de schématiser le couplage par amination réductrice par une longue chaîne séparé par un petit bras espaceur comme représenté sur la figure 39. Il est à noter que plus les chaînes sont longues, moins l'extrémité réductrice est visible pour l'amine et apparaît comme petite, ce qui laisse à penser que les temps de réactions augmenteront avec la taille des oligosaccharides.

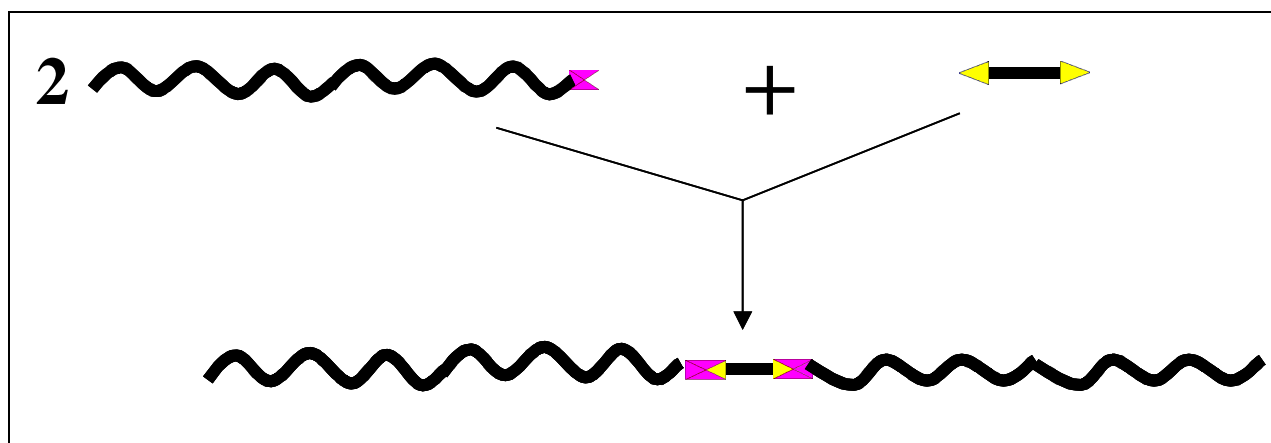


Figure 38 : Schématisation du couplage sur une extrémité réductrice d'un oligo ou polysaccharide

L'amination réductrice ici mise en jeu est la réaction d'une diamine sur l'extrémité réductrice d'un polysaccharide. Cette réaction permet l'obtention d'une amine secondaire via une carbinolamine et/ou une imine.

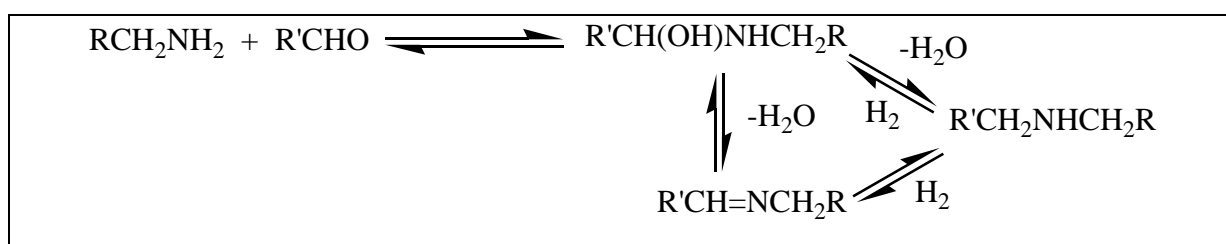


Figure 39 : Principe de l'amination réductrice^[129]

Cette réaction lorsqu'elle est réalisée sur NH_3 peut aller jusqu'à la formation de l'amine tertiaire. La réactivité est fonction de l'encombrement des fonctions. Skita et Keil ont montré que la réaction faite avec une amine encombrée aboutit à des rendements beaucoup plus faibles [130].

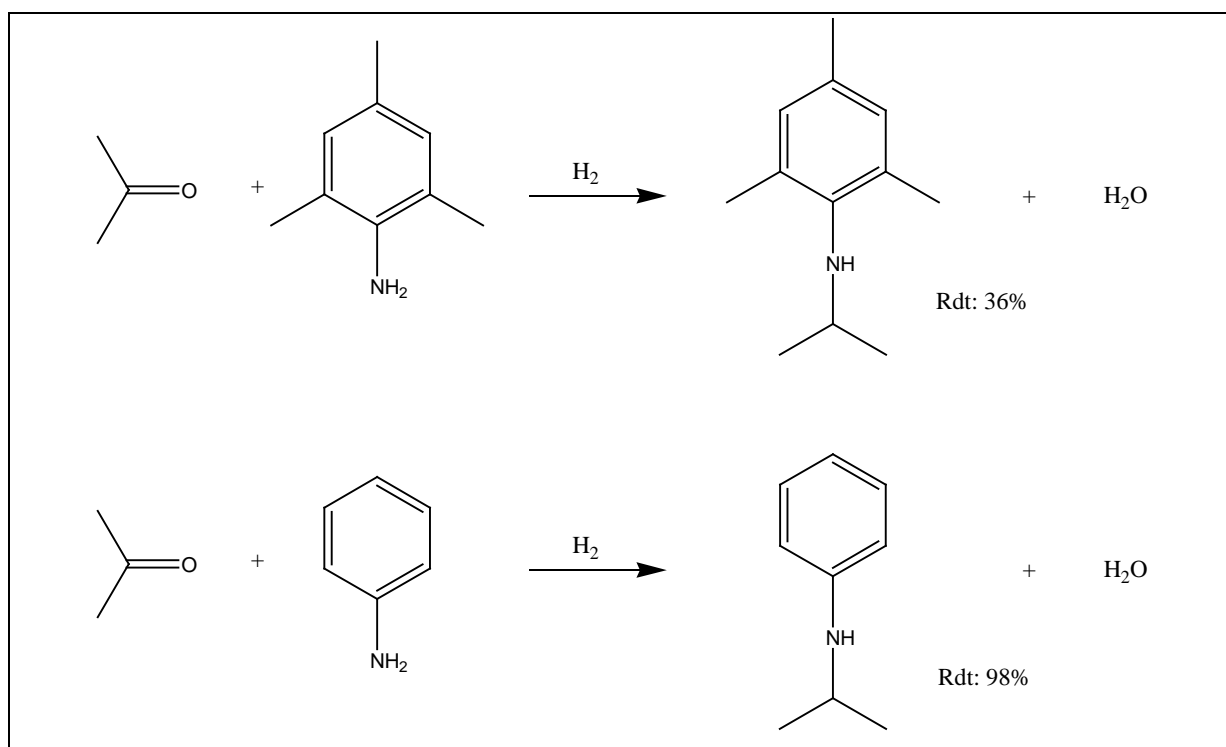
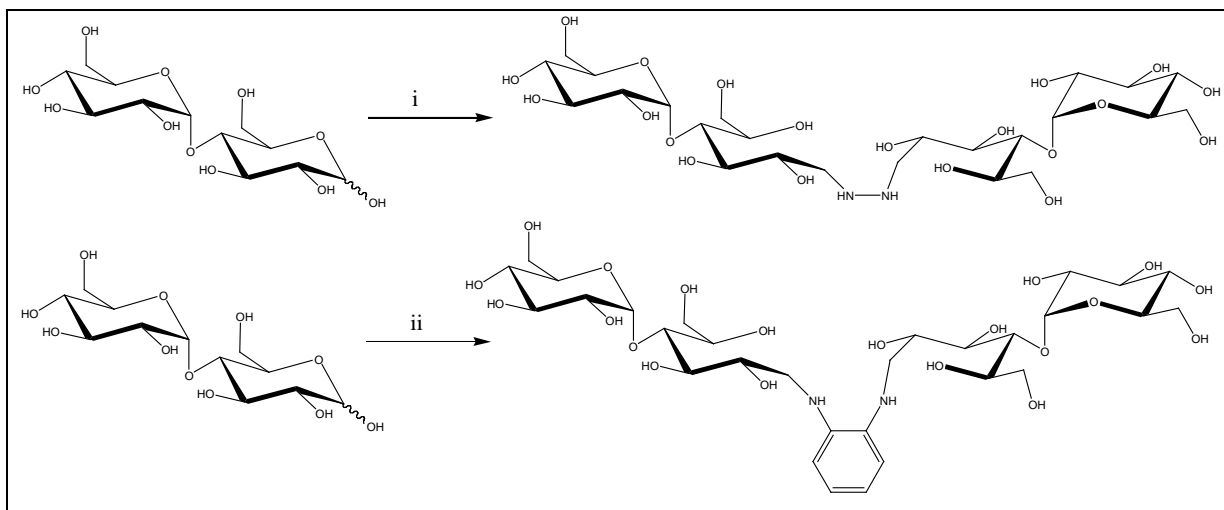


Figure 40 : Influence de l'encombrement de l'amine ^[130]

De la même façon, ils ont montré que l'encombrement stérique sur le carbonyle engendrait une baisse des rendements ^[131]. Rylander a montré par ailleurs qu'un des produits secondaires que peut engendrer cette réaction est l'alcool issu de la réduction du carbonyle ^[132]. La réduction est communément réalisée par le cyanoborohydrure de sodium mais des réductions par catalyse hétérogène sur différents métaux ont été réalisées ^[133].

β) Couplage sur modèle maltose

Le premier modèle sur lequel la réaction a été réalisée est le maltose pour des questions de facilité de suivi de réaction. Le couplage a été effectué avec la plus petite diamine existante, l'hydrazine, et l'ortho-diaminobenzène, une diamine possédant un chromophore, ce qui pourrait être intéressant dans le cadre d'un suivi de couplage par analyse UV.



i) Hydrazine, $Na(CN)BH_3$, H_2O ii) ortho-diaminobenzène, $Na(CN)BH_3$, H_2O

Figure 41 : Diamination réductrice sur le maltose

Dans les deux cas de couplage décrits ci-dessus, la réaction est suivie par chromatographie sur couche mince ce qui permet d'observer l'apparition d'un produit très polaire, comparativement au maltose. La méthode de purification choisie est la fixation sur résine échangeuse d'ions mais elle n'a pas permis d'isoler la totalité du tétrasaccharide synthétisé. Le rendement de purification obtenu est de 20% dans le cas du couplage à l'hydrazine et de 5% pour le couplage à l'ortho-diaminobenzène. Le couplage n'est pas remis en question mais la méthode de purification doit être modifiée pour le passage à des masses molaires plus importantes. La méthode de purification utilisée est la filtration sur membrane de dialyse. Pour le modèle maltose, la différence de masse et surtout de taille avec le produit de couplage n'est pas suffisante pour que cette méthode puisse être utilisée.

Par ailleurs, les spectres RMN sont difficiles à analyser de par le nombre d'isomères possibles. Par contre la spectrométrie de masse confirme bien que le couplage a été réalisé.

γ) Couplage sur modèle dextrane

Les dextrans sont des polysaccharides de D-glucoses linéaires liés en α 1-6. Ces molécules sont de très bons modèles pour l'amylose puisque l'accessibilité à l'extrémité réductrice pour les agents de couplage est similaire à celle de l'amylose. Un autre intérêt de l'utilisation de dextrans comme modèle aux couplages d'amylose ou plus généralement d'amidon est la relative maîtrise de leur taille lors de leur synthèse (enzymatique). Les modèles qui ont été

testés sont des dextranses de 10 et 43 KDa. Ces deux substrats ont des indices de polydispersités relativement faibles ce qui permet de voir assez facilement si un couplage a été réalisé.

Pour ces substrats de type oligosaccharidique, les conditions de couplage mises en jeu sont les mêmes que celles utilisées pour le modèle maltose. A partir de cette étape, pour laquelle la taille des macromolécules est plus élevée, le calcul de rendement est inutile parce que la purification des macromolécules couplées n'est pas possible de façon préparative. Deux méthodes analytiques ont été utilisées afin de prouver la réalisation du couplage : la chromatographie d'exclusion stérique et la spectrométrie de masse.

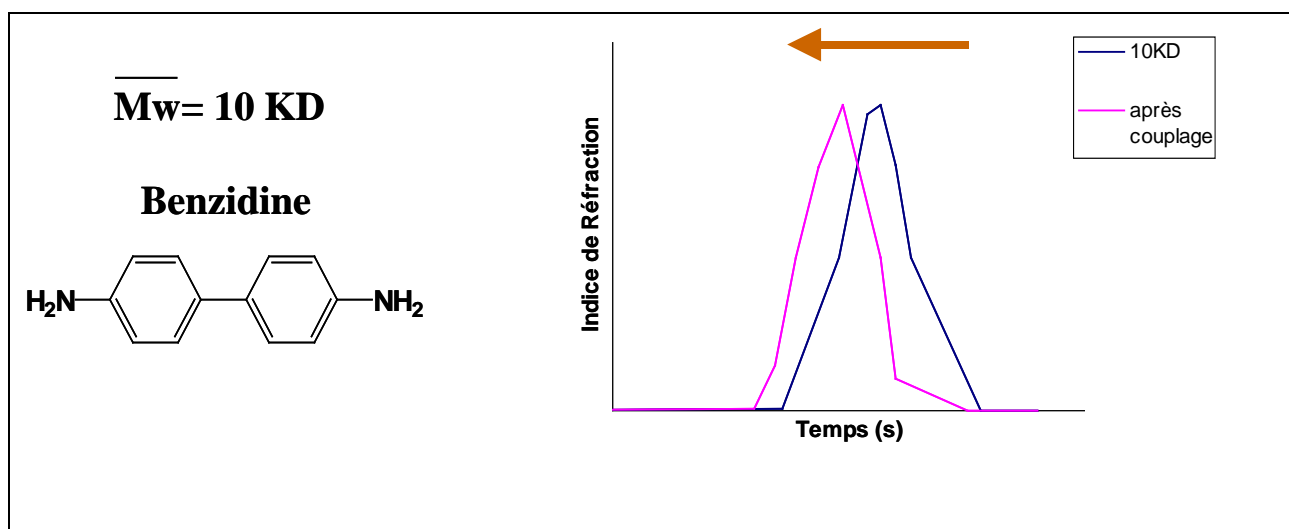


Figure 42 : Suivi par SEC sur colonne Shodex^[134] du couplage de la dextrine 10 KDa

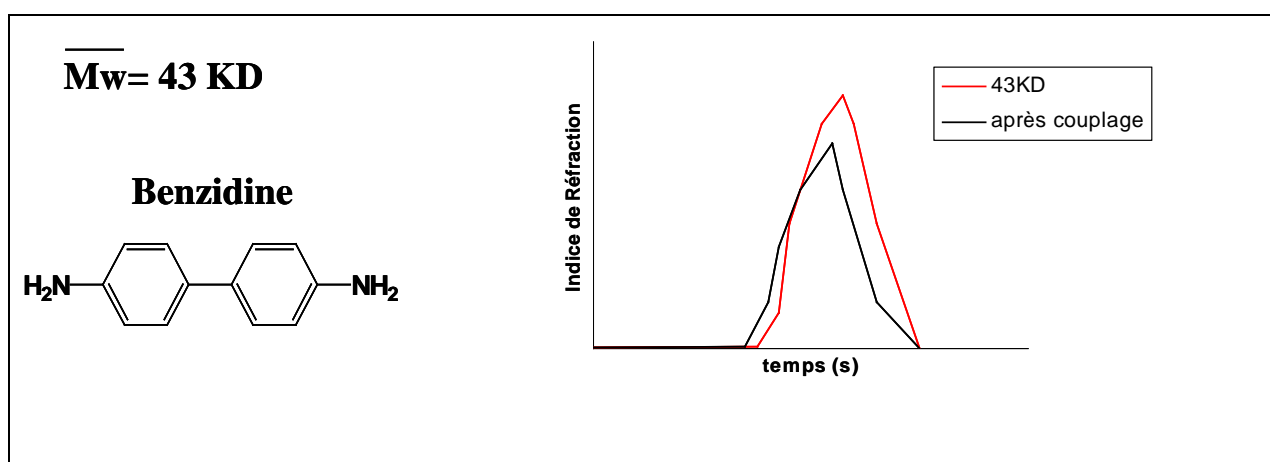


Figure 43 : Suivi par SEC du couplage de la dextrine 43 KDa

La figure 42 montre, par chromatographie d'exclusion stérique, un déplacement vers des temps de rétention plus courts donc des masses plus importantes. Ce phénomène, même léger, associé avec l'élargissement du pic à mi-hauteur indiquant une augmentation des populations de masses intermédiaires, prouve l'effectivité du couplage. La figure 43 concernant la dextrine 43 KDa ne met pas en évidence de déplacement du pic aussi important que pour la dextrine 10 KDa mais un élargissement léger du pic. Ceci s'explique par la polydispersité initiale plus importante de la dextrine 43 KDa par rapport à celle de 10 KDa. En effet, la dimérisation d'un substrat polydisperse ne conduit pas rigoureusement à doubler la masse molaire puisque rien n'empêche les grosses macromolécules de réagir avec des petites et même la probabilité que deux grandes macromolécules réagissent ensemble est plus faible que le couplage entre deux petites (ou une grande) et une molécule de taille nettement moins importante. Ainsi, les spectres de masse montrent pour les deux couplages une « forêt » de pic allant de la masse molaire du substrat jusqu'à une masse quasiment équivalente au doublement de la masse molaire.

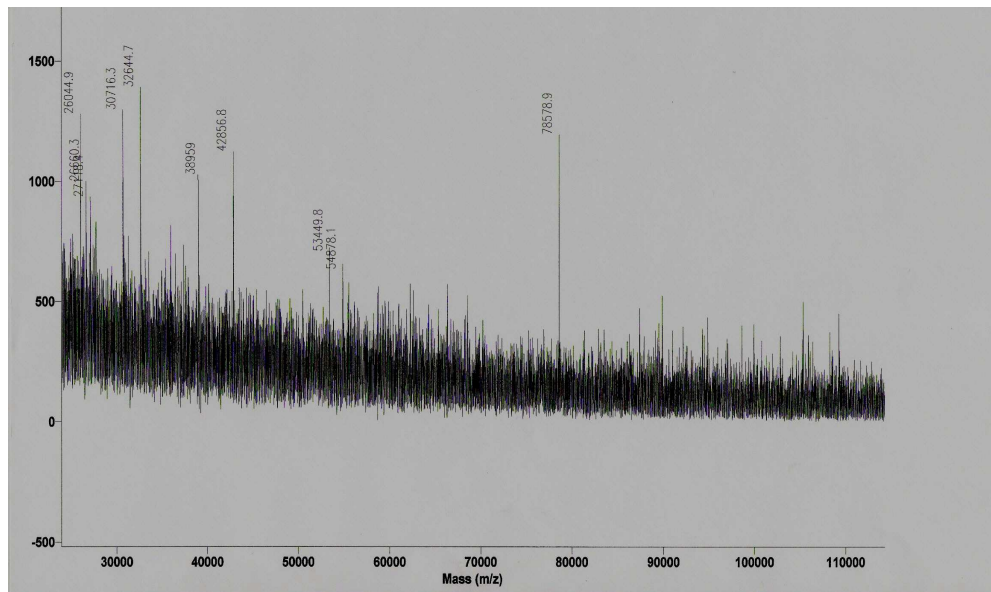


Figure 44 : MALDI-TOF du produit de couplage de la dextrine 43 KDa par la benzidine

La figure 44 montre des pics correspondants aux produits de départ entre 30 et 50 KDa, un pic important à 78 KDa et un « gazon » entre 50 et 70 KDa correspondant à l'ensemble des couplages intermédiaires.

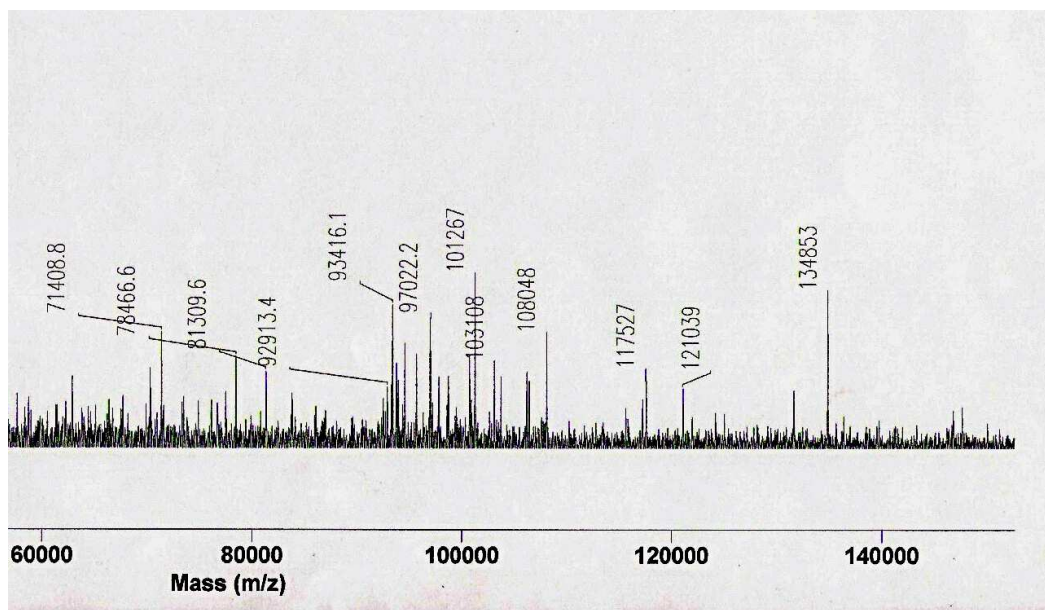


Figure 45 : MALDI-TOF du couplage de la dextrine 73 KDa par l'ortho-diaminobenzène

Sur la figure 45, on retrouve le même type de résultats avec des pics correspondants aux produits de départ, un pic à 135 KDa prouvant que le couplage a eu lieu entre des macromolécules de fortes masses et un ensemble de masses molaires intermédiaires correspondants à des couplages entre masses molaires variées.

Par ces deux méthodes analytiques, la preuve du couplage spécifique par amination réductrice sur l'extrémité réductrice de polysaccharides de masses molaires élevées a été faite. Ces résultats permettent d'envisager le couplage, non plus sur des modèles, mais bel et bien sur l'amylose et par la suite sur l'amidon.

δ) Couplage sur l'amylose

L'amylose qui a été utilisé pour réaliser le couplage est un amylose obtenu par séparation amylose/amylopectine à partir d'amidon de blé par précipitation au n-butanol^[99] et l'agent de couplage choisi est l'ortho-diaminobenzène. La méthode qui a été retenue est la chromatographie par exclusion stérique sur Gel Sephadex CL2B avec détection par analyse du

complexe à l'iode. Il s'agit de complexer l'amylose par l'ion polyiodoiodure et de corrélérer le λ_{\max} du complexe obtenu par spectroscopie UV au DP de la chaîne complexée^[9].

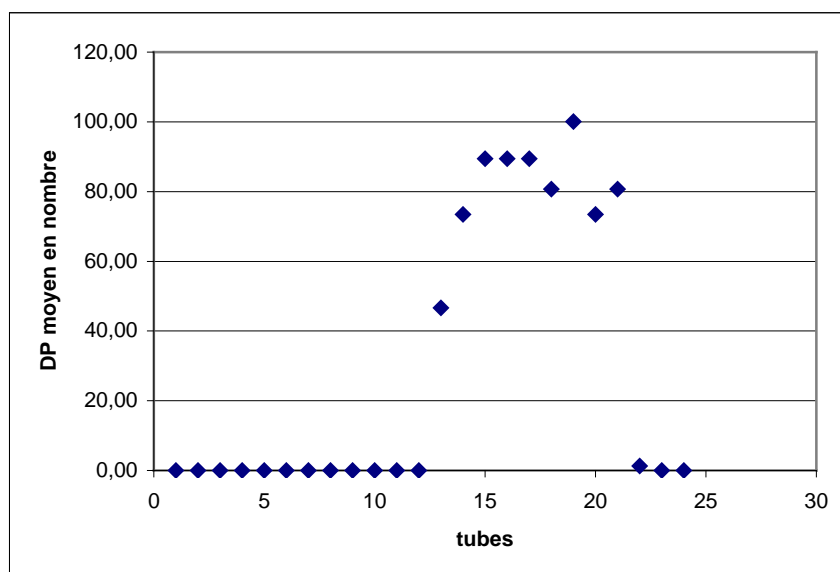


Figure 46 : DP moyen de l'amylose chromatographié par exclusion stérique sur Gel Sepharose CL2B, analysé par complexation à l'iode

La figure 46 montre que l'amylose utilisé pour la réalisation du couplage a un DP moyen compris entre 46,6 et 100 ce qui implique des masses molaires allant de 8000 à 16000 g/mol.

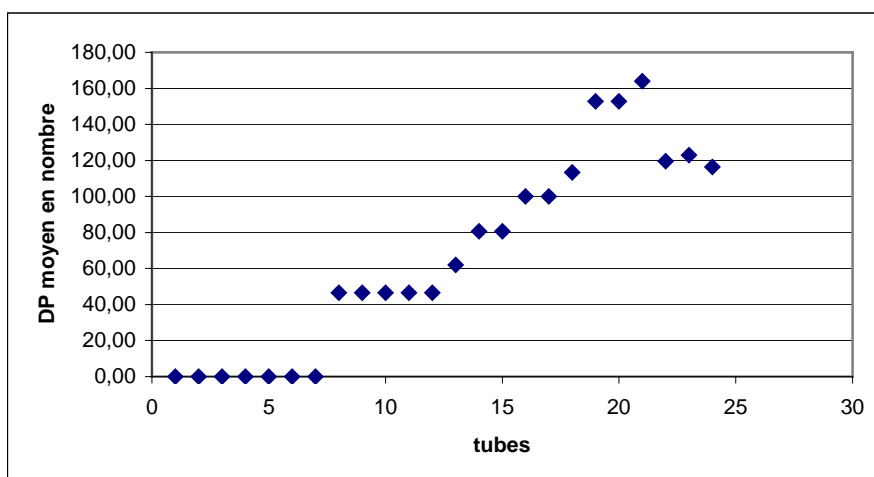


Figure 47 : DP moyen d'amylose couplé à l'ortho-diaminobenzène

La figure 47 montre que le DP moyen des amyloses après réaction de couplage va de 46,6 à 163. De cette façon, il apparaît que le couplage a bien eu lieu. Les DP moyens obtenus ici sont plus petits que ceux mis en jeu dans le cas des dextrans puisque dans le cadre du couplage de la dextrine à 73 KDa, le DP du produit de couplage, dont le pic est à 135 Kda, est de 833. Toutefois, la plus grande solubilité en milieu aqueux des dextrans justifie qu'elles aient été testées avant de réaliser les couplages sur l'amylose.

ε) Couplage sur l'amidon

Dans le cadre du couplage de l'amidon, les différents agents de couplages utilisés ont été l'hydrazine, l'ortho-diaminobenzène et un polyéthylène glycol (PEG) modifié en bout de chaîne afin d'obtenir un PEG diaminé. L'intérêt de réaliser le couplage avec un PEG (de masse molaire 8000 g/mol) modifié en bout de chaîne est de comparer par la suite les propriétés mécaniques du produit obtenu, dont la taille du linker est bien plus grande que celle des produits obtenus avec l'hydrazine ou l'ortho-diaminobenzène.

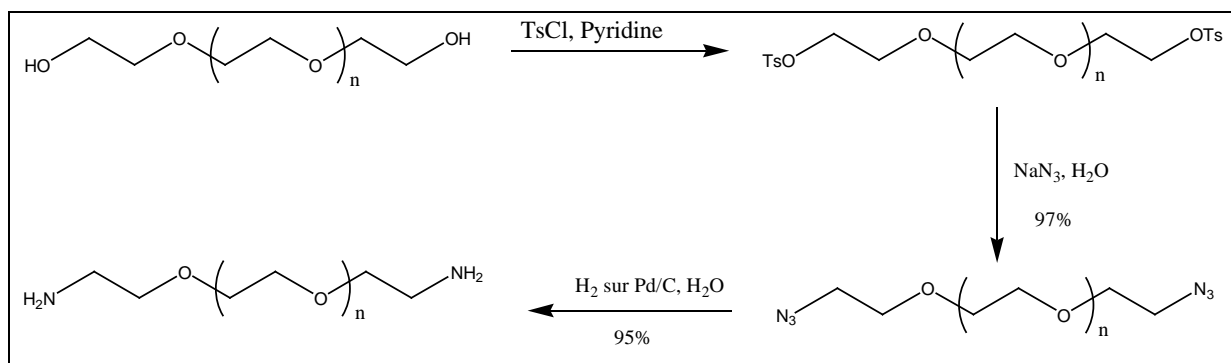


Figure 48 : Synthèse du polyéthylène 8000 diaminé

La figure 48 présente le schéma de synthèse permettant l'obtention du PEG modifié. Une tosylation dans la pyridine suivie d'une substitution nucléophile (SN2) par l'azoture de sodium permet d'obtenir le composé diazidopolyéthylène glycol avec de bons rendements. Enfin une hydrogénation en présence de palladium sur charbon aboutit au composé diaminé souhaité. Les trois réactions nécessaires pour cette synthèse sont suivies par spectroscopie IR. Cette méthode permet de voir l'apparition et la disparition du cycle benzénique du groupement tosylo (peigne entre 530 et 700 cm^{-1}) ainsi que celle du groupement azido (pic très intense à 2021 cm^{-1}).

Puisque lors du passage au couplage de l'amidon, l'échelle moléculaire visée est encore une fois différente comparativement au maltose, aux dextrans ou l'amylose, la méthode permettant de prouver le couplage est elle aussi encore une fois différente. La chromatographie sur couche mince n'est pas possible, la spectroscopie de masse non plus et la complexation à l'iode encore moins ^[83]. Ainsi, pour vérifier que le couplage est effectif, une analyse viscosimétrique Brookfield est faite pour le couplage à l'hydrazine et pour celui au PEG modifié. La valeur moyenne de la viscosité Brookfield de l'amidon natif est de 300 tandis que l'amidon couplé à l'hydrazine ou au PEG modifié donne respectivement des valeurs de 25 et de 50. Cette variation non négligeable de la viscosité indique qu'il y a bien eu modification de la structure macromoléculaire au cours de la réaction de couplage. Ce résultat est étonnant car on s'attendrait à une augmentation naturelle de la viscosité avec l'accroissement de la taille comme dans le cas des polymères linéaires, mais ce résultat doit être comparé aux propriétés particulières des polymères réticulés ; par exemple Garg et Jana ont montré qu'un amidon réticulé par l'épichlorhydrine présente une viscosité Brookfield très basse par rapport à l'amidon natif correspondant ^[83].

Ce résultat soulève de nouveau le problème de l'étude par viscosimétrie. En effet, il apparaît qu'un amidon couplé possède une viscosité Brookfield plus basse que le substrat initial. De même, il a été montré précédemment que l'amylose présente une viscosité relative supérieure à celle de l'amidon déstructuré. Dès lors que ces résultats sont étudiés dans leur globalité, ils confirment l'hypothèse posée, plus tôt dans le document, consistant à dire que la précipitation fractionnée n'est pas compatible avec une étude de viscosité qu'elle soit Brookfield ou capillaire dans le sens où elle a été menée. Il était attendu une variation vers des viscosités supérieures pour des fractions plus lourdes et/ou plus longues alors que force est de constater que tout indique que la viscosité varie dans le sens opposé.

b) Couplage par amination réductrice suivie d'une réaction de métathèse

L'un des inconvénients de la réaction d'amination réductrice est la lenteur de sa cinétique. Ainsi, pour réaliser la double amination, le temps de réaction nécessaire, dans le cadre des amidons, a été de l'ordre de la quinzaine de jours. C'est pourquoi il est intéressant de réfléchir à une voie de synthèse permettant de gagner du temps sur la deuxième amination. L'une des solutions de substitution proposée a été le couplage de produits monoéthyléniques à l'aide de la

réaction de métathèse. Cette réaction est largement utilisée pour la réaction d'allongement de chaînes par formation de liaison C=C avec le principe de ROMP (Ring Opening Metathesis Polymerisation) ou de CM (Cross Metathesis), mais la plupart de ces réactions ont été développées pour des substrats solubles en milieu organique. Les catalyseurs au molybdène de Schrock ou au ruthénium de Grubbs (première et deuxième génération) et de Hoveyda disponibles commercialement ne sont pas solubles en milieu aqueux ^[135]. C'est pourquoi il a été nécessaire de synthétiser un catalyseur capable d'être soluble et actif en milieu aqueux.

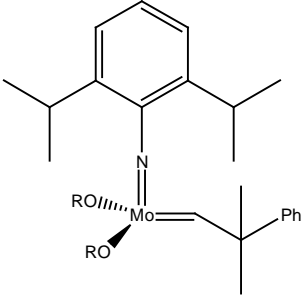
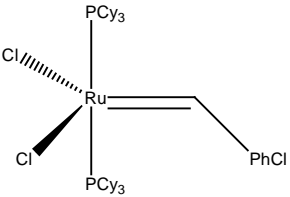
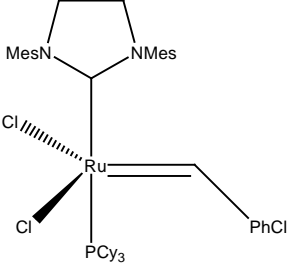
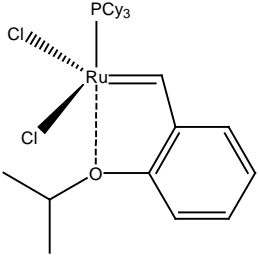
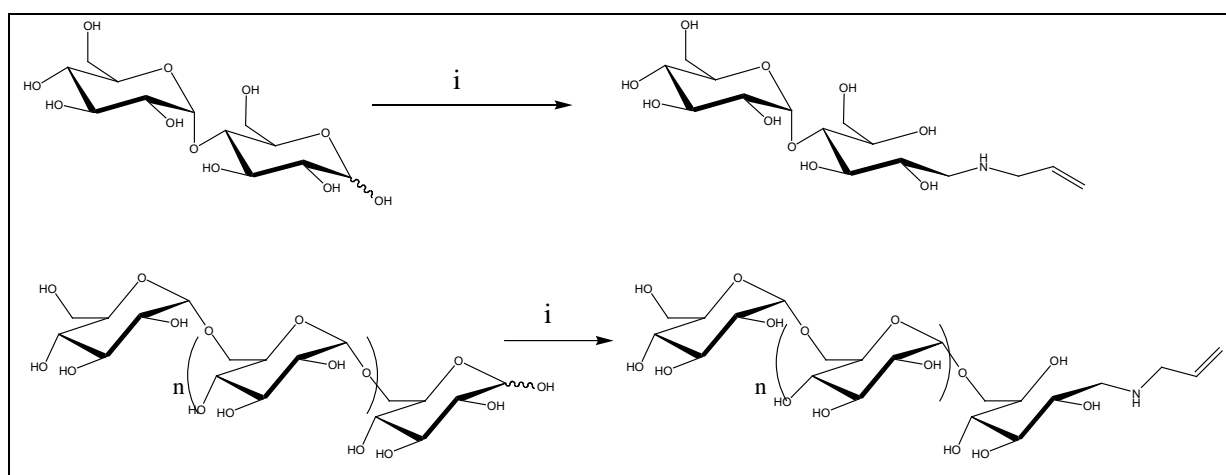
 <p style="text-align: center;">$R = C(CH_3)(CF_3)_2$</p>	Catalyseur de Schrock
	Catalyseur de Grubbs I
	Catalyseur de Grubbs II
	Catalyseur d'Hoveyda

Tableau 11 : Liste non exhaustive de catalyseurs commerciaux usuels ^[135]

a) Synthèse du dérivé éthylénique

Dans un premier temps, il faut synthétiser un intermédiaire possédant une fonction éthylénique indispensable à la réalisation de la métathèse croisée. Le groupement choisi est une allylamine. Deux substrat modèles ont été synthétisés par la méthode d'amination réductrice décrite précédemment : le 1-déshydroxy,1-*N*-allylamine maltose et un 1-déshydroxy,1-*N*-allylaminedextrane, issu du dextrane 10 KDa.



i) Allylamine, $\text{Na}(\text{CN})\text{BH}_3$, H_2O

Figure 49 : Couplage de l'allylamine sur le maltose et le dextrane 10 KDa

Le principe de la voie de synthèse envisagée est représenté sur la figure 50.

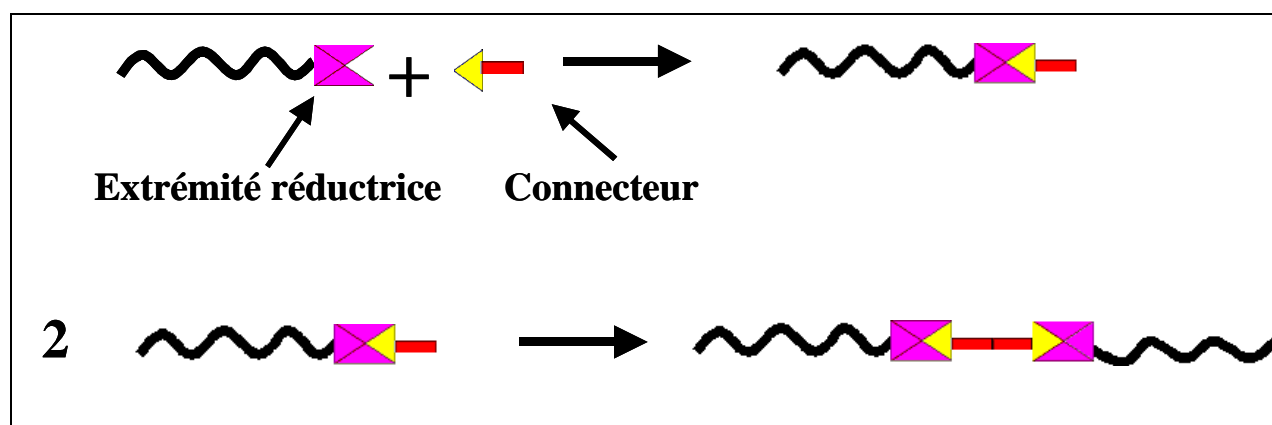


Figure 50 : Principe du couplage via une métathèse en milieu aqueux

β) Choix du catalyseur

Dans un second temps, il faut s'intéresser au catalyseur de métathèse croisée à utiliser. Grubbs^[136] a décrit un nombre important de catalyseurs efficaces en milieu aqueux. Ces catalyseurs portent des amines quaternaires favorisant ainsi leur solubilisation dans l'eau ou le méthanol. Connon et Blechert ont quant à eux greffé le catalyseur de Hoveyda de 2^{ème} génération sur une résine PEGA-NH₂ permettant également sa solubilisation en milieu aqueux^[136].

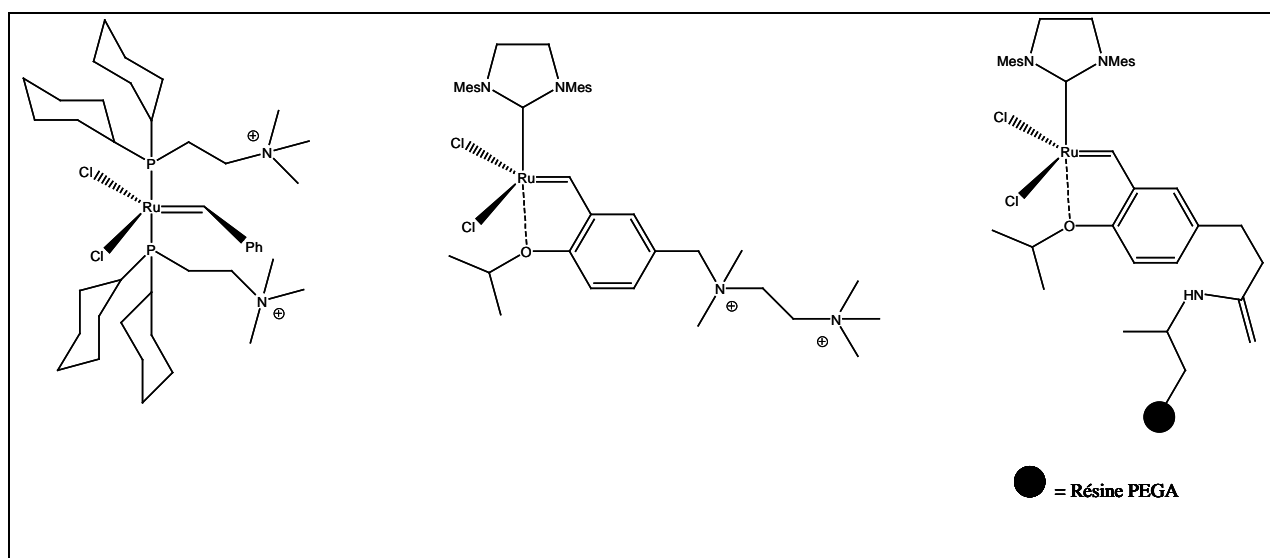


Figure 51 : Quelques exemples de catalyseurs de métathèse en milieu aqueux^[136, 137]

Ces catalyseurs n'étant pas disponibles commercialement, la synthèse du catalyseur était inévitable. Le choix de tenter la réaction avec un catalyseur original a donc été fait. Le choix s'est porté sur un catalyseur (mixant les deux structures de Grubbs et de Hoveyda) jamais décrit auparavant.

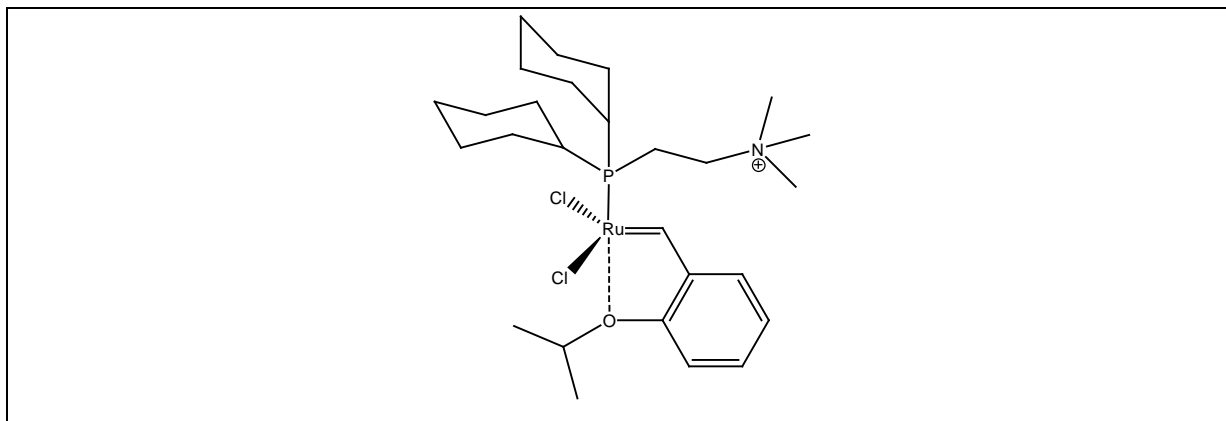


Figure 52 : Catalyseur cible

γ) Synthèse du catalyseur cible

Pour réaliser la synthèse du catalyseur cible, deux étapes de substitution de ligand sur le catalyseur de Grubbs de 1^{ière} génération sont nécessaires.

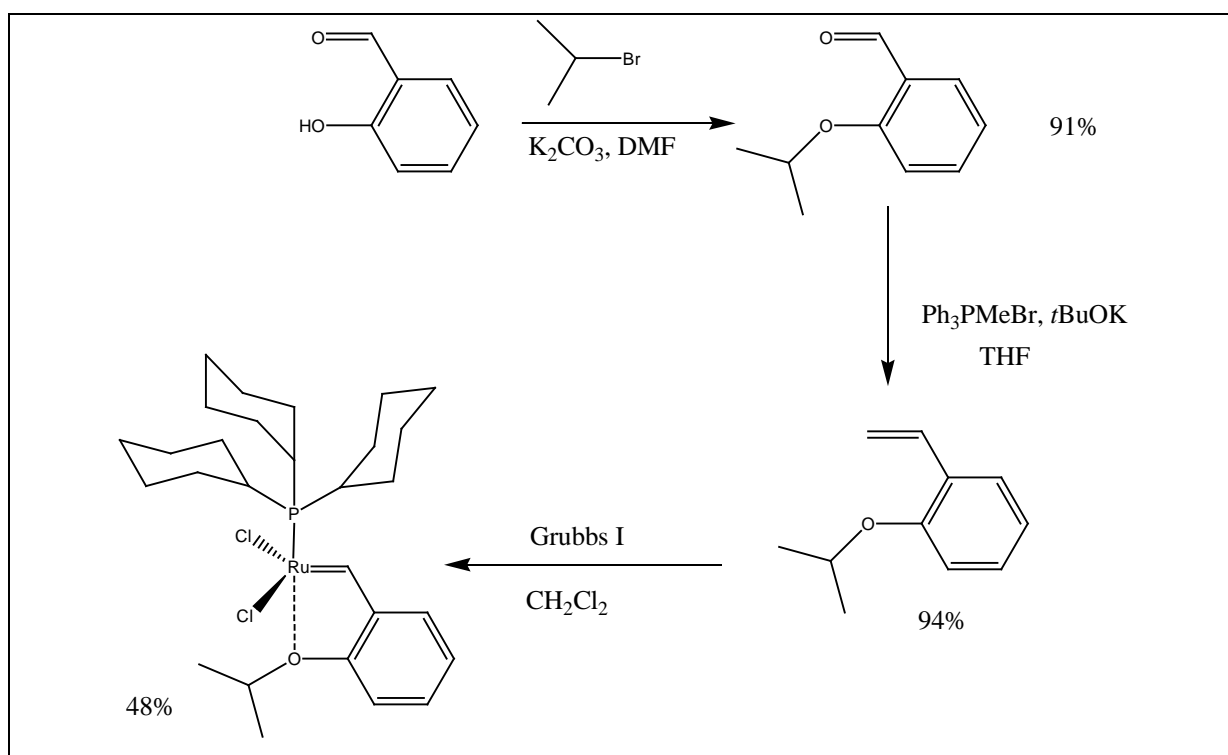


Figure 53 : Synthèse du catalyseur de Hoveyda

La dernière étape de la synthèse du catalyseur de Hoveyda ne présente pas un très bon rendement ^[138] puisqu'il ne dépasse pas 50%. Par ajout de 4 équivalents de CuCl dans le milieu, il a été possible de l'amener à 95%.

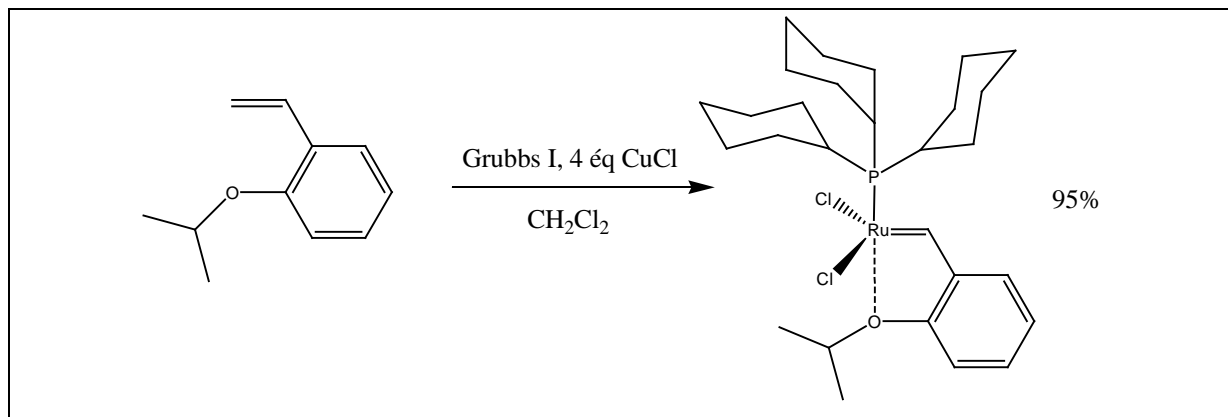


Figure 54 : Amélioration du rendement de la substitution de ligand.

Pour la dernière substitution de ligand, la méthode décrite par Mohr et collaborateurs ^[139] consistant en une substitution simple à -78°C par mise en solution dans du dichlorométhane du catalyseur de Hoveyda et du 1(dicyclohexylphosphine)-éthan-2-triméthylammonium n'a pas permis d'aboutir à la cible.

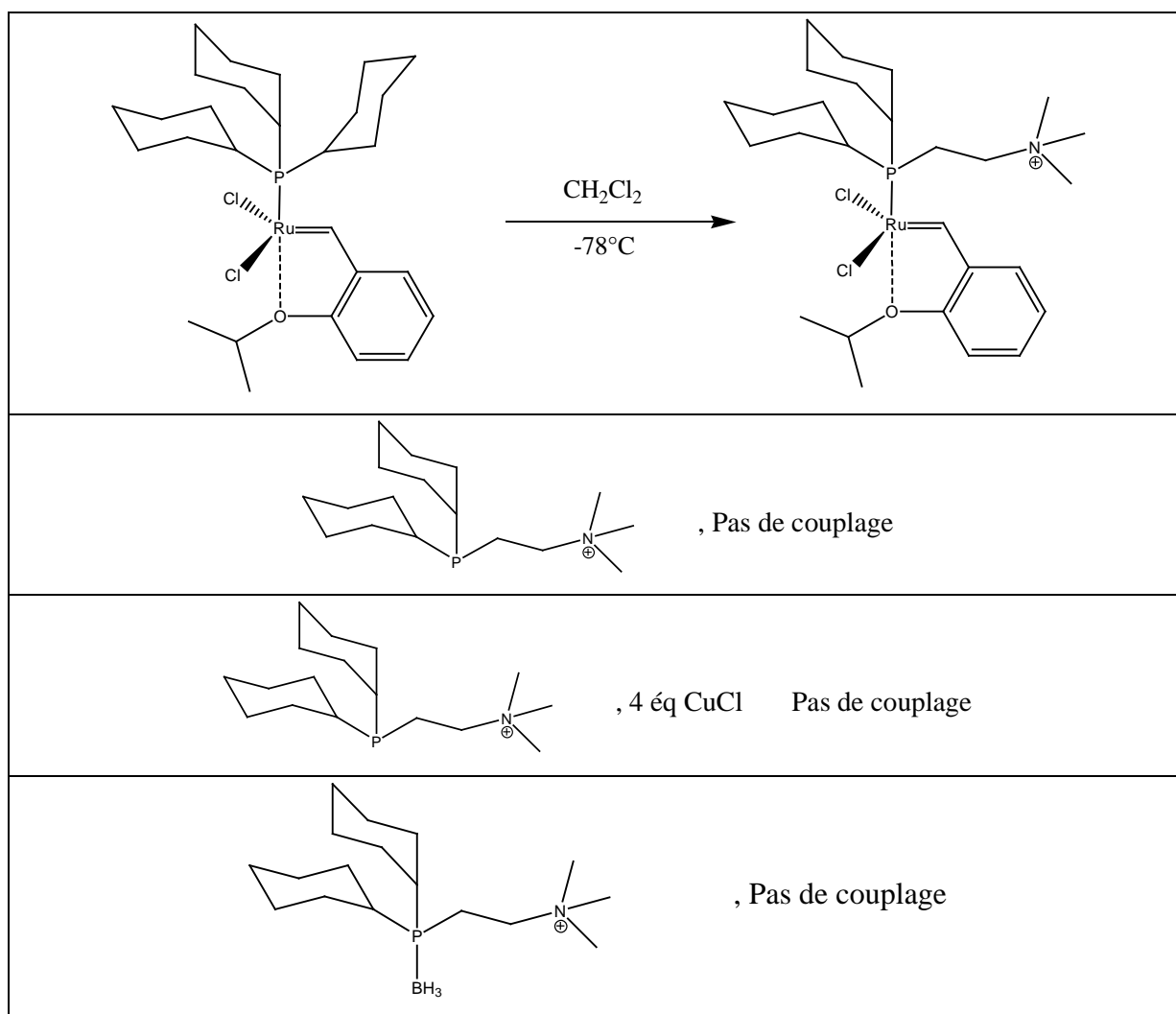


Tableau 12 : Principe de la substitution de ligand^[139] et différentes méthodes envisagées

Après de nombreuses tentatives, la substitution n'a pu être réalisée. Cette voie de synthèse n'a donc pas permis d'obtenir le catalyseur cible. L'une des voies envisagées pour réaliser cette dernière étape consiste à passer par une substitution sous rayonnement, méthode de choix pour ce genre de substitution^[140].

En conclusion de cette partie, il apparaît que la méthode initialement envisagée consistant à réaliser un couplage tête-à-queue n'a pas été réalisable du fait de la grande difficulté à différencier une extrémité non réductrice de l'ensemble des extrémités de chaînes que présente une molécule d'amylopectine. Par ailleurs, une modification de l'extrémité non réductrice engendrerait certainement plus de réticulations intramoléculaires que de réticulation intermoléculaire. Or ce genre de réticulation est totalement exclu du projet. Toutefois, le

couplage spécifique ciblé sur l'unique extrémité réductrice des chaînes par la réaction d'amination réductrice en milieu aqueux s'est montrée très efficace. L'amination réductrice a permis de synthétiser des substrats portant une fonction éthylénique destinées à être utilisée dans le cadre d'un couplage par métathèse en milieu aqueux mais les difficultés rencontrées lors de la synthèse d'un catalyseur soluble et actif en milieu aqueux n'ont pas permis l'obtention de produits couplés. La voie qui a finalement été validée est celle faisant intervenir un linker diaminé et une double amination réductrice. Cette méthode a été validée après de nombreux essais sur des molécules modèles. Le maltose a mis en évidence la chimiospécificité de la réaction sur l'extrémité réductrice d'un polysaccharide, les dextrans ont montré que la taille de l'oligosaccharide n'était pas un frein au couplage et l'amylose a confirmé que cette réaction pouvait être menée à bien sur l'un des polysaccharides présents dans l'amidon.

De ce fait, différents amidons couplés ont pu être synthétisés en quantité importante pour pouvoir être formulés afin de préparer des matériaux et en tester les propriétés mécaniques. Néanmoins, un des problèmes majeurs des matériaux amylicés est l'évolution de leurs propriétés mécaniques au cours du temps. Le vieillissement par recristallisation est un des freins à l'utilisation à grande échelle de ce type de matériaux. Il reste alors à essayer de limiter la recristallisation des échantillons au cours du temps. C'est pourquoi une étude sur l'amidon de blé non modifié a été faite.

C) Modifications par attaque enzymatique

Puisque les matériaux solides à base d'amidon ne conservent pas leurs propriétés mécaniques au cours du temps, il est important d'essayer d'empêcher ou tout du moins de limiter ce vieillissement. Comme cela a été décrit précédemment, les matériaux amylicés subissent deux types de phénomènes en fonction de la température à laquelle ils vieillissent^[38, 44]. Dans le cas présent, les échantillons étant plastifiés au glycérol dans une formulation à 20,5 et 27% en masse de glycérol par rapport à celle de l'amidon natif équilibré à 12% d'humidité, le vieillissement par recristallisation est la principale source de modifications structurales qui affectera les propriétés physiques et mécaniques des matériaux obtenus. Or cette recristallisation est due principalement aux chaînes d'amylose qui recristallisent très vite en intermoléculaire puis à l'amylopectine qui, elle, recristallise surtout en intramoléculaire^[28, 29]. Fort de cette analyse, une dégradation enzymatique ciblée et contrôlée du substrat a été mise en

œuvre afin de supprimer ou du moins de limiter la recristallisation intramoléculaire de l'amylopectine puisqu'il s'agit du composant principal. En outre, les branchements en α 1-6 étant un frein à la recristallisation ^[28], l'hydrolyse par β -amylase est toute indiquée ^[141]. En effet, avec cette enzyme non seulement l'amylopectine est « élaguée » mais sa recristallisation intra- sera limitée puisqu'elle conserve les branchements en α 1-6. Cela permet également d'éliminer toute présence d'amylose. Il sera intéressant de voir dans un premier temps l'influence qu'une telle dégradation aura sur les propriétés physico-chimiques des dextrines limites obtenues, puis dans un second temps de réaliser une étude cinétique de l'hydrolyse enzymatique et enfin de comparer la recristallisation des dextrines partielles isolées.

1) Propriétés physico-chimiques des dextrines limites

Une des propriétés importantes de l'amidon est sa très forte hydrophilie et l'on sait par ailleurs que la quantité d'eau influence la recristallisation au sein des amidons matériaux. Néanmoins, ce vieillissement par recristallisation étant majoritairement intramoléculaire, la proximité des chaînes amylopectines les unes par rapport aux autres, dans la fraction amylopectine, y contribue aussi de façon certaine. C'est la combinaison de ces deux facteurs qui peut expliquer en partie le nombre limité de débouchés industriels qu'offre l'amidon en tant que matériau. En effet, la recristallisation n'est possible que lorsque les chaînes sont suffisamment proches les unes des autres pour permettre la formation de la double hélice, mais comme décrit précédemment, la présence de molécules d'eau est essentielle à la réalisation du réseau cristallin. Ne pouvant pas empêcher la présence d'eau dans l'environnement, il s'agit d'agir sur la proximité des chaînes. C'est pourquoi l'utilisation de la β -amylase (EC 3.2.1.2) de type II.B obtenue à partir de l'orge (Sigma A 7130) est préconisée afin de réaliser la dégradation des chaînes depuis leur(s) extrémité(s) non réductrice(s) jusqu'aux branchements de type α 1-6 par élimination de maltose. Kurt Meyer ou Stanley Peat ont montré que le taux de dégradation maximum de l'amylopectine par β -amylolyse était fonction de l'origine botanique ^[141, 142] et qu'elle variait entre 55 et 62%. De ce fait une dégradation à hauteur de 50% en masse des amidons a été réalisée. Ainsi les β -dextrines synthétisées ont quasiment un taux de dégradation maximum et voient la longueur de leurs chaînes extérieures réduites de façon très nette. En outre, l'amylose, non ramifié, plus facile à hydrolyser, a été totalement digéré par l'enzyme.

La dégradation par β -amylolyse de l'amidon a été faite sur des échantillons de blé et d'ignames pour étudier la recristallisation de leur β -dextrine limite au cours du temps. Le blé sert de référence puisqu'il est couramment étudié, tandis que l'igname est utilisée de par la forte masse moléculaire de son amylopectine [95]. Dans les conditions de vieillissement choisies, 80% d'humidité relative pendant un maximum de 7 semaines à température ambiante, la recristallisation n'est pas très importante pour les amidons natifs. En effet, les deux figures ci-dessous montrent les enthalpies de fusion mesurées par DSC due à la recristallisation des échantillons initiaux et de leur β -dextrine limite.

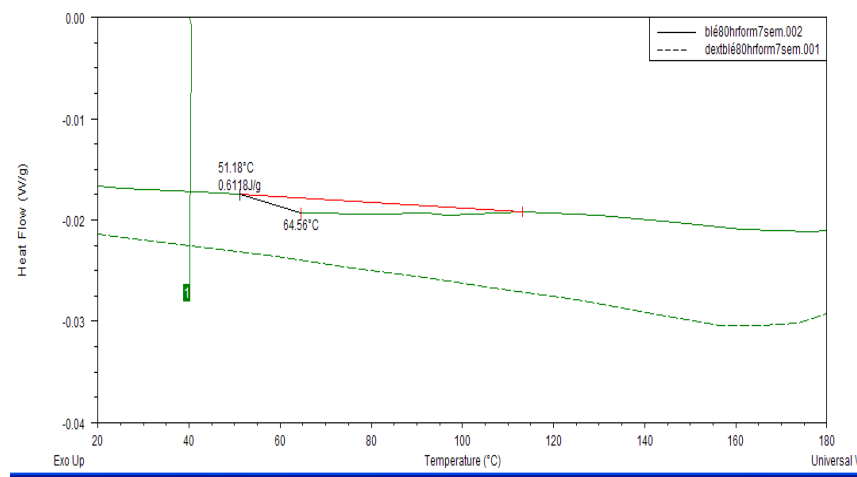


Figure 55 : Comparaison des mesures des enthalpies de fusion de l'amidon de blé formulé à 27% de glycérol et de sa β -dextrine après 7 semaines de vieillissement à 80% H.R et à température ambiante

Il apparaît nettement qu'après 7 semaines de vieillissement, l'amidon de blé présente un léger pic de fusion dont l'enthalpie est de 0,612 J/g, tandis que dans le même temps la β -dextrine limite présente une courbe bien lisse ne montrant aucun pic de fusion.

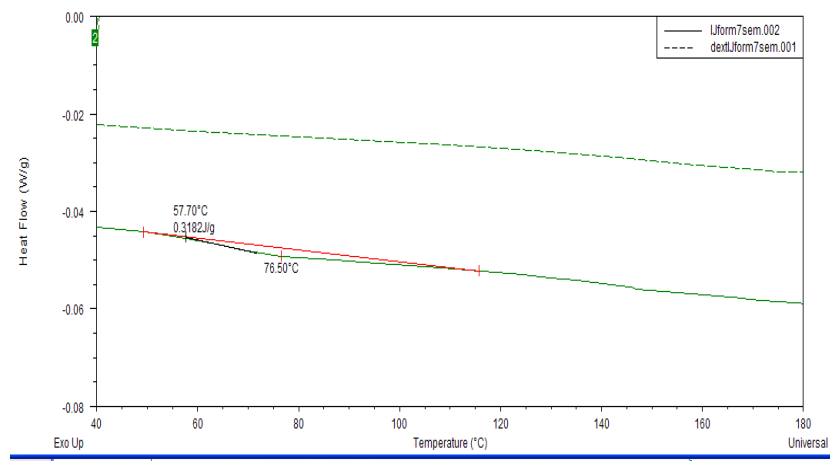


Figure 56 : Comparaison des mesures des enthalpies de fusion de l'amidon d'igname (jaune) formulé à 27% de glycérol et de sa β -dextrine après 7 semaines de vieillissement à 80% H.R et à température ambiante

Le même type de résultat se retrouve pour l'igname avec pour seule différence la valeur de l'enthalpie de fusion qui est deux fois moins importante que celle de l'amidon de blé avec une valeur de 0,318 J/g.

Il ressort globalement de cette étude que la dégradation des amidons par une hydrolyse enzymatique au moyen de la β -amylase a bel et bien permis de limiter et même d'empêcher totalement, pour au moins une période de 7 semaines, la recristallisation des amidons formulés. Certes le vieillissement des échantillons d'amidon n'est pas important dans les conditions que nous avons choisies mais la différence avec les β -dextrines limites est néanmoins bien nette, surtout dans le cas de l'amidon de blé. Il semble aussi que pour un même intervalle de temps, l'amidon d'igname ne recristallise que moitié moins par rapport à l'amidon de blé.

A la vue de ce résultat, il semble intéressant de voir si une hydrolyse correspondant à une perte de masse de 50% est rigoureusement nécessaire pour limiter le vieillissement de nos échantillons ou bien si un taux inférieur peut être suffisant pour permettre le contrôle de la recristallisation.

2) Cinétique d'hydrolyse enzymatique par β -Amylase

Pour savoir s'il est impératif de dégrader à 50% pour constater une diminution de la recristallisation de l'amidon, des β -dextrines partielles dont le taux de dégradation est respectivement de 5, 10, 20 et 30% ont été produites. Etant donné que la recristallisation est plus marquée pour l'amidon de blé que pour l'igname, l'étude a été restreinte à l'amidon de blé. La dégradation enzymatique est suivie par dosage du Dextrose Equivalent (DE) de la solution selon la méthode de Luff-Schoorl^[143, 144]. Puisque le DE mesuré est uniquement fonction de la quantité de maltose libéré, la participation au DE des longues chaînes amyliques est négligeable devant celle du maltose. Ainsi, en suivant la valeur du DE, la quantité de maltose libérée en solution est connue et de fait le taux de dégradation aussi.

a) Cinétique

La dégradation de l'amidon a été réalisée à un pH de 4,8 pour une température de 50°C et non à 20°C comme indiqué par le fournisseur, afin d'avoir une activité supérieure de la β -amylase et ainsi réduire la durée de l'hydrolyse.

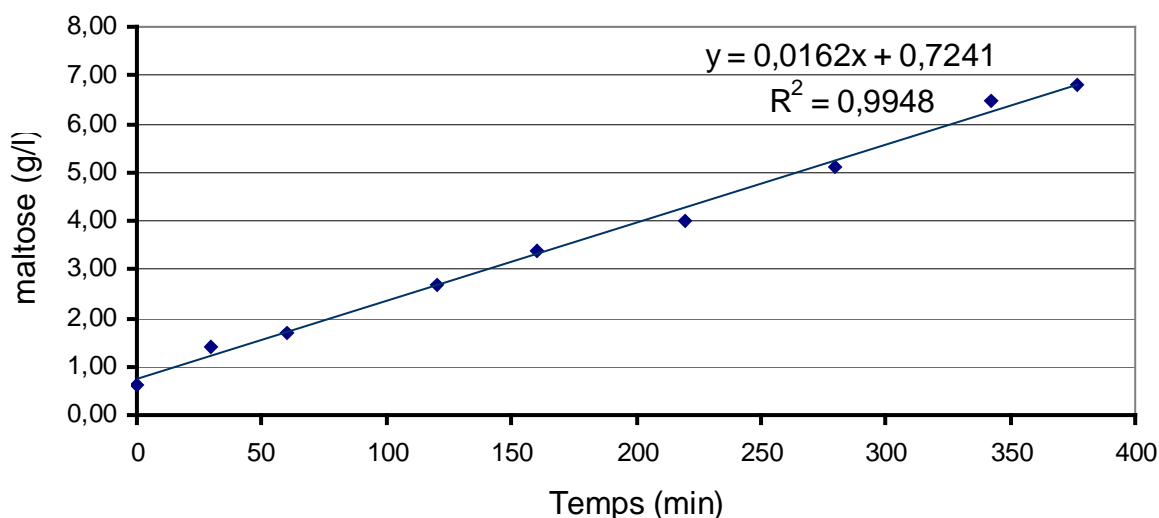


Figure 57 : Cinétique de l'hydrolyse de l'amidon de blé par β -amylase à 50°C

La figure 57 montre que la libération de maltose est linéaire au cours du temps. Il s'agit d'une cinétique d'ordre 0 ce qui permet de déterminer le temps nécessaire pour atteindre les taux de

dégradations souhaités de façon simple. Ainsi dans ces conditions d'hydrolyse, l'enzyme permet la libération de 16,2 mg/min de maltose.

Dans le tableau 13 ci-après sont rapportés les temps d'hydrolyse nécessaires à l'obtention des différentes dextrans.

Taux de dégradation (%)	Durée d'hydrolyse (min)
5	17
10	79
20	202
30	326

Tableau 13 : Durée d'hydrolyse en fonction du taux de dégradation

b) Dégradations

A l'issue de ces dégradations, il faut éliminer le maltose formé pour isoler les dextrans. Pour ce faire, l'ultra-filtration frontale agitée déjà employée dans le cadre du fractionnement des amidons est reconduite. Ainsi, sur des membranes de 10 KDa, les dextrans obtenues sont retenues.

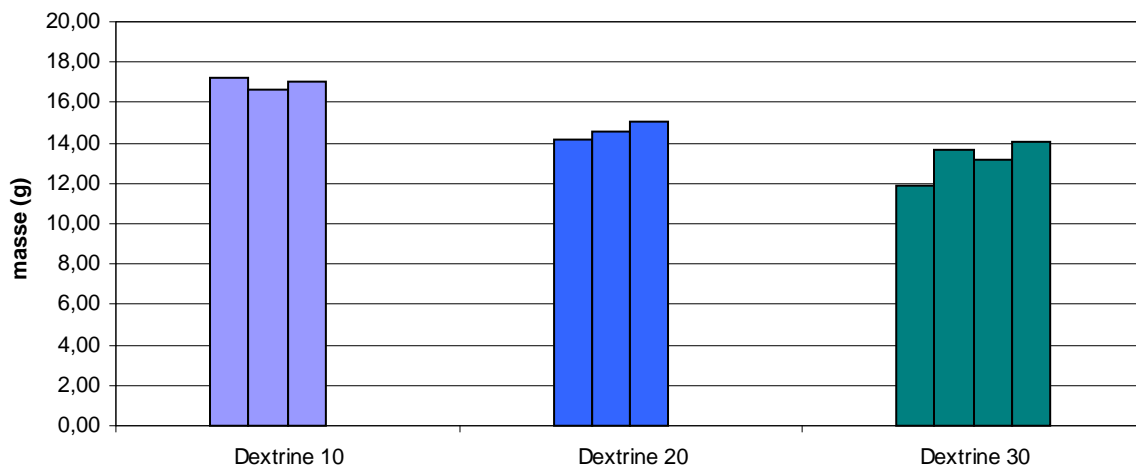


Figure 58 : Représentation graphique des masses de dextrans obtenues après une série de dégradations β -amylasiques

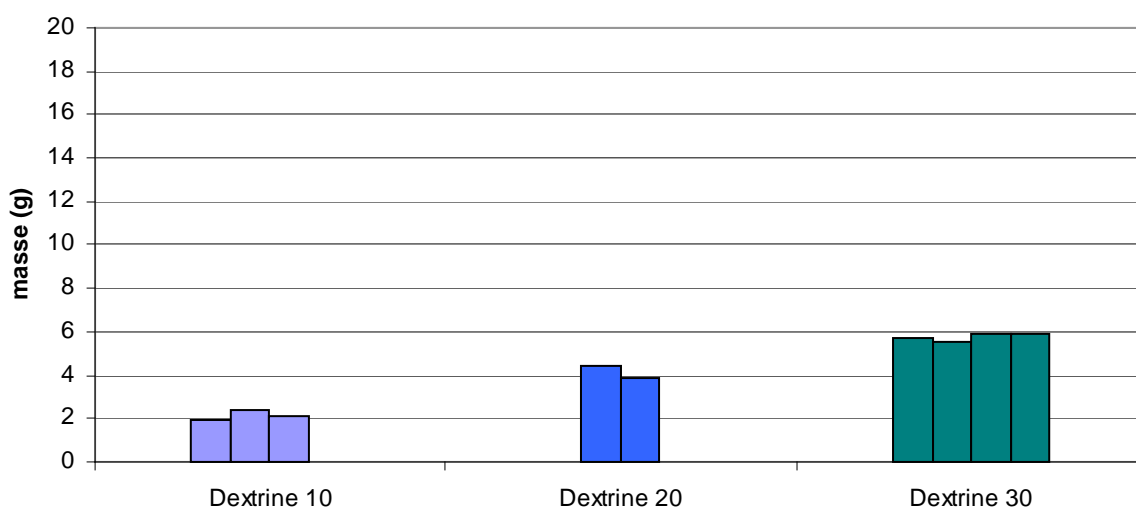


Figure 59 : Représentation graphique du maltose libéré après dégradations β -amylasiques

Lors de l'analyse de l'ultra-filtrat, un test à l'iode a dans tous les cas conduit à la coloration bleue caractéristique du complexe amylose-iodoiodure ^[145]. Cela signifie de façon certaine qu'il n'y a pas que du maltose dans le filtrat mais aussi des chaînes oligo-saccharidiques de type oligomaltosides plus ou moins longues. Une seconde ultra-filtration destinée à isoler ces « petites dextrans » a été réalisée cette fois sur une membrane de 1 KDa. Sur la figure 59 est représentée la quantité de maltose finalement récupérée et le tableau 14 dresse un bilan complet des différentes fractions isolées et pesées quand cela a été possible, après

lyophilisation. La reproductibilité des résultats des figures 58 et 59 tendent à valider la méthode utilisée.

On constate dans un premier temps que les masses de maltose obtenues sont tout à fait en accord avec les prévisions faites lors de l'étude de la cinétique de dégradation. De plus, on constate que la quantité de Fractions Oligosaccharidiques intermédiaires (FO) correspondant aux nouveaux oligosaccharides augmente avec le taux de dégradation.

% β -amylolyse	Dextrines (g)	Fractions Intermédiaires 1 < > 10 KDA FO (g)	Maltose (g)
5	18,24	ND	0,5
10	17,18	0,16	1,9
	16,63	0,16	2,4
	17,05	0,16	2,1
20	14,18	ND	ND
	14,52	ND	4,4
	15,01	0,46	3,9
30	11,92	0,96	5,7
	13,70	ND	5,5
	13,14	ND	5,9
	14,09	ND	5,9

Tableau 14 : Masse des différentes fractions obtenues après dégradation partielle par β -amylase

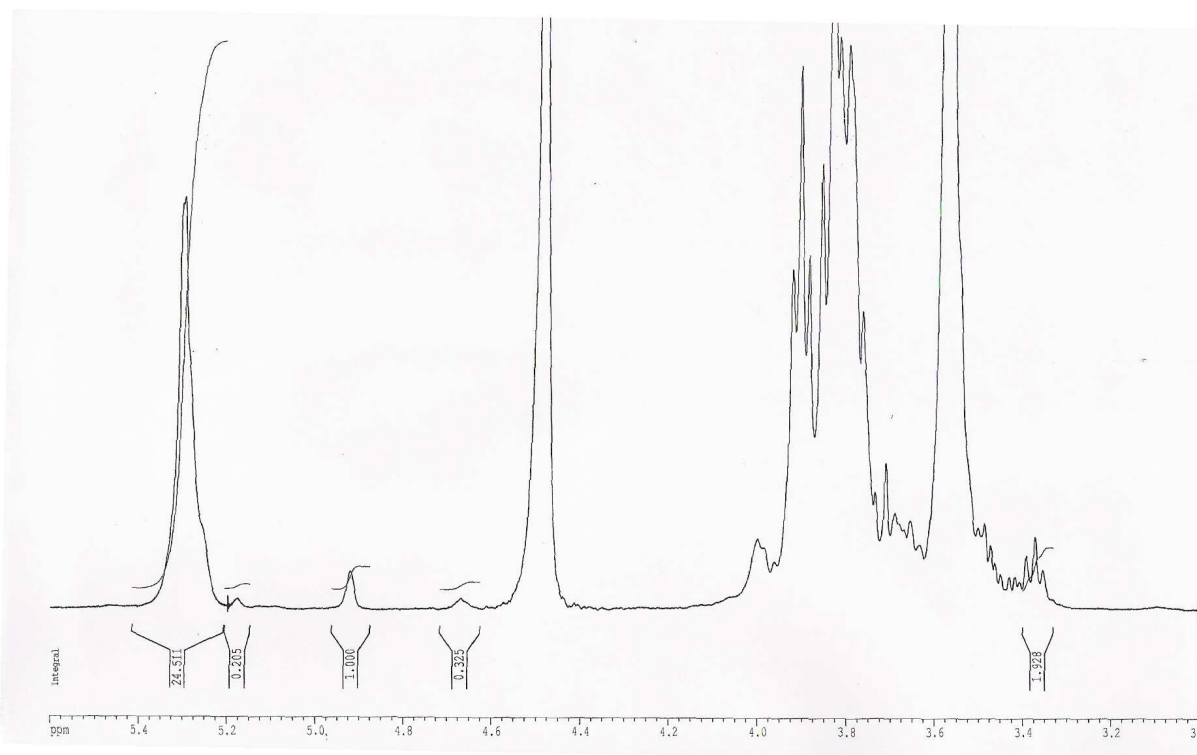


Figure 60 : Spectre RMN de la fraction FO30 ; fraction oligosaccharidique isolée entre 1 et 10 KDa après 30% de dégradation

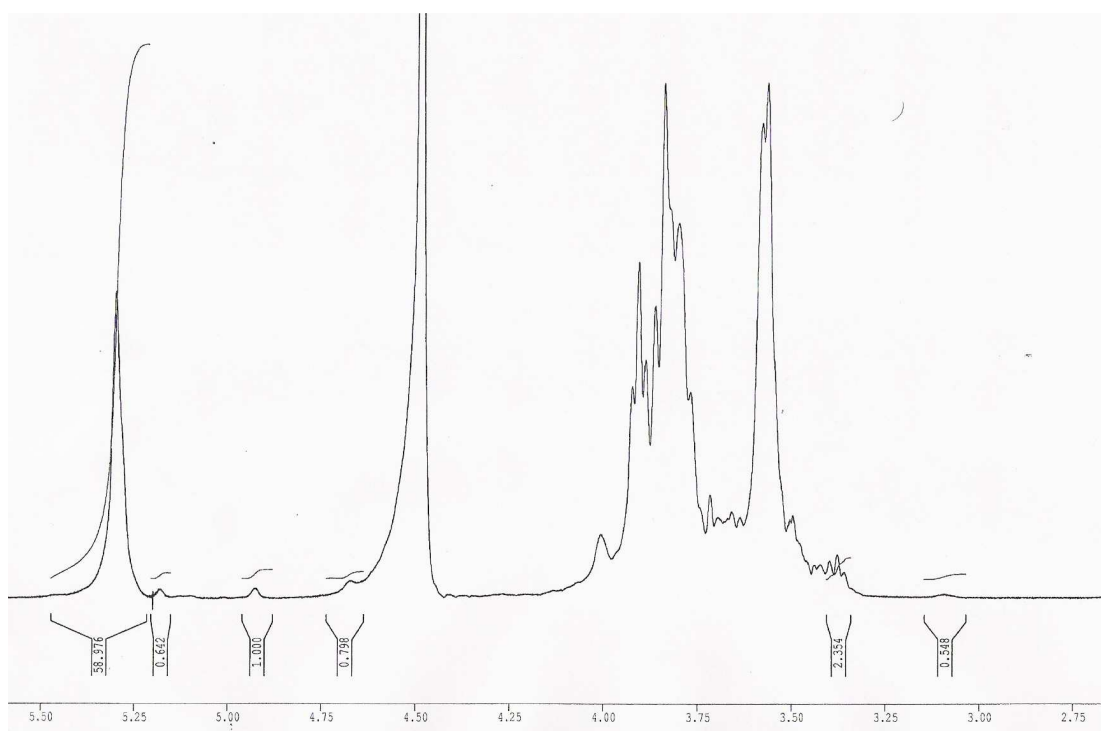


Figure 61 : Spectre RMN de la fraction FO20 ; fraction oligosaccharidique isolée après 20% de dégradation

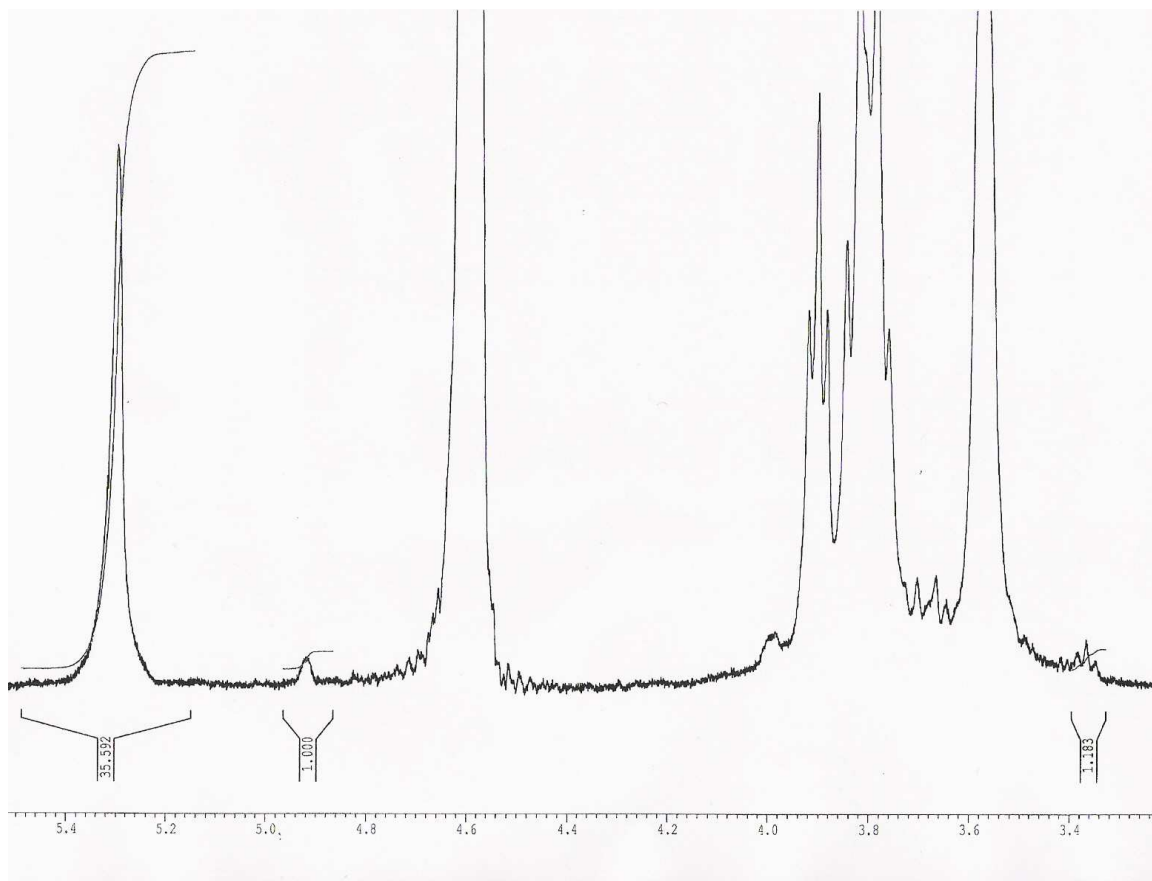


Figure 62 : Spectre RMN de la fraction FO10 ; fraction oligosaccharidique isolée après 10% de dégradation

Après spectroscopie RMN des différentes fractions d'oligosaccharides « nouveaux », une détermination du DP moyen ainsi que du taux de branchement de type $\alpha(1-6)$ (dans chacun des cas, peut être effectuée avec une précision relative de l'ordre de 10 à 20 % par l'analyse des intégrations des pics spécifiques.

Dans les spectres des fractions oligosaccharidiques FO10, FO20 et FO30 isolées après respectivement 10, 20 et 30% de dégradation présentés sur les figures 60, 61 et 62, l'analyse des intégrations relatives des pics à 4,9 ppm (correspondant aux protons portés par le carbone anomère de D-glucose des branchements liés en $\alpha(1-6)$, des pics à 4,65 et 5,2 ppm (correspondants aux protons portés respectivement en positions α ou β par le carbone anomère de l'extrémité réductrice), du triplet à 3,4 ppm (correspondant aux protons H₄ des positions 4 non-glucosylées des unités terminales non réductrices des chaînes) avec le reste des protons H-1 des unités D-glucoses intérieures indifférenciées, permet de calculer un DP moyen ainsi que le taux de branchement le nombre moyen de ramification par molécule dans chacune des trois fractions.

Dans le spectre de FO30, l'intégration comparative du pic des protons H₁ des unités α(1-4) indifférenciés à 5,3 ppm, avec leurs analogues des deux anomères de l'extrémité réductrice, permet de calculer un DP moyen proche de 50. L'intégration du pic à 4,9 ppm est égale à la somme des intégrations des pics des protons H₁ réducteurs d'une part et par ailleurs, l'intégration du triplet à 3,4 indique qu'il y a en moyenne un proton terminal de plus que de protons H₁ liés en α(1-6). Ces deux informations indiquent la présence de deux ramifications α(1-6) en moyenne par molécule ce qui correspond à un taux de branchement de 4%.

Une analyse similaire pour FO20 indique que la fraction oligosaccharidique obtenue après 20% de dégradation possède un DP moyen de 58 et ne comporte qu'un seul branchement α(1-6) en moyenne ce qui correspond à un taux de 1,7%.

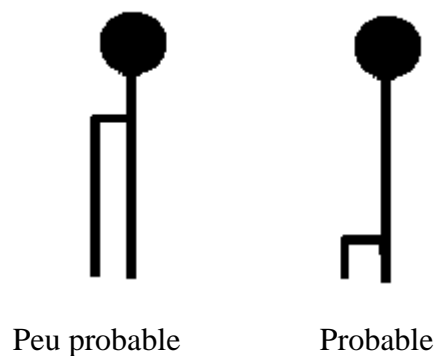
Dans le cas de la dégradation à 10%, le DP moyen de FO10 n'a pas pu être mesuré comme dans les deux cas précédents, les signaux des extrémités réductrices sortant difficilement du bruit de fond. En revanche, l'analyse de l'intégration relative des protons H₄ des terminaisons non-réductrices avec celle des H₁ des unités liées en α(1-6) et des H₁ indifférenciés indique que dans cette fraction, il y a 35 fois plus de liaisons α(1-4) que de liaisons α(1-6) ce qui correspond à un taux de branchement de 2,8%.

Il est important de noter ici que plus la dégradation est longue, plus on a d'informations sur la structure des oligosaccharides obtenus mais par contre, chaque étape de dégradation apporte des informations d'ordre différent. Pour chacune des étapes, différentes hypothèses peuvent être proposées :

- Dans le cadre de la dégradation à 10%, la β-amylase n'a pas encore pu dégrader suffisamment les petites molécules d'amylopectine. De ce fait, les protons réducteurs ne peuvent pas encore être décelés en RMN. Inéluctablement, lorsqu'il y a des branchements sur un oligosaccharide, le nombre de protons H₄ terminaux est égal au nombre de protons anomériques liés en α(1-6) plus un. Mais sur le spectre, l'intégration donne des valeurs trop proches pour que l'on puisse voir cette différence. Il est possible d'envisager alors que le DP moyen soit un multiple de celui lu sur le spectre, augmentant ainsi d'autant le nombre de branchements (l'intégration serait non plus de 1 mais de 2 pour les α(1-6) par exemple). Par la même mathématique, la différence entre le nombre de protons terminaux et le nombre de

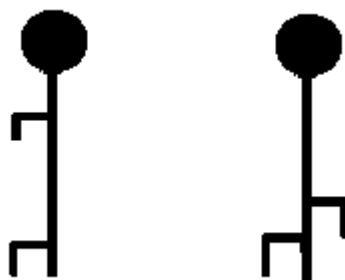
protons anomériques liés en $\alpha(1-6)$ serait plus facilement observable (l'intégration passerait alors de 1,2 à 2,4 pour les H_4 terminaux). **Si l'hypothèse que le DP moyen est en réalité deux fois celui obtenu après intégration, alors le nombre de protons H_4 terminaux indiquerait que les chaînes portent au maximum un branchement et que le DP moyen est de 70.** Ceci est en accord avec la taille des pores de la membrane de dialyse (10 KDa).

-La deuxième hypothèse concerne l'oligosaccharide issu de la dégradation à 20%. Dans ce cas, où l'oligosaccharide ne présente qu'un seul et unique branchement, on peut essayer de le localiser. Etant donné la nature de l'enzyme utilisé, une exo-enzyme, **il semble plus probable que le branchement se situe le plus proche possible de l'extrémité non réductrice.** Il se peut aussi que l'enzyme n'ait pas été capable de dégrader jusqu'au dernier D-glucose précédent le branchement et qu'il reste deux ou trois unités après celui-ci. L'hypothèse selon laquelle le branchement pourrait se trouver beaucoup plus proche de l'extrémité réductrice semble nettement moins probable.



Il est à noter également que plus le branchement se trouve proche de l'extrémité réductrice représentée par la boule, plus la longueur des chaînes sera courte pour un même DP moyen.

- Dans le cadre de la dégradation à 30%, rien ne permet de placer les deux branchements l'un par rapport à l'autre. Par contre, les quantités de matière obtenues sont cohérentes et montrent bien qu'en plus des oligosaccharides déjà obtenus depuis les 20% de dégradation, **des macromolécules d'amylopectine plus branchées, mais néanmoins de tailles relativement petites, ont été dialysées après seulement 30% de dégradation.**



Les deux types de branchements peuvent être envisagés

En outre, les analyses des complexes à l'iode de ces oligosaccharides nous informent sur une longueur de chaîne apparente pour chacun d'entre eux. Le tableau 15 montre le rapport entre le λ_{\max} mesuré et le DP du complexe linéaire correspondant pour les trois fractions FO^[9].

	FO10	FO20	FO30
λ_{\max} (nm)	545	585	544
DP apparent	39	67	38

Tableau 15: DP apparents des oligosaccharides en fonction du λ_{\max} du complexe à l'iode

On peut observer la grande proximité des résultats issus de l'analyse du complexe à l'iode et ceux obtenus par RMN. Si l'on considère que l'iode ne peut être complexé que par une chaîne exclusivement liée en $\alpha(1-4)$, l'analyse du λ_{\max} du complexe oligosaccharides-polyiodoiodure permet de supposer que l'on mesure le DP de la partie polymaltosidique linéaire entre deux branchements quand il y en a au moins deux et entre l'extrémité réductrice et le branchement lorsqu'il n'y en a qu'un seul. Cela vient aussi confirmer l'hypothèse formulée pour la dégradation à 10% et indique sans équivoque que dans le cas d'une dégradation à 30%, les deux branchements se trouvent éloignés de 38 D-glucoses en moyenne ce qui favorise le premier modèle proposé.

Enfin, des analyses par MALDI-TOF ont été réalisées sur les différentes fractions obtenues. Le spectrogramme de FO20 est rapporté en guise d'exemple sur la figure 63. Il apparaît sur la figure les amyloses dont le rapport m/z est au moins de 2000. Le pic moléculaire à 2138 correspond à un amylose monochargé de DP 13. Sur le spectrogramme, on peut lire jusqu'à la valeur 4236 correspondant à un amylose de DP 26 mais avec un agrandissement, il est possible

de voir les fractions oligosaccharidiques dont le DP est de 36 ce qui correspond à une masse molaire de 5850 g.mol^{-1} . Il n'est pas possible de voir les pics correspondant aux amyloses de DP 37 à 67 parce qu'ils deviennent trop lourds pour être ionisés dans les conditions utilisées.

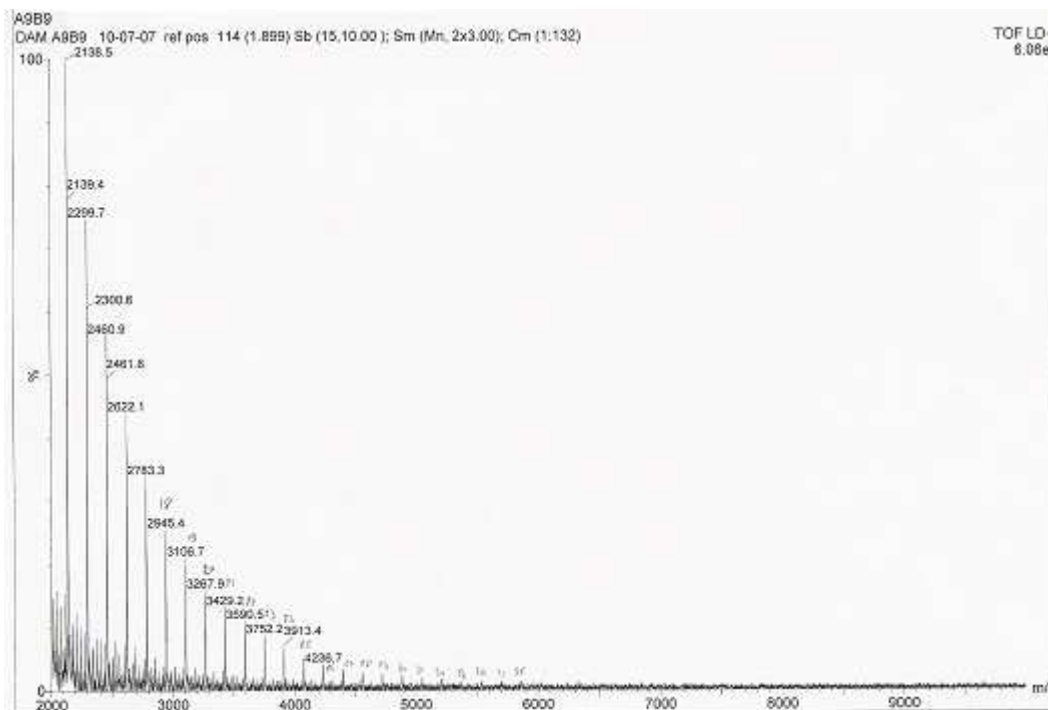


Figure 63 : Spectrogramme MALDI-TOF de FO20

3) Etude de la recristallisation des dextrines partielles

Après avoir étudié la recristallisation des dextrines limites au cours du temps et avoir observé qu'elles ne vieillissaient pas au même rythme que les amidons natifs, l'étude des dextrines partielles a pour objectif de déterminer un taux minimum de dégradation nécessaire à la limitation, voire à l'annulation d'un vieillissement par recristallisation de macromolécules issus de l'amidon de blé. Cette recristallisation est suivie par DSC mais également par rayons X.

a) Etude par DSC

Pour cette étude de la recristallisation des dextrines partielles par rapport à l'amidon déstructuré, le mode de vieillissement choisi est un vieillissement accéléré réalisé directement au sein de la capsule de DSC (Cf: matériels et méthodes). Sur les figures 64 et 65 sont

représentées les valeurs d'enthalpie de fusion ainsi que les différents thermogrammes obtenus après analyse calorimétrique.

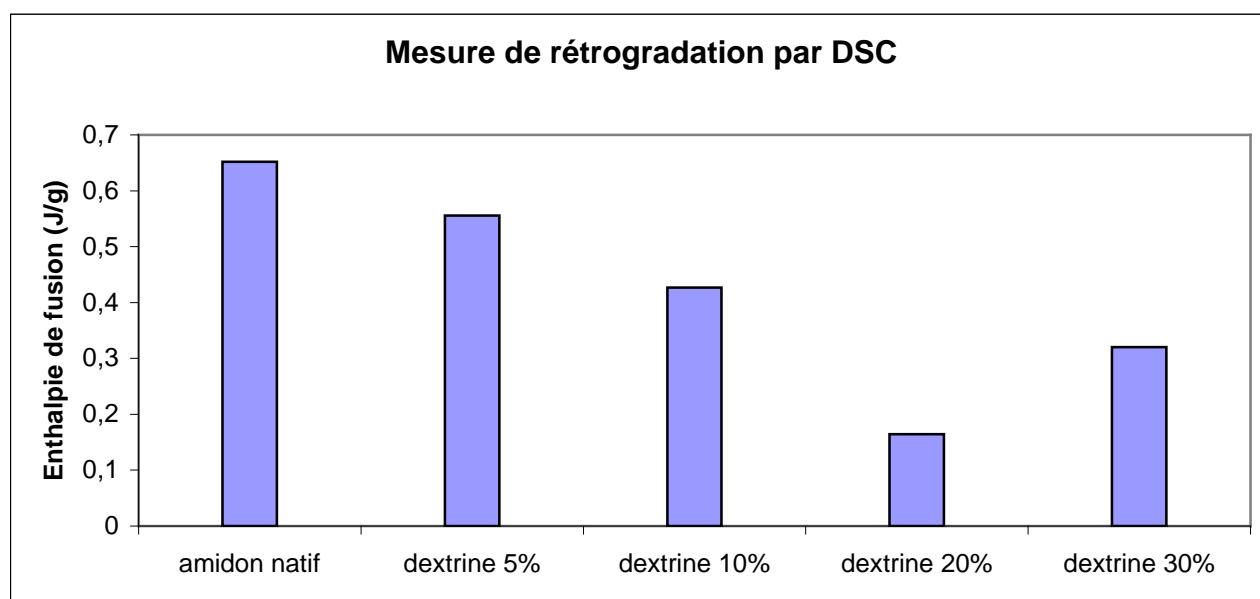


Figure 64 : Variation de l'enthalpie de fusion en fonction du taux de dégradation

Trois principales informations sont à tirer de ces figures. En premier lieu, on remarque une diminution du pic de fusion et par conséquent la diminution de la valeur de l'enthalpie de fusion lorsque l'on dégrade un amidon. La valeur de l'enthalpie est de 0,6519 J/g pour l'amidon de blé déstructuré tandis qu'elle n'est plus que de 0,1645 J/g pour 20% de dégradation. Cela confirme notre postulat de départ supposant que la dégradation limiterait la proximité des chaînes et par conséquent la recristallisation du matériau. La deuxième information que l'on peut tirer de cette étude est l'existence d'un minimum pour l'enthalpie à 20% de dégradation. En effet, il apparaît que passé 20% de dégradation l'intensité du pic augmente indiquant une cristallinité supérieure. Ce résultat était pour le moins inattendu. Il peut être supposé que passé le cap des 20% de dégradation, une certaine organisation entre les chaînes a pu se mettre en place facilitant une recristallisation. Silverio et collaborateurs ont montré par ailleurs que la valeur du ΔH était aussi corrélée au DP des chaînes d'amylopectines [146]. Toutes les longueurs de chaînes ne présenteraient pas la même influence sur la valeur de l'enthalpie de fusion des cristaux formés lors de la recristallisation. Par contre, cette cristallinité disparaît de nouveau lorsque le taux de dégradation augmente puisque l'étude par DSC des dextrines limites ne montre aucune cristallinité résiduelle.

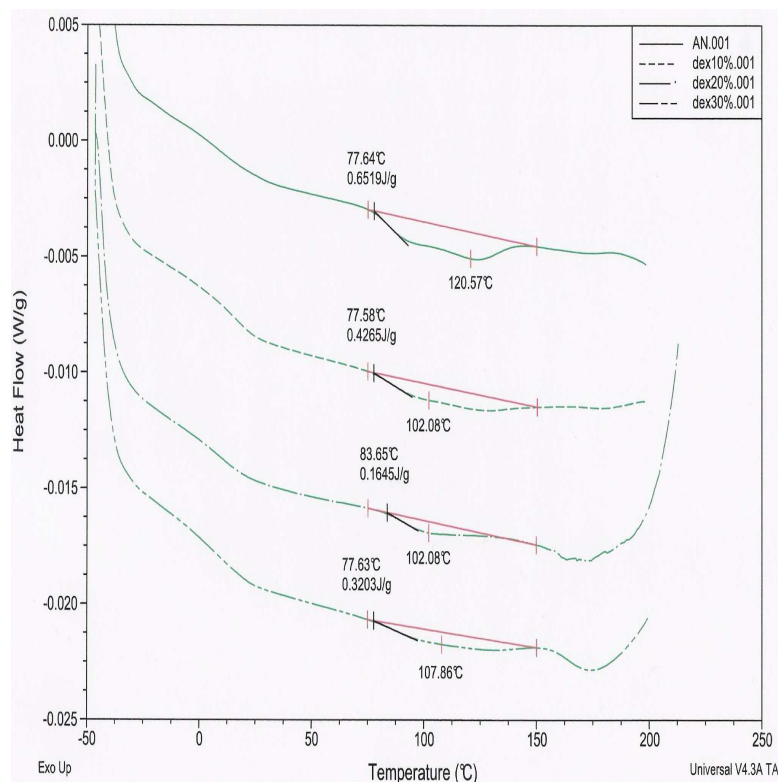


Figure 65 : Analyse par DSC de la recristallisation de l'amidon de blé et de dextrines partielles lors d'un vieillissement accéléré

La troisième information que l'on peut tirer de cette étude concerne la forme du pic de fusion. En effet, l'amidon déstructuré présente initialement une bimodalité de son pic de fusion. Il apparaît ici une disparition progressive du 2^{ième} pic (initialement à 120,57°C) tandis que le premier pic se décale lentement vers des températures élevées. Initialement ce pic sort pour une température nettement en-dessous de 100°C, tandis qu'il est de 102,08°C pour la dextrine 20%. Le cas de la dextrine à 30% est un peu particulier. En effet, deux hypothèses peuvent être envisagées. D'un côté, il peut être proposé que le pic présente une nouvelle fois une bimodalité ce qui reviendrait à dire que l'on a de nouveau ce type de cristallinité ou de cristaux au sein de la dextrine et d'un autre côté, il peut être proposé que ce pic est en fait un seul et même pic ne correspondant qu'à un seul type de cristallinité présentant un maximum pour une température de fusion de 107,86°C. Or selon Fredriksson et collaborateurs, la bimodalité des pics de fusion d'amylopectine recristallisée est due à la qualité des cristaux présents^[147]. Il est donc tout à fait envisageable que l'amidon déstructuré présente des cristaux de différentes qualités dont certains seraient plus ou moins chargés de défauts tandis que d'autres seraient plus homogènes.

En partant de ce principe, il est possible de supposer que la dégradation limite la formation de cristaux homogènes et ainsi provoque la disparition progressive du pic de fusion de plus haute température mais qu'elle n'empêche pas pour autant la formation de cristaux disparates et hétérogène, lors du vieillissement de l'échantillon. Suivant ce raisonnement, il semble plus probable que pour une dégradation à 30%, il n'apparaisse qu'un pic simple ne présentant plus de cristallinité correspondant au second pic de fusion initialement présent dans l'échantillon d'amidon déstructuré mais un ensemble totalement hétérogène de cristaux.

b) Etude par diffraction des rayons X

Pour pouvoir faire une analyse plus précise du vieillissement des dextrines, une analyse par diffraction des rayons X était nécessaire. En effet, cette méthode permet non pas de quantifier la cristallinité des échantillons comme le fait la DSC, mais donne une information sur le type de cristallinité présent. Cette analyse a été réalisée sur des substrats non plastifiés.

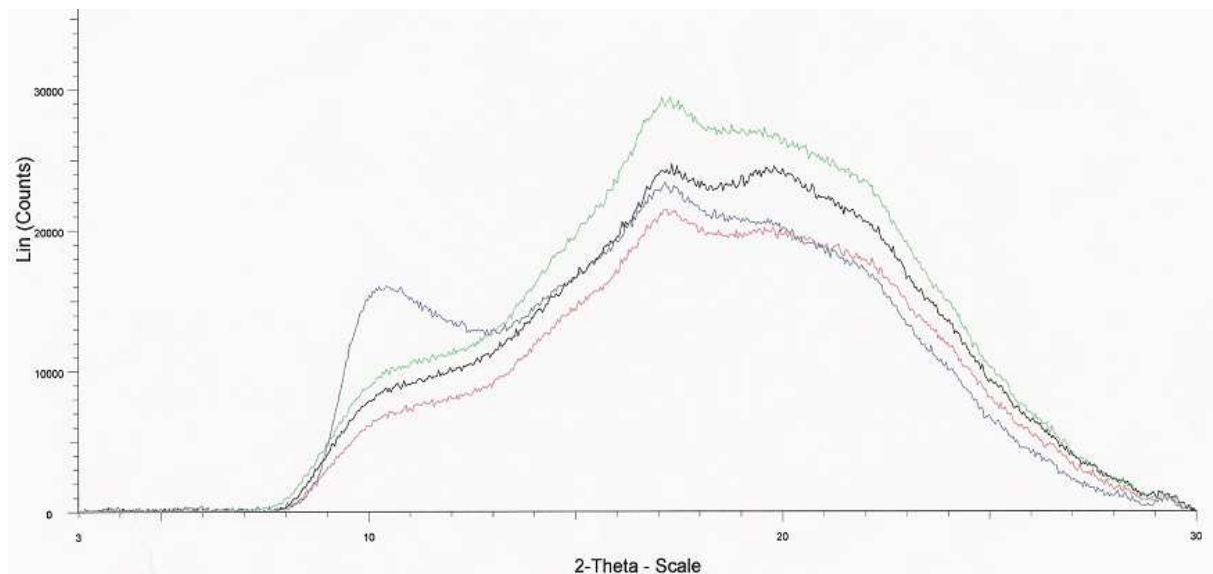


Figure 66 : Analyse par diffraction des rayons X de l'amidon de blé déstructuré (—) ainsi que de ses dextrines 10(—), 20(—) et 30%(—)

La figure 66 montre que l'amidon référence de blé et les dextrines 10 et 30% présentent des profils de diffractogrammes assez similaires. L'aspect général des diffractogrammes est de type « patatoïde » significatif d'un état amorphe très majoritaire au sein des échantillons.

Toutefois, les diffractogrammes présentent différents épaulements représentatifs d'une certaine cristallinité. Pour pouvoir faire une analyse fine de ces diffractogrammes, une déconvolution aurait permis de comparer les pics un à un, pour chacun des échantillons, mais l'appareillage ne le permettait pas. Seule une analyse globale peut donc être faite.

Il est à noter qu'avec la dégradation, le pic à 20° tend à disparaître. De plus, l'épaulement présent entre 21 et 22° semble également s'atténuer lorsque l'on passe de l'amidon natif à la dextrine 30%. Il en est de même pour le très léger épaulement visible à 15°. Par contre, la dextrine 20% présente un pic très important à 10° comparativement aux autres échantillons. Cela signifie que la cristallinité caractérisée par ce pic est très représentée lorsque l'amidon déstructuré est dégradé à 20%. Ce qui est surprenant, c'est que pour la dextrine 30%, ce pic disparaît pour de nouveau présenter l'aspect de l'amidon déstructuré ou de la dextrine 10%. Ainsi, la disparition des pics à 15, 20° et à 21-22° va dans le même sens que la disparition du pic de fusion à 120,57°C que présente l'analyse thermique. Par contre, pour l'heure aucune explication simple ne permet d'expliquer l'apparition, à 20% de dégradation, du pic important à 10° et par conséquent l'allure du thermogramme qui va avec.

L'objectif de limiter, voire d'empêcher la recristallisation des matériaux amylicés est tout à fait atteint. En effet, la dégradation de l'amidon déstructuré jusqu'à l'obtention de dextrans limites (50% de dégradation) à totalement permis la non recristallisation du produit au bout de 7 semaines. De plus, la mise en place d'un protocole original de dégradations partielles et surtout contrôlées a permis de réaliser une étude intéressante de la recristallisation de produits intermédiaires. Il apparaît que la dégradation permet une diminution progressive pour aboutir finalement à une absence totale de recristallisation pour les dextrans partielles. Il a été montré que pour 30% de dégradation, on peut diviser par deux la recristallisation du produit. Ce résultat est très intéressant car la faible enthalpie de fusion est mesurée après un vieillissement accéléré équivalent à celui observé après un vieillissement de 7 semaines à 80% d'humidité relative à température ambiante. Toutefois, le comportement de la dextrine 20% reste pour l'heure sans explication simple. L'analyse par diffraction des rayons X et celle fournie par la DSC donnent des résultats complémentaires mais ne permettent pas vraiment d'arriver à une conclusion certaine. En DSC, un type de cristallinité disparaît tandis que dans le même temps la température de fusion du pic restant augmente tandis que la diffraction des rayons X montre bel et bien une légère disparition de quelques pics mais par contre l'apparition d'un pic très important.

Conclusion

En conclusion de ce chapitre concernant la modulation de la structure de l'amidon, il est à noter qu'un fractionnement en fonction des masses molaires reste difficile, qu'un couplage tête-à-tête est réalisable à l'échelle de macromolécules telles que les amylopectines et qu'une méthode permettant de limiter fortement le vieillissement des matériaux amylicés a été mise en place.

En effet, les différentes techniques de fractionnement mises en œuvre, précipitation fractionnée ainsi que l'ultra-filtration, ont montré leurs limites. La précipitation fractionnée ne semble pas être finalement une bonne méthode dans les conditions qui ont été choisies puisqu'elle a conduit à la précipitation de fractions semblables en viscosité à l'amidon initial. Toutefois, il est apparu que le suivi par viscosimétrie n'est pas non plus la meilleure technique puisque des amidons ramifiés présentent des viscosités relatives inférieures à celle de l'amidon natif. De ce fait, comment différencier un amidon plus lourd d'une fraction de petites chaînes ? En ce qui concerne l'ultra-filtration, malgré la recherche des conditions optimales de solubilisation, il apparaît que des agrégats se forment encore en solution. De ce fait, aucune relation entre la taille des pores des membranes utilisées et celle des macromolécules ne peut être faite.

Le seul fractionnement qui a pu être fait est issu du tamisage et a donné les mêmes résultats que ceux que donnent la littérature. Les propriétés mécaniques à rupture des macromolécules issues des différentes familles de grains ainsi que la mise en relation avec la taille des macromolécules de ces mêmes grains sont exposées dans le chapitre suivant.

Puisque la sélection physique des grandes chaînes n'a pas été possible, la voie chimique a été utilisée. Il a été montré que réaliser un couplage tête-à-queue de macromolécules amylicées ramifiées reste difficile parce que la différenciation d'une extrémité non réductrice par rapport à une autre n'est pas possible. De plus à partir du moment où plusieurs extrémités non réductrices seraient différenciées par un groupement benzylidène que l'on aurait fonctionnalisé avec un dérivé éthylénique, une métathèse croisée, voie de couplage envisagée ici, engendrerait certainement des couplages intramoléculaires, totalement exclus du projet. Le couplage tête-à-tête a alors été privilégié et mis en place en milieu aqueux puisque la déprotection des sucres en milieu organique, qu'elle soit chimique ou enzymatique, et ce sans rupture de la liaison

acylglycoside n'a pas été possible. Le couplage tête-à-tête permet donc la synthèse de macromolécules dont la masse et la taille seront au maximum doublées.

La méthode de couplage via la métathèse croisée en milieu aqueux reste élégante et envisageable, mais pour l'heure la synthèse d'un catalyseur est bloquée à la dernière étape. De ce fait, la double amination réductrice a été utilisée et a permis, après de nombreux essais sur des modèles, l'obtention d'amyloses couplées ainsi que des amidons couplés. Différents agents de couplage diamminés de différentes tailles ont pu être utilisés tels que l'hydrazine, l'ortho-diaminobenzène ou la benzidine mais aussi un linker de type polyéthylène glycol modifié de masse 8000 g/mol. L'utilisation d'un agent de couplage de taille supérieure a pour objectif de rallonger encore plus la taille des macromolécules synthétisées.

Tous les produits issus du tamisage ou du couplage chimique ciblé ont dû être produits en quantité importante afin d'être par la suite formulés pour tester les propriétés mécaniques à rupture des matériaux produits.

Enfin, l'élagage enzymatique réalisé par β -amylase a permis de mettre en évidence qu'une dextrine limite ne recristallise pas au cours d'une période de 7 semaines à 80% d'humidité relative et à température ambiante. La dégradation contrôlée a également permis de montrer qu'un amidon de blé dégradé à 30% présente un pic de fusion divisé par deux après un vieillissement accéléré engendrant une recristallisation équivalente à 7 semaines à 80% d'humidité relative. De cette façon, il paraît possible de maîtriser le vieillissement par rétrogradation des matériaux amylicés.

Par ailleurs, un ensemble de nouvelles fractions oligosaccharidiques a pu être isolé mais les quantités récupérées ne permettent pas la réalisation de matériaux. Par contre, ces fractions, après analyse par RMN et complexation à l'iode, ont pu être partiellement décrites.

IV) Matériaux à base d'amidons modifiés

La méthode d'analyse qui a été choisie est l'étude des propriétés mécaniques à rupture. Cette méthode d'analyse présente l'avantage par rapport aux analyses physico-chimiques, comme par exemple l'étude de la viscosimétrie, de ne pas se contenter de donner des informations de structure mais aussi des informations macroscopiques. Par contre, concilier synthèse et tests mécaniques n'est pas chose facile du point de vue de la quantité de matière nécessaire à la réalisation de ces tests. Ceci explique le nombre plutôt limité d'échantillons testés. Les tests ont été réalisés sur des amidons naturels mais aussi, et surtout, sur des amidons préalablement modifiés. Comme décrit précédemment, les amidons naturels ont des origines botaniques variées et ont pu être travaillés en amont afin d'en sélectionner les macromolécules les plus lourdes et/ou les plus longues. En ce qui concerne les modifications, elles ont été de deux types : d'une part du rallongement par couplage chimique et d'autre part de la dégradation enzymatique. Pour la réalisation des tests de traction, il faut établir une méthode simple, reproductible et surtout engendrant le moins d'artéfacts possibles. Dans ce cadre, deux méthodes seront présentées. La première méthode consiste à tirer sur des éprouvettes découpées dans des films obtenus par casting. Cette méthode a uniquement été utilisée pour étudier les propriétés mécaniques à rupture des amidons natifs ainsi que celles de leur dextrine limite respective. La deuxième méthode consistant à réaliser le test de traction sur un jonc obtenu par extrusion du matériau a quant à elle été menée sur tous les amidons. Ainsi, les amidons couplés ont pu être comparés aux amidons dégradés et aux amidons natifs. Dans les deux cas, il s'agit de tirer sur le matériau préalablement formulé au glycérol (27% pour les matériaux « castés » et 20,5% pour les extrudés). Toutefois, la mesure des propriétés mécaniques à rupture par simple traction sur un fil n'étant pas communément utilisée, dans chacun des cas présentés, une étude préliminaire sur la pertinence et la reproductibilité de la mesure sera proposée.

Ainsi dans ce chapitre, seront tout d'abord présentés les résultats des tractions réalisées sur les amidons naturels (amidons natifs et leur dextrine limite) puis dans un deuxième temps sur les amidons modifiés (amidons ayant subi une modification autre qu'une dégradation limite). Les différentes études présentées ont pour objet la différenciation des propriétés mécaniques à

rupture en fonction de l'origine botanique, du taux de dégradation, du couplage chimique et enfin l'impact, pour quelques échantillons, du vieillissement sur ces propriétés.

A) Amidons natifs et dextrines limites

Dans cette première partie, ne seront abordés que les travaux effectués sur les amidons natifs et leur dextrine limite. En effet, dans un premier temps, il nous a semblé nécessaire de faire une étude des propriétés mécaniques des amidons en fonction de leur origine botanique. Dans un second temps, l'étude des propriétés mécaniques des dextrines limites des amidons sélectionnés nous a permis de voir dans quelles mesures une dégradation enzymatique pouvait influencer les caractéristiques mécaniques d'un amidon. En effet, l'analyse par DSC du vieillissement (Cf Chapitre III) a montré, dans les conditions choisies, que la rétrogradation des dextrines limites était supprimée pendant au moins 6 semaines.

1) Propriétés mécaniques des amidons natifs et de leur dextrine limite

Partant du principe qu'un amidon possédant de longues chaînes avait des chances d'avoir des masses molaires élevées, une étude des masses molaires des amyloses et des amylopectines de quelques amidons choisis a été faite. En fonction de l'origine botanique, des différences ont également été notées quant au rayon de giration des molécules d'amylose, d'amylopectine et plus généralement de l'amidon. Comme cela est présenté dans le tableau 8 (Chap III. A. 1) trois amidons classiques (blé, pomme de terre et maïs cireux) ainsi que trois amidons moins traditionnels ont été étudiés (le manioc et deux ignames différents). Globalement il est apparu que les amidons d'igname présentaient de fortes masses molaires par rapport aux amidons classiquement étudiés, tandis que l'amidon de manioc ne semblait pas, *a priori*, être un bon candidat de par la très forte masse molaire de son amylose. Après avoir réalisé des films par casting de blé, de manioc et de deux ignames, tous plastifiés à 27% de glycérol, les tests de tractions ont été faits sur des éprouvettes de traction. Un taux de 27% de glycérol peut paraître important pour des matériaux amylicés mais les amidons sélectionnés possèdent *a priori* de longues chaînes, il semble opportun de se placer à un taux élevé de plastifiant par rapport à ce qui a pu être décrit dans la littérature (voir II. 2 et les figures 18 selon Follain et collaborateurs^[56] et 19 selon Lourdin et collaborateurs^[63]). Il est à noter par ailleurs que les deux ignames qui

ont été testés ne sont pas les deux ignames sujets de l'étude réalisée dans le chapitre III. En effet, il n'a pas été possible de se procurer les cultivars Kangba et Esculenta mais deux ignames commerciales dont le cultivar n'était pas connu avec précision. Les résultats des tests effectués sur ces échantillons sont rapportés sur la figure 67.

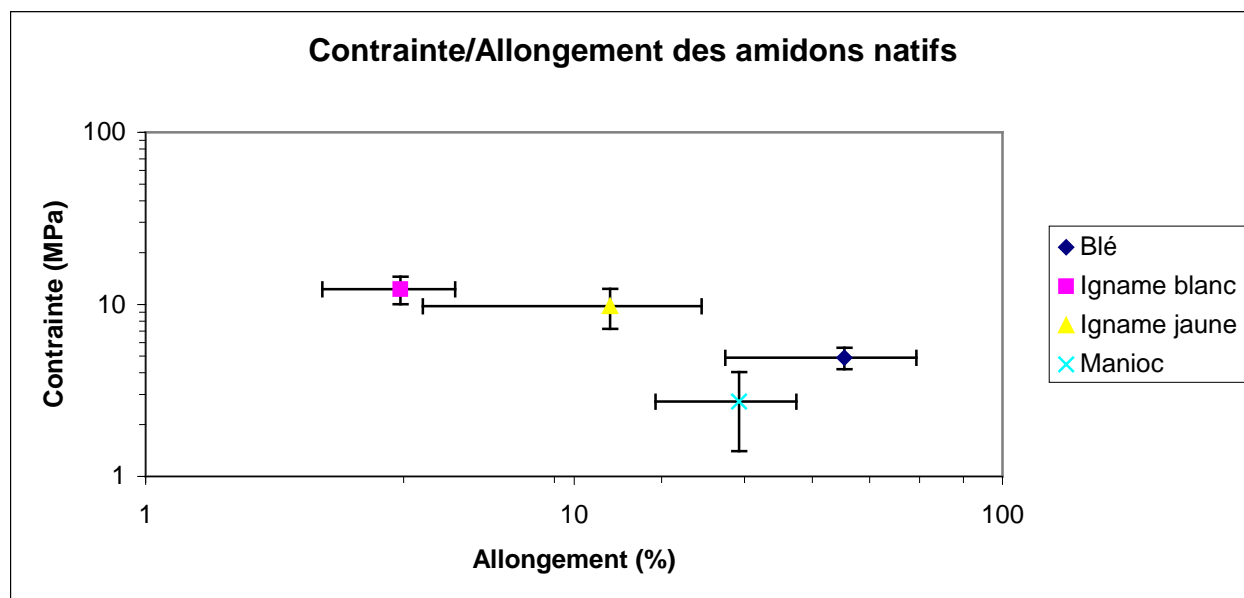


Figure 67 : Contrainte/Allongement de différents films d'amidons natifs plastifiés à 27% de glycérol

Différentes observations peuvent être faites à partir de la figure 67. Tout d'abord, il apparaît que malgré un taux important de glycérol, les propriétés des amidons se situent bien en deçà de celles présentées par Follain et collaborateurs ^[56] dans la figure 18 et par Lourdin et collaborateurs dans la figure 19. Il est important également de noter la différence existante entre les deux types d'ignames. Pour des contraintes relativement proches (9,77 et 12,26 MPa) la différence en ce qui concerne l'allongement est tout à fait remarquable. Il y a jusqu'à un facteur 3 entre l'allongement de l'igname blanc (2,9%) et l'igname jaune (9,17%) lorsque ne sont considérées que les valeurs moyennes. Lorsque les écarts types sont pris en compte, la différence existe toujours mais elle est moins marquée. L'autre élément à noter est que les propriétés de ces deux ignames restent dans la zone des amidons de tubercules tandis que les résultats concernant le manioc en sont complètement exclus. Le film de manioc présente des propriétés très faibles tant en contrainte, 2,72 MPa, qu'en allongement, 18,33 %.

Toutefois, il est important de signaler que la méthode de casting a ici montré ses limites. En effet, déjà pour les ignames mais surtout dans le cas du film de manioc, la solubilité des amidons n'était pas parfaite. Lors de la mise en œuvre des films, la gélatinisation sous haute pression et haute température se fait sans difficulté majeure mais lors de la phase de séchage est apparu un très grand nombre d'insolubles. Cette caractéristique s'est présentée pour les deux ignames mais dans des proportions beaucoup plus importantes dans le cas de l'amidon de manioc. Cette hétérogénéité de composition des éprouvettes de traction se répercute sur les propriétés de chaque échantillon et est visible sur le graphique par les grandes valeurs d'écart type de l'allongement. Les valeurs de contrainte sont quant à elles moins influencées par la présence de défauts. Ce phénomène n'était pas prévisible mais n'est pas finalement surprenant, et il est même intéressant. Rien ne pouvait laisser penser que par casting, la réalisation de films serait difficile mais, dans le même temps, l'utilisation de matériels présentant des macromolécules de fortes masses molaires implique inéluctablement une diminution de la solubilité de ces macromolécules et conforte le choix des amidons sélectionnés. De ce fait, ces films présentant des insolubles sont donc hétérogènes vis-à-vis de la répartition des molécules sur toute la surface du film. De plus, pour réaliser des tests de traction cohérents et reproductibles, il était essentiel de découper des éprouvettes dans des zones présentant le moins de défaut possible susceptible d'engendrer des artefacts et des ruptures précoces. Il apparaît alors que les éprouvettes testées ne seraient peut-être pas celles possédant les macromolécules les plus longues et par conséquent, les plus intéressantes vis à vis de l'objectif visé. C'est pourquoi, dans un premier temps, il n'a pas été choisi de changer de méthode d'obtention de matériaux mais plutôt de limiter l'étude aux amidons de blé et d'ignames.

N'ayant pas d'amidon de pomme de terre rapidement disponible, l'amidon de blé a été le seul amidon utilisé comme référence, bien qu'il s'agisse d'un amidon de céréales. Après avoir testé les amidons natifs, les dextrines limites de blé et des deux types d'igname ont été soumises aux tests de traction. L'objectif est de voir si la dégradation en elle-même permet de modifier de manière significative les propriétés mécaniques. La figure 70 présente les résultats des tests de traction réalisés sur les dextrines limites de blé et d'igname après quelques jours à 50% d'humidité.

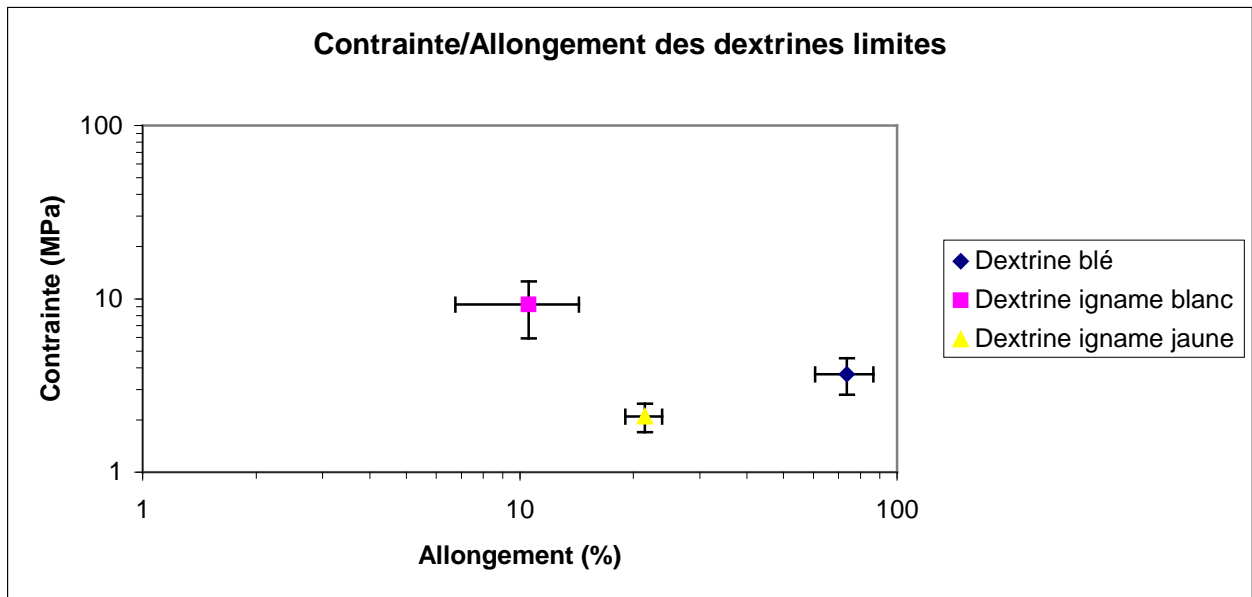


Figure 68 : Propriétés mécaniques à rupture de films plastifiés à 27% de glycérol de dextrines limites

Trois observations peuvent être faites à partir de la figure 68 :

- Dans un premier temps, il est clair que la dégradation limite par β -amylolyse permet un gain non négligeable en allongement quelle que soit l'origine botanique de l'amidon. Pour le blé et l'igname jaune, un gain de 75% est obtenu et il s'élève à 170% pour l'igname blanc. Dans le même temps, pour les trois échantillons, une diminution de la contrainte est observée. Pour le blé et l'igname blanc, la diminution s'élève à 25% tandis qu'elle est de 79% pour l'igname jaune.

- D'autre part, l'incertitude que représente l'écart type, donné sur la figure, est nettement inférieure à celle qui a pu être mesurée dans le cadre des amidons de référence. Cela traduit une plus grande homogénéité des films obtenus. Ils présentaient beaucoup moins d'insolubles, ce qui permet par ailleurs l'utilisation d'une plus grande surface des films produits (donc un plus grand nombre d'éprouvettes) pour la réalisation des tests. Cette observation permet également de dire que la dégradation enzymatique a été effective puisqu'un gain en solubilité a été observé.

- Enfin, il est important de noter qu'une diminution de la contrainte et une augmentation importante de l'allongement va exactement dans le sens de ce qui était préalablement supposé. La digestion majoritaire de l'amylose et l'élagage de l'amylopectine permet aux chaînes enchevêtrées de beaucoup mieux coulisser les unes par rapport aux autres.

La figure 69 permet par la superposition des résultats de traction des amidons natifs et de leur dextrine limite de visualiser l'impact de « l'élagage enzymatique » effectué par la β -amylase.

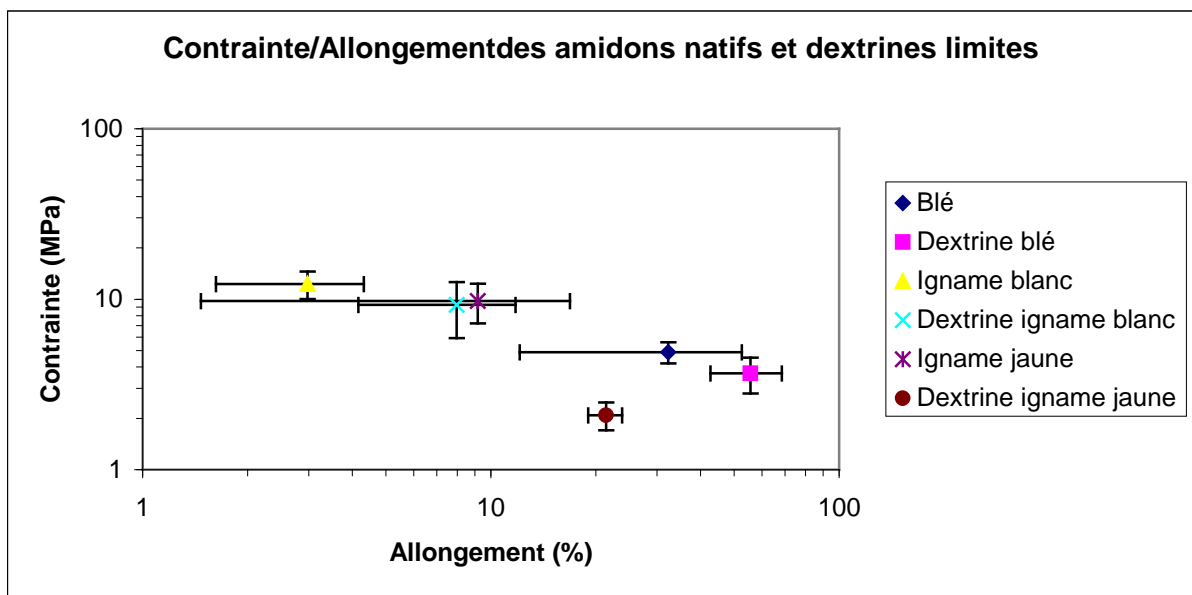


Figure 69 : Graphique récapitulatif des propriétés mécaniques à rupture des amidons natifs et de leur dextrine limite

Il est intéressant de noter ici que les dextrans de blé et d'igname blanc restent dans les domaines de propriétés des amidons dont ils sont issus. En effet, la dextrine d'igname blanc garde une valeur de contrainte importante pour un allongement faible tandis que la dextrine de blé possède un allongement important pour une contrainte relativement faible. Seule la dextrine d'igname jaune sort assez nettement de la zone de propriétés de son amidon de référence.

2) Etude comparative du vieillissement d'un amidon natif et de sa dextrine limite

Après l'étude des propriétés intrinsèques des amidons de référence et de leur dextrine limite, il ressort que l'élagage enzymatique a un impact plus marqué sur la dextrine d'igname jaune que sur celle de blé et d'igname blanc. C'est pourquoi l'étude comparative de vieillissement entre la dextrine limite et son amidon de référence a été faite sur l'igname jaune.

Lors de cette étude, deux films d'amidon d'igname jaune et de dextrine d'igname jaune sont maintenus à 80% d'humidité et à température ambiante dans une boîte à gants. Le vieillissement a été réalisé pendant au maximum 6 semaines. Ces conditions de vieillissement accéléré ont permis de quantifier, d'un point de vue mécanique, les différences déjà observées par analyses thermiques. Sur la figure 70 sont représentées les propriétés mécaniques de la dextrine limite pour $T=T_0$, 1 semaine, 3 semaines et 6 semaines.

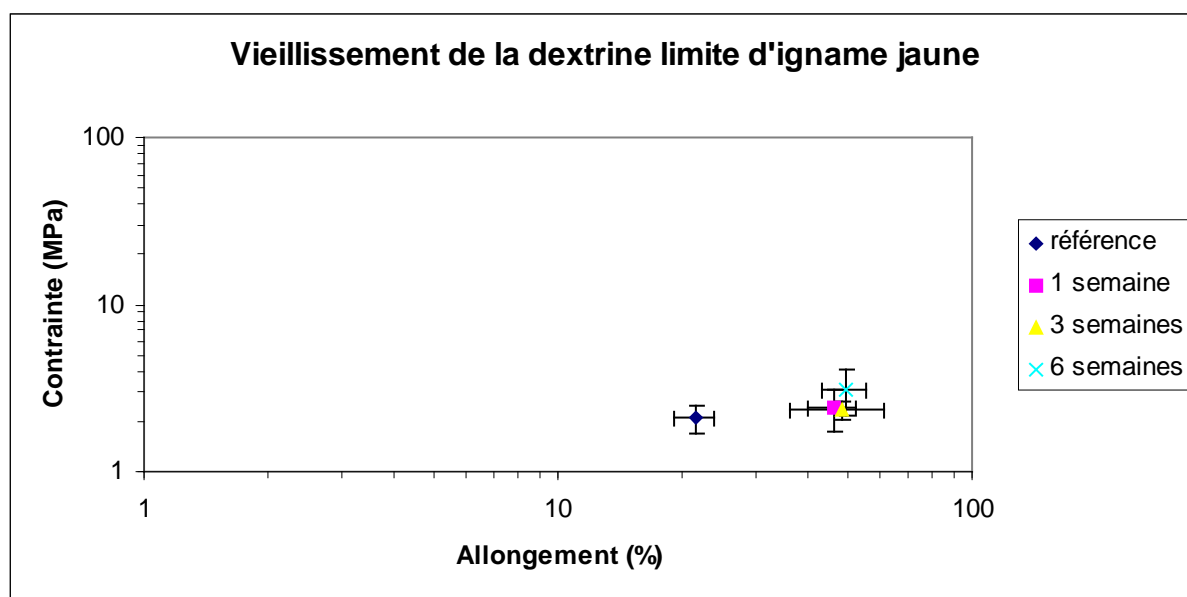


Figure 70 : Propriétés mécaniques après vieillissement accéléré à 80% d'humidité relative de la dextrine limite d'igname jaune

Le résultat intéressant de cette étude réside dans le fait qu'entre la première et la sixième semaine, les valeurs de contrainte et d'allongement restent dans le même ordre de grandeur. Cela indique donc clairement que les dextrines d'igname jaune n'ont pas subi de vieillissement. Ce résultat confirme ce que l'étude par DSC avait montré. Toutefois, il est à

noter l'écart de propriétés observé avec la dextrine de référence. En fait, la référence n'a pas été portée à 80%. Elle n'a été équilibrée qu'à 50% d'humidité relative et donc a été légèrement moins plastifiée. Les dextrines vieilles ont, quant à elles, subi le vieillissement à 80% d'humidité relative avant d'être rééquilibrées à 50% pour ensuite être testées.

La dernière information que donne ce graphique est la faible valeur des écarts types que présentent les résultats. Cela traduit une nouvelle fois que, pour les dextrines limites, la reproductibilité des mesures est bonne et que le vieillissement a été homogène sur les différents échantillons.

La figure 71 superpose les résultats du vieillissement du matériau d'igname jaune et celui de sa dextrine limite.

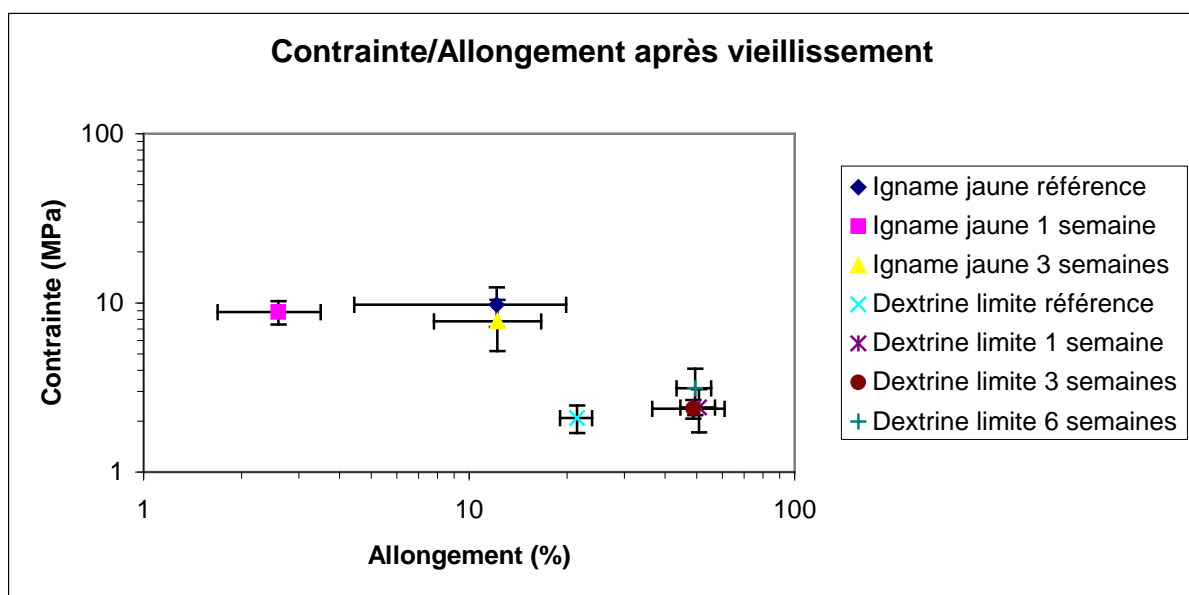


Figure 71 : Etude comparative des propriétés mécaniques des matériaux d'amidon natif d'igname jaune et de sa dextrine limite après vieillissement

Dans un premier temps, il apparaît que les propriétés mécaniques de l'amidon d'igname de référence sont nettement plus modifiées au cours du temps que celles de sa dextrine limite. Or l'amidon d'igname dont les propriétés de contrainte et d'allongement se situent dans la zone de 10 MPa pour 10 % d'allongement, devrait être moins sensible au vieillissement que la dextrine. En effet, si le matériau présente une faible contrainte pour un fort taux d'allongement, comme

c'est le cas pour la dextrine limite, l'impact du vieillissement devrait être plus visible. Ici c'est l'inverse qui se produit. Deux informations peuvent être tirées de cette observation :

- il était important de faire des films références pour pouvoir comparer les résultats obtenus mais la mauvaise qualité de ces films vient perturber cette analyse. Néanmoins, le fait que les films soient de mauvaise qualité est aussi un résultat en soi. En effet, initialement nous voulions utiliser une source d'amidon possédant de fortes masses molaires et la présence d'insolubles dans les films confirme que l'amidon d'igname était un bon candidat à l'élagage enzymatique.

- les propriétés mécaniques à rupture de la dextrine limite permettent de dire que le matériau ne subit pas le phénomène de vieillissement par rapport à son amidon de référence. Même après six semaines, aucune modification significative des propriétés n'est observée. Ainsi, l'élagage enzymatique permet aux chaînes de mieux coulisser les unes par rapport aux autres, permettant une augmentation très intéressante de l'allongement, et dans le même temps, empêche toute forme de recristallisation permettant au matériau de garder une contrainte quasi-constante au cours du temps. Enfin, il permet également d'améliorer la solubilité du substrat de départ et d'améliorer la qualité des films obtenus par la méthode du casting.

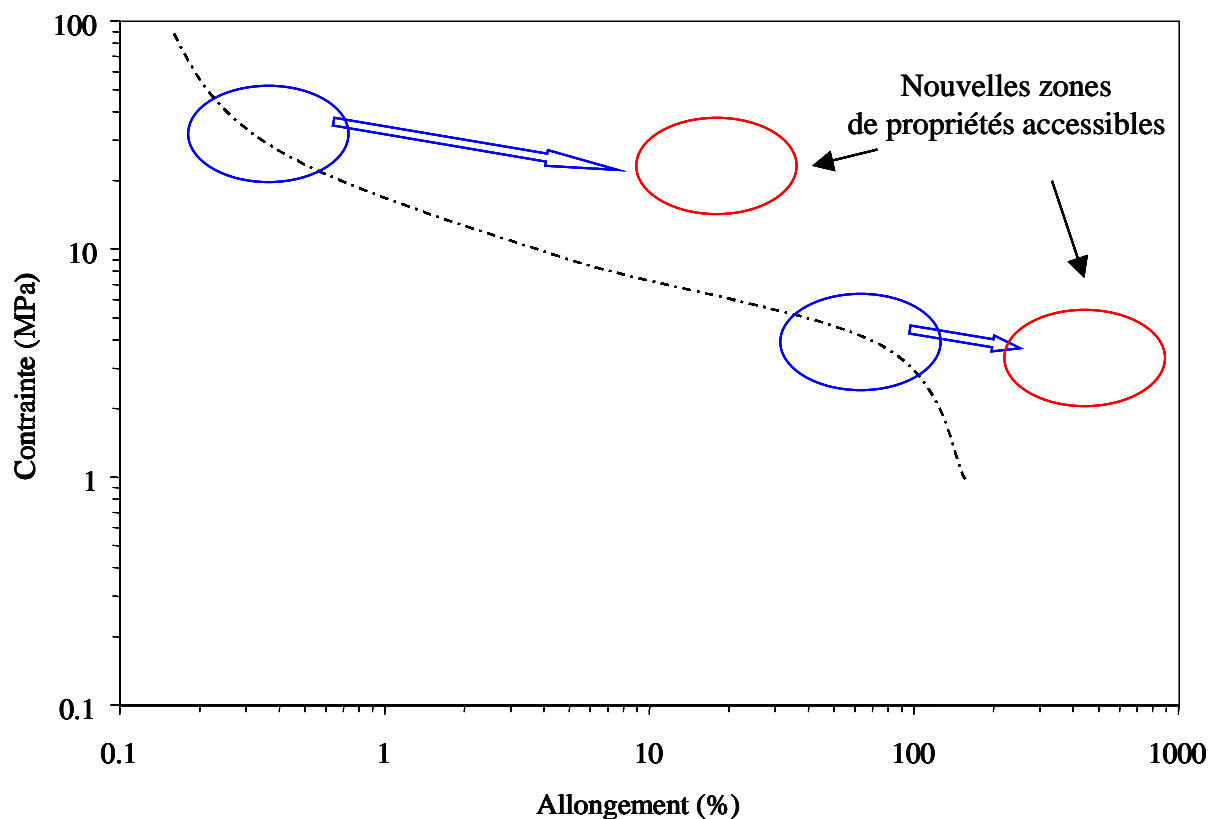
Cette étude des propriétés mécaniques des amidons natifs et de leur dextrine limite permet de faire ressortir quatre points intéressants :

i) L'origine botanique de l'amidon utilisé est bien un facteur important pour les propriétés mécaniques. On retrouve bien les différences de propriétés entre un matériau issu d'un amidon de tubercule et un amidon d'origine céréalière. On retrouve de fortes contraintes pour de relativement faibles allongements pour des amidons de tubercules et, au contraire, de forts allongements pour des contraintes modérées dans le cadre des amidons de céréales.

ii) Les propriétés mécaniques obtenues pour les amidons utilisés à un taux de 27% de glycérol se trouvent en deçà des courbes références de plastification (Figures 19 et 20). Toutefois, les matériaux références réalisés par casting étaient de mauvaise qualité puisqu'il présentaient de nombreux insolubles. Ceci confirme bien que les macromolécules sont plus longues ou plus grosses au sein de cet amidon et que, par conséquent, l'amidon d'igname est un bon sujet à

l'élitage. De plus, l'élitage permet une augmentation de la solubilité des macromolécules et ainsi l'obtention de films de meilleure qualité.

iii) la réalisation de dextrines limites par élitage enzymatique avec la β -amylase permet de déplacer les propriétés mécaniques vers une zone du graphique Contrainte/Allongement intéressante. En effet, la dégradation augmente très nettement l'allongement à rupture sans pour autant perturber de façon trop importante la contrainte (mis à part le cas de l'igname jaune). Ainsi, des matériaux avec des propriétés mécaniques intéressantes peuvent désormais être des cibles envisageables. La figure 72 présente ces perspectives.



Sur la figure 72, reprenant la courbe de plastification de l'amidon de blé de Follain et collaborateurs ^[56], les flèches bleues représentent l'élitage enzymatique réalisé sur des matériaux appartenant à des zones de propriétés mécaniques connues (elles aussi en bleu). L'élitage permet donc d'envisager la production de matériaux possédant de nouvelles propriétés mécaniques (en rouge). Dans ce cas, les matériaux obtenus sortiraient réellement de cette courbe référence, ce qui pour l'heure n'est pas vraiment le cas (Cf chapitre II).

iv) Enfin, l'étude du vieillissement a permis d'atteindre un objectif important, celui de lutter contre le vieillissement des matériaux. En effet, l'analyse par DSC des dextrines limites a montré d'une part la non recristallisation des matériaux, mais en plus l'analyse par tests de traction montre le maintien des propriétés mécaniques à rupture dans le temps (au moins pour une période de 6 semaines).

B) Propriétés mécaniques des amidons modifiés

Dans ce chapitre seront présentés les résultats des essais de traction réalisés sur les amidons modifiés. Non pas que l'élagage enzymatique n'est pas une modification en tant que telle mais dans ce chapitre seront étudiées toutes les modifications, qu'elles soient physiques avec l'étude des propriétés des amidons tamisés, chimiques par le couplage tête-à-tête ou enzymatique avec les dégradations partielles. Comme cela a été précisé précédemment, pour ces matériaux, les tests de tractions ont été réalisés sur des fils obtenus par extrusion et non plus sur des éprouvettes obtenues par casting. Il est également à noter que la plastification n'est plus de 27% par rapport à la masse sèche d'amidon. En effet, lorsque l'objet de l'étude était la réalisation de matériaux à base d'amidon de fortes masses molaires, un taux élevé de glycérol pouvait s'expliquer mais dans ce chapitre, ce n'est plus le cas. Maintenant, l'objectif est de comparer les propriétés des matériaux après différentes modifications avec celle de l'amidon de référence. Ainsi, pour les amidons modifiés, l'amidon de départ sera uniquement l'amidon de blé, un amidon déjà bien décrit, et le taux de plastifiant a été fixé à 20,5%. L'intérêt de cette étude des propriétés mécaniques des amidons modifiés est de voir comment évoluent les propriétés après différentes modifications et ainsi permettre d'obtenir des matériaux références. Seront présentés ici, tout d'abord la méthode de tests puis les résultats de traction pour les amidons fractionnés, couplés et enfin les partiellement dégradés.

1) Présentation de la méthode

Avant d'énumérer les résultats obtenus, il est utile de présenter la méthode qui a été choisie pour réaliser les tests de traction. En effet, la méthode utilisée n'est pas couramment employée. En règle générale, les tests de traction sont réalisés à partir d'éprouvettes de formes et de tailles standardisées obtenues soit par découpe de films castés, soit par moulage à l'aide d'une presse.

Comme cela a été précisé plus tôt, la méthode de casting n'a pas été satisfaisante pour nos substrats.

Ainsi, le choix de réaliser les tests de traction directement sur des joncs extrudés a été fait. Cette méthode présente l'avantage d'initier une orientation des macromolécules lors de la réalisation du jonc. D'après Zhao et collaborateurs, orienter les macromolécules est un moyen d'améliorer les propriétés mécaniques [46, 89]. De ce fait, lorsque nous serons amenés à comparer les amidons matériaux références avec les amidons couplés, les différences de propriétés seront beaucoup plus visibles puisque les longues chaînes auront pu mieux s'organiser entre elles. Différents essais ont été réalisés et, comme cela sera décrit plus précisément dans le chapitre VI, le choix de la méthode s'est finalement arrêté sur la traction de fils dont les extrémités sont recouvertes d'un peu de parafilm[®] afin d'éviter tout glissement des mors lors du test. Or les fils n'étant pas des éprouvettes normalisées, il faut s'assurer de la pertinence et de la reproductibilité des résultats obtenus. C'est pourquoi dans chacun des cas présentés, les résultats bruts seront donnés et une petite étude sera préalablement faite. En effet, si la longueur des fils utilisés peut être fixée arbitrairement, le diamètre de celui-ci et par conséquent sa section est impossible à contrôler. A la sortie de l'extrudeuse, le jonc n'a pas un diamètre constant, ce qui impose de vérifier dans chaque cas si la force nécessaire à la rupture du fil est fonction ou non de sa section, élément essentiel pour pouvoir mesurer une contrainte.

2) Amidons natifs fractionnés

Comme cela a été décrit dans le chapitre III, un fractionnement des amidons de pomme de terre et de blé a été fait. Pour l'amidon de pomme de terre, en terme de taille de grain, une seule famille a été mise en évidence. Toutefois la taille des tamis utilisés a permis d'isoler deux fractions dont l'une correspond à des diamètres de 25 à 38 μm et l'autre des diamètres de 38 à 71 μm . Les propriétés mécaniques de ces deux fractions ont été évaluées. Le cas du blé est un peu différent dans le sens où les deux familles clairement identifiées correspondent à des diamètres de 25 à 38 μm pour la première et des diamètres inférieurs à 25 μm pour la deuxième. Par contre, sur les tamis de tailles supérieures à 38 μm , une quantité non négligeable d'amidon a été récupérée. De ce fait, puisque l'objectif est de voir d'une part si la taille des grains est fonction de la taille des molécules qui le composent et d'autre part si les longues macromolécules présentent des propriétés mécaniques particulières, les tests de traction ont été

faits sur les deux fractions présentant les plus grands diamètres. Un point important à noter ici est le temps de vieillissement qu'ont subi tous les échantillons avant d'être soumis aux tests de traction. En effet, un souci d'appareillage a conduit à effectuer les tests après 6 mois de conservation du matériau à 20°C et 50% d'humidité relative.

a) Amidon de blé

Il est important en premier lieu de déterminer s'il existe dans ce cas une relation de proportionnalité entre la section des fils testés et la force à exercer pour permettre leur rupture.

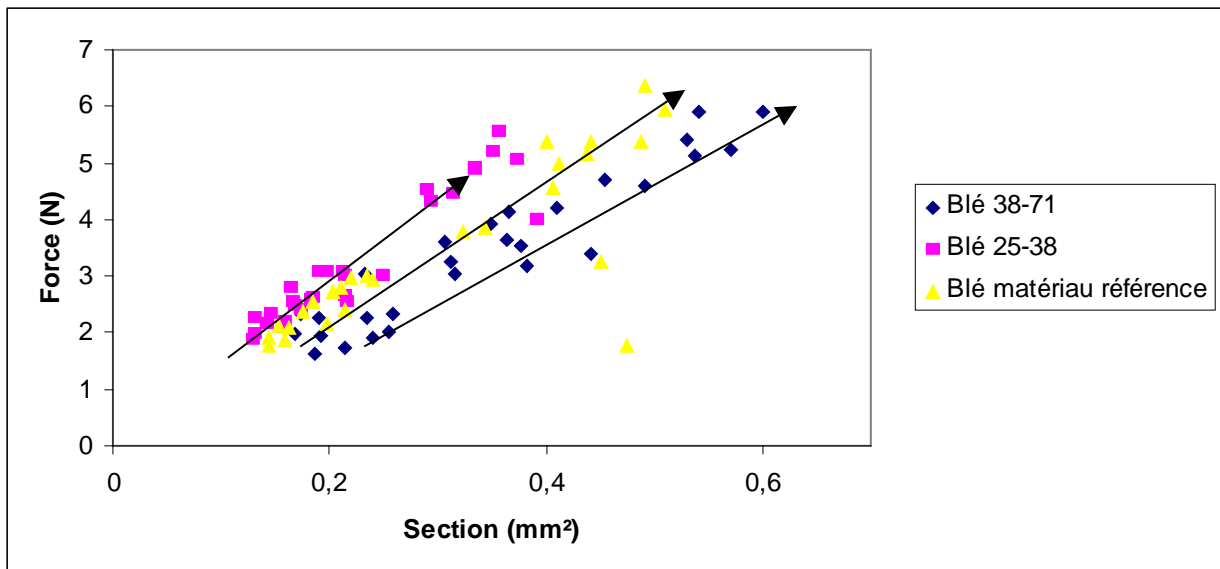


Figure 73 : Etude de la relation entre Force à rupture et Section du fil

La figure 73 montre clairement qu'il existe bien un lien entre la section du fil et la force à exercer nécessaire à sa rupture pour les trois échantillons testés. Il peut être supposé que la force nécessaire à la rupture est fonction de la section, dans le sens où pour une section élevée, le nombre de macromolécules présentes dans l'échantillon est plus important. La figure 74, quant à elle, propose de comparer l'allongement des fils par rapport à la section.

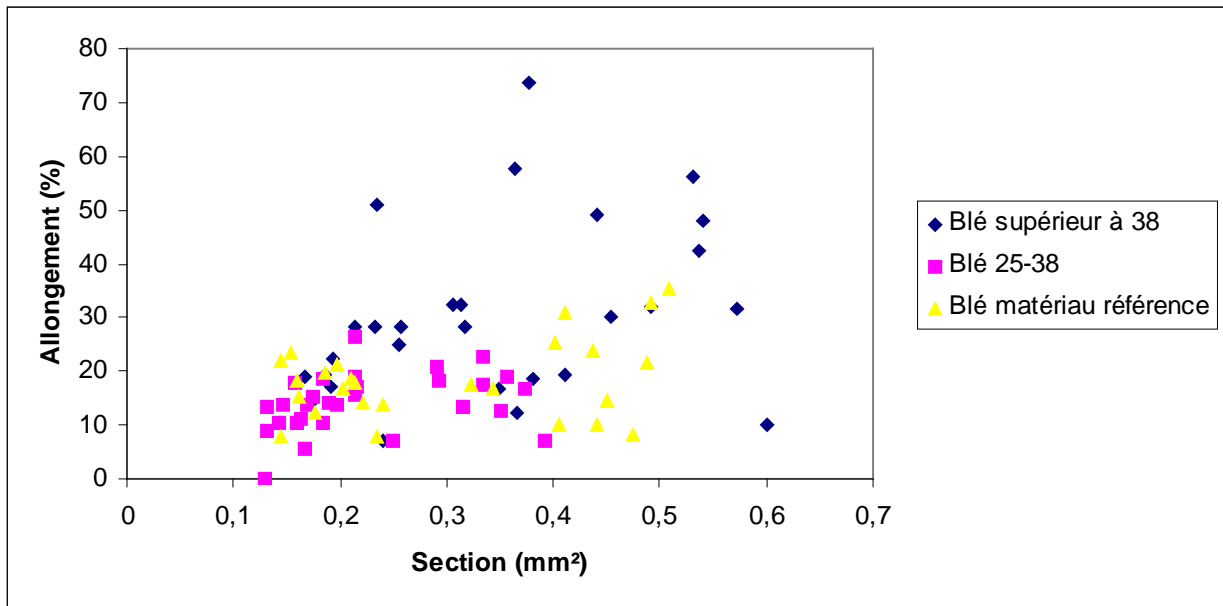


Figure 74 : Etude de la relation entre l'allongement et la section du fil

Il apparaît ici par contre que l'allongement est totalement indépendant de la section du fil. Ce résultat est normal puisque l'allongement à rupture est une valeur intrinsèque peu dépendante des éprouvettes.

Toutefois, il semble que pour les fils possédant les sections les plus grandes, l'écart entre les allongements soit beaucoup plus important que pour les fils les plus fins. En effet, pour des sections de l'ordre de 0,15 mm², l'écart entre les points est très faible tandis que pour des valeurs de 0,45 mm² par exemple une grande disparité des allongements est observée. La nature de l'échantillon peut en partie expliquer ce phénomène mais pas seulement. Probablement que lorsque les fils sont fins, les macromolécules ont plus tendance à être orientées que lorsqu'ils sont plus épais.

A partir des deux dernières figures 73 et 74, le graphique Contrainte/Allongement peut être fait.

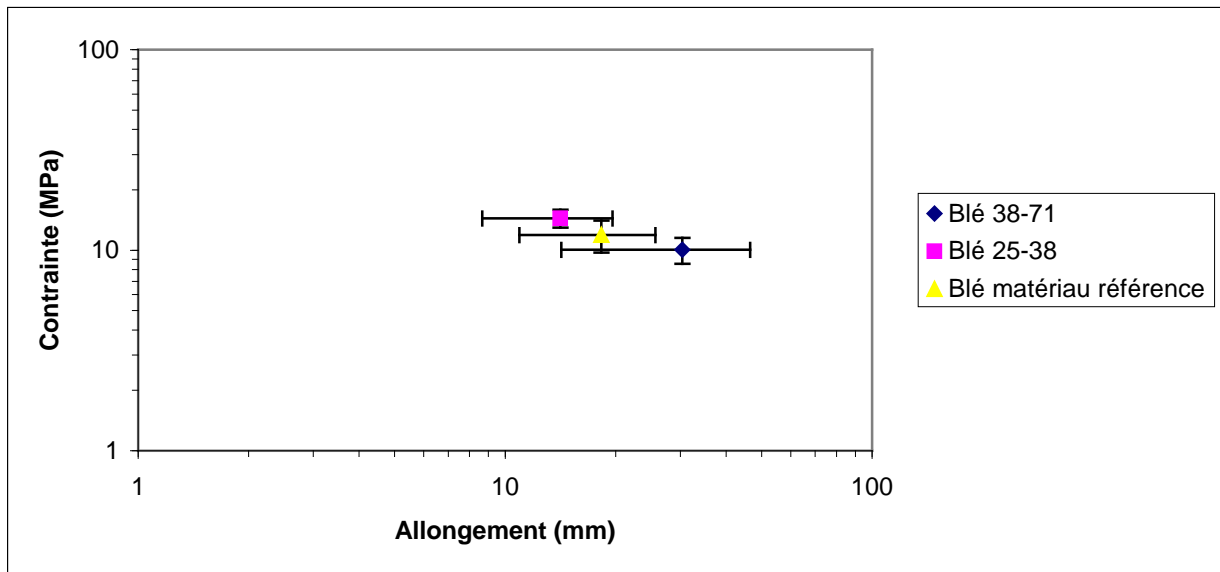


Figure 75 : Contrainte/Allongement en fonction de la taille des grains d'un amidon de blé

La figure 75 montre que les deux fractions isolées présentent des propriétés certes proches mais néanmoins différenciables. Il apparaît que le matériau réalisé à partir de la fraction dont les grains ont des diamètres supérieurs à 38 μm présente un allongement supérieur à celui de la fraction 25-38 μm . Il présente dans le même temps une contrainte plus faible. L'autre élément intéressant est le fait que les propriétés de ces deux fractions encadrent parfaitement les propriétés de l'amidon natif. De plus, il semble tant pour la contrainte que pour l'allongement, que l'amidon natif est légèrement plus proche de la fraction 25-38 μm . Ceci provient certainement du fait que la proportion de grains de la fraction 25-38 μm est nettement supérieure à celle des grains de taille supérieure à 38 μm . Ceci laisse à penser que la fraction correspondant à des grains de diamètre inférieurs à 25 μm aurait conduit à un matériau avec un allongement encore plus faible mais avec une contrainte plus importante. Dans le même temps, avec un fractionnement réalisé sur une plus grande quantité d'amidon, la fraction 71-100 μm permettrait certainement d'obtenir un allongement plus important pour une contrainte légèrement plus faible mais néanmoins proche de 10 N.

Tout ceci permet de confirmer l'hypothèse initiale. En effet, en fonction de la taille des grains, les propriétés mécaniques sont modifiées. Or après passage en extrudeuse, la seule différence entre les fractions est la structure même des macromolécules et donc leur taille. Une analyse par diffraction des rayons X a été faite afin de voir si les quantités de phases cristallines des fractions sont différentes.

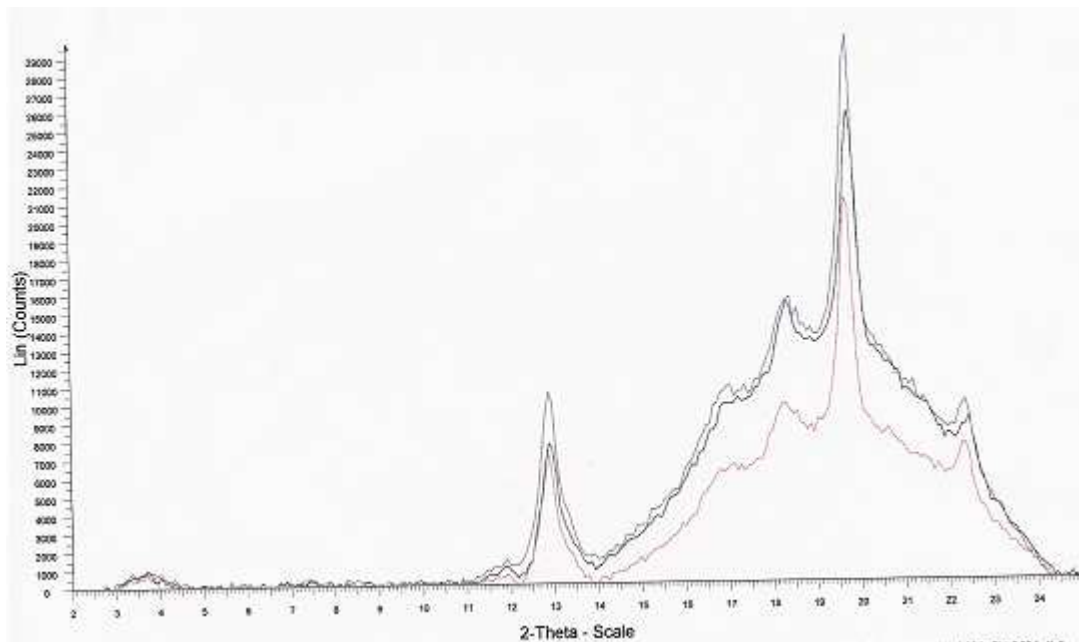


Figure 76 : Diffractogrammes des différentes fractions, 25-38 (—), amidon matériau référence (—) et supérieur à 38 μm (—)

La figure 76 montre que la structure cristalline ne varie pas entre les différentes fractions et l'amidon natif mais par contre une différence d'intensité existe. Il apparaît que l'intensité des pics du matériau issu de la fraction 25-38 μm est identique à celle de l'amidon matériau référence. Cela est facilement visible sur les pics majeurs à 13 et 19,7°. L'intensité de ceux de la fraction supérieure à 38 μm est quant à elle supérieure à celle de l'amidon natif. En ce qui concerne la zone du diffractogramme comprise entre 14 et 34° caractéristique de la phase amorphe du matériau, une similitude entre l'amidon matériau référence et la fraction supérieure à 38 μm se dégage.

b) Amidon de pomme de terre

La même étude a été faite pour l'amidon de pomme de terre pour les fractions correspondants aux diamètres 25-38 et 38-71 μm . La figure 77 présente l'étude de la force à exercer sur les fils d'amidon de pomme de terre en fonction de la valeur de la section.

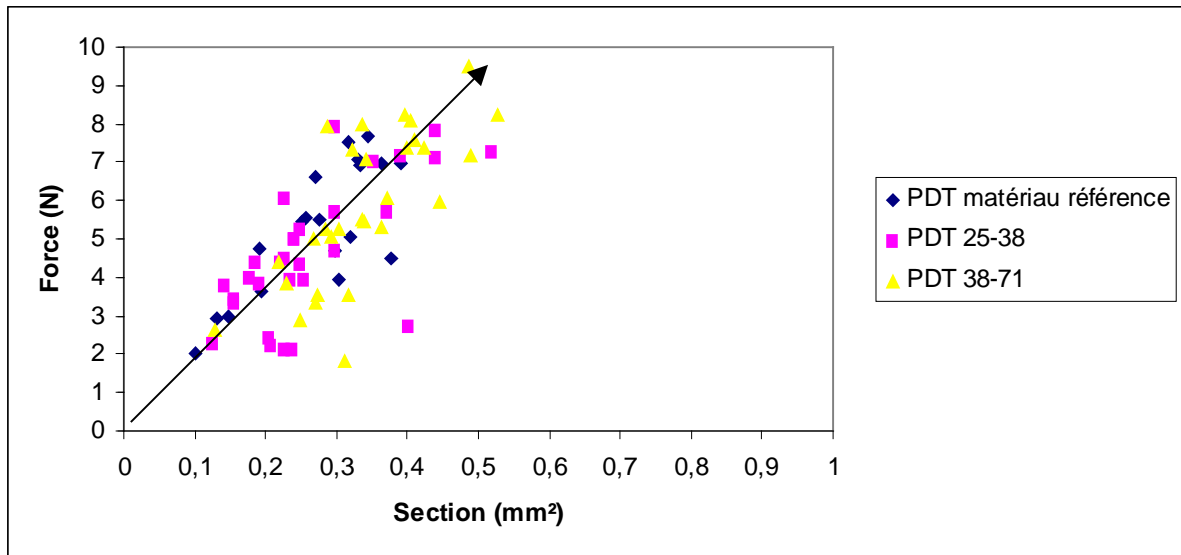


Figure 77 : Etude de la relation entre force à exercer et la section du fil

Sur cette figure 77, la relation de proportionnalité entre la force et la section est établie. La figure 78 montre, comme pour le cas du blé, que l'allongement n'est pas fonction de la section et que les tests mécaniques peuvent être analysés.

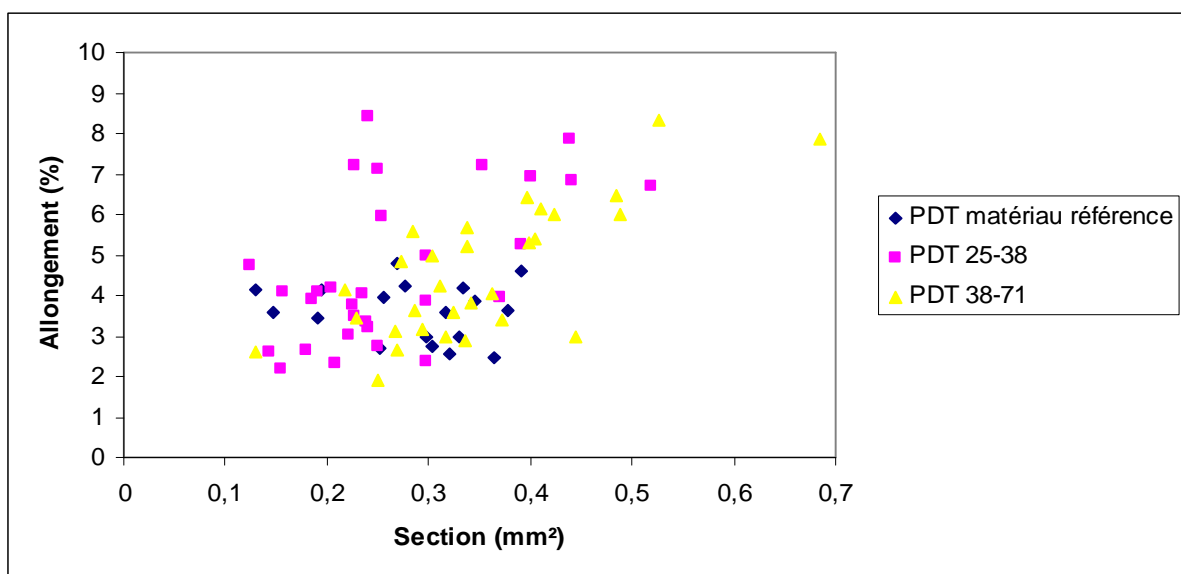


Figure 78 : Etude de la relation entre allongement et la section du fil

Contrairement au cas du blé, les propriétés de l'amidon de pomme de terre ne semblent pas être encadrées par celles des deux fractions mais bel et bien comprises dans le même domaine que les deux fractions.

La figure 79 résume les propriétés mécaniques de l'amidon de pomme de terre et des deux fractions isolées.

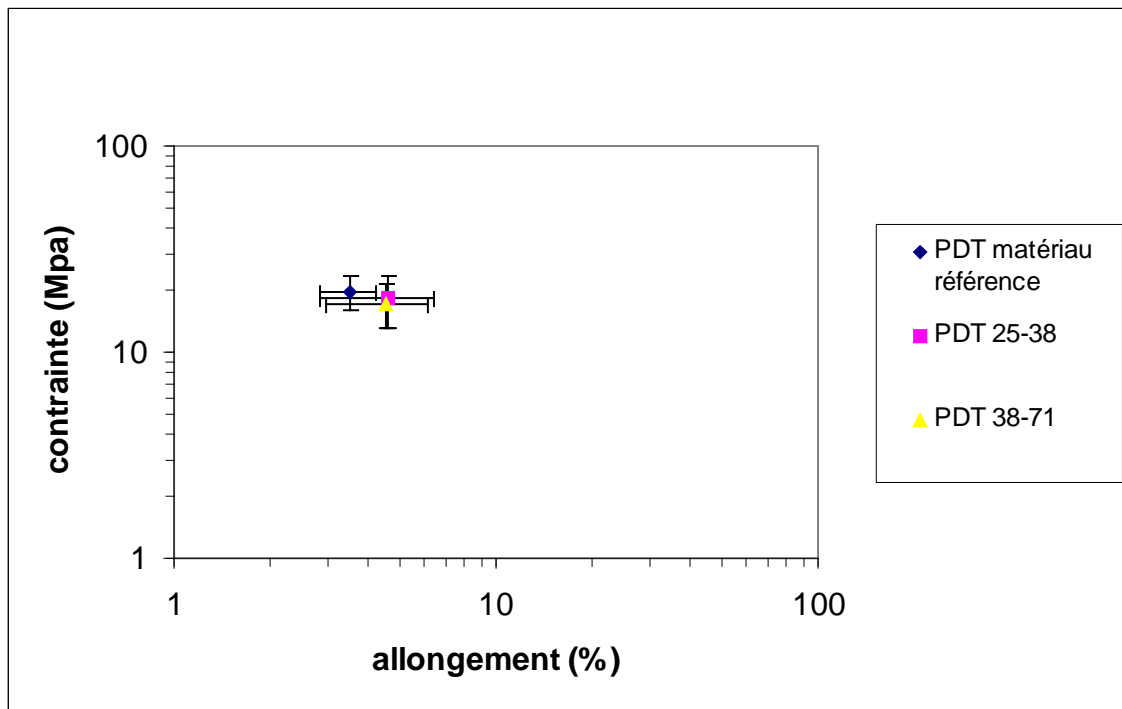


Figure 79 : Contrainte/Allongement des fractions d'amidon de pomme de terre

Sur ce graphique, il apparaît que la différence de propriétés entre les deux fractions est très faible. En fait, il peut même être considéré que les deux fractions et l'amidon natif ont les mêmes propriétés. Ceci n'est finalement pas surprenant puisque dès le départ une seule famille de grains a été mise en évidence. Contrairement à l'amidon de blé, il semble donc que, dans ce cas, la taille des grains n'implique pas une différence évidente au niveau des macromolécules. L'analyse par diffraction des rayons X montre bien que les deux fractions sont identiques au niveau structural.

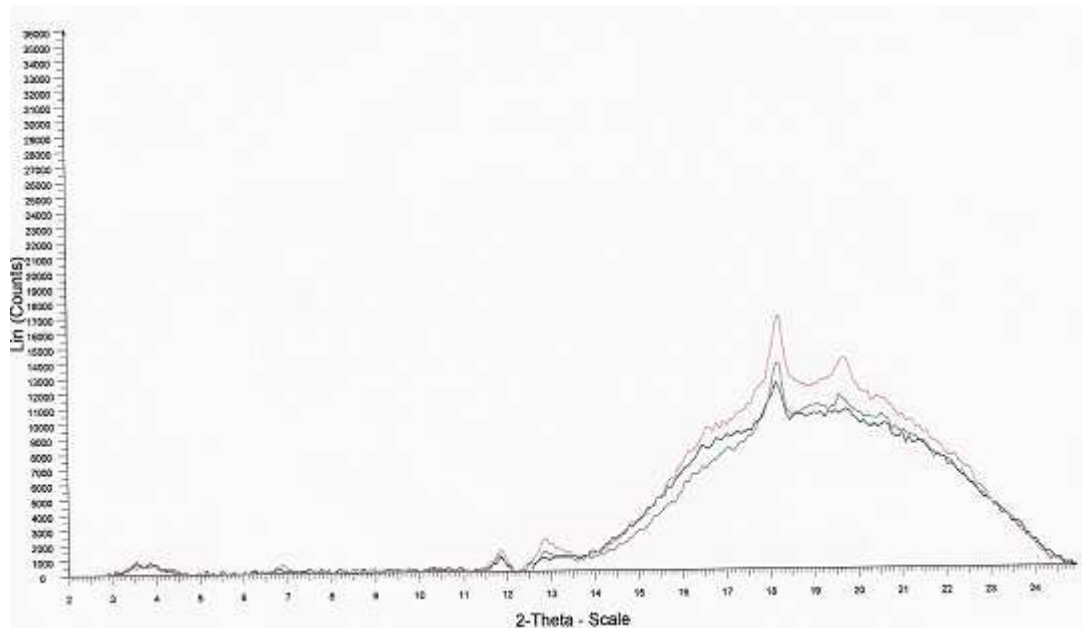


Figure 80 : Diffractogrammes des différentes fractions, 25-38 (—), amidon matériau référence (—) et 38-71 μm (—)

Cette étude des propriétés mécaniques à rupture des différentes fractions des amidons de blé et de pomme de terre a montré deux résultats totalement en contradiction. En effet, dans le cas de l'amidon de blé, la taille des macromolécules est en relation directe avec la taille des grains. Les propriétés mécaniques de la fraction des plus gros grains montrent un allongement à rupture plus important que celui de l'amidon natif confirmant l'hypothèse formulée initialement. Par contre, pour l'amidon de pomme de terre, aucune différence nette entre les fractions n'est mise en évidence. La distribution des grains d'amidon n'entraîne pas de différence au niveau des chaînes des macromolécules. La figure 81 regroupe les résultats des tests de tractions des deux types d'amidons. Elle permet de constater la différence de comportement entre l'amidon de pomme de terre et celui de blé. L'autre élément important de ce graphique est la comparaison avec la courbe référence de plastification déjà utilisée. Il apparaît que pour des tests réalisés sur des fils, donc pour des macromolécules orientées (même légèrement), les points se situent au-dessus de la courbe. De plus, pour le blé (puisque la courbe référence est obtenue à partir d'amidon de blé), pour des allongements identiques, les contraintes sont supérieures mais surtout ces résultats sont obtenus pour des taux de plastifiant plus faibles. En effet, il ressort du graphique que pour un taux de plastifiant de 20,5%, l'allongement est quasiment doublé (puisque pour les gros grains il s'élève à 30%, alors que sur la courbe de plastification il plafonne à 15%) et la contrainte est améliorée de 2 MPa. Ceci

ne peut s'expliquer que par l'orientation des chaînes au sein du fil, comparativement aux matériaux castés.

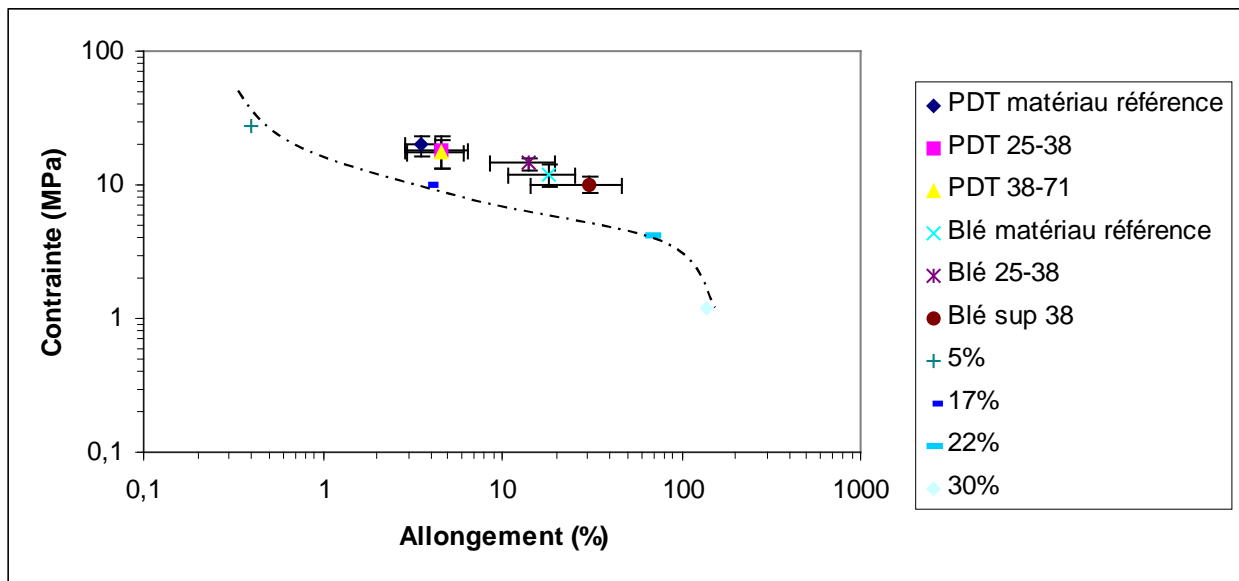


Figure 81 : Comparaison des propriétés mécaniques des deux types d'amidons entre eux, par rapport à la courbe référence de plastification ^[56]

3) Amidon partiellement dégradé

Comme cela a été présenté plus tôt, la dégradation partielle n'a été effectuée que sur l'amidon de blé. L'objectif initial était de voir si seule la dextrine limite était capable d'empêcher le vieillissement par recristallisation ou si, pour un taux de dégradation plus faible, il était possible d'atteindre le même résultat. Les analyses thermiques par DSC et physiques par diffraction des rayons X ont montré que la dégradation partielle permettait de diminuer la recristallisation mais que la stabilité face à la rétrogradation n'était obtenue que pour les amidons totalement élagués. Les amidons partiellement dégradés ont néanmoins été testés afin de comparer leurs propriétés mécaniques avec celles des amidons natifs. Les trois dextrines partielles testées sont les dextrines 10, 20 et 30%.

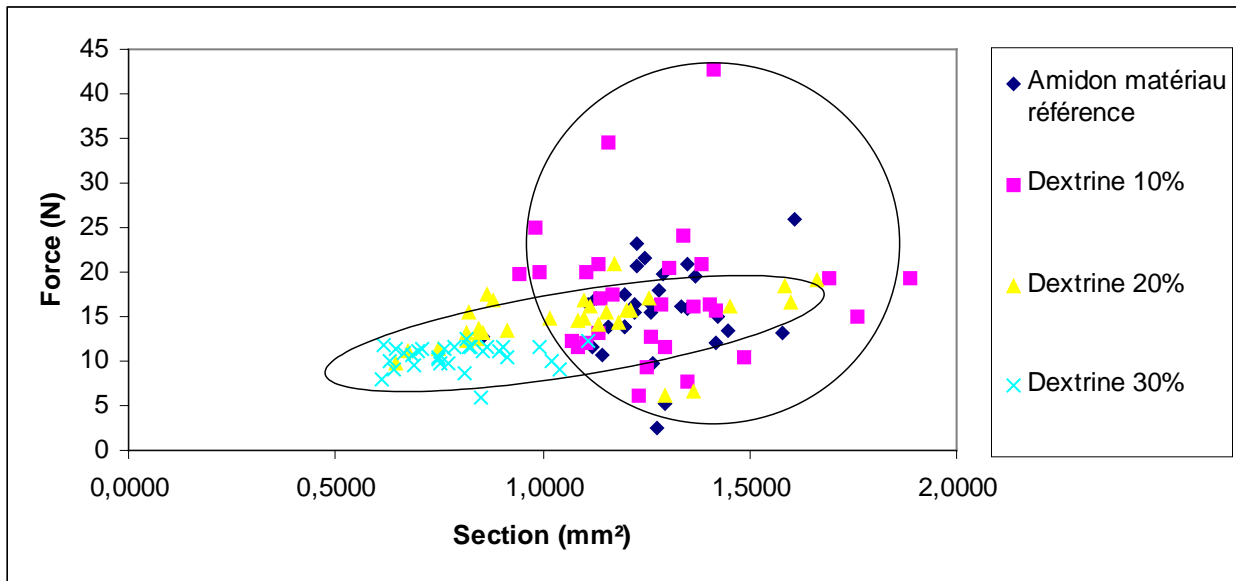


Figure 82 : Etude de la relation entre Force à rupture et section du fil

Deux informations majeures sont données par la figure 82. La première concerne l'absence de proportionnalité entre la force et la section du fil pour l'amidon matériau référence et la dextrine 10%. Le deuxième résultat remarquable est le fait que plus la dégradation est avancée, plus les fils obtenus après l'extrusion sont fins. Il est envisageable qu'un effet rhéologique nouveau accompagne la modification structurale provoquant ce résultat.

Il est à noter que malgré ces résultats, ceux des tests de traction de l'amidon matériau référence et de la dextrine 10% ont tout de même été étudiés avec ceux des dextrans 20% et 30%. En effet, les tests sur l'amidon de référence et sur la dextrine 10% ont été réalisés chronologiquement les premiers et la méthode employée était encore celle consistant à maintenir les extrémités du fil entre deux bouts de papier tenus par deux points de colle (Cf Chap VI). Or, à partir de ces essais, il est apparu que les points de colle pouvaient provoquer une rupture anticipée des fils à leur proximité. Dans ces cas, les échantillons n'ont pas été pris en compte. Toutefois, à partir de ces tests, la méthode a été modifiée pour utiliser directement le fil avec juste une petite épaisseur de parafilm[®] aux extrémités pour éviter le glissement des mors. De ce fait, les premiers résultats ont été conservés et, comme cela sera présenté ultérieurement, ne perturberont pas fondamentalement l'analyse des résultats.

La figure 83 vient compléter l'étude préliminaire avec l'observation de l'influence de la section sur l'allongement des fils.

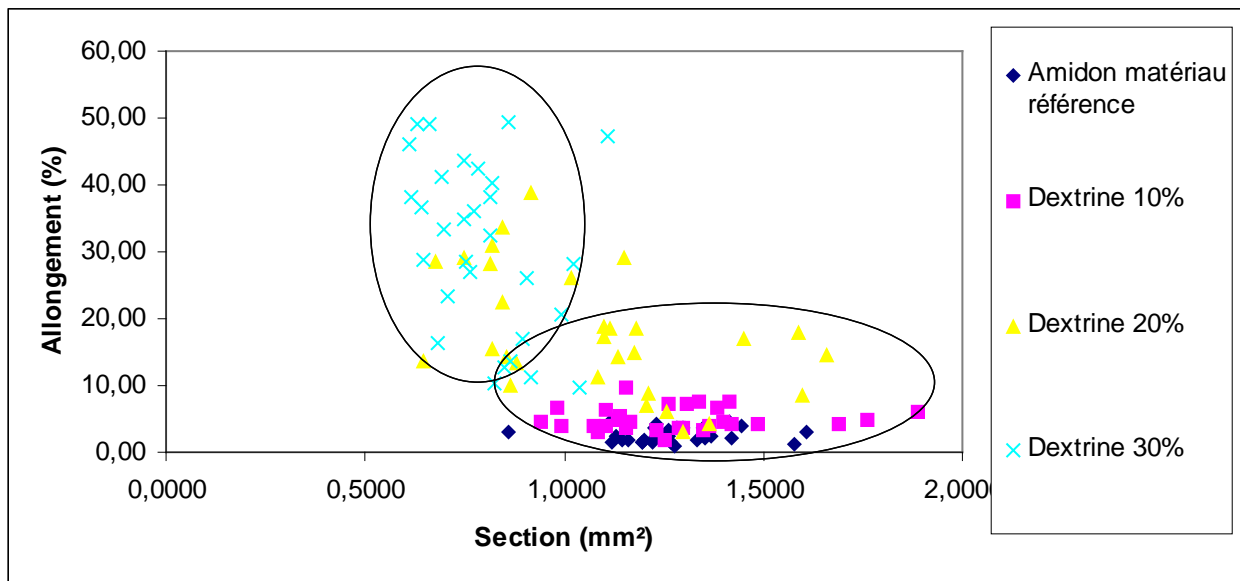


Figure 83 : Etude la relation entre Allongement et section du fil

Une nouvelle fois, trois éléments apparaissent sur ce graphique. Le premier est que, pour aucun des échantillons, l'allongement n'est fonction de la section du fil testé. Cette information est normale, par contre le graphique permet d'avoir une première tendance des propriétés d'allongement en fonction des différents échantillons. Le deuxième élément est que, plus la dégradation avance, plus les propriétés d'allongement s'améliorent. Il apparaît que, pour des sections identiques entre 1 et 2 mm², les propriétés d'allongement sont meilleures pour la dextrine 20% que pour l'amidon natif et la dextrine 10% et dans le même temps, pour des sections plus petites, la dextrine 30% présente des allongements encore supérieurs à ceux de la dextrine 20%. Il semble que plus la dégradation avance, plus les macromolécules peuvent coulisser les unes par rapport aux autres. Il ressort, bien que les matériaux testés ne se trouvent pas tous dans la même gamme de section, qu'ils peuvent quand même être comparés les uns aux autres. Enfin, il apparaît que lorsque les fils sont fins, l'écart entre les valeurs d'allongement augmente par rapport aux allongements des fils épais. En effet, lorsque l'on regarde les fils de dextrans 20% présents dans les deux gammes de section, on voit qu'à sections identiques supérieures à 1 mm², les allongements sont proches les uns des autres alors qu'ils sont beaucoup plus dispersés pour les fils de section inférieure à 1mm².

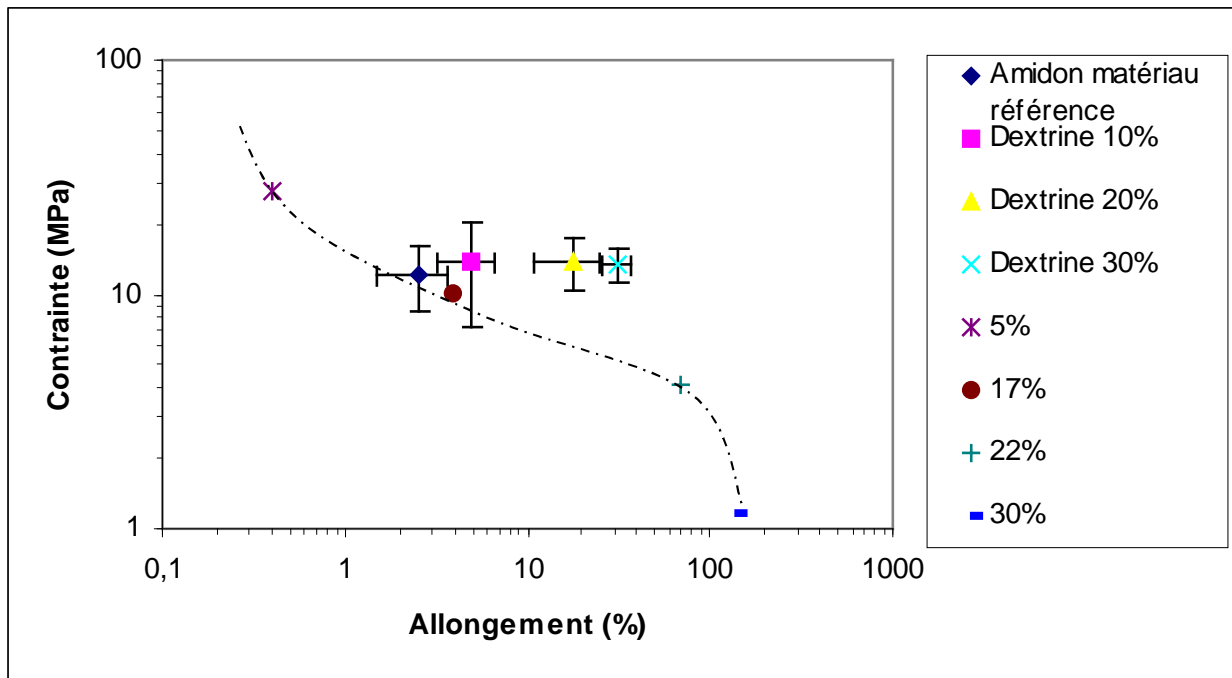


Figure 84 : Contrainte / Allongement des dextrines partielles

La Figure 84 vient conforter le résultat déjà observé dans le cadre de l'étude des propriétés mécaniques des dextrines limites. En effet, il est à noter que l'élagage enzymatique de l'amidon de blé permet de déplacer les propriétés d'allongement vers des allongements plus importants et surtout de façon graduée. Cela nous a permis d'obtenir des matériaux possédant des caractéristiques en allongement contrôlables en fonction du taux de dégradation que l'on applique à l'amidon. La position du point de l'amidon natif semble un peu surprenante pour le taux de plastifiant utilisé, puisqu'il se situe proche de valeurs anormalement faibles en allongement et élevées en contrainte lorsqu'il est comparé à la courbe de plastification. Ceci peut être dû à la non proportionnalité entre section et force à rupture qui a été observée un peu plus tôt dans le chapitre. Malgré cela, l'ensemble de ces résultats reste cohérent et permet bien la mise en évidence du phénomène. Il est intéressant de noter également que la valeur des écarts types pour les dextrines va en diminuant avec le taux de dégradation, ce qui indique que la dégradation rend la population des macromolécules plus homogène. Enfin, le dernier point intéressant ici est la conservation d'une part d'une contrainte élevée malgré l'augmentation de la dégradation et d'autre part de l'allongement. Ce résultat n'avait pas été observé lors de l'étude des dextrines limites obtenues par casting. De ce fait, l'écart par rapport à la courbe de plastification est un peu plus important encore par rapport à ce qui avait pu être observé précédemment. La dextrine 30% présente une contrainte de 13,5 MPa pour un allongement de

31%, et ceci pour un taux de plastifiant de 20,5%, tandis que la courbe de plastification pour un taux équivalent plafonne à 20% d'allongement pour une contrainte de l'ordre de 7 Mpa, ce qui est un écart non négligeable. Il aurait été intéressant de voir le comportement de la dextrine limite testée dans ces conditions mais la quantité de matière consommée pour réaliser le casting et la quantité nécessaire à la production de fils n'ont pas permis la réalisation de ces tests.

Un dernier facteur reste à étudier : le module d'Young. En effet, le module d'Young permet d'évaluer les propriétés mécaniques aux faibles déformations. La figure 85 représente le module d'Young mesuré pour chaque échantillon en fonction des sections de fil.

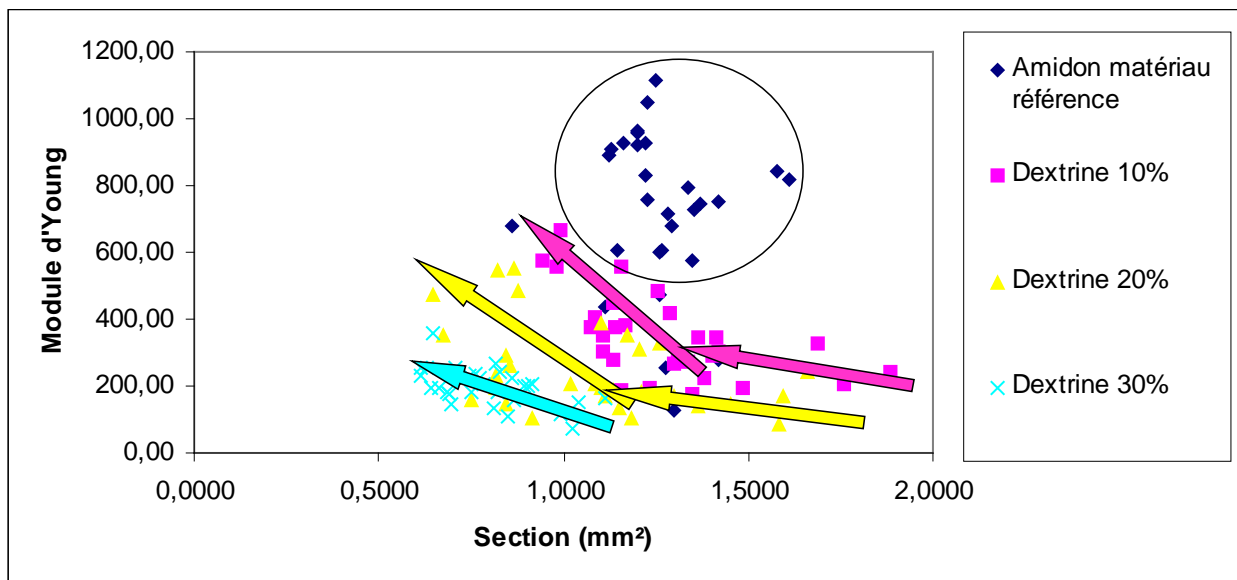


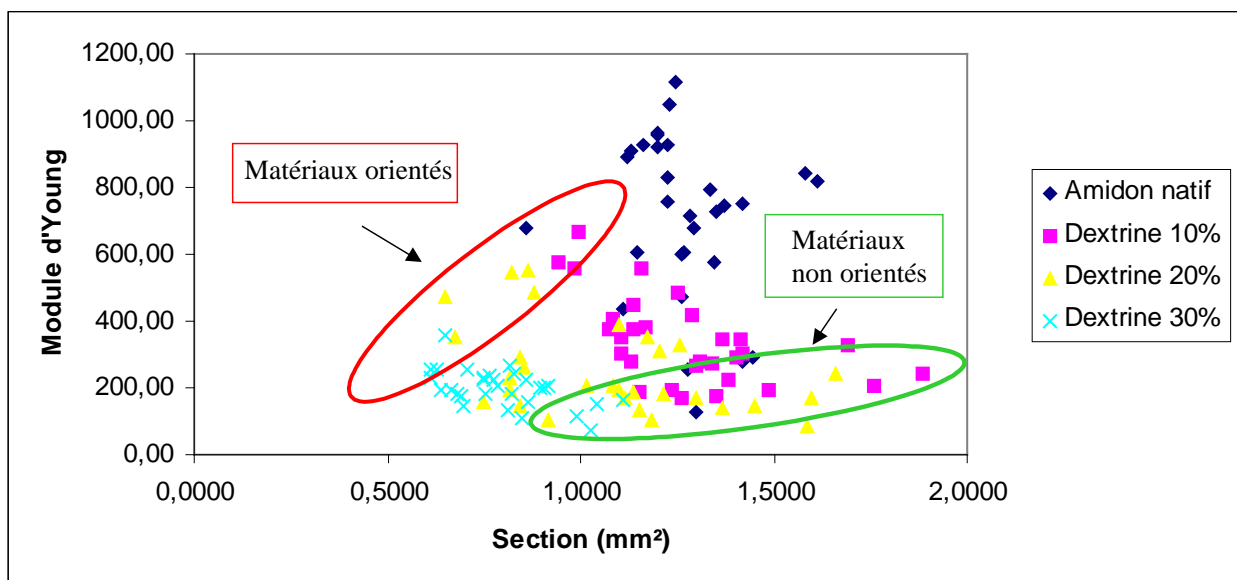
Figure 85 : Evolution du module d'Young avec la section

Ce graphique est intéressant à deux niveaux. En effet, le premier constat qui peut être fait réside dans l'indépendance du module par rapport à la section lorsque l'amidon matériau référence est étudié tandis qu'une tendance de type exponentielle inverse semble se dessiner pour les dextrines. Ce phénomène est surprenant puisque logiquement le module devrait être totalement indépendant de la section. Ici, la valeur du module augmente lorsque la section diminue. En effet, le graphique met bien en évidence ce phénomène lorsqu'il indique, pour la dextrine 10%, une valeur du module autour de 200 pour un fil de section proche de 2 mm² alors que, pour le même matériau, un fil de 1 mm² de section engendre un module de 650. Le deuxième constat est que l'influence de la section est inversement proportionnelle au taux de

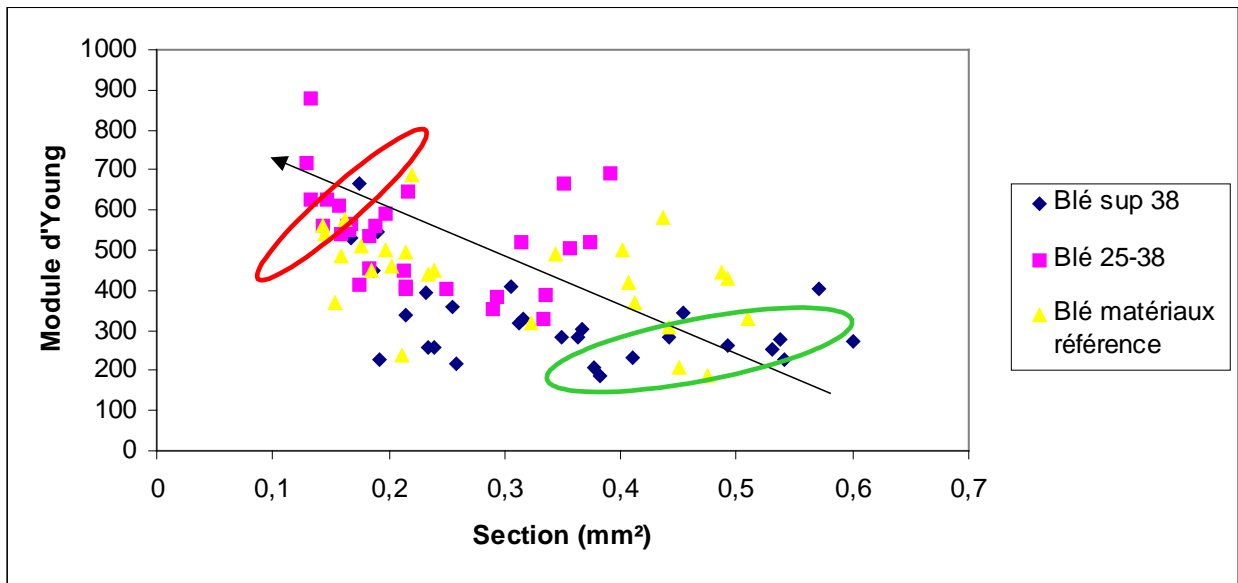
dégradation. La comparaison entre la dextrine 10% et la dextrine 30% montre bien que la variation est nettement moins marquée pour la dextrine 30% pour des sections de fil de même ordre de grandeur.

Cette variation du module en fonction de la section ne peut s'expliquer que par une modification structurale au sein du matériau étudié. Le fait qu'il augmente fortement avec la diminution de la section ainsi que les observations faites sur le graphique 84 laisse à penser que le phénomène d'orientation des chaînes au sein des fils est beaucoup plus intense lorsqu'ils sont fins. Ceci est schématisé sur les figures 86 a), b) et c).

a)



b)



c)

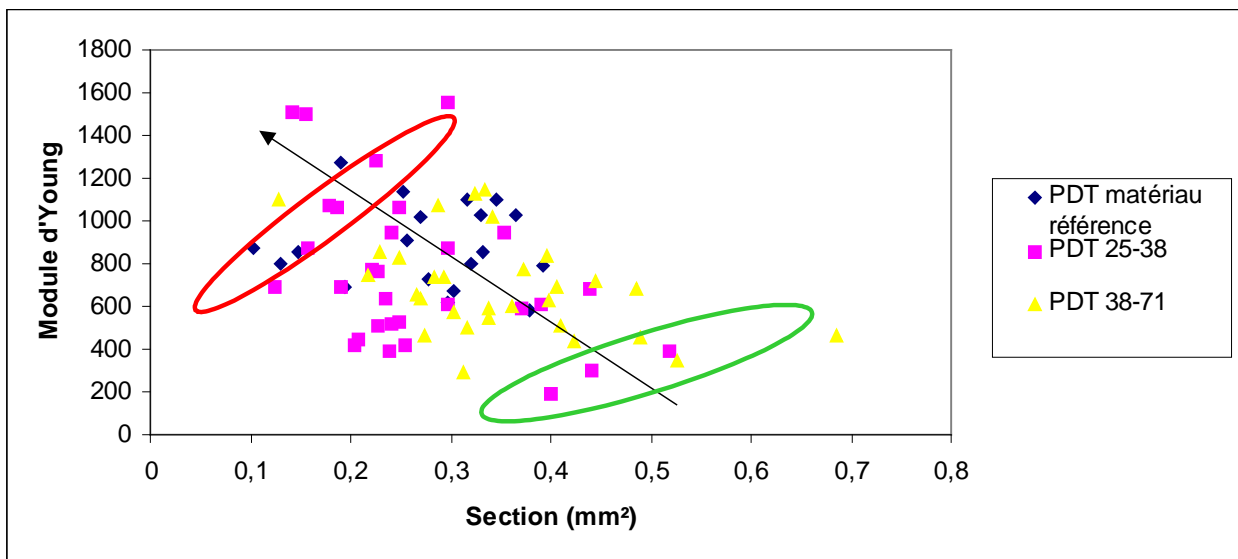


Figure 86 : Effet d'orientation des macromolécules sur le module d'Young de a) dextrines partielles b) blé fractionné c) pomme de terre fractionnée

Ce phénomène s'observe également pour les amidons fractionnés. Les figures 86 b) et c) montrent que dans chacun des cas le module d'Young varie avec plus ou moins d'ampleur toujours dans le même sens. Puisque les sections de fil sont plus petites pour les amidons

fractionnés, la conclusion de ceci peut être quelque peu atténuée en considérant que les matériaux à faible section sont beaucoup plus orientés que ceux possédant des sections plus grandes. Il n'est plus possible de considérer que, lorsque les sections sont élevées, les macromolécules sont complètement non orientées.

4) Amidons natifs couplés

Puisque l'isolement des très fortes masses molaires de l'amidon n'a pas été possible, comme cela a été présenté plus tôt, il a été décidé de les réaliser par couplages chimiques ciblés sur les extrémités réductrices des macromolécules. Le couplage tête-à-tête mis en place a été réalisé avec des bras espaceurs (ou linkers) de différentes natures. Le couplage par diamination réductrice a été fait avec la plus simple des diamines qu'est l'hydrazine puis avec l'ortho-diaminobenzène. Enfin, avec un polyéthylène glycol 8000 diaminé à ses extrémités, synthétisé pour les besoins de l'étude, le couplage a été réalisé pour comparer l'accessibilité aux extrémités réductrices et l'impact de la taille du linker sur les propriétés mécaniques.

De la même façon que pour les amidons fractionnés ou les amidons dégradés, l'influence de la section du fil a été étudiée afin de vérifier la pertinence des graphiques Contrainte/Allongement. La figure 87 présente l'impact de la section sur la force à rupture des différents matériaux synthétisés.

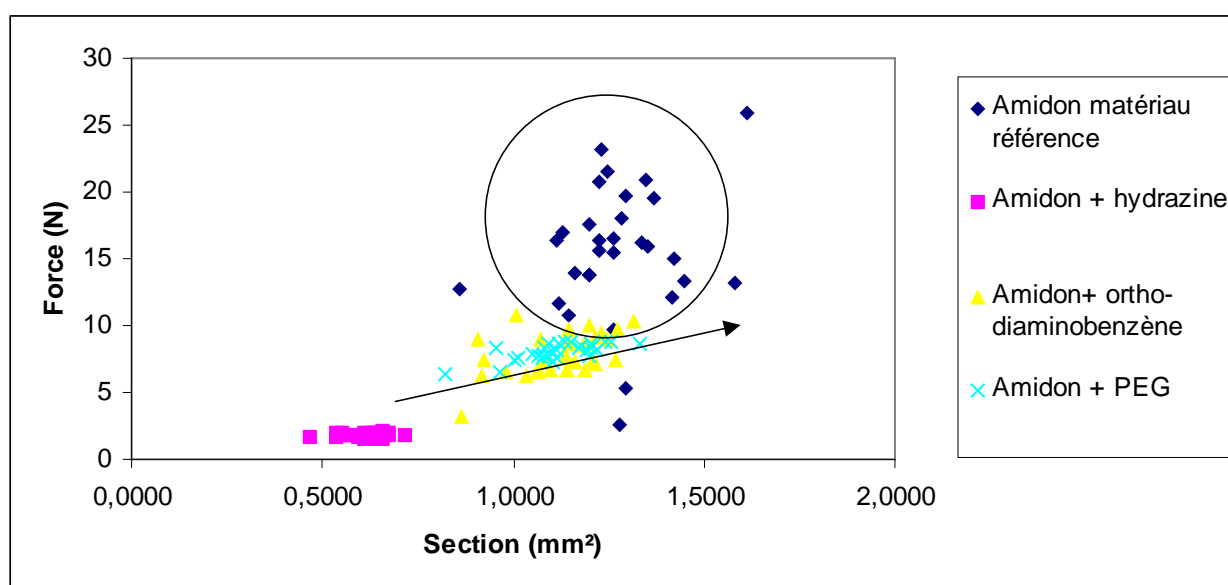


Figure 87 : Etude de la relation entre Force à rupture et section du fil

Il apparaît sur ce graphique que, pour les amidons couplés, une relation de proportionnalité existe tandis qu'elle n'est pas du tout évidente pour l'amidon de référence. De plus, il est intéressant de constater que, selon le linker employé, l'impact sur la force à rupture est très différent. Le fait d'avoir couplé l'amidon avec de l'hydrazine fait chuter très nettement la force à rupture des fils, la faisant passer de près de 15 N en moyenne à 2 N. Sans augmenter de façon importante sa taille mais en jouant sur sa rigidité (passage à l'ortho-diaminobenzène), cette même force à rupture remonte à une valeur moyenne de 7 N. Il semble enfin que la rigidité induite par le couplage avec le PEG est similaire à celle induite par l'ortho-diaminobenzène. Il est également à noter que la taille des fils entre les amidons couplés à l'hydrazine et ceux couplés avec l'ortho-diaminobenzène ou le PEG n'est pas du même ordre de grandeur, ce qui limite quelque peu la comparaison de leurs forces à rupture.

En ce qui concerne l'influence de la section sur l'allongement, les résultats sont présentés sur la figure 88.

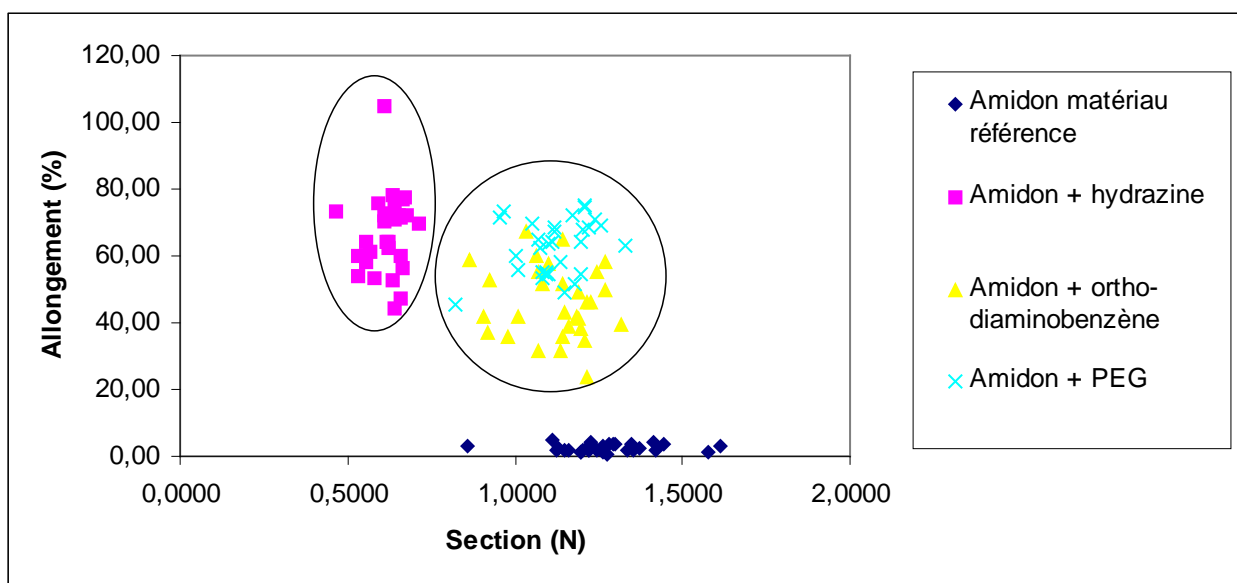


Figure 88 : Etude de la relation entre Allongement et section du fil

De la même façon que pour la force à rupture, le graphique Allongement en fonction de la section permet de mettre en évidence l'indépendance de l'allongement par rapport à la section du fil étiré. De plus, deux types de comportements sont mis en évidence : d'une part l'amidon natif qui ne présente qu'un très faible allongement naturel et d'autre part les amidons couplés. Toutefois pour des fils présentant des sections similaires, en fonction du linker, les propriétés

d'allongement varie quasiment du simple au double lorsque les matériaux sont couplés à l'ortho-diaminobenzène ou au PEG.

A partir de ces deux graphiques, il devient possible de faire le graphique Contrainte/Allongement.

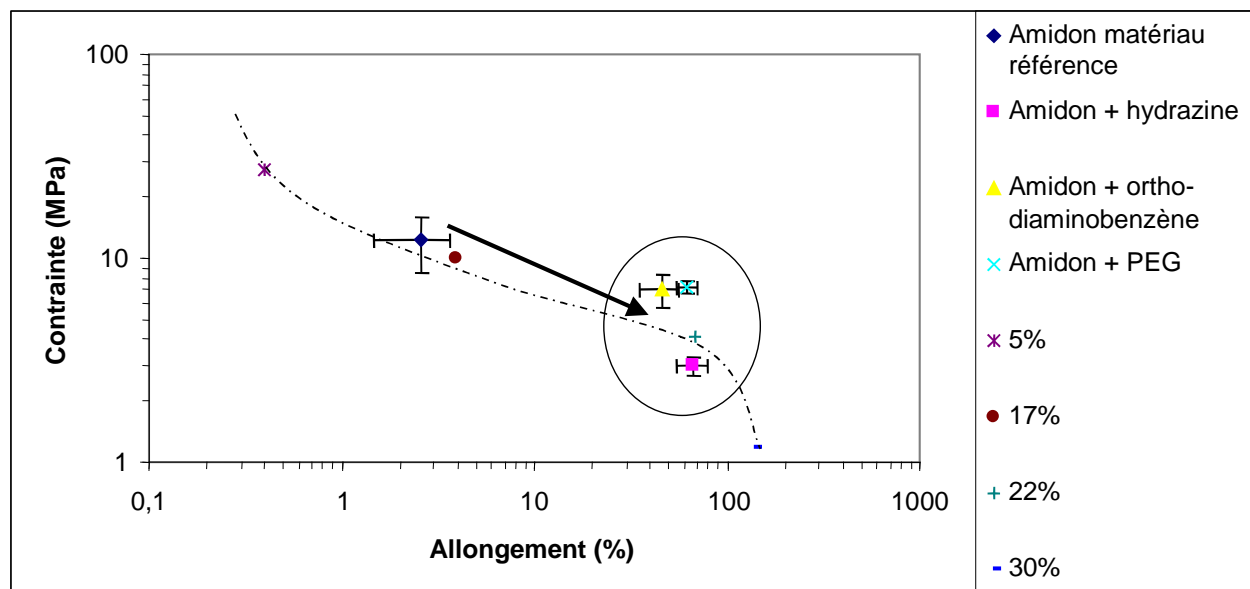


Figure 89 : Contrainte/Allongement des amidons couplés

La figure 89 présente l'influence du couplage tête-à-tête sur les propriétés mécaniques de l'amidon de blé. La première information que délivre ce graphique est que la valeur des écarts types des amidons couplés est très faibles par rapport à celle observée pour l'amidon natif. Il apparaît que le matériau couplé au PEG est très homogène. Il ressort également de ce graphique que pour tous les linkers, le couplage induit des propriétés d'allongement relativement similaires. En effet, cela va de 46% lorsque le linker est l'ortho-diaminobenzène, à 66% pour l'hydrazine en passant par 62,5% avec le PEG 8000. La principale différence observable est l'écart important des contraintes entre les différents échantillons. Cette contrainte est de 3 MPa lorsque le linker est l'hydrazine alors qu'elle est de 7 pour les deux autres matériaux.

A partir de ce graphique, il peut être supposé que l'amidon de blé lorsqu'il est couplé avec l'hydrazine se comporte globalement comme un amidon dont les macromolécules seraient très longues. En effet, Ce couplage a induit dans le même temps un gain important en allongement

et une forte perte en contrainte. Ce type de propriétés peut être comparé à ce qui a été observé pour l'amidon de blé fractionné. Sauf que dans le cas présent, le gain en allongement ainsi que la perte de contrainte sont nettement plus marqués que dans le cadre d'un simple fractionnement.

En ce qui concerne le couplage à l'ortho-diaminobenzène, l'allongement est fortement augmenté mais moins que dans le cas de l'hydrazine, tandis que la contrainte est moins affectée. A partir de cela, deux hypothèses peuvent être proposées. La première consiste à dire que la structure du linker rigidifie un peu la macromolécule mais la taille de l'ortho-diaminobenzène reste tout de même très petite par rapport à une molécule d'amylopectine ce qui rend cette hypothèse peu probable. La deuxième, quant à elle plus plausible, prend en compte la réactivité de l'amine secondaire portée par un cycle aromatique. En partant de ce principe, il est possible d'envisager que le rendement du couplage à l'ortho-diaminobenzène soit moins important que celui à l'hydrazine et par voie de conséquence, que la taille moyenne des macromolécules de ce matériau soit plus petite.

Pour le couplage au PEG 8000 modifié, il est intéressant de constater que l'allongement est très proche de celui induit par l'hydrazine mais que, dans le même temps, la contrainte est du même ordre de grandeur que celui induit par l'ortho-diaminobenzène. Il peut être supposé aussi que le rendement du couplage a été moyen induisant une longueur moyenne des chaînes peu élevée par rapport à l'amidon natif. Ceci laisse à penser que la nature du linker est directement responsable des propriétés mécaniques intéressantes de ce matériau. En fait le PEG peut être assimilé à un ressort reliant deux macromolécules. La figure 90 schématise le couplage.

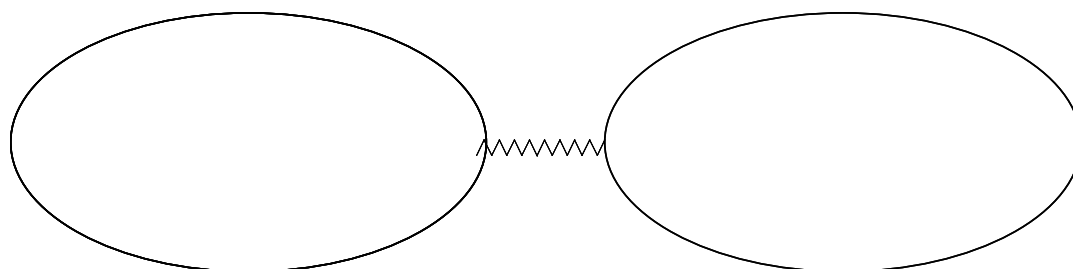


Figure 90 : Schématisation du couplage de l'amidon de blé avec le PEG 8000

Ce linker ressort introduit entre deux macromolécules joue donc un rôle probablement important dans l'amélioration des propriétés mécaniques. Non seulement, il permet le gain en allongement, mais il permet aussi de limiter la chute en contrainte de par sa structure intrinsèque. Si un parallèle est fait avec un ressort, une raideur k doit venir s'ajouter à celle de la molécule elle-même et ainsi permettre de ne pas faire chuter la valeur de la contrainte à rupture du matériau. Il serait intéressant de réaliser le couplage avec un PEG diaminé beaucoup plus long.

Il est intéressant aussi de voir si, comme cela a été le cas pour les amidons fractionnés et dégradés, les matériaux couplés s'orientent lorsque les fils sont fins. La figure 91 présentant la valeur du module d'Young en fonction de la section des fils permet de constater dans un premier temps que le module est très nettement diminué avec le couplage.

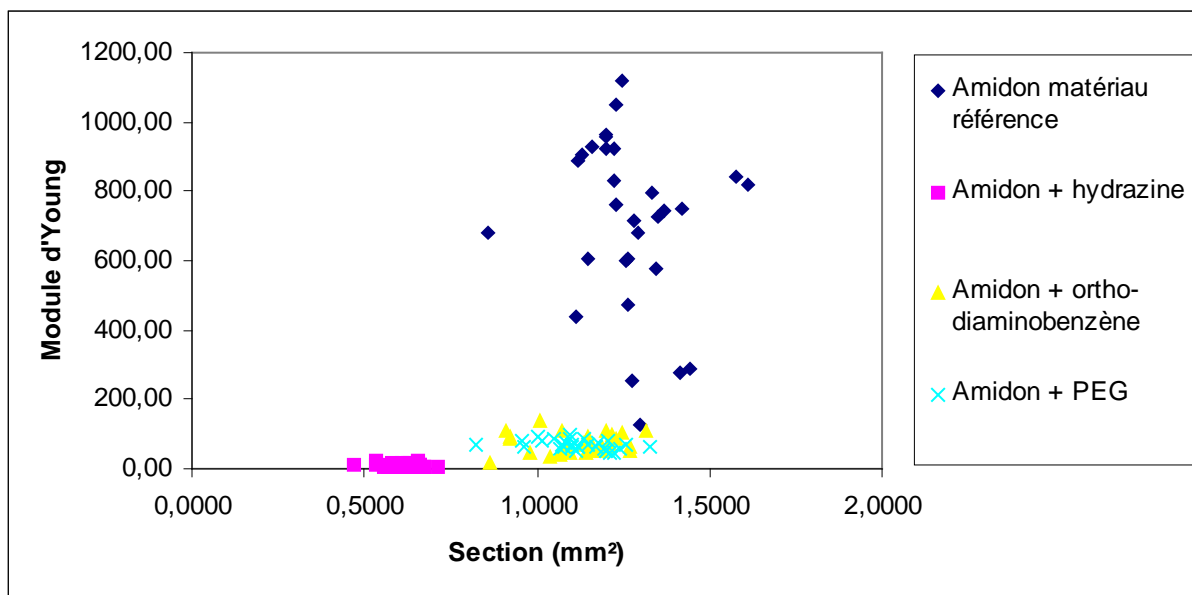


Figure 91 : Module d'Young en fonction de la section des fils d'amidons couplés

Pour les amidons couplés, comparativement à l'amidon natif, la valeur du module d'Young est divisée par 10. Elle est de 700 en moyenne pour l'amidon natif alors qu'elle n'est que de 70 pour les deux amidons présentant des sections du même ordre de grandeur. Pour l'amidon couplé à l'hydrazine, le module descend jusqu'à 10. Sur la figure 92, l'intérêt se porte uniquement sur les amidons couplés afin de voir si une légère orientation peut être observée.

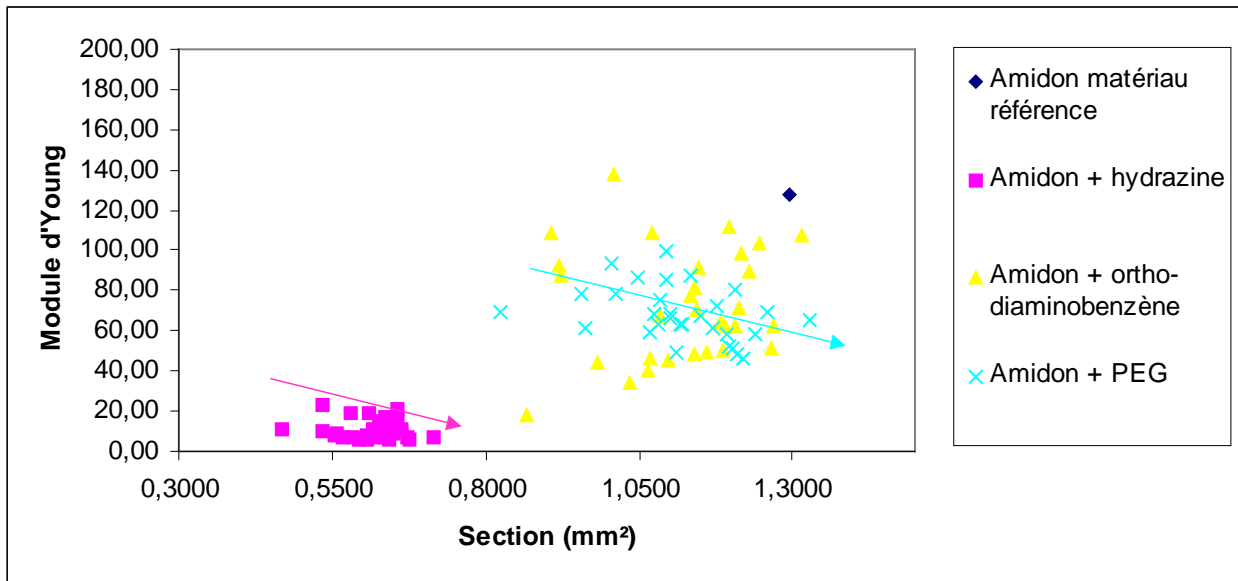


Figure 92 : Module d'Young des amidons couplés en fonction de la section du fil

Sur ce graphique, il semble qu'aucune orientation ne se mette en place pour le matériau couplé à l'ortho-diaminobenzène. Par contre, lorsque l'amidon est couplé avec le PEG 8000 ou avec l'hydrazine, le module d'Young semble diminuer légèrement avec l'augmentation de la section. Si le matériau à base d'ortho-diaminobenzène ne s'oriente pas, cela peut être dû à la nature même du linker et encore une fois au rendement obtenu lors du couplage qui ne permet pas au matériau de se différencier pleinement des propriétés d'un amidon natif. En effet, que ce soit en terme d'allongement ou de module d'Young, le matériau présente les plus mauvaises propriétés par rapport aux autres échantillons. En terme de contrainte, lorsqu'il est comparé à l'amidon couplé avec l'hydrazine (linker le plus proche structurellement), il se retrouve aussi en retrait.

Pour voir l'impact sur les propriétés des différents facteurs étudiés jusqu'à présent, un essai de couplage à l'aide du PEG a été réalisé sur la dextrine 10%. En effet, ce couplage permet de voir si le couplage et la dégradation utilisés conjointement pour obtenir un matériau permet ou non de cumuler les effets observés dans chacun des cas. Après avoir étudié la force à rupture et l'allongement à rupture en fonction de la section, le matériau issu du couplage de la dextrine 10% avec le PEG 8000 est rapporté dans le graphique Contrainte /Allongement de la figure 93 présentant les propriétés mécaniques à rupture des amidons dégradés et couplés.

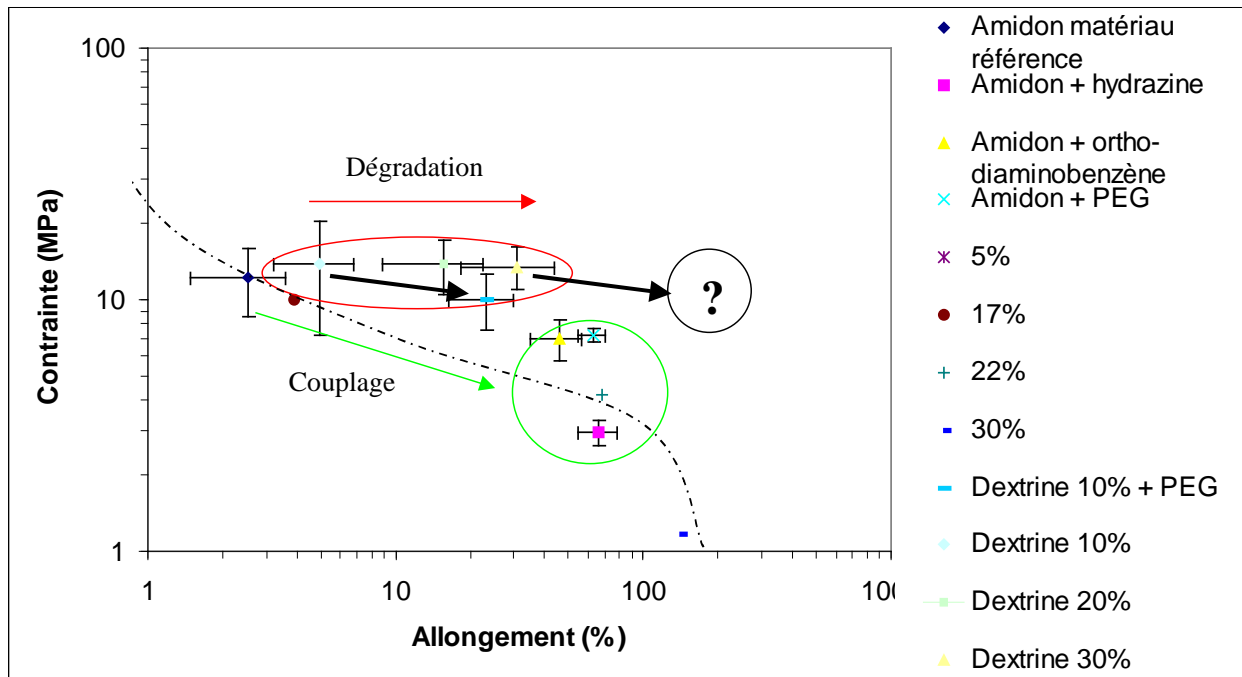


Figure 93 : Comparaison des propriétés mécaniques des amidons dégradés et couplés

Sur ce graphique apparaissent distinctement les deux zones de propriétés pouvant être atteintes par l'amidon de blé lorsqu'il est modifié, soit par élagage enzymatique, soit par couplage chimique ciblé sur l'extrémité réductrice. L'élagage enzymatique par β -amylase permet d'augmenter l'allongement sans diminuer la contrainte lorsque le taux de dégradation augmente. Le couplage chimique permet, quant à lui, d'augmenter l'allongement en diminuant plus ou moins la contrainte en fonction du linker. Il ressort des tests de traction que le linker le plus efficace pour améliorer les propriétés mécaniques est le polyéthylène glycol (PEG) 8000 modifié. Ce graphique montre bien également que le fait de réaliser le couplage avec le PEG sur la dextrine 10% permet d'augmenter l'allongement de façon importante (de 5 à 23%) en ne diminuant que très peu la contrainte (de 13 à 10 MPa). Il serait donc intéressant de faire le couplage au PEG 8000 (voire même plus long) sur les autres dextrans en particulier celles à 30% et 50% (limite). Cela permettrait certainement d'atteindre des allongements au moins supérieurs à ceux obtenus par simple couplage ($> 100\%$) et surtout des contraintes autour de 10 Mpa, ce qui permettrait d'obtenir facilement des matériaux dont les propriétés mécaniques n'auraient jamais été atteintes.

P. Dole a proposé de comparer les propriétés mécaniques des amidons avec les matériaux plastiques classiques usuels ^[148] dans un graphique Contrainte / Allongement. La figure 94 se propose de schématiser la place des amidons dégradés et couplés par rapport aux plastiques usuels.

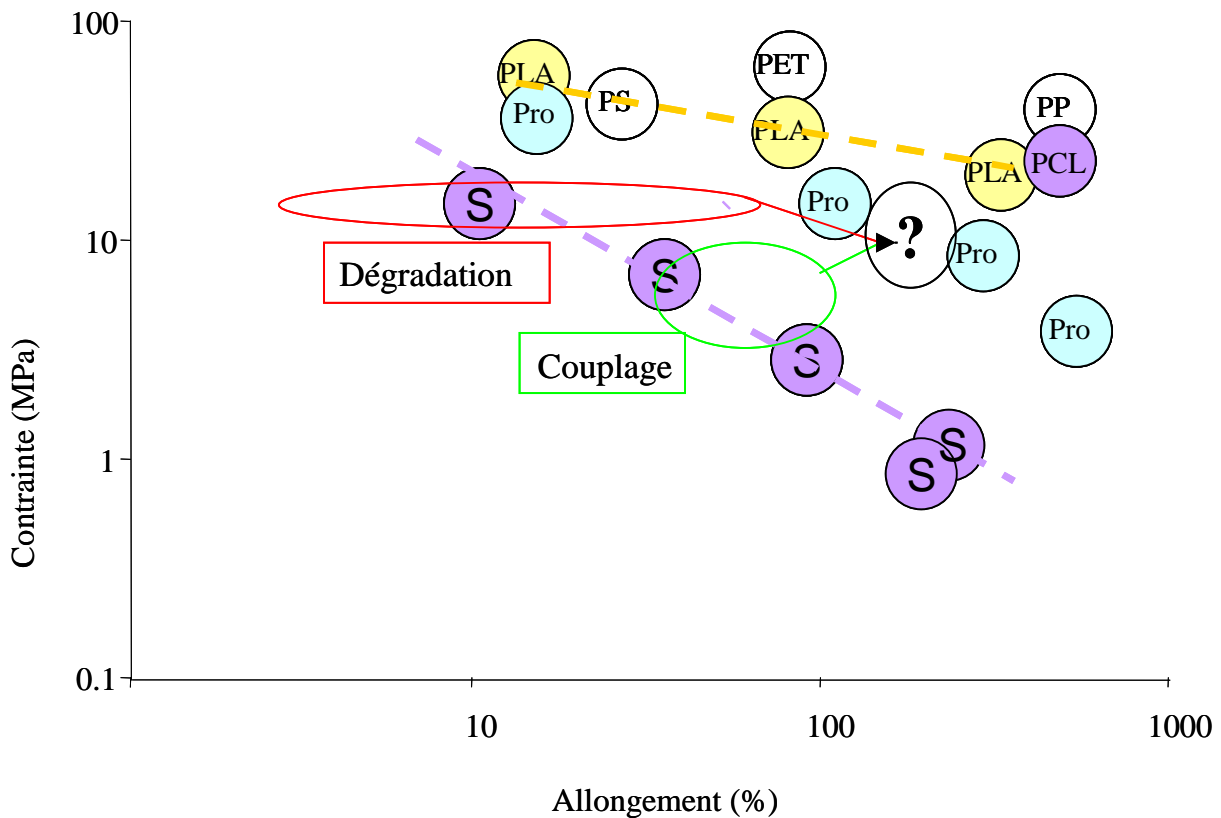


Figure 94 : Comparaison des propriétés mécaniques entre amidons natifs et amidons modifiés avec les plastiques usuels d'après P. Dole ^[148]

Ce graphique montre bien que les dextrines les plus élaguées et que l'amidon couplé au PEG permettent de se décaler de la courbe S représentant les propriétés mécaniques des amidons de référence. Il ressort que les perspectives que propose l'élagage enzymatique associé au couplage chimique ciblé, permettent de penser que les matériaux à venir possèderaient des propriétés mécaniques se rapprochant de celles de matériaux base protéines et dans une moindre mesure du PLA.

Conclusion

A partir des travaux présentés dans ce chapitre, quelques conclusions peuvent être tirées :

i) Le fractionnement physique des amidons de blé et de pomme de terre a mis en lumière une différence majeure entre les deux amidons qui n'avait pas encore été présentée. Nous avons montré qu'il existe dans le cas de l'amidon de blé une relation entre taille des grains et taille des macromolécules, alors que ce n'est pas le cas pour l'amidon de pomme de terre. De plus, au sein de l'amidon de blé, plusieurs populations ont été isolées et deux d'entre elles ont été testées. Les propriétés mécaniques de l'amidon matériau référence sont totalement encadrées par celles des deux populations de petits et gros grains.

ii) En réalisant des dextrines partielles ou limites par dégradation β -amylasique, les propriétés mécaniques ont été modifiées. Un gain en allongement et une relativement faible diminution de la contrainte ont été observés. De plus, ces modifications de propriétés sont progressives et fonction du taux de dégradation qu'à subi l'amidon de référence. Elles permettent, en outre, une meilleure solubilisation des macromolécules pour la réalisation de films. Par ailleurs, les dextrines limites ont montré qu'elles étaient insensibles au vieillissement dans les conditions de température et d'humidité relative choisies, confirmant ainsi ce qui a été observé par analyses thermiques faites par DSC. Enfin, lorsque le taux de dégradation avance, les fils obtenus après extrusion sont de plus en plus fins. De ceci découle que la dégradation permet une meilleure orientation des macromolécules.

iii) Lorsque l'amidon est couplé par double amination réductrice, les propriétés mécaniques ont été modifiées de façon intéressante. En effet, le couplage permet d'augmenter très nettement l'allongement du matériau. Par ailleurs, la taille et la nature du linker permet d'accéder à des zones du graphique Contrainte / Allongement qui n'avaient pas été atteintes.

iv) Il a également été montré que le choix de l'igname comme amidon possédant des macromolécules de très fortes masses molaires était intéressant. Toutefois, la réalisation de matériau référence par casting n'a pas été possible et nous a orienté vers une autre méthode de traction.

v) Nous avons pu coupler ces 4 approches deux à deux :

- Elagage d'amidon d'igname
- Couplage de dextrine avec le PEG 8000 modifié

Il semble que les approches soient additives puisque les propriétés obtenues dans ces deux cas cumulent les effets de chaque modification. Il devient alors envisageable de fractionner de l'igname puis de l'élaguer par β -amylolyse et de réaliser le bolaforme avec un PEG modifié beaucoup plus long que celui utilisé dans notre étude.

V) Matériels

1) Les amidons

L'amidon majoritairement utilisé a été l'amidon de blé fourni par la société Chamtor (Pomacle). Toutefois, des amidons d'origines botaniques différentes ont été également utilisés. L'amidon de manioc et les deux types d'amidons d'igname, le blanc et le jaune, ont quant à eux été directement achetés chez un commerçant rémois.

2) Les dextrans

Les trois types de dextrans utilisés ont tous été fournis par la société Sigma-Aldrich. Les réactions de couplage ont été réalisées sur les dextrans de masse molaire 10000, 43000 et 73000 g/mol.

3) Le plastifiant

Un seul et unique plastifiant a été utilisé pour ces travaux de thèse, il s'agit du glycérol fourni par la société Sigma-Aldrich.

4) Les agents de couplage

Pour réaliser le couplage du maltose, puis des différents modèles que sont les dextrans, les dextrines partielles et limites ou bien directement sur l'amylose et l'amidon de blé, trois agents de couplage aminés (hydrazine, benzidine et ortho-diaminobenzène), un polymère (polyéthylène glycol) et un acide gras insaturé (acide azélaïque) ont été choisis. Ils ont tous été fournis par la société Sigma-Aldrich.

5) L'enzyme

Pour réaliser les différentes dégradations enzymatiques, la β -amylase (E.C. 3.2.1.2) a été utilisée. Elle a été fournie par la société Sigma-Aldrich.

VI) Méthodes

1) Traitements initiaux sur les amidons

Lors des différentes manipulations, les amidons utilisés n'ont pas été formulés à l'état brut, ils ont subi, en fonction de la voie suivie, différents traitements.

a) Déprotéination et dégraissage

α) Déprotéination d'un amidon : méthode de E. Bertoft^[100]

60 g d'amidon sont mis en solution dans 372 ml d'un mélange de rapport 5/1 en Chloroforme/n-Butanol. La suspension d'amidon est laissée sous agitation dans le mélange pendant une nuit à température ambiante. Après filtration, la suspension est filtrée sur papier filtre puis la pâte obtenue est mise à sécher à l'étuve à 80°C pendant 2 heures. Après séchage, on récupère 56 g d'une poudre blanche d'amidon déprotéiné.

β) Dégraissage d'un amidon

56 g d'amidon déprotéiné sont placés en deux fractions, dans des petits sacs de papier filtre, dans un montage de Soxhlet. Ainsi, dans un ballon d'un litre, 480 ml d'éthanol sont mis au reflux en présence de quelques grains de carbure de silicium. Le reflux est maintenu pendant 24 heures puis les deux sachets sont placés à l'étuve à 80°C pendant 2 heures. Après séchage, on récupère 53 g d'amidon sec dégraissé.

b) Séparation Amylose/Amylopectine : méthode de Gilbert^[99]

Dans 4,4 l d'eau distillée, 960 ml de solution de soude à 32% sont ajoutés. Dans cette solution désormais à 18% en soude, 200 g d'amidon déprotéiné, dégraissé et sec sont additionnés doucement et sous forte agitation. 50 mg d'azoture de sodium (NaN_3) sont également additionnés pour éviter toute moisissure. L'ensemble est placé dans un bain de glace. La solution devient rapidement très visqueuse. L'agitation est maintenue pendant suffisamment longtemps pour éliminer tous les grumeaux puis est laissée reposer pendant la nuit à 4°C. La solution est versée dans 8 l d'une solution de $\text{H}_2\text{O}/n\text{-butanol}$ (92/8). L'addition se fait sur au moins 5 minutes sous forte agitation tandis que la solution devient franchement blanche. Le pH est ramené autour de 7-8 à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique à 35%. L'agitation est maintenue pendant une heure puis stoppée pour laisser la solution 48 heures au repos pour que le n-butanol puisse bien complexer l'amylose. La solution est ensuite centrifugée à trois reprises dans une écrémeuse afin de récupérer l'amylose complexé. Il est ensuite lavé par extraction à l'éthanol dans un montage soxhlet afin d'éliminer le n-butanol. La masse d'amylose récupéré est de 28 g. Dans le jus clarifié par l'écrémeuse, 9 l d'acétone sont additionnés pour faire précipiter l'amylopectine. La solution ainsi obtenue est mise au froid pour la nuit. De la même façon que précédemment, la solution est écrémée à trois reprises. L'amylopectine ainsi récupérée est ensuite solubilisée dans 600 ml de soude à 10 mmol.l^{-1} , puis neutralisée au CO_2 pour redescendre le pH à 8. Le tout est ensuite placé dans un boudin de dialyse dont la taille des pores est de 6000-8000 Daltons afin d'éliminer les restes d'acétone et de n-butanol. La masse totale d'amylopectine récupérée est de 124 g.

c) Tamisage

α) Amidon de blé

200 g d'amidon de blé déprotéiné et dégraissé sont placés dans une tamiseuse automatique Analysette 3 PRO composée de 4 tamis Roucaire dont les tailles nominales de mailles sont de 100, 71, 38 et 25 μm . Après une heure d'agitation avec une amplitude de tamisage de 1,5 mm, 3 fractions distinctes sont récupérées :

- une fraction dont le diamètre des grains est supérieure à 38 μm => 9,63 g soit 5%

- une fraction dont le diamètre est compris entre 38 et 25 μm \Rightarrow 166 g soit 84%
- une fraction dont le diamètre est inférieur à 25 μm \Rightarrow 25 g soit 12%

β) Amidon de pomme de terre

200 g d'amidon de pomme de terre déprotéiné et dégraissé sont placés dans la tamiseuse automatique. Après trois heures d'agitation, avec une amplitude de tamisage de 1,5 mm, trois fractions distinctes sont récupérées :

- une fraction dont le diamètre des grains est compris entre 71 et 38 μm \Rightarrow 114 g soit 57%
- une fraction dont le diamètre est compris entre 38 et 25 μm \Rightarrow 84 g soit 42%
- une fraction dont le diamètre est inférieur à 25 μm \Rightarrow 1,45 g soit 1%

d) Dégradation enzymatique

α) Dégradation partielle

20 g d'amidon sont gélatinisés dans 400 ml d'eau distillée. Cette solution d'amidon gélatinisé est ensuite placée dans un bécher en ajoutant 450 ml d'eau distillée et 150 ml de tampon acétate 0,1 M de manière à obtenir une concentration en amidon de 20 g/l et un pH de 4,8. A cette solution portée à 50°C, 1 ml de solution de β -amylase à 50 UI/ml est ajouté.

Cette dégradation enzymatique est suivie par dosage du maltose, selon la méthode de Luff-Schoorl^[143, 144]. Ce dosage est réalisé sur un échantillon de 5 ml prélevé toutes les 30 minutes. L'activité de l'enzyme est stoppée lorsque la dégradation est arrivée à terme en ajoutant 50 ml d'éthanol suivi d'un passage à ébullition de la solution pendant 5 minutes au four micro-ondes.

	Taux de dégradation (%)	Durée de l'hydrolyse (min)
Dextrine 5	5	17
Dextrine 10	10	79
Dextrine 20	20	202
Dextrine 40	40	326

Tableau 16 : Taux de dégradation d'un amidon en fonction du temps de réaction

Pour éliminer le maltose issu de la dégradation de l'amidon par la β -amylase, la solution est dialysée sur membrane de cellulose régénérée à un seuil de coupure de 10 KDa. Le concentrat est ensuite congelé puis lyophilisé.

β) Dégradation limite

20 g d'amidon sont gélatinisés en autoclave dans 400 ml d'eau distillée. Cette solution d'amidon gélatinisé est ensuite placée dans un bécher en ajoutant 450 ml d'eau distillée et 150 ml de tampon acétate de manière à obtenir une concentration en amidon de 20g/l et un pH de 4,8. A cette solution portée à 50°C, on ajoute 1 ml de solution de β -amylase à 50 UI/ml. On laisse sous agitation pendant 24 heures. La solution est ensuite dialysée sur membrane cellulose régénérée à un seuil de coupure de 10 KDa. Le concentrat est ensuite congelé puis lyophilisé.

2) Chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

La chromatographie d'exclusion stérique (SEC) ou perméation de gel (GPC) est une méthode de chromatographie liquide basée sur la séparation des molécules en fonction de leur taille. Le brut à purifier est déposé sur une phase stationnaire poreuse dont la taille des pores est calibrée. De cette façon, les molécules, entraînées par une phase mobile, en fonction de leur taille pénétreront ou non à l'intérieur des pores. Ainsi toutes les molécules ne parcourent pas la même distance au sein de la phase stationnaire. Cette différence de distance se traduit par une différence de temps de rétention et donc de volume d'élution final puisque pour cette méthode,

le débit de la phase mobile est maintenu constant. Les molécules les plus grosses sont éluées les premières tandis que les plus petites sortiront en derniers. On récupère alors les molécules dans l'ordre inverse de leur masse molaire.

La phase stationnaire utilisée est le gel de Sepharose CL2B (Pharmacia). Celle-ci est calibrée à l'aide de dextrane bleu de masse molaire connue ($M_w = 2 \times 10^6$ g/mol). 1 ml d'une solution de dextrane bleu à 10 mg/ml et de concentration 10 millimolaire en soude est injectée puis éluee avec une solution de soude à 10^{-2} mol/l contenant quelques milligrammes d'azoture de sodium utilisé comme antifongique. Le débit qui a été mis en place est de 1,6 ml/min.

3) Ultra-filtration frontale agitée

Cette méthode permettant de séparer différents composants d'un mélange en fonction de leur taille a été utilisée dans différentes cuves : 100, 300 et 2500 ml. Le principe simple est de pousser une solution d'amidon (plusieurs concentrations en amidon ont été testées) dans la soude (plusieurs concentrations de soude ont également été testées) par le biais d'un gaz inerte au travers d'une membrane dont le seuil de coupure est connu. Différentes membranes en polyéthersulfone ayant des seuils de coupures : 0,25 ; 0,4 et 1 μ m et 1 ; 10 KDa ont été utilisées. Pour les cuves de 100 et 300 ml, les meilleures conditions de solubilisation pour permettre une séparation sont 1g/l en amidon et ceci dans des solutions de soude allant de 0,1 à 0,5 mol/l. Par contre, pour la cuve de fort volume, des concentrations en amidon de 20 à 30 g/l pour les même concentrations en soude ont pu être atteintes.

Pour obtenir les solutions, une gélatinisation de 20 g d'amidon en autoclave dans 400 ml d'eau distillée est tout d'abord réalisée, puis après refroidissement jusqu'à température ambiante, 100 ml d'eau distillée puis 500 ml de solution de soude sont ajoutés afin d'obtenir la concentration souhaitée.

Des solutions à partir d'amidon déjà gélatinisé et lyophilisé ont aussi été faites. Ainsi, une solution à 20 g/l dans 500 ml de DMSO / 10% LiCl (p/p) a pu être produite.

Pour chacune des manipulations, l'ultra-filtration s'est déroulée en deux étapes successives dont la première est la filtration sur la membrane ayant le seuil de coupure le plus élevé. De ce fait, pour chaque expérience, deux ultraconcentrats et un filtrat ont été récupérés.

Dénomination des solutions utilisées

AGS0,1 : Solubilisation de 10 g d'amidon gélatinisé dans 500 ml de soude (NaOH) à 0,1 M (ou 20 g dans 1 L).

Ultra-filtration sur membrane 0,45 et 0,2 μm .

AGS0,5 : Solubilisation de 20 g d'amidon gélatinisé dans 1 L de soude à 0,5 M.

Ultra-filtration sur membrane 0,45 et 0,2 μm .

AS0,5 : Gélatinisation de 20 g d'amidon dans 400 ml d'eau distillée, refroidissement de la solution jusqu'à température ambiante, ajout de 100 ml d'eau distillée et 500 ml de soude à 1 M de manière à obtenir une concentration en amidon à 20 g/L et en soude à 0,5 M.

Ultra-filtration sur membrane 0,45 et 0,2 μm .

A0 : Gélatinisation de 20 g d'amidon dans 400 ml d'eau distillée puis ajout de 600 ml d'eau distillée.

Ultra-filtration sur membrane 0,45 et 0,2 μm .

A_{DMSO} : Solubilisation de 10 g d'amidon gélatinisé dans 500 ml de DMSO / 10% (p/p) LiCl

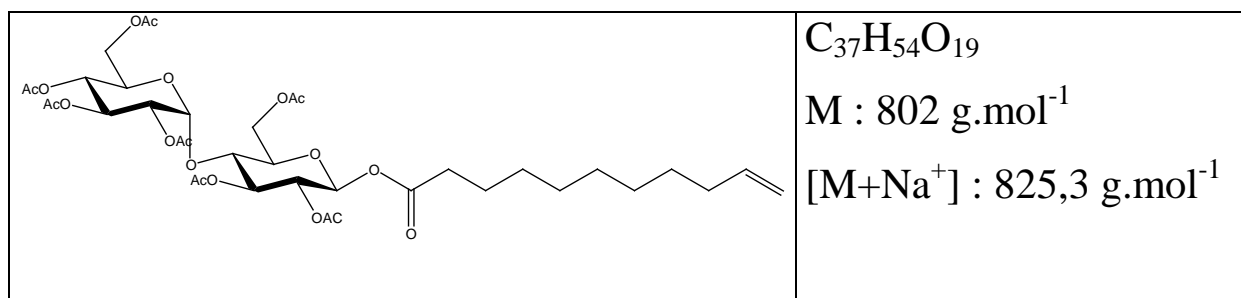
Ultra-filtration sur membrane 0,2 μm avec une cuve de 300 ml

AS0,5 bis : Identique à AS0,5 mais ultra-filtration sur membrane 1 et 0,45 μm .

Pour chaque manipulation, l'ultra-filtration est dans un premier temps réalisée sur le filtre de plus haute porosité. L'ultraconcentrat obtenu est congelé, l'ultrafiltrat récupéré est passé sur le filtre inférieur et ainsi de suite. Chaque fraction est lyophilisée puis pesée.

4) Modifications chimiques

a) Synthèse de l'undécylénate d' α -O-heptaacétylmaltosyle :



2,37 g (3,38 mmol) de 1-bromo-*O*-peracétylmaltose ainsi que 1,01 ml d'acide undécylénique (5,08 mmol, 1,5 équivalent) sont solubilisés dans 8 ml de dichlorométhane. Par ailleurs, 940 mg de carbonate de potassium (K_2CO_3) et une goutte d'aliquat 336 sont solubilisés dans 8 ml d'eau distillée. La solution aqueuse est versée dans la phase organique. Le pH doit être au moins de 9 pour que la réaction soit efficace. Le tout est placé sous argon à température ambiante sous agitation magnétique forte. L'émulsion obtenue est de couleur blanchâtre orangée. Après une semaine la réaction est arrêtée par ajout de 50 ml de dichlorométhane et 25 ml (x2) d'eau distillée pour laver la phase organique puis centrifugation pour casser l'émulsion. Après séchage au sulfate de magnésium ($MgSO_4$) et évaporation sur évaporateur rotatif, on récupère 2,756g de brut. Celui-ci est ensuite chromatographié sur gel de silice avec un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (7/3, v/v) pour conduire à 1,090g d'undécylénate d' α -*O*-heptaacétylmaltosyle pur (Rdt : 42%) sous forme de cristaux bruns après évaporation.

Description du produit :

Point de fusion : 55°C

Pouvoir rotatoire spécifique : $[\alpha]_D^{25} = 52,5$ (c= 1 g.l⁻¹, $CHCl_3$)

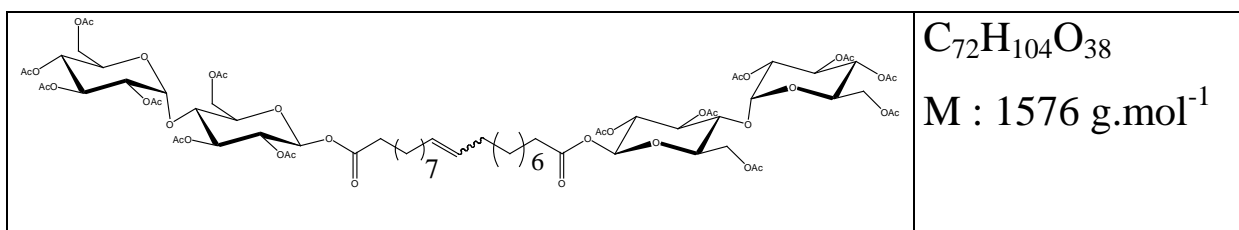
Masse exacte $[M+Na^+] : 825,3150 \text{ g.mol}^{-1}$

RMN ^{13}C (CDCl_3) : δ (ppm) : 20,30 ; 20,36 ; 20,44 ; 20,55 ; 20,67 (7 CH_3 d'Acétates) / 24,41 ($\text{C}_{3''}$) / 28,73 ; 28,84 ; 28,94 ; 29,50 (4 C'' de la chaîne) / 29,05 ($\text{C}_{8''}$) / 33,56 ($\text{C}_{9''}$) / 33,87 ($\text{C}_{2''}$) / 61,45 (C_6) / 62,54 ($\text{C}_{6'}$) / 68,05 (C_4') / 68,53 ($\text{C}_{5'}$) / 69,27 ($\text{C}_{3'}$) / 69,99 ($\text{C}_{2'}$) / 70,93 (C_2) / 72,67 (C_4) / 72,97 (C_5) / 75,09 (C_3) / 91,09 (C_1) / 95,66 ($\text{C}_{1'}$) / 114,05 ($\text{C}_{11''}$) / 138,90 ($\text{C}_{10''}$) / 169,22 ; 169,26 ; 169,62 ; 169,82 ; 170,16 ; 170,23 ; 170,33 (7 C d'Acétates) / 171,39 ($\text{C}_{1''}$).

RMN ^1H (CDCl_3) : δ (ppm) : 1,26 (m, 4 H'') / 1,34 (t, 2H, $\text{H}_{8''}$) / 1,57 (t, 2H, $\text{H}_{3''}$) / 2,03 (m, 21H d'acétate, $\text{H}_{9''}$) / 2,31 (t, 2H, $\text{H}_{2''}$) / 3,83 (m, 1H, H_5) / 3,94 (m, 1H, $\text{H}_{5'}$) / 4,02 (t, 1H, H_4) / 4,03 (dd, 1H, H_{6a}) / 4,20 (t, 1H, H_{6b}) / 4,22 (t, 1H, $\text{H}_{6a'}$) / 4,42 (dd, 1H, $\text{H}_{6b'}$) / 4,83 (dd, 2H, H_2) / 4,89 (d, 2H, $\text{H}_{11''}$) / 4,93 (t, 2H, H_2) / 5,02 (t, 2H, H_4) / 5,27 (t, 2H, H_3) / 5,32 (t, 2H, H_3) / 5,37 (d, 1H, H_1) / 5,74 (d, 1H, H_1) / 5,81 (m, 1H, H_{10}).

I.R (cm^{-1}) : 3079 (bande peu large et peu intense) ; 1640 (bande peu large et moyennement intense) ; 907 (bande moyennement large et moyennement intense) correspondant à la fonction éthylénique / 778 (bande fine et moyennement intense) correspondant à une chaîne aliphatique / 1435 (bande peu intense et peu large) correspondant aux méthyles des acétates / 1745 (bande très intense et large) correspondant aux fonctions esters.

b) Synthèse de l'icosyl-10-énate de di- α -O-heptaacétylmaltosyle :



500 mg d'undécylénate d' α -O-heptaacétylmaltosyle (0,62 mmol) sont solubilisés sous atmosphère d'argon dans 2,5 ml d'une solution contenant 25 mg ($3,115 \cdot 10^{-5}$ mol, soit 0,05 équivalent) de catalyseur de Grubbs de première génération. La concentration finale de cette solution violette est alors de $0,25 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Après 24 heures de réaction à température ambiante et sous agitation magnétique, la solution est filtrée sur coton puis évaporée sous pression réduite. 441,5 mg de brut sont ainsi récupérés sous la forme d'une mousse noire. Une chromatographie sur gel de silice avec un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (5/5, v/v)

conduit après évaporation à 308,6 mg d'icosyl-10-èneate de di- α -*O*-heptaacétylmaltosyle pur (Rdt : 63%) sous forme d'une poudre marron.

Description du produit :

Point de fusion : 67 °C

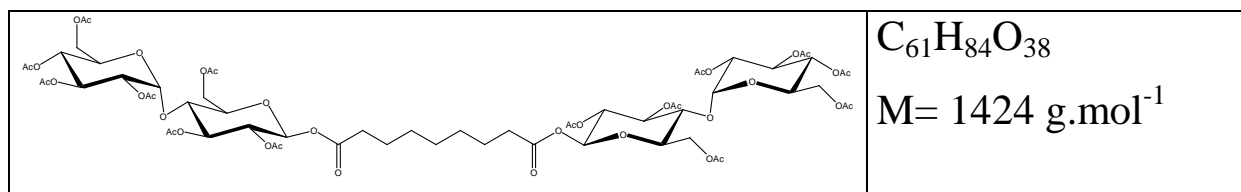
Pouvoir rotatoire spécifique : $[\alpha]_D^{25} = +50,8$ (c = 1,03 g.l⁻¹, CHCl₃)

Masse exacte [M+Na⁺] : 1599,7g.mol⁻¹

RMN ¹³C (CDCl₃) : δ (ppm) : 20,40 ; 20,56 ; 20,69 ; 20,77 (7 CH₃ d'acétates) / 24,45 (C_{3''}) / 28,82 ; 28,99 ; 29,07 ; 29,17 ; 29,49 (5 C'' de la chaîne) / 32,47 (C_{4''}) / 33,90 (C_{2''}) / 61,35 (C₆) / 62,45 (C_{6'}) / 67,85 (C_{4'}) / 68,47 (C_{5'}) / 69,19 (C_{3'}) / 69,92 (C_{2'}) / 70,86 (C₂) / 72,35 (C₄) / 72,86 (C₅) / 75,15 (C₃) / 91,00 (C₁) / 95,60 (C_{1'}) / 130,20 (C_{10''}) / 169,35 ; 169,41 ; 169,78 ; 169,98 ; 170,33 ; 170,40 ; 170,47 (7 C d'Acétates) / 171,53 (C_{1''}).

RMN ¹H (CDCl₃) : δ (ppm) : 1,25 (m, 21 H d'acétates) / 1,58 (m, H_{3''}) / 1,94 (m, H_{4''}) / 1,98-2,12 (m, 10H'' de la chaîne) / 2,32 (t, H_{2''}) / 3,84 (dt, H₅) / 3,93 (dt, H_{5'}) / 4,03 (t, H₄) / 4,03 (dd, H_{6a}) / 4,23 (dd, H_{6'a}) / 4,23 (dd, H_{6b}) / 4,44 (dd, H_{6'b}) / 4,85 (dd, H_{2'}) / 4,96 (t, H₂) / 5,05 (t, H_{4'}) / 5,29 (t, H₃) / 5,3 (t, H_{3'}) / 5,3 (m, H_{10''}) / 5,40 (d, H_{1'}) / 5,75 (d, H₁).

c) Synthèse de l'azélate de di- α -heptaacétylmaltosyle



1 g (1,43 mmol) de 1-bromo-*O*-peracétylmaltose ainsi que 815 mg d'acide azélaïque (0,57 mmol, soit 0,4 équivalent) sont solubilisés dans 2,5 ml de dichlorométhane. Par ailleurs, 157 mg de carbonate de potassium (K₂CO₃) et deux gouttes d'aliquat 336 sont solubilisés dans 2 ml d'eau distillée. La solution aqueuse est versée dans la phase organique. On basifie la solution

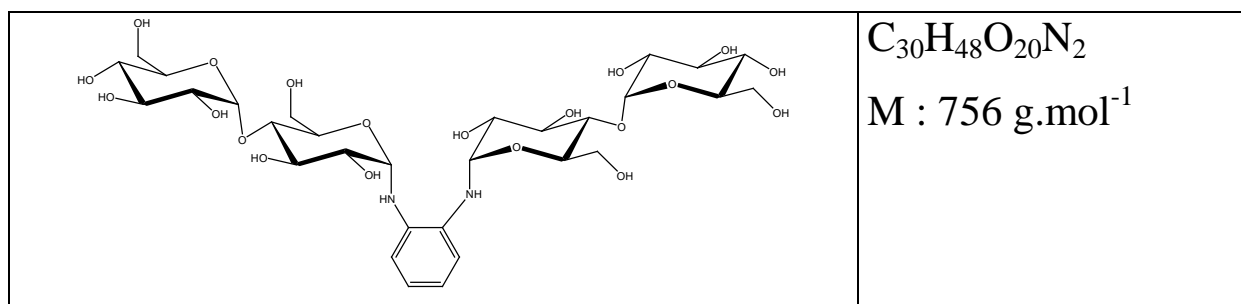
avec autant de carbonate de potassium que nécessaire pour atteindre un pH de 9. Le tout est placé sous argon à température ambiante sous agitation magnétique forte. L'émulsion obtenue est de couleur blanchâtre. Après une semaine, 50 ml de dichlorométhane sont ajoutés, on lave la phase organique par 25 ml (x2) d'eau distillée. Après séchage au sulfate de magnésium (MgSO₄) et évaporation sur évaporateur rotatif, on récupère 952,6 mg de brut. Celui-ci est ensuite chromatographié sur gel de silice avec un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (6/4 puis 5/5, v/v) pour conduire à 621 mg d'azélate de di- α -heptaacétylmaltosyle pur (Rdt : 61%) sous forme de cristaux blancs après évaporation.

Description du produit :

RMN ¹³C (CDCl₃) : δ (ppm) : 20,50-20,93 (CH₃ d'acétates) / 24,34 (C_{3''}) / 28,61 (C_{4''}) / 33,84 (C_{2''}) / 61,38 (C₆) / 62,45 (C_{6'}) / 67,86 (C_{4'}) / 68,50 (C_{5'}) / 69,23 (C_{3'}) / 69,95 (C_{2'}) / 70,88 (C₂) / 72,34 (C₄) / 72,91 (C₅) / 75,17 (C₃) / 91,07 (C₁) / 95,63 (C_{1'}) / 169,45-170,67 (C d'Acétates) / 171,51 (C_{1''}).

RMN ¹H (CDCl₃) : δ (ppm) : 1,23 (s, H_{4''}) / 1,56 (m, H_{3''}) / 1,97-2,30 (m, H d'acétates) / 2,32 (t, H_{2''}) / 3,81 (dt, H₅) / 3,91 (dt, H_{5'}) / 4,01 (m, H₄, H_{6a}) / 4,22 (m, H_{6'a}, H_{6b}) / 4,44 (dd, H_{6'b}) / 4,83 (m, H_{2'}) / 4,94 (t, H₂) / 5,04 (t, H_{4'}) / 5,27 (t, H₃) / 5,32 (t, H_{3'}) / 5,38 (d, H_{1'}) / 5,71 (d, H₁).

d) Diamination réductrice sur le maltose



2 g de maltose (5,54 mmol) sont solubilisés dans 1 ml d'eau. Ensuite sont additionnés dans cet ordre, 300 mg d'ortho-diaminobenzène (2,77 mmol soit 0,5 équivalent) et 175 mg de cyanoborohydrure de sodium (2,77 mmol). Le mélange réactionnel après 10 jours est placé dans un boudin de dialyse de seuil de coupure de 6000-8000 Daltons. Après deux jours de

dialyse pendant lesquels l'eau du bain est régulièrement renouvelée, le contenu du boudin est congelé puis lyophilisé. 532 mg de produit sont récupérés et ne sont pas purifiés. Toutefois l'analyse par spectrométrie de masse montre que la réaction a été effective par la présence du pic du bolaforme monohydrate [$M_{\text{monohydrate}} + H^+$] = 771 g.mol⁻¹.

Description du produit :

Micro-analyse : C : 37,67% ; H : 5,20% ; N: 4,15%

RMN ¹H (D₂O) : δ (ppm) : 3-4,25 (H du maltose autre que anomériques) / 4,8-5,22 (H anomérique) / 6,70-6,82 (H benzéniques).

Le même protocole est suivi pour le couplage à l'hydrazine.

e) Couplage des dextrines

α) Dextrine 10 KDa

503 mg de dextrine 10400 Daltons ($4,83 \cdot 10^{-5}$ mol) sont solubilisés dans 5 ml d'eau. A cette solution sont additionnés 4,3 mg de benzidine ($2,4 \cdot 10^{-5}$ mol soit 0,5 équivalent) ainsi que 1,5 mg de cyanoborohydrure de sodium ($2,4 \cdot 10^{-5}$ mol soit 0,5 équivalent). Pour aider à la solubilisation de la benzidine, 0,5 équivalent d'acide acétique sont introduits dans le milieu réactionnel, puis il est placé à l'abri de la lumière. Après 10 jours de réaction, la solution rose est transférée dans un boudin de dialyse de seuil de coupure de 6000-8000 Daltons. Après avoir changé régulièrement l'eau du bain, le contenu du sac est congelé puis lyophilisé. On récupère 422 mg de poudre blanche non purifiée. Avec cette poudre, 1 ml de solution à 2 g.l⁻¹ est réalisée et passé sur deux colonnes Shodex en série dont les seuils de coupure sont de 4 millions puis 1 million afin de faire une Chromatographie d'exclusion stérique. Le produit de départ est retenu pendant 41 minutes et 24 secondes tandis qu'après couplage le produit sort après 39 minutes et 36 secondes. Cette différence de temps confirme que le couplage a bien eu lieu.

β) Dextrine 40 KDa

511 mg de dextrine 40300 Daltons ($1,16 \cdot 10^{-5}$ mol) sont solubilisés dans 5 ml d'eau. A cette solution sont additionnés 1 mg de benzidine ($0,58 \cdot 10^{-5}$ mol soit 0,5 équivalent) ainsi que 0,4 mg de cyanoborohydrure de sodium ($0,58 \cdot 10^{-5}$ mol soit 0,5 équivalent). Pour aider à la solubilisation de la benzidine, 0,5 équivalent d'acide acétique sont introduits dans le milieu réactionnel puis il est placé à l'abri de la lumière. Après 10 jours de réaction, la solution rose est transférée dans un boudin de dialyse de seuil de coupure de 6000-8000 Daltons. Après avoir changé régulièrement l'eau du bain, le contenu du sac est congelé puis lyophilisé. On récupère 434 mg de poudre blanche non purifiée. Par spectrométrie MALDI-TOF, on observe un pic à 78579 et une forêt de pics entre 60000 et 70000. Ceci confirme bien le couplage.

γ) Dextrine 70 KDa

366 mg de dextrine 73200 Daltons ($5 \cdot 10^{-6}$ mol) sont solubilisés dans 10 ml d'une solution d'ortho-diaminobenzène de concentration $2,5 \cdot 10^{-4}$ mol.l⁻¹ ($2,5 \cdot 10^{-6}$ mol soit 0,5 équivalent). A cette solution est additionné 1 mg de cyanoborohydrure de sodium ($1,5 \cdot 10^{-5}$ mol soit 3 équivalents). Après 10 jours de réaction, la solution est complètement brune. Le milieu réactionnel est transféré dans un boudin de dialyse de seuil de coupure de 6000-8000 Daltons. Après avoir changé régulièrement l'eau du bain, le contenu du sac est congelé puis lyophilisé. On récupère 470 mg de poudre blanche non purifiée. Par spectrométrie MALDI-TOF, on observe un pic à 134853 et une forêt de pics entre 90000 et 120000. Ceci confirme bien le couplage.

f) Couplage de l'amylose à l'ortho-diaminobenzène

7,8 mg d'ortho-diaminobenzène ($7,22 \cdot 10^{-5}$ mol) sont solubilisés dans 2 ml d'une solution à pH 10. 25 mg d'amylose (obtenu par séparation d'avec l'amylopectine) puis 10 mg de cyanoborohydrure de sodium ($1,45 \cdot 10^{-5}$ mol) sont additionnés à cette solution. Ici, les quantités introduites sont mesurées par rapport à l'amylose considéré comme un maltotétraose. Après deux heures d'agitation, l'amylose est totalement solubilisé et la solution est brune. Après 2 jours de réaction, 25 mg d'amylose sont rajoutés au milieu réactionnel. Après 3 jours de

réaction, le milieu réactionnel est placé dans un boudin de dialyse de seuil de coupure de 6000-8000 Daltons. Après avoir changé régulièrement l'eau du bain, le contenu du boudin est injecté dans une colonne de chromatographie d'exclusion stérique contenant 200 ml de gel CL2B. Après chromatographie, on effectue, pour chaque fraction de 10 ml, un test à l'iode et une analyse UV. On constate que la longueur d'onde maximale (λ_{\max}) d'absorption augmente avec le volume d'élution. Ainsi, on peut regrouper en 2 fractions correspondant, aux volumes d'élution de 90 ml à 180 ml pour la première, et de 180 ml à 250 ml pour la deuxième. On concentre par dialyse sur membrane de 1 KDa. Par spectrophotométrie, on établit le DP du complexe observé dans la première fraction, passant d'une valeur comprise entre 50 et 100 avant le couplage, à des valeurs comprises entre 50 et 160 après le couplage. Cela montre bien que celui est effectif.

g) Synthèse du PEG diaminé

α) Tosylation des groupements hydroxyles d'extrémités de chaînes

5 g de PEG 8000 ($6,25 \cdot 10^{-4}$ mol) et 714 mg de chlorure de tosyle ($3,75 \cdot 10^{-3}$ soit 6 équivalents) sont solubilisés dans 60 ml de pyridine. La solution est parfaitement limpide. Après 5 jours d'agitation, la solution a jauni. Le milieu réactionnel est placé en boudin de dialyse de seuil de coupure 6000. Après avoir changé régulièrement l'eau du bain, le contenu du boudin de dialyse est congelé et lyophilisé pour récupérer *in fine* 1,881 g d'une poudre blanche non purifiée.

I.R. : Comparativement au PEG 8000, sur le spectre apparaît une bande fine et peu intense à 684 cm^{-1} correspondant au cycle benzénique du groupement tosyle / une bande fine et intense à 1113 cm^{-1} correspondant à la fonction SO_2 du groupement tosyle.

β) Synthèse de l'azido-PEG

1 g de PEG tosylé (0,12 mmol) est solubilisé dans 40 ml d'eau en présence de 47 mg d'azoture de sodium (0,72 mmol soit 6 équivalents). La solution est limpide et jaunâtre. Après 24 heures de réaction sous agitation, le milieu réactionnel est filtré sur membrane de cellulose régénérée, dont le seuil de coupure est de 1 KDa. Le concentrat est congelé puis lyophilisé. On récupère 942 mg d'un solide brun non purifié.

I.R. : La bande fine et très intense à 2021 cm^{-1} , caractéristique de la fonction azido, montre que la substitution a bien été réalisée.

γ) Synthèse du diamino-PEG

100 mg d'azido-PEG ($1,25 \cdot 10^{-5}$ mol) sont solubilisés dans 3,5 ml d'eau. Après addition de 0,1 équivalent de palladium sur charbon, soit 5 mg, le tout est placé sous atmosphère de dihydrogène. Après 48 heures de réaction sous agitation, la solution noire est filtrée sur célite®. Le filtrat est congelé puis lyophilisé pour donner 95 mg d'un solide brun non purifié.

I.R : Il y a disparition de la bande à 2021 cm^{-1} . La fonction azido a donc été réduite en amine.

h) Couplages de l'amidon

10 g d'amidon préalablement déstructuré et lyophilisé sont solubilisés dans 100 ml d'une solution de soude à $0,5\text{ mol.l}^{-1}$. L'ensemble est mis sous forte agitation pour solubiliser l'amidon. L'amidon étant polydisperse, pour 10 g d'amidon utilisé nous avons considéré arbitrairement que nous avons 10^{-6} mol de macromolécules. Ainsi, après deux heures d'agitation, l'amidon est solubilisé et l'agent de couplage est additionné à la solution :

- 16 μl ($0,5 \cdot 10^{-6}$ mol soit 0,5 équivalent) d'hydrazine
- 2,1 ml ($0,5 \cdot 10^{-6}$ mol soit 0,5 équivalent) d'une solution à $2,5\text{ mol.l}^{-1}$ d'ortho-diaminobenzène
- 3,9 mg ($0,5 \cdot 10^{-6}$ mol soit 0,5 équivalent) de diamino-PEG

Après 12 heures d'agitation, la solution est dialysée sur une membrane de cellulose régénérée de seuil de coupure de 10 KDa, en rinçant régulièrement par des fractions de 150 ml d'eau

distillée. Le concentrat est ensuite congelé puis lyophilisé pour donner une poudre blanche non purifiée. La masse finale est toujours supérieure à 10 g.

5) Mise en œuvre des matériaux

Classiquement pour mettre en œuvre des matériaux, deux méthodes sont envisageables : le casting et l'extrusion. Ces deux techniques sont tout à fait transposables à l'élaboration de matériaux issus d'agroressources tel que l'amidon. Dans le cas présent, des films ont été produits par la méthode de casting, tandis que des fils ont été fabriqués par extrusion.

a) Le casting

Au cours de ces travaux de thèse, deux formulations ont été testées. Tout d'abord, pour l'obtention de film par casting, une solution aqueuse à 4% en amidon de blé, d'igname (jaune et blanc) ou de manioc est chauffée en autoclave pendant 20 minutes afin de réaliser la gélatinisation de l'amidon. Dans cette solution avait préalablement été introduite la quantité nécessaire à l'obtention d'une formulation à 27% de glycérol par rapport à la masse d'amidon sec. La masse d'amidon sec est obtenue par soustraction de la masse d'eau présente à 50% d'humidité relative, soit à peu près 10% de la masse totale.

La solution une fois gélatinisée est coulée dans un moule revêtu de Téflon lui-même posé sur un bain de glycérol chauffé à 70°C. Ce système permet d'obtenir des films qui après séchage présentent une épaisseur homogène. Après la période de séchage, les films plus ou moins transparents sont démoulés et placés à 50% d'humidité relative avant les tests physico-chimiques.

b) L'extrusion

La méthode de l'extrusion a été employée pour l'obtention de fils et les substrats utilisés ont été l'amidon de blé déprotéiné et dégraissé mais aussi tous les amidons et dextrans couplés par double amination réductrice et les dextrans partielles et limites obtenues par dégradation enzymatique. Dans tous les cas, les substrats étaient déstructurés et lyophilisés préalablement à toute formulation.

Pour réaliser la formulation, la masse souhaitée de substrat (en général une dizaine ou une quinzaine de grammes) est placée dans 100 ml de solution d'éthanol absolu contenant une masse de glycérol équivalente à une formulation de 20,5% de plastifiant par rapport à la masse d'amidon sec. Le tout est laissé sous agitation pendant 30 minutes afin de laisser diffuser le plastifiant de la solution vers l'amidon. Puis le tout est placé sous vide afin d'éliminer l'éthanol du ballon. Une fois cette opération effectuée, le matériau est devenu friable. Il est ensuite mis à 80°C pendant une à deux heures afin d'éliminer les dernières traces d'éthanol. Enfin, le matériau est placé à 80% d'humidité relative (dans une boîte contenant une solution saturée de KBr) pendant 4 jours afin d'être extrudé plus facilement.

Les différents amidons plastifiés sont ensuite introduits en continu dans le micro-compounder ThermoHaake Minilab Rheomex CTW5. Ainsi, avec une vitesse de rotation des deux vis contrarotatives de 70 à 85 tours/minute et à une température de 100 à 110°C dans le fourreau selon les cas, un jonc de l'ordre de 3-4 millimètres de diamètre est facilement récupéré. L'inconvénient réside dans le fait que l'appareil ne peut passer que de petites quantités. C'est pourquoi ces joncs sont ensuite découpés aux ciseaux puis passés en extrudeuse mono-vis de plus forte capacité pour obtenir le jonc final de l'ordre de 0,5 millimètre de diamètre qui subira les tests de traction. Dans l'extrudeuse mono-vis SCAMIA de diamètre intérieur de 2 cm dont la vis est réglée pour tourner à 50 tours/min, les températures sont contrôlées dans les trois compartiments (Cf partie I.3.c.α) et réglées à 110, 115 et 120°C permettant ainsi à la sortie de récupérer un matériau à 128°C qui, après quelques secondes de séchage, est placé à 50% d'humidité relative pendant une semaine avant la réalisation des tests de tractions.

6) Analyses

a) Des solutions

α) Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

La spectroscopie par résonance magnétique nucléaire, RMN, est la méthode de choix pour obtenir des informations structurales (tridimensionnelles) des molécules étudiées. Par leur réponse aux impulsions magnétiques, les noyaux atomiques renseignent sur leur environnement. Les spectres RMN ^1H et ^{13}C sont enregistrés sur un spectromètre DRX 500 MHz BRUKER. Les déplacements chimiques (δ) sont donnés en ppm par rapport au TMS (TriMéthylSilane) et calibrés sur le pic du solvant deutéré utilisé.

β) Infra-Rouge (IR)

L'analyse Infra Rouge (IR) permet de visualiser, au sein d'une molécule, les différents types de fonctions et de liaisons. Elle est réalisée en transmission sur des pastilles de KBr mélangés aux produits préalablement réduits en poudre. Le spectre IR est obtenu sur un spectromètre Nicolet Magna IR 560 entre 400 et 4000 cm^{-1} . Pour chaque spectre, on a réalisé 32 accumulations. Cette méthode d'analyse a été particulièrement utile lorsque les modifications chimiques apportées aux substrats étaient proches des limites de détection de la RMN.

γ) Ultra-Violet (UV)

L'analyse par spectroscopie visible Ultra Violet (UV) permet de visualiser les chromophores présents dans une molécule et ainsi renseigner sur la présence ou non de certaines fonctions. Cette analyse a été réalisée sur un spectrophotomètre UVIKON 930 avec des cuves en quartz à la longueur d'onde de 401 nm pour le suivi des réactions de désacétylation de l'acétate de paranitrophénol et entre 200 et 800 dans le cadre des études des complexes d'amylose ou d'amylopectine avec l'ion polyiodo-iodure.

δ) Viscosité

La viscosité intrinsèque d'une molécule ou indice limite de viscosité est par définition la valeur limite de l'indice de viscosité pour une dilution infinie. Les mesures de viscosité, exprimées en ml/g sont réalisées en faisant circuler des solutions d'un produit à différentes concentrations dans un viscosimètre à tubes capillaires de type Ubbelohde à 25°C. Toutes les mesures effectuées ont été réalisées dans le DMSO. La viscosité intrinsèque d'un produit dépend de sa masse molaire, de sa structure (facteur de forme....), des interactions polymère-solvant mais est indépendante de la concentration.

Les échantillons testés ont été préparés à partir d'amidon natif déprotéiné et dégraissé mais aussi à partir d'amidon, préalablement passés en colonne d'exclusion stérique. Pour chacun des échantillons, 4 concentrations ont été préparées : 0,1 ; 0,2 ; 0,3 et 0,48%.

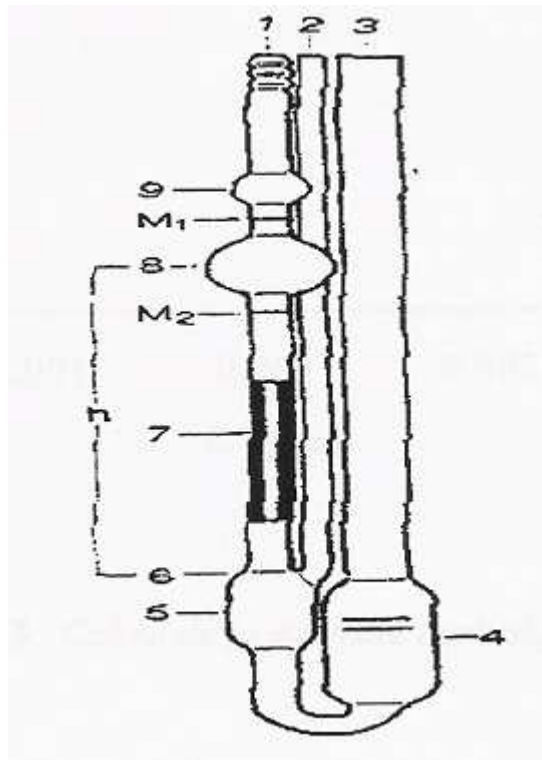


Figure 95 : Tube de Ubbelohde

Le viscosimètre est constitué principalement de trois parties tubulaires (1, 2 et 3) et le tube capillaire (7) avec sa sphère de mesure (8), sa sphère des avant-coulants (9) et le vase à niveau (5). Au-dessus et au-dessous de la sphère de mesure, les marques annulaires M_1 et M_2 sont imprimées sur le tube. Ces marques définissent non seulement le débit de l'échantillon mais aussi la pression hydrostatique moyenne h . Le tube capillaire se termine dans la partie

supérieure, réalisée comme calotte sphérique (6) du vase à niveau. L'échantillon s'écoule donc du tube capillaire vers le vase à niveau par la surface intérieure de cette calotte sphérique. Pour des mesures automatiques du temps d'écoulement, le système dispose d'un système de détection photoélectrique automatique. Le tube est placé sur son support, lui-même dans un bain thermostaté à 25°C. Après avoir réalisé un blanc au DMSO seul, grâce au tracé de t/t_0 ($t_0 = 6,7185s$) en fonction de la concentration C de l'échantillon, les différentes valeurs de viscosité relative sont obtenues. Il est possible ensuite d'extrapoler la courbe à une concentration nulle donnant alors la valeur de la viscosité intrinsèque.

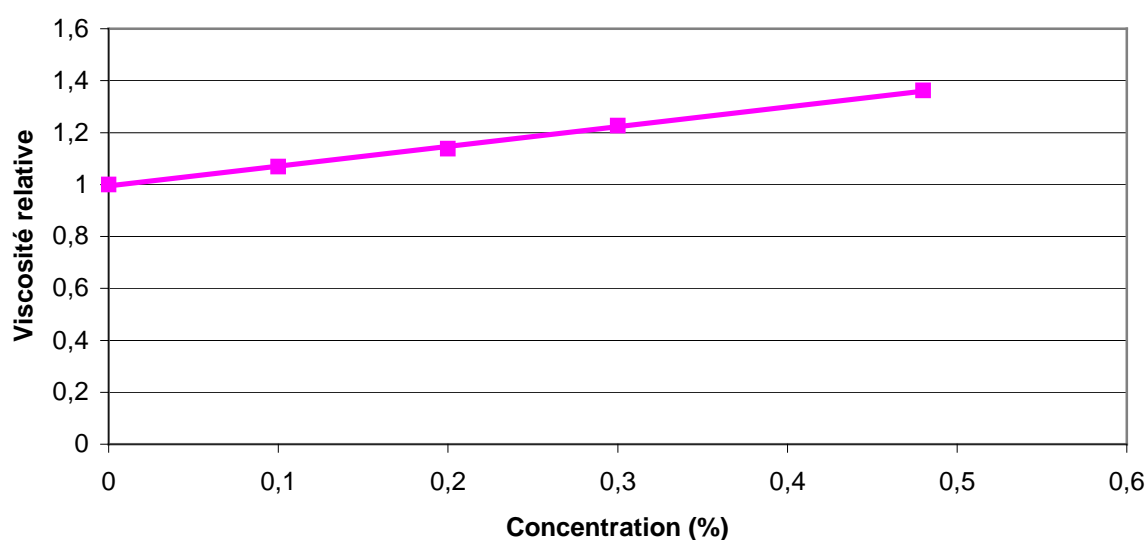


Figure 96 : Calcul des viscosités relative et intrinsèque

b) Des matériaux

α) Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

Les mesures de recristallisation sont réalisées sur des échantillons de dextrans obtenues par dégradation enzymatique de l'amidon ou bien directement sur des amidons déprotéinés et dégraissés. Les fractions passées en DSC (environ 2 g) sont équilibrées à 50% d'humidité relative pendant au moins deux jours avant toute mesure.

A l'aide d'une presse à pastilles infra-rouge, 40 à 60 mg de dextrines sont comprimés, découpés puis placés dans des capsules compatibles avec l'appareillage. De l'eau est ensuite ajoutée avec une micro-seringue afin d'obtenir une teneur massique en eau de 30% par rapport à l'échantillon. Enfin, les capsules sont scellées hermétiquement.

Chaque capsule est passée dans la cellule de DSC pour détruire l'histoire thermique de l'échantillon avant l'étape de vieillissement accéléré. Pour ce faire, la capsule subit un chauffage par gradient de température de 20°C par minute. Ce gradient est appliqué de 30°C jusqu'à 170°C, température à laquelle l'échantillon est maintenu pendant 5 minutes. Les capsules sont pesées avant et après la destruction de l'histoire thermique de l'échantillon pour contrôler l'absence de perte d'eau et ainsi s'assurer de l'étanchéité des capsules.

Chaque échantillon subit ensuite un vieillissement accéléré en étuve à 60°C pendant une durée de 2 à 3 jours (65 heures). Après cette étape, les capsules sont passées en DSC modulée afin d'évaluer la recristallisation des échantillons. Pour ce faire la méthode mise au point fut de descendre l'échantillon à la température de -40°C pendant 5 minutes avant de le réchauffer suivant un gradient de 5°C par minute jusqu'à 220°C, ce qui permet de dépasser le point de fusion de l'échantillon.

β) Diffraction des rayons X

L'analyse par diffraction des rayons X permet d'étudier la cristallinité d'un matériau. Les structures cristallines diffractent les rayons X selon la loi de Bragg, $2d\sin\theta=n\lambda$, où d est la distance entre deux plans de diffraction, θ l'angle incident du rayon et λ sa longueur d'onde (ici à 154 nm, longueur d'onde de la raie $K\alpha$ du cuivre). Toutes les analyses ont été réalisées sur un diffractomètre X-INEL pour des angles 2θ compris entre 2 et 25°. La gamme d'angles est balayée par pas de 0,08° de 60 secondes.

L'analyse par diffraction des rayons X a été utilisée pour étudier la recristallisation des dextrines limites et partielles ainsi que le vieillissement des amidons natifs et modifiés. Dans tous les cas, les meilleures réponses ont été obtenues lorsque les fils de matériau plastifié au glycérol ont été pulvérisés au pilon après avoir été congelés à l'azote liquide. La poudre ainsi

obtenue est alors placée au centre du dispositif d'analyse et recouverte d'un ruban adhésif complètement amorphe de telle façon qu'il ne produise aucun artéfact.

7) Conditionnement

Les amidons de blé et d'igname jaune ainsi que leur dextrine limite respective ont subi un vieillissement de 1,3 et 7 semaines dans une enceinte maintenue à 80% d'humidité relative grâce à une solution saturée de KBr. Cette méthode de conditionnement a été utilisée pour permettre la comparaison des cristallinités entre les amidons et leur dextrine limite après 7 semaines.

Pour la comparaison du vieillissement des dextrines partielles par rapport aux dextrines limites, la méthode choisie a été de réaliser un vieillissement accéléré au sein de capsules de DSC scellées pendant 4 jours à saturation d'eau et à 60°C avant que l'analyse thermique ne soit effectuée.

En ce qui concerne l'étude des propriétés mécaniques à rupture, tous les matériaux ont été conservés dans une chambre thermostatée à 20°C et à humidité contrôlée et stabilisée à 50%.

8) Tests mécaniques

Les tests mécaniques ont été réalisés à 50% d'humidité relative après au moins une semaine de stockage à l'aide d'un capteur de force 500 N sur une machine de traction TEST 108, 2kN (GT-TEST) pilotée par le logiciel TESTWinner 920. La vitesse de traction a été de 10 mm/min. Pour chaque matériau testé, un minimum de 30 échantillons a été utilisé. Les résultats obtenus correspondent à la moyenne de ces 30 échantillons et l'écart-type est calculé. L'ensemble des valeurs obtenues permettent d'accéder aux valeurs de contrainte σ , d'allongement ε et au module d'Young E définis par :

- $\sigma = F/S$ où F est la force maximale exercée (en Newton) et S la section (en mm).

- $\varepsilon = (l - l_0)/l_0$ où l est la longueur de l'éprouvette au temps t et l_0 celle au temps t_0 .

$$- E = \sigma / \epsilon$$

Les tests ont été faits aussi bien sur des éprouvettes de type H3, dans le cas où le matériau avait été obtenu par casting, que sur des fils après extrusion.

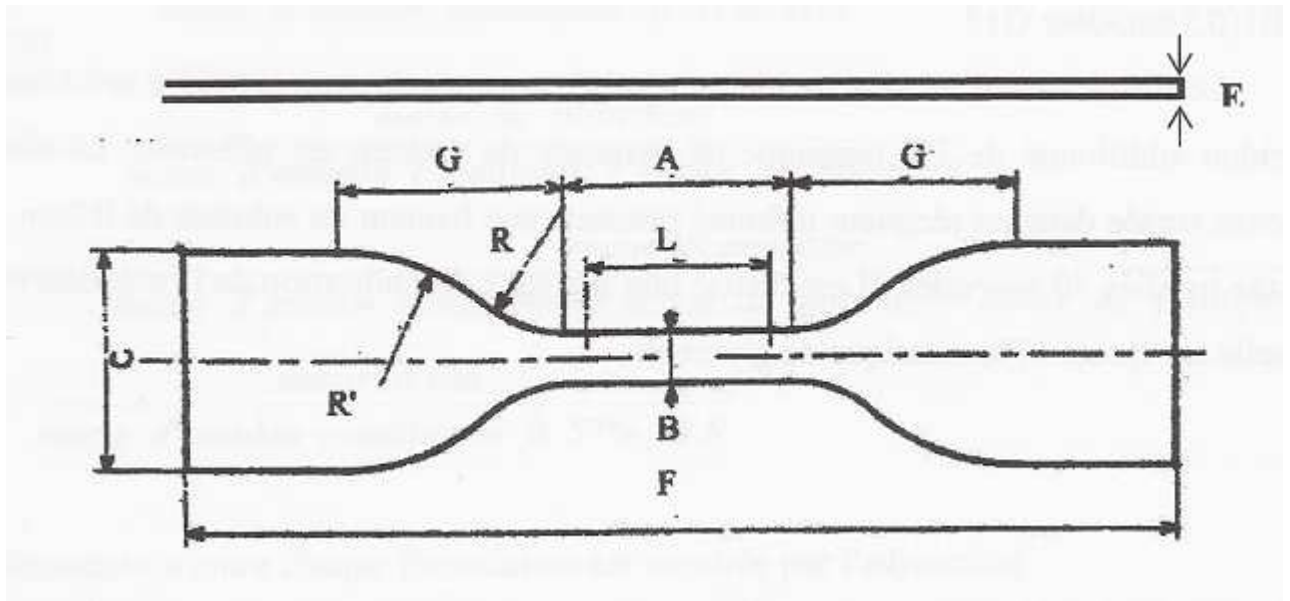


Figure 97 : Eprouvette de type H3 : A : 17 mm ; B : 4 mm ; C : 8,5 mm ; E : 0,1 mm ; F : 50 mm ; G : 8,5 mm ; L : 10 mm ; R : 7,5 mm ; R' : 10 mm

Dans le cas où la traction a été faite sur des fils de diamètre allant de 0,5 à 2 mm obtenus après extrusion, deux méthodes ont été utilisées. Dans un premier temps, des fils de 3 cm de long ont été collés sur des supports en papier afin que les mors de l'appareil de traction puissent exercer leur force dans de bonnes conditions. Avant d'exercer toute traction, le support papier est coupé en son milieu afin de ne tester la résistance que du matériau. Toutefois il est apparu que les fils avaient tendance à casser à proximité des points de colle.

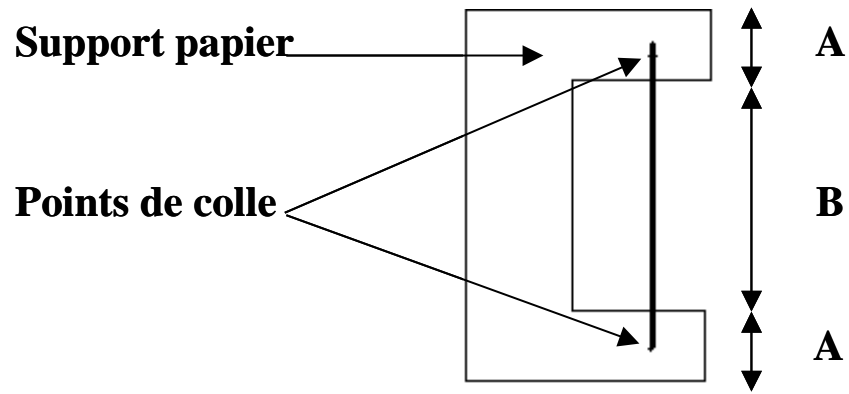


Figure 98 : Matériau extrudé sous forme de fil sur son support papier : A :10 mm ; B :25 mm

La deuxième méthode utilisée ne nécessite aucun support et le fil a été directement placé entre les mors. Pour éviter tout glissement les extrémités du fil ont été recouvertes d'un morceau de Parafilm®.

Conclusion générale

Cette thèse intervient en clôture des programmes BIOPOLYMERES et AMIVAL destinés à l'étude et l'élaboration de matériaux amylicés.

A partir des expériences acquises, différentes hypothèses ont été investiguées pour atteindre des propriétés mécaniques originales situées au-delà de la « courbe référence » de plastification mise en évidence par N. Follain et collaborateurs. Nous supposons que si les chaînes amylicées étaient plus longues et de facteur de forme plus élevé, elles pourraient présenter des interactions longues distances et des enchevêtrements similaires à ceux des polymères synthétiques linéaires. Par ailleurs, ces caractéristiques peuvent permettre l'obtention d'un réseau orienté aux propriétés mécaniques améliorées. C'est pourquoi l'un des objectifs de ce travail a été de réaliser des matériaux à partir de longues macromolécules obtenues soit par fractionnement d'amidons natifs, soit par synthèse chimique.

Nous avons tenté de sélectionner par taille ou par masse les amyloses et/ ou amylopectines à l'aide de différentes méthodes. Il semble que la précipitation fractionnée ou la filtration couplées à une analyse viscosimétrique telles qu'elles ont été mises en œuvre ne soient pas des méthodes adaptées. Les propriétés différenciées d'agrégation et de structuration de l'amylose et de l'amylopectine complexifient l'analyse et le fractionnement en masse. Seul le tamisage à sec a permis dans le cas de l'amidon de blé de mettre en évidence l'existence d'un lien entre taille de grain et taille des macromolécules. Ce résultat est particulièrement intéressant dans le sens où il montre que selon l'origine botanique, non seulement la structure des macromolécules est différente, que les propriétés mécaniques induites par ces macromolécules sont différentes mais aussi qu'il peut y avoir différentes structures de macromolécules en fonction du grain à partir duquel elles sont extraites.

Nous avons mis en place une méthodologie permettant de réaliser un couplage chimiospécifique sur l'extrémité réductrice des macromolécules amylicées par diamination réductrice à l'aide de linkers de différentes natures. Sur les modèles, ce couplage tête-à-tête a permis l'obtention de « bolaformes macromoléculaires ». Sur l'amidon, il a permis l'obtention de matériaux aux propriétés mécaniques à rupture améliorées, en particulier pour un linker PEG de longueur équivalente à celle de l'amylopectine. Dans un travail ultérieur, il pourrait

être envisagé de voir l'influence de la longueur du PEG sur les propriétés. Dans un deuxième temps, différencier une extrémité non réductrice afin de pouvoir réaliser un couplage tête-à-queue permettrait d'augmenter de façon très importante la longueur des chaînes.

Par ailleurs, nous avons montré qu'il était possible de réaliser un couplage par métathèse d'oligosaccharides acylglycosylés par une chaîne grasse insaturée à son extrémité. Ce résultat permet d'envisager le couplage sur des polysaccharides modifiés. Pour étendre ce travail à des polysaccharides hydrosolubles, nous avons démarré la synthèse d'un catalyseur de métathèse hydrosoluble original. La réalisation de ce type de catalyseur devrait permettre le couplage direct de polysaccharides modifiés spécifiquement en position réductrice par amination réductrice avec des structures telles que l'allylamine.

L'hypothèse principale de ce travail a donc été vérifiée puisque les matériaux obtenus à partir de longues macromolécules ont dans tous les cas montré une augmentation drastique de leur propriétés d'allongement.

Nous avons également montré que l'élagage enzymatique par β -amylolyse d'amidon déstructuré permet d'obtenir des matériaux dont les propriétés mécaniques à rupture sont améliorées avec l'augmentation du taux d'élagage. Par ailleurs nous avons montré que plus l'élagage est important, plus les matériaux obtenus présentent une aptitude à l'orientation. L'élagage enzymatique s'accompagne d'un effet sur le comportement rhéologique à l'état fondu. Cette modification sur l'amidon permet de se déplacer horizontalement sur le graphique Contrainte / Allongement. De plus lorsque l'élagage est maximal, nous avons montré qu'il était possible d'inhiber le vieillissement des matériaux et de rendre alors les propriétés mécaniques stables au cours du temps.

Enfin, par combinaison deux à deux des différentes approches nous avons montré que leur association permet de cumuler les effets. Par exemple, la dégradation de l'amidon d'igname couplé avec le PEG 8000 a mis en évidence une augmentation très significative de l'allongement et une perte limitée en contrainte. Ceci permet l'accès à des matériaux qui n'ont pour l'heure pas encore été envisagés. Il serait intéressant de réaliser par exemple le couplage avec un PEG beaucoup plus long, d'une dextrine limite d'igname dont les macromolécules auraient été préalablement sélectionnées en fonction de la taille des grains.

Ce travail de thèse propose de nouvelles pistes intéressantes pour la réalisation de matériaux à base d'amidon possédant des propriétés mécaniques à rupture se rapprochant de celles des matériaux d'origines fossiles. La recherche de structures macromoléculaires originales ouvre *a priori* un champ d'investigation beaucoup plus large que les approches classiques basées sur la formulation ou la dérivatisation de l'amidon.

1. F. Duprat, J.P. Robin, C. Mercier, A. Guilbot & D. Gallant. "les polymères végétaux". Ed.B.Monties, Gauthier-Villars , pp. 176-231. 1980.
2. W. Banks & C.T. Greenwood. "starch and its components". Ed.Banks et C.T.Greenwood, Edinburgh University Press . 1975.
3. A. Buléon, P. Colonna & V. Leloup. "les amidons et leurs dérivés dans les industries des céréales". Actualités des industries alimentaires et agroalimentaires , pp. 515-532. 1-6-1990.
4. Hizukuri.S., Takeda.Y. & Yasuda.M. "Multi-branched nature of amylose and the action of debranching enzymes.". Carbohydrate Research 94, pp. 205-213. 1981.
5. T.Suortti, M.V.Gorenstein & P.Roger. "Determination of the molecular mass of amylose". Journal of Chromatography A 828, pp. 515-521. 1998.
6. P.Roger, V.Tran, J.Lesec & P.Colonna. "Isolation and characterisation of single chain amylose". Journal of Cereal Science 24, pp. 247-262. 1996.
7. A.Buléon, P.Colonna, V.Planhot & S.Ball. "Starch granules: structure and biosynthesis". International Journal of Biological Macromolecules 23, pp. 85-112. 19-2-1998.
8. Carlson T.L.G., Larsson K. & Dinh-Nguyen Krog N. "A study of the amylose-monoglyceride complex by raman spectroscopy.". Starke 31, pp. 322-324. 1979.
9. M.John, J.Schmidt & H.Kneifel. "Iodine maltosaccharine complexes: relation between chain length and color.". Carbohydrate Research 119, pp. 254-257. 1983.
10. Hanjun Tang, Toshio Mitsunaga & Yukio Kawamura. "Molecular arrangement in blocklets and starch granule architecture". Carbohydrate Polymers 63, pp. 555-560. 2006.
11. K.Kainuma & D.French. "Nageli amyloextrin and its relationship to starch granule structure II. Role of water in cristallization of B-starch". Biopolymers 11, pp. 2241-2250. 1972.
12. Manners DJ. Carbohydrate Polymers 11, pp. 87. 1989.
13. S.Hizukuri. "Polymodal distribution of the chain lengths of amylopectins, and its signifiante.". Carbohydrate Research 147, pp. 342-347. 1986.
14. Isao Hanashiro, Jun-ichi Abe & Susumu Hizukuri. "A periodic distribution of the chain length of amylopectin as revealed by high-performance anion-exchange chromatography". Carbohydrate Research 283, pp. 151. 1996.
15. J.P.Robin, C.Mercier, R.Charbonniere & A.Guilbot. "Lintnerized starches. Gel filtration and enzymatic studies of insoluble residues from prolonged acid treatment of potato starch". Cereal chemistry 51(389). 1974.
16. C.Mercier & P.Colonna. "Macromolecular structure of wrinkled-and smooth-pea starch components". Carbohydrate Research 126, pp. 233-247. 1984.

17. Daris Kuakpetoon & Ya-Jane Wang. "Internal structure and physiochemical properties of corn starches as revealed by chemical surface gelatinization". *Carbohydrate Research* 342, pp. 2253-2263. 2007.
18. Gallant D.J., Bouchet B. & Baldwin P.M. "Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organisation". *Carbohydrate Polymers* 32, pp. 177-191. 1997.
19. French D. "Trends in the biology of fermentations for fuel and chemicals". Ed.A.Hollaender, R.Rabon, P.Rogers, A.San Pietro, R.Valentine, R.Wolfe, Pub.Plenum Press, New York. 1981.
20. Imberty A, hanzy H & erez S. "The double helical nature of the cristalline part A-starch". *J.Mol.Biol* 201, pp. 365-378. 1988.
21. Imberty A & Perez S. "A revisit to the three dimensional structure of B-starch". *Biopolymers* 27, pp. 1205-1221. 1988.
22. Nara S. "On the water sorption in starch granules". *Journal of japanese society of starchscience* 28(1), pp. 24-32. 1981.
23. Jane J. & Shen J. "Internal structure of the patato starch granule revealed by chemical gelatinization". *Carbohydrate Polymers* (247), pp. 279. 1993.
24. T.Kasemsuwan and J.Jane. "Location of amylose in normal starch granules.II.". *Cereal chemistry* 71(3), pp. 282-287. 1994.
25. Shogren R.L. "Starch: properties and materials applications.". *Biopolymer from renewable ressources.* (30), pp. 46. 1998.
26. Zobel H.F., Young S.N. & Rocca L.A. "Starch gelatinization: an X-ray diffusion study.". *Ceral chimistry* 65, pp. 443-446. 1988.
27. Leloup V., Colonna P. & Buléon A. "studies on probe diffusion and accessibility in amylose gels". *Macromolecules* 23, pp. 862-866. 1990.
28. Parker R and Ring S.G. "Aspect of the physical chemistry of starch". *Journal of Cereal Science* 34, pp. 1-17. 2001.
29. Ring S., Colonna P., L'anson D.J., Miles M.J., Morris V.J. & Orford P. "Gelation and crystallisation of amylopectin". *Carbohydrate Research* 162, pp. 277-293. 1987.
30. Miles M.J., Morris V.J. & Ring S.G. "The roles of amylose and amylopectine in the gelation ond retrogradation of starch.". *Carbohydrate Research* 135, pp. 271-278. 1985.
31. Mouile G., Maddelein M.L., Libessart N., Tagala P., Decq A., Delrue B. & Ball S. "Preamylopectin processing: a mandatory step for starch biosynthesis in plants.". *Plant cell* 86, pp. 151-159. 1996.

32. Couchman P.R. "Compositional variation of glass-transition temperatures.2. Application of the thermodynamic theory to compatible polymer blend". *Macromolecules* 11, pp. 1156-1161. 1978.
33. Biliaderis C.G., Page C.M., Maurice T.J. & Juliano B.O. "Thermal characterization of the rice starches: a polymeric approach to phase transitions of granular starch.". *Journal of agricultural and food chemistry* 34, pp. 6-14. 1986.
34. Wolff I.A. "Preparation of films from amylose.". *Industrial and engineering chemistry* 43(4), pp. 915-919. 1951.
35. Myllärinen P., Buléon A., Lahtinen R. & Forssell P. "The crystallinity of amylose and amylopectin films". *Carbohydrate Polymers* 48, pp. 41-48. 2000.
36. Myllärinen P., Partanen R., Seppälä J. & Forssell P. "Effect of glycerol on behaviour of amylose and amylopectin films". *Carbohydrate Polymers* 50, pp. 355-361. 2002.
37. Colonna P. & Mercier C. "Macromolecular modifications of manioc starch components by extrusion-cooking with and without lipids.". *Carbohydrate polymer* 3, pp. 87-108. 1983.
38. Perez J. "Physique et mécanique des polymères amorphes". Paris. Ed Tec & Doc. 1992.
39. Struik L.C.E. "Physical aging in amorphous polymers and other materials.". Amsterdam. Elsevier . 1978.
40. M.T. Kalichevski, E.M. Jaroszkiwicz, S. Ablett, J.M.V. Blanshard & P.J. Lillford. "The glass transition of amylopectin measured by DSC, DMTA and NMR". *Carbohydrate Polymers* 18, pp. 77-88. 1992.
41. Zeleznak K.J. & Hosney R.C. "The glass transition in starch". *Cereal chemistry* 64, pp. 121-124. 1987.
42. X.F. Ma, J.G. Yu & J.J. Wan. "Urea and ethanolamine as mixed plasticizer for thermoplastic starch". *Carbohydrate Polymers* 64, pp. 267-273. 2006.
43. Riku A. Talja, Harry Helén, Yrjö H. Roos & Kirsi Jouppila. "Effect of various polyols and polyol contents on physical and mechanical properties of potato starch-based films". *Carbohydrate Polymers* 67, pp. 288-295. 2007.
44. Van soest J.J.G. & Vliegenthart J.F.G. "Crystallinity in starch plastics: consequences for material properties.". *TIBTECH* 15, pp. 208-213. 1997.
45. A.L.M. Smits, P.H. Kruiskamp, J.J.G. Van Soest & J.F.G. Vliegenthart. "The influence of various small plasticisers and malto-oligosaccharides on the retrogradation of (partly) gelatinised starch.". *Carbohydrate Polymers* 51(4), pp. 417-424. 2003.
46. Wenyan Zhao, Andrzej Kloczkowski, James E. Mark & Burak Erman. "Novel high-performance materials from starch.3. Influence of degree of substitution and

- amylose/amylopectine ratio on performance.". *Chemical materials* 10, pp. 804-811. 1998.
47. Shui-Dong Zhang, Yu-Ron Zhang, Jiang Zhu, Xiu-Li Wang, Ke-Ke Yang & Zu-Zhon Wang. "Modified corn starches with improved comprehensive properties for preparing thermoplastics". *Starch/stärke* 59, pp. 258-268. 2007.
 48. Ming-Fu Huang & Hong Yuan Wang. "Preparation, characterization and performances of biodegradable thermoplastic starch". *Polymers for advanced technologies* 18, pp. 910-915. 2007.
 49. L.Godbillot, P.Dole, C.Joly, B.Roge & M.Mathlouthi. "Analysis of water binding in starch plasticized films". *Food Chemistry* 96, pp. 380-386. 2006.
 50. S.Hizukuri. "Relationship between the distribution of the chain-length of amylopectin and cristalline-structure of starch granules". *Carbohydrate research* 141, pp. 295-306. 1985.
 51. Susumu Hizukuri. "Polymodal distribution of the chain lengths of amylopectins, and its significance". *Carbohydrate research* 147, pp. 342-347. 1986.
 52. S.H.D.Hulleman, F.H.P.Janssen & H.Feil. "The role of water during plasticization of native starches". *Polymer* 39(10), pp. 2043-2048. 1998.
 53. Albert L.Charles, Yung H.Chang, Wen C.Ko, Klanaroth Sriroth & Tzou C.Huang. "Influence of amylopectin structure and amylose content on the gelling properties of five cultivars of cassava starches". *Journal of agricultural and food chemistry* 53(7), pp. 2717-2725. 2005.
 54. C.E.Millan-Testa, M.G.Mendez-Montevalvo, M.-A.Ottenhof, I.A.Farhat & L.A.Bello-Perez. "Determination of the molecular and structural characteristics of Okenia, Mango, and Banana starches". *Journal of agricultural and food chemistry* 53(3), pp. 495-501. 2005.
 55. Karlsson R., Oleres R. & Eliasson A.-C. "Changes in starch granule size distribution and starch gelatinisation properties during development and maturation of wheat, barley and rye.". *starch/staerke* 35, pp. 335-340. 1983.
 56. Nadège Follain. "Melanges miscibles à base d'amidon. Relations formulation/propriétés". Thèse de doctorat Université de Reims Champagne-ardenne . 2003.
 57. Suzana Mali, Maria Victoria E.Grossmann, Maria A.Garcia, Miriam N.Martina & Noemie E.Zaritsky. "Effect of controlled storage on thermal, mechanical and barrier propertiesof plastified films from different starch sources". *Journal of food engineering* 75, pp. 453-460. 2006.
 58. Wan-Jin Lee, Young-Nam Youn, Yeon-Hum Yun & Soon-Do Yoon. "Physical properties of chemically modified starch (RS4)/PVA blend films. Part 1". *J.Polym.EnvIRON.* 15, pp. 35-42. 2007.

59. D.Lourdin, L.Coigard, H.Bizot & P.Colonna. "Influence of equilibrium relative humidity and plasticizer concentration on the water content and glass transition of starch materials". *Polymer* 38(21), pp. 5401-5406. 1997.
60. Riku A.Talja, Harry Helén, Yrjo H.Roos & Kirsi Jouppila. "Effect of type and content of binary polyol mixtures on physical and mechanical properties of starch-based edible films". *Carbohydrate Polymers* 71, pp. 269-276. 2008.
61. D.W.Grover & J.M.Nicol. "The vapor pressure of glycerol solutions at 20°C". *J.Soc.chem.Ind* 59, pp. 175-177. 1940.
62. N.Follain, C.Joly, P.Dole & C.Bliard. "Properties of starch-based blends. part II. Influence of polyvinyl alcohol addition and photocrosslinking on starch-based materials mechanical properties.". *Carbohydrate Polymers* 60, pp. 185-192. 2005.
63. D.Lourdin, H.Bizot & P.Colonna. "'Anti-plasticization' in starch-glycerol film". *Journal of applied polymer science* 63(8), pp. 1047-1053. 1997.
64. N.Follain, C.Joly, P.Dole & C.Bliard. "Mechanical properties of starch-based materials. I. Short review and complementary experimental analysis". *Journal of applied polymer science* 97, pp. 1783-1794. 2005.
65. N.Follain, C.Joly, P.Dole & C.Bliard. "Ultimate mechanical properties of starch based materials. Part 1. Short review and complementary experimental analysis.". *Carbohydrate Polymers* . 2007.
66. A.Buléon, H.Bizot, M.M.Delage & J.L.Multon. "Evolution of crystallinity and specific gravity of potato starch versus water Adsorption and Desorption". *Starch/stärke* 34(11), pp. 361-366. 1982.
67. Céline M.Chaléat, Peter J.Halley & Rowan W.Truss. "Properties of a plasticised starch blend. Part 1: Influence of moisture content on fracture properties". *Carbohydrate Polymers* 71, pp. 535-543. 2008.
68. Cathrine Savary, Paul Colonna & Guy Della Valle. "Matériaux d'emballage à base d'amidons et leurs dérivés". *Industries des céréales* (17), pp. 20. 1993.
69. P.M.Forssell, S.H.D.Hulleman, P.Myllärinen, G.K.Moates & R.Parker. "Ageing of rubbery thermoplastic barley and oat starches". *Carbohydrate Polymers* 39, pp. 43-51. 1999.
70. J.J.G.Van Soest & B.D.Borger. "Structure and properties of compression molded thermoplastic starch materials from normal and high amylose maize starches". *Journal of applied polymer science* 64(4), pp. 631-644. 1997.
71. M.Xanthos. "Reactive extrusion Principles and practice". Munich: Hanser . 1992.
72. J.Aburto, I.Alric, S.Thiebaud, E.Borredon, D.Bikiaris, J.Prinos & C.Panayiotou. "Synthesis, characterization, and biodegradability of fatty-acid esters of amylose and starch". *Journal of applied polymer science* 74, pp. 1440-1451. 1999.

73. M.Gomberg & C.C.Buchler. "Benzyl ethers of carbohydrates". *Journal of the american chemical society* 34, pp. 1904-1911. 1921.
74. R.Jantas. "synthesis and characterization of acryloyloxystarch". *Journal of applied polymer science* 65, pp. 2123-2129. 1997.
75. Ali Ayoub & Syed S.H.Rizvi. "Properties of supercritical fluid extrusion-based crosslinked starch extrudates". *Journal of applied polymer science* 107, pp. 3663-3671. 2008.
76. Heloïse Thérien-Aubin, Florence Janvier, Wilms E.Baille, X.X.Zhu & Robert Marchessault. "Study of hydration of cross linked high amylose starch by solid state ¹³C NMR spectroscopy". *Carbohydrate Research* 342, pp. 1525-1529. 2007.
77. Pawinee Deetae, Sujin Shobsngob, Warunee Varanyanond, Pavini Chinachoti, Ananong Navikul & Saiyavit Varavinit. "Preparation, pasting properties and freeze-thaw stability of dual modified crosslink-phosphorylated rice starch". *Carbohydrate Polymers* 73, pp. 351-358. 2008.
78. O.B.Wurzburg. "Cross-linked Starches". *Modified starches: properties and uses* (3), pp. 42-51. 1987.
79. J.Delville, C.Joly, P.Dole & C.Bliard. "Solid state photocrosslinked starch based films: a new family of homogenous modified starches". *Carbohydrate Polymers* 49, pp. 71-81. 2002.
80. J.Delville, C.Joly, P.Dole & C.Bliard. "Ageing of solid state photocrosslinked starch based films". *Physical and chemical news* 15, pp. 1-3. 2004.
81. J.Delville, C.Joly, P.Dole & C.Bliard. "Influence of phtocrosslinking on the retrogradation of hydrated solid wheat starch based films". *Carbohydrate Polymers* 53, pp. 373-381. 2003.
82. A.K.Bajpai & Smitha Bhanu. "Dynamics of controlled release of heparin from swellable crosslinked starch microspheres". *Journal of material science: Material medical* 18, pp. 1613-1621. 2007.
83. Sangeeta Garg & Asim Kumar Jana. "Studies on the properties and characteristics of starch-LDPE blend films using cross-linked, glycerol modified, cross-linked and glycerol modified starch". *European polymer journal* 43, pp. 3976-3987. 2007.
84. Franck Delval, Gregorio Crini, Sabrina Bertini, Claudine Filiatre & Giangiacomo Terri. "Preparation, characterization and sorption properties of crosslinked starch-based exchangers". *Carbohydrate Polymers* 60, pp. 67-75. 2005.
85. L.Kuniak & R.H.Marchessault. "Study of the crosslinking reaction between epichlorhydrin ans starch". *Die Stärke* 8, pp. 110-116. 1972.
86. Lars Holmberg, Bengt Lindberg & Bengt Lindqvist. "The reaction between epichlorhydrin and polysaccharides: Part 1, syntheses of some model substances with non-cyclic substituents". *Carbohydrate Research* 262, pp. 213-221. 1994.

87. Mao Gui-Jie, Wang Peng, Meng Xiang-Sheng, Zhang Xing & Zheng Tong. "Crosslinking of corn starch with sodium trimetaphosphate in solid state by microwave". *Journal of applied polymer science* 102, pp. 5854-5860. 2006.
88. Yixiang XU & Milford A.Hanna. "Preparation and properties of biodegradable foams from starch acetate and poly(tetramethylene adipate-co-terephthalate)". *Carbohydrate Polymers* 59, pp. 521-529. 2005.
89. Wenyan Zhao, Andrzej Kloczkowski, James E.Mark & Burak Erman. "Novel high-performance materials from starch. 1. Factors influencing the lyotropic liquid crystallinity of some starch ethers". *Chemical materials* 10, pp. 784-793. 1998.
90. Prasanna V.Aiyer. "Amylase and their applications". *African journal of biotechnology* 4(13), pp. 1525-1529. 2005.
91. Eric Bertoft. "Investigation of the fine structure of amylopectin using α and β -amylase;". *Carbohydrate Research* 189, pp. 195-207. 1989.
92. Eric Bertoft. "Partial characterisation of amylopectin alpha-dextrins". *Carbohydrate Research* 189, pp. 181-193. 1989.
93. Eric Bertoft. "Investigation of the fine structure of alpha-dextrins derived from amylopectin and their relation to the structure of waxy-maize starch". *Carbohydrate Research* 212, pp. 229-244. 1991.
94. Andrea Bertolini, C.Mestres, J.Raffi, Alain Buleon, Dan Lerner & Paul Colonna. "Photodegradation of cassava and corn starches". *Journal of agricultural and food chemistry* 49, pp. 675-682. 2001.
95. N'Guessan Georges Amani, Alain Buleon, Alphonse Kamenan & Paul Colonna. "Variability in starch physicochemical and functional properties of yam (*Dioscorea* sp) cultivated in Ivory Coast". *Journal of the science of food and agriculture* 84, pp. 2085-2096. 2004.
96. W.Blaszczak, S.Valverde & J.Fornal. "Effect of high pressure on the structure of potato starch". *Carbohydrate Polymers* 59, pp. 377-383. 2005.
97. Zihua Ao & Jay-lin Jane. "Characterization and modeling of the A- and B-granule starches of wheat, triticale, and barley". *Carbohydrate Polymers* 67, pp. 46-55. 2006.
98. Anil Gunaratne, Somathilaka Ranaweera & Harold Corke. "Thermal, pasting, and gelling properties of wheat and potato starches in the presence of sucrose, glucose, glycerol, and hydroxypropyl β -cyclodextrin". *Carbohydrate Polymers* 70, pp. 112-122. 2007.
99. Lilo M.Gilbert, G.A.Gilbert & S.P.Spragg. "Amylose amylopectin from potato starch". *Methods in Carbohydrate Chemistry* 4, pp. 25-27. 1964.
100. Eric Bertoft. "Fractional precipitation of amylopectin α -dextrins using methanol". *Carbohydrate Research* 189, pp. 169-180. 1989.

101. **Katrien Swennen, Christophe M.Courtin, Bart Van der Bruggen, Carlo Vandecasteele & Jan A.Delcour.** "Ultrafiltration and ethanol precipitation for isolation of arabinoxylooligosaccharides with different structures". *Carbohydrate Polymers* 62, pp. 283-292. 2005.
102. **Roy L.Wistler & Joseph L.Sannella.** "Fractional precipitation with ethanol: purification of hemicelluloses". *Methods in Carbohydrate Chemistry* 5, pp. 34-36. 1965.
103. **Athanasios K.Goulas, Petros G.Kapasakalidis, Haydn R.Sinclair, Robert A.Rastall & Alistair S.Grandisson.** "Purification of oligosaccharides by nanofiltration". *Journal of membrane science* 209, pp. 321-335. 2002.
104. **Ladislav Petruš, Derek G.Gray & James N.Bemiller.** "Homogeneous alkylation of cellulose in lithium chloride/DMSO solvent with dimsyl activation. A proposal for the mechanism of cellulose dissolution in LiCl/DMSO". *Carbohydrate Research* 268, pp. 319-323. 1995.
105. **D.B.Bechtel, I.Zayas, L.Kaleikau & Y.Pomeranz.** "Size distribution of wheat starch granules during endosperm development". *Cereal chemistry* 67, pp. 59-63. 1990.
106. **René Roy, Ewa Katzenellenbogen & Harold J.Jennings.** "Improved procedures for the conjugation of oligosaccharides to protein by reductive amination". *Canadian journal of biochemistry cellular biology* 62, pp. 270-275. 1983.
107. **Tomoaki Yoshida & Yuan Chuan Lee.** "Glycammine formation via reductive amination of oligosaccharides with benzylamine: efficient coupling of oligosaccharides to protein". *Carbohydrate Research* 251, pp. 175-186. 1994.
108. **Yves Dumoulin, Serge Alex, Pompilia Szabo, Louis Cartilier & Mircea Alexandru Mateescu.** "Cross-linked amylose as matrix for drug controlled release. X-ray and FT-IR structural analysis". *Carbohydrate Polymers* 37, pp. 361-370. 1998.
109. **Khaled El-Tahlawy, Richard A.Venditi & Joel J.Pawlak.** "Aspect of the preparation of starch microcellular foam particules crosslinked with glutaraldehyde using a solvent exchange technique". *Carbohydrate Polymers* 67, pp. 319-331. 2007.
110. **Meera Kim & Sun-Ja Lee.** "Characteristics of crosslinked potato starch and starch-filled linear low-density polyethylene films". *Carbohydrate Polymers* 50, pp. 331-337. 2002.
111. **Sayavit Varavinit, Worachat Paisanjit, Tuangporn Tukomane & Chindchau Pukkahuta.** "Effect of osmotic pressure on the crosslinking reaction of tapioca starch". *Starch/starke* 59, pp. 290-296. 2007.
112. **Pathama Chatakanonda, Saiyavit Varavinit & Pavinee Chinachoti.** "Relationship of gelatinization and recrystallization of cross-linked rice to glass transition temperature". *Cereal chemistry* 77(3), pp. 315-319. 2000.

113. Yuhong Wang & You-Lo Hsieh. "Cellulose functionalization by glutaraldehyde". *Polymer preprints* 42(1), pp. 520-521. 2001.
114. N.Natarajan, V.Shashirekha, S.E.Noorjahan, M.Rameshkumar, C.Rose & T.P.Sastry. "Fibrin-Chitosan-Gelatin composite film: preparation and characterization". *Journal of macromolecular science, part A: pure and applied chemistry* 42(7), pp. 945-953. 2005.
115. Michele Marcazzan, Fabio Vianello, Marine Scarpa & Adelio Rigo. "An ESR assay for alpha-amylase activity toward succinylated starch, amylose and amylopectin". *journal of biochemical and biophysical methods* 38, pp. 191-202. 1999.
116. W.Ziese. "The specificity of amylases. Action of amylase on hydroxyethyl starch.". *Z.physiol.chem* 229, pp. 213-218. 1934.
117. L.A Bello-Perez & P.J.Colonna. "Macromolecular features of starches determined by aqueous high-performance size exclusion chromatography". *Journal of Cereal Science* 27(3), pp. 267-278. 1998.
118. P.Salemis & M.Rinauldo. "Gel permeation chromatography of starch and other uncharged polysaccharides". *Polymer bulletin* 11(4), pp. 397-400. 1984.
119. Thisbe K.Lindhorst, Curtis Braun & Stephen G.Withers. "syntheses of 4'-deoxy- α -maltosyl fluoride and 4''-deoxy- α -maltotriosyl fluoride as probes of α -glucanotransferase mechanisms". *Carbohydrate Research* 268, pp. 93-106. 1995.
120. Christophe Bliard, Georges massiot & Serge Nazabadioko. "Glycosylation of acids under phase transfert conditions. Partial synthesis of saponins.". *Tetrahedron letters* 35(33), pp. 6107-6108. 1994.
121. D.H.Brauns. "Optical rotation and atomic dimension. VIII. Halogeno-hepta-acetyl derivatives of melibiose and maltose. The structures of bioses and cellulose.". *Journal of american chemical society* 51(6), pp. 1820-1831. 1929.
122. Garry Williamson. "Purification and characterisation of pectin acetylerase prom orange peel". *Phytochemistry* 30(2), pp. 445-449. 1991.
123. Herbert Waldmann & Axel Heuser. "Acetylerase from orange peel as biocatalyst for the chemo- and regioselective deprotection of carbohydrates". *Bioorganic & medicinal chemistry* 2(5), pp. 477-482. 1994.
124. Valérie Molinier, Krzysztof Wisniewski, Alain bouchu, Juliette Fitremann & Yves Queneau. "Transesterification of sucrose in organic medium: Study of acyl group migrations". *Journal of carbohydrate chemistry* 22(7 & 8), pp. 657-669. 2003.
125. Dilusha S.Dalpathado, Hui Jiang, Marcus A.Kater & Heather Desaire. "Reductive amination of carbohydrates using $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ ". *Analytical and bioanalytical chemistry* 381, pp. 1130-1137. 2005.
126. P.R.Steyermark. "Reaction of D-glucopyranosylamine with phosgene". *Journal of organic chemistry* 27(3), pp. 1058-1059. 1962.

127. Richard F.Helm, Joseph J.Karchesy & Douglas F.Barofsky. "Carbohydrate-Urea-Phenol-based adhesives: transient formation of mono- and di-D-glucosylurea". *Carbohydrate Research* 189, pp. 103-112. 1989.
128. Y.Ichikawa, Y.Matsukawa & M.Isobe. "Urea glycoside synthesis in water". *Synlett* 6, pp. 1019-1022. 2004.
129. G.Mignonac. *Compt.Rend.* 172, pp. 223. 1921.
130. A.Skita & F.Keil. *Z.Allgem.Chem.* 42, pp. 501. 1929.
131. A.Skita & F.Keil. *Ber.dtsch.chem.Ges.* 61, pp. 1452. 1928.
132. Silvia Gomez, Joop A.Peters & Thomas Maschmeyer. "The reductive amination of aldehydes and ketones and the hydrogenation of nitriles: Mechanistic aspects and selectivity control". *Adv.Synth.Catal.* 334(10), pp. 1037-1057. 2002.
133. P.N.Rylander. "Catalytic hydrogenation over platinum metals". Academic press, New York , pp. 291-303. 1967.
134. Eric Bertoft. "Chains of intermediate lengths in waxy-maize amylopectin". *Carbohydrate Research* 212, pp. 245-251. 1991.
135. Andrea J.Vernall & Andrew D.Abell. "Cross metathesis of nitrogen-containing systems". *Aldrichimica acta* 36(3), pp. 93-105. 2003.
136. Jason P.Jordan & Robert H.Grubbs. "Small-molecule N-heterocyclic-carbene-containing olefin-metathesis catalysts for use in water". *Angewante chemistry international edition english* 46, pp. 5152-5155. 2007.
137. Stephen J.Connon & Siegfried Blechert. "A solid supported phosphine-free Ruthenium alkylidene for olefin metathesis in methanol and water". *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 12, pp. 1873-1876. 2002.
138. Jason S.Kingburry, Joseph P.A.Harrity, Peter J.Bonitatebus Jr & Amir H.Howeida. "A recyclable Ru-based metathesis catalyst". *Journal of the american chemical society* 121, pp. 791-799. 1999.
139. Bernard Mohr, David M.Lynn & Robert H.Grubbs. "Synthesis of water-soluble, aliphatic phosphines and their application to well-defined ruthenium olefin metathesis catalysts". *Organometallics* 15, pp. 4317-4325. 1996.
140. Norbert Hoffman. "Photochemical reactions as key steps in organic synthesis". *Chemical review* 108, pp. 1052-1103. 2008.
141. Kurt H.Meyer, P.Bernfeld, P.Rathgeb & P.Gürtler. "Recherches sur l'amidon,41. La dégradation de l'amylopectine par la β -amylase". *helvetica chimica acta* 38, pp. 1536-1540. 1948.
142. S.Peat, S.J.Pirt & W.J.Whelan. "Enzymic synthesis and degradation of starch. Part XV. β -Amylase and the constitution of amylose.". *Journal of the chemical society* , pp. 705-713. 1952.

143. N. Schoorl. "sugar titration". *Zeitschrift fuer Untersuchung der lebensmittel* 57, pp. 566-576. 1929.
144. N. Schoorl. *Cmemisch Weekblad* 26, pp. 130-134. 1929.
145. Xiaochun Yu, Carl Houtman & Rajai H. Atalla. "The complex of amylose and iodine". *Carbohydrate Research* 292, pp. 129-141. 1996.
146. J. Silverio, H. Frederiksson, R. Andersson, A.-C. Eliasson & P. Åman. "The effect of temperature cycling on the amylopectin retrogradation of starches with different amylopectin unit-chain length distribution.". *Carbohydrate Polymers* 42, pp. 175-184. 2000.
147. H. Frederiksson, J. Silverio, R. Andersson, A.-C. Eliasson & P. Åman. "The influence of amylose and amylopectin characteristics on gelatinization and retrogradation properties of different starches.". *Carbohydrate Polymers* 35, pp. 119-134. 1998.
148. P. Dole. "Comparaison des propriétés mécaniques entre amidons et plastiques usuels". *Séminaire MATORNA* . 2006.

RESUME

L'objectif de ce travail est la réalisation de nouveaux matériaux amylicés présentant des propriétés mécaniques à rupture améliorées. L'intérêt de travail réside dans le choix de modifications structurales dirigées originales pour l'obtention de ces nouveaux matériaux. Les voies proposées sont d'une part la sélection des longues macromolécules au sein d'amidons, le rallongement chimique via des réactions de couplage par diamination réductrice et enfin l'élagage enzymatique permettant de diminuer le degré de ramification de l'amylopectine.

La sélection directe des macromolécules les plus longues sur différents amidons gélatinisés s'est révélée difficile à mettre en œuvre tandis que le tamisage à sec a permis de mettre en évidence, pour certaines espèces, une relation entre la taille des grains et celle des macromolécules qui le composent.

Les différentes modifications apportées à l'amidon de blé ont permis d'engendrer une augmentation de l'allongement à rupture avec, dans certains cas, le maintien de la contrainte à rupture. Par ailleurs, l'élagage enzymatique a mis en évidence une orientation des macromolécules lors de la mise en forme des matériaux ainsi qu'une stabilité de leurs propriétés mécaniques dans le temps.

MOTS-CLES

Amidon – Blé - Matériaux – Polysaccharides – Propriétés mécaniques à rupture – Modifications chimiques – Modifications enzymatiques – Ultra-Filtration – Tamisage – CPG – Couplage macromoléculaire – Sélection de chaînes – Rallongement de chaînes – Vieillessement – DSC- Test de traction – Orientation

TITLE

Study of the evolution of mechanical properties for amylicated materials by selection and/or controlled structural modifications.

SUMMARY

The aim of this study was the achievement of new starch based-materials with enhanced ultimate mechanical properties. The interest of this work was in the choice of unusual structural modifications to obtain this new materials. The different ways were first the selection of the longest macromolecules from different starches then the chemical lengthening by reductive amination coupling and finally the enzymatic pruning leading to the reduction of the networking degree of amylopectine.

An immediate selection of the longest macromolecules from gelatinised starches was finally difficult to carry out whereas a dried sieving bring to light for some species a relationship between the granule size and the size of its macromolecules.

All the transformations done on wheat starch afforded to a notable modification of the mechanical behaviour of the new materials with an improvement of ultimate strain and in some cases no changes for ultimate strength. In addition enzymatic pruning showed a orientation property for the materials during the extrusion and the stability of their ultimate mechanical properties during the ageing.

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE

UMR-CNRS 6229 – Institut de Chimie Moléculaire de Reims – Université de Reims Champagne Ardenne – UFR des Sciences exactes et naturelles - bât 18 – Europol'agro – BP 1039 – 51687 Reims cedex 2