

**Caractérisation de leur activité anti-oxydante.**

Emmanuel Renault, Vincent Chaleix, Claude Calliste, Aline Barbat, Vincent Gloaguen\*

Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles-EA1069, Université de Limoges, Faculté des Sciences et techniques, 123 Avenue Albert Thomas, F-87000 Limoges, France

\*email: vincent.gloaguen@unilim.fr

Avec une forêt occupant plus du tiers de sa superficie, le Limousin présente, entre autres caractéristiques, une industrie forestière particulièrement développée. Parmi les essences forestières représentatives du Limousin, le châtaignier y est bien implanté. Son bois est principalement formé de polysaccharides, dont le 4-*O*-Méthylglucuronoxylanes (MGX, hémicellulose caractéristique des parois cellulaires végétales) (figure 1, référence 1). Actuellement, de nombreuses voies de valorisation des MGX sont à l'étude en raison de leurs propriétés physico-chimiques ou biologiques. Ces derniers sont classiquement recueillis après délignification des sciures de châtaignier par NaOCl et extraction alcaline par KOH. En s'appuyant sur des travaux récents du laboratoire, l'objectif de cette étude est de démontrer qu'en appliquant des conditions de délignification plus douces par une phthalocyanine et une simple extraction à l'eau (référence 2), il est possible de moduler la structure et les propriétés anti-oxydantes des xylanes obtenus.

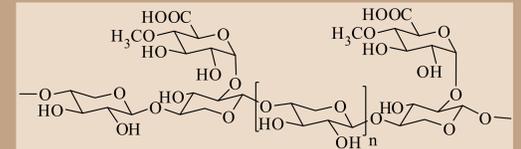


Fig. 1 : structure du 4-*O*-Méthylglucuronoxylane extrait en milieu alcalin (ref 1)

**Extraction du 4-*O*-Méthylglucuronoxylane**

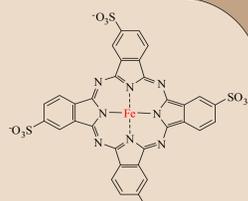
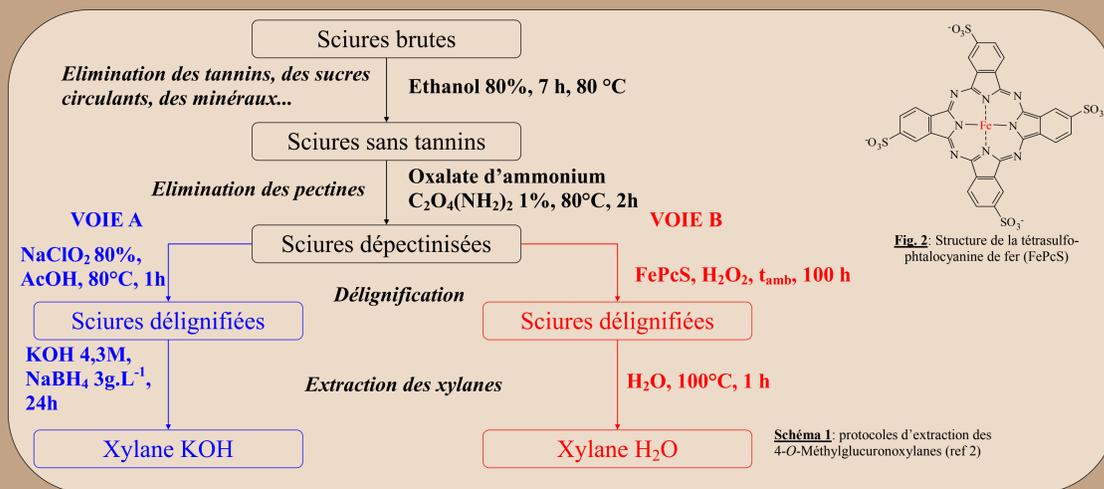


Fig. 2 : Structure de la tétrasulfophthalocyanine de fer (FePcS)

Schéma 1 : protocoles d'extraction des 4-*O*-Méthylglucuronoxylanes (ref 2)

Pour atteindre cet objectif, deux protocoles de délignification/extraction ont été mis en œuvre, à partir d'un même lot de sciures de châtaignier dépectinisées  
.Voie A : Délignification au chlorite de sodium et extraction alcaline.  
.Voie B : Délignification par la Tétrasilphthalocyanine de fer (fig. 2) en milieu oxydant et une extraction à l'eau chaude.

Analyse de la composition chimique (glucides, phénols) des extraits par dosages colorimétriques :

Tableau 1 : Composition chimique (% molaire), concentration en phénols (% massique molaire) et rendement d'extraction

Composé	Oses Neutres	Acides glucuroniques	Rendement	Phénols
Xylane KOH	83 % Dont xylose: 82%	17 %	14 %	<1 %
Xylane H <sub>2</sub> O	84 % Dont xylose: 57%	16 %	0,7 %	13 %

Les polysaccharides extraits présentent une composition glucidique similaire mais ce distinguent très nettement par le taux de phénols mesurés, dépassant 10% pour celui extrait à l'eau.

**Evaluation des propriétés anti-oxydantes par Résonance Paramagnétique Electronique (RPE)**

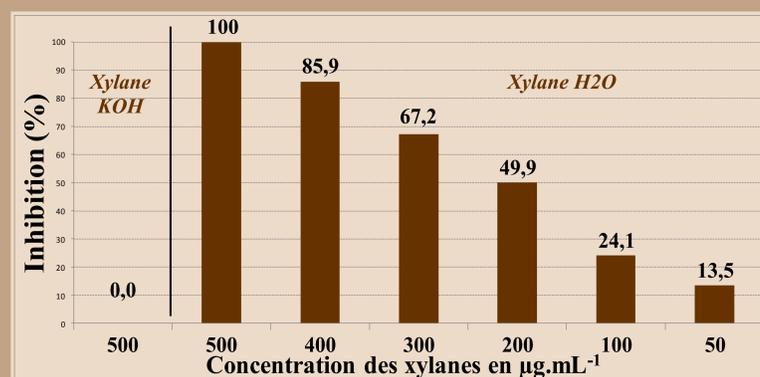
**Détermination de l'activité anti-oxydante des xylanes**

La RPE est une méthode spectroscopique qui permet de mettre en évidence la présence dans un milieu (liquide ou solide) des radicaux libres. Elle permet d'obtenir un spectre d'absorption caractéristique du radical détecté, l'intensité du signal étant proportionnelle à la quantité de radicaux présents dans le milieu réactionnel (figure 3). Dans notre cas, nous avons déterminé la capacité des xylanes extraits à piéger le 2,2-DiPhenyl-1-PicrylHydrazyl (DPPH). Le mécanisme d'action se déroule selon la réaction suivante: DPPH• + AH → DPPHH + A•. Un composé actif entraînera la diminution de l'intensité du signal de référence. Les résultats obtenus sont exprimés en % d'inhibition du radical.



Fig. 3 : Spectre RPE du radical DPPH

Résultats (figure 4):



Mode opératoire: Un volume équivalent de radicaux (2,5.10<sup>-4</sup> M dans l'éthanol) et d'échantillon (solubilisé dans l'eau distillée) à des concentrations variables sont mis en contact dans le tube de mesure. La quantité de radicaux résiduels est déterminée au bout de 5 minutes.

Figure 4 : résultats d'activité anti-oxydante en % d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration des échantillons.

On observe ainsi que le xylane KOH extrait ne présente pas d'activité à la concentration maximale. En revanche, pour le xylane extrait à l'eau, une gamme de dilution nous a permis de déterminer la CI<sub>50</sub>, qui est de 225 µg.mL<sup>-1</sup>. Pour ce même test, la Vitamine E (composé de référence pour ce type d'activité) présente une CI<sub>50</sub> de 20 µg.mL<sup>-1</sup>. On constate une très forte augmentation de l'activité anti-oxydante du xylane H<sub>2</sub>O par rapport au xylane KOH. Sa CI<sub>50</sub> étant près de 10 fois supérieure à celle de la vitamine E, ce qui est un niveau d'activité très intéressant pour ce type de composés.

**Caractérisation structurale**

Afin d'établir une corrélation entre la structure et l'activité anti-oxydante des xylanes de châtaignier, une analyse structurale préliminaire du MGX extrait à l'eau après délignification par la phthalocyanine a été effectuée par RMN <sup>1</sup>H (figure 5) et Infrarouge (figure 6).

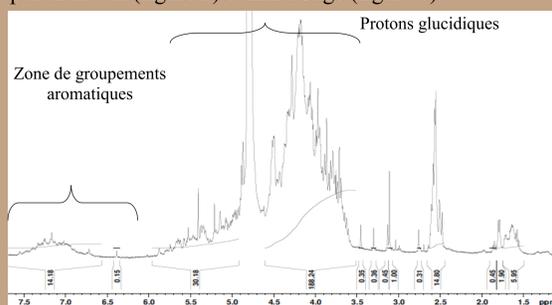


Fig. 5 : Spectre RMN <sup>1</sup>H du xylane H<sub>2</sub>O

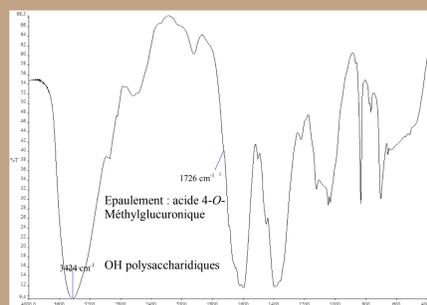


Fig. 6 : Spectre FT-IR du xylane H<sub>2</sub>O

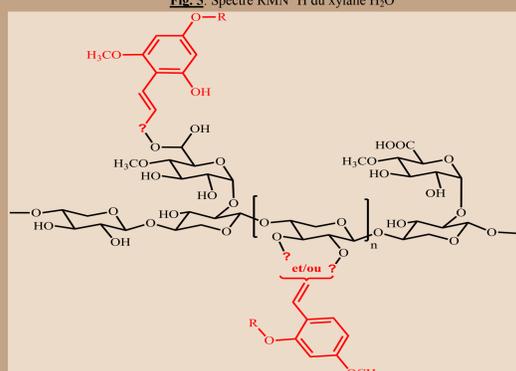


Fig. 7 : Structure proposée pour le xylane H<sub>2</sub>O

Le spectre Infrarouge révèle un ensemble de bandes caractéristiques d'un glucuronoxylane (ref 2). La présence des noyaux aromatiques indiqués par les dosages colorimétriques des phénols est confirmée par le spectre RMN du proton. Ces premiers résultats permettent de suggérer un modèle structural pour le xylane extrait à l'eau (figure 7).

**Conclusions et perspectives:**

Nous avons montré que la structure mais également l'activité anti-oxydante des 4-*O*-Méthylglucuronoxylanes issus du châtaignier sont directement liées au protocole de délignification/extraction appliqué. Une délignification douce réalisée à l'aide d'une phthalocyanine suivie d'une extraction à l'eau permet d'obtenir un xylane portant des groupements phénoliques résultants d'une délignification partielle. La présence de ces motifs phénoliques semble responsable de la forte activité anti-oxydante mesurée pour ce polysaccharide ce qui en fait un excellent candidat pour des applications en tant qu'agent de conservation, pour l'industrie cosmétique ou alimentaire par exemple.

Des études complémentaires sont actuellement en cours dans le but de préciser le modèle structural proposé et notamment la nature des liaisons glucides-phénols. Pour cela, des fragments oligosaccharidiques ont été produits par autohydrolyse. Des analyses ultérieures par RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C et spectrométrie de masse MALDI permettront d'en préciser la structure.

**Références:**

- Moine C. et coll., *Journal of Natural Products*, 2007, 70 (1), 60-66
- Barbat A. et coll., *Bioresource Technology*, 2010, 101, 6538-6544