



DEVELOPPEMENT DE NOUVEAUX MATERIAUX BIOSOURCES

VALORISATION CONJOINTE DE COMPOSANTS DU BOIS ET D'ACIDES GRAS

DEVELOPMENT OF NEW BIOSOURCES MATERIALS

L'objectif principal du projet SYNCOBIO était de concevoir de nouveaux copolymères intégrant des hémicelluloses du bois et des acides gras par réaction de couplage « click ». A partir des stratégies de synthèses mises au point dans le cadre d'une thèse précédente (Maud Chemin, co-financement entre le Conseil Régional d'Aquitaine, FCBA et ITERG), il a été question d'optimiser et de produire des quantités plus importantes afin d'étudier leurs propriétés amphiphiles. Le 'scale-up' de la production et purification des xylooligosaccharides (XOS) puis de la synthèse des bioconjugués a été réalisé avec succès. La deuxième partie du projet a consisté à étudier les propriétés des bio-conjugués comme surfactants pour stabiliser des émulsions et pour l'encapsulation de principes actifs.

The main objective of SYNCOBIO project was to design new copolymers by coupling wood hemicelluloses and fatty acids by "click chemistry". Based on the syntheses strategies developed as part of a previous thesis (Maud Chemin), co-financed by the Conseil Régional de la Nouvelle Aquitaine, FCBA and ITERG), the optimization and production of larger quantities were performed in order to study their amphiphilic properties. The 'scale-up' of the production and purification of the xylooligosaccharides (XOS) then the synthesis of the bioconjugates were been successfully achieved. The second part of the project consisted in studying the potential of applications of the bio-conjugates as surfactants to stabilize emulsions and for the encapsulation of active molecules.

Contexte

Le développement de polymères biosourcés est un axe prioritaire présent dans les différentes feuilles de route nationales et européennes sur les mutations de la chimie basée sur le pétrole vers une chimie durable. Cependant, de nombreux verrous scientifiques et technologiques restent à lever avant que l'industrie puisse proposer de alternatives biosourcées comparables à la fois en coût et en performance aux matériaux existants.

Le premier verrou est assurément l'extraction, la purification et la caractérisation des biopolymères naturels qui constituent généralement la paroi végétale (cellulose, hémicelluloses, lignine) ou qui sont stockés dans des tissus de réserve (amidon, lipides). Ensuite, il est généralement nécessaire de modifier leurs structures chimiques ou de les associer avec d'autres polymères pour étendre leurs champs d'application.

Afin de répondre à ces défis, L'institut Technologique FCBA, l'Institut des Corps Gras (ITERG) et le Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques (LCPO) se sont associés pour mener un projet de recherche visant à concevoir de nouveaux copolymères intégrant des polysaccharides naturels et des séquences lipidiques par réaction de couplage.

Cette stratégie permet de mieux tirer parti des caractéristiques intrinsèques des composés naturels, contrairement à la déconstruction totale de la biomasse pour la production de molécules plateforme, dont l'approche reste calquée sur la chimie de ressources fossiles.

La première phase du projet Syncobio, développé dans le cadre d'une thèse (Maud Chemin) a permis de mettre au point les

stratégies de synthèse de ces copolymères par *chimie click*. Cette approche, proposée par le chimiste américain Karl Barry Sharpless (prix Noble de chimie en 2001), consiste en réaliser une réaction de couplage entre deux entités chimiques préalablement préparées afin qu'elles soient *clipsables*, de préférence dans l'eau ou dans un solvant bénin tout en fournissant les produits désirés à un haut rendement et/ou faciles à purifier. Dans la deuxième phase du projet (Syncobio 2), il a été question d'optimiser et de produire des quantités plus importantes des composés en question afin d'étudier leurs propriétés.

La synthèse des conjugués a été réalisée à partir d'oligosaccharides d'hémicelluloses de bois feuillus (xylanes) et deux acides gras modèle, l'oléate de méthyle et le ricinoléate de méthyle). Les résultats de cette thèse ont été valorisés sous la forme d'un brevet européen (EP3034517B1), dont l'extension à l'international est en cours de demande à l'heure actuelle (WO2016097043A1).

Grâce à leur propriétés amphiphiles (composés possédant à la fois une partie hydrophile et une partie hydrophobe) les conjugués présentent d'excellentes caractéristiques tensioactives pour la stabilisation d'émulsions eau-huile.

D'autre part, quand dispersés dans l'eau ou un solvant organique approprié, des observations par microscopie électronique par transmission (TEM) révèlent la capacité de ces composés à s'auto-assembler en micelles et en vésicules.

Cela fait de ces molécules de bons candidats à l'encapsulation de petites molécules, tels des principes actifs dans les domaines pharmaceutique ou cosmétique.

La « chimie-click » au service des matériaux biosourcés

Deux stratégies de synthèse par « chimie click » ont été mises au point dans le cadre de la thèse de Maud Chemin : le couplage thiol-ène et azoture-alcyne. Pour des raisons de rendement de réaction et de stratégies de purification, seule la dernière approche a été retenue pour le projet Syncobio 2.

Ainsi, la synthèse des copolymères de la deuxième partie de l'étude a été réalisée selon l'approche « chimie-click » par la cyclo-addition azoture-alcyne catalysée au Cu(I) (Figure 1).

Tout d'abord, l'extrémité réductrice du XOS est fonctionnalisée par une animation réductrice sur la forme « ouverte » (aldéhyde) afin d'envisager des morphologies de type 'bloc'. Des oligosaccharides de xylane (XOS) fonctionnalisés avec le groupement azoture ont été caractérisés par RMN ¹H et par spectroscopie infra rouge. Le rendement de cette étape est quantitatif.

De leur côté, les esters gras (oléate de méthyl MeOl ou ricinoléate de méthyl MeRic) porteurs de la fonction alcyne ont été synthétisés par réaction de trans-estérification en présence du 3-butyn-1-ol comme réactif et du 1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-ène (TBD) comme catalyseur.

Les deux « moitiés » fonctionnalisées sont ensuite couplées pour permettre la formation des conjugués amphiphiles, comportant une partie hydrophile (XOS) et une partie hydrophobe (acide gras).

Scale-up de la production d'hémicelluloses, oligosaccharides de xylanes et copolymères

Dans le cadre de la thèse de Maud Chemin, les XOS ont été obtenus à partir de xylanes modèle, disponibles commercialement, mais uniquement tant que réactif de laboratoire. Les quantités mis en œuvres étaient de l'échelle de quelques centaines de milligrammes.

Afin de rapprocher le projet de la réalité industrielle et de permettre l'étude d'applications potentielles, un scale-up des conditions réactionnelles a été réalisé permettant de porter les expériences à l'échelle de quelques dizaines de grammes.

Des extractions d'hémicelluloses ont été réalisées à partir de copeaux de pin maritime et de hêtre en raison de la nature différente des hémicelluloses entre les bois feuillus et résineux. Différentes conditions d'extractions (temps, températures, avec et sans palier d'extraction après la montée en température, etc...) ont été testées. Après l'extraction, les hémicelluloses ont été obtenues à partir des jus d'extraction par précipitation. Cette dernière a été réalisée selon les étapes décrites dans la Figure 2.

Deux stratégies de purification ont été testées : soit une précipitation directe dans l'éthanol; soit un abaissement du pH à 2; ce qui permet la précipitation de la lignine, suivi d'une neutralisation et finalement la précipitation et les lavages successifs dans de l'éthanol. Les deux principaux enseignements sont qu'il est possible d'éliminer une partie de la lignine par simple précipitation à pH 2 et que la montée de température est responsable d'une forte dégradation des hémicelluloses de pin maritime.

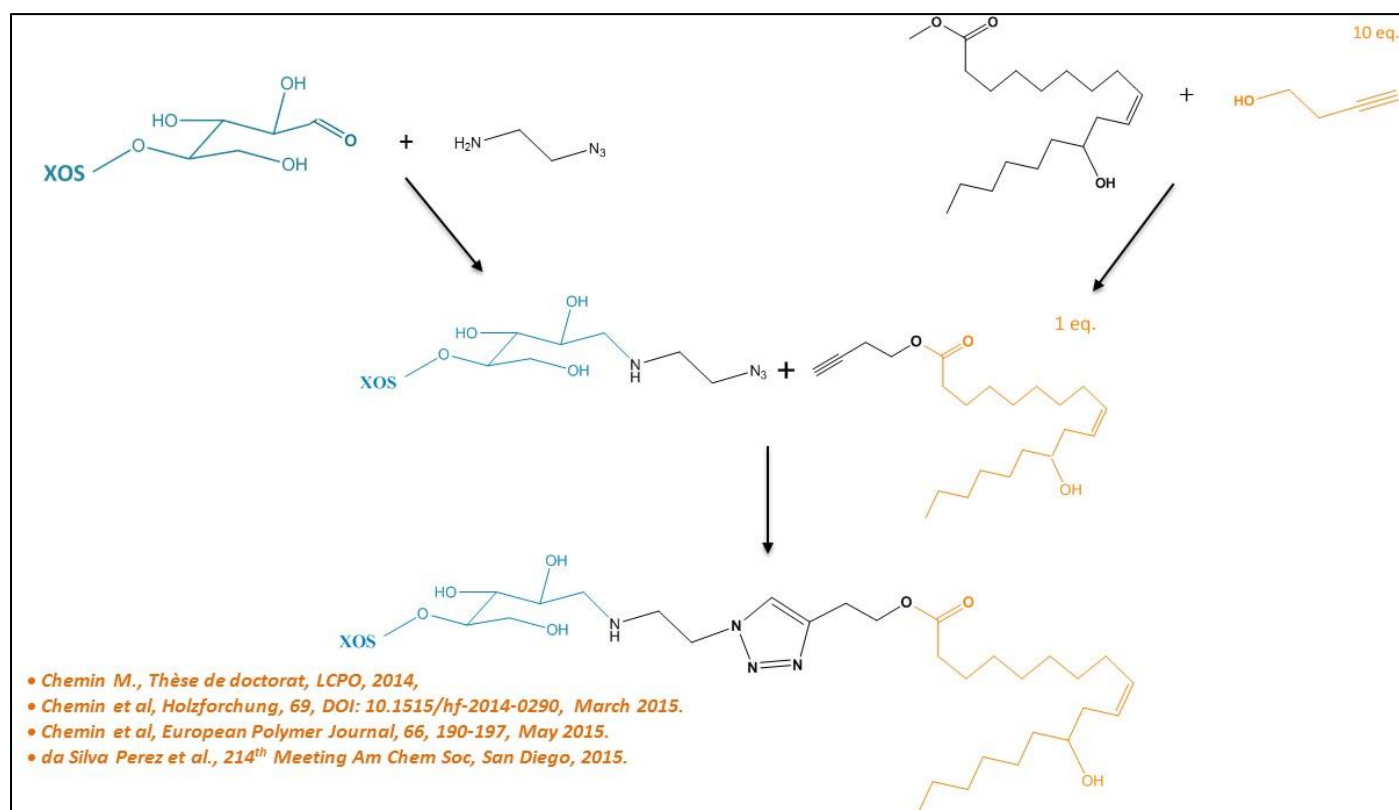


Figure 1 : Schéma réactionnel de la synthèse de copolymères par l'approche « click » thiol-ène à partir de XOS et d'acides gras

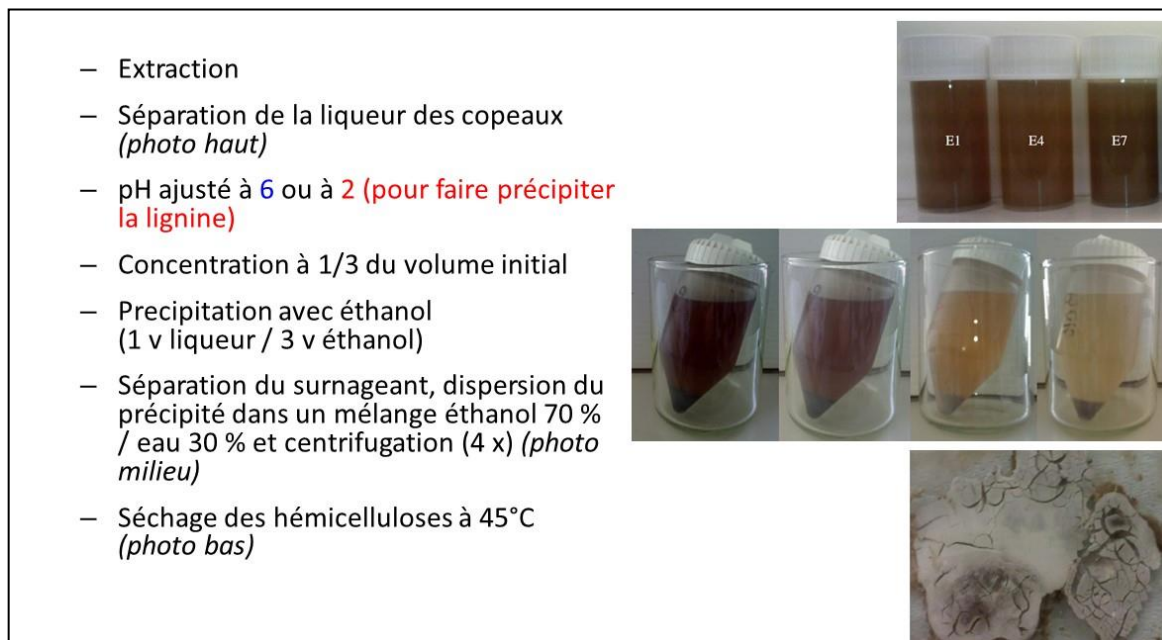


Figure 2 : Schéma de purification des hémicelluloses à partir des jus d'extraction

L'accroissement d'échelle de la production et purification des xylooligosaccharides (XOS) par hydrolyse acide d'hémicelluloses type xylane a été mené sur la base du protocole mis en place pendant la thèse de Maud Chemin en adaptant certaines techniques aux conditions industrielles (Figure 3). Les différentes analyses prouvent que le scale-up a permis d'obtenir avec succès des xylo-oligosaccharides de pureté et de masses molaires identiques à ceux obtenus précédemment.

Les couplages ont été réalisés avec un accroissement d'échelle de 4 g de XOS fonctionnalisés par un groupement azoture. Après la réaction, le mélange est purifié par dialyse (MWCO : 100-500 Da, Spectra/Por®Biotech), puis lyophilisé. Cette étape de dialyse est la plus limitante de tout le procédé de production des bio-conjugués amphiphiles et doit être optimisée dans le futur.

Les deux oligomères bio-conjugués amphiphiles obtenus, XOS-b-MeOI et XOS-b-MeRic, ont été analysés par RMN ¹H dans le CDCl₃ et le D₂O. Dans le CDCl₃, seuls les pics associés aux esters gras sont visibles. Il est probable que les macromolécules formées soient organisées en nano-objets avec des chaînes grasses à leur surface, le CDCl₃ étant un mauvais solvant pour les XOS fortement liés entre eux par des liaisons hydrogènes en un cœur dense ; ce qui explique qu'ils ne soient pas visibles. Dans le D₂O au contraire, les XOS sont parfaitement solubles, et leurs signaux sont visibles, et les esters gras le sont moins : leurs signaux sont moins bien définis que dans le CDCl₃. Dans le D₂O, les objets obtenus sont plus mous et le cœur des objets formés est composé des chaînes grasses. Ces observations corroborent les résultats obtenus par Maud Chemin dans le cadre de sa thèse.

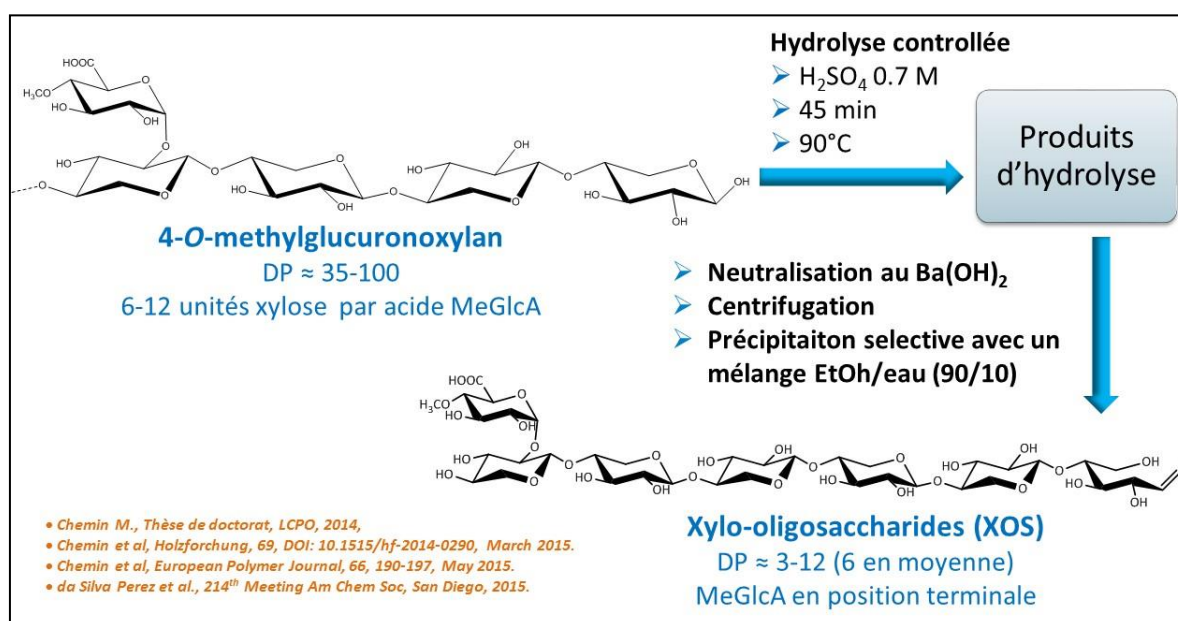


Figure 3 : Schéma de scale-up de production et purification des XOS à partir de xylanes

Applications potentielles des copolymères obtenus

Dans le cas de systèmes à blocs de nature chimique incompatible, il existe une micro-séparation de phase en solution conduisant à la formation d'objets organisés. Grâce à cela, il est possible d'envisager des applications d'encapsulation, de tensioactifs ou revêtements. Ainsi, une organisation supramoléculaire des oligomères bio-conjugués amphiphiles XOS-b-MeOI et XOS-b-MeRic se produit spontanément quand ceux-ci sont dispersés dans un solvant, formant des micelles et/ou vésicules. Cependant, cette organisation dépend de la nature du solvant (polaire ou non-polaire). En effet, la partie hydrophile du conjugué a une tendance à rester à l'extérieur de la vésicule ou micelle formées dans un solvant polaire (l'eau, par exemple), tandis que quand un solvant organique est utilisé (chloroforme), c'est la partie hydrophobe (acide gras) de ces objets qui se retrouve à l'extérieur) (Figure 4).

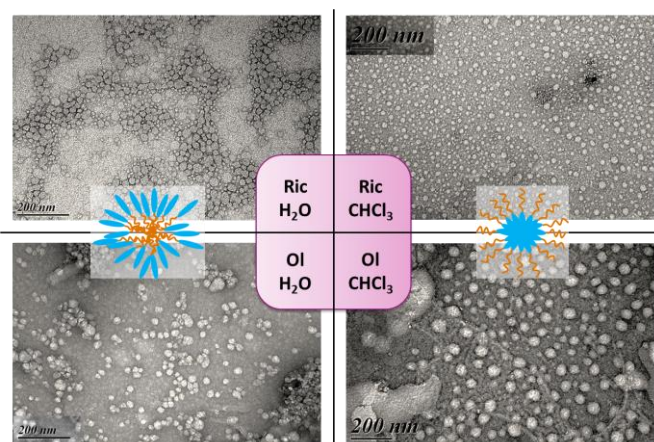


Figure 4 – Vésicules de conjugués amphiphiles formées en fonction de la nature du solvant dans lequel ils sont dispersés.

L'étude par DLS ('dynamic light scattering' ou diffusion dynamique de la lumière) permet d'estimer le rayon hydrodynamique (Rh) des objets formés en solution par mesure de leur coefficient de diffusion. Trois concentrations différentes ont été étudiées : 10, 1 et 0,1 mg/mL. Les diamètres des objets formés obtenus sont cohérents et varient de 114 à 135 nm avec des dispersités (Pdi) faibles indiquant des nano-objets mono-dispersés. Des observations par microscopie électronique par transmission (TEM) révèlent la présence de deux types de population : des objets, petits et pleins, de l'ordre de 20 nm à 50 nm et des objets, plus grands et creux, de l'ordre de 60 à 80 nm. Il semblerait donc que le bio-conjugué amphiphile XOS-b-MeOI donne une mixture de micelles et de vésicules par dissolution directe dans l'eau pour une concentration de 1 mg/mL.

A partir de ces observations, il a été possible d'étudier les propriétés des bio-conjugués comme tensio-actif pour stabiliser des émulsions. La balance hydrophile-lipophile (HLB) a été déterminée pour ces oligomères et est de 15 ; ceci leur confère un pouvoir d'émulsifiant huile dans l'eau. Afin de tester ce pouvoir émulsifiant, 4 quantités différentes de bio-conjugué amphiphile XOS-b-MeOI ; 0,25, 0,5, 1 et 2 w/v % ont été ajoutés à un mélange huile :eau (50/50). Des observations directes et des clichés par microscopie optique (Figure 5) démontrent que la taille des gouttelettes d'émulsion varie avec leur stabilité : plus les émulsions sont stables et plus les gouttelettes d'émulsion sont petites. Celles-ci grossissent lors du phénomène de crémage.

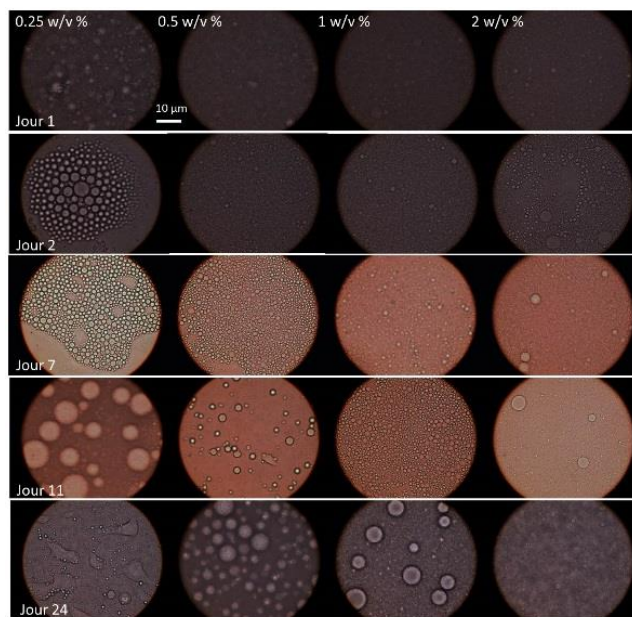


Figure 5 : Clichés obtenus par microscopie optique des émulsions stabilisées.

Enfin, grâce à leur capacité de s'auto-assembler en micelles et en vésicules, ces oligomères se présentent comme de bons candidats à l'encapsulation de petites molécules. Cela a été testé dans le cadre de cette étude pour l'encapsulation du rouge du Nil, un colorant modèle, car observable par microscopie confocale et TEM (Figure 6). Le microscopie confocal a permis d'établir que le rouge du Nil est distribué de façon homogène sur l'ensemble de la surface de l'échantillon sous la forme de petits objets sphériques, tandis que les clichés en TEM révèlent un mélange de micelles et de vésicules avec le colorant distribué dans les parties hydrophobes des micelles, c'est-à-dire dans leur cœur, ainsi que dans les parties hydrophobes des vésicules, donc dans leur membrane.

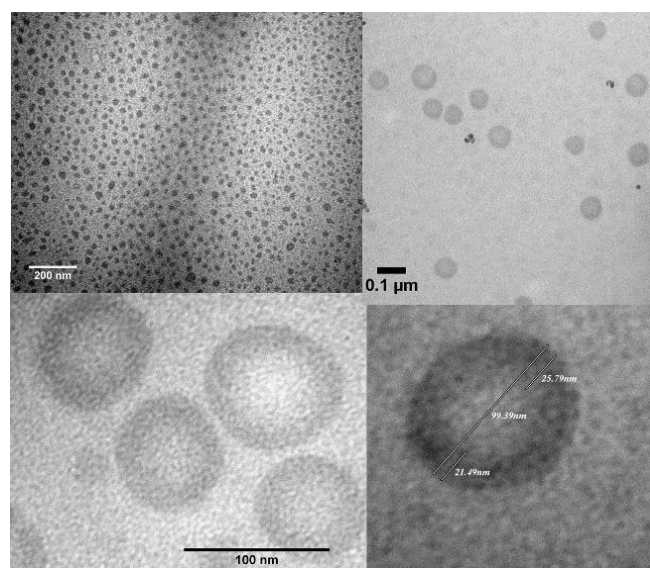


Figure 6 : Clichés de microscopie électronique par transmission (TEM) des conjugués oligosaccharides de xylanes-oléate de méthyle dans l'eau..

Perspectives

La conception, la synthèse, l'optimisation et le scale-up de nouveaux copolymères intégrant d'oligosaccharides d'hémicelluloses du bois et des acides gras par réaction de couplage « click » ont été achevés dans le cadre de ce projet. L'étude a permis de maîtriser les conditions d'extraction d'hémicelluloses à partir de hêtre et de pin maritime, de leur hydrolyse en oligosaccharides de taille contrôlée et de leur couplage avec des acides gras par « chimie click » de type azoture/azide.

La deuxième partie du projet a consisté à réaliser des études physico-chimiques et à tester des applications potentielles pour les conjugués amphiphiles. Grâce à leur capacité de s'auto-assembler en micelles et en vésicules, ces oligomères se présentent comme de bons candidats à l'encapsulation de molécules pour des applications dans les domaines pharmaceutique et/ou cosmétique.

Le concept a été démontré depuis l'échelle du laboratoire (milligrammes) au scale-up (dizaines de grammes) et est protégé par un brevet Européen, dont l'extension à l'international est en cours. La valorisation des résultats sera un projet de maturation en vue d'une transposition vers une possible industrialisation.

Pour en savoir plus

> Maud Chemin, Valorisation des xylanes du bois : Vers la synthèse de copolymères amphiphiles bio-sourcés ; Thèse de doctorat, soutenue le 19/12/2014 au LCPO/Université de Bordeaux.

Etude réalisée en partenariat avec



Avec le soutien financier de



Labellisé par le Pôle de compétitivité

Pôle de Compétitivité



Contact

Denilson DA SILVA PEREZ ● denilson.dasilvaperez@fcba.fr

Tél. 04 76 76 10 11

InTechFibres

Pôle Technologique

Domaine Universitaire – CS 90251

38044 Grenoble Cedex 9



INSTITUT TECHNOLOGIQUE