

# Recherches sur les macromolécules végétales

**Le Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales (CERMAV) a été créé en 1966 pour développer à Grenoble un centre d'études sur « la cellulose et la lignine ». Progressivement, le centre s'est orienté vers une recherche fondamentale très pluridisciplinaire sur les mono-, oligo- et polysaccharides structurée en six grands thèmes ; compte tenu de l'importance grandissante des glucides dans plusieurs domaines industriels dont l'agro-alimentaire, nombre de recherches sont menées dans le cadre de contrats avec d'importants laboratoires.**



## Historique et évolution des thèmes de recherche

Le CERMAV, laboratoire propre du CNRS a été créé en 1966 à l'initiative du Professeur Marcel CHÈNE, alors Directeur de l'Ecole Française de Papeterie et avec l'appui du Professeur Louis WEILL, Doyen de la Faculté des Sciences de Grenoble, et du Professeur Georges CHAMPETIER, Membre de l'Institut, alors Directeur de l'Ecole de Physique et Chimie de la Ville de Paris.

Article proposé par Marguerite RINAUDO, Professeur à l'Université Joseph Fourier, UPR 5301, Grenoble.

L'objectif initial était d'implanter à Grenoble un Institut de Recherche fondamentale sur « la cellulose et la lignine » en amont du Centre Technique du Papier et de l'Ecole Française de Papeterie.

A la création du laboratoire, trois équipes se mettaient en place, animées par des universitaires, sur les thèmes suivants :

- synthèse et stéréochimie des polysaccharides,
- physicochimie des solutions et polyélectrolytes,
- biosynthèse et biodégradation des parois végétales.

Dès 1967, une activité sur l'« état solide des polymères » se développait et conduisait à la création d'une quatrième équipe en 1970 ; à cette même époque, par transfert d'une équipe de chimistes, une activité sur la chimie des monosaccharides s'est développée.

Au début, essentiellement constitué d'enseignants-chercheurs de l'université, le laboratoire accueillait progressivement des chercheurs CNRS qui, actuellement, sont largement majoritaires.

Le premier Directeur du CERMAV a été le Professeur Didier GAGNAIRE, à qui a succédé, le 1<sup>er</sup> janvier 1984, Mme

M. RINAUDO, Professeur à l'Université Joseph Fourier.

La structure du laboratoire reposait alors sur 5 équipes de recherche ayant une large autonomie. Depuis 1984, l'organisation du laboratoire évolue progressivement vers une structure en thèmes. Les différents thèmes de recherche actuels sont les suivants :

- Synthèse et modifications chimiques et enzymatiques des oligosaccharides,
- Etudes structurales des oligo et polysaccharides,
- Biodégradation des polysaccharides,
- Physique et physicochimie des polysaccharides,
- Structure et ultrastructure des parois végétales,
- Valorisation de la biomasse végétale et obtention de nouveaux matériaux.

Une extension des locaux a permis dès septembre 1990 le développement d'une activité de recherche dans le domaine des propriétés des matériaux à base de polysaccharides. Cette extension devrait permettre également l'accueil de nouveaux biochimistes et de microbiologistes.

Parmi les résultats récents obtenus dans notre laboratoire, nous avons sélectionné quelques exemples reflétant la pluridisciplinarité de nos activités.

**C.E.R.M.A.V. : Tableau établi le 1<sup>er</sup> juillet 1990**  
**Evolution des effectifs et des crédits depuis la création du laboratoire en 1966**

		1966	1968	1969	1970	1971	1972	1973	1974	1975	1976
Chercheurs	C.N.R.S.	0	1	1	2	7			9		
	Université Non permanent	7	7	7	9	10			11		
I.T.A.	C.N.R.S.		8	12	11,5	12,5			15,5		
	Thèses	1	2	5	4	4	4	1	5	4	7
Budget en KF	C.N.R.S.		364,8	707			579	519,49	549	594,5	607
	Université Contrats										167 396
		1977	1978	1979	1980	1981 (a)	1982	1983	1984 (b)	1985	1986
Chercheurs	C.N.R.S.	12	14	13	15	17	19	17	18		
	Université Non permanent	9 19	10,5 21	9 12,5	9 11	9 17	8,5 17	9,5 17	9,5 12	8,5 14	20
I.T.A.	C.N.R.S.	18,5	17,5	17	18	17	19,8	19,4	19,4		
	Thèses	6	4	5	4	5	8	8	8	6	3
Budget en KF	C.N.R.S.	613,2	642,5	768	812	708	1 185	1 405	1 539,9	1 651	1807,14
	Université Contrats	199 415	164 688	128 603	117 811	107 1 089	149 1 211	138 1 491	139 1 355	135 1 802	167 2 570
		1987 (c)	1988	1989	1990	} Valeurs au 1/7/1990					
Chercheurs	C.N.R.S.	16	17	17	16						
	Université Non permanent	8,5 19	8,5 26	8,5 20	8,5 20						
I.T.A.	C.N.R.S.	19,1	18,7	19,9	19,9						
	Thèses	4	6	5							
Budget en KF	C.N.R.S.	1 787	1 751	1 836	2 242						
	Université Contrat	168 2 283	179 1 832	163 1 540	185 1 175						

(a) Sommes exprimées H.T. à partir de 1981.

(b) A partir de 1984 les crédits correspondants aux dépenses d'infrastructures sont inclus dans la dotation globale (+ vacations) (auparavant dépenses payées sur un budget « groupe de laboratoires »).

(c) Départ de 3 chercheurs vers d'autres unités.

#### Les moyens mi-lourds

- Microscope électronique Philips EM400T avec microtome,
- RMN AC 300 (dans le cadre du Centre Grenoblois de Résonance Magnétique),
- Spectrométrie de masse Nermag R1010 (en commun CNRS-Université Joseph Fourier),
- Réseau de stations de travail (4 SUN, 1 Silicon Graphics),
- Microscope électronique à balayage Jeol JSM 6100,
- Chromatographie d'exclusion stérique Waters 150 avec triple détection (viscosité, diffusion de la lumière et réfractométrie différentielle),
- Réacteur d'autohydrolyse des matériaux lignocellulosiques,
- Spectromètre mécanique (Micromecanalyser Metravib),
- Diffusion élastique de la lumière (Chromatix KMX6, CMX100),
- IRTF Perkin Elmer, 1720 X
- Banc de filage,
- Salles de culture de cellules végétales.

#### Moyens mi-lourds à prévoir :

- RMN à haut champ 500 MHz,
- Renouvellement du microscope électronique,
- Serveur de calcul.



## Synthèse, structure 3D et interactions des oligosaccharides

Nous développons principalement des méthodes de synthèses et de modifications chimiques et enzymatiques de maltooligosaccharides linéaires et cycliques. La finalité de ces recherches est l'étude des enzymes intervenant dans la dégradation et la modification de l'amylose et de l'amylopectine. De plus, dans le cas des cyclodextrines, la modification de ces molécules devrait également permettre des études nouvelles de reconnaissance et de catalyse supramoléculaire.

### Synthèses chimio-enzymatiques combinées pour l'obtention de cyclodextrines régulièrement modifiées

La cycloglucosyltransférase (CGTase), enzyme responsable de la synthèse de cyclodextrines naturelles, peut également reconnaître des analogues de substrat.

Cette méthode originale est la seule permettant l'obtention de cyclodextrines régulièrement substituées avec un bon rendement.

Ainsi le 6'-O-méthyl-fluoromaltose conduit après oligomérisation et cyclisation à la 6<sup>A,C,E</sup> tri-O-méthyl- $\alpha$ -cyclodextrine (fig. 1).

### Synthèse totale des 4-thiomaltooligosaccharides

Les thiooligosaccharides, dans lesquels l'atome interglycosidique est un atome de soufre, résistent à l'hydrolyse acide ou enzymatique et sont modulateurs d'activités glycanasiques. Ils permettent donc la purification par affinité de ces protéines et le marquage d'acides aminés impliqués dans la reconnaissance protéine-substrat (fig. 2).

### Structures tridimensionnelles et interactions

Ces études sont abordées selon une démarche qui cherche à corréler expéri-

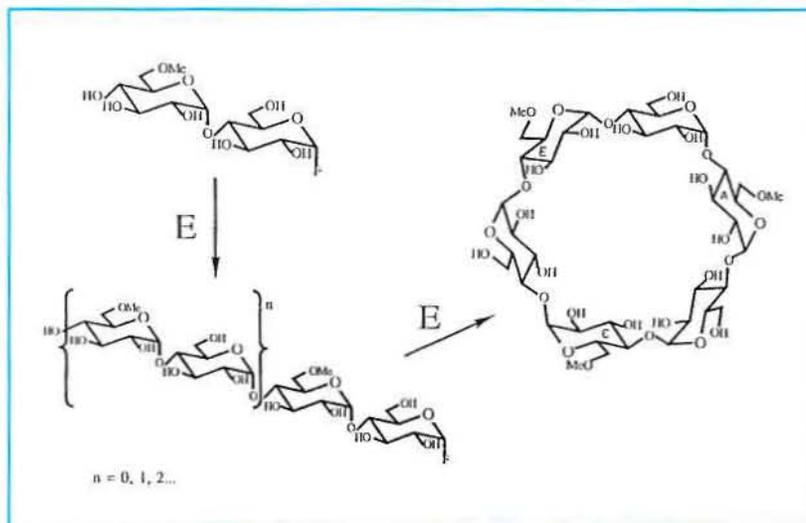


Figure 1. — Obtention de cyclodextrine régulièrement substituée par la cycloglucosyltransférase (E).

mentation d'une part, modélisation et analyse conformationnelle d'autre part.

Les sujets traités actuellement concernent des molécules qui sont préparées et étudiées dans le laboratoire ; c'est le cas des cyclodextrines modifiées dont certaines sont cristallisées et dont la structure tridimensionnelle est en cours de résolution.

Des études de RMN en solution (mesure de couplages hétéronucléaires et interglycosidiques pour l'estimation des angles de torsion, mesure de NOE pour la détermi-

tion de distances entre protons, ...) sont également développées et permettront par confrontation avec l'approche théorique, de préciser la conformation de ces oligomères cycliques (fig. 3, page suivante). Ces résultats sont utilisés pour étudier la complexation avec de petites molécules.

La même approche s'applique également pour l'étude de polysaccharides chargés (alginate et polygalacturonate) et devrait nous permettre de préciser le mécanisme de leur réticulation coopérative par les ions bivalents.

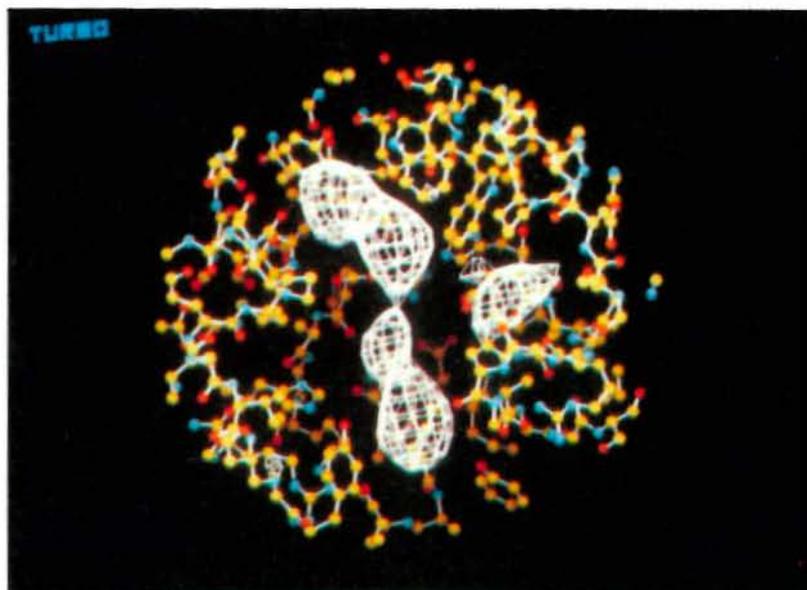


Figure 2. — Interaction de l' $\alpha$ -amylase pancréatique de porc avec un analogue de substrat, le 4-thiomaltotriptide visualisé dans le centre actif de l'enzyme (collaboration avec F. Payan, R. Haser, CNRS Marseille, et E. Duée, G. Buisson, CEN-Grenoble ; logiciel Turbo-Frodo : A. Roussel, C. Cambillau, CNRS Marseille).

## Structure des parois végétales

Aux stades les plus précoces de leur développement, les parois cellulaires végétales sont constituées d'un assemblage de polysaccharides organisés autour des microfibrilles de cellulose. En accord avec la détermination de leurs structures chimiques, on a pu mettre en évidence plusieurs types d'associations selon la nature des polysaccharides constitutifs (liaisons hydrogène, covalentes ou électrostatiques). L'étude par microscopie électronique de la localisation des différentes macromolécules au sein de la paroi a pu être abordée grâce à des marqueurs spécifiques.

La reconnaissance d'un substrat polysaccharidique peut être réalisée par l'intermédiaire d'une *exo-* ou *endo-*glycohydrolase appropriée couplée à l'or colloïdal, par un anticorps dirigé contre un motif structural caractéristique ou encore par la réaction spécifique d'une fonction chimique créée sur la chaîne de polysaccharide (fig. 4).

Ces techniques de marquage sont appliquées au problème du développement des cellules en phase de croissance et à l'étude des facteurs intervenant dans le phénomène d'extension cellulaire. La diffusion des enzymes lignolytiques dans le réseau des parois lignifiées est également étudiée dans le but de comprendre l'évolution des propriétés des fibres papetières soumises à un traitement enzymatique.

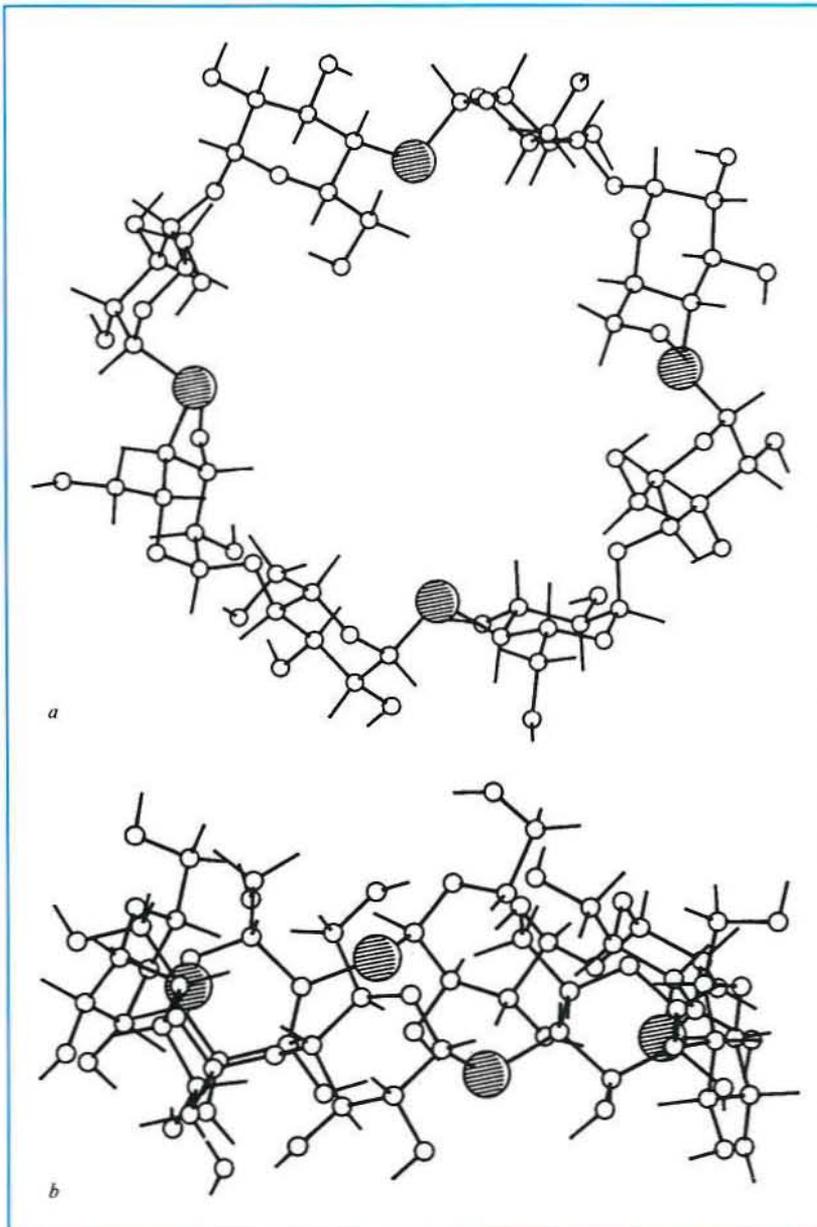


Figure 3. — Modèle d'un 4<sup>A,C,E,G</sup> tétra-S-cyclomaltooctaose.  
a) de face.  
b) de profil.

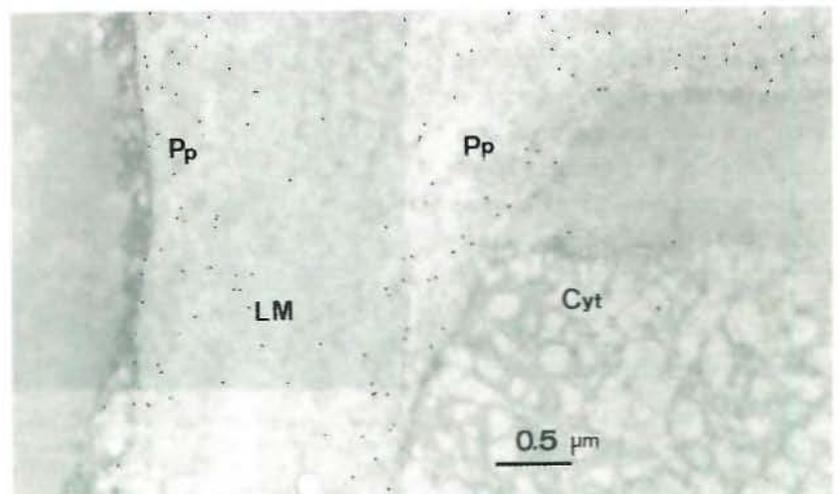


Figure 4. — Photographie au microscope électronique montrant la localisation spécifique des xyloglucanes à l'aide d'un anticorps antixyloglucanes dans les parois de cellules de *Rubus fruticosus* en culture (P<sub>p</sub> paroi primaire ; L<sub>M</sub> lamelle mitoyenne ; Cyt cytoplasme).

## Etat solide des polysaccharides

Les polysaccharides cristallins sont susceptibles de présenter des morphologies particulièrement intéressantes qui résultent de l'action simultanée de la biosynthèse et de la cristallisation. La cellulose, polymère naturel le plus abondant et produit de base de l'industrie papetière en est un bon exemple. La cellulose native se trouve toujours sous forme microfibrillaire (fig. 5A) et peut atteindre des degrés de cristallinité très supérieurs à ceux de la plupart des autres polymères (fig. 5B). Chaque microfibrille est en fait un « whisker polymère » comme le démontre la microscopie électronique, par une technique de champ sombre (fig. 5C), ou par observation en haute résolution (fig. 5D). Dans ce cas, les images obtenues permettent de voir l'empilement latéral des chaînes cellulose et l'absence de tout défaut de structure sur des distances de l'ordre du micromètre.

En dépit de leur perfection, les cristaux de cellulose peuvent être hydrolysés par des cellulases en particulier d'origine fongique. La figure 6 donne un exemple d'une hydrolyse partielle observée au microscope électronique : les enzymes attaquent les défauts qui dans ce cas précis ont été créés artificiellement par un traitement acido-mécanique de la cellulose. Chaque défaut est attaqué simultanément et donne lieu à une hydrolyse unidirectionnelle, ce qui prouve que les chaînes de cellulose sont organisées de façon parallèle au sein de chaque microfibrille.

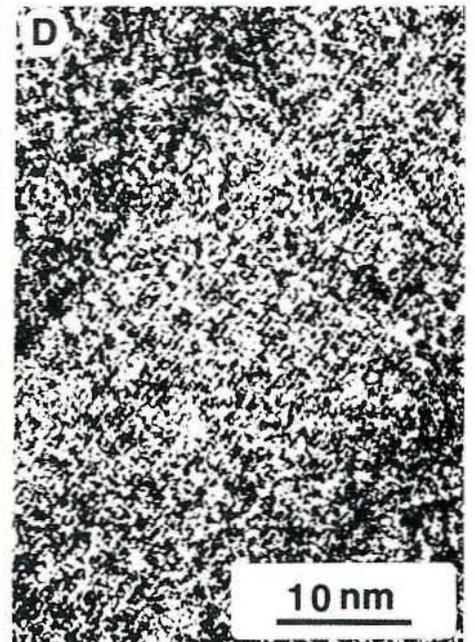
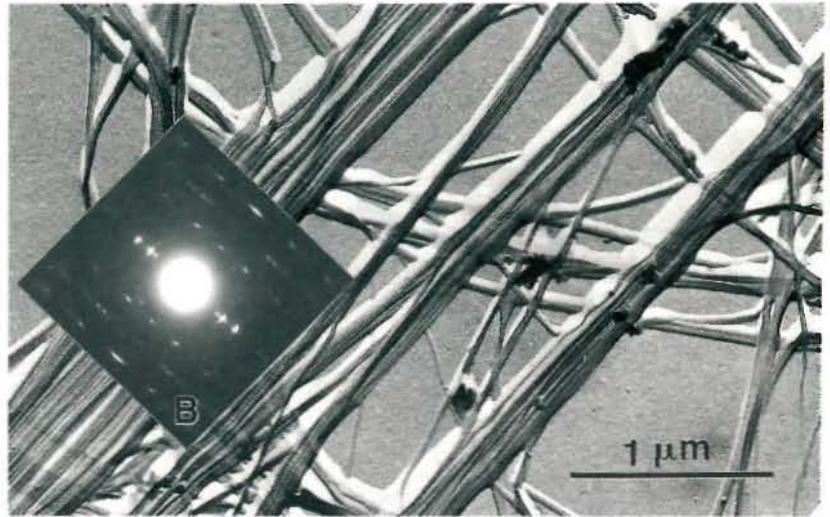


Figure 5A : Photographie prise au microscope électronique d'une nappe de microfibrilles cellulose en provenance de la paroi de l'algue *Valonia ventricosa*.

5B : Cliché de diffraction aux électrons correspondant à un faisceau orienté de microfibrilles.

5C (image en champ sombre) et 5D (image en haute résolution) démontrant le caractère monocristallin des microfibrilles qui sont de véritables « whisker polymères » à chaînes parallèles et totalement étirées. Les lignes dans la figure 5D correspondent aux empilement des molécules de cellulose. Elles sont séparées par 0,54 nanomètres, distance entre les chaînes cellulose.

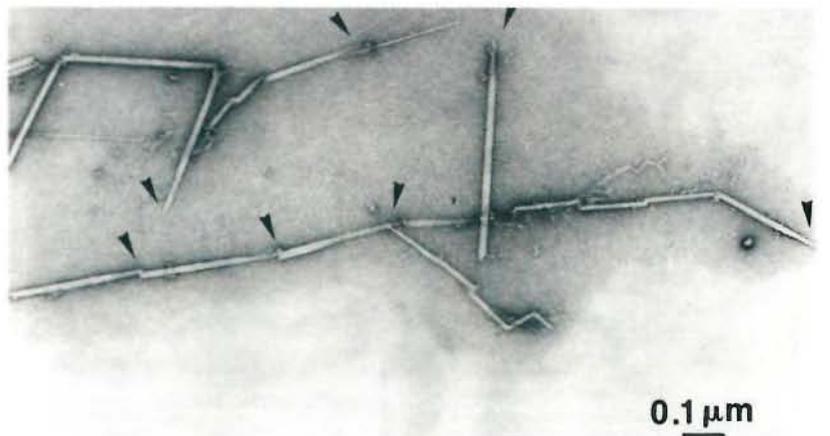


Figure 6. — Photographie prise au microscope électronique de microfibrilles de cellulose en provenance de paroi de *Valonia ventricosa*. Après une préhydrolyse par un traitement acido-mécanique, les microfibrilles sont soumises à une attaque enzymatique par un mélange de deux cellulases : l'endo-cellulase attaque les défauts créés par l'acide tandis que l'exo-cellulase dégrade uniquement l'une des deux extrémités (indiquées par des flèches) des fragments de microfibrilles.

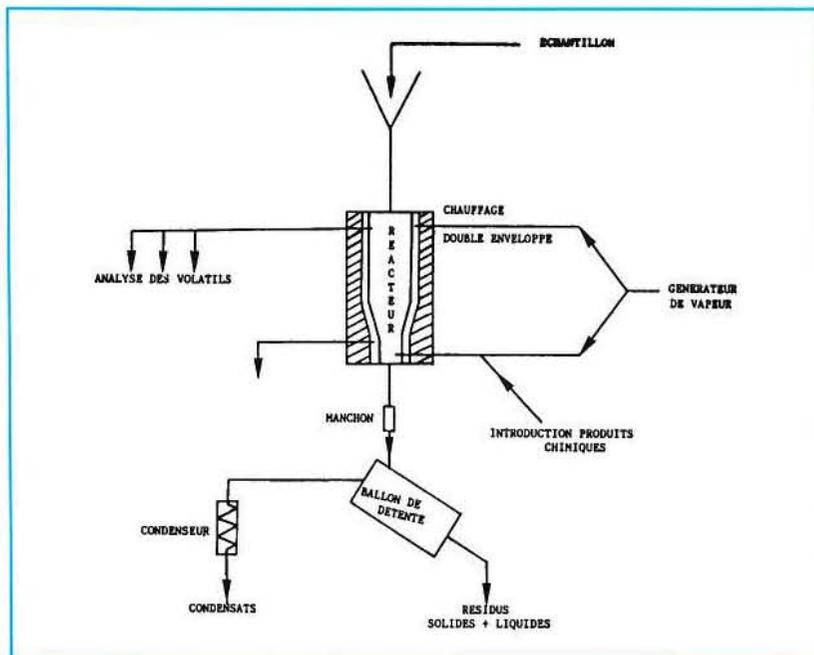


Figure 7. — Schéma des éléments du pilote EC300 commercialisé par la société DELTA-LAB Voreppe France sous licence CNRS.

Figure 8. — Traitement d'une paille de blé par autohydrolyse rapide :  
 a) paille de blé : état initial,  
 b) paille « explosée »,  
 c) paille « explosée » blanchie.

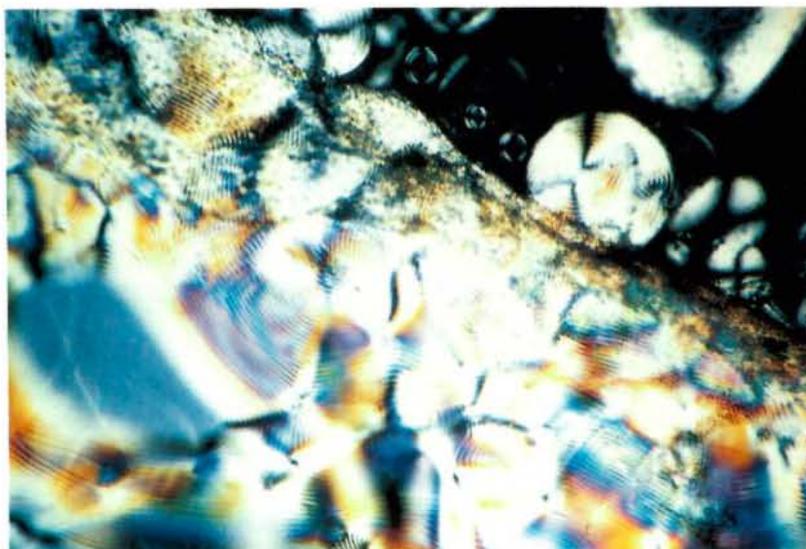
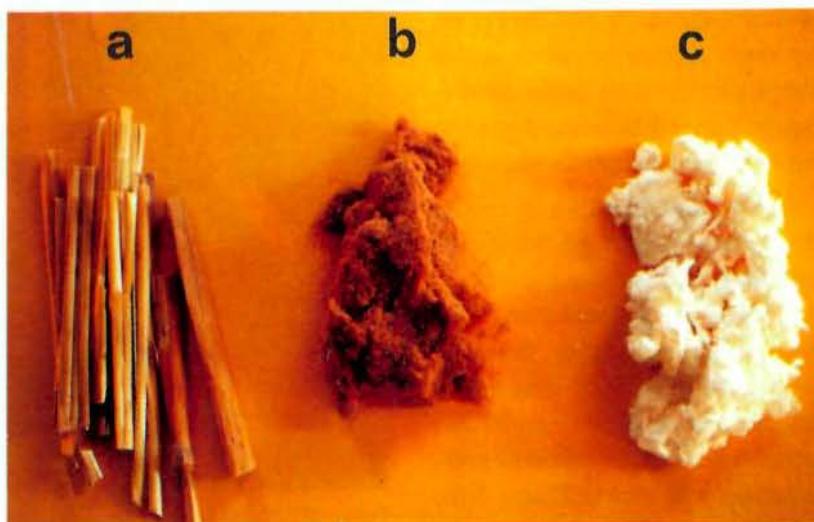


Figure 9. — Formation d'un cristal liquide cholestérique dans une solution aqueuse de xanthane partiellement hydrolysé. Observation par microscopie photonique en lumière polarisée dans le domaine biphasique. On met en évidence la présence de sphérolites dont la taille peut atteindre un diamètre de 1 mm.

### **Autohydrolyse rapide de matériaux lignocellulosiques**

Un pilote d'autohydrolyse rapide (EC300) destiné au prétraitement de matériaux lignocellulosiques a été conçu au laboratoire (fig. 7). Il est particulièrement adapté pour réaliser des bilans et pour étudier l'influence des paramètres de traitement (température, pression et durée de réaction) sur les constituants de la biomasse.

Au cours de ce processus, les matériaux subissent une décompression explosive accompagnée d'une destructuration entraînant une augmentation d'accessibilité et de réactivité chimique ou enzymatique (fig. 8); partiellement hydrolysés, les constituants de la biomasse végétale peuvent être sélectivement solubilisés en vue de leur valorisation. La figure 8 montre l'effet du traitement sur la paille de blé. On obtient de façon simple et rapide une cellulose destinée à l'industrie chimique.

### **Les polysaccharides sont aussi des matériaux**

— en solution, ils peuvent former des cristaux liquides cholestériques. Le xanthane,

<b>Fiche d'identité</b>
<b>Intitulé :</b> Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales (CERMAV)
<b>U.P.R. N° 5301</b>
<b>Date de création :</b> 1966
<b>Directeur :</b> Marguerite RINAUDO
<b>Personnels :</b>
— Chercheurs CNRS : 16
— ITA CNRS : 20
— Enseignants-chercheurs : 8,5
— Etudiants, post-docs, visiteurs : 20
<b>Budget</b>
* 1990 : Dotation initiale CNRS 2 230 KF (dont 1 000 KF de crédits d'infrastructure).
* 1989 : — CNRS : 1 824 KF (dont 744 KF d'infrastructure)
— industrie : 1 540 KF
— université : 163 KF
<b>N° de téléphone :</b> 76 54 11 45
<b>N° de fax :</b> 76 54 72 03
<b>Adresse :</b> Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales (CERMAV) B.P. 53X 38041 Grenoble Cedex
<b>Sections du Comité National :</b> 17 et 16 (Chimie) 26 (Sciences de la Vie)
<b>Région :</b> Rhône-Alpes (secteur Alpes)

polysaccharide bactérien, est un épaississant utilisé en récupération assistée du pétrole ou dans le domaine alimentaire. Sa rigidité moléculaire est telle que dans son état natif, il forme des cristaux liquides à une concentration inférieure à 3 g/l. Démontrée pour la première fois pour le xanthane (fig. 9), cette propriété peut être mise en évidence pour de nombreux polysaccharides microbiens. Cette rigidité justi-

fie également la stabilité de la viscosité des solutions en présence d'électrolytes.

— en régime semi-dilué, ils peuvent conduire à des gels physiques. Ces propriétés gélifiantes sont déjà largement utilisées dans différents domaines industriels.

— enfin, les polysaccharides peuvent être mis en œuvre pour obtenir des films, des fibres ou des structures cellulaires. ■