

UNIVERSITÉ DE NANTES  
FACULTÉ DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

---

ÉCOLE DOCTORALE  
Végétal, Environnement, Nutrition, Agroalimentaire, Mer

Année 2011



Diffusion multi-échelle de Pectine Méthylestérases dans  
différents systèmes pectiques. Conséquences biochimiques  
et structurales.

---

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Physiologie et Biologie des organismes  
Spécialité : Physiologie, biologie des organismes, populations, interaction

*Présentée  
et soutenue publiquement par*

**Pauline VIDECOQ**

*Le 26 septembre 2011, devant le jury ci-dessous*

Président M. Charles TELLIER, Professeur, Université de Nantes  
Rapporteurs Mme Véronique Larreta-Garde, Professeur, Université de Cergy-Pontoise  
M. Herman Höfte, Directeur de recherche, INRA, Versailles  
Examineurs Mme Karine Steenkeste, Maître de conférence, Université Paris-Sud  
M. Jacques Mazoyer, Manager Développement Produits et Procédés, Cargill

*Directeur de thèse : Mme Estelle Bonnin, Ingénieur de recherche, INRA, Nantes  
Co-encadrante : Mme Catherine Garnier, Chargée de recherche, INRA, Nantes*







UNIVERSITÉ DE NANTES  
FACULTÉ DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

---

ÉCOLE DOCTORALE  
Végétal, Environnement, Nutrition, Agroalimentaire, Mer

Année 2011



Diffusion multi-échelle de Pectine Méthylestérases dans  
différents systèmes pectiques. Conséquences biochimiques  
et structurales.

---

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Physiologie et Biologie des organismes  
Spécialité : Physiologie, biologie des organismes, populations, interaction

*Présentée  
et soutenue publiquement par*

**Pauline VIDECOQ**

*Le 26 septembre 2011, devant le jury ci-dessous*

Président M. Charles TELLIER, Professeur, Université de Nantes  
Rapporteurs Mme Véronique Larreta-Garde, Professeur, Université de Cergy-Pontoise  
M. Herman Höfte, Directeur de recherche, INRA, Versailles  
Examineurs Mme Karine Steenkeste, Maître de conférence, Université Paris-Sud  
M. Jacques Mazoyer, Manager Développement Produits et Procédés, Cargill

*Directeur de thèse : Mme Estelle Bonnin, Ingénieur de recherche, INRA, Nantes  
Co-encadrante : Mme Catherine Garnier, Chargée de recherche, INRA, Nantes*







## Remerciements

Ce travail a été réalisé à l'INRA de Nantes au sein de l'unité Biopolymères Interaction Assemblages (BIA) sous la direction d'Estelle Bonnin et de Catherine Garnier, avec le soutien financier du ministère de l'Éducation nationale, de la recherche, et de la technologie.

Je remercie Jean-François Thibault, président du centre INRA Angers-Nantes, Jacques Guéguen, directeur de l'unité BIA, ainsi qu'à Marc Anton, responsable de l'équipe Interface et systèmes dispersés et Luc Saulnier, responsable de l'équipe Paroi Végétale & Polysaccharide Pariétaux, de m'avoir accueillie au sein du centre et de leur laboratoire.

Je suis très reconnaissante à Estelle Bonnin et Catherine Garnier pour m'avoir encadré durant ces trois années, merci pour leur aide au quotidien, leur disponibilité, pour m'avoir fait partager leur esprit d'analyse, de m'avoir épaulée tout au long de ces trois années, ainsi que pour leur patience lors de la rédaction des articles, de la thèse, ou de mes nombreuses répétitions pour les présentations orales. J'ai eu beaucoup de chance. Merci beaucoup à Estelle, pour son dynamisme, sa prévenance et de m'avoir donné l'opportunité d'exposer ce travail dans différents endroits de la planète. Merci à Catherine pour son soutien, et ainsi que pour ses conseils.

J'exprime toute ma reconnaissance aux membres du jury : Herman Höfte, Véronique Larreta-Garde, Catherine Garnier, Jacques Mazoyer, Karine Steenkeste, Charles Tellier et Estelle Bonnin, pour s'être penché sur mon travail et y avoir consacré du temps.

Je remercie aussi Jean-François Thibault, Jérôme Pelloux, Jacques Mazoyer, Karine Steenkeste, membres de mon comité de thèse pour m'avoir consacré du temps et avoir apporté de nombreuses idées qui ont contribué à améliorer et à construire ce travail.

Je remercie aussi vivement toutes les personnes ayant contribué à ce travail :

Marie-Jeanne Crépeau, pour sa gentillesse et sa disponibilité pour toute la partie biochimie de ma thèse.

Laurent Héлары pour toutes les expériences d'ELISA et de dot blot.

Paul Robert pour la réalisation des spectres Infra-rouge et le traitement des données.

Loïc Foucat pour la RMN.

Virginie Lolier pour la modélisation des PME.

Bernard Quemener pour sa précieuse aide pour les analyses en HPAEC.

Sylvie Durand pour m'avoir initié à la rhéologie et pour son amitié.

Thierry Gousset pour avoir partagé sa connaissance de la diffusion et m'avoir permis de traiter les résultats de diffusion macroscopique.

Denis Renard pour son aide dans l'utilisation et l'interprétation des résultats de diffusion du nanosizer.

Brigitte Bouchet pour son aide lors des essais de FRAP.

Benjamin Lejeune pour son aide technique, ses conseils cinématographiques.

Merci beaucoup à l'ensemble de l'équipe PVPP pour leur accueil chaleureux, les discussions que j'ai pu avoir ainsi que pour leur disponibilité en cas de ... Merci plus particulier à Sylviane, Sandrine, Jacqueline, Fatma, Cécile, Rachelle, Xavier, Claudine, Laurent, Paul, Fabienne, Anne-Cécile.

Je remercie aussi Marie-Christine pour m'avoir emmenée en congrès au Cap Hornu mais aussi à Honolulu et avec qui j'ai passé de très bons moments.

Je remercie aussi l'ensemble de l'équipe ISD de même pour leur accueil chaleureux, ainsi que pour leur disponibilité et gentillesse. Merci à Lucie, Bérénice, Valérie, Elisabeth, Michèle, Sylvaine pour leur disponibilité et leur aide. Je remercie aussi l'ensemble des doctorants ainsi que les stagiaires que j'ai pu rencontré, merci à Claire B, Claire S, Tin Hinan, Anne-Laure, Carole, Bénédicte, Guéba, Rui. Je remercie aussi Claire et Salhia pour avoir partagé mon bureau et avoir permis la réalisation de ce travail dans une ambiance très amicale.

Une partie de ce travail a été réalisé à l'Institut des Science Moléculaires d'Orsay (ISMO). Je remercie Mme Fontaine-Aupart pour m'y avoir accueilli chaleureusement. Un grand merci à Karine Steenkeste pour m'avoir aussi bien encadré sur les expériences de FRAP et de FCS que sur le traitement des données ainsi que pour toutes nos discussions scientifiques et personnelles que j'ai énormément appréciées. Je remercie aussi Samia Daddi-Oubékka pour tout le soutien et l'amitié qu'elle m'a apportée. Je remercie aussi Ivan pour nos discussions. Je remercie aussi toutes les personnes que j'ai pu côtoyer à l'ISMO pour leur accueil et l'aide que j'ai reçu, ainsi que pour les discussions que j'ai pu partagées.

Par ailleurs, ces années ont été riches en rencontres, merci à toutes les personnes qui m'ont offert leur amitié et avec qui j'ai passé de très bon moments (la patinoire, l'accrobranche, la piscine, la piscine, la plage..) : Yulia, Christian, Asghar, Shady, Judith, Julie, Nadège, Aiping, Maja, Tania, Shady, Azza, Judith, Agustin, Ying, Mélanie, Jean-Luc, Asha, Amel, Nelly et plus récemment, Evangéline, Sally. Merci à Hernan pour nos discussions et son amitié. Je tiens particulièrement à remercier Aynur pour son soutien et son amitié => my first time as a Bridesmaid ;- ) !!! Ainsi que Tanya pour son amitié et nos sorties, Spasibo !! Je remercie aussi beaucoup Muhtadi pour son soutien; tous ses conseils et son amitié.

Merci aussi à Madeleine pour les diners asiatiques du dimanche soir, son soutien, et nos discussion, ainsi qu'à Anaïs pour son oreille attentive.

Je suis aussi extrêmement reconnaissante à ma famille qui m'a énormément soutenu. Merci beaucoup à mes parents de m'avoir supportée, écouté pendant tout ce temps. Merci beaucoup à mes sœurs, Marie, pour son calme et ses encouragements, je suis aussi très reconnaissante à Laëtitia, de m'avoir relu, soutenu par sa présence, et espère te rendre la pareil très vite.



## Table des matières

<b>Liste des figures</b>	<b>VII</b>
<b>Liste des tableaux</b>	<b>XI</b>
<b>Liste des abréviations</b>	<b>XII</b>
<b>Introduction générale</b>	<b>1</b>
<b>1. Les pectines</b>	<b>5</b>
1.1. Les pectines : composition et organisation	6
1.1.1. Eléments structuraux	6
1.1.2. Organisation structurale des différents éléments	12
1.2. Les pectines au sein de la plante	16
1.2.1. Les pectines : un polysaccharide pariétal	16
1.2.2. Fonctions des pectines dans la paroi végétale	19
1.3. Les pectines : propriétés et utilisations industrielles	22
1.3.1. Sources et techniques d'extraction	22
1.3.2. Propriétés physico-chimiques	25
1.3.3. Applications	39
<b>2. Les pectines méthylestérases</b>	<b>43</b>
2.1. Caractéristiques structurales et catalytiques	43
2.1.1. Propriétés physico-chimiques	43
2.1.2. Activité catalytique des PME	47
2.2. Les PME végétales	50
2.2.1. Diversité	50
2.2.2. Structure	50
2.2.3. Rôle physiologique des PME végétales	52
2.2.4. Paramètres influençant l'activité catalytique des PME végétales	55
2.3. Les PME fongiques	60
2.3.1. Structure	60
2.3.2. Rôle des PME fongiques	60
2.3.3. Régulation de l'expression des PME	60
2.3.4. Paramètres influençant l'activité catalytique des PME fongiques	61
2.4. Impact de l'action des PME sur la gélification des pectines	62
2.4.1. Propriétés de gélification des pectines lors de l'action des PME	64
2.5. Les applications liées aux PME	66
2.5.1. Dégradation des pectines	67
2.5.2. Renforcement des parois	67
2.5.3. Elimination des pectines	68

<b>3. Objectifs de la thèse</b>	<b>69</b>
<b>4. Matériel</b>	<b>4</b>
4.1. Pectines	71
4.1.1. Caractéristiques	71
4.1.2. Purification	71
4.2. Pectine méthylestérases	72
4.2.1. Caractéristiques	72
4.2.2. Purification	72
4.3. Conditions physico-chimiques	72
<b>5. Méthodes</b>	<b>75</b>
5.1. Préparation d'une solution de pectines	75
5.2. Réalisation d'un gel de pectines	75
5.3. Caractérisation du degré de méthylation des pectines en spectroscopie infrarouge	76
5.3.1. Principe de la spectroscopie infrarouge	76
5.3.2. Application à la détermination du degré de méthylation	76
5.4. Caractérisation du « absolute Degree of Blockiness »	79
5.4.1. Dégradation des pectines par l'endoPG	80
5.4.2. Dosage des monomères, dimères, trimères d'acides galacturoniques	80
5.4.3. Dosage des acides galacturoniques totaux	81
5.5. Dosage de l'activité PME	82
5.6. Détermination des paramètres cinétiques	84
5.7. Modélisation moléculaire	85
5.8. Suivi cinétique de l'activité des PME au cours du temps dans différents environnements physico-chimiques	86
5.8.1. En solution	86
5.8.2. En gel en formation	87
5.8.3. En gel préformé	87
5.9. Caractérisation rhéologique des gels de pectines	88
5.9.1. Généralités sur la rhéologie	88
5.9.2. La caractérisation des propriétés viscoélastiques	88
5.9.3. Caractérisation d'un gel de pectines	90
5.10. Caractérisation de la diffusion des PME	91
5.10.1. Marquage des PME	91
5.10.2. la spectroscopie de corrélation de fluorescence couplée à l'excitation à deux photons	92
5.10.3. Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP)	98
5.10.4. Diffusion de la PME dans un gel préformé	101

<b>6. Influence du calcium sur le comportement des PME dans différents systèmes pectiques</b>	<b>107</b>
6.1. Détermination des paramètres cinétiques des PME	107
6.2. Comparaison des structures de l'Aa-PME et de l'O-PME	113
6.3. Comparaison de la cinétique de dé-méthylation en solution ou en gel en formation	116
6.4. Comparaison du mode d'action des PME en solution et dans un gel en formation	117
6.5. Caractérisation rhéologique des différents systèmes PME-pectine-calcium	120
6.6. Conclusion	124
<b>7. Etude de la diffusion des PME</b>	<b>126</b>
7.1. Introduction à l'étude de la diffusion	126
7.1.1. Définitions	126
7.1.2. Influence de l'environnement sur la diffusion	128
7.2. Etude de la diffusion locale de l'Aa-PME et de l'O-PME	130
7.2.1. Détermination des conditions expérimentales	132
7.2.2. Diffusion de l'O-PME	132
7.2.3. Diffusion de l'Aa-PME	141
7.3. Etude de la diffusion à une échelle intermédiaire	150
7.3.1. Etude de la diffusion de l'O-PME	150
7.3.2. Etude de la diffusion de l'Aa-PME	153
7.4. Etude macroscopique de la diffusion des PME dans un gel de pectines	159
7.4.1. Caractérisation de l'activité des PME	159
7.4.2. Transport par diffusion des PME dans un gel de pectine	162
<b>8. Discussion générale</b>	<b>70</b>
8.1. Influence de l'environnement sur le comportement de l'O-PME	173
8.2. Influence de l'environnement sur le comportement de l'Aa-PME	177
8.3. Rôle des enzymes in vivo	177
<b>9. Conclusion</b>	<b>168</b>
<b>10. Références bibliographiques</b>	<b>183</b>
Annexe : Article	



## Liste des figures

Figure 1 : Modèle de structure pour la région HG. D'après Caffall & Mohnen, 2009.....	7
Figure 2 : Modèle de structure pour la région des RG II. D'après du Penhoat <i>et al.</i> , 1999.....	8
Figure 3 : Modèle de structure pour la région RG I. D'après Caffall & Mohnen, 2009.....	9
Figure 4 : Différents types de liaisons rencontrés entre les molécules de pectines.....	13
Figure 5 : Modèle d'alternance des zones lisses et hérissées proposé par Visser & Voragen (1996). .....	15
Figure 6 : Modèle de la paroi d'une cellule dans une feuille d' <i>Arabidopsis</i> en accord avec le modèle de Vinken <i>et al.</i> (2003) et à partir du modèle présenté par McCann et Roberts. (Somerville <i>et al.</i> , 2004).....	17
Figure 7 : Schéma de l'extraction industrielle des pectines.....	24
Figure 8 : Conformation des régions HG. D'après Perez <i>et al.</i> , 2000. ....	27
Figure 9 : Schéma du mécanisme de gélification des pectines HM en présence de sucre et en milieu acide. ....	29
Figure 10 : Schéma de la gélification des pectines LM en présence de calcium. ....	31
Figure 11 : Représentation en bâton de la meilleure association chaîne de pectines-calcium-chaîne de pectines. D'après Perez, Mazeau <i>et al.</i> , 2000. ....	32
Figure 12 : (A) Structure de la PME de carotte, (B) vue de la structure de la PME tournée à 90° selon l'axe x représenté vers l'extrémité N terminale. D'après Johansson <i>et al.</i> , 2002.....	45
Figure 13 : (A) Représentation de la surface de la PME de carotte présentant la faille permettant la liaison à une chaîne de pectines modélisée dans une conformation proche d'une hélice 2 <sub>1</sub> . (B) Représentation du site actif avec une molécule de substrat modèle. D'après Jolie <i>et al.</i> , 2010.....	46
Figure 14 : Superposition de deux PME, la PME de carotte en rouge et celle d' <i>E. chrysanthemi</i> en bleu. D'après Johansson <i>et al.</i> , 2002. ....	46
Figure 15 : Mécanisme catalytique proposé. D'après Fries <i>et al.</i> , 2007. ....	48
Figure 16 : Structure des gènes de PME végétales. D'après Pelloux <i>et al.</i> , 2007. ....	51
Figure 17 : Schéma des liaisons possibles entre les chaînes homogalacturonanes partiellement déméthylées. D'après Luzio & Cameron (2008).....	63
Figure 18 : Evolution des grandeurs rhéologiques G' (carrés bleu plein) et G'' (carrés bleu vides) du mélange pectine HM-calcium (3 mM)-PME ( <i>Aspergillus aculeatus</i> ) ainsi que du degré de méthylation de la pectine (ronds noirs). D'après Slavov <i>et al.</i> , 2009.....	66
Figure 19 : (a) Dépendance de l'activité de l'O-PME au pH (%). Activité relative par rapport à l'activité mesurée à pH 7 en présence de NaCl (1, 2%). (b) Dépendance de l'activité relative de l'O-PME à la température (%). ....	73
Figure 20 : Courbe de stabilité de la O-PME commerciale après 5min d'incubation à la température indiquée. D'après Savary <i>et al.</i> , 2002. ....	73
Figure 21 : Dépendance de l'activité relative de l'Aa-PME au pH (%). ....	74
Figure 22 : Pics d'intérêt du spectre infrarouge des pectines. D'après Winning <i>et al.</i> 2009... ..	77
Figure 23 : Gamme étalon des DM de pectines connues analysées en spectroscopie infrarouge. ....	78
Figure 24 : Description de l'hydrolyse enzymatique par l'endoPG et du principe du calcul du DM, DB et DBabs (Fraeye <i>et al.</i> , 2010).....	79
Figure 25 : Chromatogramme d'un échantillon de pectines MM digéré par l'AnPGII. ....	81
Figure 26 : Réaction de condensation du MBTH avec un aldéhyde, le formaldéhyde pour R = H (a) et formation de la cyanine (b). D'après Oliveira <i>et al.</i> , 2005 . ....	83
Figure 27 : Représentation de Lineweaver et Burk.....	85
Figure 28 : Protocole employé pour la mesure de l'action des PME dans différents environnements physico-chimiques. ....	87

Figure 29 : Principe de l'essai harmonique : évolution de $\sigma$ et $\gamma$ en fonction du temps. ....	88
Figure 30 : Représentation schématique de comportements typiques de spectres mécaniques. .....	90
Figure 31 : Système cône plan. ....	91
Figure 32 : Fluctuations de l'intensité de fluorescence en fonction du temps. ....	94
Figure 33 : Courbe d'auto-corrélation et son ajustement avec un modèle. ....	95
Figure 34 : Principe de la FRAP. ....	99
Figure 35 : Principe du fit d'un profil. ....	100
Figure 36 : Système expérimental vu de dessus. ....	102
Figure 37 : Empreinte obtenue après migration de l'Aa-PME dans un gel de pectines. ....	103
Figure 38 : Description du système expérimental pour la diffusion de PME en gel préformé. .....	104
Figure 39 : Représentation de Lineweaver et Burk pour l'O-PME en présence (rouge) ou en absence (orange) de calcium 5 mM. ....	108
Figure 40 : Représentation de Lineweaver et Burk pour l'Aa-PME en présence (bleu foncé) ou en absence (bleu clair) de calcium 5 mM. ....	110
Figure 41 : Activité de l'Aa-PME (bleu) et de l'O-PME (rouge) en présence de 5 mmol.L <sup>-1</sup> de calcium en fonction de R. ....	113
Figure 42 : Superposition des représentations de l'Aa-PME (vert) et de l'O-PME (bleu). ....	114
Figure 43 : Représentation du potentiel électrostatique à la surface de l'O-PME (a) et l'Aa- PME (b). ....	116
Figure 44 : Evolution du DM lors de l'action de l'Aa-PME (a) et de l'O-PME (b) sur la pectine MM en présence (carrés) ou en absence (cercles) de calcium. ....	117
Figure 45 : Evolution du DBabs lors de l'action de l'Aa-PME (a) et de l'O-PME (b) sur la pectine MM en présence (carrés) ou en absence (cercles) de calcium. ....	118
Figure 46 : Suivi cinétique de l'évolution de G' (cercles pleins) et G'' (cercles vides) à 1 rad.s <sup>-1</sup> (a) et spectre mécanique du mélange pectine MM 0,9 % en présence de 5 mmol.L <sup>-1</sup> de calcium pour une déformation de 1% (b). ....	120
Figure 47 : Suivi cinétique de l'évolution de G' (cercles pleins) et G'' (cercles vides) à 1 rad.s <sup>-1</sup> (a) et spectre mécanique du mélange O-PME, pectine LM 0,9% en présence de 5 mmol.L <sup>-1</sup> de calcium (b). ....	121
Figure 48 : Suivi cinétique de l'évolution de G' (cercles pleins) et G'' (cercles vides) à 1 rad.s <sup>-1</sup> (a) et spectre mécanique du mélange Aa-PME, pectine MM 0,9% en présence de 5 mmol.L <sup>-1</sup> de calcium pour une déformation de 1% (b). ....	122
Figure 49 : Suivi cinétique de l'évolution de G' (cercles pleins) et G'' (cercles vides) à 1 rad.s <sup>-1</sup> du mélange Aa-PME inactivée, pectine MM 0,9% en présence de 5 mmol.L <sup>-1</sup> de calcium. ....	123
Figure 50 : Evolution du nombre de molécules diffusant dans le volume d'observation (a) et de leur temps de diffusion (b) lors de la diffusion de la O-PME dans une solution de pectines (orange) et dans un gel en formation (rouge). ....	133
Figure 51 : Courbes d'auto-corrélation moyennes normalisées obtenues lors de la diffusion d'O-PME dans une solution de tampon MES (violet), une solution de pectines (orange) et dans un gel en cours de formation (rouge). ....	134
Figure 52 : Courbes d'auto-corrélation moyennes normalisées obtenues lors de la diffusion d'O-PME inactivée dans une solution de tampon MES (violet), une solution de pectines (orange) et dans un gel en formation (rouge). ....	136
Figure 53 : Evolution du nombre de molécules d'O-PME diffusant librement dans le volume d'observation en fonction du temps après dépôt de l'enzyme. ....	138
Figure 54 : Evolution du coefficient de diffusion de l'O-PME au cours du temps dans un gel préformé (rose) et dans le tampon (violet). ....	139

Figure 55 : Evolution du nombre de molécules d'O-PME inactive diffusant librement dans le gel préformé en fonction du temps après le dépôt de l'enzyme. ....	140
Figure 56 : Evolution du coefficient de diffusion de l'O-PME inactivée au cours du temps dans un gel préformé (losanges) et dans la solution tampon (carrés). ....	141
Figure 57 : Evolution du nombre de molécules diffusantes (a) et du temps de diffusion (b) lors de la diffusion de l'Aa-PME dans une solution de pectine (bleu clair) ou dans un gel en cours de formation (bleu foncé). ....	142
Figure 58 : Comparaison des courbes d'auto-corrélation normalisées de l'Aa-PME diffusant librement dans le tampon (vert), dans une solution de pectines (bleu clair), dans un gel en formation (bleu foncé). ....	143
Figure 59 : Comparaison des courbes de corrélation moyennes normalisées obtenues lors de la diffusion de l'Aa-PME inactivée en tampon (vert), en solution de pectines (bleu clair), en solution de pectines et présence de calcium (bleu foncé). ....	145
Figure 60 : Evolution du nombre de molécules diffusant dans le volume d'observation lors de la diffusion de l'Aa-PME active dans un gel de pectines préformé. ....	146
Figure 61 : Evolution du coefficient de diffusion au cours du temps lors de la diffusion de l'Aa-PME dans un gel de pectines préformé (bleu) en comparaison avec le coefficient de diffusion obtenu en tampon MES (vert). ....	147
Figure 62 : Evolution du nombre de molécules diffusant dans le gel préformé lors de la diffusion de l'Aa-PME inactivée. ....	148
Figure 63 : Evolution du coefficient de diffusion au cours de la migration de l'Aa-PME inactivée au cours du temps dans un gel préformé (ronds bleus) et comparaison avec le coefficient de diffusion obtenu dans le tampon (carrés verts). ....	148
Figure 64 : Comparaison des courbes normalisées de retour de fluorescence pour la diffusion de l'O-PME dans le tampon (violet), dans une solution de pectines (orange), dans un gel en cours de formation (rouge). ....	151
Figure 65 : Comparaison des courbes normalisées de retour de fluorescence normalisées obtenues lors de la diffusion de l'O-PME inactivée dans le tampon (violet), dans une solution de pectines (orange) et dans un gel en formation (rouge). ....	152
Figure 66 : Comparaison des courbes normalisées de retour de fluorescence normalisées obtenues lors de la diffusion de l'Aa-PME dans le tampon (vert), dans une solution de pectines (bleu clair), dans un gel en formation (bleu foncé). ....	154
Figure 67 : Comparaison des courbes normalisées de retour de fluorescence obtenues lors de la diffusion de l'Aa-PME inactivée dans le tampon (vert), dans une solution de pectines (bleu clair) et dans un gel en formation (bleu foncé). ....	155
Figure 68 : Comparaison des courbes normalisées de retour de fluorescence obtenues lors d'expérience réalisées après 4h de diffusion de l'Aa-PME active (symboles pleins) et inactive (symboles vides) dans un gel de pectine préformé. ....	157
Figure 69 : Evolution du DM (carrés) et du DBabs (losange) de la pectine lors de la diffusion de l'Aa-PME dans un gel de pectines. ....	160
Figure 70 : Evolution du DM (carrés) et du DBabs (losanges) lors de la migration de l'O-PME pendant 6 et 24h. ....	161
Figure 71 : Schéma représentant deux situations de diffusion en régime stationnaire (A) et en régime transitoire (B). ....	163
Figure 72 : Schéma de la diffusion de l'Aa-PME dans un gel de pectines. ....	166
Figure 73 : Evolution de la concentration en fonction du temps lors de la migration de l'Aa-PME active (bleu foncé) et inactivée (bleu clair). ....	167
Figure 74 : Variation du nombre de molécules en fonction de la distance au point de dépôt pour l'Aa-PME inactivée. ....	168

Figure 75 : Variation du nombre de molécules en fonction de la distance au point de dépôt pour l'Aa-PME active. .... 169

## Liste des tableaux

Tableau 1: Différentes sources de pectines. ....	5
Tableau 2 : Les utilisations des pectines HM dans l'industrie agro-alimentaire en fonction de leur DM (Thibault & Ralet, 2003).....	40
Tableau 3 : Evolution du $K_m$ de la PME de pomme en fonction de la force ionique, du pH et du DM d'une pectine de pomme ainsi qu'en présence d'un inhibiteur compétitif l'acide polygalacturonique. ....	56
Tableau 4 : Composition de la pectine MM déterminée en chromatographie en phase gazeuse et colorimétrie pour la teneur en GalA.....	71
Tableau 5 : Caractéristiques de l'Aa-PME et O-PME .....	72
Tableau 6 : Activités spécifiques de l'Aa-PME et O-PME en présence ou en absence de calcium. ....	107
Tableau 7: Caractéristiques catalytiques de différentes PME végétales.....	109
Tableau 8 : Constantes catalytiques pour différentes PME d'origine fongique. ....	111
Tableau 9 : Comparaison des constantes catalytiques de l'O-PME et de l'Aa-PME.....	112
Tableau 10 : Activité spécifique des PME marquées au FITC. ....	130
Tableau 11: Rayons hydrodynamiques calculés pour l'Aa-PME et l'O-PME.....	131
Tableau 12 : Comparaison des valeurs extraites des courbes d'auto-corrélation et du coefficient de diffusion obtenues lors de la diffusion de l'O-PME en solution, en solution de pectines, en gel en formation.....	135
Tableau 13 : Comparaison des valeurs extraites des courbes d'auto-corrélation et du coefficient de diffusion obtenues lors de la diffusion de l'O-PME inactivée en solution, en solution de pectines, en gel en formation. ....	137
Tableau 14: Comparaison des paramètres de diffusion de l'Aa-PME dans trois environnements différents. ....	144
Tableau 15 : Comparaison des données moyennes obtenues pour la diffusion de l'Aa-PME inactivée en tampon, en solution de pectines et dans un gel en cours de formation. ....	145
Tableau 16: Comparaison des caractéristiques de diffusion obtenues suite à la diffusion de l'O-PME en tampon, dans une solution de pectines et dans un gel en cours de formation. ..	151
Tableau 17 : Comparaison des caractéristiques de diffusion obtenues lors de la diffusion de la PME inactivée dans le tampon et dans une solution de pectines. ....	153
Tableau 18: Comparaison des coefficients de diffusion obtenus pour l'Aa-PME dans différents environnements. ....	154
Tableau 19 : Comparaison des caractéristiques de la diffusion de l'Aa-PME inactivée dans trois environnements. ....	156
Tableau 20 : Comparaison des caractéristiques de la diffusion de l'Aa-PME active et inactive dans un gel de pectine préformé.....	157
Tableau 21 : Comparaison des coefficients de diffusion obtenus pour les différentes expériences de diffusion de l'Aa-PME-FITC inactive et active dans un gel de pectines. ....	170

## Liste des abréviations

Aa-PME : PME d'*Aspergillus aculeatus*  
ACP : Analyse en Composant Principale  
AG I : Arabinogalactanes I  
AG II : Arabinogalactanes II  
*Araf*: Arabinofuranose  
Arg : Arginine  
Asp : Acide Aspartique  
DB : Degree of Blockiness  
DBabs : Absolute Degree of Blockiness  
DM : Degré de méthylation  
DMSO : Diméthylsulfoxyde  
DO : Densité optique  
endoPG : Endopolygalacturonase  
FCS : Spectroscopie de Corrélation de Fluorescence (Fluorescence Correlation Spectroscopy)  
FDA : Food and Drug Administration  
FITC : Isothiocyanate de fluoresceine  
FRAP : Fluorescence Recovery After Photobleaching  
FTIR : Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier  
Gal : Galactanes  
GalA : Acide galacturonique  
GalAp : Acide galacturopyranose  
GalAT : Galacturonosyltransférase  
Gln : Glutamine  
GRAS : Generally Regarded As Safe  
GTs : Glycosyltransférases  
HG : Homogalacturonanes  
HM : Hautement méthylé (High Methoxylated)  
HPAEC : Chromatographie échangeuse d'anions haute pression  
 $K_m$  : Constante de Michaelis  
LM : Faiblement méthylé (Low Methoxylated)  
MBTH : N-méthylbenzothiazolinone-2-hydrazone  
MES : 4-Morpholin-1-ylEthylSulphonate de sodium  
MHDP : Métahydroxyldiphényle  
MM : Moyennement méthylé (Medium Methylated)  
O-PME : PME d'orange  
OGA : Oligo- $\alpha$ -galacturonides  
ORF : Open Reading Frame  
p : Degré d'attaque ou de processivité  
pH : Potentiel hydrogène  
pI : Point isoélectrique  
PL : Pectine lyase  
PME : Pectine méthylestérase  
PMEI : Inhibiteur de PME (Pectin Methylsterase Inhibitor)  
RG I : Rhamnogalacturonanes I  
RG II : Rhamnogalacturonanes II  
RLKs : Receptor like kinases  
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

TPE : Two Photon Excitation

TPE-FCS : Two Photon Excitation-Fluorescence Correlation Spectroscopy

$V_{\max}$  : Vitesse maximale

WAKs : Wall-associated kinases

XG : Xyloglucanes

XGA : Xylogalacturonanes



# **Introduction Générale**



## **Introduction générale**

Toutes les cellules végétales sont entourées par une paroi cellulaire principalement composée de polysaccharides et de protéines. La paroi est indispensable pour certains aspects de la vie de la plante : l'adoption du port dressé, la forme des cellules, les interactions cellule-cellule, la défense contre les herbivores et les agents pathogènes.... La paroi cellulaire est formée d'un réseau de fibres cellulosesques – hémicellulosiques noyé dans une matrice constituée majoritairement de pectines et d'une fraction protéique minoritaire. La paroi primaire d'une dicotylédone est constituée d'approximativement 35% de pectines, 30% de cellulose, 30% d'hémicelluloses et 5% de protéines (Mohnen, 2008). La paroi végétale constitue une source de matière première renouvelable et abondante, utilisable en tant que ressource agro-alimentaire, source de biomatériaux ou de biomasse valorisable à des fins énergétiques. Les polysaccharides pariétaux, comme les pectines, peuvent être extraits et employés dans diverses applications. Les pectines sont notamment utilisées pour leurs propriétés gélifiantes en agro-alimentaire.

Les propriétés de la paroi évoluent selon l'état physiologique de la cellule grâce à la présence d'enzymes qui remodelent les polysaccharides. Les enzymes capables de remodeler les polysaccharides pariétaux se rencontrent aussi chez les organismes phytopathogènes : bactéries et champignons. La compréhension de l'activité et du mode d'action de ces enzymes permet de contrôler leur utilisation pour conférer de nouvelles propriétés aux polysaccharides. Ces connaissances permettraient aussi d'un point de vue fondamental de mieux comprendre le rôle de ces enzymes au sein de la paroi végétale et, d'un point de vue appliqué, par exemple, de les employer comme outils pour modifier la paroi *in vivo*. L'étude des pectines méthylestérases (PME) au sein d'une matrice pectique présente ces deux types de finalités. Les pectines sont un polysaccharide d'intérêt pour l'industrie, l'étude de leur modification enzymatique et des propriétés résultantes peut faire l'objet de nouvelles applications. Les pectines étant un polysaccharide majeur de la paroi primaire, une matrice pectique peut être considérée comme un modèle simplifié de paroi. L'étude des PME en leur sein est une première étape avant leur étude dans une matrice plus complexe. D'autre part, les PME trouvent des applications en tant que modulateur de la structure d'une telle matrice.

Le travail présenté ici fait suite aux travaux réalisés à l'INRA de Nantes en 2007 par Anton Slavov, portant sur le comportement des PME dans un gel calcique de pectines en cours d'élaboration (Slavov *et al.*, 2009). Ces travaux ont permis de mettre en évidence une

spécificité d'action des PME dans un gel en cours d'élaboration ainsi que l'obtention de nouvelles propriétés de gélification. Ces résultats ont conduit à s'interroger sur l'impact de la structure pectique environnante et de ses modifications sur l'activité des PME. En effet, la gélification progressive du milieu pourrait modifier l'accessibilité de la PME à son substrat entraînant des contraintes sur la diffusion de l'enzyme.

Ce travail s'intéresse donc à l'impact de la structure du milieu sur l'action des PME ainsi que sur leur diffusion. Les données obtenues apportent des éléments d'explications sur le comportement des PME dans une matrice simple composée exclusivement de pectines, et constituent une première étape en vue de l'étude de la diffusion des PME dans une matrice plus complexe.

Ce travail a fait l'objet de différentes communications :

#### Production écrite

Articles :

« Influence of calcium on pectin methylesterase behaviour in the presence of medium methylated pectins ». Pauline Videcoq, Catherine Garnier, Paul Robert, Estelle Bonnin. Carbohydrate Polymers (2011), vol. 86, iss. 4, 1657-1664.

« Pectin methylesterase diffusion in different pectic environments ».

Pauline Videcoq, Karine Steenkeste, Estelle Bonnin, Catherine Garnier. En préparation pour Soft matter.

#### Participation aux congrès

Présentation orale :

Final Workshop Cost 928. 2-4 mars 2010 à Naples. « PME behaviour in pectin gels ». Pauline Videcoq, Catherine Garnier, Karine Steenkeste et Estelle Bonnin.

2010 International chemical congress of pacific basin societies. Pacifichem. 15-20 décembre 2010 à Honolulu. "Pectin methylesterase behaviour to modify functional properties of pectin in gels". Pauline Videcoq, Catherine Garnier, Karine Steenkeste et Estelle Bonnin.

Journée des Jeunes Chercheurs 2011. 21 juin 2011 à l'INRA de Nantes. « Le comportement des pectines méthylestérases dans un gel de pectines ». Pauline Videcoq

Poster :

XXIIIèmes Journées du GFG 2010. 17–20 mai 2010 au Cap Hornu. « Comportement de la pectine méthylestérase dans un gel de pectines ». Pauline Videcoq, Catherine Garnier, Karine Steenkeste et Estelle Bonnin.

Biopolymers'2010. 1–3 décembre 2010 au Croisic. « Pectin methylesterase behaviour to modify functional properties of pectin in gels ». Pauline Videcoq, Catherine Garnier, Karine Steenkeste et Estelle Bonnin.

Le manuscrit présenté ici, s'organise en quatre parties :

La première partie est constituée d'une synthèse bibliographique rappelant les différents éléments du contexte de l'étude et exposant les objectifs du travail.

La seconde partie décrit les différents matériels et méthodologies employés pour mener cette étude.

La troisième partie présente les différents résultats obtenus sur l'impact de l'environnement sur l'action des PME, puis sur l'impact de la structuration du milieu sur la diffusion des PME. Cette partie est close par une discussion générale sur l'ensemble des résultats obtenus.

La quatrième partie termine ce manuscrit en exposant les conclusions de l'étude et ses perspectives.



## **Synthèse bibliographique**



# 1. Les pectines

Les pectines sont une classe de polysaccharides ubiquitaires et multifonctionnels représentant 20 à 35% de la paroi cellulaire chez les dicotylédones et monocotylédones non graminées (Tableau 1). Les monocotylédones graminées ont une paroi riche en hémicelluloses, mais qui ne contient que 2 à 10% de pectines. Les pectines sont aussi présentes dans le bois à hauteur de 5% (Mohnen, 2008). Les pectines sont localisées dans la paroi primaire et, de façon moins abondante, dans la paroi secondaire. En participant à l'adhésion entre les cellules et à la force mécanique de la paroi, elles jouent avec la cellulose un rôle prépondérant sur la texture des fruits et des légumes. Leurs propriétés de gélification ont été décrites pour la première fois par un scientifique français, Henri Braconnot (1780-1855) en 1825 et elles sont utilisées depuis de nombreuses années dans le but de faciliter la prise de confitures.

Sources	Pourcentage massique de pectines
Pomme ( <i>Malus</i> spp.)	0,5 – 1,6
Marc de pommes	1,5 – 2,5
Banane ( <i>Musa acuminata</i> L.)	0,7 – 1,2
Pulpe de betterave ( <i>Beta vulgaris</i> )	1,0
Carambole ( <i>Averrhoa carambola</i> )	0,66
Carotte ( <i>Daucus carota</i> )	0,2 - 0,5
Goyave ( <i>Psidium guajava</i> L.)	0,77 - 0,99
Pulpe de citron ( <i>Citrus limon</i> )	2,5 - 4,0
Litchi ( <i>Litchi chinensis</i> S.)	0,42
Mangue ( <i>Mangifera indica</i> L.)	0,26 - 0,42
Ecorce d'orange ( <i>C. sinensis</i> )	3,5 - 5,5
Papaye ( <i>Carica papaya</i> )	0,66 - 1,0
Fruit de la passion ( <i>Passiflora edulis</i> S.)	0,5
Péricarpe de fruit de la passion	2,1 - 3,0
Pêches ( <i>Prunus persica</i> )	0,1 - 0,9
Ananas ( <i>Ananas comosus</i> L.)	0,04 - 0,13
Fraise ( <i>Fragaria ananassa</i> )	0,6 - 0,7
Tamarin ( <i>Tamarindus indica</i> L.)	1,71
Mûre ( <i>Rubus rosafolius</i> )	0,72
Tomate ( <i>Lycopersicon esculentum</i> )	0,2 – 0,6

Tableau 1: Différentes sources de pectines.

D'après Thakur *et al.*, 1997.

## **1.1. Les pectines : composition et organisation**

### **1.1.1. Eléments structuraux**

Les pectines correspondent à une famille de polysaccharides complexes. Elles sont principalement composées de résidus d'acides galacturopyranosyles (GalAp) liés en  $\alpha$ -(1→4), mais aussi d'oses neutres en quantité souvent significative dont le rhamnose, l'arabinose et le galactose. Il est possible de distinguer trois régions de bases : les homogalacturonanes, les rhamnogalacturonanes I et les rhamnogalacturonanes II.

#### 1.1.1.1. Les homogalacturonanes

Les homogalacturonanes (HG) sont constitués d'un squelette linéaire de GalAp liés en  $\alpha$ -(1→4) (Figure 1) qui peuvent être estérifiés par un méthyle en C-6 ou O-acétylés en O-2 ou O-3 (Perrone *et al.*, 2002). Les proportions de méthylation et d'acétylation sont variables selon l'origine de la pectine. La région HG est impliquée dans les propriétés de gélification de la pectine et les influence en fonction de la proportion de méthyles et/ou d'acétyles présents ainsi que de leur distribution le long de la chaîne.

Le squelette HG peut être substitué en O-3 par des chaînes latérales de  $\beta$ -D-xylose en (1→3) et est alors appelé Xylogalacturonane (XGA). Les XGA ont été isolés dans les tissus reproducteurs de différentes espèces comme le pois (Le Goff *et al.*, 2001) ou la pastèque (Mort *et al.*, 2008). Les XGA ont aussi été isolés dans d'autres organes comme l'abédo de citron (Ros *et al.*, 1998), la tige et les feuilles d'*Arabidopsis thaliana* (Zandleven *et al.*, 2007). Le degré de xylosilation, défini comme la proportion de GalAp substitué par du xylose, peut varier entre 25% chez la pastèque et 75% chez la pomme (Schols *et al.*, 1995).

Chez certaines monocotylédones aquatiques comme le varech marin (Gloaguen *et al.*, 2010) ou la lenticule à plusieurs racines (Longland *et al.*, 1989), le squelette HG peut être substitué avec des monomères ou dimères d'apioses (D-apiofuranosyl- $\beta$ -(1→3)-D-apiose) liés en O-3 ou O-2 et est nommé Apiogalacturonane.

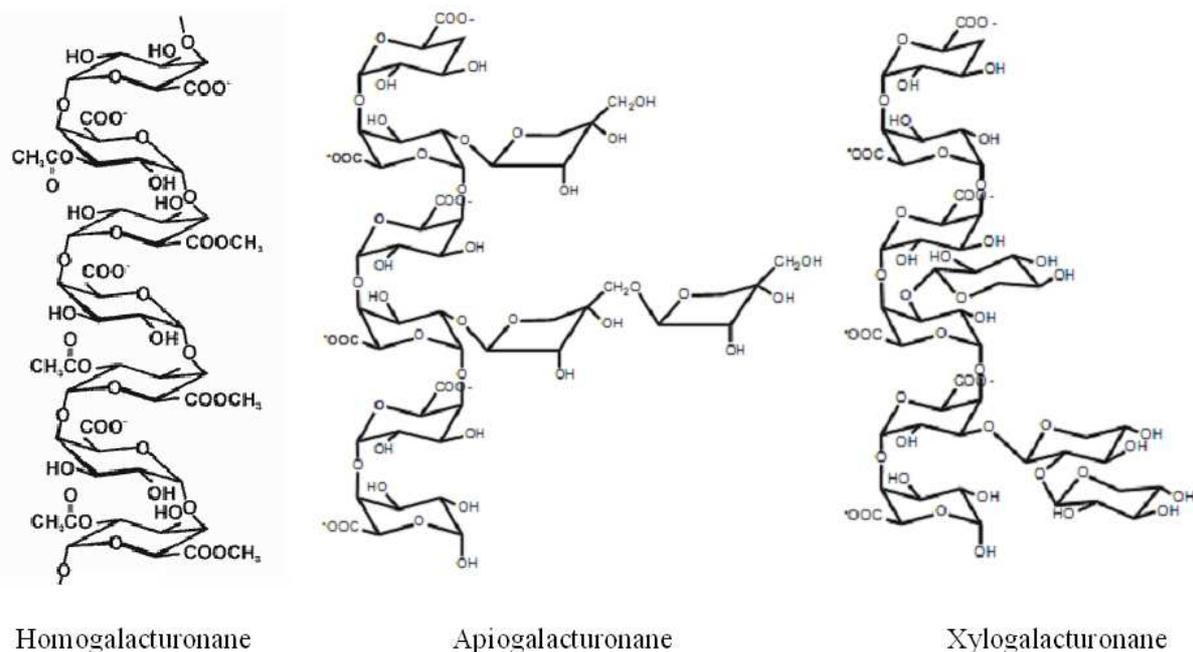


Figure 1 : Modèle de structure pour la région HG. D'après Caffall & Mohnen, 2009.

#### 1.1.1.2. Les rhamnogalacturonanes II

Les rhamnogalacturonanes II (RG II) correspondent à un squelette HG ramifié par un groupe de quatre chaînes latérales A, B, C et D (Figure 2). Ces chaînes latérales sont constituées d'au moins 12 résidus glycosyles différents : D-apiose, 3-C-carboxyl 5-déoxy-L-xylose (acide L-acérique), 2-O-méthyl L-fucose, 2-O-méthyl D-xylose, L-galactose, acide 3-déoxy-D-lyxo-2-heptulosarique (Dha), acide 2-kéto-3-déoxy-D-manno-octulosonique (Kdo), L-arabinose, D-galactose, L-rhamnose, D-acide glucuronique et D-GalA (O'Neill *et al.*, 2004). Certains de ces oses sont particuliers, par exemple, le Kdo est habituellement rencontré dans la composition des polysaccharides et lipopolysaccharides de la capsule bactérienne et non dans le monde végétal. La structure des quatre chaînes latérales est très conservée chez les plantes vasculaires (Matsunaga *et al.*, 2004). Les GalA peuvent être substitués en C-2 ou en C-3. En C-2, le GalA est substitué par un octosaccharide (chaîne A) ou par un nonasaccharide (chaîne B). En C-3, la substitution peut être réalisée par deux disaccharides différents (chaînes C et D) (du Penhoat *et al.*, 1999). L'arrangement des chaînes latérales les unes par rapport aux autres peut se faire dans deux ordres différents : A, C, B, D ou A, D, B, C (du Penhoat *et al.*, 1999).

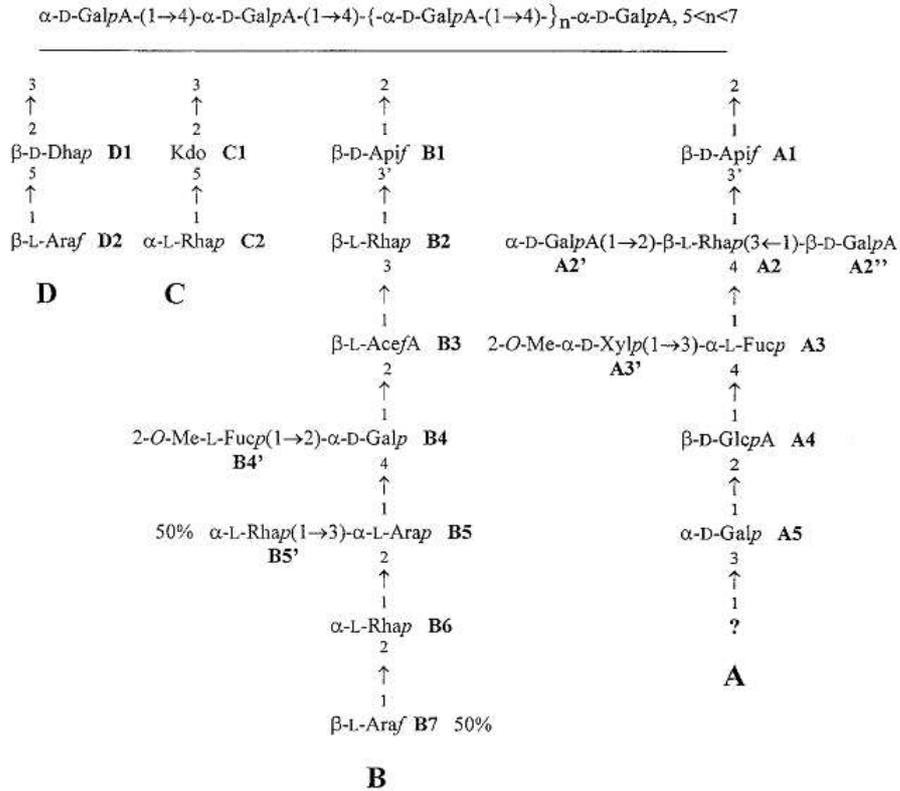


Figure 2 : Modèle de structure pour la région des RG II. D’après du Penhoat *et al.*, 1999.

Les RG II sont associés entre eux sous forme de dimère (*cf.* § 1.1.2.1.1). Les RG II représentent entre 1 et 4% de la paroi végétale primaire riche en pectines des dicotylédones, monocotylédones non graminées et gymnospermes et moins de 0,1% chez les graminées. Chez les ptéridophytes et les lycophytes, les RG II composent entre 0,2 et 2% de la paroi (Matsunaga *et al.*, 2004).

### 1.1.1.3. Les rhamnogalacturonanes I

Les rhamnogalacturonanes I (RG I) sont constitués d’un squelette de [-4)-  $\alpha$ -D-GalpA-(1→2)- $\alpha$ -rhamnose-(1-] (Figure 3). Les branchements peuvent être situés sur le rhamnose en C-4. Ils peuvent être de nature monosaccharidique : l’ $\alpha$ -galactose (Sengkhampan *et al.*, 2009) ou oligosaccharidique. Plus rarement, ces GalA peuvent être branchés en C-3 par des résidus d’acide glucuronique (Renard *et al.*, 1999).

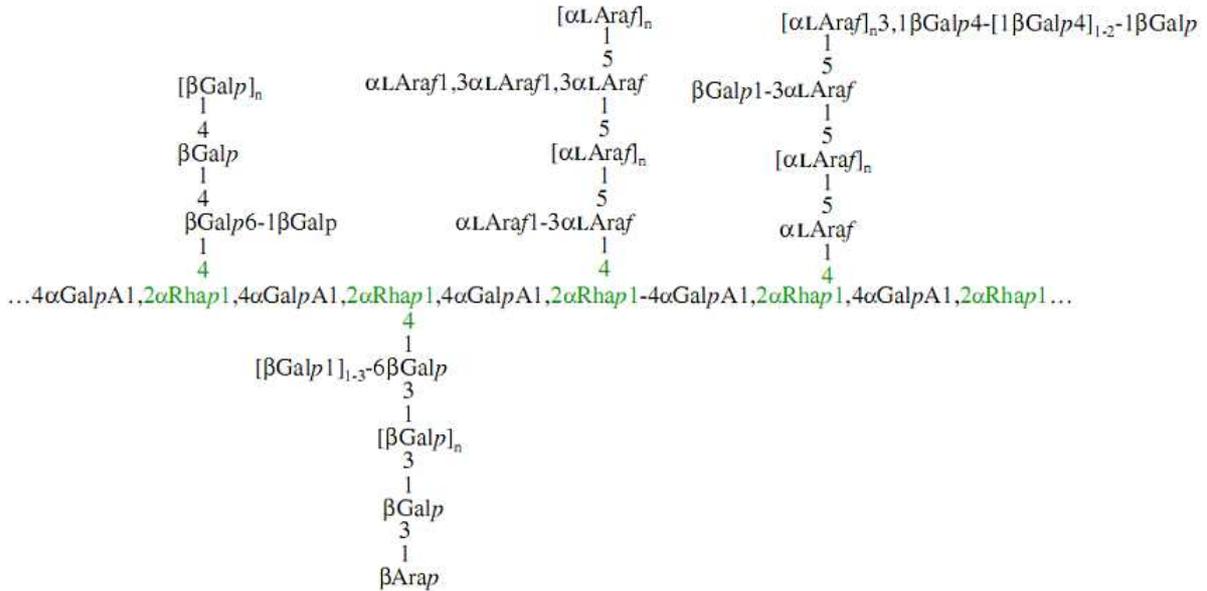


Figure 3 : Modèle de structure pour la région RG I. D’après Caffall & Mohnen, 2009.

Dans le cas des substitutions oligosaccharidiques, trois types de chaînes peuvent être distingués :

- Les galactanes (Gal) sont composés d’un squelette de  $\beta$ -(1→4)-D-galactane ramifié par des résidus galactose liés en  $\beta$ -(1→6) et  $\beta$ -(1→3).
- Les arabinogalactanes I (AG I) sont composés d’un squelette de  $\beta$ -(1→4)-D-galactane substitué par des résidus  $\alpha$ -L-Araf en O-3. Une substitution en O-6 est aussi possible. Cette chaîne peut être terminée par un  $\alpha$ -(1→4)-L-Arap.
- Les arabinanes (Ara) sont constitués d’un squelette de  $\alpha$ -(1→5)-L-Araf pouvant être substitué par des chaînes latérales de  $\alpha$ -L-Araf-(1→2)-,  $\alpha$ -L-Araf-(1→3)- ou  $(\alpha$ -L-Araf-(1→3)- $\alpha$ -L-Araf).

Leur proportion relative ainsi que la longueur de la chaîne dépend de la plante considérée. Ces oligosaccharides peuvent aussi contenir des résidus  $\alpha$ -L-fucosyles,  $\beta$ -D-glucuronosyles, 4-O-méthyle- $\beta$ -D-guluronosyles ainsi que de l’acide férulique. Une autre chaîne latérale est aussi rencontrée. Il s’agit des Arabinogalactanes II (AG II) qui sont composés d’un squelette de (1→3)- $\beta$ -D-Galp contenant une courte chaîne latérale  $\alpha$ -L-Araf-(1→6)-[ $\beta$ -D Galp-(1→6)]<sub>n</sub> avec n = 1, 2 ou 3. Les résidus galactosyles peuvent être substitués avec  $\alpha$ -L-Araf-(1→3). Leur appartenance aux pectines peut être discutée car les AG II sont principalement associés à des modifications post traductionnelles d’une fraction de

protéines pariétales (3-8%) appelées « arabinogalactan proteins ». Mais certains types d'AG II sont associés avec les pectines (Caffall & Mohnen, 2009).

#### 1.1.1.4. Les substituants non osidiques

Les GalA des pectines peuvent être méthylés et/ou acétylés. La présence de ces substituants est régulée chez la plante pour moduler les propriétés de la paroi et, dans l'industrie, pour moduler les propriétés fonctionnelles des pectines. La présence d'autres substituants comme l'acide férulique est aussi rapportée.

##### 1.1.1.4.1. La méthylation

Les HG peuvent porter un ester de méthyle en C-6. Conventionnellement, les pectines sont caractérisées par leur degré de méthylation (DM). Le DM est défini par le pourcentage du nombre de GalA méthylés sur le nombre total de GalA de l'échantillon. Il est alors possible de distinguer deux types de pectines : les pectines hautement méthylées (« High Methoxylated », HM) dont le DM est supérieur à 50% et les pectines faiblement méthylées (« Low Methoxylated », LM) dont le degré de méthylation est inférieur à 50%. Le DM détermine le mécanisme de gélification de la pectine (cf. §1. 3. 2. 5)

La notion de distribution des méthyles est complexe car elle comprend la distribution au niveau d'une seule molécule (intramoléculaire) et la distribution entre plusieurs chaînes de pectines appartenant à un mélange (intermoléculaire). Différentes méthodes chimiques et biochimiques ont été développées afin de l'évaluer (Schols *et al.*, 2003) et de l'exprimer de différentes façons. Notamment, la détermination du « Degree of Blockiness » (DB) (Daas *et al.*, 1999) permet d'évaluer la distribution intramoléculaire moyenne des méthyles et leur tendance à former des blocs plus ou moins longs.

A l'origine, la détermination du DB se base sur une technique d'empreinte enzymatique (Daas *et al.*, 1999). La pectine est dégradée par une endopolygalacturonase (endoPG) qui hydrolyse la liaison entre deux GalA uniquement si un nombre suffisant de GalA consécutifs non estérifiés sont présents. Ce nombre varie avec l'origine de l'endoPG. Chez *Kluyveromyces fragiles*, il est de quatre. Ainsi, le fragment le plus long libéré par l'endoPG sera constitué de quatre GalA libres et d'un GalA méthylestérifié. La quantité de monomères, dimères et trimères de GalA est mesurée et rapportée à la quantité de GalA non méthylés présents dans l'échantillon. Le DB exprime le pourcentage de GalA non méthylés présents en blocs avant la digestion par l'endoPG. Mais ce paramètre ne permet pas de

prendre en compte les variations du DM. L'« absolute Degree of Blockiness » (DBabs) a donc été introduit pour prendre en compte les variations du DM (Guillotin *et al.*, 2005). Le calcul de ce paramètre s'effectue à partir des résultats de l'empreinte enzymatique comme précédemment. Mais les quantités de monomères, dimères, trimères libérées sont rapportées à la quantité totale d'acides galacturoniques présents dans l'échantillon. Plus le DB ou le DBabs sont élevés, plus les méthyles sont répartis en blocs. Un autre avantage de ce paramètre est d'être corrélé aux propriétés mécaniques des gels calciques de pectines (Ström *et al.*, 2007). Plusieurs techniques physiques comme la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ou la spectroscopie infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR) permettent d'évaluer le DB (Winning *et al.*, 2007; Winning *et al.*, 2009).

La distribution des méthyles varie aussi à l'échelle intermoléculaire. En effet, chacune des chaînes de pectines possède sa propre séquence de GalA méthylés et libres, ce qui se traduit par des différences de densité de distribution de charge entre les chaînes. La distribution intermoléculaire peut être mesurée par chromatographie échangeuse d'ions (Ralet & Thibault, 2002) ou encore en électrophorèse capillaire (Ralet & Thibault, 2002; Williams *et al.*, 2003; Williams *et al.*, 2009).

La détermination des différents paramètres concernant la quantité et la répartition des méthyles le long de la chaîne peut permettre la caractérisation du mode d'action des pectines méthylestérases lorsqu'elle est réalisée sur les pectines modifiées par voie enzymatique.

#### 1.1.1.4.2. L'acétylation

La substitution des GalA par des acétyles en O-2 et/ou O-3 est présente dans les régions HG et dans les régions RG I (Perrone *et al.*, 2002). La proportion de groupements acétyle est particulièrement importante chez les pectines d'abricot, de poire et de betterave sucrière (Jarvis *et al.*, 2003). Chez la betterave sucrière, 75% des acétyles proviennent des HG et 25% des RG I (Ralet *et al.*, 2005b). La présence d'acétyles substituant les groupements rhamnose des régions RG I a aussi été montrée chez les pectines d'okra (Sengkhampan *et al.*, 2009). De la même façon que pour les méthyles, le degré d'acétylation constitue une caractéristique des pectines. Il est possible d'acétyler les régions HG de façon chimique (Renard & Jarvis, 1999a). L'acétylation altère les propriétés de complexation du calcium par les pectines (Renard & Jarvis, 1999b; Ralet *et al.*, 2003). La présence des acétyles rend les HG résistants à la dégradation par les endopolygalacturonases et gêne l'action des pectines méthylestérases (Renard & Jarvis, 1999a).

#### 1.1.1.4.3. La feruloylation

Chez les Chenopodiaceae comme la betterave sucrière, la présence de résidus féruloyles estérifiés sur les RG I a été rapportée sur les arabinanes et les galactooligosaccharides liés en  $\alpha$ -(1→4) (Thibault & Rombouts, 1986; Ishii, 1997). Une dégradation enzymatique poussée de pulpe de betterave a permis de localiser l'acide férulique sur le C6 du galactose ou sur le C2 de l'arabinose (Micard *et al.*, 1997b).

#### 1.1.1.5. Diversité des pectines

La structure fine des pectines peut varier selon la source, le stade de développement, la localisation pariétale ou tissulaire et la méthode d'extraction. Il faut aussi prendre en compte les conditions de cultures, le moment de la récolte et le parcours post-récolte. La longueur des chaînes, la composition en oses neutres ainsi que les différentes substitutions possibles peuvent varier d'une molécule à l'autre. Typiquement, dans la paroi végétale d'un tissu indifférencié, les HG sont les plus abondants. Ils représentent 65% des pectines, la proportion de RG I étant comprise entre 20% et 35% (Mohnen, 2008). Les RG II et XGA sont des composés minoritaires, représentant moins de 10% des pectines (Zandleven *et al.*, 2007; Mohnen, 2008). Ces proportions sont à moduler selon les différents facteurs de variation de la composition en pectines cités ci-dessus comme l'espèce. Par exemple, chez les fruits de l'arganier (*Argania spinosa*), la proportion de régions RG I est supérieure à celle d'HG (Aboughe-Angone *et al.*, 2008). D'autre part, les conditions d'extraction entraînent une perte des régions RG II. Les pectines commerciales ont généralement un poids moléculaire compris entre 7 et 14 x 10<sup>4</sup> Da et une teneur en acide galacturonique d'environ 75%.

### 1.1.2. Organisation structurale des différents éléments

#### 1.1.2.1. Les liaisons

Dans la paroi végétale, les pectines forment un réseau contribuant aux propriétés mécaniques de la paroi. L'établissement de ce réseau s'effectue grâce à des liaisons de nature ionique ou covalente entre les molécules de pectines (Figure 4).

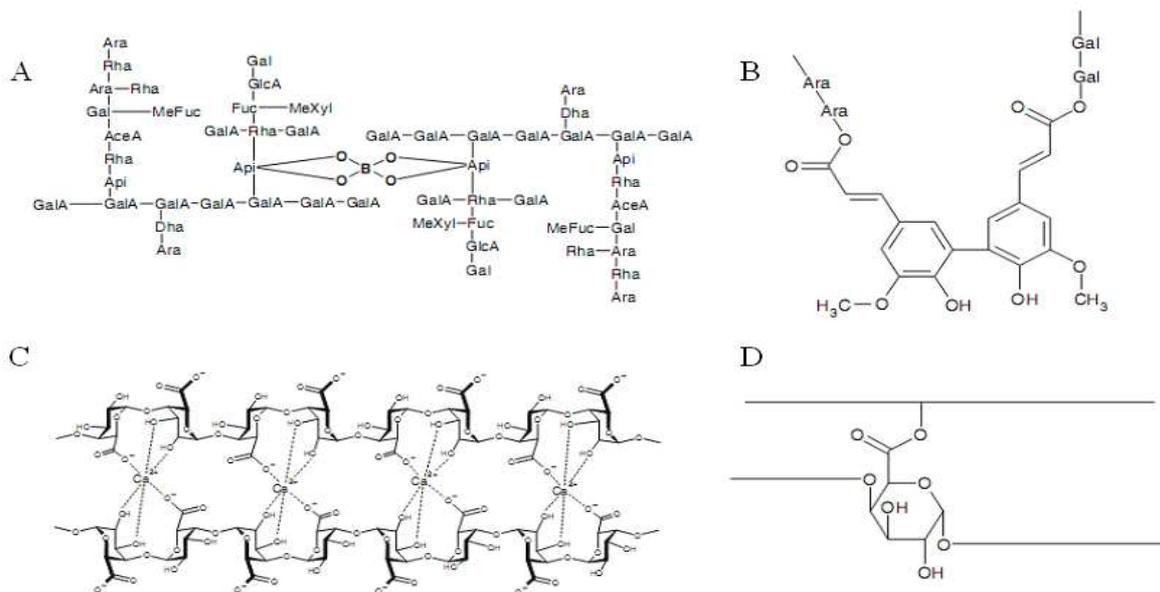


Figure 4 : Différents types de liaisons rencontrés entre les molécules de pectines.

Liaison borate RG II-RG II (A), liaison covalente RG I-RG I (B), liaison ionique HG-HG (C), liaison covalente HG-HG (D). D'après Voragen *et al.*, 2009.

#### 1.1.2.1.1. La formation des dimères RG II-RG II

L'acide borique réagit spontanément avec les composés comportant des diols en position *cis* comme les sucres (Matoh & Kobayashi, 1998). Les esters de borate se forment plus rapidement avec des monosaccharides qui ont une configuration  $\beta$ -D-furanose. Le seul composant des RG II présentant cette configuration est l'apiose. Une liaison tétravalente s'établit entre le bore et les diols de deux molécules de RG II (Figure 4 A). La structure du RG II détermine les résidus apiosyles qui seront estérifiés avec le bore. En présence d'acide borique, deux monomères de RG II s'auto-assemblent pour former un dimère (Ishii *et al.*, 1999). Les esters de borate impliquent les O-2 et O-3 de l'apiose. Cette liaison borate serait impliquée dans la mise en place du réseau pectique (Ishii *et al.*, 1999). *In muro*, les ions calcium pourraient stabiliser les dimères de RG II (Matoh & Kobayashi, 1998). Dans le cas d'une carence en bore, les tissus végétaux sont souvent cassants et ont un défaut dans l'élongation d'une partie de leurs cellules. L'altération de ces liaisons associée à une modification structurale des RG II (mutation) peut conduire à un phénotype nain et à une fragilité des tissus (O'Neill *et al.*, 2004). Ces observations soulignent l'importance des RG II et de leurs dimères dans la croissance et le développement de la plante.

#### 1.1.2.1.2. La formation des dimères covalents RG I-RG I

Les acides hydroxycinnamiques tels que l'acide férulique peuvent se coupler pour former des dimères covalents (figure 4B). *In vitro*, les pectines de betterave peuvent former des gels par le biais d'un réseau grâce à l'action oxydante de la peroxydase ou d'un traitement au persulfate d'ammonium (Thibault & Rombouts, 1986). La formation de ces dimères dans la paroi végétale contribuerait à sa rigidification. La présence d'un certain nombre de déhydrodimères a été montrée chez la betterave (Micard *et al.*, 1997a). Les pectines de betterave présentent des résidus féruloyles estérifiés sur les arabinanes et les oligosaccharides galactosyles liés en  $\alpha$ -(1→4) (Ishii, 1997).

#### 1.1.2.1.3. La formation des dimères ioniques HG-HG

Les chaînes HG faiblement méthylées peuvent se complexer autour de cations divalents tels que le calcium et former des zones de jonction (figure 4C). Dans la paroi, cette interaction est mise en évidence notamment par l'utilisation de l'anticorps 2F4, spécifique du dimère calcique (Liners *et al.*, 1989). Après extraction des pectines, cette association permet de former un gel de pectines. Cette liaison sera détaillée dans le paragraphe traitant de la gélification des pectines LM (*cf.* § 1.3.2.5.2).

#### 1.1.2.1.4. La formation des dimères covalents HG-HG

Les régions HG pourraient être liées entre elles par des esters d'uronyles (figure 4D). Jusqu'à 2% des résidus GalA pourraient être reliés de cette façon (Vincken *et al.*, 2003). Cette réaction pourrait être catalysée par une pectine méthylestérase particulière pouvant réaliser une trans-estérification entre deux GalA. Le méthanol est libéré d'un GalA méthylestérifié et estérifié avec un groupement hydroxyle d'un GalA appartenant à une chaîne adjacente (Voragen *et al.*, 2009). Les informations sur cette liaison restent encore éparées.

### 1.1.2.2. Les modèles d'organisation de la macromolécule pectique

Dans la paroi primaire, les HG et les RG I et II sont reliés entre eux par des liaisons covalentes et forment une molécule de pectine (Nakamura *et al.*, 2002) (Ishii & Matsunaga, 2001). Chez la pomme, il a été montré que les RG I étaient liés de façon covalente aux HG ou XGA (Coenen *et al.*, 2007). Différents modèles d'agencement des sous-unités pectiques ont été proposés (Voragen *et al.*, 2009).

Un des premiers modèles (Visser et Voragen, 1996) présente un squelette continu formé des HG et des RG I. Dans ce modèle, le squelette pectique consiste en une chaîne étendue comprenant à la fois les RG I et les HG (ou XGA) ainsi que des résidus rhamnose isolés espaçant les régions HG (Figure 5).

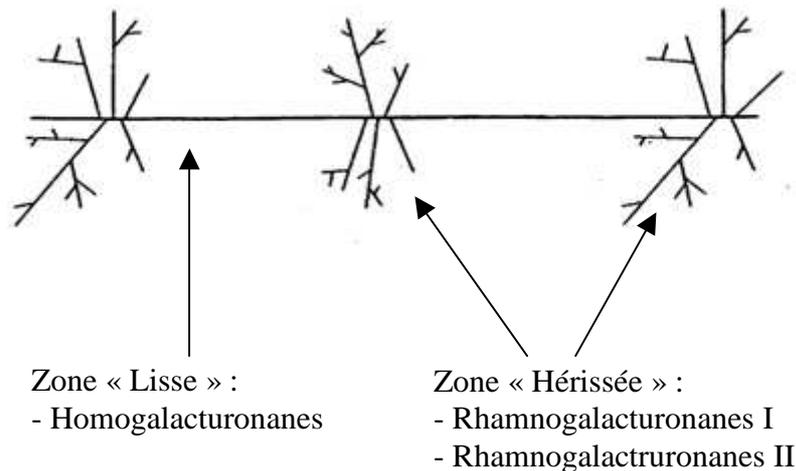


Figure 5 : Modèle d'alternance des zones lisses et hérissées proposé par Visser & Voragen (1996).

Le modèle d'alternance des régions lisses et hérissées propose que la pectine soit un biopolymère en blocs composé d'éléments contenant des régions hérissées interrompues par des régions lisses (HG) contenant de 70 à 100 GalA. Ce degré de polymérisation a été confirmé chez plusieurs espèces et par plusieurs méthodes (Thibault *et al.*, 1993; Pérez *et al.*, 2000; Bonnin *et al.*, 2002). Dans ce modèle, les RG II sont associés aux HG (Ishii & Matsunaga, 2001) et permettraient éventuellement de lier deux molécules de HG entre elles. Ce modèle est en compétition avec celui de Vincken *et al.* (2003) qui propose que les RG I constituent le squelette principal de la molécule et que les RG II et les HG soient liés de façon covalente aux RGI sous forme de chaînes latérales (Vincken *et al.*, 2003). La mise en évidence, chez la pectine de soja, de fragments HG liés en C-2 au rhamnose, ainsi que des fragments HG reliant deux résidus rhamnose favorise le modèle de l'alternance des régions lisses et hérissées (Nakamura *et al.*, 2002).

La masse moléculaire des pectines est relativement difficile à évaluer notamment à cause de leur hétérogénéité. La masse moléculaire des pectines est comprise entre une dizaine et une centaine de kDa. Elle dépend à la fois de l'origine des pectines, de leur mode d'extraction ainsi que de la technique employée pour la mesurer (Ralet *et al.*, 2005a).

## **1.2. Les pectines au sein de la plante**

### **1.2.1. Les pectines : un polysaccharide pariétal**

#### 1.2.1.1. Généralités sur la paroi végétale

Une des particularités des cellules végétales est la présence d'une paroi à l'extérieur de des cellules. A l'échelle cellulaire, la paroi végétale contrôle la croissance et le développement de la cellule. A l'échelle tissulaire, elle assure la cohésion des cellules entre elles. A l'échelle de la plante, la paroi permet l'établissement du port dressé tout en permettant une certaine flexibilité, ainsi que la résistance aux stress abiotiques et biotiques. Les principales contraintes imposées à la paroi sont d'être solide et souple à la fois ainsi que d'être facilement modulable pour permettre le développement et la croissance de chaque cellule. La paroi végétale est un système dynamique, vis à vis du remodelage intervenant sur ses polymères. En effet, par exemple, les HG sont sécrétés sous forme hautement estérifiée (~80%) (Wolf *et al.*, 2009). L'ajustement du taux et de la répartition des méthyles s'effectue dans la paroi par les pectines méthylestérases. D'autre part, une communication entre la paroi et la cellule via des récepteurs spécifiques a été mise en évidence et permet ainsi une régulation fine des propriétés pariétales (Seifert & Blaukopf, 2010).

La paroi végétale est constituée d'un réseau de cellulose et d'un réseau d'hémicelluloses (xyloglucanes, XG), tous deux incorporés dans une matrice pectique. L'organisation de ces différents réseaux a donné lieu à l'élaboration de différents modèles (Carpita & Gibeaut, 1993). Dans un premier modèle, le réseau cellulose-xyloglucanes correspond à la structure porteuse de la paroi tandis que le réseau pectique sert principalement à remplir les vides. L'existence de liaisons entre le réseau pectique, les hémicelluloses, les composés phénoliques et les protéines pariétales, ainsi que l'existence d'une répartition spécifique des domaines pectiques le long de la paroi ont été soulevées dans la littérature et ont conduit à l'élaboration de nouveaux modèles.

Vincken *et al.* (2003) proposent un modèle dans lequel le réseau de pectines est fixe et interagit avec le réseau cellulose-xyloglucanes (Figure 6) (Vincken *et al.*, 2003; Morris *et al.*, 2009).

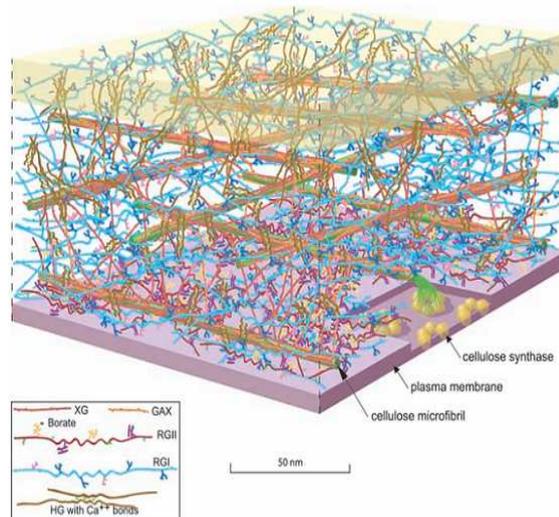


Figure 6 : Modèle de la paroi d'une cellule dans une feuille d'*Arabidopsis* en accord avec le modèle de Vinken *et al.* (2003) et à partir du modèle présenté par McCann et Roberts. (Somerville *et al.*, 2004)

Ce modèle permet d'expliquer la répartition des différents domaines pectiques. Dans ce modèle, les microfibrilles de cellulose sont reliées les unes aux autres par les hémicelluloses, tandis que les RG I sont alignés avec les microfibrilles. Les HG, Ara, Gal et RG II sont considérés comme les chaînes latérales des RG I. Les RG II forment des liaisons entre les différentes molécules de pectines via les esters de borate. Les HG sont plutôt situés dans la lamelle moyenne où ils s'associeraient via le calcium (Vorwerk *et al.*, 2004).

#### 1.2.1.2. Localisation des pectines dans la paroi

Les diverses fonctions de la paroi végétale dans la plante lui imposent des contraintes importantes. Pour y répondre, la structure et la composition chimique de la paroi sont hétérogènes au sein de la plante ainsi qu'au niveau pariétal (Burton *et al.*, 2010). Par conséquent, les pectines présentent une variété de structure et de composition au niveau des différents organes de la plante et au niveau pariétal. L'existence de micro-domaines au sein du réseau pectique a pu être mise en évidence notamment grâce aux marquages immunologiques à l'aide d'anticorps monoclonaux contre les différents domaines pectiques, ainsi que leur association avec le calcium (Liners *et al.*, 1989; Christiaens *et al.*, 2011). Par exemple, pour les régions HG, il a été possible de montrer une différence de localisation entre des pectines

HM et LM. Chez la racine de carotte, correspondant à un stade jeune des tissus, les pectines LM ont été mises en évidence sur la face interne de la paroi adjacente à la membrane plasmique, dans la lamelle moyenne et dans les espaces intercellulaires. Les pectines HM, quant à elles, sont réparties plus uniformément à travers la paroi (Knox *et al.*, 1990). D'autre part, il a été possible de montrer une différence de répartition des méthyles en différents endroits de la paroi grâce aux anticorps LM 7 et PAM 1.

L'épitope LM 7 correspond à une région HG partiellement méthylestérifiée abondamment présente lorsque la distribution des méthyles est aléatoire. Il est spécifiquement détecté à la jonction des parois végétales adhérentes et non adhérentes, *i.e.* sur les espaces intercellulaires de nombreux parenchymes. Chez le pois, cet épitope est détecté selon des localisations comparables dans les parois cellulaires épidermiques et dans les espaces intercellulaires de tous les organes étudiés (Willats *et al.*, 2001).

L'épitope PAM 1 est constitué d'un minimum de 30 acides galacturoniques dé-estérifiés. Il reconnaît les régions dé-estérifiées en blocs et est détecté le long des espaces intercellulaires et dans la région proche de la membrane plasmique. Les pectines avec un DM faible et une distribution en blocs seraient principalement présentes le long des espaces intercellulaires (Willats *et al.*, 2001). La présence des régions HG dé-estérifiées dans cette partie de la paroi indique une forte implication de ces régions dans l'adhésion cellule-cellule.

Une différence de répartition du degré d'acétylation au sein de la paroi a été montrée chez les cellules de betteraves. Les régions HG sont moins acétylées dans les espaces de jonction tri-cellulaire que dans la paroi primaire (Guillemin *et al.*, 2005). Les micro-domaines pectiques de la paroi sont aussi caractérisés par la composition en chaînes latérales des RG I (Oomen *et al.*, 2003).

Les RG II dans la paroi ont été localisés proches de la membrane plasmique (Williams *et al.*, 1996).

La répartition et la composition des micro-domaines ne sont pas figées. Elles évoluent avec l'état physiologique de la cellule. Par exemple, la proportion des chaînes latérales galactanes et arabinanes des régions RG I évoluerait au cours de la croissance (Willats *et al.*, 2003), comme lors du passage d'une cellule de l'état de division cellulaire à l'état d'élongation cellulaire chez la racine de carotte (Willats *et al.*, 1999). Le premier état (cellule en prolifération) est caractérisé par une forte proportion d'arabinanes tandis que le second (différentiation cellulaire) se caractérise par l'appartition de chaînes galactanes. D'autre part, la composition des domaines est différente selon la localisation de la cellule dans la plante. Par exemple, chez le pois, la présence de XGA a été corrélée à un processus de détachement

des cellules de la coiffe (Willats *et al.*, 2004). La diversité de la répartition des méthyles est associée à des régions plus ou moins sensibles à la dégradation enzymatique, ce qui est important notamment dans le cas d'invasion par un agent pathogène.

Une réorganisation du réseau pectique serait également observée lors de la mise en place de la paroi secondaire et en particulier de sa lignification (Lairez *et al.*, 2005).

### **1.2.2. Fonctions des pectines dans la paroi végétale**

La paroi végétale donne à la cellule sa taille et sa forme et lui confère une résistance physique tout en accompagnant la cellule dans sa croissance et son développement. La paroi joue aussi un rôle de protection contre l'environnement extérieur. Les pectines participent à ces rôles en association avec les autres polysaccharides de la paroi.

#### **1.2.2.1. Rôle des pectines sur les propriétés mécaniques de la paroi**

La contribution des pectines aux propriétés mécaniques de la paroi a été évaluée grâce à l'étude de systèmes simplifiés modélisant la paroi. La comparaison de ces modèles avec et sans pectines a été réalisée grâce à un test d'étirement. Il a été montré que l'ajout de pectines à une paroi artificielle constituée de cellulose augmente ses capacités de déformation. Cet effet a été corrélé à un taux d'hydratation important (Cybulska *et al.*, 2010). L'hypothèse émise est que le gonflement de la matrice de pectines après hydratation conduit à une diminution de la friction des microfibrilles de cellulose. De la même façon, il a été montré que la présence de pectines dans la paroi augmentait les effets du calcium sur les paramètres mécaniques. (Cybulska *et al.*, 2011).

Les propriétés de rigidité et de souplesse de la paroi sont aussi influencées par la composition des pectines. L'état de souplesse de la paroi lors de la croissance et de l'expansion cellulaire a pu être corrélé à une teneur croissante en HG et en chaînes latérales de RG I. D'autre part, la rigidification de la paroi a pu être reliée à une dégradation des chaînes latérales de RG I et à une accumulation d'HG dé-méthylés (Caffall & Mohnen, 2009). En effet, il a été montré qu'une diminution de la teneur en HG conduit à une augmentation de la flexibilité de la paroi (Ralet *et al.*, 2008). La comparaison des longueurs de persistance (distance à travers laquelle l'axe longitudinal de la chaîne peut être considéré comme linéaire) montre que les HG sont 4 fois plus rigides que les RG I. La présence des régions HG le long

des espaces intercellulaires indique une forte implication de ces régions dans l'adhésion cellule-cellule (Willats *et al.*, 2001).

Les régions RG I et RG II ont aussi un rôle important dans les propriétés mécaniques de la paroi. Pour les RG I, les chaînes latérales arabinanes pourraient empêcher la formation de zones de jonction entre les HG via le calcium en les espaçant les unes des autres (Harholt *et al.*, 2010). De plus, les arabinanes assureraient la connexion entre le réseau pectique et le réseau cellulosique en formant des liaisons de faible énergie avec les microfibrilles de cellulose (Zykwinska *et al.*, 2007). Les chaînes latérales arabinanes et galactanes sont très mobiles comparées aux autres composants des pectines (Ha *et al.*, 2005; Harholt *et al.*, 2010). Les RG II sont minoritaires dans la paroi, mais jouent également un rôle dans les propriétés mécaniques. La liaison borate entre les RG II présente chez tous les groupes de plantes terrestres semble avoir joué un rôle évolutif important en permettant le port dressé (Matsunaga *et al.*, 2004). Les pectines participent aux propriétés d'hydratation de la paroi grâce à leur hydrophilicité et à leurs charges (Thibault & Ralet, 2003b). D'autres propriétés sont aussi fortement influencées par la présence des pectines comme la porosité de la paroi, la modulation du pH et la balance ionique de la paroi (Carpita & Gibeaut, 1993).

#### 1.2.2.2. Rôle des pectines dans la croissance de la cellule

La paroi cellulaire se doit d'être extensible au moment de l'élongation cellulaire, puis de se rigidifier à la fin de la croissance (Cosgrove, 2005). La capacité des pectines à former des gels hydratés joue un rôle important dans la croissance des cellules. Le degré d'estérification élevé des pectines déposées dans la paroi leur confère une certaine mobilité, essentielle à la plasticité de la paroi et, par conséquent, à l'élongation cellulaire. Le taux de méthylation élevé est essentiel. En effet, il a été montré que les régions HG doivent posséder un DM minimum de 60% pour permettre l'élongation des cellules de l'hypocotyle chez *A.thaliana* (Derbyshire *et al.*, 2007). La mobilité des chaînes de pectines permet le glissement des microfibrilles de cellulose les unes par rapport aux autres.

A la fin de la croissance de la cellule, les PME retirent les groupements méthyles par bloc et créent des régions chargées négativement. Les groupements carboxyles libérés sont donc disponibles pour se lier aux ions calcium formant ainsi des ponts salins inter-chaînes. Le gel devient donc plus rigide. Les pectines permettent donc aussi une meilleure cohésion intercellulaire et le maintien des microfibrilles de cellulose une fois la croissance terminée (Jarvis *et al.*, 2003; Leboeuf *et al.*, 2005).

#### 1.2.2.3. Rôle des pectines dans la maturation des fruits

Le ramollissement des fruits lors du mûrissement s'accompagne d'une dépolymérisation du réseau pectique (Brummell *et al.*, 2004). La cohésion du gel de pectines est donc probablement parmi les facteurs déterminants de la texture des fruits (Jarvis, 1984). La modification des pectines passe par leur dégradation et leur renouvellement. L'importance de ces processus varie selon les espèces concernées. Lors du mûrissement de la pomme, la fraction pectique est remplacée par une pectine néo-synthétisée hautement estérifiée et qui possède une faible proportion de résidus neutres (Jarvis, 1984). Les fruits de *citrus* sont une exception car leurs pectines sont hautement estérifiées et extractibles à un stade précoce et sans lien avec la maturation.

#### 1.2.2.4. La défense des plantes contre les stress biotiques

Les pectines sont les premières cibles lors d'une attaque par des microorganismes phytopathogènes. Leurs produits de dégradation sont des éliciteurs. Les éliciteurs sont souvent de petites molécules synthétisées ou issues du pathogène, mais aussi des oligosaccharides issus de la paroi végétale dérivant de la présence du pathogène. Ces molécules induisent une réponse défensive de la plante. Les oligosaccharides éliciteurs les plus connus sont les oligo- $\alpha$ -galacturonides (OGA) produits lors de la dégradation des HG. Ils induisent la production de molécules possédant une activité antibiotique : les phytoalexines (Hahn *et al.*, 1981; Ridley *et al.*, 2001; Vorwerk *et al.*, 2004). Une expérience sur les cotylédons de soja (*Glycine max*) a montré qu'un hydrolysate de pectines de *citrus* avait une activité élicitrice proche d'un hydrolysate de paroi végétale de soja (Nothnagel *et al.*, 1983). Un processus de même nature est observé lorsqu'une plante parasite infeste une plante hôte (Veronesi *et al.*, 2007).

#### 1.2.2.5. La défense des plantes contre les stress abiotiques

La proportion de pectines présente dans la paroi végétale joue un rôle naturel d'échangeur d'ions et assure jusqu'à 70% de sa capacité d'échange de cations (McKenna *et al.*, 2010). Les pectines associées aux ions divalents pourraient ainsi jouer un rôle d'immobilisation d'ions métalliques comme le cuivre II, le plomb II ou le chrome III et limiter ainsi leurs effets toxiques sur la plante (Castaldi *et al.*, 2010).

Les pectines sont aussi impliquées dans le contrôle de l'hydratation (*cf.* § 1.2.2.1). Certaines plantes d'Afrique du Sud présentent des teneurs en arabinanes très élevées et survivent à des

déshydratations poussées (Moore *et al.*, 2008). Le modèle issu de ces observations propose que, sous la dessiccation, ces chaînes latérales d'arabinanes longues conservent leur mobilité plus longtemps que les autres composés pectiques et peuvent ainsi combler les cavités créées par le réarrangement de la paroi consécutif à la déshydratation. Les longues chaînes d'arabinanes empêchent ainsi la formation de liaisons irréversibles indésirables dans la paroi.

#### 1.2.2.6. La lignification

Les pectines sont présentes dans la paroi secondaire et seraient impliquées dans le processus de lignification (Lairez *et al.*, 2005). Un modèle de paroi lignifiée a permis de montrer que les pectines affectaient la structure et l'ultrastructure de lignines modèles. (Touzel *et al.*, 2003).

#### 1.2.2.7. Polymère de réserve

Les pectines peuvent tenir un rôle de polymère de stockage. En particulier, les galactanes sont très abondants chez certaines espèces de lupin et sont remobilisés lors de la germination de la graine (Harholt *et al.*, 2010).

### **1.3. Les pectines : propriétés et utilisations industrielles**

#### **1.3.1. Sources et techniques d'extraction**

##### 1.3.1.1. Sources

Les principales sources de pectines pour l'extraction industrielle sont les résidus issus de la transformation des pommes et des fruits de la famille des *citrus* (citron, citron vert, orange, pamplemousse). Ces sources sont abondantes car elles proviennent de sous-produits de l'industrie des jus de fruits : le marc de pomme et les écorces de *citrus*. Il existe d'autres sources de pectines d'importance plus réduite : les têtes de tournesol (Miyamoto & Chang, 1992), la fibre de pomme de terre (Turquois *et al.*, 1999), les peaux d'oignons, la pulpe de courge (O'Donoghue & Somerfield, 2008) et les déchets de la production des jus de fruits tropicaux (Berardini *et al.*, 2005). Selon la source utilisée, la pectine extraite sera de type HM ou LM. Les pectines peuvent être aussi extraites de pulpe de betterave. Mais leur forte teneur en acétyles restreint leur usage dans les filières traditionnelles de la pectine en limitant leurs

propriétés de gélification en présence de calcium ou en présence de sucre et milieu acide (Mesbahi *et al.*, 2005).

#### 1.3.1.2. Techniques d'extraction

Selon la loi, la désignation « pectine » s'applique aux produits composés d'au moins 65% de GalA. Typiquement, le processus employé pour l'extraction des pectines se divise en trois étapes (Figure 7) :

- Extraction aqueuse à partir de la matière végétale en milieu basique ou acide
- Purification de l'extrait liquide
- Isolement de la pectine extraite

L'extraction basique conduit à une pectine de faible DM à cause de la réaction de saponification des esters de méthyles. L'extraction acide conduit à des pectines de haut DM. Pour l'extraction acide, le matériel végétal est traité à l'acide à une température comprise entre 70°C et 90°C. L'acide employé est un acide minéral, souvent l'acide nitrique (Ralet *et al.*, 2005a). Cette étape est suivie d'une étape de filtration pour éliminer la cellulose. La pectine est ensuite précipitée à l'aide d'alcools (éthanol ou isopropanol) ou de sels (chlorure d'aluminium). La récupération de la pectine s'effectue par filtration. Puis la pectine est lavée, séchée et broyée à la taille de particule désirée. L'extrait obtenu en milieu acide ou basique est composé d'un mélange de pectines de différents degrés d'estérification et de différents poids moléculaires. Le contrôle du degré d'estérification et du poids moléculaire s'effectue par le contrôle des sources d'extraction. Les pectines extraites industriellement de *citrus* ou de pomme sont typiquement HM. Suite à l'extraction, il est possible de procéder à une dé-estérification, soit par voie chimique (dé-estérification alcaline à basse température), soit par voie enzymatique (utilisation de pectines méthylestérases). Il est aussi possible de modifier chimiquement la structure de la pectine (amidation) pour lui conférer d'autres propriétés.

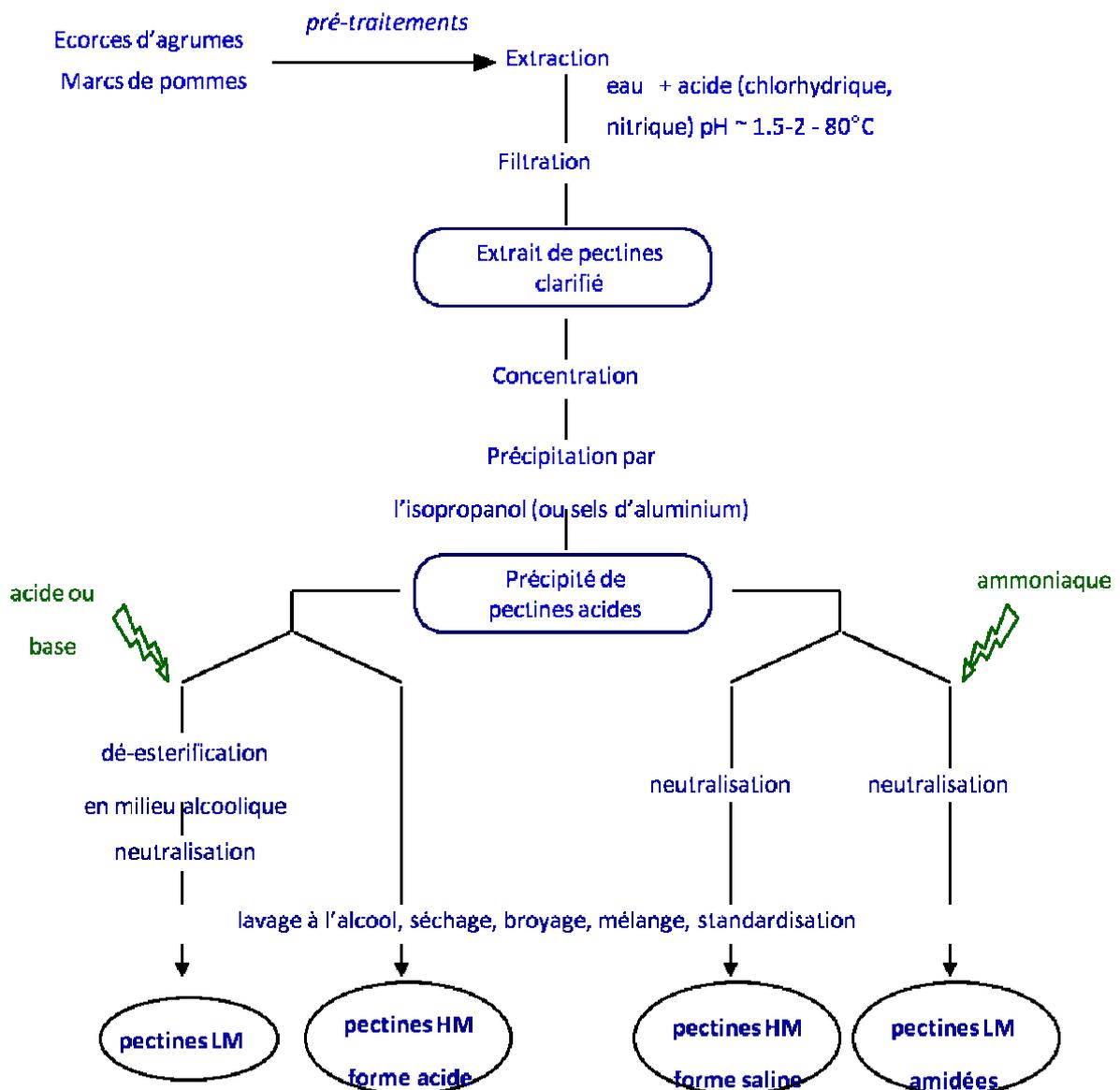


Figure 7 : Schéma de l'extraction industrielle des pectines.

Dans un contexte de développement durable, l'extraction enzymatique des pectines a été explorée (Zykwinska *et al.*, 2009). Il peut être intéressant d'effectuer l'extraction de pectines en fonction de leur DM. Ce procédé est possible en variant le pH de l'extraction acide (Joye & Luzio, 2000). Une première extraction à un pH compris entre 3 et 3,3 sans ajout d'ions polyvalents permet d'extraire des pectines HM. Une seconde extraction sous conditions d'acide fort à pH 2 permet d'extraire des pectines LM.

### 1.3.2. Propriétés physico-chimiques

Le pKa de GalA est de 3,5. Le pKa d'un GalA au sein d'une chaîne pectique dépend à la fois du DM et du poids moléculaire et est évalué à ~3,6 (Ralet *et al.*, 2001b). Le rayon de gyration des pectines, *i.e.* la distance moyenne entre une extrémité de la chaîne et le centre de masse de la chaîne, a été déterminé en chromatographie d'exclusion couplée à une détection laser multiangle. Dans la littérature, selon leur mode de préparation, il est possible de trouver des pectines avec un rayon de gyration d'une vingtaine à une cinquantaine de nanomètres (Corredig *et al.*, 2000; Ralet *et al.*, 2001a).

#### 1.3.2.1. Solubilité

La solubilité des pectines dans l'eau dépend de leur degré de polymérisation, du nombre et de la distribution des groupements méthoxyles et du degré d'ionisation des groupements carboxyles (Thakur *et al.*, 1997). Typiquement, la solubilité augmente avec la diminution du poids moléculaire et l'augmentation du nombre de groupements carboxyles. Dans le cas de solutions diluées, la présence de groupements carboxyles ionisés crée une force de répulsion entre les chaînes de pectines, les chaînes s'individualisent et sont, par conséquent, solubilisées. Pour l'obtention de solutions concentrées, il est nécessaire d'écranter les charges. La solubilité augmente également avec la température.

La poudre de pectines séchée a tendance à s'hydrater rapidement en présence d'eau et à former des agrégats composés de pectines semi-hydratées avec une couche extérieure très hydratée. Ces agrégats se solubilisent lentement. Afin d'obtenir une solution de pectines homogène, il faut éliminer ces agrégats, le meilleur moyen semblant être la filtration (Ousalem *et al.*, 1993).

#### 1.3.2.2. Stabilité

Les pectines sont stables en solution à pH 3-4. A pH inférieur, la dégradation des groupements estérifiés et des chaînes latérales (oses neutres) intervient plus rapidement que la dégradation des HG (Thibault *et al.*, 1993). A l'inverse, à pH alcalin, un phénomène de  $\beta$ -élimination intervient au niveau des liaisons glycosidiques près des unités GalA méthylées et dépolymérise la pectine. Cette dégradation est amplifiée à haute température. La sensibilité à

la  $\beta$ -élimination dépend du DM, les pectines HM étant plus sensibles que les pectines LM puisqu'elles portent plus de groupements méthyles (Morris *et al.*, 2002).

L'étude de la stabilité des gels et des solutions de pectines a montré une diminution de la force du gel ou de la viscosité apparente des solutions en fonction du temps de stockage. Ce phénomène s'amplifie avec l'augmentation de la température et est dû à la dépolymérisation de la pectine (Morris *et al.*, 2010).

#### 1.3.2.3. Viscosité

Les pectines ont des propriétés épaississantes qu'il est possible d'évaluer grâce à leur viscosité intrinsèque. La viscosité intrinsèque reflète le volume hydrodynamique occupé par le polymère dans des conditions de solvant données. Elle dépend des conditions extrinsèques (température, conditions de solvant) et des caractéristiques intrinsèques de la pectine comme sa masse molaire (Hotchkiss *et al.*, 2002). La masse molaire dépend de la méthode d'extraction et de dé-estérification. A même masse molaire, les viscosités intrinsèques des pectines sont aussi influencées par le DM (Yoo *et al.*, 2006).

#### 1.3.2.4. Conformation moléculaire

Si l'on considère l'organisation des pectines comme l'alternance de régions lisses et de régions hérissées, le squelette pectique est constitué d'un polymère de (1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-GalAp (HG) interrompu par des séquences [ $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-GalAp-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ )] (RG I). Le D-GalAp présente un groupement carboxyle en C-6 en position équatoriale. La conformation adoptée est  ${}^4C_1$ . En forme pyranose, le carbone 4 est situé au-dessus du plan formé par les carbones C2, C3, C5 et l'oxygène du pont hémiacétalique tandis que le carbone 1 est en dessous de ce plan. La liaison entre deux GalAp est axiale-axiale. C'est une liaison très rigide. D'après la conformation du dimère de GalAp, des expériences de modélisation moléculaire ont conduit à 4 conformations possibles pour la chaîne HG (Pérez *et al.*, 2000). Le recouplement avec les données expérimentales a permis d'en retenir deux : une conformation en hélice  $2_1$  et une conformation en hélice  $3_1$  (Figure 8).

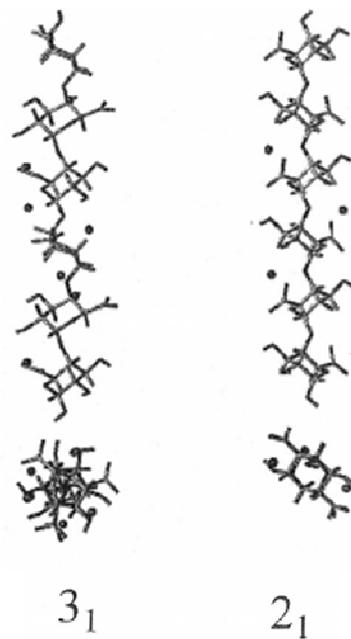


Figure 8 : Conformation des régions HG. D'après Perez *et al.*, 2000.

Ces deux conformations peuvent se lier au calcium selon les expériences de modélisation moléculaire (Perez *et al.*, 2000).

Expérimentalement, ces deux conformations ont été mises en évidence dans les gels de pectates concentrés ( $0,3 \text{ g.mL}^{-1}$ ) en présence de calcium (Jarvis & Apperley, 1995). En solution diluée, une transition conformationnelle a été mise en évidence entre une conformation acide  $3_1$  ( $\text{H}^+$ ) et une conformation plus neutre  $2_1$  ( $\text{Na}^+$  ou  $\text{Ca}^{2+}$ ). Néanmoins, dans un gel de pectates de concentration moindre, les données de modélisation et expérimentales pointent vers une conformation  $2_1$  pour les zones de jonction entre les chaînes (Jarvis & Apperley, 1995; Braccini & Pérez, 2001).

Il a été montré que la conformation hélicoïdale n'était pas modifiée par la méthylation ou l'acétylation de la chaîne (Pérez *et al.*, 2000). Néanmoins, la présence de charges le long de la chaîne augmenterait sa rigidité (Noto *et al.*, 2005). De plus, l'insertion des régions RG I ne provoquerait qu'une perturbation locale et ne modifierait pas l'orientation générale de la chaîne (Cros *et al.*, 1996; Pérez *et al.*, 2000). L'insertion de chaînes latérales n'aurait pas non plus d'incidence sur la conformation globale (Hwang & Kokini, 1992).

#### 1.3.2.5. Gélification

Une propriété remarquable des pectines est leur capacité à former des gels, soit en présence de calcium, soit en milieu acide et en présence de saccharose, selon leur DM. La gélification se définit par l'établissement d'un réseau continu tridimensionnel de molécules de polymère reliées entre elles par des zones de jonction retenant une phase liquide entre les mailles du réseau.

D'un point de vue moléculaire, un gel aqueux se caractérise par trois éléments :

La présence de zones de jonction par lesquelles les molécules de polymère sont liées.

La présence de segments d'inter-jonction relativement mobiles.

La présence d'eau piégée dans le réseau.

Les gels de pectines sont qualifiés de gels physiques car la connectivité entre les éléments structuraux est assurée par des liaisons non-covalentes, en opposition avec les gels chimiques établis par la création de liaisons covalentes. Les gels physiques de polysaccharides sont métastables et certains peuvent être thermo-réversibles. Le nombre, la taille ainsi que la position des liaisons varient avec le temps et la température. Par conséquent, leur gélification est un processus cinétique et le système peut évoluer pendant de nombreuses heures. En général, l'équilibre n'est jamais atteint.

Le passage de l'état de solution à l'état gélifié est un phénomène critique. Pour les pectines, ce passage est modélisé par la théorie de la percolation. La force des gels est caractérisée par la détermination des modules conservatif  $G'$  et de perte  $G''$ . L'augmentation de  $G'$  exprime une amélioration des propriétés mécaniques du gel.

Le mécanisme de gélification des pectines dépend de leur degré de méthylation.

#### 1.3.2.5.1. Gélification des pectines HM

##### Conditions

La gélification des pectines HM nécessite un milieu acide ( $\text{pH} < 3,5$ ) pour que les fonctions carboxyliques ne soient pas dissociées et une teneur élevée en sucres solubles (Thibault & Ralet, 2003a). Le saccharose est typiquement utilisé comme co-soluté à une concentration supérieure à 55% en poids. Le mélange pectine-sucre s'effectue à chaud et la prise en gel intervient lors du refroidissement. Le degré de méthylation de la pectine HM permet de prévoir son comportement de gélification et, notamment le temps de prise (Thibault & Ralet, 2003a).

L'ajout d'une base forte (KOH ou NaOH) à une pectine hautement méthylée conduit à la formation de gel en présence de cations monovalents (Wehr *et al.*, 2004). La description des

mécanismes de gélification en présence d'une base forte sera décrite dans le paragraphe concernant les pectines LM (*cf.* § 1.3.2.5.2).

### Gélification en milieu acide et en présence de sucre

La concentration importante en sucre réduit l'activité de l'eau favorisant les interactions chaîne-chaîne au détriment des interactions chaîne-solvant (Figure 9). Les conditions acides réduisent la dissociation de l'acide carboxylique. La conséquence est une diminution des répulsions électrostatiques entre les chaînes. Le mécanisme proposé pour la gélification des pectines HM est un alignement des hélices moléculaires stabilisé par des liaisons hydrogène entre les carboxyles non dissociés et les groupements alcools secondaires. Des liaisons hydrophobes sont aussi mises en jeu entre les groupements méthyles.

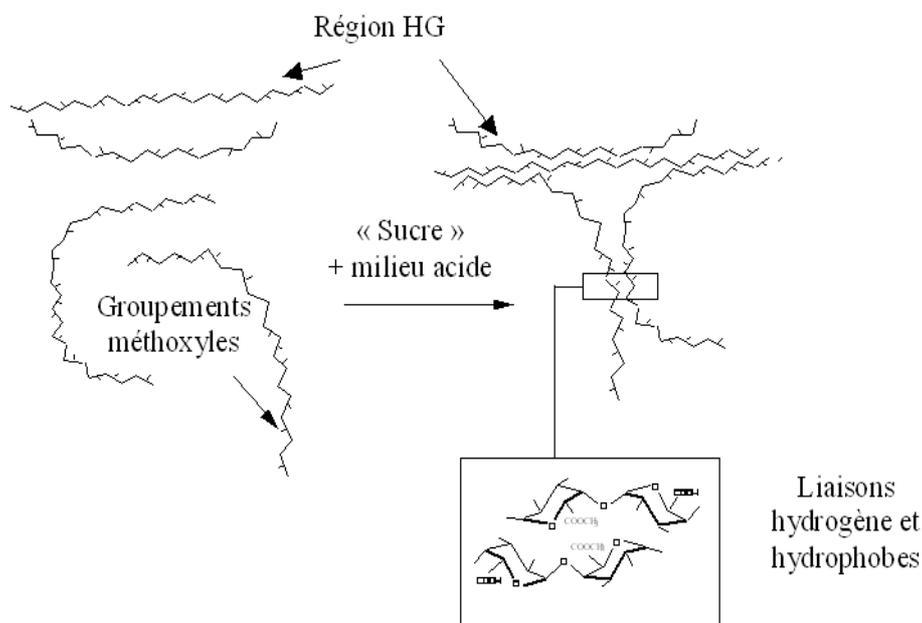


Figure 9 : Schéma du mécanisme de gélification des pectines HM en présence de sucre et en milieu acide.

### Paramètres extrinsèques influençant la gélification des pectines HM

#### - Température et pH de gélification

Le mélange pectine-sucre est réalisé à chaud et la prise en gel intervient lors du refroidissement. Le taux de refroidissement a une incidence sur la cinétique de gélification, mais pas sur les propriétés du gel. La température de gélification dépend du taux

d'estérification pour des DM supérieurs à 70% ainsi que de la concentration en pectines (Neidhart *et al.*, 2003). La diminution du pH en dessous du pKa provoque une augmentation du module conservatif G' et correspond à l'association des chaînes de pectines (Evageliou *et al.*, 2000).

#### Paramètres intrinsèques influençant la gélification des pectines HM

La distribution des groupements méthyles le long de la chaîne, diagnostiquée par le DB, a une forte influence sur la cinétique de gélification (Löfgren *et al.*, 2005). Le temps de gélification des pectines HM (0,75% pectine, 60% saccharose, pH 3) est réduit lorsque le DB est élevé. Le DB induit aussi une différence de comportement du gel vis-à-vis de la présence de calcium et du pH (Löfgren *et al.*, 2005).

#### 1.3.2.5.2. Gélification des pectines LM

La capacité à former des gels en présence d'ions divalents existe pour plusieurs polysaccharides et donne lieu à des applications technologiques. C'est le cas des pectines, mais aussi des alginate (copolymère d'acide  $\beta$ -D-mannuronique et d'acide  $\alpha$ -L-guluronique). Leurs structures ordonnées, chaînes de galacturonates et de guluronates respectivement, génèrent des configurations permettant l'association des chaînes via la présence d'ions divalents impliqués.

#### Conditions

La formation des gels de pectines LM intervient en présence d'ions calcium ou d'autres cations divalents similaires non alimentaires comme  $\text{Cu}^{2+}$  (McKenna *et al.*, 2010) dans des conditions de pH supérieures au pKa. La gélification des pectines LM peut aussi avoir lieu en absence d'ions calcium dans des conditions de pH très bas et très hauts (Gilsenan *et al.*, 2000; Wehr *et al.*, 2004).

#### Mécanisme de gélification en présence d'ions calcium

La gélification des pectines LM intervient par interaction ionique entre les résidus dissociés d'acides galacturoniques non estérifiés et les cations divalents comme le calcium (Figure 10). Les ions calcium établissent des liaisons de coordination entre les groupements carboxylates de deux chaînes pectiques adjacentes. Ces liaisons sont stabilisées par les oxygènes des hydroxyles adjacents.

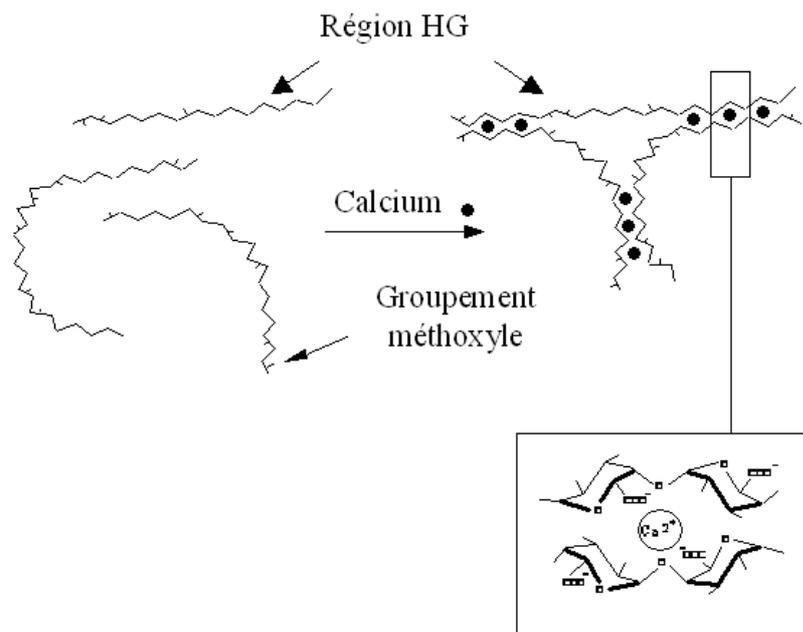


Figure 10 : Schéma de la gélification des pectines LM en présence de calcium.

Le modèle moléculaire pour expliquer la gélification des pectines fait appel au modèle boîte à œufs (egg-box). Ce modèle a été découvert pour la gélification des alginate en présence de calcium. Etant donné que les chaînes de GalA $\alpha$  correspondent à l'image miroir des chaînes d'acides guloniques, ce modèle a ensuite été étendu aux pectines. Mais dans ce modèle, les cavités formées par les chaînes jointes n'ont pas une taille adaptée aux ions calcium : elles sont trop grandes. Ces observations ont donc conduit à la mise en place d'un nouveau modèle « shift egg box » où les chaînes sont décalées d'1,7 Å par rapport au modèle de la boîte à œufs (Braccini & Pérez, 2001). Ce décalage permet la réduction de la cavité initiale qui génère deux sous-cavités symétriques de taille appropriée aux ions calcium (Figure 11). Il crée aussi un réseau intermoléculaire de liaisons hydrogène suggérant qu'elles contribuent à la force du gel. Celles-ci impliquent les carbones 2 et 3 aux faces internes des dimères.

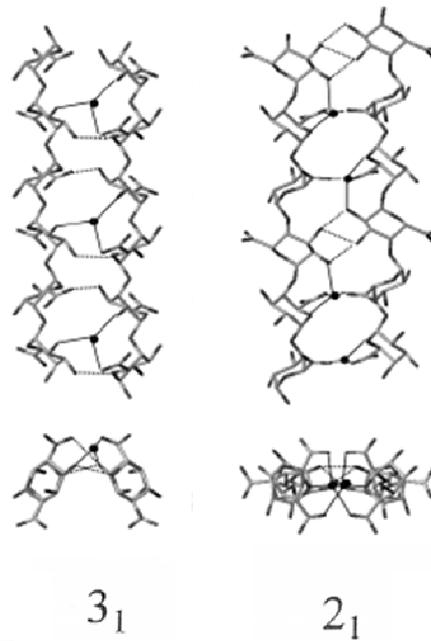


Figure 11 : Représentation en bâton de la meilleure association chaîne de pectines-calcium-chaîne de pectines. D'après Perez, Mazeau *et al.*, 2000.

Le modèle boîte à œufs propose que la formation du gel implique deux étapes : une dimérisation initiale forte en hélice  $2_1$  suivie par une agrégation des dimères liés essentiellement par des liaisons électrostatiques. L'agrégation entre dimères a été mise en évidence, mais elle est moins forte et moins spécifique que la formation des dimères. Les gels calciques de pectates concentrés ( $0,3 \text{ g.mL}^{-1}$ ) sont composés principalement d'une grande proportion d'hélices droites  $2_1$ , mais aussi d'une proportion de pectines en conformation  $3_1$  et d'agrégats hélicoïdaux intermédiaires (Jarvis & Apperley, 1995).

#### Mécanisme de gélification en absence d'ions divalents.

Deux mécanismes ont été mis en évidence, l'un en condition acide et l'autre en condition basique. En condition acide, Gilsenan *et al.* (2000) ont montré qu'il était possible d'observer la gélification d'une solution de pectines LM lors de son refroidissement. Ce phénomène est expliqué grâce à l'établissement de liaisons hydrogène intermoléculaires. En effet, la modification du pH induit un changement de conformation de la chaîne de pectines d'une hélice  $2_1$  vers une hélice  $3_1$ . Cette conformation est beaucoup plus compacte. Une série de liaisons hydrogène intermoléculaires peut alors s'établir entre un hydroxyle et le groupement carboxyle du résidu suivant. D'autre part, la réduction des répulsions

électrostatiques grâce au bas pH permet le rapprochement des chaînes. En condition basique entraînant une dé-estérification, les cations monovalents ( $\text{Na}^+$  ou  $\text{K}^+$ ) induisent la gélification des pectines HM et le temps requis pour la formation du gel dépend de leurs concentrations. Cette gélification s'explique par un effet combiné de dé-estérification des pectines par la base et de l'écrantage des charges négatives par des concentrations importantes d'ions monovalents (Wehr *et al.*, 2004).

#### Paramètres extrinsèques influençant la gélification des pectines LM

##### - Influence de la présence du calcium et de sa concentration

L'augmentation de la concentration en calcium dans une solution de pectines LM permet d'observer successivement une solution aux faibles concentrations, un gel et un gel avec un phénomène de synérèse, i.e exclusion du solvant, aux concentrations les plus élevées. Il a été montré que la mobilité des molécules d'eau et celle des molécules de pectine sont liées à la concentration de l'agent de liaison, donc au calcium (Dobies *et al.*, 2005). La force du gel augmente avec la quantité de calcium (Fraeye *et al.*, 2009). La transition sol-gel observée est décrite par la théorie de la percolation (de Gennes, 1979). La transition rhéologique intervient plus rapidement que la transition visuelle (Garnier *et al.*, 1992). L'évaluation de l'effet du calcium sur des pectines de DM différent s'effectue en calculant le rapport de la concentration en ions calcium à la quantité de fonctions galacturonates,  $R = 2[\text{Ca}^{2+}] / [\text{COO}^-]$  (Garnier *et al.*, 1993; Capel *et al.*, 2006).

L'affinité de la pectine pour le calcium est très élevée et induit une gélification du système même en régime dilué, i.e. lorsque la concentration en polymère (C) est inférieure à la concentration critique d'enchevêtrement ( $C^*$ ) (Garnier *et al.*, 1993). Cette affinité dépend des conditions du milieu. Dans l'eau, l'affinité pour les ions calcium est indépendante de la concentration en polymères. Des phénomènes de coopérativité pour la liaison calcium-pectine (la liaison d'un premier ion facilite la liaison des suivants) sont observés en présence de sels et non dans l'eau (Braudo *et al.*, 1992; Garnier *et al.*, 1994). Dans l'eau, le comportement des polyélectrolytes est anti-coopératif. En effet, la liaison d'un ion divalent diminue le potentiel électrostatique et rend les liaisons suivantes moins aisées. Les ions calcium doivent, dans un premier temps, écranter les charges des chaînes pectiques et, une fois que les répulsions électrostatiques sont minimisées, ils peuvent induire la formation de liaisons inter-chaînes. En présence de NaCl ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ), l'écrantage des charges négatives de la pectine est déjà réalisé, les ions calcium peuvent induire la formation directe de liaisons. Le comportement

coopératif du calcium est perdu dans le cas où la pectine présente des acétyles sur ses régions HG (Renard & Jarvis, 1999b). L'augmentation de la force ionique à un pH neutre et une diminution du DM et de la température abaissent la quantité de calcium nécessaire à la gélification.

- Influence du degré de méthylation et de la répartition des méthyles

Le mélange pectine-calcium évolue de la solution vers le gel, et vers une augmentation de la force du gel avec la diminution du DM (Fraeye *et al.*, 2009). En effet, lorsque le DM diminue, le nombre de séquences suffisamment longues pour former une zone de jonction augmente. Néanmoins, la comparaison des propriétés rhéologiques de pectines avec des degrés de méthylation proches, mais avec différentes répartitions des méthyles a mis en évidence l'importance de ce deuxième paramètre. La répartition des méthyles influence à la fois la gélification pectine-calcium, mais aussi les gels de pectines LM acides (Ström *et al.*, 2007). Les propriétés de gélification présentent une corrélation plus importante avec le DBabs qu'avec le DM. Récemment, l'impact du DBabs sur la structure du gel a été étudié. En présence d'une quantité de calcium suffisante, les pectines avec un haut DBabs génèrent des zones de jonction coopératives, fortes et stables. Ensuite, le réseau se développe lentement et tend vers un état d'équilibre. Les polymères avec des valeurs de DBabs faibles génèrent, dans la plupart des cas, des zones de jonction moins coopératives et plus faibles. Le réseau développé n'est pas stable et évolue. Mais la présence de longues régions dé-méthylées favorise l'établissement d'interactions conférant un caractère plus élastique au gel formé (Ngouémazong *et al.*, 2011). La polydispersité interchaînes de la répartition des méthyles en relation avec le DM n'influence pas les propriétés de liaison du calcium à la pectine (Ralet & Thibault, 2002).

- Influence du degré de polymérisation

La dépolymérisation provoque une diminution de la force du gel. Néanmoins, les effets délétères de la dépolymérisation peuvent être en partie contrebalancés par l'ajout de calcium (Fraeye *et al.*, 2009).

- Influence de la concentration en pectines

L'augmentation de la concentration en pectines pour un rapport stoechiométrique R constant conduit à une augmentation de la force du gel (Fraeye *et al.*, 2009).

#### - Influence des branchements

Récemment, il a été montré que la diminution du taux de branchements d'une pectine (diminution de la teneur en arabinose) conduit en solution diluée à une diminution des propriétés élastiques du gel ainsi que de sa force. Ces résultats suggèrent un rôle des chaînes d'arabinanes dans les propriétés des gels calciques. Elles pourraient contribuer à la stabilité des réseaux de gel calcique et améliorer leurs propriétés élastiques en réduisant la mobilité des chaînes par leur participation aux enchevêtrements (Ngouémazong *et al.*, 2011).

#### - Influence de la présence de co-solutés

A la différence des pectines HM, les co-solutés comme le saccharose ne sont pas nécessaires à la gélification, mais influent sur les propriétés du gel.

Le comportement des pectines LM en présence de calcium et de sucre dépend à la fois des paramètres physico-chimiques du milieu et de la nature du sucre (Grosso & Rao, 1998). Lorsque le pH est supérieur au pKa de la pectine, toute addition de sucre conduit à une altération des propriétés visco-élastiques du gel. En effet, dans ces conditions, la répulsion entre les groupements carboxyles libres est maximale, la conformation de la chaîne est alors très étendue et le sucre ajouté peut interagir avec la pectine. Cette interaction défavorise la formation de dimères de pectines. D'autre part, certains co-solutés comme le sorbitol peuvent complexer le calcium et entrer en compétition avec la pectine. Dans ce cas, plus la capacité du sucre à complexer le calcium est élevée, plus les modules du gel formé seront bas. Dans certains cas, il est possible d'observer une augmentation des modules, comme avec le saccharose. Ce dernier ne peut pas complexer le calcium, mais pourrait stabiliser les zones de jonction en diminuant l'hydratation (Fu & Rao, 2001).

Le mélange de pectines LM et de calcium en présence de co-soluté polymérique, comme la gomme guar ou l'inuline présente un comportement particulier. Dans ces systèmes, une augmentation des modules est observée à haute température dans la solution pré-gel, due à l'augmentation de l'association initiale des chaînes pectiques en dimère. A l'inverse, une diminution des modules est observée lors du refroidissement à faible température, due à la précipitation des pectates de calcium en larges agrégats contribuant peu à la formation du gel (Giannouli *et al.*, 2004a). L'étude de mélanges de pectines LM avec différents co-solutés polymériques a montré une influence de la taille, de la rigidité et du branchement du co-soluté sur le comportement de gélification (Giannouli *et al.*, 2004b).

### 1.3.2.6. Propriétés émulsifiantes

Le rôle d'un agent émulsifiant est de réduire la tension de l'interface d'une émulsion (eau dans l'huile, huile dans l'eau...) pour lui permettre de se diviser en fines gouttelettes et d'être stable. La plupart des polysaccharides ne sont pas considérés comme des émulsifiants. Néanmoins, les pectines peuvent être utilisées comme agent émulsifiant à condition de réduire leurs interactions avec les ions divalents (Mazoyer, 2010). Pour cela, il est possible d'utiliser des pectines de betterave dont le fort taux d'acétylation gêne les interactions avec les ions divalents. Il a aussi été montré que les pectines de *citrus* ou de pomme dépolymérisées jusqu'à un poids moléculaire inférieur à 80 kDa possédaient de bonnes propriétés émulsifiantes avec un taux d'acétylation bas (Mazoyer *et al.*, 1999).

### 1.3.2.7. Interaction avec les protéines

Les pectines peuvent interagir avec les protéines en formant un complexe électrostatique réversible comme par exemple dans le cas pectine-caséine (Redigueri *et al.*, 2007). Dans ce cas, elles peuvent stabiliser sous certaines conditions de pH ( $\text{pH} \approx \text{pI}$  caséine) les émulsions de caséinate de sodium, huile dans l'eau, en augmentant les répulsions stériques et électrostatiques entre les gouttes (Surh *et al.*, 2006). Le pH et la concentration en biopolymères ont une influence sur la stabilité des mélanges.

Dans le cas d'un mélange de pectines et de protéines avec des propriétés de gélification, lorsque l'un des deux biopolymères du mélange gélifie, une compétition cinétique intervient entre la séparation de phase et la gélification. Dans le cas d'un mélange de pectines LM et de protéines dont la gélification peut être induite par la chaleur, il a été montré que le contrôle de la gélification est influencé par la concentration de chacun des biopolymères et la présence ou non de calcium et de sodium (Donato *et al.*, 2005a; Donato *et al.*, 2005b).

Dans les produits alimentaires, les pectines peuvent être en contact avec différents composés azotés comme les acides aminés et les protéines. De nombreuses modifications chimiques peuvent avoir lieu entre ces composés lors de la fabrication des produits alimentaires, en particulier dans le cas d'un traitement thermique : amidation, saponification des groupements esters, hydrolyse des liaisons glycosidiques ou décarboxylation du groupement carboxyle libre. La réaction d'amidation peut avoir lieu à température ambiante et induit une diminution du degré de méthylation (Kratchanova *et al.*, 2004).

L'étude des interactions intervenant entre les pectines et les protéines présente aussi un intérêt pour la modélisation de la paroi. En effet, la paroi végétale est composée de protéines comme les extensines. Des analogies ont été mises en évidence avec les intégrines, présentes chez l'animal, qui permettent le maintien des cellules dans la matrice extra-cellulaire. Ce rôle pourrait être transposé aux extensines chez les végétaux. Une interaction a été mise en évidence entre une protéine modèle mimant une extensine et les pectines (MacDougall *et al.*, 2001).

#### 1.3.2.8. Interaction avec les ions métalliques

Les pectines ont des propriétés d'échangeur d'ions. Leur capacité à complexer les ions métalliques est liée au nombre d'acides galacturoniques libres présents sur les pectines (Castaldi *et al.*, 2010) ainsi qu'à la nature de l'ion métallique. Une échelle de sélectivité a pu être mise en évidence pour les cations divalents sur des pectines de *citrus* (DM 54%) et de betterave (DM 58%). L'ordre déterminé est le suivant :  $\text{Cu}^{2+} \approx \text{Pb}^{2+} \gg \text{Zn}^{2+} > \text{Cd}^{2+} \approx \text{Ni}^{2+} \geq \text{Ca}^{2+}$  (Dronnet *et al.*, 1996). La présence d'ions peut permettre la gélification des pectines selon la nature de l'ion et le DM de la pectine. Wellner *et al.* (1998) ont montré en utilisant la spectroscopie infrarouge l'existence d'interactions entre les pectates et les ions  $\text{K}^+$  et  $\text{Mg}^{2+}$ , même si aucun gel n'est formé. A l'inverse, des interactions fortes et une gélification ont été observées entre  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  et les pectines faiblement méthylées et les pectates. Pour les pectines moyennement méthylées (DM 59, 1%), la formation de complexes et de gels s'effectue en présence de  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  et  $\text{Pb}^{2+}$  (Wellner *et al.*, 1998). Dans le cas des pectines hautement méthylées (DM > 90%),  $\text{Pb}^{2+}$  et  $\text{Cu}^{2+}$  continuent à se lier, mais la formation de gel n'est observée que dans le cas du cuivre. L'hypothèse formulée est que, dans le cas de  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  et  $\text{Pb}^{2+}$ , les zones de jonction seraient constituées de plusieurs GalA libres. Dans le cas du cuivre, Wellner *et al.* (1998) ont montré que la gélification s'effectuait avec 6% de GalA libres. La distribution statistique des GalA libres suggère ainsi l'existence de zones de jonction formées par un seul  $\text{Cu}^{2+}$ . La pectine présente une affinité plus importante pour le cuivre que pour le calcium. Par ailleurs, la comparaison de gels réalisés en présence de différents ions ( $\text{Al}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ) a montré que les gels formés en présence de calcium possédaient une capacité d'hydratation plus forte (McKenna *et al.*, 2010).

### 1.3.2.9. Interaction pectine-pectine

Il a été montré que le comportement d'une solution pectine-pectine en régime très dilué ( $0,8-0,16 \text{ g.L}^{-1}$ ) dépendait fortement de leur degré d'estérification respectif. Dans le cas d'un mélange de pectines de DM proches dans une solution de NaCl ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ), les interactions électrostatiques sont répulsives, tandis qu'un comportement attractif est observé pour des pectines de degrés de méthylation différents (Migliori *et al.*, 2010).

### 1.3.2.10. Modulation des propriétés des pectines

#### 1.3.2.10.1. Amidation

Une dé-estérification des pectines HM en présence d'ammoniaque en suspension alcoolique permet de convertir les groupements méthoxyles en groupements amide primaire ( $-\text{CONH}_2$ ). Les pectines faiblement méthylées et amidées assurent un meilleur contrôle des propriétés physiques en présence de calcium. Les facteurs influençant la réaction d'amidation sont le type de chaîne alkyle de l'amine, la basicité du composé aminé (dépend du pH du milieu réactionnel), la polarité du milieu réactionnel et la température de réaction (Kratchanova *et al.*, 2004). Les pectines LM amidées présentent une cinétique de gélification proche des pectines LM classiques. Néanmoins, la présence des groupements amides permet la gélification des pectines LM à pH acide inférieur à 3 (Capel *et al.*, 2006).

#### 1.3.2.10.2. Méthylation

Les propriétés de gélification sont liées à la proportion et à la distribution des méthyles présents le long de la chaîne de pectines. Il est possible de méthyler les régions HG de façon chimique pour étudier leur rôle dans les propriétés de la pectine (Renard & Jarvis, 1999a; Ralet *et al.*, 2005b). La plupart des procédés de méthylation entraîne une diminution de la masse molaire sans atteindre une méthylation maximale (Rosenbohm *et al.*, 2003).

#### 1.3.2.10.3. Réduction

La réduction des groupements méthyles par du borohydrure de sodium ( $\text{NaBH}_4$ ) en alcools primaires en présence d'acides libres permet de développer les propriétés de gélification des pectines HM (Rosenbohm *et al.*, 2003). En effet, la transformation des galacturonates en galactose permet d'améliorer les propriétés de gélification des pectines HM en réduisant la quantité de sucre à apporter.

#### 1.3.2.10.4. Ajout d'un polymère gélifiant

##### 1.3.2.10.4.1. Gélification du mélange pectines LM-alginates

Les alginates et les pectines forment des gels synergiques à bas pH sous des conditions telles que ni l'un, ni l'autre ne puissent gélifier seul : absence de calcium et haute activité en eau. Le fait que le pKa des chaînes pectiques et des alginates soit compris entre 3,4 et 3,7 indique que les chaînes doivent être partiellement protonées avant l'interaction. La présence de méthyles permet de réduire les répulsions électrostatiques. L'interaction synergique peut être décrite comme une association entre des blocs d'acides guluroniques et des régions méthylestérifiées des pectines assemblées comme un ruban rigide. La composition de la pectine et de l'alginate influence les propriétés du gel. Un mélange de pectines HM et d'alginates riches en acide guluronique gélifie sous la forme d'un gel fort avec un point de fusion élevé, tandis qu'un mélange d'alginates riches en acide mannuronique et de pectines LM gélifiera sous forme d'un gel faible avec un point de fusion bas (Walkenström *et al.*, 2003).

##### 1.3.2.10.4.2. Gélification du mélange pectine HM-gélatine

L'interaction pectine-gélatine dépend du ratio entre les deux polymères. Des interactions électrostatiques entre la pectine et la gélatine peuvent se former dans certaines conditions. A forte concentration en pectine, une séparation de phase apparaît et perturbe le réseau du système mixte. Néanmoins, l'utilisation de pectines peut permettre de renforcer les gels de gélatine (Liu *et al.*, 2007b).

### 1.3.3. Applications

La consommation annuelle mondiale de pectines peut être estimée à 45 000 tonnes et représente un marché d'une valeur approximative de 400 millions d'euros. Ces chiffres s'expliquent par le fait que les pectines sont un des composants majeurs de la paroi cellulaire végétale et, par conséquent, dans un régime occidental moyen, 4-5 g de pectines sont consommés par jour.

### 1.3.3.1. Utilisation dans l'industrie agro-alimentaire

Les pectines sont un ingrédient à haute valeur ajoutée largement utilisé par l'industrie alimentaire. Elles sont considérées par la FDA (Food and Drug Administration) comme GRAS (Generally Regarded As Safe) et répertoriées dans l'Union Européenne sous le code : E440.

#### 1.3.3.1.1. Les pectines HM

Les propriétés de gélification des pectines HM en milieu acide et en présence de sucre sont employées dans différents produits agro-alimentaires. Elles sont utilisées pour gélifier les confitures. Leur ajout peut permettre de diminuer les quantités de sucres ajoutées et de préparer ainsi des confitures allégées en sucre (Gajar & Badrie, 2002). Les pectines sont aussi employées comme stabilisant dans les boissons lactières acidifiées et les yaourts. Les pectines HM permettent d'éviter les problèmes de sédimentation causés par la floculation des protéines de lait. Cet effet serait dû à l'adsorption des pectines sur la surface des agrégats de caséines induisant une répulsion entre ces agrégats (Jensen *et al.*, 2010). La modulation du degré de méthylation des pectines HM ainsi que leurs pH d'utilisation permet leur emploi dans différentes productions (Tableau 2).

Degré de méthylation	pH	Temps de prise	Nom commercial	Applications
74-77%	3,1-3,4	1-3 minutes	Ultra-Rapid Set	Confiture de fruits entiers Produits laitiers acides
71-74%	3,0-3,3	3-7 minutes	Rapid Set	Confiture classique
66-69%	2,8-3,1	15-25 minutes	Medium Set	Confiture acide (framboise) Confiserie Confiture acide à très acide
58-65%	2,6-2,9	30-120 minutes	Slow set	(cassis) Gelées

Tableau 2 : Les utilisations des pectines HM dans l'industrie agro-alimentaire en fonction de leur DM (Thibault & Ralet, 2003).

En confiserie, les pectines permettent également de confectionner des pâtes de fruits avec l'ajout ou non de gélatine. Les pectines HM peuvent être employées pour remplacer les matières grasses dans les gâteaux (Min *et al.*, 2010).

#### 1.3.3.1.2. Les pectines LM

Les pectines LM sont employées pour leurs propriétés de gélification en présence de calcium. Elles permettent de confectionner des confitures allégées en sucres et, dans le cas des confitures avec des morceaux de fruits, assurer une répartition homogène de ces derniers.

Elles peuvent être utilisées avec d'autres agents stabilisants et gélifiants comme les carraghénanes, par exemple dans l'amélioration des caractéristiques sensorielles des produits alimentaires allégés en matières grasses comme les produits à base de viandes ou les pâtisseries (Candogan & Kolsarici, 2003; Liu *et al.*, 2007a; Min *et al.*, 2010).

Les pectines LM améliorent la texture des produits laitiers comme les yaourts, les crèmes desserts ou les crèmes employées pour le remplissage des pâtisseries. Les pectines LM amidées sont aussi ajoutées aux préparations destinées à réaliser des nappages ou des glaçages.

#### 1.3.3.2. Utilisation des pectines dans l'industrie pharmaceutique

Les pectines ont été longtemps utilisées par l'industrie pharmaceutique comme agent colloïdal et anti-diarrhéique. En effet, les pectines sont des fibres alimentaires car elles ne sont pas hydrolysables par les enzymes humaines. La teneur en pectines d'une fibre est importante pour ses propriétés diététiques (Guillon *et al.*, 1998). Les pectines se classent parmi les fibres solubles et, à ce titre, peuvent contribuer à abaisser le taux de cholestérol sanguin et à ralentir l'absorption intestinale des nutriments en épaississant le bol alimentaire.

Les préparations pharmaceutiques emploient aussi les pectines pour leurs propriétés émulsifiantes dans le but d'améliorer la disponibilité du principe actif.

Les pectines HM de pommes ont ainsi été testées pour réaliser des nano-émulsions avec un médicament modèle faiblement soluble dans l'eau (l'itraconazole). La présence de pectines diminue la taille des gouttes et augmente la biodisponibilité du médicament (Burapapadh *et al.*, 2010).

Une autre application des pectines dans les préparations pharmaceutiques est de permettre une libération du principe actif ciblée temporellement et spatialement (Drug delivery). Différents systèmes ont été mis au point pour différentes administrations du principe

actif. Dans le cas d'une administration orale, les pectines sont employées pour protéger le principe actif le long du tractus gastro-intestinal et le libérer dans le colon. En effet, les pectines sont dégradées spécifiquement par la flore du colon (Ni & Yates, 2002). Pour cette application, les pectines peuvent être modifiées chimiquement ou mélangées à un polymère hydrophobe, puis gélifiées sous forme de billes. Ces traitements permettent d'améliorer le contrôle de la libération du principe actif (Das & Ng, 2010; Pinto, 2010).

Dans le cas d'une administration nasale, l'utilisation de pectines permet d'augmenter le temps de présence du principe actif dans la cavité nasale (PecSys<sup>TM</sup> d'Archimedes). Une solution de pectines contenant le principe actif est libérée sous forme de petites gouttes dans la cavité nasale. La pectine interagit avec les mucines de la muqueuse nasale, un contact étroit s'établit alors entre la pectine et la couche de mucus (Liu *et al.*, 2007c). De plus, les ions calcium contenus dans la muqueuse nasale amènent la pectine à former une fine couche de gel. Le principe actif est donc retenu au contact de la muqueuse nasale et, par conséquent, absorbé de façon rapide, mais contrôlée. Cette technologie permet de s'affranchir des problèmes d'égouttement ou d'avalement de la solution médicamenteuse rencontrés avec les vaporisateurs nasaux classiques. Une des indications est le traitement de l'accès douloureux transitoire lié à différents cancers (Portenoy *et al.*, 2010).

Dans le cas d'une administration transcutanée, les formulations à base de pectines favoriseraient l'adsorption sur la peau du principe actif (Liu *et al.*, 2007c). Dans le cadre de la lutte anti-malaria, des essais ont été conduits chez le rat pour l'administration de chloroquine par voie transcutanée grâce à des patchs réalisés à partir de pectines amidées (Musabayane *et al.*, 2003).

D'autres applications sont possibles pour la pectine dans l'industrie pharmaceutique. Les gels de pectines peuvent servir de matrice pour la création de biominéraux, définis comme des agglomérats de cristaux distribués à l'intérieur d'une matrice organique principalement composée de polysaccharides et de protéines. La minéralisation apparaît spontanément en présence d'une quantité adéquate de calcium et de phosphate et se manifeste par un dépôt de phosphate de calcium. La présence des groupements COO<sup>-</sup> de la pectine stimule la liaison de cations à partir de la solution vers le substrat. L'élaboration de microsphères injectables composées de pectines et de phosphate de calcium a été réalisée pour servir de support dans le cadre d'une régénération osseuse (Munarin *et al.*, 2010).

## **2. Les pectines méthylestérases**

Les pectines méthylestérases (PME, E.C. 3.1.1.11) sont des enzymes classées dans la famille 8 des carbohydrates estérases (CE 8) de la classification CAZy. Elles catalysent l'hydrolyse des méthyles estérifiés sur certains groupements carboxyles des acides galacturoniques en méthanol et en protons. La découverte de ces enzymes a été effectuée par l'industrie des *citrus*. En effet, les PME sont responsables de la clarification indésirable des jus de fruits.

Les PME sont des enzymes ubiquitaires chez toutes les plantes supérieures. Elles ont été mises en évidence dans tous les organes : fruits, feuilles, tiges, fleurs et racines. Les PME sont le plus souvent associées à la paroi végétale par des interactions ioniques et sont ainsi extraites grâce à une forte force ionique ou un décalage du pH vers la région alcaline (de Assis *et al.*, 2002). Néanmoins, des formes solubles ont aussi été découvertes. Les PME sont aussi produites par les micro-organismes phytopathogènes (champignons et bactéries) et symbiotiques lors de leurs interactions avec la plante. Les PME ont également été mises en évidence chez certaines levures dont les levures méthylotrophes et chez certains insectes phytophages (Nakagawa *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 2005).

### **2.1. Caractéristiques structurales et catalytiques**

#### **2.1.1. Propriétés physico-chimiques**

Les PME sont des enzymes de taille moyenne avec une masse molaire comprise entre 25 et 54 kDa. Elles sont actives sous forme de monomères. Les PME d'origine eucaryotique peuvent être glycosylées via l'azote de l'asparagine ou l'oxygène de la sérine ou de la thréonine. Néanmoins, seul un petit nombre de PME glycosylées a été découvert chez les plantes comme le kiwi (Ciardiello *et al.*, 2004) et chez les champignons comme *Aspergillus aculeatus* (Christgau *et al.*, 1996). La glycosylation ne semble pas avoir d'influence sur l'activité de la PME. En revanche, elle pourrait avoir un rôle dans la spécificité du substrat (Warren *et al.*, 2002).

Le point isoélectrique (pI) des PME varie de 3,1 pour une PME fongique à 11 pour une PME de tomate. La plupart des PME purifiées issues de plantes présentent un pI neutre ou alcalin expliquant leur localisation dans la cellule. Les PME avec un pI neutre ou légèrement acide ne sont pas liées à la paroi, tandis que les PME avec un pI alcalin se lient à la paroi qui

est faiblement acide (Ciardiello *et al.*, 2004). Chez une même espèce, il est possible de rencontrer des PME avec une gamme de pI importante. Par exemple, on note chez le lin, l'existence de trois groupes de PME de pI différents : neutre (pI = 7-7,5), basique modéré (pI = 8,5), très basique (pI > 9,5) (Lacoux *et al.*, 2003; Al-Qsous *et al.*, 2004). Quelques PME végétales avec un pI acide ont aussi été mises en évidence. La plupart des PME bactériennes et fongiques ont, quant à elles, un pI acide.

#### 2.1.1.1. Structure primaire

De nombreuses PME végétales et microbiennes ont été séquencées. La comparaison de la séquence en acides aminés de 127 PME d'origines diverses a permis de mettre en évidence l'existence de cinq segments ayant des fortes similarités représentant les motifs caractéristiques de la famille des PME ainsi que six résidus strictement conservés (trois glycines, un acide aspartique, une arginine, et un tryptophane) et plusieurs résidus aromatiques très conservés (Markovic & Janecek, 2004). Malgré cela, les PME de plantes, bactériennes et fongiques présentent des différences. L'alignement de ces séquences a aussi permis de classer les PME en dix groupes phylogénétiques distincts. Les PME végétales sont divisées en huit groupes tandis que les PME bactériennes et fongiques appartiennent à deux groupes distincts.

#### 2.1.1.2. Structures secondaire et tertiaire

Jenkins *et al.* (2001) ont établi la première structure tridimensionnelle d'une PME. La PME d'*Erwinia chrysanthemi* a été exprimée chez *Bacillus subtilis* à partir du gène *PmeA* et a été étudiée en cristallographie après purification. Cette caractérisation a été suivie par la découverte de la structure de deux PME végétales (tomate et carotte) en cristallographie (Johansson *et al.*, 2002; D'Avino *et al.*, 2003).

Chacune des trois enzymes présente la même superstructure secondaire. Elles sont caractérisées par une hélice  $\beta$  de pas à droite à trois feuillets (Figure 12 A et B). Chaque côté de l'hélice  $\beta$  est constitué de trois feuillets  $\beta$  parallèles : PB1, PB2, PB3 (Figure 12 A : PB1 en marron, PB2 en vert, PB3 en jaune) liés par des boucles : T1, T2, T3 (Figure 12 B) sortant de la structure de l'hélice. Cette hélice est aussi présente chez d'autres enzymes pectinolytiques : pectate lyase, pectine lyase, polygalacturonase et rhamnogalacturonase. La PME d'*E. chrysanthemi* possède une hélice  $\alpha$  à l'extrémité N-terminale de l'hélice  $\beta$  (Jenkins *et al.*, 2001).

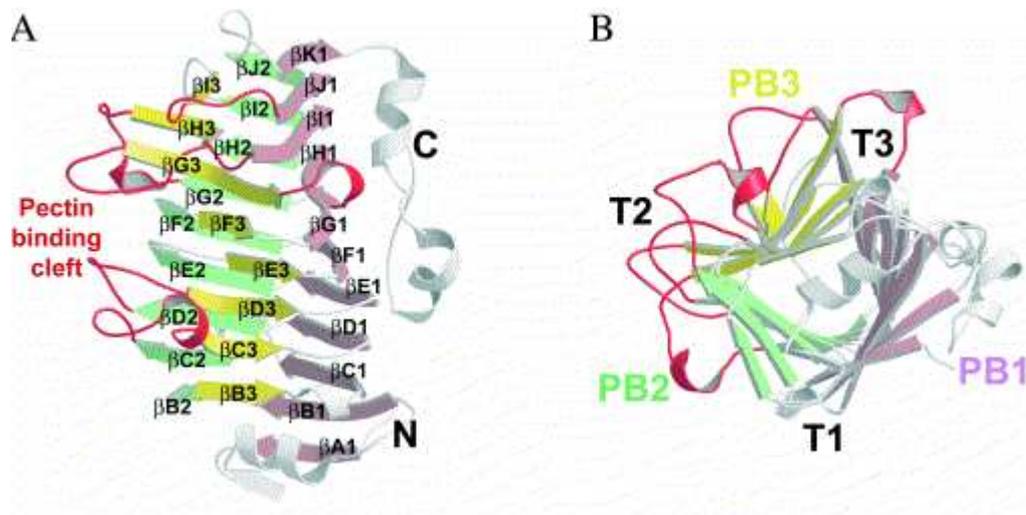


Figure 12 : (A) Structure de la PME de carotte, (B) vue de la structure de la PME tournée à 90° selon l'axe x représenté vers l'extrémité N terminale. D'après Johansson *et al.*, 2002.

L'espace à l'intérieur de l'hélice  $\beta$  est essentiellement hydrophobe. La présence de cette hélice  $\beta$  conférerait une résistance à la pression (Dirix *et al.*, 2005). Un pont disulfure a été mis en évidence chez la PME d'*E.chrysanthemi* (Jenkins *et al.*, 2001). Le site de liaison à la pectine est situé dans une faille peu profonde formée par les boucles extérieures (Figure 12 A en rouge) et accessible au solvant. La partie centrale de la faille est formée par plusieurs résidus aromatiques (tyrosine, phénylalanine et tryptophane, Figure 13A partie orange). C'est une caractéristique des sites de liaisons aux oligo- et polysaccharides. Une molécule de pectine dans une conformation hélice  $2_1$  peut entrer dans cette faille ; les esters de méthyles pointent dans différentes directions pour des résidus d'acides galacturoniques successifs. Cette faille contient aussi des acides aminés conservés : deux Asp (Figure 13 B : D136, D157), deux Gln (Figure 13 B : Q113, Q135) et une Arg (Figure 13 B : R225) qui constituent le site actif (Figure 13 B). Cette séquence est différente de celle rencontrée chez la plupart des estérases dont le site actif est constitué d'une triade catalytique Serine-Histidine-Acide Aspartique (Jenkins *et al.*, 2001).

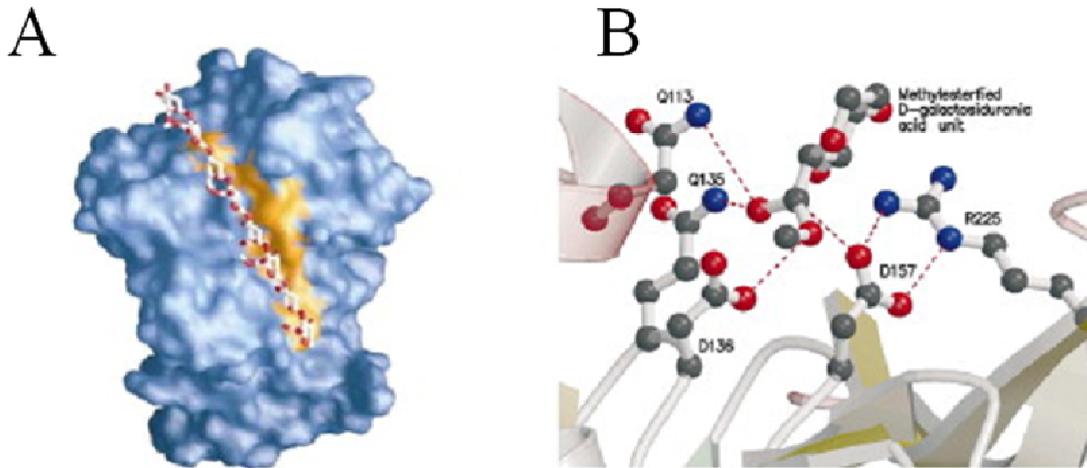


Figure 13 : (A) Représentation de la surface de la PME de carotte présentant la faille permettant la liaison à une chaîne de pectines modélisée dans une conformation proche d'une hélice  $2_1$ . (B) Représentation du site actif avec une molécule de substrat modèle. D'après Jolie *et al.*, 2010.

Le repliement des PME végétales et fongiques est proche. La différence entre les deux se situe dans la profondeur de la faille (Figure 14) : les bords de la faille sont plus hauts pour la PME d'origine bactérienne (Johansson *et al.*, 2002; D'Avino *et al.*, 2003).

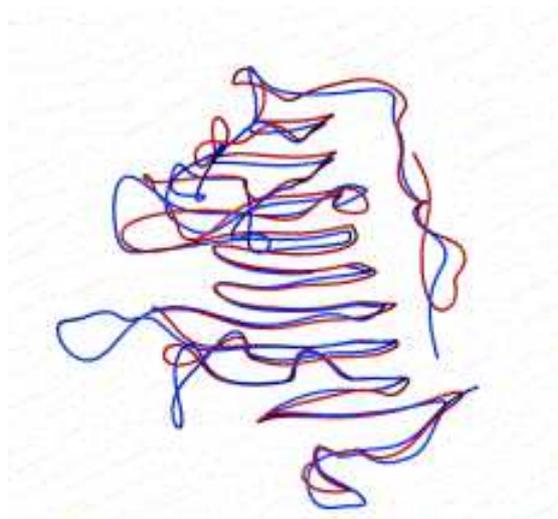


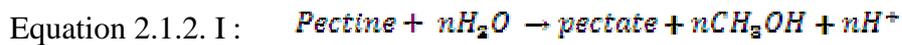
Figure 14 : Superposition de deux PME, la PME de carotte en rouge et celle *d'E. chrysanthemi* en bleu. D'après Johansson *et al.*, 2002.

Les PME sont typiquement des enzymes monomériques et ne présentent pas, par conséquent, de structure quaternaire. Néanmoins, il est possible de les rencontrer sous forme de complexe

en association avec une activité pectine lyase ou polygalacturonase chez certaines bactéries du genre *Clostridium* (Van Rijssel *et al.*, 1993).

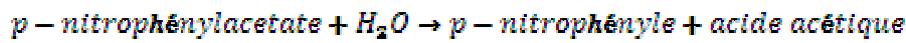
### 2.1.2. Activité catalytique des PME

Les pectines méthylestérases catalysent la réaction suivante :



Les PME présentent une forte spécificité pour les chaînes  $\alpha$ -(1→4)-D-galacturonanes, avec une préférence pour les chaînes de faible poids moléculaire avec 91% de GalA méthylés (Schombirg & Salzmann, 1991). Leur action est plus rapide sur les liaisons esters adjacentes aux carboxyles libres. Certaines PME comme celle du soja peuvent aussi catalyser la dé-estérification du p-nitrophénylacétate (équation 2.1.2 II). Ce substrat artificiel est alors utilisé pour doser l'activité PME (Nari *et al.*, 1991) :

Equation 2.1.2 II :



(Schombirg & Salzmann, 1991)

Les PME sont inhibées de façon non spécifique par différentes catégories d'inhibiteurs: des ions métalliques lourds ( $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ...), des sels ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NaN}_3$ ), des détergents (SDS, EDTA...), des sucres (glucose, saccharose...) (Schombirg & Salzmann, 1991).

#### 2.1.2.1. Mécanisme d'action

Un mécanisme d'action a été proposé pour les PME végétales et bactériennes (Figure 15) (Johansson *et al.*, 2002; Fries *et al.*, 2007).

Un acide aspartique active l'ester de méthyle par une liaison hydrogène avec l'oxygène du groupement ester.

Un second acide aspartique via son groupement carboxylate chargé négativement réalise une attaque nucléophile sur le carbone de l'ester. Cette attaque génère un intermédiaire tétrahédral avec une charge négative sur l'oxygène. Cet intermédiaire est stabilisé par une chaîne latérale de glutamine et un acide aspartique dans le cas d'*E. chrysanthemi* (Fries *et al.*, 2007) ou deux chaînes latérales de glutamine chez les PME végétales (Johansson *et al.*, 2002).

Le premier résidu d'acide aspartique intervient alors en tant que donneur de proton. La protonation du groupe partant permet de libérer le méthanol et génère un intermédiaire anhydre.

Puis, ce même résidu extrait un proton à partir d'une molécule d'eau par son groupement carboxylate. Cette extraction catalyse l'hydrolyse de la liaison entre l'anhydre et le premier acide aspartique. Le site actif retrouve ainsi son état initial et l'acide galacturonique est dé-méthylé.

Grâce aux acides aminés aromatiques, la chaîne HG reste dans la faille et l'enzyme peut glisser le long de la chaîne de pectines.

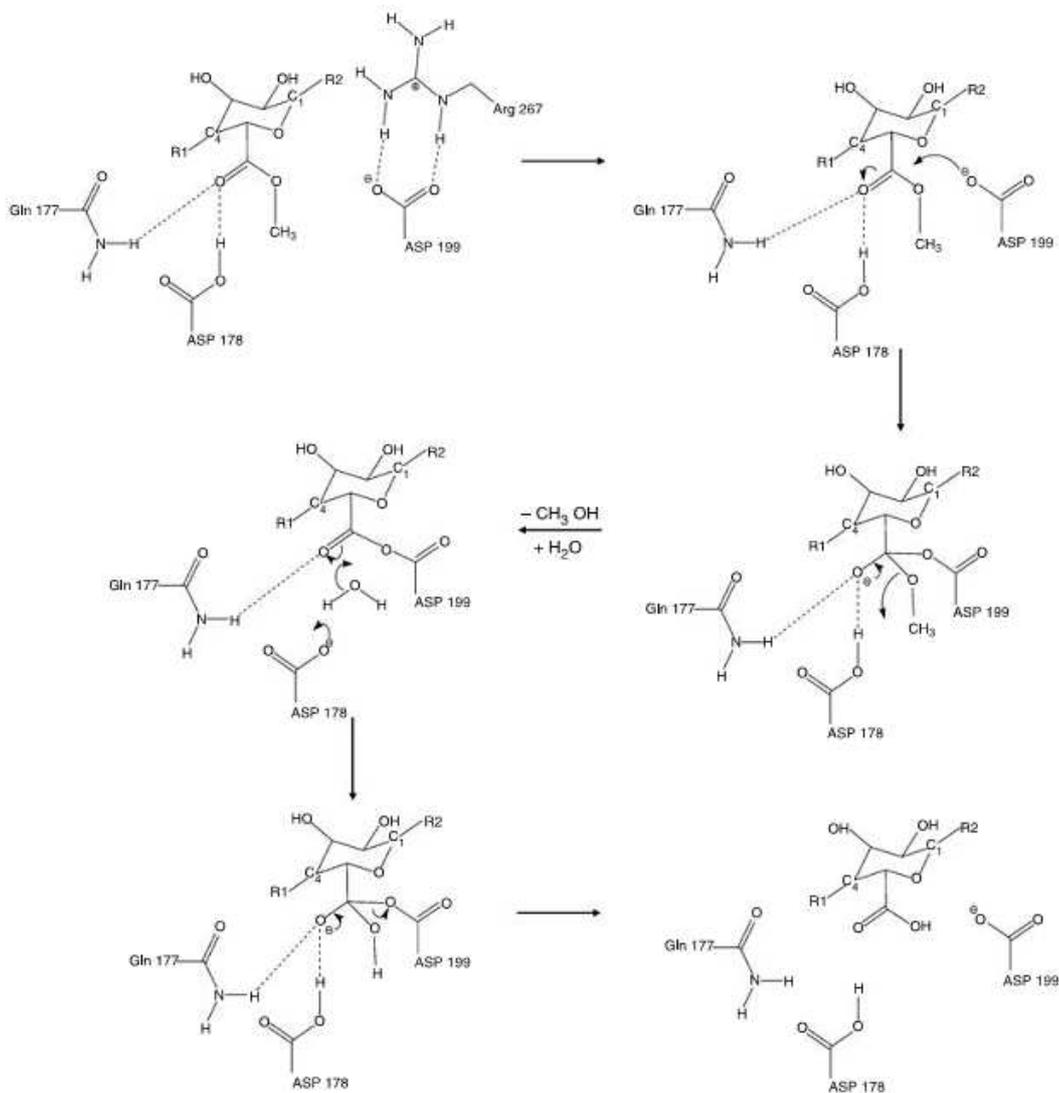


Figure 15 : Mécanisme catalytique proposé. D'après Fries *et al.*, 2007.

La spécificité de la liaison a été étudiée chez *E. chrysanthemi*. Il a été montré que la présence d'un acide galacturonique libre précédant le site actif était indispensable à la fixation de l'enzyme. La dé-estérification s'effectue dans un sens particulier, elle a lieu du côté réducteur d'un acide galacturonique libre.

#### 2.1.2.2. Mode d'action des PME

A la différence d'une dé-méthylation chimique qui conduit à une distribution aléatoire des méthyles résiduels, l'action des PME conduit à une distribution plus ordonnée.

Trois différents modes d'action ont été décrits selon la distribution intrachaîne et interchaîne finale (Grasdalen *et al.*, 1996; Denès *et al.*, 2000) :

Mécanisme de chaîne simple (single-chain mechanism) et d'attaques multiples (multiple-attack mechanism) : la PME retire tous les esters de méthyles contigus d'une seule chaîne de pectines, puis se dissocie du substrat. Ce mécanisme conduit à une répartition en blocs sur une partie de la population de pectines.

Mécanisme de chaînes multiples (multiple-chain mechanism) et attaque simple (single-attack) : la PME catalyse une seule réaction avant de se dissocier. Ce mécanisme conduit à une répartition aléatoire des GalA dé-méthylés sur toute la population de pectines.

Mécanisme de chaînes multiples et d'attaques multiples : la PME retire un nombre limité d'esters de méthyles avant dissociation du complexe enzyme-substrat. Le nombre d'évènements catalytiques avant la dissociation est appelé degré d'attaque ou de processivité, *p*. Ce mécanisme conduit à une distribution des GalA dé-méthylés en blocs plus ou moins longs selon le degré d'attaque sur toute la population de pectines.

En plus de ces trois mécanismes, un mécanisme supplémentaire a été postulé : le mécanisme de chaîne simple et d'attaque simple, mais il n'a pas été mis en évidence.

Le mode d'action de chaque PME dépend de son origine, mais aussi du pH, du DM initial de la pectine et de son poids moléculaire (Tanhatan-Nasseri *et al.*, 2011). Les interactions salines ou électrostatiques et le pH jouent un rôle fondamental dans le contrôle de l'activité des PME en modulant à la fois le nombre et la distribution des carboxyles libres et estérifiés. Le mode d'action des PME végétales est plutôt de type chaîne simple - attaques multiples (Grasdalen *et al.*, 1996; Massiot *et al.*, 1997; Catoire *et al.*, 1998; Ralet *et al.*, 2001b; Ralet & Thibault, 2002) (cf. § 2.1.2) et aboutit donc à une répartition en bloc des méthyles résiduels, tandis que les PME fongiques ont plutôt un mode d'action de chaînes multiples – attaques multiples, qui

aboutit à une répartition plus aléatoire des méthyles résiduels (Massiot *et al.*, 1997; Ralet *et al.*, 2001b) (cf. § 2.1.2).

## **2.2. Les PME végétales**

### **2.2.1. Diversité**

Chez les plantes, les PME sont présentes dans différents tissus et organes végétaux et forment une famille multigénique d'isoenzymes. Le séquençage du génome d'*Arabidopsis thaliana* a permis d'identifier 66 ORF (Open Reading Frame) codant pour des PME putatives (Micheli, 2001). Chez *Populus trichocarpa*, 89 ORF ont été identifiés. Le nombre de PME putatives identifiées pourrait être mis en relation avec la proportion d'homogalacturonanes présente dans la plante. En effet, chez le riz (*Oryza sativa*), où cette proportion est faible, 35 ORF ont été mis en évidence. Le séquençage d'autres monocotylédones (maïs) et gymnospermes (pin) va permettre de fournir les différences entre ces deux classes et des informations sur le rôle des PME chez les gymnospermes (Pelloux *et al.*, 2007).

La diversité des PME est très importante au sein d'une même plante. Chez l'orange, de nombreuses PME ont été isolées et caractérisées (Savary *et al.*, 2002; Cameron *et al.*, 2003; Cameron *et al.*, 2005). Les PME ont d'abord été classées selon leur thermostabilité, puis selon la dépendance de leur activité à la présence de sels. Le type I a un caractère sel-indépendant, tandis que le type II est sel-dépendant. Les PME de type I sont synthétisées spécifiquement dans les fruits tandis que les PME de type II sont synthétisées de façon ubiquitaire dans les tissus végétatifs. La PME 2 est l'isoforme la plus abondante dans les extraits de *citrus*. C'est une PME thermolabile de type I. Cette enzyme a été identifiée comme étant la PME d'orange Valencia commerciale (Savary *et al.*, 2002). L'étude du mode de dé-méthylation des PME 2 à 4 en RMN a montré que ces 3 enzymes avaient un mode de dé-méthylation en blocs (Lee *et al.*, 2008).

### **2.2.2. Structure**

Les PME végétales sont appelées pré-pro-protéines. La région pré ou peptide signal est nécessaire pour l'adressage de la protéine dans le réticulum endoplasmique. La région pro est une extension N-terminale de longueur variable et présentant des variations en acides

aminés d'une isoforme à l'autre (Markovic & Janecek, 2004). La région pro peut posséder un domaine de liaison à un inhibiteur de PME (PMEI, cf. § 2.2.3.3).

Les PME végétales sont codées par deux types de gènes (Figure 16), classés en fonction de la présence de la région pro (Type) et de la présence d'un domaine PMEI (Groupe) (Micheli, 2001; Pelloux *et al.*, 2007) :

- Type I/Groupe 2 : présence de 2 à 3 introns et d'une longue région pro contenant 1 à 3 domaines PMEI.
- Type II/Groupe 1 : présence de 5 à 6 introns et d'une région pro courte sans domaine PMEI ; structure proche des gènes de PME identifiées chez les phytopathogènes.

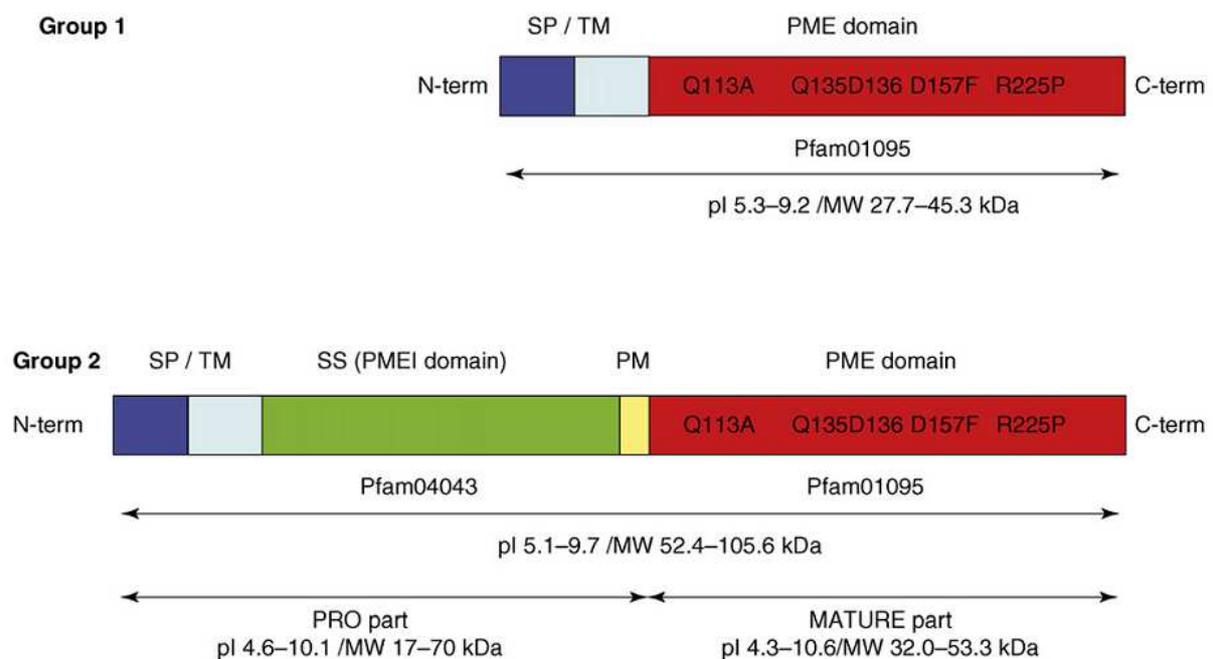


Figure 16 : Structure des gènes de PME végétales. D'après Pelloux *et al.*, 2007.

La pro PME est sécrétée dans l'apoplasme via le cis, le médial et le trans Golgi. Or, seule la protéine mature est extraite de la paroi. Le clivage de la région pro doit intervenir avant ou après la sécrétion dans l'apoplasme. Le rôle de la région pro n'est pas encore déterminé. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées (Pelloux *et al.*, 2007) :

- Un rôle dans la fonction biologique des PME.
- L'adressage de la PME à travers la paroi cellulaire.

- Un rôle de chaperonne intermoléculaire (repliement conformationnel de la partie mature de la PME comme inhibiteur de l'activité enzymatique pendant la sécrétion dans l'apoplasme pour éviter une dé-méthylation trop précoce des pectines (Bosch *et al.*, 2005).

### 2.2.3. Rôle physiologique des PME végétales

Les PME sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques notamment dans la croissance et le développement de la plante ainsi que dans ses défenses. Leur principal rôle est de remodeler la pectine *in muro*. Leur action peut produire deux effets opposés (Micheli, 2001) :

Une dé-méthylation en blocs génère des longueurs de groupements carboxyles libres qui interagissent avec le calcium induisant une gélification des régions homogalacturoniques, et donc un renforcement de la paroi. Par exemple, chez le lin, il a été montré une forte expression d'un gène codant pour une PME (Lupme5) après l'élongation cellulaire (Al-Qsous *et al.*, 2004).

A l'inverse, une dé-méthylation aléatoire entraîne une augmentation de la sensibilité des pectines aux pectinases endogènes et exogènes à cause, d'une part, de la répartition des méthyles et, d'autre part, du relargage de protons qui activent les pectinases (van Alebeek *et al.*, 2003). L'effet observé est alors un relâchement de la paroi.

L'activité des PME modifie également le pH de la paroi. Le pH pourrait être impliqué dans la régulation de l'activité des PME en activant ou inhibant les différentes isoformes. Par exemple, trois isoformes de PME cohabitent avec différents pH et différentes sensibilités aux ions et différents  $V_{\max}$  et  $K_m$  chez l'hypocotyle de haricot (Bordenave *et al.*, 1996).

#### 2.2.3.1. La croissance et le développement des plantes

La méthylestérification des pectines joue un rôle crucial dans le développement de la plante. Le DM est maximal pendant l'expansion de la cellule et diminue quand l'élongation cellulaire cesse. Les pectines possèdent des caractéristiques particulières, notamment liées à leur capacité à lier les cations dont le calcium. Celui-ci contribue à l'intégrité de la matrice pectique en liant deux chaînes homogalacturonanes pour former une zone de jonction. Le nombre de résidus GalA libres consécutifs nécessaires à ces zones dépend de la concentration

en calcium et de la structure des pectines. Or, les PME ont un impact direct sur la quantité d'acides galacturoniques libres.

La croissance de la paroi cellulaire induit une diminution de la concentration locale en protons (augmentation du pH) due à une diminution du potentiel électrostatique de la paroi (Moustacas *et al.*, 1991). En effet, l'incorporation de pectines néosynthétisées méthylées, et donc plus neutres, diminue la densité de charge de la paroi. Cette augmentation de pH peut activer les PME. Celles-ci restaurent le potentiel électrostatique initial. Ce phénomène est amplifié par un apport d'ions métalliques, lié à leur affinité pour la matrice polyanionique. En effet, l'arrivée d'ions métalliques comme le calcium va augmenter la dissociation des complexes PME-pectines. L'augmentation de la concentration en ions métalliques et en protons active les enzymes de relâchement de la paroi. De plus, l'apparente inhibition de la PME par les hautes concentrations en ions peut être considérée comme un mécanisme empêchant le potentiel électrostatique d'être trop élevé. Différentes études ont montré l'influence des PME sur la croissance des plantes. Chez le tremble, il a été montré que les PME étaient impliquées dans le contrôle de la croissance des cellules du bois et, par conséquent, dans le contrôle de la longueur et de la largeur des fibres de bois (Siedlecka *et al.*, 2008). L'inhibition partielle de l'expression d'une PME ubiquitaire chez la pomme de terre (*Solanum tuberosum*) affecte la croissance de la plante, la polarité de croissance de ses feuilles et la répartition des ions dans la paroi (Pilling *et al.*, 2004).

Les PME jouent également un rôle dans la croissance et le développement des racines. L'expression des PME est corrélée spatialement et temporellement avec le détachement des cellules de la coiffe. En effet, l'inhibition partielle de l'expression d'un gène de PME empêche le détachement normal des cellules de la racine chez le pois (Wen *et al.*, 1999). Une implication dans la croissance de l'hypocotyle et celle du tube polinique a aussi été montrée (Bosch *et al.*, 2005). Les PME interviennent aussi dans le développement des différents tissus. Elles ont un rôle dans le développement du grain de pollen (Bosch *et al.*, 2005; Francis *et al.*, 2006), la maturation des fruits (Brummell *et al.*, 2004), la différenciation des cellules cambiales (Guglielmino *et al.*, 1997b) ainsi que dans la germination de la graine (Ren & Kermode, 2000).

#### 2.2.3.2. Interaction avec les micro-organismes et les virus

Les PME peuvent avoir une implication dans la phase d'invasion des virus phytopathogènes. Lors de l'infection par le virus de la mosaïque du tabac (TMV), la

transmission du virus cellule à cellule n'est possible que si la protéine de mouvement du TMV (TMV MP) se lie à une PME ubiquitaire (Chen *et al.*, 2000). En effet, le retrait de la séquence de liaison n'empêche pas la réplication et l'assemblage du virus, mais ne permet plus à la TMV MP d'augmenter la perméabilité du plasmodesme et donc, la transmission à la cellule voisine. Cette PME est aussi reconnue par le virus de la mosaïque du navet et du chou-fleur.

Mais les PME ont aussi un rôle de défense contre les virus phytopathogènes.

Il a été montré que les PME pouvaient avoir un rôle dans le « RNA Silencing », un mécanisme de défense contre les virus (Dorokhov *et al.*, 2006). L'extinction post-transcriptionnelle de gène (Posttranscriptional gene silencing) ou ARN interférant (RNAi, RNA interference) est un mécanisme de régulation des gènes spécifiques d'une séquence. Il comprend l'extinction des gènes induits par les virus (VIGS, virus-induced gene silencing) et l'extinction des gènes transgéniques (TIGS, transgene induced gene silencing).

Les PME pourraient aussi être impliquées dans l'établissement des relations symbiotiques entre la plante et la bactérie symbiotique notamment au niveau de la formation des nodules (Lievens *et al.*, 2002; Rodríguez-Llorente *et al.*, 2004).

#### 2.2.3.3. Contrôle de l'activité des PME végétales

L'activité PME est contrôlée au sein de la plante de façon spatiale et temporelle, selon le niveau de croissance et de différenciation de la cellule. Chez le peuplier, Guglielmino *et al.* (1997) ont montré que les PME sont absentes de la paroi des cellules cambiales et de leurs premières cellules-filles. Mais la synthèse des PME existe car elles sont détectées au niveau des dictyosomes. En fait, l'exocytose des PME n'a lieu que lors du premier processus de différenciation cellulaire. Un autre exemple du contrôle de l'activité des PME est la régulation saisonnière de la croissance chez le peuplier. L'arrêt de la croissance en saison de repos est associé à un remplacement d'une PME neutre par une PME alcaline. L'inverse se produit en saison active (Guglielmino *et al.*, 1997a). Certaines PME sont exprimées à des stades de développement particuliers comme le mûrissement des fruits, la germination du grain de pollen ou l'élongation de la tige. Chez le lin, la PME codée par le gène *Lupme* n'est active que chez les tissus vasculaires jeunes et indifférenciés et non dans les tiges matures (Lacoux *et al.*, 2003).

En plus du rôle possible de la région pro (*cf.* § 2.3.1.1.), la régulation de l'activité des PME est assurée par des inhibiteurs protéiques : les Pectin Methylesterase Inhibitor (PMEI). Chez le kiwi (*Actinidia chinensis*), une protéine de 152 acides aminés inhibant une PME

végétale a été isolée (Balestrieri *et al.*, 1990). Les PMEI inhibent les PME végétales en formant un complexe non covalent (stœchiométrie 1:1) (Di Matteo *et al.*, 2005). L'inhibition a lieu par recouvrement de la faille par le PMEI empêchant l'interaction avec le substrat. Mais les PMEI sont inefficaces sur les PME produites par les organismes fongiques et bactériens car elles possèdent une boucle extérieure qui empêche le rapprochement du PMEI (Jolie *et al.*, 2010). Certaines PME végétales ne sont pas inhibées par les PMEI, une PME d'*A. thaliana* possède un brin  $\beta$  qui pourrait empêcher la fixation de l'inhibiteur (Dedeurwaerder *et al.*, 2009).

Malgré cela, les PMEI auraient un rôle de défense contre les micro-organismes phytopathogènes en influençant la sensibilité de la paroi à la dégradation. En effet, les plantes surexprimant les PMEI sont plus résistantes aux infections (Lionetti *et al.*, 2007).

#### **2.2.4. Paramètres influençant l'activité catalytique des PME végétales**

L'activité des PME végétales est influencée par les paramètres environnementaux. Ces PME ont un mode d'action chaîne simple - attaques multiples. Ce mode d'action peut être modulé d'une isoforme à une autre (Kim *et al.*, 2005) ainsi que par les paramètres environnementaux.

##### **2.2.4.1. La température**

La thermostabilité des PME est très variable. D'une part, elle varie avec l'origine de la PME : L'isoforme PME-2 de kaki est thermostable jusqu'à 80°C (Alonso *et al.*, 1997). D'autre part, chez un même organisme et dans un même tissu, il est possible d'identifier des PME de thermostabilités et de températures optimales très différentes. Chez l'orange, plusieurs isoformes de PME ont été isolées. La PME 1 est plus active à 30°C, tandis que la PME 3 thermostable présente une activité optimale à 4°C (Cameron *et al.*, 1998). Les pectinesterases I et II sont inactivées respectivement à 70°C et 60°C tandis que pour inactiver la pectinesterase de haut poids moléculaire, une température de 90°C est requise (Versteeg *et al.*, 1980). De plus, les PME peuvent rester actives même à très faible température et même si leur activité de dé-estérification diminue fortement. Il a été montré que la PME de tomate est encore active à -18°C. En effet, les PME peuvent modifier la texture des fruits et des légumes congelés à -20°C s'ils n'ont pas été préalablement blanchis (Terefe *et al.*, 2009).

#### 2.2.4.2. Les inhibiteurs

Les PME végétales sont inhibées par les inhibiteurs classiques de l'activité enzymatique, comme les PME fongiques (cf. § 2.1.2). De façon plus spécifique, les PME végétales sont inhibées par différentes molécules issues du métabolisme secondaire de la plante : les catéchines et notamment l'épigallocatechine, sont des inhibiteurs compétitifs de nombreuses PME végétales (Lewis *et al.*, 2008). Elles sont aussi inhibées par les produits de leur action de façon compétitive par exemple, par l'acide galacturonique. Cette inhibition chez la PME de pomme dépend du DM de la pectine utilisée comme substrat et du pH du milieu réactionnel si l'on compare le  $K_m$  et le  $K_m$  apparent obtenus pour différentes conditions (Macdonald & Evans, 1996) (Tableau 3).

<i>pH</i>	<i>NaCl</i> (M)	$k_m$ ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Apparent $k_m^a$ ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )
<i>62% DE pectin</i>			
5.0	0.2	172	397
5.0	0.4	1030	1038
7.0	0.2	123	125
<i>36% DE pectin</i>			
5.0	0.2	40	109
5.0	0.4	182	258
7.0	0.2	44	76

Tableau 3 : Evolution du  $K_m$  de la PME de pomme en fonction de la force ionique, du pH et du DM d'une pectine de pomme ainsi qu'en présence d'un inhibiteur compétitif l'acide polygalacturonique.

Le  $K_m$  apparent correspond à l'activité en présence d'acide polygalacturique (Macdonald & Evans, 1996).

Les PME végétales peuvent aussi être inhibées par un inhibiteur protéique spécifique PMEI (cf. § 2.2.3.3) (Jolie *et al.*, 2010). L'action des PMEI inter-espèces est variable selon l'origine des PME. Le PMEI de kiwi permet d'inhiber de façon compétitive la PME de carotte et du kiwi et, de façon non compétitive, la PME de banane et de fraise (Balestrieri *et al.*, 1990; Ly-Nguyen *et al.*, 2004).

#### 2.2.4.3. Le degré de méthylation initial de la pectine

L'action des PME végétales nécessite la présence de résidus GalA libres pour réaliser une dé-estérification processive. Le DM initial peut influencer les paramètres catalytiques de la PME selon son origine.

Une augmentation du  $V_{\max}$  peut être observée avec la diminution du DM (Seymour *et al.*, 1991). Pour la PME 4 de l'orange, l'affinité augmente lorsque le degré de méthylation augmente ( $K_m = 0,7 \text{ mg.mL}^{-1}$  pour DM 70% et  $K_m = 17 \text{ mg.mL}^{-1}$  pour DM 25%) (Christensen *et al.*, 1998). A l'inverse, la PME de pomme à pH 5 et une concentration en NaCl de  $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$  conduisent une diminution de l'affinité lorsque le DM augmente (Tableau 3) (Macdonald & Evans, 1996). Ce tableau met aussi en évidence une modification de l'affinité en fonction du pH (Tableau 3).

D'autre part, une influence du degré de méthylation initial sur le mode d'action de la PME a aussi été mise en évidence. Chez la PME d'orange, il a été montré que le mode de dé-méthylation en blocs ne débutait qu'après un certain taux de dé-méthylation. L'hypothèse émise est que la PME doit disposer d'une certaine taille de bloc du côté non-réducteur de la chaîne, pour se lier étroitement au substrat et effectuer une dé-méthylation en blocs vers l'extrémité réductrice (Limberg *et al.*, 2000). Récemment, il a été montré que le DM initial de pectines pouvait moduler le mode d'action des PME (Tanhatan-Nasseri *et al.*, 2011).

#### 2.2.4.4. Influence du pH

Les PME sont sensibles à leur environnement ionique. Leur stabilité dépend de la source de l'enzyme. La gamme de pH couverte par toutes les PME s'étend de pH 1 à pH 10. Le pH optimal des PME varie beaucoup : il est de neutre à alcalin pour la plupart des PME végétales et bactériennes. D'après cette constatation, une PME végétale alcaline doit être faiblement active à pH acide à cause des fortes interactions entre l'enzyme chargée positivement et les carboxyles libres issus de la réaction de dé-méthylation. À l'inverse, à pH basique, la PME alcaline doit être libérée du substrat grâce aux répulsions entre les groupements carboxyles libres et l'enzyme chargée négativement.

Une modification dans le mécanisme d'action interchaîne a été mise en évidence chez le haricot mungo (Catoire *et al.*, 1998) et la pomme (Denès *et al.*, 2000) lors de la modification du pH. A pH alcalin (7,5 ou 7,6), les PME agissent selon un mécanisme simple chaîne, tandis qu'à pH acide (4,5 ou 5,6) le mécanisme suivi est de type chaînes multiples

avec un degré de processivité supérieur ou égal à 10. Chez la pomme et le haricot mungo, la distribution intrachaîne des méthyles n'est pas modifiée (Denès *et al.*, 2000). L'influence du pH a aussi été étudiée pour la PME 2 extraite de l'orange Valencia (Cameron *et al.*, 2008). Suite à l'action de la PME jusqu'à différents DM, les pectines sont dégradées pendant un temps très court par l'endoPG, puis la distribution des oligomères est tracée et ajustée avec un modèle mathématique pour déterminer le mécanisme d'action. En considérant la distribution des oligosaccharides de faible poids moléculaire, une influence du pH semblable à celle observée chez la pomme est déterminée. A pH acide (4,5), l'action peut être décrite par un mécanisme d'attaques multiples avec un degré de processivité  $p = 1$  alors qu'à pH légèrement alcalin (7,5), le degré de processivité augmente à  $p = 10$ . Mais lorsque l'on considère les fragments de haut poids moléculaire, c'est un mécanisme simple chaîne qui est mis en évidence. Pour expliquer ces observations, un modèle a été proposé par les auteurs (Cameron *et al.*, 2008) : il est basé sur la ré-association de la PME à de petites régions précédemment dé-méthylées. L'augmentation du degré de processivité serait liée à des liaisons successives de la PME sur ces régions (Cameron *et al.*, 2008).

A partir des pectines obtenues lors de cette étude à pH 7,5 et à pH 4,5, la détermination du nombre moyen de blocs par molécule et leur taille moyenne a été réalisée. Pour un DM final de 70%, à pH 7,5, le nombre moyen de blocs par molécule est de 2 avec une taille moyenne de 10,2 résidus tandis qu'à pH 4,5, il est de 3,6 avec une taille de 5,3 résidus. Par conséquent, la capacité des pectines à gélifier en présence de calcium dépendra du pH d'incubation avec la PME. En effet, pour favoriser les propriétés de gélification, il faut un nombre de blocs moyen compris entre 2 et 4 couplé à une taille de bloc supérieure ou égale à 8. La présence d'un nombre minimum de GalA consécutifs libres est nécessaire. Une taille de bloc de 6 à 13 serait suffisante pour permettre l'interaction avec le calcium et constitue la plus petite zone de jonction stable possible (Luzio & Cameron, 2008).

La modification du mode d'action en fonction du pH semble dépendre de l'isoforme de PME considérée, chez l'orange Valencia, la PME 3 conserve son degré d'attaque à pH 4, 5 et 7, 5 (Cameron *et al.*, 2011). Une dépendance peut être également notée vis-à-vis de la source de la PME étudiée, en effet, la PME de tomate présente le même mécanisme à pH 4,5 et 8 (Duvetter *et al.*, 2006).

D'autre part, chez l'orange (var.Valencia) où il existe 4 isoformes de PME, il a été montré que le pH avait une influence sur le taux de dé-méthylation (Cameron *et al.*, 2005). Le DM atteint après 25h d'action est différent en fonction du pH pour les 4 isoformes. Pour cela, le DM a été

mesuré à pH 4,5 et 7,5. Le DM à pH 7,5 est inférieur à celui à pH 4,5 pour les 4 isoformes (Cameron *et al.*, 2005).

#### 2.2.4.5. Influence des cations

Les cations affectent la catalyse de la PME. Pour la plupart des PME végétales, la présence de cations est indispensable à leur activité (PME « salt-dependent »). Néanmoins, pour certaines PME, la présence de cations influence l'activité, mais n'est pas indispensable (« salt-independent »). Chez l'orange, les PME peuvent être classées en fonction de leur dépendance aux sels. La PME 2 ne nécessite pas la présence de cations pour son activité alors que l'activité de la PME 4 est conditionnée à la présence de cations. La PME 3 ne nécessite pas la présence de cation pour son activité, sa dépendance au pH et aux sels est intermédiaire comparée aux PME thermolabiles PME 2 et 4 (Savary *et al.*, 2002; Cameron *et al.*, 2003; Cameron *et al.*, 2005).

Typiquement, l'activité de la PME augmente avec la concentration en sel jusqu'à une concentration limite au-delà de laquelle l'activité diminue. L'activation de la réaction par les cations s'explique par une interaction entre les cations et le substrat plutôt qu'entre les cations et la PME (Nari *et al.*, 1991).

Les cations, aussi bien cations métalliques que polyamines, entreraient en compétition avec les enzymes chargées positivement pour l'interaction avec les groupements carboxyles libres de la pectine et déplaceraient ainsi la PME d'une forme inactive à une forme active. Les PME présentent une affinité pour les GalA libres qui inhibent leur action, l'acide polygalacturonique étant un inhibiteur compétitif des PME. L'augmentation de l'activité de la PME en présence de cations peut donc s'expliquer par une augmentation de sa constante de dissociation avec le produit de la réaction (Moustacas *et al.*, 1991). L'inhibition provoquée par les fortes concentrations en cations peut s'expliquer par le fait que de fortes concentrations sont susceptibles de masquer les groupements carboxyles libres alors que la présence de ces groupements à proximité des groupements estérifiés est nécessaire pour l'action de la PME végétale. L'effet des cations sur les PME végétales dépend de leur nature. La PME d'acerola subit une baisse d'activité en présence de magnésium tandis que la présence de sodium, de potassium ou de calcium augmente son activité (de Assis *et al.*, 2002). De plus, il a été montré que la présence de cations lors de la dé-méthylation avait une influence sur le mode d'action des PME végétales. La mesure du DBabs lors de l'action de la PME d'orange en présence de calcium, conduit à l'élaboration de blocs plus courts qu'en l'absence de calcium (Slavov *et al.*, 2009). Ces observations ont été confirmées en

électrophorèse capillaire (Vincent *et al.*, 2009). L'hypothèse avancée pour cette réduction de la taille des blocs est développée en 2.4.2.

## **2.3. Les PME fongiques**

### **2.3.1. Structure**

Les gènes codant pour les PME bactériennes et fongiques sont souvent inductibles et le plus souvent organisés en opéron avec d'autres gènes codant pour la dégradation des pectines et ne contiennent pas de région Pro.

### **2.3.2. Rôle des PME fongiques**

Les chaînes latérales des pectines ainsi que les méthylestérifications réduisent l'accessibilité à la chaîne principale pour les enzymes issues des micro-organismes phytopathogènes. En effet, il a été montré que l'augmentation du DM causée par une surexpression des inhibiteurs de PME chez *A. thaliana* limite l'infection par le champignon *Botrytis cinerea* (Lionetti *et al.*, 2007). Les organismes phytopathogènes doivent impérativement passer la paroi végétale pour envahir la plante. Ce phénomène est possible lors de cassures occasionnelles ou lorsque le micro-organisme dispose d'outils enzymatiques pour dégrader la paroi. Les PME fongiques augmentent les chances de succès de l'infection en augmentant le taux de dégradation des pectines. Les PME peuvent être un facteur de virulence. Chez *Phytophthora capsici* (oomycète ou champignon vrai), un gène de PME (*pcpme6*) a été identifié dans une bibliothèque génomique d'une souche hautement virulente (Feng *et al.*, 2010). Les mutations au site actif de la PME affectent son activité et sa virulence. Certains pathogènes ne présentant pas d'activité PME ont la capacité d'induire l'expression transitoire d'une PME de l'hôte. Chez *A.thaliana*, *Pectobacterium carotovorum* induit l'expression d'une PME végétale (*pme3*) lors de l'infection. Cette PME est nécessaire à la colonisation initiale des tissus de l'hôte (Raiola *et al.*, 2011).

### **2.3.3. Régulation de l'expression des PME**

La production de PME est souvent inductible. La transcription du gène codant pour la PME chez *Aspergillus niger* est induite par la présence de pectines et d'acides

polygalacturoniques et est réprimée en présence de glucose (Williamson *et al.*, 1998). A l'inverse, certaines PME sont produites de façon constitutive, ce qui montre leur importance dans le métabolisme de certains champignons (Reignault *et al.*, 1994).

Alors que les PME fongiques dé-estérifient de l'extrémité réductrice vers l'extrémité non réductrice, une activité de dé-méthylation de l'extrémité non réductrice vers la réductrice a été montrée dans une préparation d'endoPG provenant d'*Aspergillus niger* (Williams & Benen, 2002).

#### **2.3.4. Paramètres influençant l'activité catalytique des PME fongiques**

Les PME fongiques ont un mode d'action chaînes multiples - attaques multiples. Ce mécanisme génère des blocs courts de GalA dé-estérifiés distribués sur toute la population de chaînes (Fraeye *et al.*, 2007). Par exemple, la PME d'*Aspergillus aculeatus* suit ce mode d'action à pH 4,5 à 30°C en présence d'acétate de sodium. Le degré d'attaque de la PME d'*A.aculeatus* est plus faible que celui des PME végétales.

##### 2.3.4.1. Température

La température optimale des PME fongiques est située entre 30 et 45°C. Il a été montré que cette température était influencée par les conditions environnementales. La pectine méthylestérase PME I d'*Aspergillus aculeatus* a été exprimée chez *Aspergillus oryzae* (Christgau *et al.*, 1996). Cette PME présente 74% d'identité avec celle d'*Aspergillus niger*. Une augmentation de la thermostabilité est montrée en présence de sels à pH 5 (50°C) et à pH 7 (55°C) (Plaza *et al.*, 2008). D'autre part, l'augmentation de la pression augmente la thermostabilité de cette PME. L'application d'une pression de 200 MPa augmente la température de dénaturation au dessus de 60°C (Dirix *et al.*, 2005). Son activité optimale est observée à une pression de 200-300 MPa et une température de 45-55°C (Fraeye *et al.*, 2007). La PME d'*A.aculeatus* présente une activité importante à haute pression, et pourrait être employée pour minimiser les dégâts des hautes pressions sur les fruits lors de leur transformation.

##### 2.3.4.2. Inhibiteurs

La PME d'une souche d'*Aspergillus niger* est inhibée par les produits de son action de façon compétitive par GalA et de façon non compétitive par le méthanol (Maldonado *et al.*, 1994).

Cette sensibilité aux produits de réaction dépend des enzymes. En effet la PME d'*Aspergillus aculeatus* n'est sensible ni au méthanol, ni à GalA (Christgau *et al.*, 1996). Les PME fongiques sont aussi inhibées par les inhibiteurs généraux donnés précédemment (2.1.2). Mais de façon plus spécifique, les PME peuvent être inhibées par des molécules végétales : les acides gallique et coumarique. Ce sont des inhibiteurs mixtes (liaison à la PME et au complexe PME-pectine) de la PME chez *Saccharomyces cerevisiae* (Chen *et al.*, 2009). Les PME fongiques sont insensibles aux PMEI (Duvetter *et al.*, 2005).

#### 2.3.4.3. Le degré de méthylation initial des pectines et le pH réactionnel

Le pH optimal des PME fongiques est plutôt acide à neutre. L'action de la PME fongique sur la pectine ne nécessite pas la présence d'acides galacturoniques libres. En effet, il a été montré que la PME d'*Aspergillus niger* pouvait agir sur des oligogalacturoniques entièrement méthylestérifiés (Massiot *et al.*, 1997).

#### 2.3.4.4. Cations

D'une part, la présence de cations comme le calcium ou le sodium conduisent à une augmentation de l'activité de la PME (Maldonado *et al.*, 1994; Christgau *et al.*, 1996). D'autre part, certains cations comme le magnésium diminuent l'activité (Maldonado *et al.*, 1994). Il a aussi été montré que le mode d'action de la PME fongique était modifié en présence de calcium. Dans le cas de son action sur une pectine HM, la PME d'*A.aculeatus* génère des blocs de GalA libres plus longs que lors de son action sur la même pectine en solution (Slavov *et al.*, 2009).

## **2.4. Impact de l'action des PME sur la gélification des pectines**

La dé-estérification par les PME fongiques ou végétales ne modifie pas le poids moléculaire des pectines à l'inverse de la dé-estérification chimique. Par conséquent, les propriétés de gélification sont améliorées pour un DM équivalent. En effet, un gel formé à partir de pectines modifiées par une PME végétale (orange Valencia) conduit à un gel 10 fois plus fort en présence de calcium que celui obtenu à partir de pectines dé-estérifiées de façon alcaline à un DM équivalent (Hunter *et al.*, 2006).

Les pectines générées suite à l'action d'une PME végétale gélifient en présence de calcium à des DM supérieurs à 50%, par exemple, 67% (Slavov *et al.*, 2009). Cette

observation a conduit à s'interroger sur la taille minimum requise en GalA libres consécutifs pour permettre l'établissement d'une liaison stable via le calcium. Une taille de bloc comprise entre 6 et 10 GalA libres consécutifs a été proposée (Luzio & Cameron, 2008).

Pour permettre la formation d'un réseau, il est nécessaire que chaque molécule contienne un nombre de blocs supérieur ou égal à deux (Figure 17, A), ou encore un bloc assez grand pour permettre l'établissement d'une interaction avec deux autres blocs appartenant à deux chaînes pectiques différentes (Figure 17, B). D'autre part, il est aussi nécessaire qu'une partie des molécules possèdent 3 blocs ou plus pour permettre la formation du réseau tri-dimensionnel (Figure 17, C). Dans le cas des molécules ne contenant qu'un seul bloc (Figure 17, D), elles peuvent être incorporées au gel et former des chaînes terminales. Dans le cas où elles représentent une large proportion du mélange, la formation du gel sera difficile. Afin que la gélification ait lieu, il faut qu'il y a un nombre de bloc suffisant et d'une longueur assez importante. Pour que la gélification ait lieu à un DM élevé, il faut donc supposer que les PME ont généré un nombre suffisant de blocs assez longs (Luzio & Cameron, 2008).

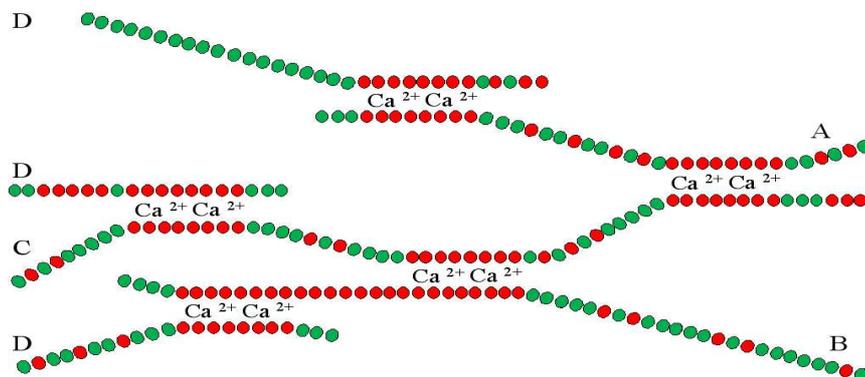


Figure 17 : Schéma des liaisons possibles entre les chaînes homogalacturonanes partiellement déméthylées. D'après Luzio & Cameron (2008).

(A) Chaîne de pectine comportant deux blocs, (B) Chaîne de pectine comportant un bloc de GalA très long, (C) Chaîne de pectine comportant trois blocs de GalA, (D) Chaîne de pectine comportant un bloc de GalA

L'apparition de nouvelles propriétés rhéologiques par l'action de PME dépend de la gamme de diminution du DM de la pectine. En effet, l'augmentation du nombre d'acides

galacturoniques contigus améliore l'affinité de la pectine pour le calcium et influence les propriétés physiques du mélange pectine-calcium (Lee *et al.*, 2008). Néanmoins le degré de méthylation initial ainsi que l'amplitude de la modification doivent être considérés. Il a été montré que la modification du DM entre 37 et 45% par les PME de *citrus* ne modifie pas les propriétés visco-élastiques du mélange de ces pectines avec le calcium (Lee *et al.*, 2008).

L'étude de l'impact de l'action des PME sur la pectine a été réalisée de deux façons : en effectuant la dé-méthylation, puis en ajoutant le calcium (étude de l'influence du DBabs sur les pectines décrite précédemment) ou en effectuant la dé-méthylation en présence de calcium.

Cette dernière approche peut permettre de se rapprocher du comportement des pectines méthylestérase *in muro*. En effet, selon les tissus considérés et l'état physiologique de la cellule la paroi végétale possède une proportion de calcium lié aux pectines (capacité d'échange des ions calcium) de 0 à 856 mmol.L<sup>-1</sup> (Fritz, 2007) et une proportion de calcium libre de l'ordre du μmol.L<sup>-1</sup> (Dayod *et al.*, 2010). Cette concentration est difficile à mesurer et dépend fortement de l'état physiologique de la cellule, elle peut varier d'une dizaine à une centaine de micromolaires (Sattelmacher, 2001).

#### **2.4.1. Propriétés de gélification des pectines lors de l'action des PME**

La cinétique de gélification induite par l'activité des PME dans une solution de pectines a été récemment étudiée (O'Brien *et al.*, 2009; Slavov *et al.*, 2009; Vincent *et al.*, 2009). L'action des PME en présence de calcium permet d'observer conjointement la dé-estérification et la dé-méthylation (Figure 18).

La micro-rhéologie a permis de mettre en évidence des différences de flexibilité entre les chaînes de pectines composant un gel induit par l'enzyme *in situ* et un gel composé par des pectines préalablement dé-méthylestérifiées au préalable, puis mises en présence de calcium (Vincent & Williams, 2009). La dé-estérification des pectines par une PME végétale en présence de calcium conduit à l'établissement d'un gel formé de chaînes flexibles, tandis que les gels de pectines issues d'une dé-méthylestérification préalable, sont composés de chaînes de pectines semi-flexibles. L'hypothèse avancée pour expliquer cette différence est la suivante : lorsque la PME agit dans une solution de pectines en absence de calcium, l'enzyme est libre de créer de longs blocs de GalA libres en se réassociant avec la chaîne à proximité des blocs précédemment dé-estérifiés (Vincent & Williams, 2009). L'ajout du calcium provoque l'association de ces longs blocs et la formation de structure linéaires rigides. Lorsque la dé-estérification intervient en présence de calcium, celui-ci associe les chaînes

pectiques, un nombre suffisant de GalA libéré provoque la complexation du calcium par les chaînes pectiques. La PME ne peut plus accéder à cette zone, à cause d'une part de la gêne stérique et d'autre part, du changement de conformation induit par la liaison au calcium. La diminution de la taille de bloc a été observée en électrophorèse capillaire. Ces connexions de longueur minimale sont réparties de manière ponctuelle à travers le système et une chaîne de pectines libre est présente entre deux jonctions. Ces caractéristiques structurales conduisent à la nature flexible des éléments de ce système (Vincent & Williams, 2009). D'autre part, il a été montré que la densité de liaisons dans un gel formé en présence de PME et de calcium est plus importante et conduit à des propriétés visco-élastiques supérieures que lorsque la dé-estérification intervient avant l'ajout du calcium. Les blocs sont plus courts, mais plus nombreux lors de la dé-estérification en présence de calcium.

La modification de l'action des PME végétales en présence de calcium a aussi été observée lors de la caractérisation biochimique de l'action de la PME d'orange sur une pectine HM en présence de calcium (Slavov *et al.*, 2009). La comparaison des DBabs indique que la présence de calcium induit une répartition des méthyles en blocs plus petits. L'effet inverse a été montré lors de l'action d'une PME fongique en présence de calcium, où la répartition est plus en bloc qu'attendue.

Au niveau de la distribution intermoléculaire, les pectines de faible DM générées par les PME végétales présentent une distribution de DM plus large que celles générées par les PME fongiques ou par dé-estérification alcaline (Ralet & Thibault, 2002; Williams *et al.*, 2003). Ces observations peuvent être reliées à leur mécanisme d'action. Les PME végétales ont tendance à avoir un mécanisme de chaîne simple et libèrent donc de très longs blocs sur certaines chaînes. Dans le cas des PME fongiques qui ont tendance à suivre un mécanisme de chaîne multiple, leur action produit des blocs de taille moyenne sur de nombreuses chaînes de l'échantillon. D'un point de vue rhéologique, un retard de gélification est observé lors de l'action de la PME fongique en présence de calcium sur une pectine HM au contraire de ce qui est observé lors de l'action de la PME végétale (Slavov *et al.*, 2009). La figure 18 montre que le suivi de l'évolution des modules visco-élastiques ne correspond pas à la diminution du DM. L'augmentation du module conservatif intervient de façon très retardée (~5 jours) par rapport à la chute rapide du DM (quelques heures).

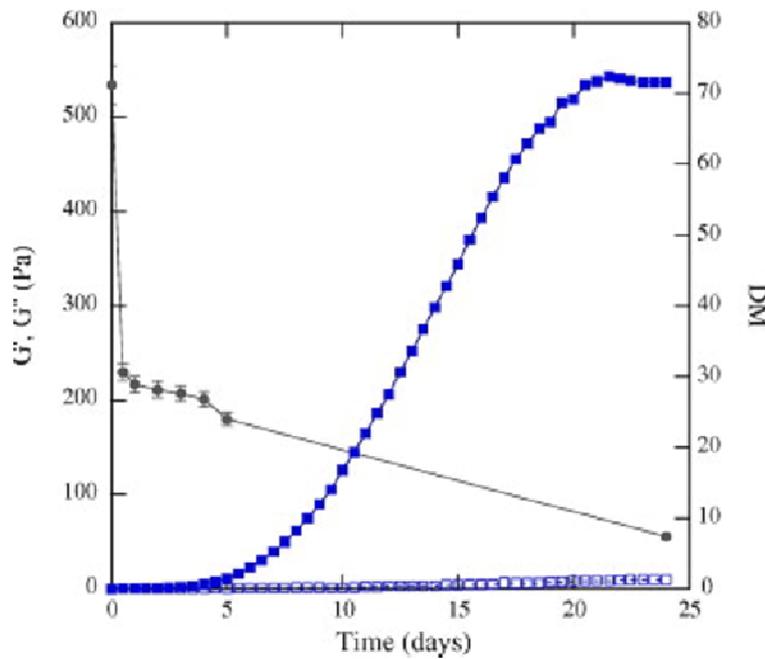


Figure 18 : Evolution des grandeurs rhéologiques  $G'$  (carrés bleu plein) et  $G''$  (carrés bleu vides) du mélange pectine HM-calcium (3 mM)-PME (*Aspergillus aculeatus*) ainsi que du degré de méthylation de la pectine (ronds noirs). D'après Slavov *et al.*, 2009.

Pour expliquer ce retard de gélification, une modification du comportement de l'enzyme liée à la texturation progressive du système a été supposée. La diffusion de l'enzyme serait modifiée au cours de la texturation du milieu, ce qui conduirait à une modification de son action.

## **2.5. Les applications liées aux PME**

Les PME sont employées dans différentes industries non alimentaires : traitement des eaux usées issues de l'industrie des *citrus*, industrie du textile, papeterie, production d'aliments pour animaux, fermentation du thé et du café, saccharification de la biomasse (Jayani *et al.*, 2005).

Les PME sont également employées dans l'industrie agro-alimentaire. En effet, la pression de turgescence et les caractéristiques structurales des polymères de la paroi et, particulièrement, des pectines influencent la texture des fruits et des légumes. Par conséquent, l'activité des PME provoque des modifications favorables ou défavorables de la texture selon le produit considéré.

### **2.5.1. Dégradation des pectines**

Les pectines sont plus sensibles à la dégradation par les endoPG lorsqu'elles sont dé-méthylées. Les endoPG dépolymérisent la pectine et entraînent une perte de l'intégrité des tissus végétaux et donc, une détérioration de la texture.

Dans l'industrie des jus de fruits, des PME exogènes sont employées lors de l'extraction. Ces enzymes sont principalement fongiques. La combinaison des PME avec des endoPG ou PL permet d'augmenter les rendements d'extraction et de diminuer le temps de cette étape. La dégradation enzymatique des pectines permet aussi une meilleure extraction des pigments et de l'arôme.

L'action des PME et des endoPG peut aussi être un inconvénient. Les purées de fruits et de légumes possédant une forte teneur en endoPG peuvent subir, de ce fait, une diminution de leur viscosité et de leur texture (Grassin & Coutel, 2009).

### **2.5.2. Renforcement des parois**

Les pectines avec un faible degré de méthylation peuvent complexer le calcium et former un réseau.

Dans les tissus végétaux intacts, la conséquence de ce réseau est un renforcement de la paroi et une augmentation de la fermeté. Au cours de la transformation industrielle des fruits et légumes, cet effet peut être stimulé par l'exposition des aliments à des températures favorisant l'activité des PME ou en réalisant des infusions de calcium ou de PME exogènes. Une étape de pré-cuisson améliore l'adhésion cellule-cellule et diminue le ramollissement provoqué par la cuisson (Ng & Waldron, 1997). Les infusions de calcium permettent d'augmenter la fermeté des produits végétaux après décongélation, en favorisant l'activité des PME, puis en élaborant des gels avec la pectine dé-estérifiée (Guillemin *et al.*, 2006). Ces gels renforcent les tissus et l'adhésion cellulaire (Alonso *et al.*, 1995).

D'autre part, la dé-méthylation des pectines conduit à une diminution de leur sensibilité à la  $\beta$ -élimination qui est associée au ramollissement induit lors du chauffage de nombreux fruits et légumes.

### 2.5.3. Elimination des pectines

Lorsque les produits végétaux sont réduits en purée ou en jus, la complexation des pectines par les ions calcium peut conduire à leur précipitation. Cette clarification peut être désirable ou non.

Pour l'obtention de jus clairs et pétillants comme pour la fabrication du cidre, des PME exogènes, en général fongiques, sont ajoutées pour augmenter le rendement de pressage et pour éliminer la matière en suspension (Kashyap *et al.*, 2001).

Pour certains jus de fruits, cette clarification est indésirable. De nombreuses études ont été menées pour comprendre son origine. Chez l'orange (Navel), Versteeg *et al.* (1980) ont montré que les problèmes de déstabilisation étaient principalement liés à l'existence d'une isoforme minoritaire et thermostable (Versteeg *et al.*, 1980). Ces résultats ont ensuite été approfondis chez la variété Valencia. Cameron *et al.* (1998) ont caractérisé le rôle des quatre PME dans la déstabilisation des jus d'orange à différentes températures (Cameron *et al.*, 1998). La stabilisation des jus s'effectue par chauffage du jus. Ce procédé entraîne une diminution des propriétés nutritionnelles et organoleptiques du jus. Différents procédés alternatifs sont élaborés pour éviter ces pertes : utilisation des PME1, inactivation par les hautes pressions ou par un champ électrique pulsé (Giner *et al.*, 2005) utilisation des PME1. Il a été montré que l'addition de PME1 à un jus d'orange non pasteurisé empêchait le déphasage jusqu'à 9 mois de stockage à 5°C (Giovane *et al.*, 2004).

Les PME peuvent être aussi employées pour la confection de pectines « sur mesure » dédiées à des applications spécifiques (cf. § 1.3.3).

### **3. Objectifs de la thèse**

L'étude des pectines et des modifications de leurs propriétés par voie enzymatique présente un intérêt en vue d'obtenir de nouvelles propriétés pour l'industrie, et pour mieux comprendre la mise en place et le remodelage des pectines *in muro*.

Comme expliqué précédemment, l'action des PME sur la pectine est guidée par de nombreux facteurs dont la présence de calcium. Cette action combinée à la présence de calcium conduit à une gélification du système. Une modification du mode d'action de l'enzyme ainsi que de nouvelles propriétés rhéologiques du système ont été mises en évidence selon l'origine fongique ou végétale de la PME. Suite à ces observations, une hypothèse a été émise selon laquelle la texturation du milieu pourrait influencer le mode d'action de l'enzyme en jouant sur sa diffusion. Le travail présenté ici explore cette hypothèse en évaluant l'impact de la gélification du système sur la diffusion des PME.

Pour cela, une PME fongique et une PME végétale ont été choisies pour leurs modes d'action différents. Dans un premier temps, leur activité a été caractérisée sur un système en solution et un système en cours de gélification. L'évolution de ce mode d'action a ensuite été étudiée dans les différents environnements des pectines, en déterminant le taux de méthylation et la répartition des méthyles après action de chaque enzyme. Ces données seront rapprochées de la caractérisation rhéologique des systèmes et des paramètres catalytiques des enzymes dans les différents environnements.

Ensuite, l'influence de l'environnement physique et chimique sera étudiée sur la diffusion des PME. Ce phénomène sera abordé à différentes échelles, pour mettre en évidence l'influence de la structure du réseau sur la diffusion des enzymes.



## **Matériel et méthodes**



## 4. Matériel

### 4.1. Pectines

#### 4.1.1. Caractéristiques

La pectine employée est une pectine moyennement méthylée (MM) de DM 46% extraite à partir d'orange (lot 13830, Cargill, Beaupre, France). La teneur en GalA est de 67% et sa composition est décrite dans le tableau 4. Le degré de méthylation de la pectine a été choisi suffisamment bas pour permettre une gélification en présence de calcium et suffisamment élevé pour permettre une action efficace des PME. La répartition des méthyles est caractérisée par un DBabs de  $16 \% \pm 0,41$ .

	<b>Solution initiale de pectines (% en poids)</b>	<b>Solution après centrifugation et filtration (% en poids)</b>
<b>Rhamnose</b>	1,51	1,26
<b>Fucose</b>	0,17	0,00
<b>Arabinose</b>	0,53	0,39
<b>Xylose</b>	0,22	0,20
<b>Mannose</b>	0,45	0,03
<b>Galactose</b>	6,99	5,26
<b>Glucose</b>	0,85	0,97
<b>GalA</b>	66,85	61,10

Tableau 4 : Composition de la pectine MM déterminée en chromatographie en phase gazeuse et colorimétrie pour la teneur en GalA.

#### 4.1.2. Purification

La poudre de pectines est dispersée dans un mélange d'éthanol (95 - 99%), d'acide chlorhydrique ( $13 \text{ mol.L}^{-1}$ ) et d'eau désionisée (v/v 70/16,5/13,5), puis laissée sous agitation une nuit à 4°C. Ce lavage permet d'obtenir, d'une part, que toutes les fonctions carboxyliques des acides galacturoniques soient sous forme protonée et, d'autre part, l'élimination de tous les ions monovalents et divalents qui seraient présents dans la poudre initiale. La poudre est récupérée et abondamment lavée avec de l'éthanol à 70% pour éliminer le chlore. Elle est

ensuite séchée à l'éthanol 96°, puis à l'acétone. La poudre de pectines est ensuite placée dans une étuve à 40°C pour une nuit, puis conservée à 4°C dans un récipient fermé.

## **4.2. Pectine méthylestérases**

### **4.2.1. Caractéristiques**

La PME fongique employée est une PME d'*Aspergillus aculeatus* (Aa-PME, Uniprot Q12535) gracieusement fournie par Novozyme A/S (Copenhagen, Denmark).

La PME végétale est une PME d'orange (O-PME, 461 U.mg<sup>-1</sup>, lot 087K7435, P4500, L'Isle d'Abeau, France). Les caractéristiques des PME végétales et fongiques sont données dans le tableau 5.

	<b>Aa-PME</b>	<b>O-PME</b>
<b>Masse molaire kDa</b>	36,2	34,0
<b>pI</b>	3,8	9,2
<b>pH optimal</b>	4,5	9,0
<b>Température optimale °C</b>	45	55-60

Tableau 5 : Caractéristiques de l'Aa-PME et O-PME

(Christgau *et al.*, 1996 ; Savary, Hotchkiss *et al.* 2002; Duvetter, Fraeye *et al.* 2006)

### **4.2.2. Purification**

Les PME sont solubilisées dans un tampon 4-Morpholin-1-ylEthylSulphonate de sodium (MES, C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>NNaO<sub>4</sub>S) 10 mmol.L<sup>-1</sup> à pH 6 en chambre froide. Puis une dialyse contre le tampon MES est réalisée pendant une nuit à 4°C.

## **4.3. Conditions physico-chimiques**

La gélification des pectines est influencée par le pH et la température. Dans cette étude, les paramètres de pH et de température doivent donc rester constants pour pouvoir étudier l'effet de la présence du calcium et de la gélification des pectines sur le comportement des deux PME.

Le pH optimal de l'O-PME est de 9 et sa température optimale est de 55-60°C (Figure 19 a et b).

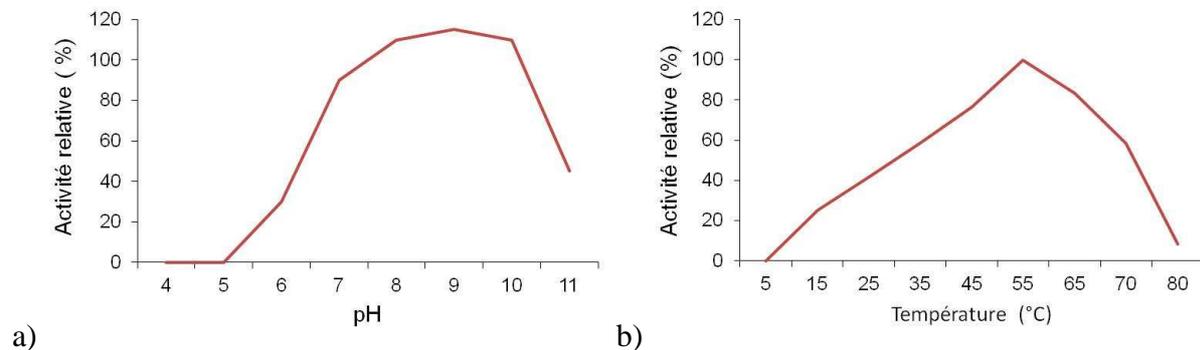


Figure 19 : (a) Dépendance de l'activité de l'O-PME au pH (%). Activité relative par rapport à l'activité mesurée à pH 7 en présence de NaCl (1, 2%). (b) Dépendance de l'activité relative de l'O-PME à la température (%).

Les mesures d'activité ont été réalisées en titrimétrie. D'après Savary *et al.*, 2002.

D'après la courbe de stabilité (Figure 20), la O-PME perd la moitié de son activité après avoir été chauffée à 55°C. 30°C est la température où la O-PME est la plus stable. Peu d'information sont disponibles sur la thermostabilité de l'Aa-PME, mais d'après la température optimale (45°C), il est possible qu'à 30°C l'enzyme soit stable. Cette température a donc été choisie pour permettre le fonctionnement des deux enzymes.

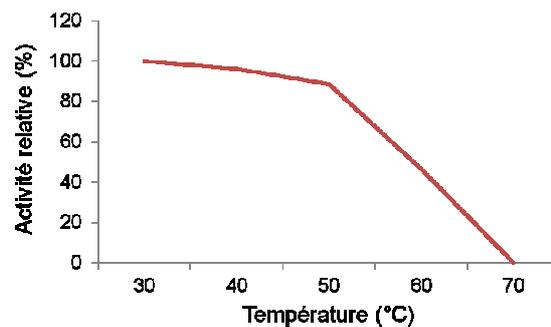


Figure 20 : Courbe de stabilité de la O-PME commerciale après 5min d'incubation à la température indiquée. D'après Savary *et al.*, 2002.

Le choix du pH a été guidé par le pH optimal des deux enzymes. L'activité de l'O-PME en fonction du pH décroît de pH 9 à pH 5 où l'activité est très réduite (Figure 19 a). L'activité de l'Aa-PME en fonction du pH décroît de son pH optimal jusqu'à pH 8 où l'activité est très réduite (Duvetter *et al.*, 2006) (Figure 21).

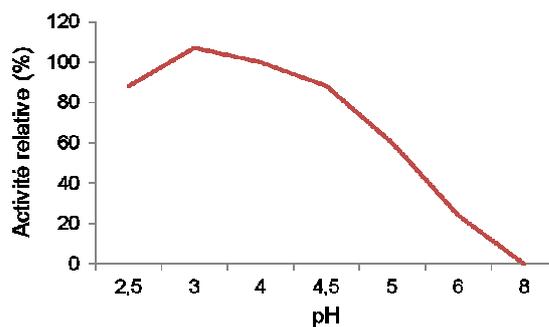


Figure 21 : Dépendance de l'activité relative de l'Aa-PME au pH (%).

L'activité a été déterminée par titrimétrie en présence de  $0,3 \text{ mol.L}^{-1}$  de NaCl à  $22^\circ\text{C}$ . D'après Duvetter *et al.*, 2006.

La valeur de pH 6 a été choisie pour permettre l'activité des deux enzymes afin de réaliser l'ensemble des mesures sans modifier les conditions de pH.

Une solution de calcium ( $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$  ; Prolabo) est réalisée à  $18,3 \text{ mmol.L}^{-1}$  dans le tampon MES  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$ .

## **5. Méthodes**

### **5.1. Préparation d'une solution de pectines**

La poudre de pectines est dispersée pour atteindre une concentration finale de 2,5 % (p/p) dans 50 mmol.L<sup>-1</sup> de tampon MES à pH 6. La dispersion se fait sous forte agitation en pluie pour éviter la formation d'agrégats. Le mélange est ensuite placé pendant quelques heures en chambre froide sous agitation. Puis le pH de la solution est ajusté à 6 à froid avec de l'hydroxyde de sodium à 0,01 mol.L<sup>-1</sup>, puis à 0,1 mol.L<sup>-1</sup> lorsque l'agitation devient plus facile. Une fois le pH ajusté, la solution de pectines est placée en chambre froide sous agitation pendant une nuit. La solution est ensuite centrifugée à 17000 g pendant 30 min. Le surnageant est filtré sur des filtres de porosité décroissante (8 ; 3 ; 1, 2 ; 0,8 µm ; Millipore). Cette dernière étape permet d'éliminer les agrégats de la solution de pectines.

La concentration finale est déterminée en réalisant une mesure de la matière sèche de la solution : 2 mL de solution sont déposés dans une capsule tarée (M<sub>1</sub>), pesés (M<sub>2</sub>) puis placé dans un four à 110°C pendant une nuit et pesé à nouveau (M<sub>3</sub>). La matière sèche de la solution est calculée de la façon suivante :

Formule 5.1 I : 
$$\text{matière sèche (\%)} = \frac{(M_3 - M_1)}{(M_2 - M_1)} \times 100$$

### **5.2. Réalisation d'un gel de pectines**

Les solutions de pectines et de calcium sont placées dans un bain-marie à 50°C. La température de 50°C a été choisie pour permettre l'introduction de la PME dans le système. Après quelques minutes nécessaires à l'équilibration des solutions à la température du bain, le calcium est ajouté goutte à goutte sous agitation forte dans la solution de pectines pour atteindre une concentration finale de 0,9% en pectines et 5 mmol.L<sup>-1</sup> en calcium. Le mélange est maintenu sous forte agitation à 50°C pendant une minute supplémentaire. Il peut ensuite subir un ajout de PME (cf. § 5.8.2), être mis en place sur le plateau du rhéomètre (cf. § 5.9), ou être introduit dans un moule (cf. § 5.10.4).

## **5.3. Caractérisation du degré de méthylation des pectines en spectroscopie infrarouge**

### **5.3.1. Principe de la spectroscopie infrarouge**

La spectroscopie correspond à l'étude de l'interaction d'une onde électromagnétique avec la matière. Cette interaction est caractérisée par un échange d'énergie. La spectroscopie infrarouge est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par l'échantillon. Le domaine infrarouge est la région du spectre située entre le visible et les micro-ondes. Ce domaine est découpé en trois parties : le proche infrarouge, le moyen infrarouge et le lointain infrarouge. Dans le cas présent, le domaine de l'infrarouge considéré est celui du moyen infrarouge qui s'étend de  $4000\text{ cm}^{-1}$  à  $400\text{ cm}^{-1}$ . Pour qu'une absorption d'énergie puisse avoir lieu, il faut que la fréquence de l'onde lumineuse (nombre d'onde) soit égale à la fréquence de vibration de la liaison moléculaire. Dans ce cas, un phénomène de résonance est observé entre la molécule et l'onde ainsi qu'un transfert d'énergie. Chaque liaison moléculaire a sa fréquence de vibration propre, la mesure de l'absorbance permet d'obtenir des renseignements sur la nature du groupement chimique et sa proportion.

### **5.3.2. Application à la détermination du degré de méthylation**

#### 5.3.2.1. Principe

La détermination du degré d'estérification par spectroscopie infrarouge moyenne a été développée dans le but de caractériser l'évolution du DM lors du mûrissement de la pêche (Chatjigakis *et al.*, 1998). Plus précisément, ces auteurs ont montré que  $-\text{COOH}$  et  $-\text{COOCH}_3$  absorbaient à  $1749\text{ cm}^{-1}$  et que le groupe d'acide carboxylique ionisé ( $-\text{COO}^-$ ) absorbait à  $1630\text{ cm}^{-1}$  à l'état solide. Ces bandes d'absorption correspondent aux vibrations d'étirement de la liaison  $\text{C}=\text{O}$  des groupements ester et carboxylates. Classiquement, en solution, les groupes esters carboxyliques et les acides carboxyliques protonés absorbent à  $1740\text{ cm}^{-1}$  tandis que les groupes carboxylates absorbent à  $1600\text{ cm}^{-1}$  (Figure 22). Pour mesurer le degré de méthylation, il est important que le pH des échantillons soit supérieur au pKa des fonctions carboxyliques de l'acide galacturonique ( $\text{pKa} = 3,5$ ) pour diminuer la proportion des fonctions  $\text{COOH}$  ( $\sim 1740\text{ cm}^{-1}$ ). Pour être dans ce cas, il faut que le pH soit supérieur au  $\text{pKa} + 1$ . De plus, l'eau doit être éliminée de l'échantillon à cause de son absorption proche des pics d'intérêt et du bruit qu'elle induit.

### 5.3.2.2. Détermination du degré de méthylation sur un échantillon

#### 5.3.2.2.1. Obtention du spectre infrarouge

Les échantillons de pectines sont dilués dans du tampon MES à une concentration de 0,12 %. Ils sont ensuite déposés sur une fenêtre en baryum (150  $\mu\text{L}$ ), puis séchés à l'aide d'un sèche-cheveux jusqu'à l'obtention d'un film adhérent à la fenêtre. La fenêtre est alors fixée sur le porte-échantillon et l'ensemble est introduit dans le spectromètre. La prise des spectres a été réalisée sur un Spectromètre infrarouge à Transformée de Fourier (Bruker, « Vector 22 », IFS25). Pour un échantillon, 200 spectres sont enregistrés en transmission contre 200 spectres de la fenêtre sans échantillon avec un intervalle de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Chaque échantillon est passé en double. Les spectres sont ensuite lissés, coupés sur la zone d'intérêt (1800-1535  $\text{cm}^{-1}$ ), corrigés par rapport aux spectres de référence et normalisés.

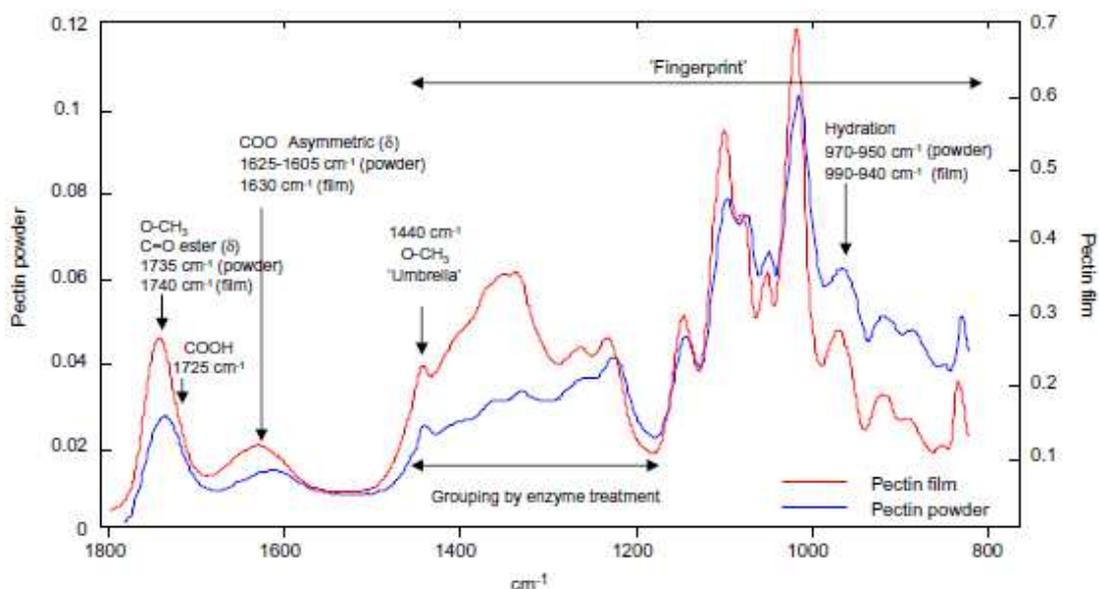


Figure 22 : Pics d'intérêt du spectre infrarouge des pectines. D'après Winning *et al.* 2009.

#### 5.3.2.2.2. Traitement des spectres

Pour la détermination du DM, une gamme étalon a été construite à partir de pectines de DM connus déterminés en CPG. Les spectres de chacune de ces pectines ont été enregistrés. Ils ont ensuite été comparés entre eux et aux spectres échantillons grâce à une analyse en composant principale (ACP) sous Unscrambler®. Le principe de comparaison des spectres en ACP s'effectue selon les étapes suivantes :

- Pour chaque spectre, une valeur d'absorbance est attribuée à chaque nombre d'onde. Chaque nombre d'onde est représenté par une direction, la valeur de l'absorbance correspondant à chaque nombre d'onde pour un spectre donné est reportée sur ces directions.

- Chaque spectre peut être ainsi visualisé sous forme d'un nuage de points.

- Pour comparer les spectres entre eux, un changement de repère est effectué. L'origine du nouveau repère correspond au centre du nuage de points. L'abscisse est déterminée par la distance maximale entre les deux extrémités du nuage (première composante principale) et l'ordonnée par la seconde distance maximale (seconde composante principale). A chaque point du nuage initial, il est alors possible d'attribuer de nouvelles coordonnées.

- Ainsi il est possible de comparer les points en fonction des axes. Dans notre cas, la première composante principale correspond au degré de méthylation.

Les valeurs de la première composante principale correspondant aux spectres de la gamme étalon sont utilisées pour tracer une droite d'étalonnage en fonction du degré de méthylation correspondant (Figure 23). L'équation de la droite étalon permet de calculer le DM de chaque échantillon à partir de la valeur obtenue en ACP.

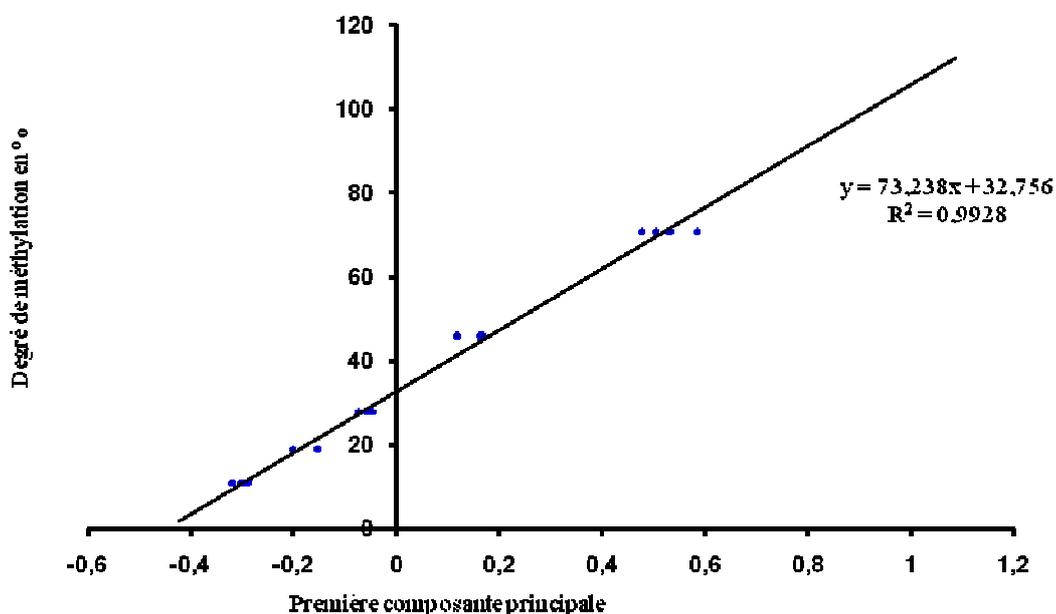


Figure 23 : Gamme étalon des DM de pectines connues analysées en spectroscopie infrarouge.

A partir de la gamme étalon, une valeur d'erreur de prédiction est calculée (~2%).

Formule 5.3.2 I :

$$\text{Erreur de prédiction} = \sqrt{\frac{\sum (DM_{théoriques} - DM_{prédits})^2}{\text{degré de liberté} - 1}}$$

#### 5.4. Caractérisation du « absolute Degree of Blockiness »

La répartition des méthyles est un paramètre influant sur les propriétés de gélification des pectines. Cette répartition peut être caractérisée par deux calculs différents : celui du « Degree of Blockiness », DB, ou celui de l' « absolute Degree of Blockiness », DBabs (Daas *et al.*, 1999; Guillotin *et al.*, 2005) (*cf.* § 1.1.14.1) (Figure 24). Le DBabs correspond à la somme des monomères (GalA<sub>1</sub>), dimères (GalA<sub>2</sub>), trimères (GalA<sub>3</sub>) d'acides galacturoniques libérés lors de la digestion de l'échantillon par une endopolygalacturonase rapportée à la quantité totale de GalA de l'échantillon (GalA<sub>tot</sub>).

Equation 5.4 I :

$$DB_{abs} = \frac{(GalA_1 + GalA_2 + GalA_3)}{GalA_{tot}} \times 100$$

La détermination du DBabs est réalisée en trois étapes : la digestion des échantillons par l'endopolygalacturonase, la détermination des quantités d'oligosaccharides de GalA en HPAEC et la détermination de la quantité d'acides galacturoniques totale par colorimétrie.

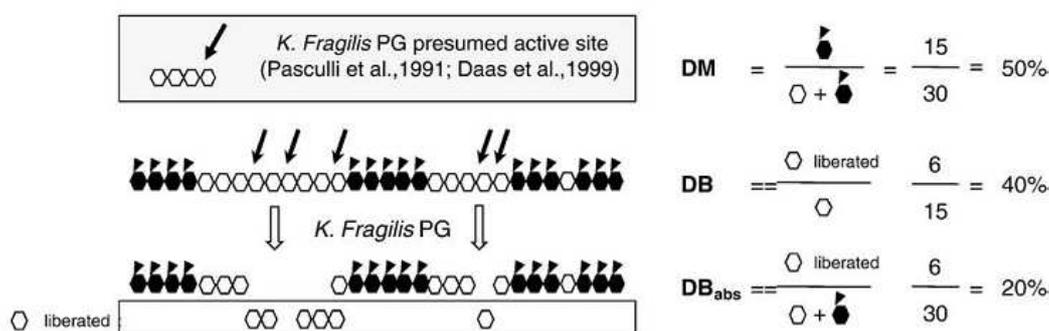


Figure 24 : Description de l'hydrolyse enzymatique par l'endoPG et du principe du calcul du DM, DB et DBabs (Fraeye *et al.*, 2010).

#### **5.4.1. Dégradation des pectines par l'endoPG**

L'endoPG employée est l'endoPG II d'*Aspergillus niger* (AnPGII, E.C. 3.2.1.15, UniProt P26214, Novozymes). Cette enzyme dégrade spécifiquement les régions déméthylées des régions HG. Cette enzyme a été purifiée à l'INRA de Nantes à partir d'une préparation monocomposante fournie par Novozymes (Sakamoto *et al.*, 2003). Elle est solubilisée dans du tampon acétate 50 mmol.L<sup>-1</sup> à pH 4.

Les solutions de pectines sont diluées à 0,6 mg.mL<sup>-1</sup> avec de l'eau et du tampon acétate pour avoir une concentration finale en acétate de 50 mmol.L<sup>-1</sup>. Puis ils reçoivent 0,2 nkat d'AnPGII et sont incubés à 40°C pendant 24h. La même quantité d'endoPG est ajoutée à nouveau à 24h et à 48h après la première incubation. Après 72h, la réaction d'hydrolyse de la pectine est stoppée en incubant les échantillons pendant 5min à 100°C. Les échantillons sont ensuite filtrés sur 45 µm, puis sont divisés en deux aliquots : l'un pour le dosage des oligosaccharides de GalA et l'autre pour le dosage des GalA totaux.

#### **5.4.2. Dosage des monomères, dimères, trimères d'acides galacturoniques**

Le dosage s'effectue en chromatographie échangeuse d'anions haute pression (HPAEC) avec une détection ampérométrique. La séparation des oligogalacturonides s'effectue dans un milieu très basique (NaOH, 100 mmol.L<sup>-1</sup>) pour permettre l'ionisation des groupements hydroxyles et leur rétention sur la colonne (Carbopac PA1, 2x50 mm). Puis les oligogalacturonides sont élués grâce à un gradient d'acétate de sodium de 250 mmol.L<sup>-1</sup> à 500 mmol.L<sup>-1</sup> (Figure 25). L'ion acétate agit comme l'ion déplaceur.

Le débit est de 0,25 mL.min<sup>-1</sup>.

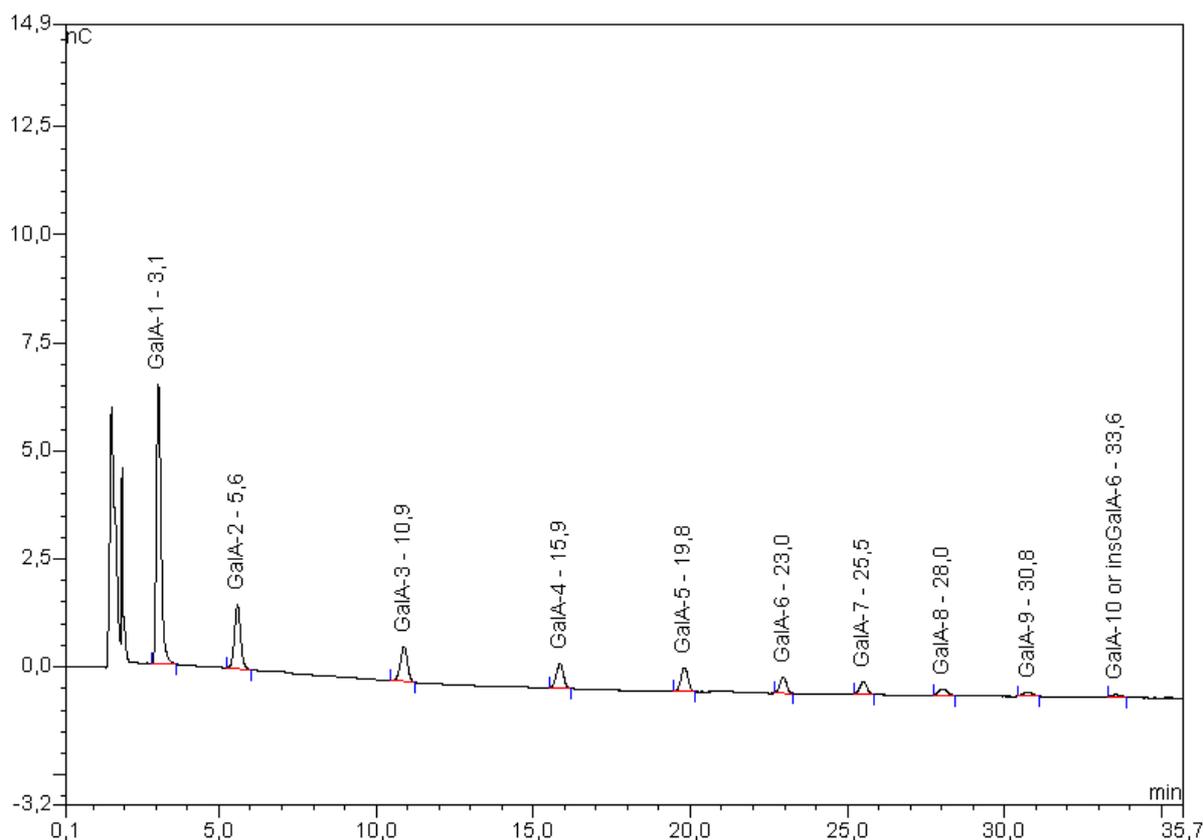


Figure 25 : Chromatogramme d'un échantillon de pectines MM digéré par l'AnPGII.

Avant d'être injectés, les échantillons sont filtrés sur filtres de 45  $\mu\text{m}$  et dilués au quart. En effet, l'acétate présent dans le milieu réactionnel nécessaire à l'action de l'AnPGII provoque des dédoublements de pics lors de l'analyse. Pour permettre la quantification des oligosaccharides, une gamme étalon de monomère, dimère et trimère de GalA est réalisée à 5, 10, 20, 30 et 40  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  et injectée de façon régulière tout au long de l'analyse. En effet, une modification de la réponse due à la carbonatation de la soude a été observée au cours du temps. Les concentrations en oligosaccharides d'intérêt sont ensuite calculées à partir de l'aire des pics et des trois gammes étalons. Deux déterminations sont effectuées par échantillon.

### 5.4.3. Dosage des acides galacturoniques totaux

Ce dosage s'effectue par colorimétrie selon la méthode au méthahydroxyldiphényle (MHDP) (Blumenkrantz & Asboe-Hansen, 1973; Thibault, 1979) qui a été automatisée (Thibault, 1979). Cette méthode est très sensible et très spécifique des acides uroniques. Afin d'éviter une différence de réactivité entre les acides galacturoniques méthylés et non

méthylés, les échantillons sont préalablement saponifiés. L'échantillon (0,2%) est dilué au demi dans l'eau, puis un volume double d'hydroxyde de sodium à 0,2 mol.L<sup>-1</sup> est ajouté. Après 30 minutes à température ambiante, la réaction est stoppée à l'aide d'acide chlorhydrique à 0,2 mol.L<sup>-1</sup>. Le volume de l'échantillon est ensuite ajusté pour atteindre une concentration théorique en acide galacturonique de 100 µg.mL<sup>-1</sup>.

L'échantillon est ensuite chargé sur l'auto-analyseur (Skalar, San plus system). Au sein de celui-ci, les échantillons subissent une série de réactions :

Une hydrolyse acide (acide sulfurique, 72%) à chaud permet, d'une part, l'hydrolyse totale du polysaccharide en monomères et, d'autre part, l'obtention de dérivés furfuriques de GalA (acides 5-formylfuroïques).

Une condensation de ces dérivés furfuriques avec le MHDP (400 mg.L<sup>-1</sup> dans de la soude N/8, Merck) conduit à la formation d'un complexe coloré. La densité optique de ce complexe est lue à 530 nm.

Pour permettre le dosage, une gamme étalon de GalA est réalisée de 20 à 100 µg.mL<sup>-1</sup>. Les résultats sont exprimés en pourcentage de GalA et tiennent compte du facteur de polymérisation (0,906). Deux déterminations sont effectuées par échantillon.

### **5.5. Dosage de l'activité PME**

La réaction enzymatique a été décrite par Brown en 1902.

Equation 5.5 I :  $E + S \rightarrow ES \rightarrow E + P$

où

E est l'enzyme

S est le substrat

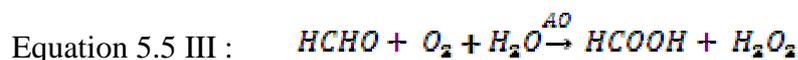
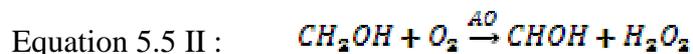
ES est le complexe enzyme substrat

P est le produit

L'activité enzymatique peut être définie par la quantité de substrat transformé ou par la quantité de produit apparu par unité de temps. Les mesures d'activité sont effectuées pour des concentrations en produit très faibles : c'est la mesure de vitesse initiale pour  $[P] \approx 0$  et  $[S] \approx [S]_0$  où  $[S]_0$  est la concentration du substrat à l'instant initial.

L'activité des PME est déterminée par une méthode colorimétrique (Anthon & Barrett, 2004; Slavov *et al.*, 2009). La détermination de l'activité des PME (16 µg.mL<sup>-1</sup>) en présence

de pectines (5 mg.mL<sup>-1</sup>) est basée sur l'oxydation du méthanol libéré en formaldéhyde par réaction enzymatique avec l'alcool oxydase (équation 5.5 II) (0,06 U.μL<sup>-1</sup>, E.C.1.3.13, *Pichia pastoris*, Sigma A2404).



L'aldéhyde formé a la propriété de se condenser avec le N-méthylbenzothiazolinone-2-hydrazone (MBTH, 3mg.mL<sup>-1</sup>, Sigma M8006-1G) en milieu neutre (Figure 26a). Cette condensation empêche l'alcool oxydase de poursuivre l'oxydation du formaldéhyde (équation 5.5 III). Lorsque le milieu est acidifié et oxydé par l'ajout d'un mélange d'acide sulfonique et d'ammonium de fer (5 mg.mL<sup>-1</sup>), le complexe précédemment obtenu se condense une nouvelle fois avec une molécule de MBTH pour former un complexe bleu (Figure 26b). La densité optique (DO) du composé obtenu est lue à 620 nm (Oliveira *et al.*, 2005 ).

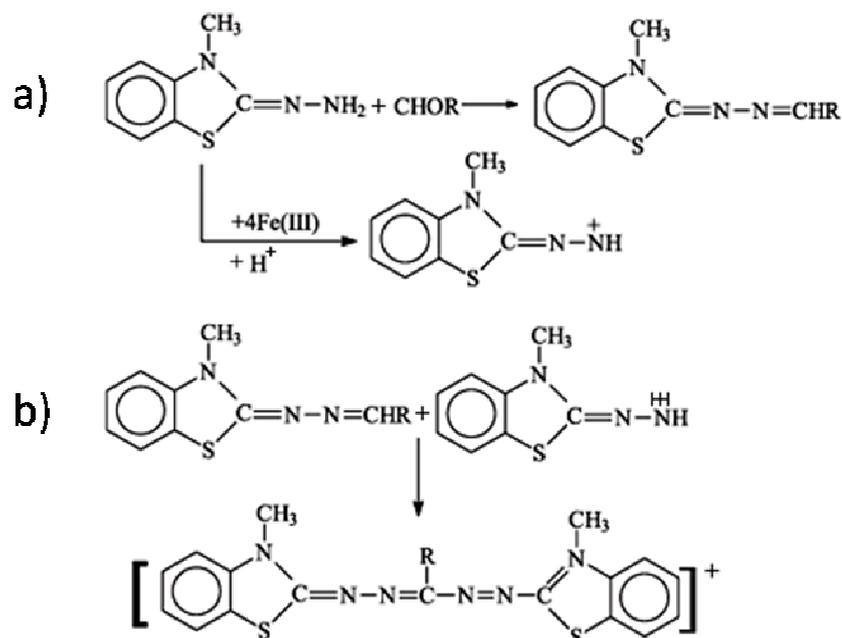


Figure 26 : Réaction de condensation du MBTH avec un aldéhyde, le formaldéhyde pour R = H (a) et formation de la cyanine (b). D'après Oliveira *et al.*, 2005 .

En pratique, la PME est mise en contact avec un mélange contenant la pectine, le MBTH, et l'alcool oxydase. L'ensemble est incubé à 30°C. Plusieurs prélèvements sont réalisés sur ce

mélange selon une cinétique de temps déterminée à 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 et 30 minutes. Après chaque prélèvement, la réaction est stoppée par ajout d'un mélange d'acide sulfonique et d'ammonium de fer. Puis après un temps d'attente, nécessaire au développement de la coloration, la DO est mesurée à 680nm. Il est alors possible de tracer une courbe de DO en fonction des différents temps de prélèvement.

En parallèle, une gamme étalon de méthanol est réalisée. La concentration de l'alcool oxydase est alors ajustée pour un volume réactionnel plus faible (0,01 U.µL<sup>-1</sup>, *Pichia pastoris*, Sigma).

Le calcul de l'activité de l'enzyme est effectué selon la formule suivante :

Formule 5.5 IV :

$$\text{Activité (nkat.mL}^{-1}\text{)} = \frac{\text{DO}_{t_a} - \text{DO}_{t_0}}{\text{pente}} \times \text{dilution}$$

Où

pente    coefficient directeur de la droite étalon

L'activité spécifique est définie par la quantité de substrat catalysé par l'enzyme par mg d'enzyme. Deux déterminations sont effectuées par échantillon.

## **5.6. Détermination des paramètres cinétiques**

La détermination des constantes cinétiques d'une enzyme implique généralement le suivi de la variation de la concentration du produit en fonction du temps pour une concentration d'enzyme donnée à différentes concentrations de substrat. La détermination des constantes catalytiques s'effectue dans des conditions de vitesse initiale, en présence d'une concentration de substrat grande devant celle de l'enzyme. De plus, il faut poser l'hypothèse de l'approximation de l'état stationnaire proposée par Briggs et Haldane en 1925 selon laquelle la concentration du complexe ES est constante si la concentration en substrat est très grande devant celle en enzyme. Ces conditions permettent d'écrire l'équation de Michaëlis-Menten :

Equation 5.6 I :

$$V = \frac{V_{\max}[S]_0}{K_m + [S]_0}$$

A partir du calcul des vitesses initiales, il est possible d'utiliser une représentation dérivée de cette équation pour déterminer les constantes catalytiques. Ici, la détermination de la constante de Michaelis ( $K_m$ ) et de la vitesse maximale ( $V_{max}$ ) est réalisée grâce à la représentation en inverse de Lineweaver et Burk (Figure 27). Cette représentation s'appuie sur la relation suivante :

$$\text{Equation 5.6 II : } V = \frac{V_{max} [S]_0}{K_m + [S]_0} \Rightarrow \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max} [S]_0} = \frac{1}{V}$$

Le tracé de la variation de la concentration en produit au cours du temps permet de calculer la vitesse initiale qui correspond à la pente de la tangente à l'origine de ce tracé. La gamme de concentrations en pectine employée s'échelonne de 0,6 à 12 mg.mL<sup>-1</sup> pour l'Aa-PME et l'O-PME en absence de calcium et de 0,6 à 4,9 mg.mL<sup>-1</sup> en présence de calcium. Chacune des mesure est réalisée en double. La présence de calcium provoque la gélification des pectines MM même à faible concentration en pectine et limite les mesures à forte concentration. A partir des valeurs de vitesse initiale à différentes concentrations en substrat, la représentation de Lineweaver et Burk est tracée et  $K_m$  et  $V_{max}$  sont déterminés à partir des équations des droites.

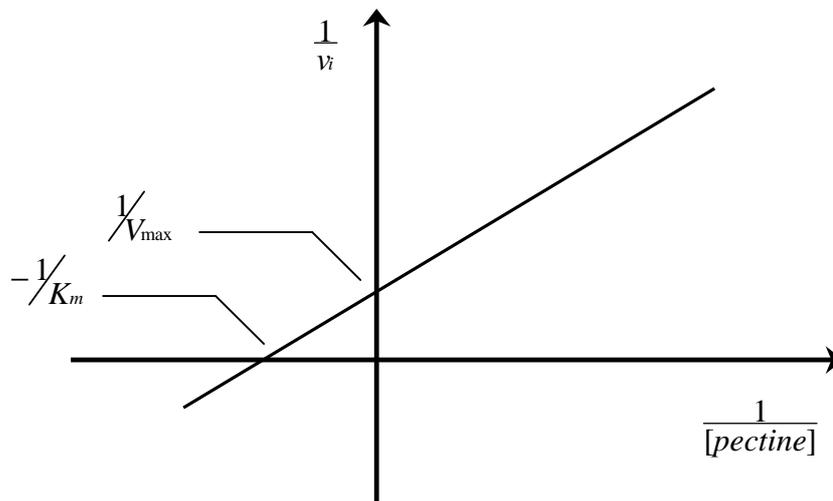


Figure 27 : Représentation de Lineweaver et Burk.

## 5.7. Modélisation moléculaire

La modélisation de la structure 3D à partir des séquences des protéines Aa-PME- (Q12535) (Christgau *et al.*, 1996) et O-PME (Q8GS16) (Arias & Burns, 2002) est lancée sur le serveur de modélisation par homologie de séquence Swiss model (URL :<http://swissmodel.expasy.org/>, (Guex & Peitsch, 1997; Schwede *et al.*, 2003; Arnold *et al.*, 2006)). Le seuil minimal d'identité de séquence pour la construction d'un modèle est de  $\approx 30\%$  avec une molécule dans la librairie de structures ExpDB de Swiss model qui servira de « patron ». Le modèle est évalué sur la base du pourcentage d'identité de séquence avec le patron et la e-value calculée par le serveur. Cette dernière permet d'évaluer l'incertitude du modèle, lorsqu'elle est inférieure à  $1.10^{-3}$ , le modèle est de bonne qualité. Additionnellement, un module de cristallographie, « procheck » (Laskowski *et al.*, 1993) a été appliqué à la structure obtenue pour évaluer si les contraintes stéréochimiques connues sont respectées. Idéalement, le résultat donné (score) pour ce module devrait être supérieur à  $-0,5$ . Les données cristallographiques existantes pour les PME sont celles des PME d'*Erwinia chrysanthemi* et de *Daucus carota*. La modélisation du potentiel électrostatique est issue des données de cristallographie et correspond au pH de leur acquisition, ici, 6,6. Le potentiel électrostatique de la surface est calculé pour chaque modèle par le programme MEAD (Macroscopic Electrostatic with Atomic Detail, D. Bashford) (Bashford, 1997).

## **5.8. Suivi cinétique de l'activité des PME au cours du temps dans différents environnements physico-chimiques**

### **5.8.1. En solution**

Une solution de pectines MM et une solution de tampon MES à  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$  sont placées dans un bain-marie à  $50^\circ\text{C}$  (Figure 28). La solution de tampon est ajoutée à la solution de pectine pour une concentration finale en pectines de  $0,9\%$  (p/p). Le mélange est ensuite replacé dans le bain une minute supplémentaire. Une quantité de PME fongique ou végétale est alors ajoutée à température ambiante pour atteindre une concentration finale de  $0,4 \text{ nkat.mL}^{-1}$ . Le mélange est homogénéisé, puis séparé en aliquots de  $150 \mu\text{L}$  chacun.

L'activité de l'enzyme est stoppée par chauffage à  $70^\circ\text{C}$  pendant 10 minutes toutes les heures pendant 6 heures, puis à 10h et à 24h. D'autre part, les échantillons sont dilués après inactivation de l'enzyme dans du tampon MES de façon à obtenir une concentration finale en pectines de  $0,12\%$  (p/p).

Sur chaque échantillon, les DM et DBabs sont déterminés en double, et deux répétitions ont été effectuées.

### 5.8.2. En gel en formation

Le protocole employé est semblable à celui employé pour le suivi de l'activité en solution à l'exception que l'ajout de tampon est remplacé par l'ajout d'une quantité de chlorure de calcium dissous dans du tampon MES 50 mmol.L<sup>-1</sup> pour atteindre une concentration de 5 mmol.L<sup>-1</sup> (Figure 28). Sur chaque échantillon, les DM et DBabs sont déterminés en double, et deux répétitions ont été effectuées.

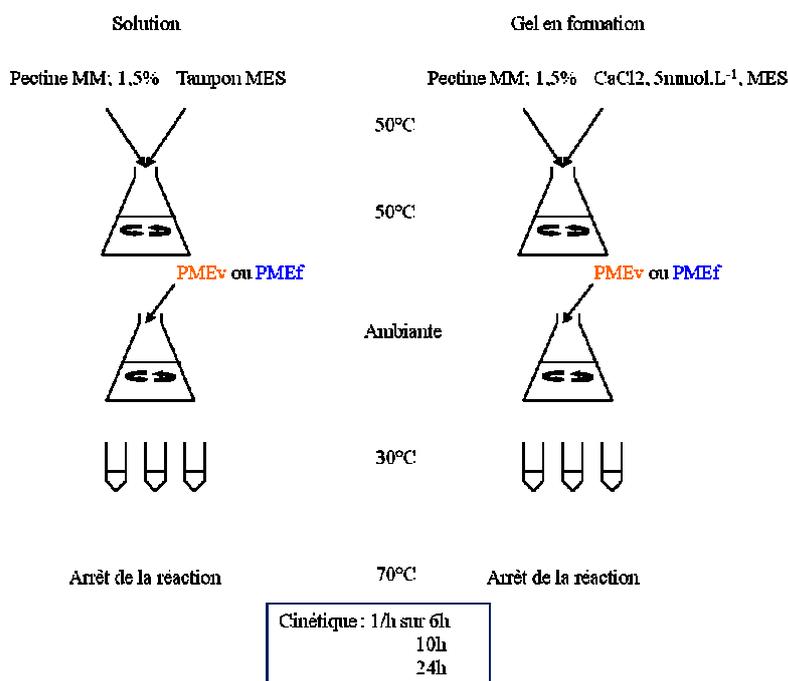


Figure 28 : Protocole employé pour la mesure de l'action des PME dans différents environnements physico-chimiques.

### 5.8.3. En gel préformé

Le mélange pectine-calcium est préparé comme décrit en 5.2. Puis, 3 mL de ce mélange sont coulés dans un cylindre de 1,4 cm de diamètre et 2,5 cm de hauteur, huilé avec de l'huile de paraffine à l'intérieur. Le gel est laissé à température ambiante pendant 15h en conditions d'humidité contrôlée. Puis, une solution de PME (72 µL, concentration finale 0,4 nkat.mL<sup>-1</sup>) est déposée au sommet du gel afin d'étudier sa migration pendant 6 ou 24h. Sur chaque échantillon, les DM et DBabs sont déterminés en double. La migration de l'Aa-PME

sur 6h a été répétée 7 fois et 2 fois sur 24h . La migration de l'O-PME sur 6h a été répétée 3 fois et sur 24h, 2 fois

## **5.9. Caractérisation rhéologique des gels de pectines**

### **5.9.1. Généralités sur la rhéologie**

La rhéologie désigne la science de la déformation et de l'écoulement de la matière. La caractérisation rhéologique d'un échantillon consiste soit à appliquer une contrainte ( $\sigma$ ) et à mesurer sa déformation ( $\gamma$ ), soit à lui appliquer une déformation et à mesurer la contrainte correspondante. La contrainte est la force appliquée par unité de surface du fluide considéré.

### **5.9.2. La caractérisation des propriétés viscoélastiques**

L'analyse dynamique consiste à imposer à l'échantillon une contrainte de cisaillement oscillatoire de pulsation donnée  $\omega$ . C'est un régime harmonique permanent. Au cours de ce mouvement périodique, la contrainte  $\sigma(t)$  et la vitesse de déformation  $\gamma(t)$  évoluent sinusoïdalement au cours du temps avec la même pulsation ( $\omega$ ), mais en présentant un certain déphasage ou angle de perte ( $\delta$ ) l'un par rapport à l'autre (Figure 29) :

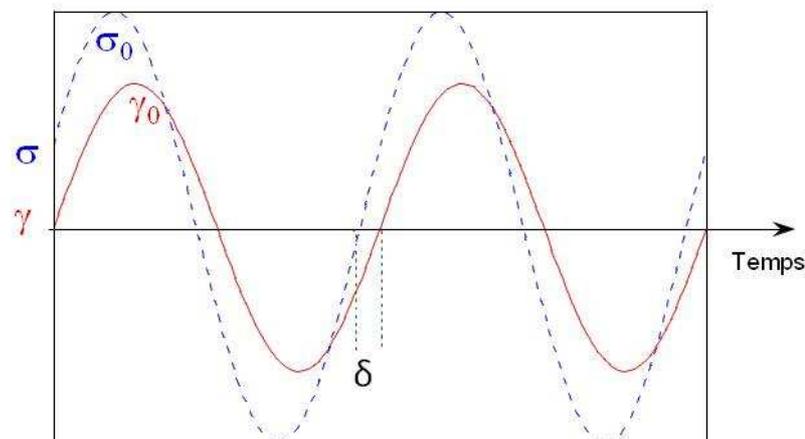


Figure 29 : Principe de l'essai harmonique : évolution de  $\sigma$  et  $\gamma$  en fonction du temps.

La vitesse de déformation peut être décrite par :

Equation 5.9.2 I :  $\gamma(t) = \gamma_0 \cos(\omega t)$

La contrainte peut être décrite par :

$$\text{Equation 5.9.2 II : } \sigma(t) = \sigma_0 \cos(\omega t + \delta)$$

avec  $\gamma_0$  et  $\sigma_0$ , respectivement les amplitudes maximales de la déformation et de la contrainte. La valeur de l'angle de perte  $\delta$  entre la contrainte et la déformation permettent de distinguer les systèmes purement élastiques ( $\delta = 0$ ), purement visqueux ( $\delta = \frac{\pi}{2}$ ) et viscoélastiques ( $0 < \delta < \frac{\pi}{2}$ ).

Pour faciliter les calculs, les notations complexes sont utilisées :

$$\text{Equation 5.9.2 III : } \gamma^* = \gamma_0 e^{i\omega t}$$

$$\text{Equation 5.9.2 IV : } \sigma^* = \sigma_0 e^{i(\omega t + \delta)}$$

et l'on définit le module complexe de cisaillement:

$$\text{Equation 5.9.2 V : } G^* = \frac{\sigma^*}{\gamma^*}$$

En remplaçant  $\gamma^*$  et  $\sigma^*$  par leurs expressions respectives, il est possible d'écrire :

$$\text{Equation 5.9.2 VI : } G^* = \left( \frac{\sigma_0}{\gamma_0} \right) (\cos \delta + i \sin \delta)$$

$$\text{Equation 5.9.2 VII : } G^* = G' + iG''$$

Où

$$G' \text{ partie réelle du module complexe } G' = \left( \frac{\sigma_0}{\gamma_0} \right) \cos \delta$$

$$G'' \text{ partie imaginaire du module complexe } G'' = \left( \frac{\sigma_0}{\gamma_0} \right) \sin \delta$$

Ces modules sont définis comme le module conservatif  $G'$  et le module de perte  $G''$ .

Ces modules ont la dimension d'une contrainte en Pa. L'énergie emmagasinée et restituée au cours d'une période est proportionnelle à  $G'$  tandis que l'énergie dissipée par frottement visqueux au cours du même cycle est proportionnelle à  $G''$ . Le déphasage  $\delta$  est relié à ces deux

modules par la relation :  $\tan \delta = \frac{G''}{G'}$ . Toutes les grandeurs rhéologiques dynamiques décrites

(déphasage  $\delta$ , modules  $G^*$ ,  $G'$  et  $G''$ ) dépendent de la substance considérée, de la température, mais aussi de la pulsation du cisaillement  $\omega$ . La variation de  $G'$  et  $G''$  en fonction de la pulsation permet de caractériser le comportement viscoélastique du milieu et renseigne sur sa structure (Figure 30). Cette mesure est valable si la contrainte est située dans le régime viscoélastique linéaire, *i.e.* le régime dans lequel la contrainte est proportionnelle à la déformation.

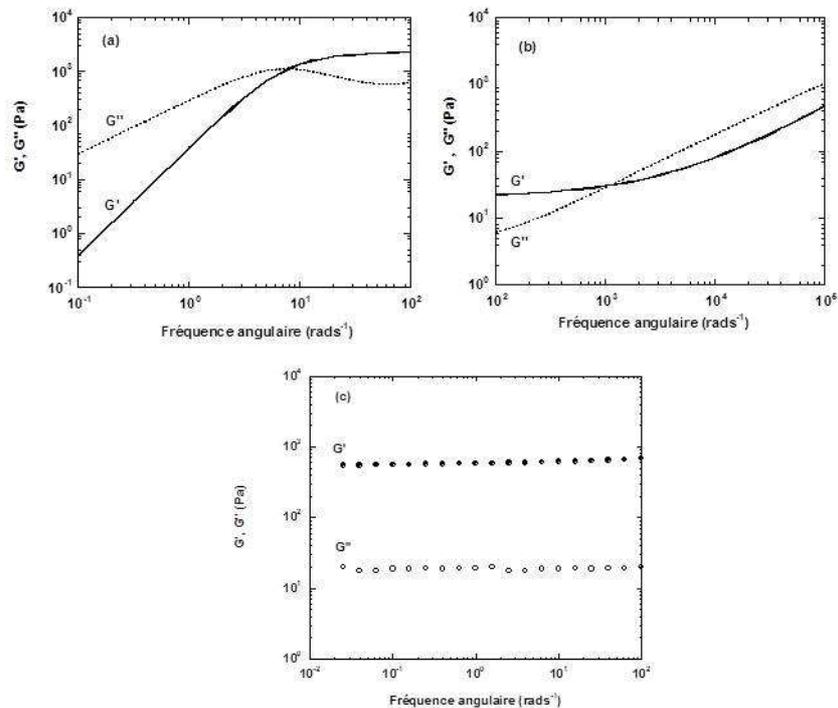


Figure 30 : Représentation schématique de comportements typiques de spectres mécaniques.  
 (a) : Solution macromoléculaire ; (b) : Gel faible ; (c) : Gel rigide.

### 5.9.3. Caractérisation d'un gel de pectines

Les propriétés rhéologiques des systèmes avec et sans PME ont été caractérisées grâce à un rhéomètre à contrainte imposée (AR 2000, TA Instruments, Sierrey, Grande-Bretagne). La géométrie utilisée est une géométrie cône-plan (rayon : 20 mm, angle de troncature  $\psi$ : 2°, entrefer : 98  $\mu$ m) (Figure 31). Le cisaillement est assuré par l'application d'un couple sur l'axe du corps de mesure. Le couple imposé minimal selon le constructeur est de 0,1  $\mu$ N.m. La mesure de la déformation se fait par un capteur de déplacement angulaire. La résolution

angulaire est de  $0,04 \mu\text{rad}$ . La température du plateau du rhéomètre est contrôlée par un thermostat à effet Peltier. L'échantillon est déposé sur le plateau du rhéomètre.

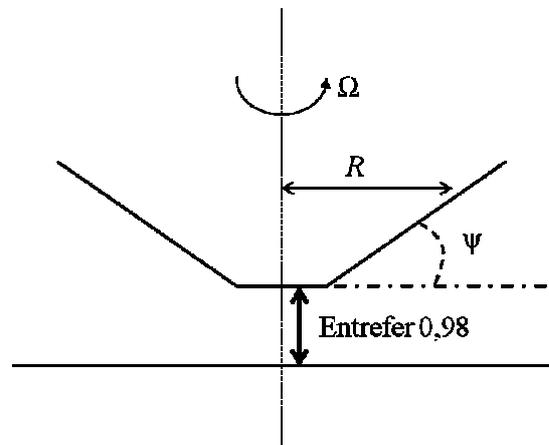


Figure 31 : Système cône plan.

Où  $R$  est le rayon du cône,  $\psi$  est l'angle de troncature du cône et  $\Omega$  correspond au couple appliqué sur l'axe de mesure.

Le mélange pectine-calcium est préparé comme indiqué en § 5.2 ou en § 5.8.2., puis déposé sur le plateau du rhéomètre préchauffé à  $50^\circ\text{C}$ . Après avoir descendu le cône jusqu'à l'entrefer, l'échantillon est recouvert d'huile de paraffine pour éviter l'évaporation. Dans un premier temps, on effectue un suivi de  $G'$  et  $G''$  en fonction du temps à pulsation constante ( $1 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$ ) et à une déformation de 1%. Cette cinétique permet d'avoir des informations sur l'évolution de la structuration. Puis la variation de  $G'$  et  $G''$  est mesurée en fonction de la fréquence ( $0,01$  à  $100 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$ ) à une déformation de 1% (spectre mécanique). Cette étape permet de caractériser la structure de l'échantillon. Pour terminer la séquence, un balayage en déformation est réalisé pour vérifier que la déformation choisie était bien située dans le régime de la viscoélasticité linéaire.

## **5.10. Caractérisation de la diffusion des PME**

### **5.10.1. Marquage des PME**

Les PME subissent un marquage fluorescence pour pouvoir permettre leur observation en FCS et FRAP. Le marqueur fluorescent choisi est l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). Sa masse molaire est de  $389,38 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Son maximum d'excitation est à  $494 \text{ nm}$  et son maximum d'émission est à  $518 \text{ nm}$ . Au cours du marquage d'une protéine, le FITC se fixe sur les groupements amines des chaînes latérales des lysines.

Le protocole employé pour le marquage est le suivant :

L'Aa-PME ou O-PME sont mises en solution dans un tampon carbonate à pH 9 (21 mg.mL<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 16,8 mg.mL<sup>-1</sup> de NaHCO<sub>3</sub>) pour une concentration finale en protéine de 10 mg.mL<sup>-1</sup>.

Le FITC est dissous dans un mélange DMSO-eau (v :v, 3/1,5) pour une concentration finale en FITC de 15 mg.mL<sup>-1</sup>.

Ajouter 150 µL de solution de FITC pour 2,85 mL de solution de PME.

Laisser sous agitation pendant 5h à 4°C.

Dialyser contre de l'eau ultrapure pendant 4 jours.

Dialyser contre le tampon MES 10 mmol.L<sup>-1</sup> pendant 3 jours.

Le degré de marquage (M) *i.e.* le rapport du nombre de molécules de FITC par molécule de PME est calculé selon la formule suivante :

$M = \text{Absorbance à 494} / (\text{coefficient d'absorption molaire du FITC} \times [\text{concentration en protéines}])$

Coefficient d'absorption molaire à pH 6 : 17666 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>

Le coefficient d'absorption a été déterminé par une gamme étalon du FITC dans le tampon MES 10mM à pH 6. A l'issue du marquage, M est situé autour de 4.

Ce marquage a été réalisé deux fois sur la même solution de protéines afin d'obtenir une augmentation du marquage. Cependant, aucune augmentation n'a été observée en FCS, ce qui signifie que le marquage était maximum lors de la première étape.

### **5.10.2. La spectroscopie de corrélation de fluorescence couplée à l'excitation à deux photons**

#### **5.10.2.1. Principe**

La spectroscopie de corrélation de fluorescence (« Fluorescence Correlation Spectroscopy », FCS), créée en 1972 par D.Magde, E. Elson et W.W. Webb, est une technique ultra sensible permettant de suivre les opérations dynamiques au niveau de la molécule. Le mouvement des molécules fluorescentes dans un micro volume génère des fluctuations temporelles de la fluorescence émise. L'analyse de l'auto-corrélation de ces fluctuations peut permettre de fournir différents paramètres dont le coefficient de diffusion translationnel des molécules fluorescentes avec une précision submicrométrique. La FCS possède diverses applications, par exemple, le suivi de la diffusion de sondes fluorescentes à

travers un biofilm bactérien (Briandet et al., 2008) ou encore au travers de membranes cellulaires (Schwille *et al.*, 1999; Garcia-Saez & Schwille, 2008).

Nous avons utilisé un dispositif de FCS couplé à l'excitation à deux photons (« Two Photon Excitation », TPE). Cette technique utilise le processus d'absorption non linéaire à deux photons découvert par Göpper - Mayer en 1931. Les fluorophores de l'échantillon sont excités suite à l'absorption simultanée de deux photons d'énergie deux fois plus faible que celle nécessaire pour exciter directement la molécule avec un seul photon. La probabilité de ce type d'absorption est rare et nécessite un flux de photons élevé pour l'excitation des molécules. Le couplage de la FCS à l'excitation à deux photons (TPE-FCS) confère différents avantages :

- Une réduction des dommages causés par le photo-blanchiment :

Le taux d'excitation en TPE dépend de façon quadratique de l'intensité d'illumination. Ainsi pour un faisceau étroitement focalisé, le taux d'excitation décroît rapidement à partir du plan focal. Par conséquent, l'excitation est confinée au point focal de l'objectif (région où la concentration temporelle et spatiale en photons est très élevée). Ce confinement réduit le photo-blanchiment au volume d'excitation.

- Une réduction du bruit de fond :

L'écart entre la longueur d'onde d'excitation à deux photons et celle de la fluorescence émise est important. Cet écart permet d'éviter le bruit de fond lié à la diffusion Raman et Rayleigh de l'eau. L'absorption à un photon est généralement négligeable dans les domaines de longueurs d'onde utilisés.

#### 5.10.2.2. Détermination du coefficient de diffusion

Le laser est focalisé sur une zone précise de l'échantillon définissant le volume d'observation ( $\sim 1$  fL). Les molécules fluorescentes entrent et sortent du volume d'observation. Excitées par les impulsions laser, elles émettent des photons. L'intensité de la fluorescence  $F(t)$  est mesurée au cours du temps (Figure 32). Selon l'évolution de la concentration en molécules dans le volume d'observation, l'intensité de la fluorescence fluctue autour d'une valeur moyenne et ses variations sont notées  $\delta F(t)$ . Le signal est alors corrélé avec lui-même à un temps postérieur. Si les signaux sont identiques, la corrélation est parfaite et est donnée par la valeur 1. Si les signaux sont très différents, il n'y a pas de corrélation, la valeur donnée est 0. Si l'intensité du signal au temps  $t$  est comparée à l'intensité du signal à un temps  $t + \delta t$  très court, il y aura une forte corrélation entre

l'intensité des deux signaux. Mais, plus  $\delta t$  est grand, plus la corrélation diminue. A  $\delta t$  infini, la corrélation est nulle. La fonction d'auto-corrélation matérialise la perte de corrélation au cours du temps. Plus les molécules du volume d'observation sont grosses et diffusent lentement, plus la corrélation est longue. La courbe d'auto-corrélation obtenue possède une amplitude inversement proportionnelle au nombre  $N$  de molécules diffusantes dans le volume d'observation. L'abscisse à mi-hauteur correspond au temps de diffusion des molécules de l'échantillon (Figure 33).

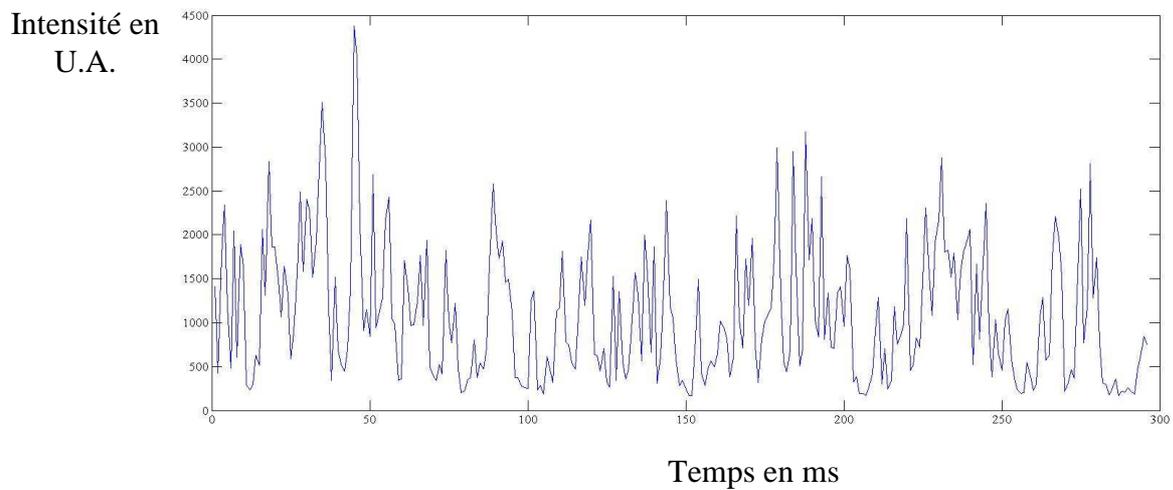


Figure 32 : Fluctuations de l'intensité de fluorescence en fonction du temps.

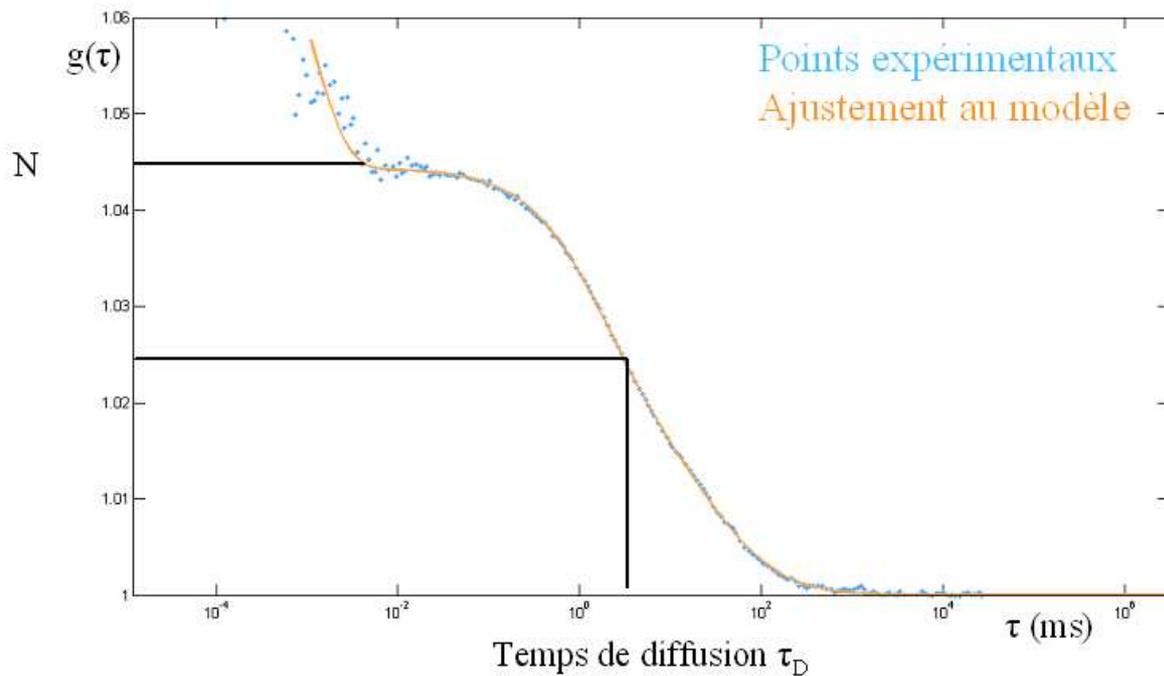


Figure 33 : Courbe d'auto-corrélation et son ajustement avec un modèle.

Dans le cas d'une seule espèce moléculaire, l'évolution temporelle des fluctuations de sa concentration peut être quantifiée *via* les fluctuations correspondantes de fluorescence  $\delta F(t)$  dans le signal de fluorescence  $F(t)$  autour de sa valeur moyenne  $\langle F(t) \rangle$  où  $\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle$  (Hess *et al.*, 2001). La fonction d'auto-corrélation normalisée  $g(\tau)$  d'une fluctuation de fluorescence à un temps donné  $\delta F(t)$  et à un temps postérieur  $\delta F(t + \tau)$  est donnée par l'équation :

Equation 5.10.2 I : 
$$g(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2}$$

Le symbole  $\langle \rangle$  correspond à la moyenne de la fonction au cours du temps.

Ainsi,  $g(\tau)$  contient les informations concernant les fluctuations de la concentration des molécules observées reflétant la dynamique moléculaire du système.

Si l'on suppose que l'intensité du profil d'excitation peut être assimilée à une distribution gaussienne à 3 dimensions, la courbe de corrélation de fluorescence  $g(\tau)$  pour les mouvements browniens de particules fluorescentes peut être ajustée en employant la fonction d'auto-corrélation normalisée suivante :

$$g(\tau) = 1 + \left[ \frac{1}{\sqrt{8} \cdot N} \right] \cdot \left[ \frac{1}{1 + \left( \frac{\tau}{\tau_D} \right)} \right] \cdot \left[ \frac{1}{1 + \left( \frac{\omega_0}{z_0} \right)^2 \cdot \left( \frac{\tau}{\tau_D} \right)} \right]^{\frac{1}{2}}$$

Equation 5.10.2 II :

Avec

N Nombre moyen de particules fluorescentes présentes dans le volume d'excitation

$\tau_D$  Temps de diffusion caractéristique des particules fluorescentes diffusant

$\omega_0$  Largeur du faisceau

$z_0$  Profondeur focale

Les fluctuations de fluorescence d'une molécule donnée se corrèlent entre elles et non avec celles d'autres molécules indépendantes. Lorsque le nombre de molécules augmente dans le volume d'observation, l'effet relatif du passage d'une molécule donnée dans le volume d'excitation sur le signal de fluorescence total diminue, et l'amplitude de la courbe d'auto-corrélation normalisée diminue également. Le nombre de molécules présentes dans le volume d'observation doit ainsi être faible, soit de 1 à 10 molécules ou encore une concentration de l'ordre du nano molaire pour obtenir une corrélation avec une amplitude suffisante.

Il est possible de distinguer deux espèces diffusant dans le volume d'observation sous réserve que leurs temps de diffusion respectifs soient au moins séparés par un facteur  $\sim 1,6$  (Hess *et al.*, 2001).

Dans ce cas, la courbe de corrélation de fluorescence peut être ajustée avec la fonction d'auto-corrélation suivante :

Equation 5.10.2 III :

$$g(\tau) = 1 + \frac{1}{\sqrt{8} \cdot N} \cdot \left\{ \alpha \left[ \frac{1}{1 + \left( \frac{\tau}{\tau_{D1}} \right)} \right] \left[ \frac{1}{1 + \left( \frac{\omega_0}{z_0} \right)^2 \cdot \left( \frac{\tau}{\tau_{D1}} \right)} \right]^{\frac{1}{2}} + (1 - \alpha) \left[ \frac{1}{1 + \left( \frac{\tau}{\tau_{D2}} \right)} \right] \left[ \frac{1}{1 + \left( \frac{\omega_0}{z_0} \right)^2 \cdot \left( \frac{\tau}{\tau_{D2}} \right)} \right]^{\frac{1}{2}} \right\}$$

Où

N Nombre moyen de particules fluorescentes présentes dans le volume d'excitation

$\alpha$  et  $1 - \alpha$  Fraction de la concentration molaire des deux espèces diffusantes

$\tau_{D1}$  Temps de diffusion translationnel des molécules de fraction molaire  $\alpha$

- $\tau_{Dz}$  Temps de diffusion translationnel des molécules de fraction molaire  $1 - \alpha$
- $\omega_0$  Rayon du faisceau laser au point focal
- $z_0$  Profondeur focale

A partir du temps de diffusion  $\tau_D$  extrait, il est possible de calculer le coefficient de diffusion  $D$  à partir de la relation suivante :

Equation 5.10.2 IV : 
$$D \approx \frac{\omega_0^2}{8 \tau_D}$$

Où

- $D$  Coefficient de diffusion en  $\text{mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$
- $\omega_0$  Rayon du faisceau laser au point focal en mm ( $4,2 \cdot 10^{-4}$  mm)
- $\tau_D$  Temps de diffusion en s

### 5.10.2.3. Montage et conditions expérimentales

L'échantillon est déposé dans deux systèmes différents selon sa nature (solution ou gel). Des chambres de 8 puits à fond lamelle de verre (Lab-Tek, Nunc) sont utilisées pour l'analyse de la diffusion en gel ou en gel en cours de formation, tandis que pour l'analyse des solutions, un dépôt  $\sim 40 \mu\text{L}$  est réalisé sur une lamelle de verre. L'échantillon est placé sur l'objectif (Zeiss Plan apochromat., x63, immersion à l'huile, ouverture numérique 1, 4) d'un microscope inversé (Zeiss Axiovert 135, Heidelberg, Allemagne). Il reçoit des impulsions laser provenant d'un laser Titane saphir (MIRA 900, Coherent Inc., Santa Clara, CA, USA). Il s'agit d'un laser impulsif femtoseconde dont les caractéristiques sont les suivantes :

Fréquence : 76 MHz

Temps d'une impulsion :  $\sim 100$  fs

Gamme de longueurs d'onde accessibles : 690-930 nm

Puissance moyenne du laser en sortie de cavité : 1 W

Ce laser est pompé par un laser à l'état solide à onde continue (VERDI, Coherent Inc., Santa Clara, CA, USA).

La longueur d'onde employée lors de l'expérience est de 800 nm. La puissance du laser est ajustée sur l'échantillon grâce à une roue de densité optique neutre variable placée sur le trajet du faisceau laser et fixée à 75 mW. La fluorescence est détectée par un photomultiplicateur (R7205-01 ; Hamamatsu, Hamamatsu, Japon). Celui-ci va capter les photons émis dans le

volume confocal (0,5 - 1 fL) à une fréquence très élevée (20 MHz), ce qui équivaut à 50 données par nano seconde. La durée de l'acquisition varie entre 30 et 60 secondes. La mesure est répétée de 10 à 20 fois, soit sur une durée comprise entre 10 et 20 minutes pour une expérience. Le signal est corrélé grâce à un corrélateur commercial (Flex2kx2-12, Correlator, USA). Toutes les courbes d'auto-corrélation ont été ajustées avec un modèle à deux composantes selon l'équation 5.10.2 III avec le module Curvefit du logiciel Matlab. Les différentes expériences ont été répétées et les courbes expérimentales moyennées entre elles avant la détermination du coefficient de diffusion.

### **5.10.3. Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP)**

#### 5.10.3.1. Principe

Lorsque les molécules fluorescentes sont soumises à un rayonnement de forte intensité qu'elles sont susceptibles d'absorber, elles peuvent perdre leur fluorescence par photoblanchiment (« photobleaching »), lié le plus souvent à un processus de photo-destruction de l'échantillon. Directement après la photo-destruction, les molécules de fluorescence intacte situées autour de la région éteinte commencent à diffuser vers la région éteinte. Simultanément, les molécules photo-détruites quittent la région éteinte. Pour suivre ces mouvements moléculaires, les molécules sont excitées avec un rayonnement de même longueur d'onde, mais de faible puissance. De cette manière, les molécules ne sont pas photo-détruites et le retour de fluorescence dans la zone photo-blanchie peut être visualisé. Ce retour est directement lié à la diffusion des molécules. C'est le principe des mesures de FRAP illustré en figure 34. La courbe de retour de fluorescence est ensuite ajustée avec un modèle mathématique.

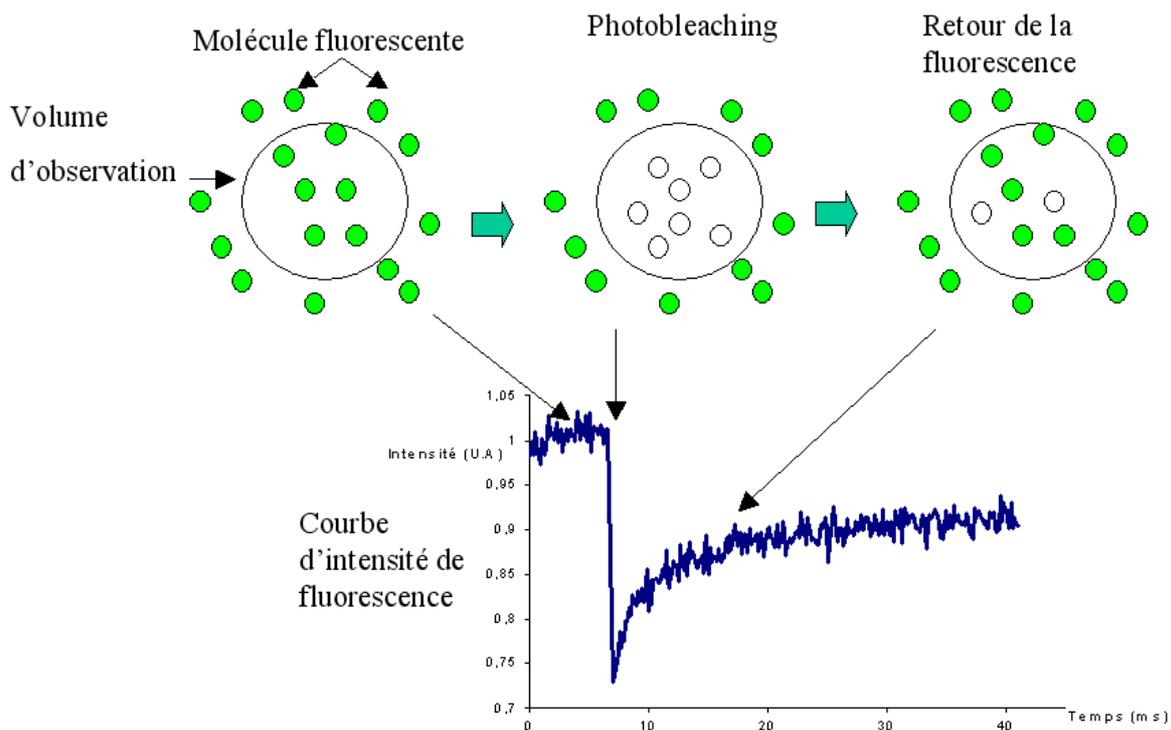


Figure 34 : Principe de la FRAP.

#### 5.10.3.2. Montage et conditions expérimentales

Le suivi s'effectue grâce à un microscope confocal inversé (Leica TCS SP5, Leica Microsystems, Wetzlar, Allemagne) avec un objectif à immersion à huile (x63, ouverture numérique 1,4). Dans un tel microscope, un laser UV – visible est utilisé comme source d'excitation et déplacé sur l'échantillon au moyen d'un système de miroirs galvanométriques. La fluorescence émise par l'échantillon au point focal de l'objectif est ensuite isolée de celle émise dans les plans sur- et sous-jacents au moyen d'un trou de filtrage, ce qui permet d'obtenir des images mieux contrastées qu'en microscopie d'épifluorescence conventionnelle. Dans le présent système, l'échantillon, déposé sur une lamelle en verre pour les solutions ou sur une plaque Labtech pour les systèmes gélifiés, est excité au moyen d'un laser argon à 488 nm. L'étape de bleach est réalisée à la puissance maximale  $P_{\text{bleach}}$  du laser comprise entre 4,6 mW et 5,1 mW. L'acquisition des images pré-bleach et post-bleach est réalisée avec une puissance  $P_{\text{obs}}$  du laser de ~0,1 mW et 0,11 mW (puissance mesurée à la pupille arrière de l'objectif). La fluorescence est alors collectée entre 500 et 700 nm.

La taille des images d'intensité de fluorescence est de 512 x 128 pixels avec une taille de pixel de 80,25 nm, soit une taille d'échantillon balayé de 41,01  $\mu\text{m}$  sur 10,19  $\mu\text{m}$ . Le balayage laser de l'échantillon est effectué de manière bidirectionnelle à une fréquence de 1400 Hz.

L'intervalle de temps entre deux images est de 133 ms et chaque image résulte de la moyenne de deux balayages de l'échantillon. La résolution des images est de 16 bits.

Chacune des expériences de FRAP débute par l'acquisition de 50 images d'intensité de fluorescence à la puissance  $P_{obs}$ , suivie par l'étape de bleach en un point de l'échantillon de  $0,8 \mu\text{m}$  de diamètre à la puissance  $P_{bleach}$ , bleach dont la durée est comprise entre 100 et 500 ms en fonction des échantillons. Chacune des expériences de FRAP est réalisée en triple et 2 répétitions sont effectuées.

Pour améliorer l'ajustement au modèle, les courbes expérimentales de retour de fluorescence peuvent être moyennées les unes avec les autres. Afin d'effectuer les moyennes, les courbes sont superposées pour évaluer leur similarité. Puis la taille de la zone de bleach est calculée à partir de la séquence d'images. Pour cela, le profil d'intensité de la première image post-bleach est réalisé. Il s'agit de mesurer les variations d'intensité le long d'une ligne (Figure 35) (Waharte *et al.*, 2010).

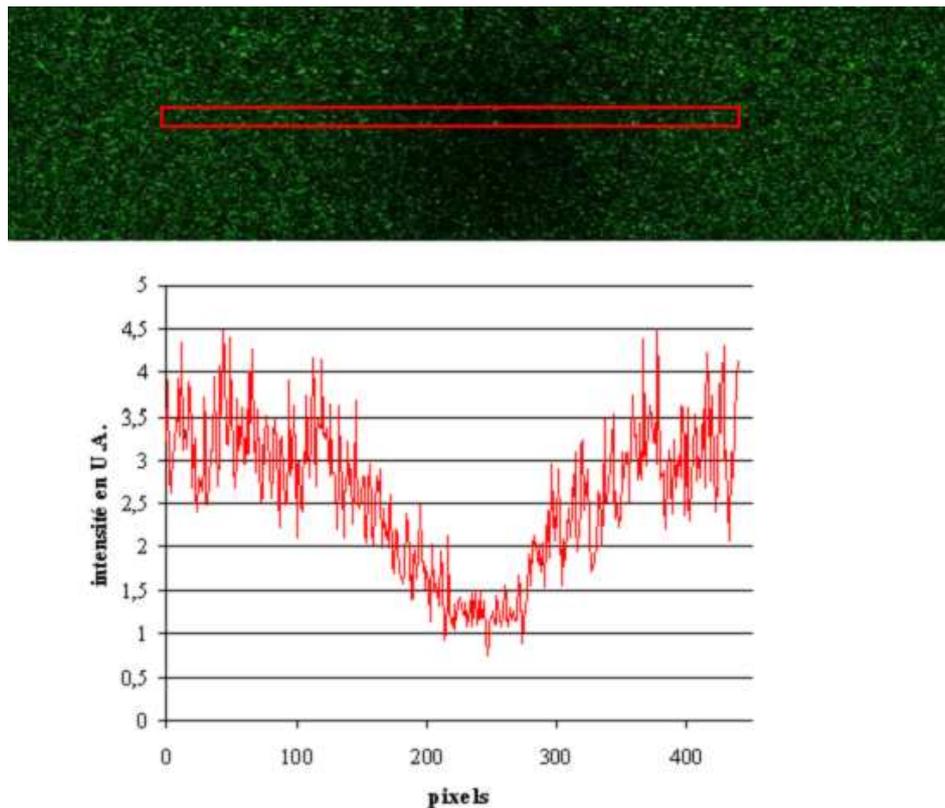


Figure 35 : Principe du fit d'un profil.

Dans le cas où les courbes et la zone de bleach des différentes expériences sont similaires, une moyenne peut être réalisée.

### 5.10.3.3. Détermination du coefficient de diffusion

Les images sont acquises à une puissance de laser ne provoquant pas ou très peu de photo-destruction sur l'échantillon. L'extraction des courbes de retour de fluorescence s'effectue à partir des séquences d'images réalisées et des régions d'intérêt sélectionnées sur ces images. Les courbes sont normalisées à 1, puis ajustées avec le modèle suivant (Waharte *et al.*, 2010) :

Equation 5.10.3 I : 
$$C(x, y, t) = \left( \frac{C_0 W^2}{8Dt + W^2} \right) \cdot e^{-\left( \frac{2(x^2 + y^2)}{8Dt + W^2} \right)}$$

Où

$C(x, y, t)$  Fonction décrivant la concentration des molécules sur un plan xy en fonction du temps

$C_0$  Concentration initiale en molécules diffusantes

$D$  Coefficient de diffusion

$W$  Largeur de la zone de bleach

Ce modèle provient de la résolution analytique de l'équation différentielle classique de la diffusion dans un plan (Equation 5.10.3 II) et de la description du phénomène de photo-destruction.

Equation 5.10.3 II : 
$$\frac{\partial C}{\partial t}(x, y, t) = D \Delta C(x, y, t)$$

La diffusion des molécules durant l'étape de bleach est négligée car le temps de bleach est considéré comme très court par rapport au temps de diffusion des molécules. Une courbe de retour de fluorescence ainsi que son traitement selon le modèle analytique décrit précédemment sont illustrés en figure 34.

### 5.10.4. Diffusion de la PME dans un gel préformé

La diffusion macroscopique a été caractérisée sur un gel préformé. Le but de cette expérience est de suivre et quantifier la migration de l'enzyme au sein du gel.

#### 5.10.4.1. Essais préliminaires

La première étape a été de mettre au point les conditions de concentration en calcium et en pectine pour obtenir un gel suffisamment résistant pour pouvoir être découpé en tranches. Le type de géométrie choisi est un cylindre assez large (diamètre 3 cm, hauteur 3 cm) dans lequel 3 mL de gel ont été coulés. Plusieurs essais ont été réalisés et les concentrations de 0,9 % et 5 mmol.L<sup>-1</sup> ont été choisies. Les expériences de diffusion ont débuté dans un premier temps avec le FITC (Figure 36). Une encoche est réalisée dans le gel et 100 µL d'une solution de FITC (50 µmol.L<sup>-1</sup>) y sont déposés. Le temps de migration est fixé à 4h, puis le gel est tranché. Les tranches sont alors diluées et refondues et le FITC est dosé en spectrométrie visible à 488 nm. La répartition de la concentration en FITC dans le gel s'est révélée très variable. La cause probable est que la diffusion s'effectue principalement sur les bords du gel.

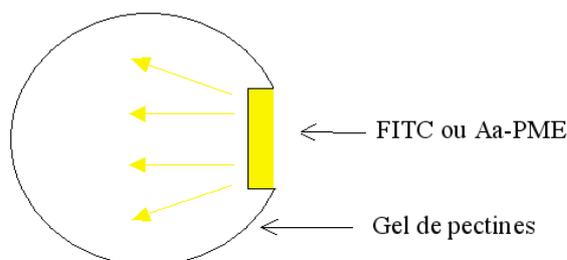


Figure 36 : Système expérimental vu de dessus.

Un essai de diffusion a ensuite été réalisé avec l'Aa-PME dans ce même système. Dans ce cas, la présence de l'Aa-PME a été révélée par détection immunologique grâce à un anticorps de lapin anti-PME d'*Aspergillus niger* obtenu à l'INRA de Nantes (Guillemin *et al.*, 2006). Des tests ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) ont été réalisés pour vérifier l'absence de réaction de cet anticorps avec la pectine et sa reconnaissance de l'Aa-PME. Une empreinte de la migration de l'Aa-PME dans le gel est réalisée par transfert sur une membrane de nitrocellulose (Figure 37). Puis la membrane est incubée avec l'anticorps anti-PME qui se lie à la PME adsorbée sur la membrane. La présence de l'anticorps est révélée par un anticorps anti-lapin couplé à une peroxydase. En présence de 4-chloro-1-naphtol et de peroxyde d'hydrogène, la peroxydase conduit à la formation d'une coloration bleue. Cette expérience a confirmé les effets de bords très importants liés à notre système expérimental (Figure 37).

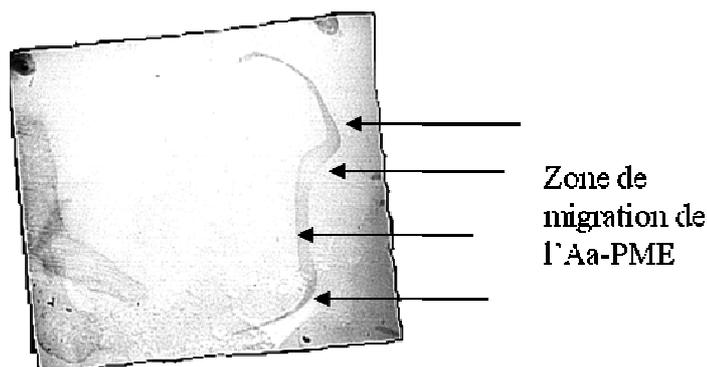


Figure 37 : Empreinte obtenue après migration de l'Aa-PME dans un gel de pectines.

Ces différents résultats nous ont conduits à modifier le système expérimental en réduisant la taille du cylindre et en effectuant une migration verticale de l'enzyme (*cf.* § 5.10.4.2).

Par ailleurs, plusieurs méthodes ont été testées pour le dosage de la PME et sa détection au cours de la migration. Les critères pour le choix de cette méthode sont, d'une part, la possibilité de doser l'Aa-PME, l'O-PME et leurs formes inactives, et d'autre part, la sensibilité de la méthode. La méthode immunologique a été abandonnée pour la première raison : l'anticorps ne reconnaît pas la forme inactive de l'Aa-PME. La concentration en PME a été déterminée en mesurant l'absorbance à 280 nm dans les solutions préparées à partir des tranches de gel et en calculant la concentration en protéine correspondante. Mais cette technique n'a pas permis pas d'évaluer correctement la concentration de la protéine car elle manquait de sensibilité. Le choix s'est alors porté sur une détection indirecte via l'activité de la PME sur la pectine. Un essai de dosage du DM par une méthode colorimétrique au rouge de ruthénium ( $\text{Ru}_2(\text{OH})_2\text{Cl}_4 \cdot 7\text{NH}_3, 3\text{H}_2\text{O}$ ) a été réalisé (Hou *et al.*, 1999). Le rouge de ruthénium se lie spécifiquement aux GalA libres et est souvent utilisé pour révéler la présence des pectines en microscopie ou la présence d'une activité PME (Downie *et al.*, 1998). La mise au point du protocole n'a pas abouti, les résultats obtenus étant très variables. Le dosage du DM a été aussi réalisé par dosage du méthanol libéré à partir de la pectine après saponification. Ce dosage est basé sur le même principe que celui décrit en § 5.5. Mais cette technique est assez longue.

De façon indirecte, le suivi de la diffusion de la PME a été réalisé en analysant l'action de la PME sur les pectines par le dosage du DM en spectroscopie infrarouge (*cf.* § 5.3.2.2) et du DBabs (*cf.* § 5.4). Néanmoins, pour calculer un coefficient de diffusion, il faut pouvoir avoir accès à l'évolution de la concentration en enzyme le long de sa migration. Pour cela, la diffusion de la PME-marquée au FITC (*cf.* § 5.10.4.4) a permis de suivre l'évolution de la

quantité de PME diffusant tout au long du gel en déterminant tranche par tranche la quantité de PME en FCS (*cf.* § 5.10.2).

#### 5.10.4.2. Le système expérimental

Un gel de pectines est coulé dans un moule comme décrit au § 5.2. Après avoir déposé la PME sur le sommet du gel, le gel est placé dans une étuve à 30°C. La migration a été réalisée pendant deux temps différents, 6 et 24h. Le gel est ensuite démoulé et découpé en tranches avec une lame de rasoir (Figure 38). Les tranches sont déposées dans des micro-tubes tarés et pesés. Une tranche représente une masse de gel située en moyenne entre 0,1 et 0,2 g.

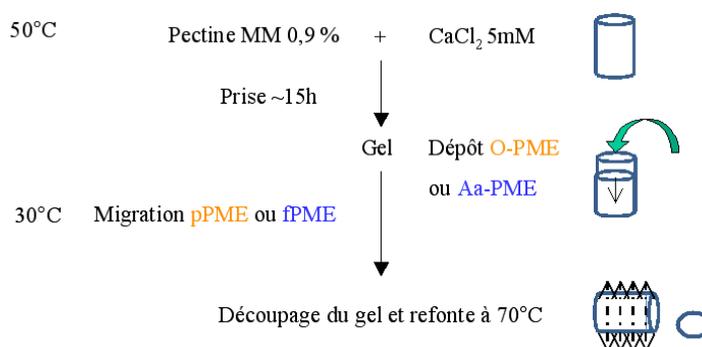


Figure 38 : Description du système expérimental pour la diffusion de PME en gel préformé.

#### 5.10.4.3. Caractérisation de l'activité de la PME dans le gel de pectines préformé

Suite à la pesée de chaque tranche, une quantité suffisante de tampon MES est ajoutée pour obtenir une concentration finale en pectines de 0,12%. L'inactivation thermique de la PME et la refonte du gel sont alors réalisées à 70°C pendant 10 minutes. Puis le DM (*cf.* § 5.3.2.2) et le DBabs (*cf.* § 5.4) sont déterminés comme précédemment décrit.

#### 5.10.4.4. Caractérisation de la diffusion de la PME marquée au FITC

La PME marquée est déposée au sommet du gel comme précédemment. Suite à la découpe du gel et à la pesée des tranches, la PME est simplement inactivée à 70°C sans dilution. Les tranches sont ensuite congelées avant d'être analysées en FCS à température ambiante. Elles sont déposées sur une lame de verre. Le nombre de molécules diffusant dans le volume d'observation est obtenu grâce aux ajustements des courbes expérimentales (*cf.* § 5.10.2). Deux acquisitions ont été réalisées pour chacune des tranches. Cette expérience a été

réalisée uniquement sur l'Aa-PME active et inactivée. La diffusion a été réalisée en quadruple pour les deux conditions.

La diffusion au niveau global a été caractérisée sur un gel préformé. Le suivi de la diffusion de la PME a été réalisé d'une part, en analysant l'action de la PME sur les pectines par le dosage du DM (*cf.* § 5.3.2.2) et du DBabs (*cf.* § 5.4), et d'autre part, la diffusion de la PME-marquée au FITC (*cf.* § 5.10.4.4) a permis de suivre l'évolution de la quantité de PME, déterminée en FCS (*cf.* § 5.10.2), diffusant tout au long du gel.



## **Résultats et discussion**



## **6. Influence du calcium sur le comportement des PME dans différents systèmes pectiques**

### **6.1. Détermination des paramètres cinétiques des PME**

L'ensemble de ce travail a été mené à pH 6 et à 30°C, conditions choisies pour permettre la gélification des pectines et l'activité des deux enzymes utilisées. Or ces conditions ne correspondent pas aux paramètres physico-chimiques optimaux de l'Aa-PME et l'O-PME. De plus, les PME sont sensibles à la présence de sels. Il est donc important de connaître l'impact du calcium sur l'activité de l'O-PME et de l'Aa-PME. L'activité spécifique ainsi que les paramètres cinétiques ont donc été déterminés à pH 6 et 30°C en présence et en absence de calcium (Tableau 6). En présence de calcium, on observe une forte augmentation de l'activité pour l'Aa-PME alors qu'elle est plus discrète pour l'O-PME.

<b>Origine de la PME</b>	<b>Activité spécifique (nkat.mg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Activité spécifique en présence de 5 mmol.L<sup>-1</sup> de calcium (nkat.mg<sup>-1</sup>)</b>
<b>Aa-PME</b>	37,7 +/-2,5	126,6 +/-2,3
<b>O-PME</b>	31,9 +/-2,7	42,3 +/- 4,8

Tableau 6 : Activités spécifiques de l'Aa-PME et O-PME en présence ou en absence de calcium.

L'augmentation de l'activité en présence de calcium a déjà été observée pour l'Aa-PME à pH 4,6 sur une pectine de pomme HM et pour l'O-PME sur une pectine de *citrus* HM à 30°C, et à pH 6. Cet effet positif du calcium sur l'activité des deux enzymes est donc indépendant du DM initial du substrat.

Les différentes modélisations du site actif des PME lui associent une chaîne pectique dans la conformation 2<sub>1</sub> (Jolie *et al.*, 2010). La dé-estérification en présence de calcium pourrait favoriser cette modification de conformation et favoriser l'activité de la PME. L'augmentation de l'activité spécifique en présence de calcium est également à mettre en relation avec les autres paramètres catalytiques (Christgau *et al.*, 1996; Slavov *et al.*, 2009).

Les constantes catalytiques ont été déterminées en traçant la représentation de Lineweaver et Burk (Figure 39 et 40) pour l'O-PME et l'Aa-PME. La détermination de la constante de Michaëlis permet d'évaluer l'affinité d'une enzyme vis-à-vis de son substrat. Une enzyme efficace est définie par un  $K_m$  faible et une vitesse maximale élevée. Dans le cas de l'O-PME, la présence de calcium conduit à une augmentation de  $K_m$  et une augmentation de  $V_{max}$ , ce qui se traduit par une diminution de l'affinité de l'enzyme pour son substrat et une augmentation de la vitesse de catalyse de l'enzyme (Figure 39).

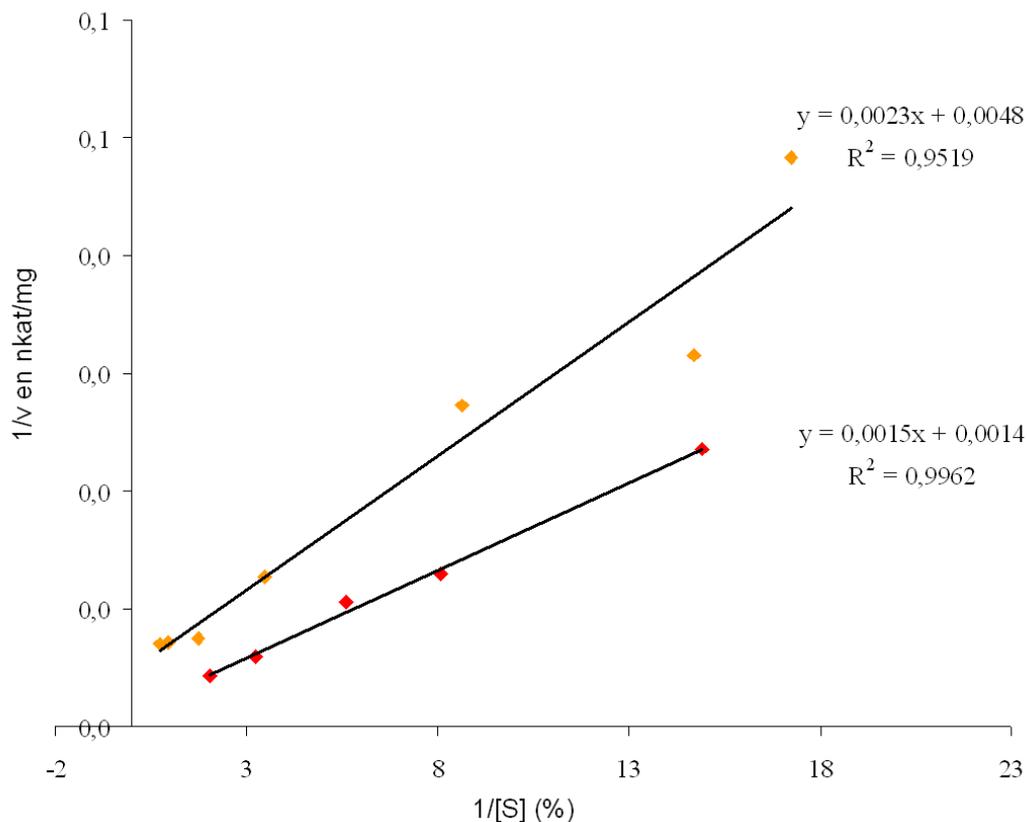


Figure 39 : Représentation de Lineweaver et Burk pour l'O-PME en présence (rouge) ou en absence (orange) de calcium 5 mM.

Pour l'O-PME, en absence de calcium, le  $K_m$  obtenu ( $4,8 \text{ mg.ml}^{-1}$ ) est élevé en comparaison avec celui de la littérature (Tableau 7). Cette augmentation de  $K_m$  peut s'expliquer car le DM initial de la pectine employée est faible : une diminution de l'affinité en fonction du DM a déjà été observée (Christensen *et al.*, 1998). Par ailleurs, le pH utilisé ici ne correspond pas au pH optimal de l'enzyme, ce qui amoindrit l'affinité de l'enzyme pour son substrat.

Origine	Conditions	$K_m$	$V_{max}$
<i>Citrus sinensis</i> (Cette étude)	Pectine de <i>citrus</i> : DM 46% pH 6, MES 50 mM	PME 2: 4,8 mg.mL <sup>-1</sup>	35,7 $\mu\text{mol.min}^{-1}$ . mg de protéines <sup>-1</sup>
<i>Citrus sinensis</i> (Cette étude)	Pectine de <i>citrus</i> : DM 46% pH 6, MES 50 mM Ca <sup>2+</sup> 5 mmol.L <sup>-1</sup>	PME 2 : 10,7 mg.mL <sup>-1</sup>	122,4 $\mu\text{mol.min}^{-1}$ . mg de protéines <sup>-1</sup>
<i>Citrus sinensis</i> (L.) var. Valencia (Cameron <i>et al.</i> , 1994)	Pectine de <i>citrus</i> DM 68-73%	PME 3 : 0,03 mg.mL <sup>-1</sup>	1,4 $\mu\text{equ.min}^{-1}$
<i>Citrus sinensis</i> (L.) Var. Valencia (Cameron <i>et al.</i> , 2003)	Pectine de <i>citrus</i> DM 59% pH 7,5 0,2 M NaCl	PME 4 : 0,0487 mg.mL <sup>-1</sup>	4,2 nkat.mg <sup>-1</sup> protéines
<i>Citrus sinensis</i> var. Navel (Christensen <i>et al.</i> , 1998)	Pectine de betterave DM 60% Pectine de <i>Citrus</i> DM 70% et 25% pH 7, 30°C 0,15 M NaCl	8 mg.mL <sup>-1</sup>  0,7 et 17 mg.mL <sup>-1</sup>	
<i>Citrus sinensis</i> cv. Pera-rio (Do Amaral <i>et al.</i> , 2005)	Pectine de <i>citrus</i> pH 8 0,15 M NaCl	0,3 mg.mL <sup>-1</sup>	5,2 $\mu\text{mol. ml}^{-1}$ mg de protéines <sup>-1</sup>
Pomelo (Seymour <i>et al.</i> , 1991)	pH 7, 25°C 0.1 M NaCl	PME thermolabile (TL) 0,2 mg.mL <sup>-1</sup> PME thermostable (TS)1,02 mg.mL <sup>-1</sup>	TL 0,7 $\mu\text{mol.min}^{-1}$ . $\mu\text{g}^{-1}$ TS 0,5 $\mu\text{mol.min}^{-1}$ . $\mu\text{g}^{-1}$

Tableau 7: Caractéristiques catalytiques de différentes PME végétales.

En absence de calcium, la  $V_{max}$  obtenue est proche des données de la littérature (Tableau 7). La présence de calcium conduit à une augmentation du  $K_m$  et du  $V_{max}$  (Figure 39). L'O-PME présente donc dans ces conditions une affinité moindre pour la pectine MM avec une vitesse de réaction accrue.

Il a été montré, pour l'O-PME, que le calcium peut avoir un effet d'activation à condition de rester dans une gamme de concentrations donnée. En effet, l'O-PME est inhibée par la présence d'acide polygalacturonique. La présence de calcium induit la formation de dimères pectine-pectine diminuant la quantité de GalA accessibles dans le milieu. Au-delà de

cette concentration limite ( $4 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) (Charnay *et al.*, 1992), le calcium se comporte comme un inhibiteur compétitif vis-à-vis de l'O-PME. Pourtant, il n'interagit pas avec l'enzyme. En effet, la mesure de l'activité de la PME en présence de bleu de méthylène présente une activation comparable à la présence de calcium sans toutefois induire une inhibition au-delà de la concentration limite déterminée pour les ions métalliques (Charnay *et al.*, 1992). Ce comportement peut s'expliquer par une compétition entre le calcium et la PME pour les GalA libres des pectines. En effet, l'activité de l'O-PME nécessite la présence d'un GalA libre contigu au GalA méthylé pour permettre la fixation de l'enzyme. La concentration de calcium choisie ici est de  $5 \text{ mmol.L}^{-1}$ . Les constantes catalytiques obtenues pour l'O-PME peuvent s'expliquer par un équilibre entre l'effet d'activation et de compétition par les ions calcium.

En présence de calcium, on observe une diminution du  $K_m$  et du  $V_{\max}$  de l'Aa-PME, ce qui se traduit par une affinité plus importante pour le substrat et une diminution de la vitesse maximale de réaction (Figure 40).

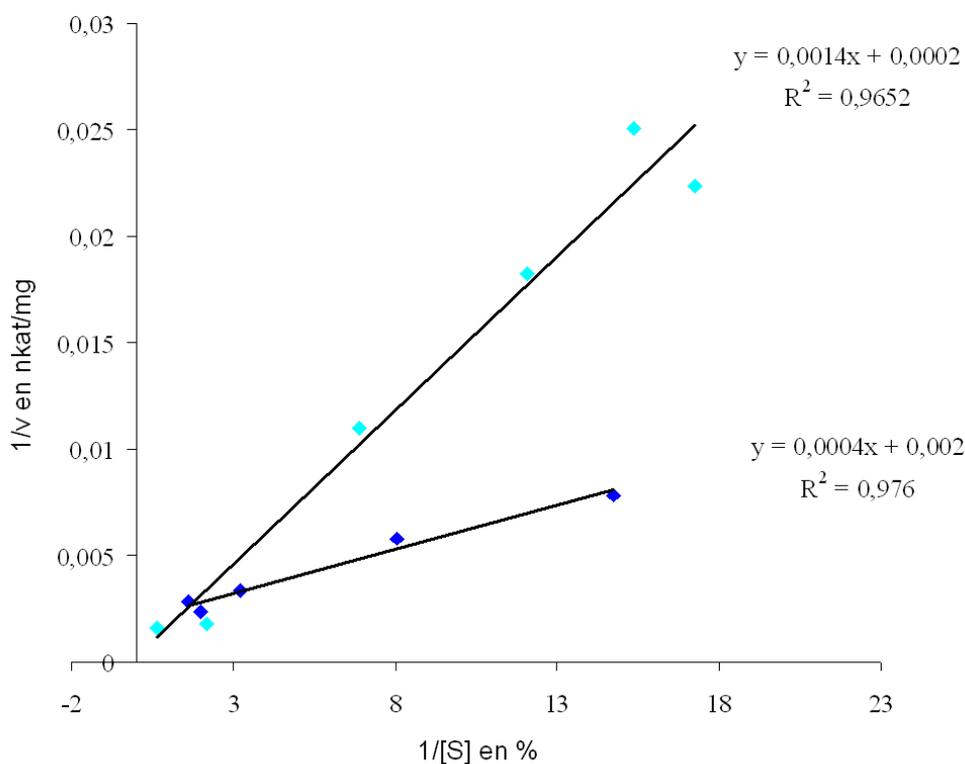


Figure 40 : Représentation de Lineweaver et Burk pour l'Aa-PME en présence (bleu foncé) ou en absence (bleu clair) de calcium 5 mM.

De plus, il a été montré que l'Aa-PME n'a pas besoin d'acides galacturoniques libres pour se lier à la pectine puisqu'elle peut agir sur un substrat totalement estérifié (Massiot et al., 1997), et qu'elle n'est pas inhibée par l'acide polygalacturonique (Christgau et al., 1996).

En absence de calcium, une diminution de l'affinité de l'Aa-PME est observée pour la pectine MM à pH 6 : le  $K_m$  obtenu ( $133 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) est plus élevé que celui obtenu sur la pectine HM à pH 4,8 (Tableau 8). L'Aa-PME est donc moins affine pour les pectines moyennement méthylées.

Origine	Conditions	$K_m$	$V_{max}$
<b>Aa-PME</b> (cette etude)	DM 46%, pH 6, 30°C MES 50 mmol.L <sup>-1</sup>	70,0 mg.mL <sup>-1</sup>	882,3 μmoles.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup>
<b>Aa-PME</b> (cette etude)	DM 46%, pH 6, 30°C MES 50 mmol.L <sup>-1</sup> Ca <sup>2+</sup> 5 mmol.L <sup>-1</sup>	2,0 mg.mL <sup>-1</sup>	88,2 μmoles.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup>
<b><i>Aspergillus niger</i></b> (Dinu et al., 2007)	DM 60%, pH 4,2 40°C	2,5 mg.mL <sup>-1</sup>	626 μg. min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> ou 19,5 μmoles.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup>
<b><i>Aspergillus niger</i></b> (Maldonado et al., 1994)	45°C, pH 5	1,0 mg.mL <sup>-1</sup>	1,8 μmol. min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup>
<b><i>Aspergillus aculeatus</i></b> (Christgau et al., 1996)	Pectine de pomme DM 75%, pH 4,6 30°C	27,0 mg.mL <sup>-1</sup>	

Tableau 8 : Constantes catalytiques pour différentes PME d'origine fongique.

Il est possible de comparer l'efficacité catalytique des deux PME. Pour cela, il faut calculer la constante catalytique ou  $k_{cat}$ , définie comme étant le nombre de molécules de substrat converties en produit par unité de temps par site actif, quand l'enzyme est saturée, selon la formule suivante :

Equation 6.1.I 
$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E]_t}$$

Où

$[E]_t$  est la concentration molaire en enzyme

D'autre part, l'inverse du  $k_{cat}$  correspond au temps requis pour convertir une molécule de substrat en produit.

L'efficacité catalytique de l'enzyme (E) est définie par le rapport suivant :

$$E = \frac{k_{cat}}{K_M}$$

Equation 6.1.II

L'efficacité catalytique maximale est atteinte lorsque l'activité de l'enzyme n'est limitée que par la diffusion du substrat.

L'ensemble des valeurs obtenues pour l'Aa-PME et l'O-PME sont réunies dans le tableau 9.

	Aa-PME		O-PME	
	Absence de calcium	Présence de calcium	Absence de calcium	Présence de calcium
$k_{cat} (s^{-1})$	532,0	53,3	20,2	69,3
$1/k_{cat} (s)$	0,00018	0,018	0,049	0,0144
$E (M^{-1}.s^{-1})$	5165,0	18033,8	2849,2	4389,8

Tableau 9 : Comparaison des constantes catalytiques de l'O-PME et de l'Aa-PME.

La comparaison des  $k_{cat}$  de l'Aa-PME et de l'O-PME présente une évolution différente vis-à-vis de la présence de calcium. L'Aa-PME convertit moins de molécules de substrat par unité de temps en présence de calcium, tandis que l'inverse est observé pour l'O-PME. Par conséquent, le temps de conversion évolue aussi de façon opposée pour les deux enzymes. L'ordre de grandeur de ce temps de conversion s'échelonne de la dizaine à la centaine de microsecondes. La présence de calcium induit une multiplication par 7 de celui de l'Aa-PME et une division par 4 de celui de l'O-PME. Le temps de conversion de l'Aa-PME en absence de calcium est proche de celui observé pour l'O-PME en présence de calcium. La présence du calcium augmente l'efficacité catalytique de l'Aa-PME mais pas de l'O-PME. Ces résultats issus de la représentation graphique de Lineweaver-Burk sont toutefois à considérer avec prudence compte-tenu de l'incertitude induite par la représentation en double inverse, qui donne un poids important aux résultats obtenus aux faibles concentrations en substrat.

Lors de la détermination des paramètres catalytiques de l'O-PME et de l'Aa-PME en présence de calcium, la concentration en calcium ajoutée a été de 5 mmol.L<sup>-1</sup> pour toutes les concentrations en pectines. Or le calcium étant complexé par la pectine, des concentrations croissantes en pectines induisent donc une diminution du calcium libre. Pour prendre en compte cette diminution, on calcule le rapport stoechiométrique  $R = \frac{2[Ca^{2+}]}{COO^-}$ . En traçant l'activité des deux enzymes en fonction de ce rapport R, une diminution de l'activité est observée au fur et à mesure que la quantité de calcium par rapport à celle des acides galacturoniques augmente (Figure 41). L'activité la plus forte pour les deux enzymes correspond à la concentration en pectine la plus importante. Une autre façon d'aborder les paramètres cinétiques de ces PME en présence de calcium aurait pu être de travailler à R constant.

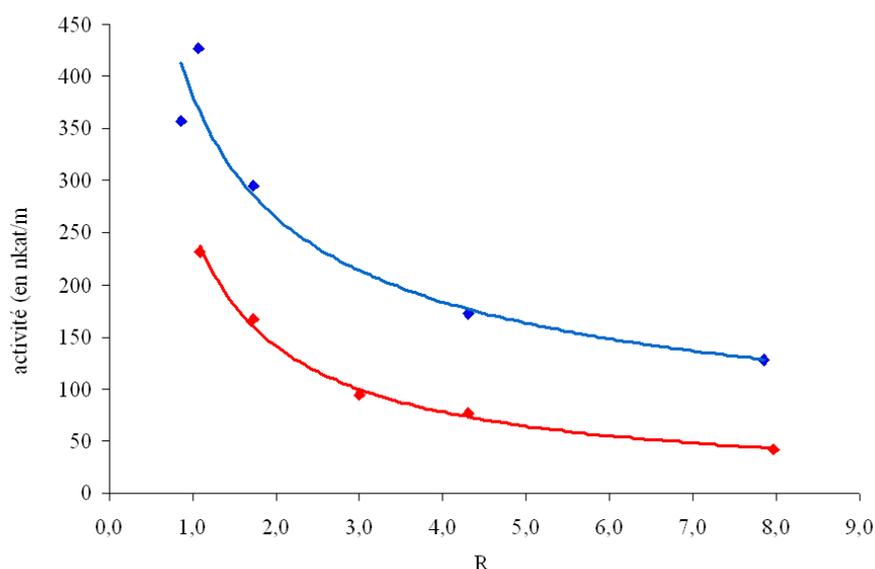


Figure 41 : Activité de l'Aa-PME (bleu) et de l'O-PME (rouge) en présence de 5 mmol.L<sup>-1</sup> de calcium en fonction de R.

## **6.2. Comparaison des structures de l'Aa-PME et de l'O-PME**

Afin de mieux comprendre le mécanisme d'action des deux enzymes ainsi que l'influence des paramètres physico-chimiques sur leur activité, elles ont été modélisées. Suite à un alignement de séquences des PME végétales, la structure 3D de la PME de *Daucus carota* 1gq8A (Johansson *et al.*, 2002) a été choisie comme modèle de base.

Pour l'O-PME, l'alignement avec la séquence de *D.carota* s'effectue entre les acides aminés 313 et 681 avec un pourcentage d'identité de séquence de 77%. L'e-value calculée par le serveur Swissmodel est très inférieure à  $1.10^{-3}$  ( $9.59.10^{-142}$ ). Puis l'évaluation donnée par le module de cristallographie donne un résultat très supérieur à -0,5 (score : 0,03). Ces différentes données permettent d'évaluer le modèle comme bon.

Pour l'Aa-PME, l'alignement avec la séquence de *D.carota* s'effectue de l'acide aminé 25 à l'acide aminé 330. C'est un alignement plus long que celui de l'O-PME, mais l'identité de séquence de 30% est très faible et l'e-value obtenue est de 0. De plus, l'évaluation du modèle par le module de cristallographie est assez mauvaise (score : -0,16). Il faudra donc rester prudent avec les conclusions issues de ce modèle.

La superposition des deux modèles permet de noter que les deux enzymes ont des structures très proches même si cet effet peut être influencé par le modèle de base commun (Figure 42). Le site actif, matérialisé par les deux acides aspartiques conservés, est situé au fond d'une faille. Une des différences entre les PME végétales et bactériennes est la profondeur de cette faille (Johansson *et al.*, 2002). Les boucles formant le rebord de la faille chez la PME d'*E.chrysanthemi* sont plus longues et conduisent à une faille plus profonde que celles de la PME de carotte (Johansson *et al.*, 2002). La même constatation entre une PME fongique et végétale est réalisée ici entre l'Aa-PME (faille profonde) et l'O-PME.

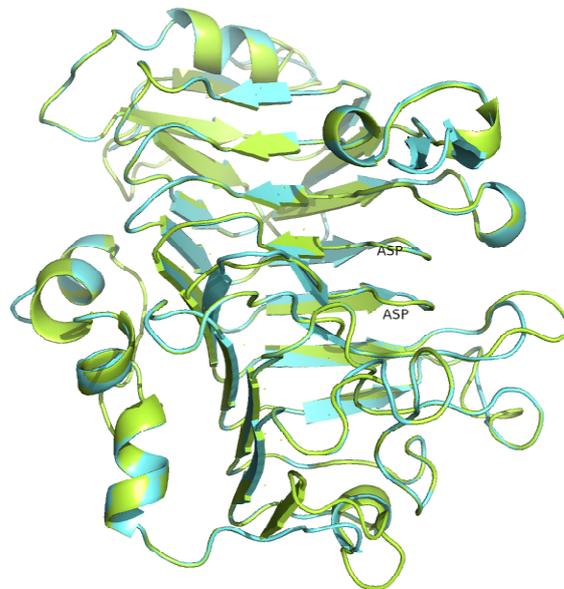


Figure 42 : Superposition des représentations de l'Aa-PME (vert) et de l'O-PME (bleu). La position du site catalytique est notée par les deux ASP.

La pectine et les PME étant chargées et le pH jouant un rôle important à la fois sur l'état électrostatique des pectines et dans la détermination de l'activité des PME, il est intéressant de connaître le potentiel électrostatique des deux enzymes dans les conditions choisies pour ce travail. Dans le cas présent, le potentiel électrostatique est déterminé dans les conditions physico-chimiques dont sont issues les données cristallographiques. En particulier, le pH est de 6,6 (Johansson *et al.*, 2002). Il est donc proche du pH 6 choisi pour le milieu réactionnel de ce travail.

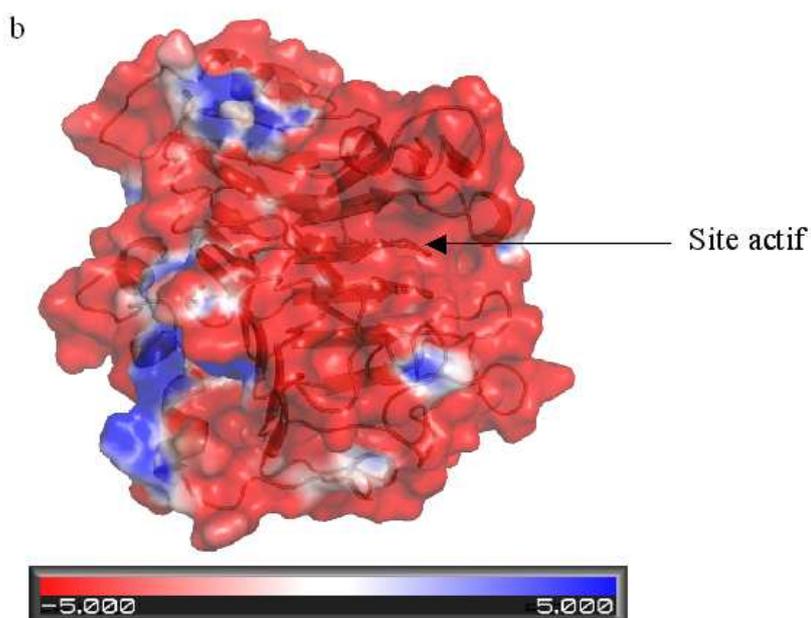
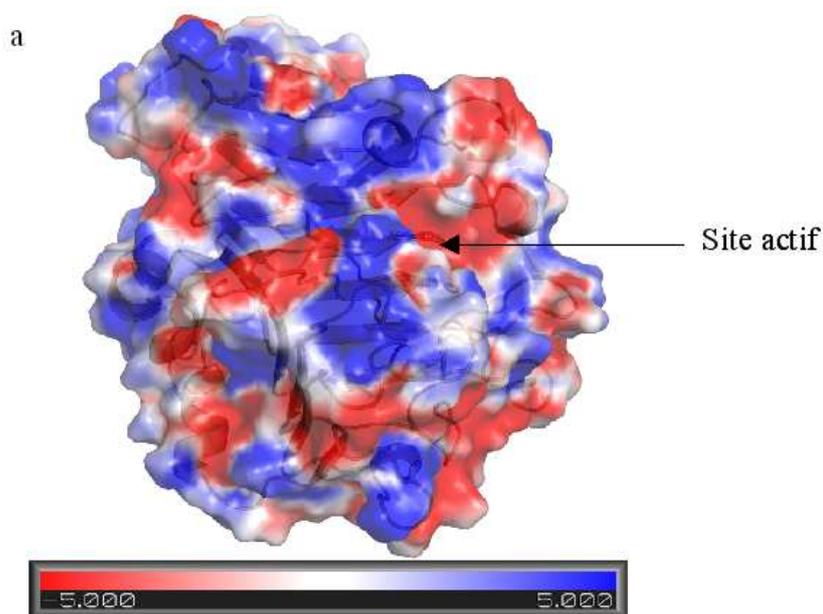


Figure 43 : Représentation du potentiel électrostatique à la surface de l'O-PME (a) et l'Aa-PME (b).

Les zones rouges et bleues correspondant respectivement aux potentiels négatifs et positifs.

Pour l'O-PME, une répartition homogène des charges est notée à la surface de la protéine (Figure 43 a). Au niveau du site actif, les abords de la faille sont plutôt positifs tandis que le fond est négatif. Cette répartition des charges entraîne une attraction de l'O-PME pour les polysaccharides chargés négativement par les abords de la faille et une répulsion de ces mêmes polysaccharides par le site actif. A pH 6, la pectine est chargée négativement, et peut donc interagir avec la PME bien que le site actif soit chargé négativement.

Contrairement à l'O-PME qui présente une répartition homogène des charges, la surface de l'Aa-PME a un potentiel électrostatique globalement négatif (Figure 43 b). Ce résultat est à moduler avec la qualité faible de l'ajustement au modèle. Ces données pourraient en partie expliquer la faible affinité de l'Aa-PME pour la pectine MM à pH 6 en absence de calcium. La forte charge négative de l'enzyme pourrait conduire à des répulsions électrostatiques avec les régions dé-méthylées de la pectine, cette répulsion pouvant être potentiellement réduite lorsque le calcium écrante les charges et complexe ces régions dé-méthylées. Ainsi, cette observation pourrait expliquer l'augmentation de l'affinité de l'Aa-PME pour la pectine en présence de calcium (§ 6.1).

### **6.3. Comparaison de la cinétique de dé-méthylation en solution ou en gel en formation**

Le DM de la pectine est suivi pendant 24h après l'incubation de la PME en présence (gel en formation) ou non (solution) de calcium ( $5 \text{ mmol.L}^{-1}$ ). Avec l'Aa-PME (Figure 44 a), en absence de calcium, on observe une diminution rapide du DM lors des premières heures, de 46% à 27%, puis le DM continue de diminuer plus lentement jusqu'à 24h où il atteint la valeur de  $\approx 16\%$ . Dans les mêmes conditions, avec l'O-PME (Figure 44 b), le DM diminue également, mais sur une amplitude plus faible et dans un temps plus court. Après 6 heures d'incubation, le DM atteint une valeur de 24% et varie peu jusqu'à 24h. L'Aa-PME dé-estérifie donc la pectine de façon plus étendue que l'O-PME.

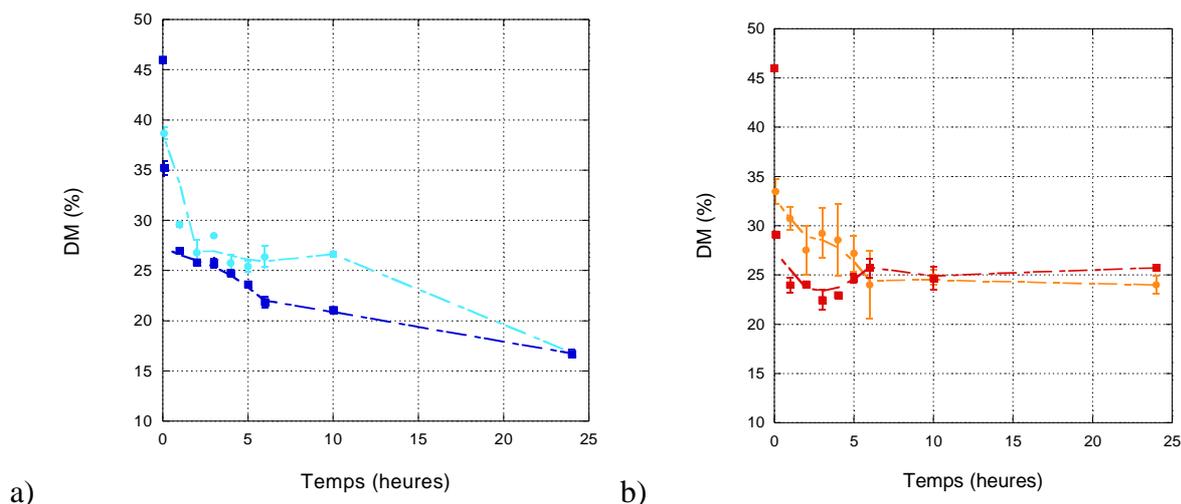


Figure 44 : Evolution du DM lors de l'action de l'Aa-PME (a) et de l'O-PME (b) sur la pectine MM en présence (carrés) ou en absence (cercles) de calcium.

En présence de calcium, une légère augmentation de la vitesse de réaction est observée sur les deux cinétiques. Néanmoins, la présence de calcium n'influence pas le DM final pour les deux enzymes puisque des valeurs similaires de DM à 24h sont observées avec et sans calcium.

#### **6.4. Comparaison du mode d'action des PME en solution et dans un gel en formation**

Le mode d'action des enzymes est diagnostiqué par la mesure du DBabs, qui traduit l'aptitude de l'enzyme à avoir un comportement processif le long de la chaîne de pectine.

Le DBabs initial de la pectine MM est de  $16\% \pm 0,41$ . Le DBabs est suivi pendant 24h au cours de l'incubation des PME en absence de calcium, c'est-à-dire en solution, ou en présence de calcium où le système va gélifier au cours de l'incubation.

Pour l'Aa-PME (Figure 45 a), une augmentation rapide du DBabs est notée jusqu'à 6h, où il atteint une valeur proche de 40% en présence ou en absence de calcium. Cette phase est suivie d'une augmentation plus lente jusqu'à 24h. La valeur du DBabs finale est située autour de 50%. Les séries avec et sans calcium sont assez similaires. Néanmoins, la valeur finale du DBabs en présence de calcium est légèrement inférieure à celle obtenue en absence de calcium. La présence de calcium influence peu le mode d'action de l'Aa-PME sur les pectines MM. L'action de l'Aa-PME sur une pectine HM a montré une augmentation du DBabs en présence de calcium (Slavov *et al.*, 2009). Sur la pectine HM, l'Aa-PME génère une

distribution des méthyles plus en blocs en présence de calcium par rapport à son action sur les pectines MM.

Le degré de méthylation de départ pourrait être à l'origine de la différence d'influence du calcium sur l'Aa-PME.

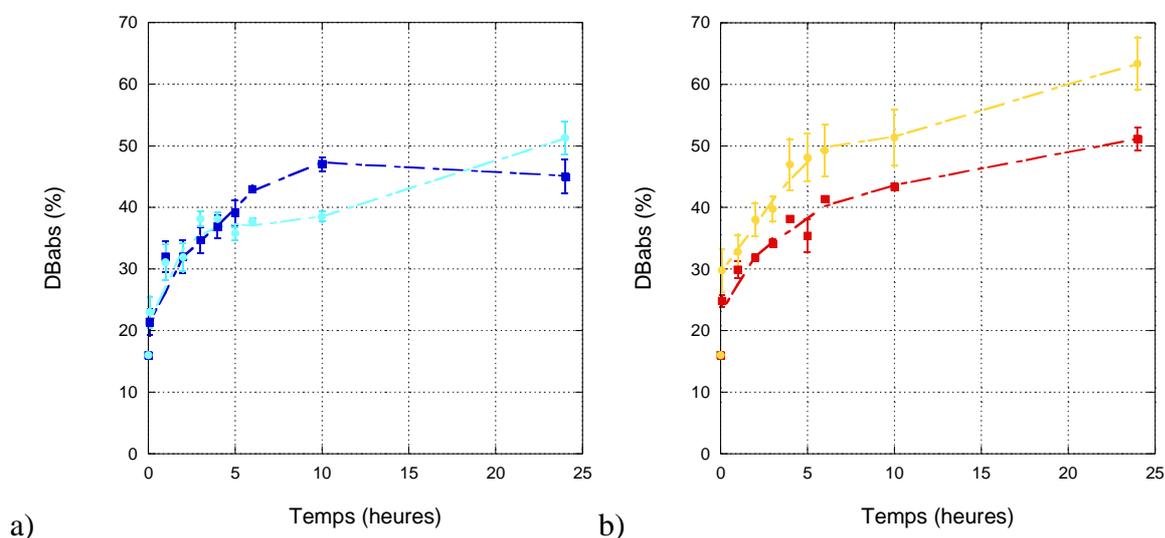


Figure 45 : Evolution du DBabs lors de l'action de l'Aa-PME (a) et de l'O-PME (b) sur la pectine MM en présence (carrés) ou en absence (cercles) de calcium.

Pour l'O-PME (Figure 45 b), l'évolution du DBabs s'effectue selon deux phases de la même façon que pour l'Aa-PME : une phase d'augmentation rapide, jusqu'à 6h d'incubation puis une seconde phase d'augmentation plus lente. En présence de calcium, l'augmentation du DBabs est moins importante (42% à 6h et 51% à 24h) qu'en solution (48% à 6h et 63% à 24h). La valeur finale obtenue avec l'O-PME en présence de calcium est très proche de celle obtenue à 24 h suite à l'action de l'Aa-PME en présence ou absence de calcium. L'ensemble de ces résultats indique que l'O-PME génère des blocs plus petits en présence de calcium qu'en son absence.

Plusieurs paramètres peuvent expliquer cette observation. D'une part, le pH choisi influence beaucoup le mécanisme d'action des PME, le passage d'un pH alcalin vers un pH acide entraînant une modification du mode d'action, d'un mécanisme simple chaîne vers un mécanisme d'attaques multiples (Denès *et al.*, 2000). L'O-PME (PME d'orange sel-indépendante) a été caractérisée sur une pectine de DM 94% à pH 4,5 et 7,5. Le mécanisme identifié est un mécanisme d'attaques multiples avec un degré de processivité variable en fonction du pH : élevé à pH alcalin générant des blocs longs et peu de blocs par molécule, et bas à pH acide, générant des blocs plus courts, mais plus nombreux par chaîne de pectines (Cameron *et al.*, 2008; Luzio & Cameron, 2008). Si l'on admet que le changement de mode

d'action suit une évolution progressive lors du changement de pH, il est possible d'avancer que la PME à pH 6 présente un mécanisme d'action de type attaques multiples qui possède un degré de processivité plus bas qu'à pH 7,5.

D'autre part, l'influence du calcium sur le mode d'action a déjà été observée à pH 6 et à pH 7,5 sur la pectine HM par la génération de blocs plus courts en présence de calcium (O'Brien *et al.*, 2009; Slavov *et al.*, 2009; Vincent *et al.*, 2009). Vincent *et al.* (2009) ont proposé l'hypothèse suivante : lorsque l'O-PME a dé-méthylé un nombre suffisant de GalA pour permettre l'établissement d'une zone de jonction via la présence du calcium, celle-ci se forme. Par conséquent, si l'on considère que le mécanisme permettant l'élongation des blocs est réalisé par des dé-méthylations successives à partir d'un premier bloc, la zone de jonction empêche ou gêne fortement l'activité de l'enzyme. D'autre part, en utilisant l'hypothèse émise par Cameron *et al.* (2008) concernant la possibilité, pour la PME, de se lier à nouveau sur une zone préalablement dé-méthylée, il est possible de montrer une influence du DM initial sur la modification du DBabs en présence de calcium. La pectine employée ici présente un DM initial de 46% et gélifie en présence de calcium, il existe donc sur cette pectine des blocs assez longs pour former des zones de jonctions pectines-calcium. Ces blocs peuvent, selon cette hypothèse, être étendus par la PME. Or en présence de calcium, ces blocs sont engagés dans des zones de jonction et sont, par conséquent, moins accessibles à l'enzyme.

De plus, il a été montré que le degré de méthylation initial de la pectine influence le mode d'action de l'O-PME (Tanhatan-Nasseri *et al.*, 2011). L'O-PME, à partir d'une pectine de DM élevé, génère de longs blocs de GalA libres. A l'inverse, à partir d'un DM plus bas, les blocs formés seront plus courts et plus nombreux.

Dans ces conditions de pH et en présence de calcium, l'O-PME pourrait présenter un mécanisme d'action très similaire à celui de l'Aa-PME : multi-chaînes et multi-attaques avec un degré d'attaque réduit par rapport à celui observé en absence de calcium. Néanmoins, le degré d'attaque de l'O-PME doit être plus élevé que celui de l'Aa-PME. En effet, le DBabs obtenu suite à l'action de l'Aa-PME en absence de calcium et celui obtenu suite à l'action de l'O-PME en présence de calcium sont proches, ce qui signifie que le pourcentage de mono-, di-, tri- GalA dé-méthylés libérés par l'endoPG par rapport à la quantité totale de GalA est sensiblement le même. Mais pour atteindre ce rapport, la proportion de GalA dé-méthylés est plus importante dans le cas de l'Aa-PME ( $DM_{24h} = 16\%$ ) que dans le cas de l'O-PME ( $DM_{24h} = 24\%$ ). Suite à l'action de l'Aa-PME, la proportion de GalA libres est plus importante, mais moins accessible pour l'endoPG parce qu'ils sont répartis en blocs trop petits.

## 6.5. Caractérisation rhéologique des différents systèmes PME-pectine-calcium

Les propriétés rhéologiques ont été déterminées par suivi des cinétiques de gélification en mesurant les modules conservatif et visqueux et la structure des échantillons a été caractérisée par la mesure de ces mêmes modules lors d'un balayage en fréquence.

Dans un premier temps, la caractérisation du système pectine MM et calcium sans PME a été réalisée pour servir de référence. En absence de PME, le module conservatif  $G'$  du système augmente lentement avec le temps jusqu'à une valeur de 4,6 Pa après 10h (Figure 46 a). On considère alors que le système tend vers un état d'équilibre, il a été montré sur un temps de mesure plus important que les modules augmentaient de plus en plus lentement au cours du temps (Garnier, 1992). Le spectre mécanique présente la forme typique d'un gel physique faible et présente un module élastique de 4,6 Pa à 0,01  $\text{rad.s}^{-1}$  (Figure 46 b).  $G'$  présente un plateau sur la majeure partie du domaine de fréquences exploré, et est supérieur à  $G''$ .

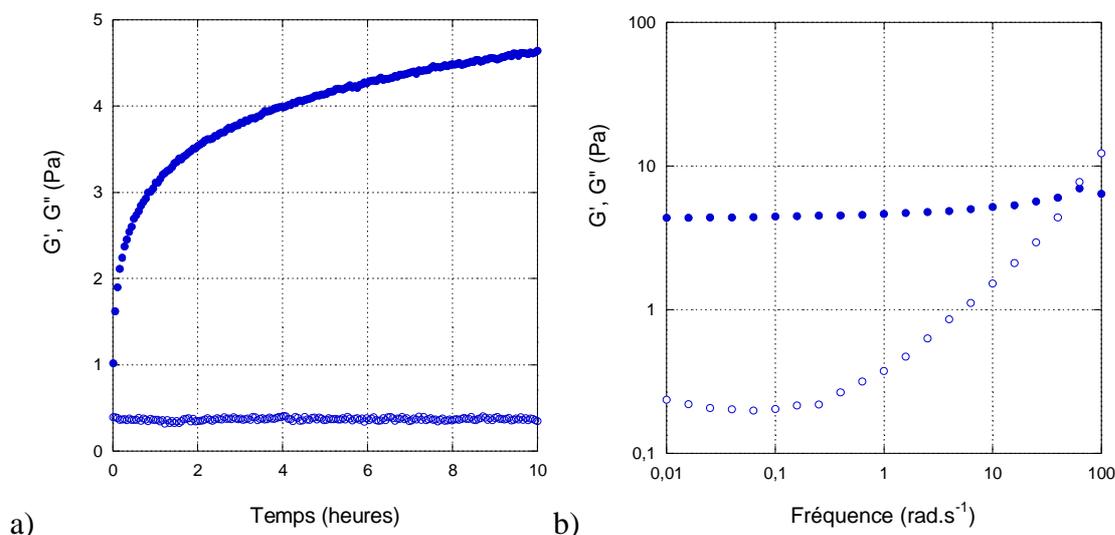


Figure 46 : Suivi cinétique de l'évolution de  $G'$  (cercles pleins) et  $G''$  (cercles vides) à 1  $\text{rad.s}^{-1}$  (a) et spectre mécanique du mélange pectine MM 0,9 % en présence de 5  $\text{mmol.L}^{-1}$  de calcium pour une déformation de 1% (b).

L'introduction de l'enzyme change complètement les cinétiques de structuration du système. En présence de l'O-PME,  $G'$  augmente rapidement en fonction du temps. L'allure de la cinétique de gélification est proche de celle obtenue pour les pectines LM (Figure 47 a). A 48h, le système tend vers l'équilibre avec un module de 3078 Pa à 1  $\text{rad.s}^{-1}$ . Le spectre

mécanique présente un  $G'$  indépendant de la fréquence et supérieur de plus d'une décade à  $G''$  (Figure 47 b). Ces observations sont caractéristiques d'un comportement de gel fort avec une valeur de  $G'$  de 2964 Pa à 0,01 rad.s<sup>-1</sup>.

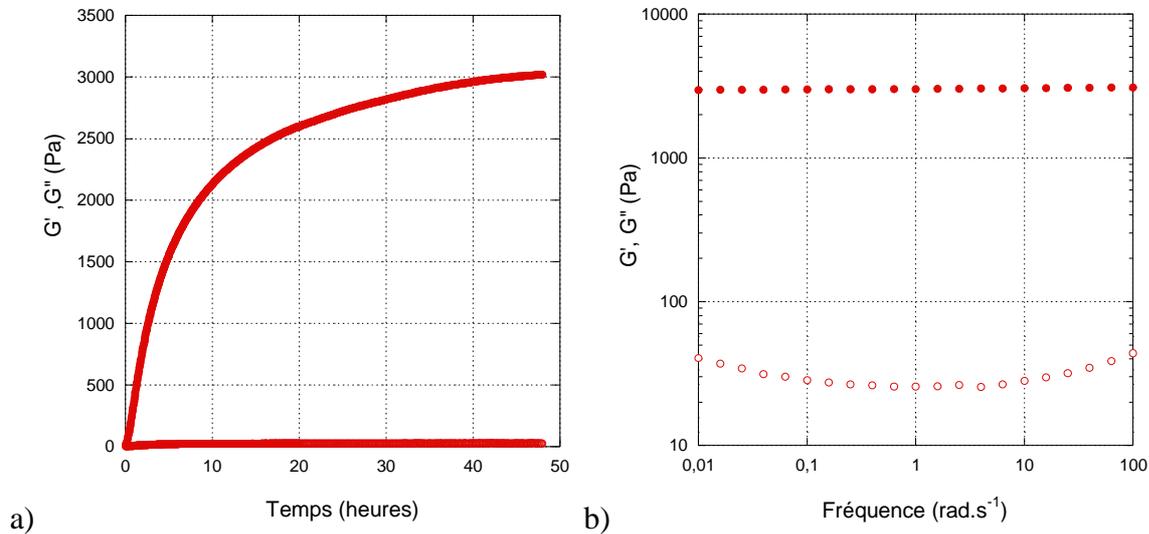


Figure 47 : Suivi cinétique de l'évolution de  $G'$  (cercles pleins) et  $G''$  (cercles vides) à 1 rad.s<sup>-1</sup> (a) et spectre mécanique du mélange O-PME, pectine LM 0,9% en présence de 5 mmol.L<sup>-1</sup> de calcium (b).

En présence de l'Aa-PME, un comportement différent est observé. L'action de l'Aa-PME dans le système pectine-calcium conduit à une cinétique de gélification retardée (Figure 48 a).  $G'$  augmente lentement au cours du temps dans les dix premières heures, puis plus rapidement. Le pseudo-équilibre est atteint très tardivement (~ 2900 Pa à 48h). A 48h, le spectre mécanique caractérise un gel fort avec un module conservatif fort de ~ 2750 Pa à 0,01 rad. s<sup>-1</sup> (Figure 48 b).

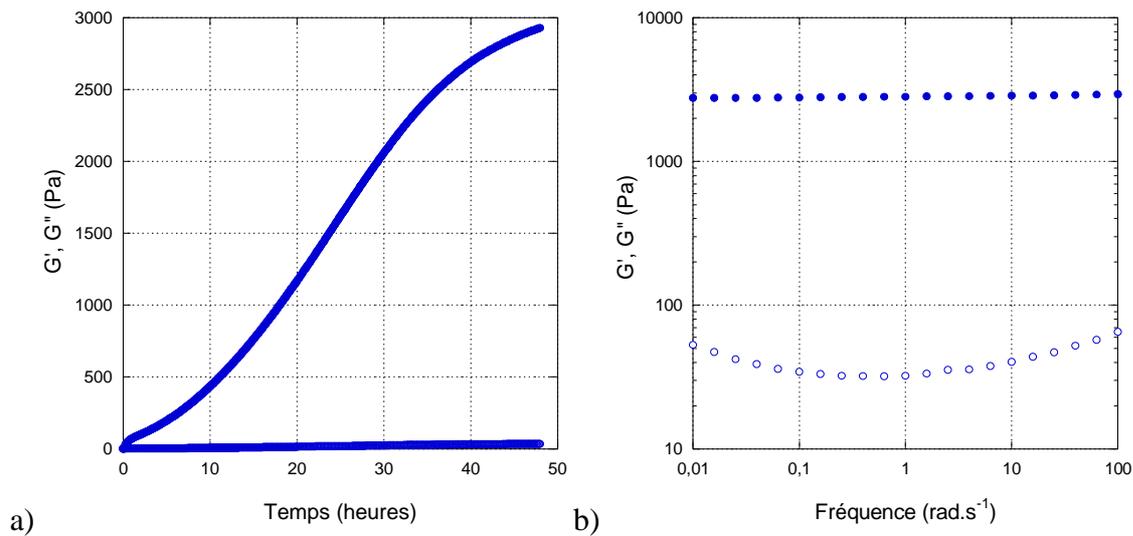


Figure 48 : Suivi cinétique de l'évolution de  $G'$  (cercles pleins) et  $G''$  (cercles vides) à  $1 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$  (a) et spectre mécanique du mélange Aa-PME, pectine MM 0,9% en présence de  $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de calcium pour une déformation de 1% (b).

Les modules obtenus à 48h en présence des deux enzymes sont donc proches. Cependant, la caractérisation rhéologique de ces mélanges montre une cinétique totalement différente en fonction de l'origine de la PME utilisée. Si l'on compare les modules élastiques à 24h, le système avec l'Aa-PME présente un  $G'$  de 1559 Pa alors que le système avec l'O-PME pour un temps identique présente un  $G'$  de 2669 Pa.

Le retard d'augmentation de la force du gel est bien causé par l'action de l'Aa-PME : la réalisation d'une cinétique identique avec l'Aa-PME inactivée thermiquement ne conduit pas à ce phénomène (Figure 49). Le module final à 10h est de 5,4 Pa à  $1 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$ , donc proche de celui obtenu avec la pectine MM en présence de calcium.

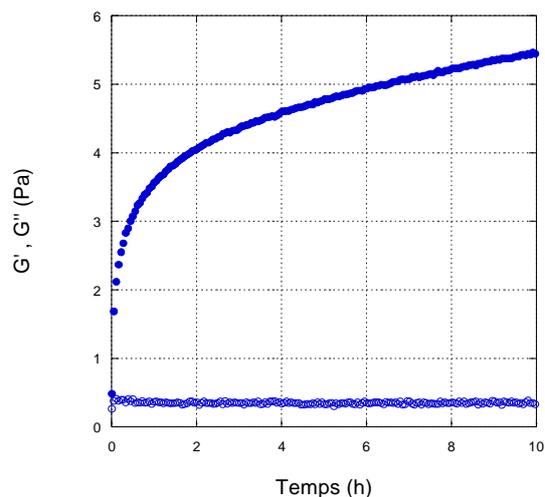


Figure 49 : Suivi cinétique de l'évolution de  $G'$  (cercles pleins) et  $G''$  (cercles vides) à  $1 \text{ rad.s}^{-1}$  du mélange Aa-PME inactivée, pectine MM 0,9% en présence de  $5 \text{ mmol.L}^{-1}$  de calcium.

Les cinétiques de gélification générées lors de l'action de l'Aa-PME ou de l'O-PME sont différentes. Néanmoins, les modules atteints par les deux enzymes à 48h (2762 Pa avec Aa-PME et 2964 Pa avec l'O-PME) sont très proches ainsi que leurs spectres mécaniques. Par ailleurs, le calcul du rapport  $G''/G'$ , appelé tangente de perte ( $\tan\delta$ ), montre qu'il existe une légère différence de contribution de  $G'$  et  $G''$  entre les deux systèmes. Avec l'Aa-PME,  $\tan\delta$  a pour valeur 0,02 à 0,01  $\text{rad.s}^{-1}$ , alors qu'avec l'O-PME,  $\tan\delta$  a pour valeur 0,01 à 0,01  $\text{rad.s}^{-1}$ . Une composante visqueuse plus importante est donc observée dans le gel formé suite à l'action de l'Aa-PME, alors qu'en présence d'O-PME, le gel formé est plus élastique. Pourtant, les DBabs sont proches. Cette légère différence d'élasticité peut être liée à la mobilité des chaînes entre deux zones de jonction. Dans le cas de l'Aa-PME, la présence de petits blocs peut conduire à la formation de zones de jonction métastables, *i.e.* non permanentes. Ce phénomène induit une mobilité des chaînes pectiques entre deux jonctions inter-chaînes se traduisant par une augmentation du caractère visqueux du gel. En présence d'O-PME, des blocs plus longs sont générés par son action, les zones de jonction sont donc plus stables. L'établissement de liaisons entre les zones de jonction est par conséquent stable et entraîne moins de liberté pour les chaînes pectiques non impliquées dans les liaisons.

D'autre part, la formation de blocs longs entraîne, à partir d'un certain nombre de GalA, la formation de zones de jonctions coopératives en présence de sel. Il a été proposé que, lors du vieillissement du gel, les ions calcium situés dans les zones de jonction courtes et instables seraient réarrangés vers les zones de jonction plus grandes ou de taille intermédiaire

grâce à une liaison coopérative pour conduire à l'établissement de zones de jonction plus longues (Garnier, 1992; Cabrera *et al.*, 2008). L'observation d'une augmentation de la liaison de l'anticorps 2F4 au cours du temps à des dimères calciques d'oligogalacturonides (degré de polymérisation >8) a conduit à l'hypothèse d'un processus de maturation des liaisons en « boîte à œuf » (Cabrera *et al.*, 2008). La formation de jonction débiterait par l'établissement de plusieurs ponts calciques, puis, par réarrangement, les chaînes glisseraient les unes vers les autres jusqu'à être alignées de façon à former le plus grand nombre de ponts calciques. Ce phénomène n'est pas instantané et pourrait prendre plusieurs heures pour atteindre l'équilibre. Ce mécanisme de liaison au calcium implique que le temps nécessaire pour former des zones de jonction stables dépend de la taille et/ou du nombre des blocs de GalA libres dont le calcium est susceptible d'être réorganisé et de la quantité de calcium disponible.

On peut supposer que l'action de l'O-PME conduite à l'établissement de blocs de GalA libres assez grands pour induire une liaison coopérative du calcium conduisant à l'établissement rapide de zones de jonction stables.

Pour une même proportion de GalA libres en bloc, *i.e.* pour un DBabs équivalent, l'Aa-PME libère une quantité de GalA plus importante, *i.e.* un DM plus bas que l'O-PME. Cela suggère que les blocs courts répartis sur toutes les chaînes de pectines conduisent à une dispersion du calcium (Ngouemazong *et al.*, 2011). Au fur et à mesure de la dé-estérification, la taille des blocs augmente et certains sont probablement de taille suffisante pour induire une liaison coopérative du calcium. L'augmentation du module élastique du gel pour le système contenant l'Aa-PME ne serait pas, par conséquent, couplée de façon instantanée à la dé-estérification. Un temps de décalage correspondant au réarrangement du calcium serait nécessaire pour la gélification. Dans le cas de l'O-PME, la taille des blocs générés est probablement telle qu'elle induit la formation de liaisons coopératives. De ce fait, la formation de liaisons est plus rapide et la cinétique de gélification n'est pas retardée.

## **6.6. Conclusion**

L'activité de l'O-PME et celle de l'Aa-PME ont été caractérisées en solution et en gel en formation. Le comportement d'action de l'O-PME et de l'Aa-PME se traduit par une augmentation de la vitesse de déméthylation dans un gel en formation et une diminution du DBabs pour l'O-PME. La mesure des constantes catalytiques des deux PME a montré que la présence du calcium avait des effets opposés sur l'affinité et la vitesse maximum des PME.

L'Aa-PME voit son affinité pour la pectine augmenter dans un gel en formation et sa vitesse maximale diminuer. L'inverse est observé pour l'O-PME. Le gel en formation a aussi été caractérisé en présence de l'Aa-PME ou de l'O-PME. D'un point de vue rhéologique, les systèmes finaux sont proches, mais les cinétiques de gélification sont différentes pour les deux enzymes. Afin de déterminer quel peut être l'impact de la structuration de l'environnement sur les PME, leur diffusion a été étudiée.

## **7. Etude de la diffusion des PME**

### **7.1. Introduction à l'étude de la diffusion**

#### **7.1.1. Définitions**

La diffusion est basée sur l'existence des mouvements browniens que l'on définit comme les déplacements aléatoires et désordonnés dans les trois dimensions de l'espace qu'effectuent les petites particules à la surface ou au sein d'un liquide. Ce mouvement est attribué aux chocs de molécules de liquide sur la particule. La diffusion est un phénomène spontané, *i.e.* qui ne nécessite pas l'intervention d'une force extérieure. Le déplacement de la particule est dépendant de la température. Son trajet est régi par le hasard : la direction prise par la particule après chaque choc est suivie aléatoirement et est indépendante du mouvement précédent. A partir d'une position de départ définie, lors d'un phénomène de diffusion, chaque particule s'éloigne de son origine au hasard. Les mouvements browniens sont composés de deux types de fluctuations aléatoires :

- Les fluctuations aléatoires de la position d'une molécule dans l'espace correspondant au phénomène de diffusion translationnelle.
- Les fluctuations aléatoires liées à l'orientation de la molécule par rapport à une direction définie correspondant au phénomène de diffusion rotationnelle.

La diffusion translationnelle est la plus communément étudiée. Deux phénomènes tous deux basés sur les mouvements browniens peuvent être distingués :

- L'autodiffusion correspond aux mouvements browniens des molécules du fluide à l'équilibre thermodynamique et est définie par le coefficient d'auto-diffusion. Ce phénomène peut être mis en évidence par différentes techniques comme la RMN, la FRAP et la FCS. Les mesures sont typiquement réalisées sur une échelle de temps de la milliseconde à la seconde. Les mouvements des molécules considérées peuvent atteindre quelques micromètres.
- Le transport par diffusion correspond à un flux d'espèces dissoutes dans le fluide dans une situation hors équilibre et est mis en évidence par le coefficient de diffusion mutuel. Ce phénomène peut souvent être décrit par les lois de Fick et est caractérisé par l'étude d'un profil de concentration lié à une expérience de pénétration ou de libération de la particule diffusante. Les techniques employées pour calculer le coefficient de diffusion mutuel peuvent être la RMN ou encore l'utilisation de cellule

de diffusion. Ces mesures sont typiquement réalisées sur une échelle de temps de la minute à l'heure voire aux jours. Les mouvements des molécules s'effectuent sur des distances pouvant atteindre plusieurs millimètres.

L'auto-diffusion et le transport par diffusion sont deux mécanismes distincts qui se déterminent expérimentalement à différentes échelles de temps et de longueur. Le transport par diffusion correspond au transport d'une quantité de matière caractérisée par une densité locale, conduisant à l'uniformisation spatiale de sa distribution et se traduit par l'établissement d'un gradient de diffusion. Ce phénomène d'homogénéisation est mis en évidence pour une échelle de temps d'observation suffisamment longue et pour une échelle de longueur macroscopique. Les phénomènes d'autodiffusion intervenant dans un système à l'équilibre sans variation de volume, ni de transfert de masse, sont observables quelle que soit l'échelle de temps ou de longueur considérée. Dans le cas de la diffusion d'une particule sphérique pour un système à l'équilibre dans un solvant pur, le coefficient d'autodiffusion ( $D$ ) peut être calculé par l'équation de Stokes-Einstein :

Equation 7.1 I : 
$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_h}$$

Où

- $k$  La constante de Boltzmann ( $J.K^{-1}$ )
- $T$  La température (K)
- $\eta$  La viscosité de la solution ( $Pa.s^{-1}$ )
- $R_h$  Le rayon hydrodynamique du diffusant (m)

Cette équation décrit la relation entre les forces induites par le mouvement aléatoire d'une particule dû aux fluctuations thermiques et aux forces de friction que cette particule subit lorsqu'elle passe à travers un liquide. L'autodiffusion et le transport par diffusion dépendent tous deux de la température, de la pression, de la taille du soluté et de la viscosité du milieu de diffusion. Les relations entre ces deux phénomènes sont à l'étude. Il est difficile de pouvoir les comparer dans des systèmes expérimentaux identiques, compte-tenu des différences d'échelle de mesure. Plusieurs travaux comparant la détermination de la diffusion selon une approche macroscopique ou microscopique ont montré des coefficients d'autodiffusion et de diffusion mutuel d'un ordre de grandeur équivalent. Ces études ont été menées sur la diffusion d'un composé aromatique dans un gel de carraghénanes (Délérès *et al.*, 2010) ou sur la

diffusion de différentes particules dans un gel d'agarose (Lead *et al.*, 2003; Labille *et al.*, 2006). Ces différentes études ont permis d'avancer que lors de la diffusion en gel, les coefficients de diffusion mutuel et d'autodiffusion présentent une forte correspondance dans le cas où la particule diffusante est beaucoup plus petite que la taille moyenne des pores du gel (Gagnon, 2009; Gagnon & Lafleur, 2009).

### **7.1.2. Influence de l'environnement sur la diffusion**

Dans le cas de notre étude, les trois environnements considérés ont des structures physiques différentes : la solution de pectines correspond à un milieu visqueux, le mélange pectine-calcium correspond à un milieu en cours de structuration et le gel préformé est un hydrogel. Les caractéristiques de la diffusion en gel et les différences avec la diffusion en solution sont importantes pour cette étude.

Différents modèles ont été avancés pour expliquer la diffusion d'une molécule dans une solution de polymères (Masaro & Zhu, 1999a). L'effet des chaînes de polymères sur la diffusion est notamment décrit par des effets d'obstruction, des interactions hydrodynamiques ou par l'intervention de la théorie de l'espace libre. Ces différents concepts ont aussi été appliqués à la diffusion en gel (Amsden, 1998). Dans ce cas, le transport de soluté intervient essentiellement dans les régions emplies d'eau délimitées par les chaînes de polymères : les mailles du gel. Par conséquent, la diffusion du soluté est influencée par tout facteur modifiant cet espace :

- Le rapport taille de maille sur taille de la particule diffusante
- La mobilité des chaînes
- La présence de groupements chargés sur le polymère pouvant se lier au soluté.

Il a été montré que l'autodiffusion dans les hydrogels est sensible à plusieurs paramètres comme la taille du soluté (Fatin-Rouge *et al.*, 2004), sa forme (Masaro & Zhu, 1999b), la concentration en polymère ainsi que la structure de l'hydrogel (porosité, tortuosité, rayon du polymère) (Amsden, 1998; Masaro & Zhu, 1999a). Des paramètres similaires influencent le transport par diffusion : la taille du soluté (Johansson *et al.*, 1991), la charge du polysaccharide ou/et de l'espèce diffusante, la concentration en polymère, la taille des pores, mais aussi la structure de l'hydrogel qui peut aussi avoir un impact si l'expérience est suffisamment longue.

La plupart des modèles sont développés pour des conditions particulières de taille d'espèce diffusante et de concentration du milieu et nécessitent l'absence d'interactions d'absorption ou électrostatiques entre la molécule diffusante et les chaînes du réseau de polymères.

Expérimentalement, il a été montré que la diffusion de macromolécules en gel est plus lente que dans un solvant pur (Johnson *et al.*, 1996; Gagnon, 2009). Elle est d'autant plus lente que la taille de la particule est grande et que la concentration du gel en polymères est forte (Leloup *et al.*, 1987; Johnson *et al.*, 1996). Les interactions entre la particule diffusante et les chaînes de polymères modifient le comportement de diffusion. Notamment les interactions attractives ralentissent la diffusion de la molécule dans le gel (Fatin-Rouge *et al.*, 2003). L'étude de l'action de la thermolysine hydrolysant un gel de gélatine a été réalisée en FCS et a mis en évidence une diffusion anormale *i.e.* un ralentissement du transport des molécules intervient. L'interaction de l'enzyme avec son substrat conduit à un ralentissement de la diffusion (Fadda *et al.*, 2003).

La présence d'hétérogénéités dans le milieu complexifie l'étude de l'autodiffusion, mais leur influence dépend de l'échelle d'observation considérée, de l'échelle locale à l'échelle globale (Lorén *et al.*, 2009) :

- A un temps d'observation infiniment court, le phénomène de diffusion est observé à une échelle très locale. Le coefficient de diffusion ( $D$ ) équivaut au coefficient de diffusion obtenu dans un solvant pur, *i.e.* sans obstruction ( $D_0$ ).
- A un temps d'observation très court, un nombre négligeable de molécules est affecté par la présence des hétérogénéités. En effet, les particules dans le volume d'observation parcourent une distance très faible car le temps d'observation est très court. Par conséquent, seules les particules à proximité immédiate de l'hétérogénéité peuvent être affectées par sa présence.  $D$  reste alors très proche de  $D_0$ .
- A partir d'une certaine durée d'observation, un ralentissement du transport des molécules intervient. La diffusion est alors qualifiée d'anormale. Ce seuil de durée d'observation dépend à la fois de la taille du diffusant et de la taille des pores du gel. Ce phénomène intervient lorsque les tailles des pores et du diffusant sont proches, pour des temps courts et une échelle de longueur inférieure à 1  $\mu\text{m}$  (Labille *et al.*, 2006).
- A un temps infiniment long, les particules ont exploré tout le volume disponible et ont toutes été affectées par l'hétérogénéité. Un coefficient de diffusion global est alors mesuré, celui-ci est proportionnel à la tortuosité du gel.

L'effet de la structure environnante sur la diffusion des particules est conditionné par l'échelle d'observation. L'effet de la structuration du milieu sur la diffusion des PME a été étudié par mesure du coefficient d'autodiffusion à une échelle très locale (FCS, § 7.2), à une échelle plus intermédiaire ou mésoscopique (FRAP, § 7.3) et par mesure du coefficient de diffusion

mutuel à une échelle macroscopique (§ 7.4). L'impact de l'activité de la PME a aussi été étudié en réalisant ces différentes expériences avec la PME inactivée.

## **7.2. Etude de la diffusion locale de l'Aa-PME et de l'O-PME**

La spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) permet d'étudier les phénomènes de diffusion dans un très petit volume d'observation et sur une échelle de temps très courts. Afin de connaître et de comprendre l'influence des différents environnements sur la diffusion de l'Aa-PME et de l'O-PME, une série d'expériences a été réalisée en FCS. La diffusion de l'Aa-PME et de l'O-PME a été étudiée en solution tampon, dans une solution de pectines, dans un gel en formation et dans un gel préformé. Pour cela, les PME ont été marquées au FITC.

	<b>Activité spécifique nkat.mg<sup>-1</sup></b>
<b>Aa-PME</b>	35,2
<b>O-PME</b>	24,8

Tableau 10 : Activité spécifique des PME marquées au FITC.

Les deux enzymes sont toujours actives après marquage avec une baisse de l'activité spécifique (Tableaux 6 et 10).

Par ailleurs, l'influence de l'activité des PME sur leur diffusion a été évaluée en les inactivant par chauffage, puis en réalisant une série d'expériences identiques. Le chauffage de la protéine entraîne une modification du repliement de la protéine et, par conséquent, modifie son rayon hydrodynamique. Ce dernier est important car il influence la diffusion de la protéine (Equation de Stokes-Einstein).

Le rayon hydrodynamique peut être calculé à partir des formules suivantes pour une protéine globulaire ou dénaturée (Wilkins *et al.*, 1999) :

Formule 8 I :  $R_h = 4,75 \times N^{0,29}$  (globulaire)

Formule 8 II :  $R_h = 2,21 \times N^{0,57}$  (dénaturée)

où

N est le nombre d'acide aminés

$R_h$  est le rayon hydrodynamique en Å

A l'état natif, l'Aa-PME et O-PME étant des protéines globulaires, il est possible d'appliquer ces formules. Les résultats sont donnés dans le tableau 11.

	<b>N</b>	<b>Rh globulaire (nm)</b>	<b>Rh dénaturée (nm)</b>
<b>Aa-PME</b>	314	2,5	5,6
<b>O-PME</b>	317	2,5	5,8

Tableau 11: Rayons hydrodynamiques calculés pour l'Aa-PME et l'O-PME.

Ces calculs montrent un doublement du rayon hydrodynamique après dénaturation thermique. Celui-ci reste néanmoins du même ordre de grandeur.

La comparaison des courbes d'auto-corrélation entre elles peut permettre d'effectuer un classement relatif des coefficients de diffusion. Plus les particules diffusent vite, plus le temps moyen pendant lequel l'enzyme reste dans le volume d'observation est court. Le signal de fluorescence, par conséquent, fluctue d'autant plus vite et conduit à une diminution rapide de la corrélation. Les courbes d'auto-corrélation de fluorescence correspondant au phénomène de diffusion le plus rapide seront alors situées sur la gauche du graphique. Dans le cas d'une diffusion plus lente, le phénomène inverse intervient et les courbes sont décalées vers la droite.

Les courbes expérimentales sont ensuite ajustées en utilisant un modèle. Plusieurs d'entre-eux ont été testés, parmi lesquels les modèles de diffusion libre d'une espèce fluorescente (modèle à une composante) ou de deux espèces fluorescentes (modèle à deux composantes), ainsi que le modèle de diffusion anormale. Le modèle de diffusion libre à deux composantes a fourni le meilleur ajustement et il a alors été possible de déterminer :

- N le nombre de molécules fluorescentes diffusant dans le volume d'observation
- $\tau_d$  le temps de diffusion le plus court concernant le pourcentage  $\alpha$  (donné par  $\alpha$ ) de molécules fluorescentes diffusantes
- $\tau_b$  le temps de diffusion le plus long concernant le pourcentage  $\alpha$  (donné par  $(1 - \alpha)$ ) de molécules fluorescentes diffusantes.

L'interprétation des résultats est réalisée à partir de ces paramètres issus des moyennes des ajustements des courbes expérimentales et à partir de la comparaison graphique des

courbes moyennes pondérées normalisées ou non obtenues pour chaque type d'expérience. Le calcul du coefficient de diffusion à partir de  $\tau_d$  permet de comparer les différentes expériences entre elles et de confronter les résultats obtenus à l'échelle de la FCS avec ceux obtenus en FRAP.

### **7.2.1. Détermination des conditions expérimentales**

Dans un premier temps, les conditions expérimentales favorables à l'utilisation de la FCS ont été déterminées. Les concentrations des solutions utilisées sont identiques à celles employées pour la caractérisation du mode d'action de l'enzyme, l'intensité du signal donnée par le nombre de photons détectés par le photomultiplicateur étant alors jugée suffisante.

Pour vérifier le bon fonctionnement du dispositif de FCS, le signal d'autocorrélation d'une solution de FITC ou de fluorescéine est systématiquement recherché en début d'expérience. La solution de pectines ainsi que le gel préformé ont également été testés. Les fluctuations de la fluorescence de la pectine en solution ne sont pas ou peu corrélées, le temps de diffusion issu du traitement de la courbe moyenne est long. Tout comme pour la solution de pectines, les fluctuations de la fluorescence du gel conduisent à une corrélation peu importante. Le signal généré par les pectines en gel préformé ou en solution est ainsi assimilé à du bruit de fond dont l'influence sur le signal issu des enzymes marquées est négligeable.

### **7.2.2. Diffusion de l'O-PME**

#### **7.2.2.1. Comparaison de la diffusion de l'O-PME dans différents environnements**

La diffusion de l'O-PME marquée au FITC a été suivie dans le tampon MES, dans une solution de pectines MM à 0,9%, ou dans un gel en formation et sa diffusion a été suivie en FCS pendant 3h. Le nombre de molécules diffusant librement dans le volume d'observation présente une forte dispersion des valeurs mais a tendance à augmenter au cours du temps (Figure 50 a). Les valeurs des temps de diffusion extraites des données brutes sont aussi très dispersées, mais elles oscillent autour d'une valeur moyenne de 0,1 ms pendant les 3 heures d'observation (Figure 50 b).

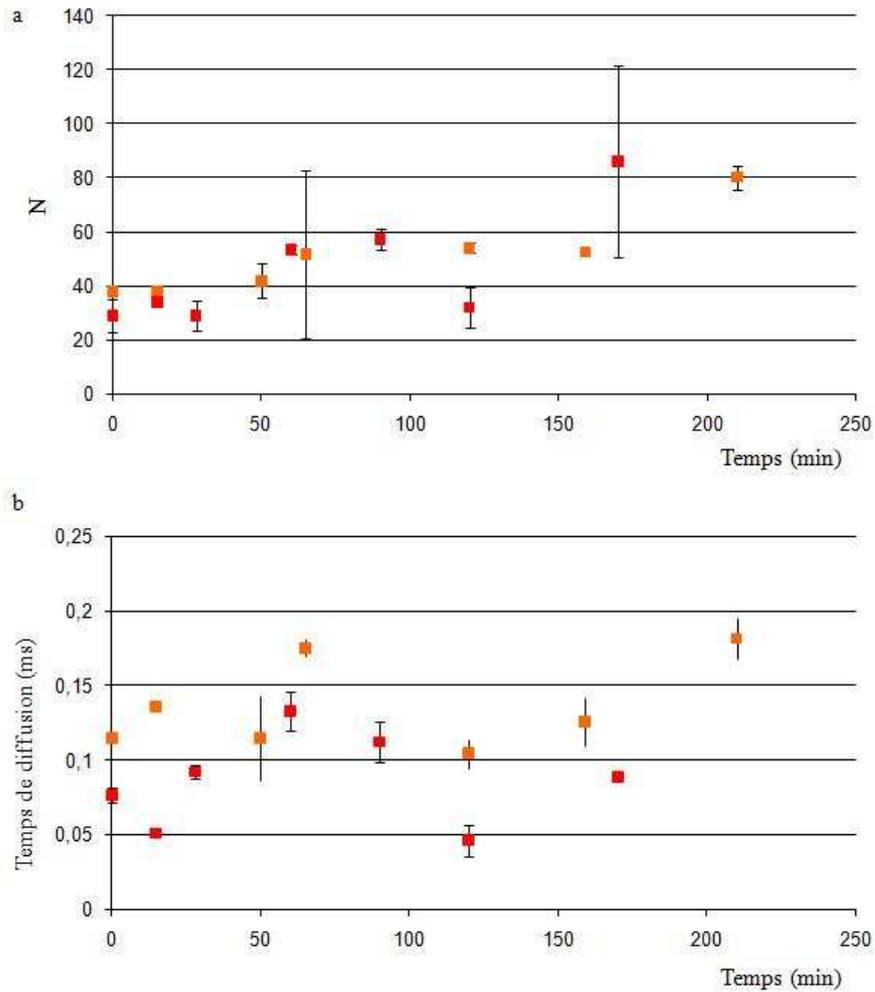


Figure 50 : Evolution du nombre de molécules diffusant dans le volume d'observation (a) et de leur temps de diffusion (b) lors de la diffusion de la O-PME dans une solution de pectines (orange) et dans un gel en formation (rouge).

Les courbes d'auto-corrélation de même allure ont été moyennées pour pouvoir comparer les différents environnements entre eux. Elles présentent des allures similaires dans les trois environnements considérés (Figure 51).

Mais la courbe d'auto-corrélation correspondant à la diffusion de l'O-PME dans la pectine seule diffère de celles obtenues dans les deux autres environnements : elle présente une composante aux temps longs plus importante que celles observées pour les deux autres environnements. Ceci avait aussi été constaté lors de l'acquisition des données. En effet, la présence de pics d'intensité très importants dans le vecteur d'intensité perturbait régulièrement le signal.

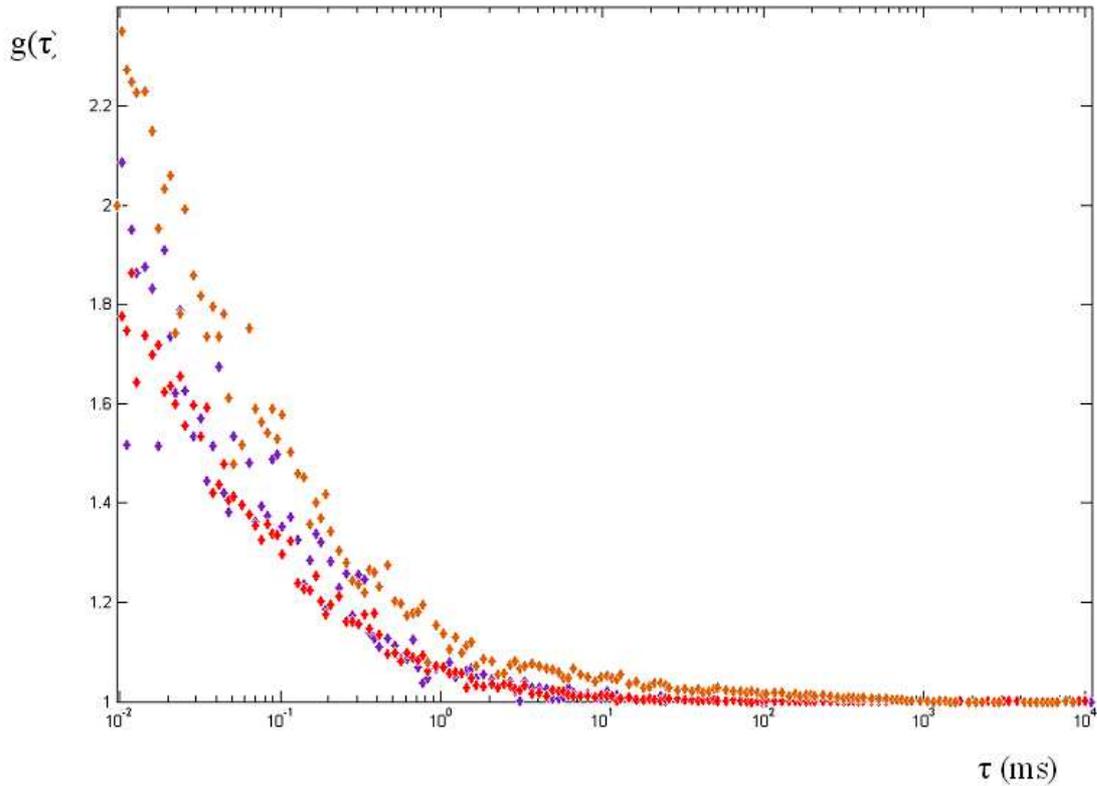


Figure 51 : Courbes d'auto-corrélation moyennes normalisées obtenues lors de la diffusion d'O-PME dans une solution de tampon MES (violet), une solution de pectines (orange) et dans un gel en cours de formation (rouge).

L'observation des courbes moyennes permet de conclure que le temps de diffusion des PME diffusant rapidement dans la pectine varie très peu d'un environnement à l'autre. Par ailleurs, une augmentation de la population de PME diffusant lentement corrélée à un allongement de son temps de diffusion est observée lorsque l'O-PME diffuse dans une solution de pectines. Ces observations graphiques sont comparées aux données issues des différentes analyses (Tableau 12).

	O-PME MES		O-PME pectine		O-PME pectine Ca	
	valeur moyenne	écart-type	valeur moyenne	écart-type	valeur moyenne	écart-type
<b>N</b>	70,31	6,26	48,64	8,45	51,22	16,35
<b>a (%)</b>	97,75	1,55	94,62	1,23	96,34	1,78
<b><math>\tau_d</math> (ms)</b>	0,11	0,02	0,133	0,061	0,091	0,03
<b><math>\tau_b</math> (ms)</b>	28,14	41,22	67,94	179,14	9,11	6,20
<b><math>D\tau_d</math> (<math>\text{mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}</math>)</b>	$2,06 \cdot 10^{-04}$	$2,87 \cdot 10^{-05}$	$1,85 \cdot 10^{-04}$	$5,54 \cdot 10^{-05}$	$2,74 \cdot 10^{-04}$	$1,01 \cdot 10^{-04}$

Tableau 12 : Comparaison des valeurs extraites des courbes d'auto-corrélation et du coefficient de diffusion obtenues lors de la diffusion de l'O-PME en solution, en solution de pectines, en gel en formation.

D'après les valeurs des paramètres extraites du traitement des données, une tendance à la diminution du nombre de PME diffusant librement est observée entre la diffusion de la PME dans une solution tampon (~70 molécules) et sa diffusion en présence de pectines (~48 molécules) (Tableau 12). Cette constatation est à relativiser du fait des écarts-types importants. Les mesures réalisées en FCS prenant uniquement en compte les molécules diffusantes, il est possible d'émettre l'hypothèse qu'en présence de pectine ou de pectine et de calcium, une même proportion d'O-PME se fixe à la pectine, entraînant une diminution du nombre de molécules diffusantes. D'autre part, la présence d'une proportion de la population de PME diffusant aux temps longs plus importante en solution de pectines seules qu'en présence de pectines et de calcium pourrait s'expliquer grâce à la forte affinité de l'O-PME pour la pectine. En effet, la détermination du  $K_m$  a montré que l'O-PME avait une affinité plus importante pour la pectine dans une solution de pectines seule plutôt qu'en présence de calcium. Cette forte affinité dans une solution de pectines peut se traduire, soit par une réduction du temps de re-fixation à la pectine, soit par un temps de fixation plus long qu'en présence de pectine et de calcium. Néanmoins, les temps de diffusion diffèrent peu d'un environnement à un autre, ce qui conduit à des coefficients de diffusion proches. La diffusion de l'O-PME entre deux fixations ne serait donc pas influencée par la modification de l'environnement.

### 7.2.2.2. Evaluation de l'influence de l'activité de l'O-PME sur la diffusion

Afin de déterminer l'effet de l'activité de l'O-PME sur sa diffusion, l'O-PME a été inactivée thermiquement. Sa diffusion a ensuite été suivie dans les mêmes conditions que pour l'O-PME active. Toutefois, le nombre final de molécules étant plus faible que celui de l'O-PME active, il est possible que le traitement thermique ait conduit à une précipitation d'une partie des protéines.

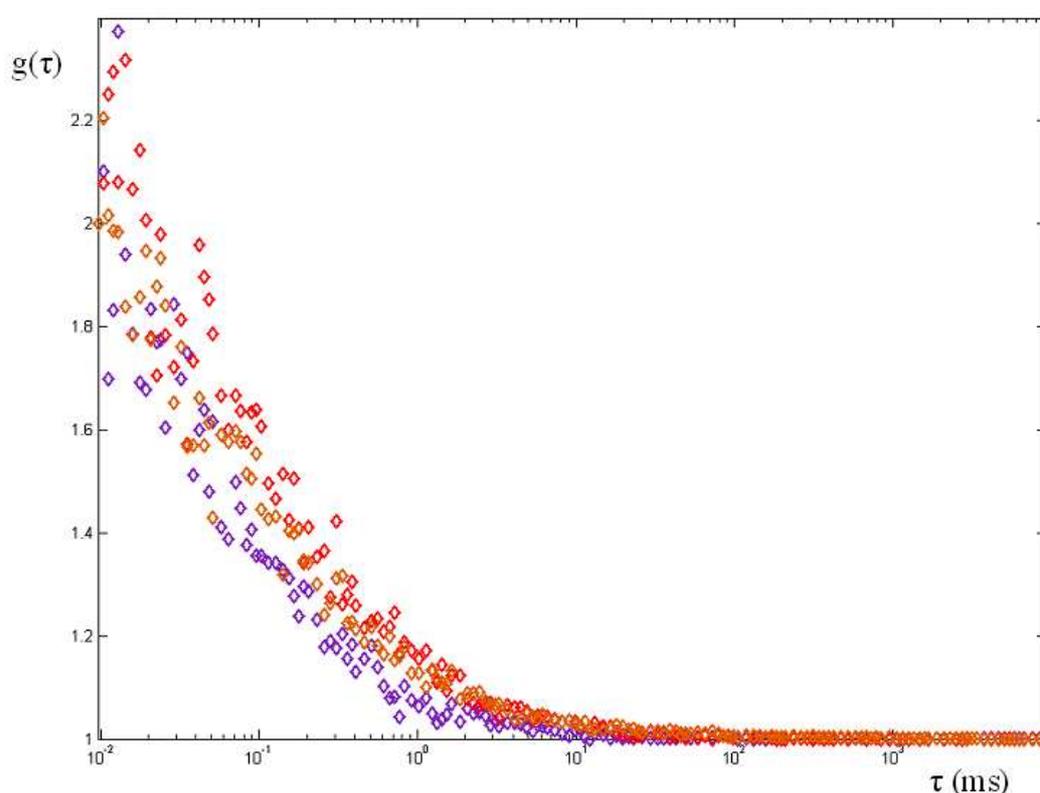


Figure 52 : Courbes d'auto-corrélation moyennes normalisées obtenues lors de la diffusion d'O-PME inactivée dans une solution de tampon MES (violet), une solution de pectines (orange) et dans un gel en formation (rouge).

D'après l'observation des courbes moyennes, l'O-PME inactive aurait un temps de diffusion plus court lors de sa diffusion en tampon que dans les autres environnements (Figure 52). Cette tendance peut s'expliquer par l'augmentation de la viscosité du milieu en présence de pectines qui, conformément à l'équation de Stokes-Einstein (équation 7.1.I), diminue le coefficient de diffusion. A l'inverse de l'O-PME active diffusant dans une solution de pectines, l'O-PME inactive ne présente pas une population plus élevée de molécules diffusant aux temps longs. Le comportement de l'O-PME inactive diffère également de celui de l'O-

PME active par le fait que la proportion de molécules fluorescentes diffusantes reste semblable quel que soit l'environnement considéré (Tableau 13). Ces observations suggèrent l'absence d'interaction entre l'O-PME inactivée et la pectine.

	O-PME inactivée MES		O-PME inactivée pectine		O-PME inactivée pectine Ca	
	valeur moyenne	écart-type	valeur moyenne	écart-type	valeur moyenne	écart-type
<b>N</b>	34,76	6,00	36,82	5,38	35,70	5,61
<b>a (%)</b>	94,66	3,00	96,88	1,59	96,30	2,66
<b><math>\tau_d</math> (ms)</b>	0,10	0,03	0,10	0,02	0,09	0,03
<b><math>\tau_b</math> (ms)</b>	52,47	155,16	49,22	54,44	7,41	7,24
<b><math>D\tau_d</math> (<math>\text{mm}^2.\text{s}^{-1}</math>)</b>	$2,54.10^{-04}$	$7,61.10^{-05}$	$2,38.10^{-04}$	$5,21.10^{-05}$	$2,86.10^{-04}$	$3,06.10^{-04}$

Tableau 13 : Comparaison des valeurs extraites des courbes d'auto-corrélation et du coefficient de diffusion obtenues lors de la diffusion de l'O-PME inactivée en solution, en solution de pectines, en gel en formation.

Les coefficients de diffusion déterminés pour l'O-PME active et pour l'O-PME inactive ne sont pas significativement différents les uns des autres (Tableau 12 et Tableau 13). Néanmoins ces résultats suggèrent que l'O-PME inactive diffuserait toujours plus rapidement que l'O-PME active. De plus, la plupart des molécules d'O-PME diffusent de la même façon dans les différents environnements qu'elles soient actives ou inactives. Néanmoins, la proportion de la population minoritaire de molécules diffusantes tend à augmenter pour l'O-PME active dans une solution de pectines, de même que le temps de diffusion la caractérisant. Cette tendance n'est pas observée pour l'O-PME inactivée, ce qui laisse penser que ce phénomène est fortement lié à l'action de l'O-PME.

### 7.2.2.3. Suivi de la diffusion de l'O-PME dans un gel préformé

Le suivi de la diffusion dans un gel préformé allie à la fois le transport de diffusion, c'est-à-dire le temps que vont mettre les molécules d'enzyme pour se répartir sur tout le volume du gel, et l'autodiffusion des molécules. Ces deux phénomènes sont simultanés. Le premier phénomène est mis en évidence par l'évolution du nombre de molécules diffusant librement dans le volume d'observation au cours du temps et suivi par FCS (Figure 53) et le

second est suivi via la mesure du temps de diffusion et le calcul du coefficient d'autodiffusion.

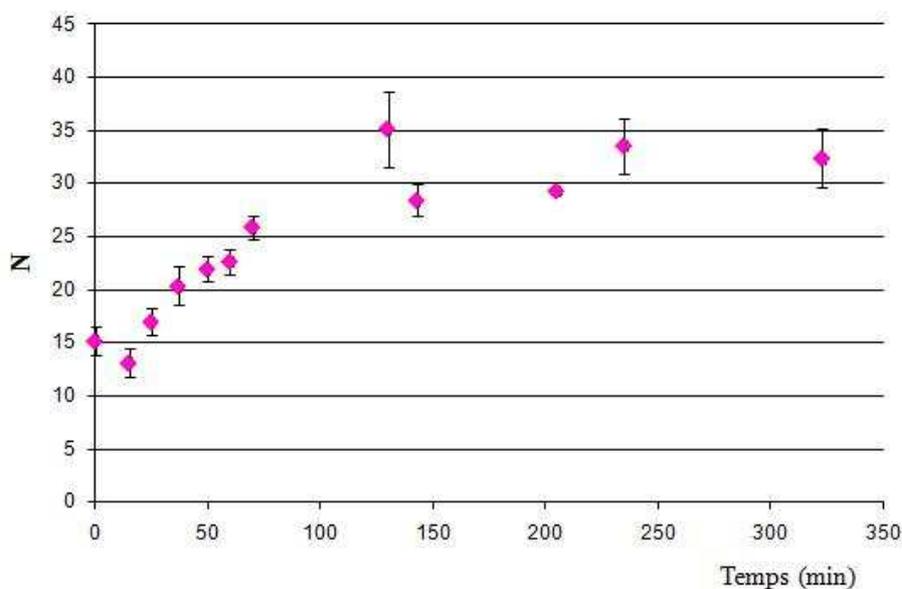


Figure 53 : Evolution du nombre de molécules d'O-PME diffusant librement dans le volume d'observation en fonction du temps après dépôt de l'enzyme.

Une augmentation du nombre de molécules dans le volume d'observation est notée pendant la première heure. Le nombre de molécules se stabilise entre 80 et 130 minutes et reste ensuite constant (Figure 53). A 24h, le nombre de molécules mesuré est de 35.

L'évolution du temps de diffusion a été suivie pendant la même période. La comparaison des courbes d'auto-corrélation à différents temps montre une évolution du temps de diffusion lors des 15 premières minutes suivant l'application de l'O-PME. Cette évolution se traduit au niveau du coefficient de diffusion par son augmentation rapide au cours des 15 premières minutes, puis une stabilisation autour de la valeur du coefficient de diffusion de l'O-PME dans le tampon MES : à 24h, le coefficient de diffusion mesuré est de  $1,9 \cdot 10^{-4} \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  (Figure 54).

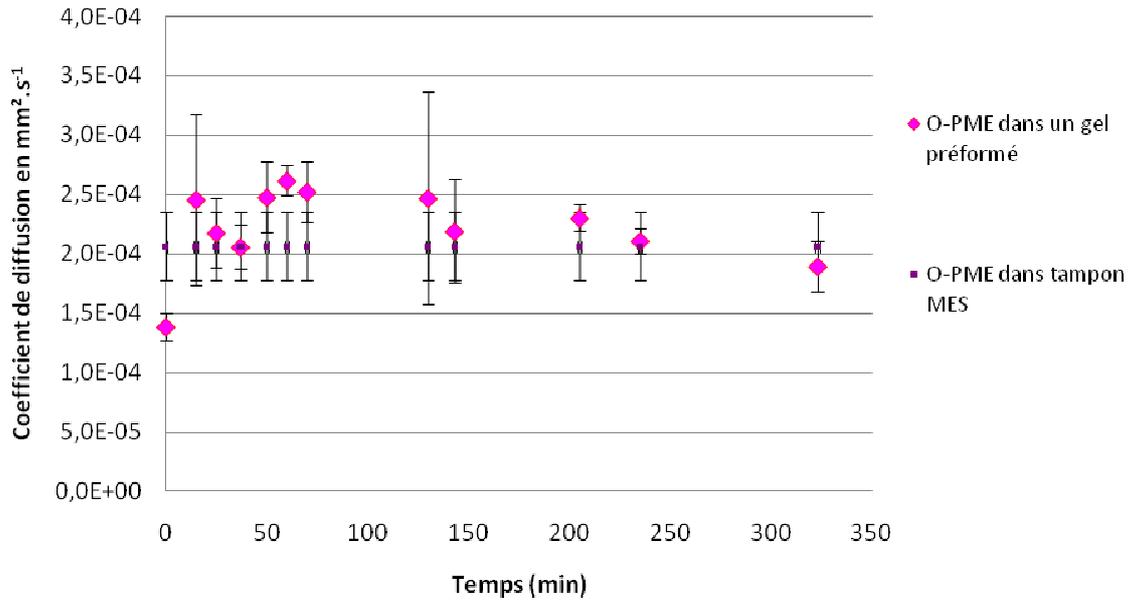


Figure 54 : Evolution du coefficient de diffusion de l'O-PME au cours du temps dans un gel préformé (rose) et dans le tampon (violet).

Cet effet est probablement dû à l'application de la solution d'enzyme sur le gel qui provoque la formation d'une interface gel-liquide. Or, il a été montré pour un gel d'agarose que deux couches se forment de part et d'autre de l'interface. Du côté liquide, une couche s'établit à cause de l'extension des chaînes de polymères, induisant une viscosité plus importante que celle de la phase liquide. Du côté gel, il a été montré qu'une couche de porosité moins importante que le reste du gel se forme et agit comme un tamis sur les molécules pénétrant dans le gel (Labille *et al.*, 2006). La formation de ces deux couches pourrait aussi être possible pour les gels de pectines. L'augmentation du coefficient de diffusion pour l'O-PME pourrait ainsi être due au passage de cette couche tamis.

Cet effet pourrait aussi être dû à l'équilibre s'instaurant entre la PME libre et la PME fixée dans les premières minutes et qui entraverait ainsi la diffusion libre de la PME.

Pour vérifier cette dernière hypothèse, l'effet de l'activité de l'O-PME sur sa diffusion en gel a été étudié en observant la diffusion de l'O-PME inactivée dans le gel préformé.

De la même façon que pour la PME active, une augmentation du nombre de molécules dans le volume d'observation est constatée (Figure 55). Toutefois, cette augmentation est lente. A 24h, le nombre mesuré de molécules diffusantes est de 29.

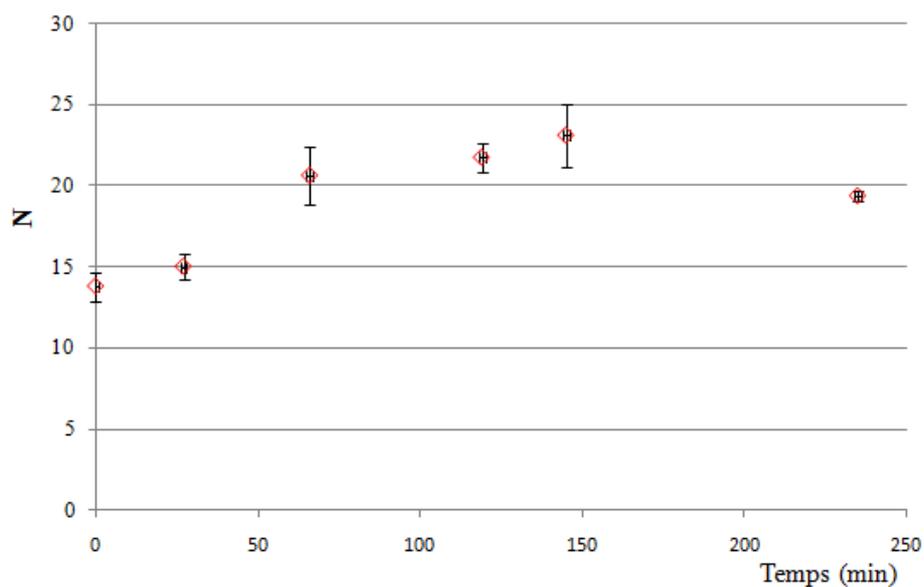


Figure 55 : Evolution du nombre de molécules d'O-PME inactive diffusant librement dans le gel préformé en fonction du temps après le dépôt de l'enzyme.

Le coefficient de diffusion au cours du temps présente aussi une évolution similaire à celle observée pour l'O-PME active (Figure 56). Une augmentation du coefficient de diffusion est observée dans les premiers temps après le dépôt de l'enzyme, puis le coefficient se stabilise autour de la valeur obtenue pour la diffusion de l'O-PME inactivée dans le tampon MES. A 24h, le coefficient de diffusion mesuré est de  $2,4 \cdot 10^{-4} \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ . Cette évolution du coefficient de diffusion est probablement due à la pénétration des molécules dans le gel tout comme décrit précédemment.

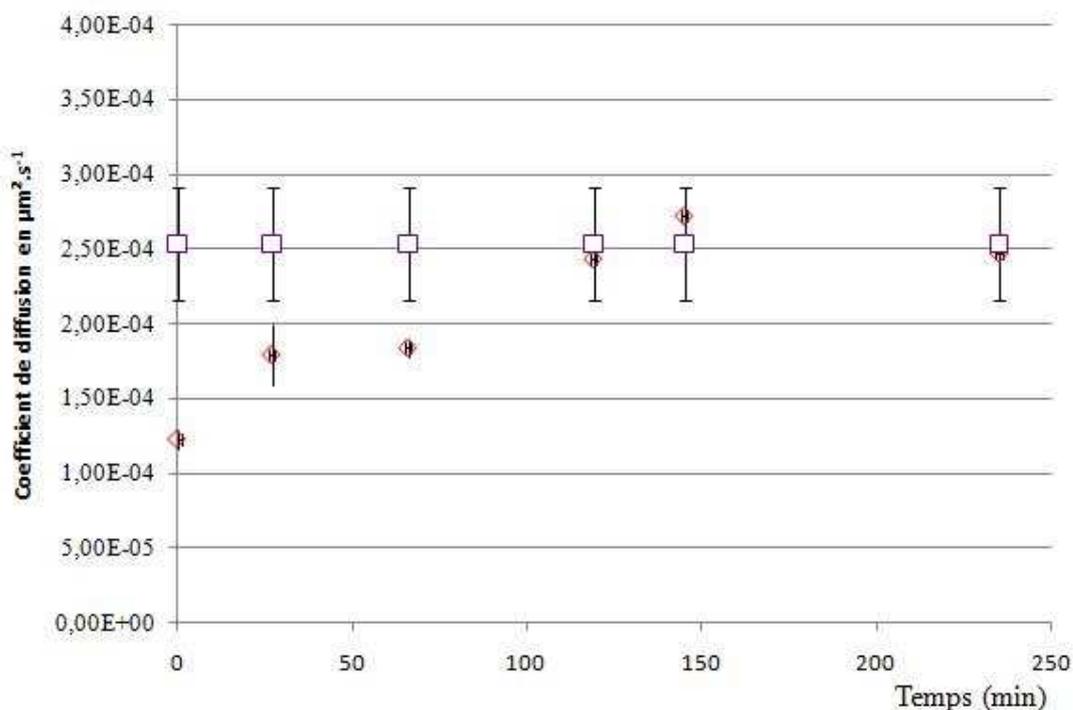


Figure 56 : Evolution du coefficient de diffusion de l'O-PME inactivée au cours du temps dans un gel préformé (losanges) et dans la solution tampon (carrés).

Par conséquent, mise à part l'augmentation du coefficient de diffusion dans les premiers temps suivant le dépôt de l'O-PME, la diffusion en gel préformé présente des caractéristiques similaires à celles de la diffusion dans les trois autres environnements considérés. Les coefficients de diffusion calculés pour les molécules diffusant librement restent semblables. Ainsi, aucune influence de l'activité de l'O-PME sur sa diffusion n'est mise en évidence dans un gel préformé.

### 7.2.3. Diffusion de l'Aa-PME

#### 7.2.3.1. La diffusion de l'Aa-PME dans différents environnements

La diffusion de l'Aa-PME est comparée en solution tampon, en solution de pectines et en gel en formation (pectine - calcium). Le nombre de molécules diffusant librement dans le volume d'observation présente une forte dispersion des valeurs, mais a tendance à augmenter au cours du temps (Figure 57 a). Les valeurs des temps de diffusion extraites des données brutes sont aussi très dispersées et oscillent autour d'une valeur moyenne ( $\sim 0,19$  ms) pendant les 3h d'observation (Figure 57 b).

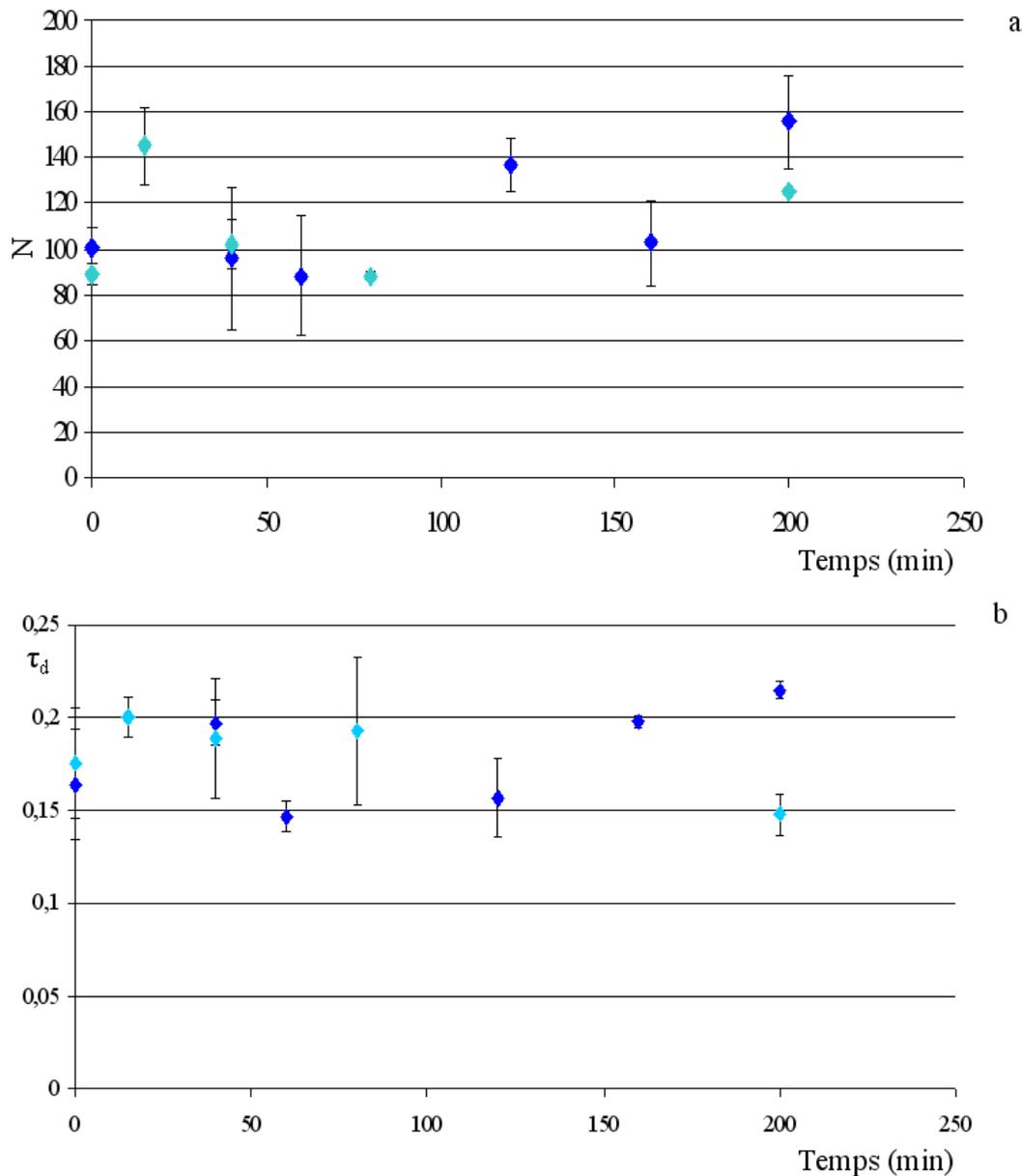


Figure 57 : Evolution du nombre de molécules diffusantes (a) et du temps de diffusion (b) lors de la diffusion de l'Aa-PME dans une solution de pectine (bleu clair) ou dans un gel en cours de formation (bleu foncé).

Les courbes d'auto-corrélation obtenues dans les différents environnements ont des allures semblables (Figure 58) et un temps de diffusion à mi-hauteur équivalent, ce qui signifie que la nature de l'environnement affecte peu la diffusion de la PME à une échelle locale. Ces similarités graphiques sont confirmées par la proximité des valeurs des coefficients de diffusion obtenues après traitement des données (Tableau 14).

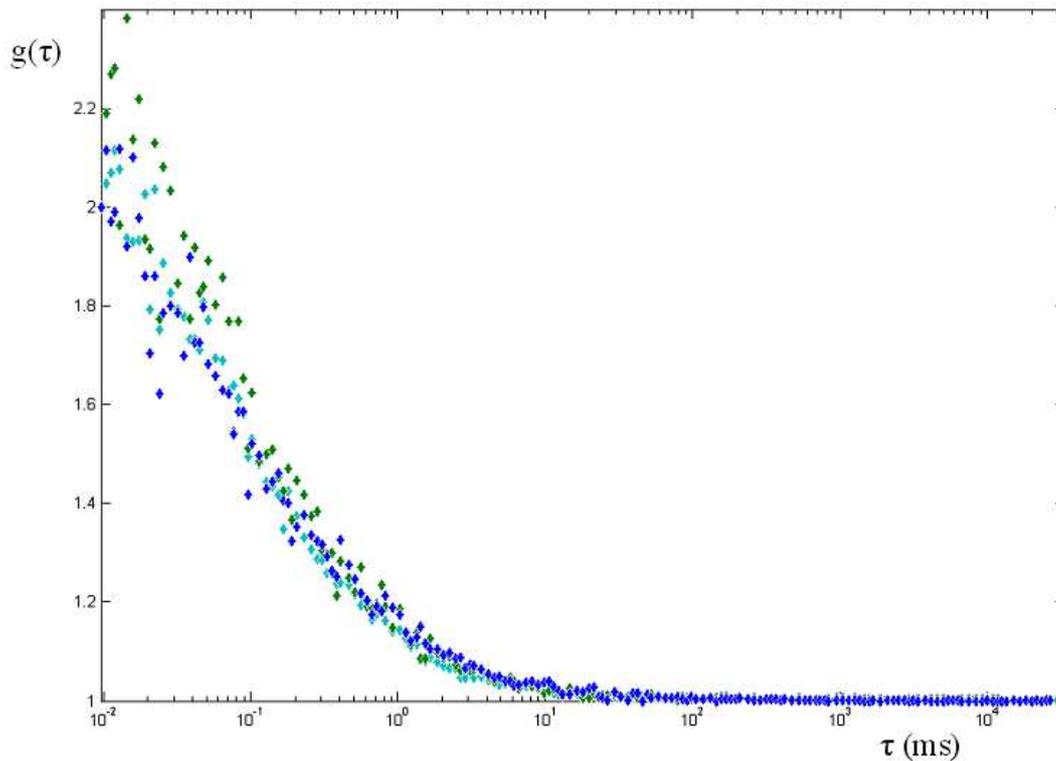


Figure 58 : Comparaison des courbes d'auto-corrélation normalisées de l'Aa-PME diffusant librement dans le tampon (vert), dans une solution de pectines (bleu clair), dans un gel en formation (bleu foncé).

Néanmoins, l'Aa-PME dans le tampon semble toujours diffuser plus rapidement (temps de diffusion plus court) et en nombre plus élevé que dans les autres environnements. Ces phénomènes peuvent s'expliquer par l'interaction entre la pectine et l'Aa-PME conduisant à l'immobilisation d'une fraction des enzymes, et par l'augmentation de la viscosité du milieu conformément à l'équation de Stokes-Einstein (équation 7.1.I). Ces tendances sont corroborées par les valeurs  $N$  du nombre de molécules diffusantes, des temps de diffusion,  $\tau_d$  et  $\tau_b$  et des coefficients de diffusion  $D\tau_d$  obtenus après traitement des données (Tableau 14).

	Aa-PME dans tampon MES		Aa-PME dans solution de pectines		Aa-PME dans gel en formation	
	moyenne	écart-type	moyenne	écart-type	moyenne	écart-type
<b>N</b>	126,43	44,24	109,98	31,69	104,25	22,99
<b>a (%)</b>	94,30	2,31	0,94	0,04	92,64	0,03
<b><math>\tau_d</math> (ms)</b>	0,11	0,01	0,20	0,11	0,18	0,08
<b><math>\tau_b</math> (ms)</b>	6,33	3,30	46,07	40,17	11,70	8,92
<b><math>D\tau_d</math> (<math>\text{mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}</math>)</b>	$1,98 \cdot 10^{-04}$	$2,61 \cdot 10^{-05}$	$1,36 \cdot 10^{-04}$	$8,55 \cdot 10^{-05}$	$1,39 \cdot 10^{-04}$	$6,34 \cdot 10^{-05}$

Tableau 14: Comparaison des paramètres de diffusion de l'Aa-PME dans trois environnements différents.

Ainsi, bien que des orientations se dégagent sur l'évolution des coefficients de diffusion d'un environnement à l'autre, ces derniers ne sont que statistiquement peu différents, les écarts-types sur ces valeurs étant très élevés.

#### 7.2.3.2. Evaluation de l'influence de l'activité sur la diffusion de l'Aa-PME

L'influence de l'activité de l'Aa-PME sur sa diffusion a été étudiée de la même façon que pour l'O-PME, en réalisant des expériences de diffusion similaires avec une enzyme inactivée thermiquement.

D'après l'observation des courbes moyennes, la diffusion de l'Aa-PME inactive en tampon serait plus rapide (un temps de diffusion plus court) que dans les autres environnements (Figure 59). Cette différence est probablement liée à la différence de viscosité entre les deux milieux.

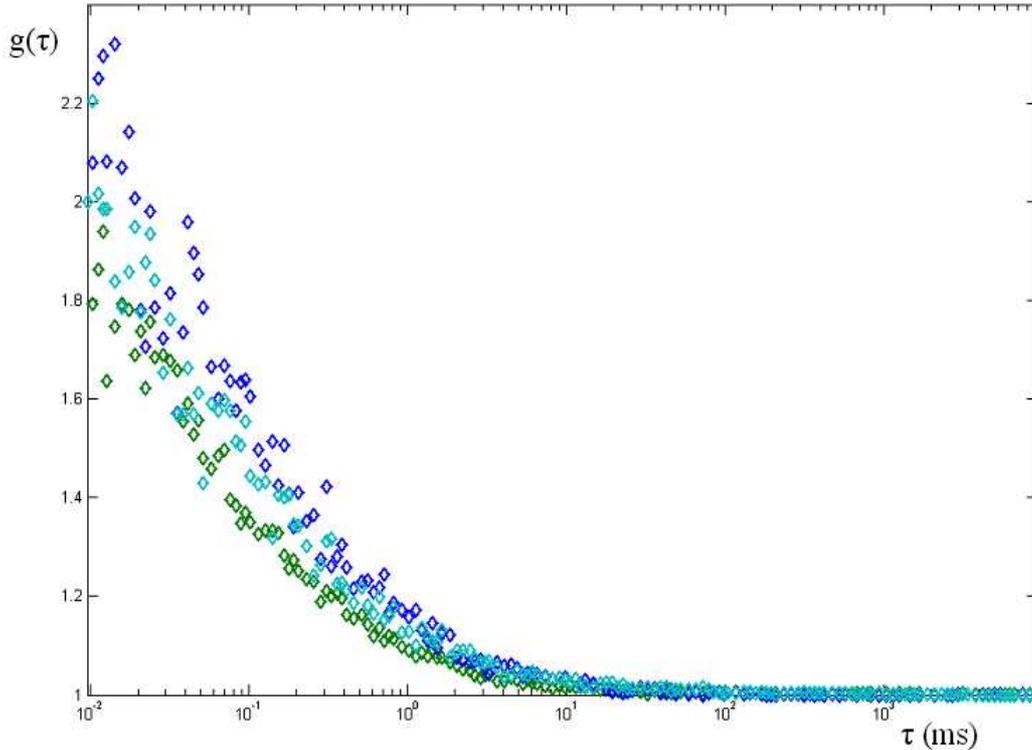


Figure 59 : Comparaison des courbes de corrélation moyennes normalisées obtenues lors de la diffusion de l'Aa-PME inactivée en tampon (vert), en solution de pectines (bleu clair), en solution de pectines et présence de calcium (bleu foncé).

Les valeurs extraites du traitement des courbes d'auto-corrélation ne permettent pas de différencier la diffusion de l'Aa-PME inactivée dans les différents environnements (Tableau 15). Néanmoins, la tendance observée sur les courbes moyennes concernant un temps de diffusion plus court pour la diffusion en solution tampon est confirmée.

	Aa-PMEi dans tampon MES		Aa-PMEi dans solution de pectines		Aa-PMEi dans un gel en formation	
	moyenne	écart-type	moyenne	écart-type	moyenne	écart-type
<b>N</b>	116,69	51,57	102,65	9,87	98,87	11,59
<b>a (%)</b>	91,88	4,56	93,62	2,44	93,03	2,25
<b><math>\tau_d</math> (ms)</b>	3,97	15,23	8,96	6,21	8,42	6,03
<b><math>\tau_b</math> (ms)</b>	0,10	0,08	0,15	0,04	0,11	0,04
<b><math>D\tau_d</math> (<math>\text{mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}</math>)</b>	$2,35 \cdot 10^{-04}$	$7,26 \cdot 10^{-05}$	$1,62 \cdot 10^{-04}$	$4,32 \cdot 10^{-05}$	$2,18 \cdot 10^{-04}$	$6,45 \cdot 10^{-05}$

Tableau 15 : Comparaison des données moyennes obtenues pour la diffusion de l'Aa-PME inactivée en tampon, en solution de pectines et dans un gel en cours de formation.

Les coefficients de diffusion obtenus pour l'Aa-PME inactive ont été comparés à ceux de l'Aa-PME active : aucune différence significative n'est constatée. Mais globalement, l'Aa-PME inactivée (Tableau 15) tend à présenter un coefficient de diffusion supérieur à l'Aa-PME active (Tableau 14) à la fois en tampon, en solution de pectines, et en gel en formation. Cette orientation paraît assez inattendue. En effet, l'inactivation de la PME a conduit à une modification de sa structure engendrant une augmentation du rayon hydrodynamique de la protéine. Par conséquent, si l'on considère la relation de Stokes-Einstein, le coefficient de diffusion mesuré devrait diminuer, ce qui n'est pas le cas ici. L'augmentation du coefficient de diffusion pourrait être due au fait que l'inactivation de la PME diminue les interactions possibles avec la pectine.

### 7.2.3.3. Diffusion de l'Aa-PME en gel préformé

La diffusion de l'Aa-PME est suivie au cours du temps, après le dépôt d'une solution d'enzyme à la surface du gel. Tout comme dans le cas de l'O-PME, un phénomène de transport de diffusion est observé lors de l'arrivée de l'Aa-PME dans la zone d'observation. Le nombre de molécules diffusant dans le volume d'observation augmente au cours du temps (Figure 60). Celui-ci se stabilise autour de 250 min, et 24h après l'application de la solution d'Aa-PME, il se situe aux alentours de 64 molécules dans le volume de détection.

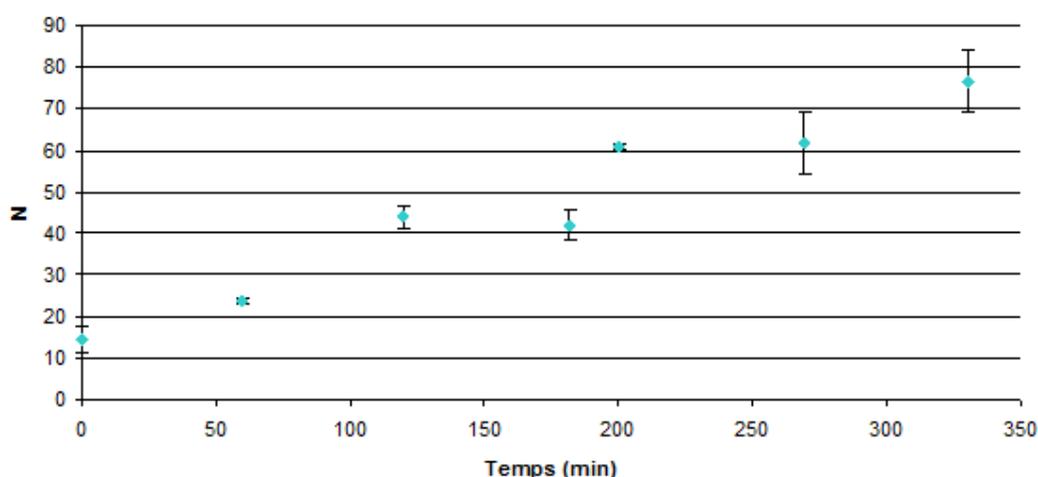


Figure 60 : Evolution du nombre de molécules diffusant dans le volume d'observation lors de la diffusion de l'Aa-PME active dans un gel de pectines préformé.

Le coefficient de diffusion évolue en fonction de la durée écoulée après le temps de dépôt. Il a tendance à diminuer au cours du temps. Cette évolution du coefficient de diffusion de l'Aa-

PME au cours du temps présente donc une allure différente de celle obtenue pour la diffusion de l'O-PME (Figure 61).

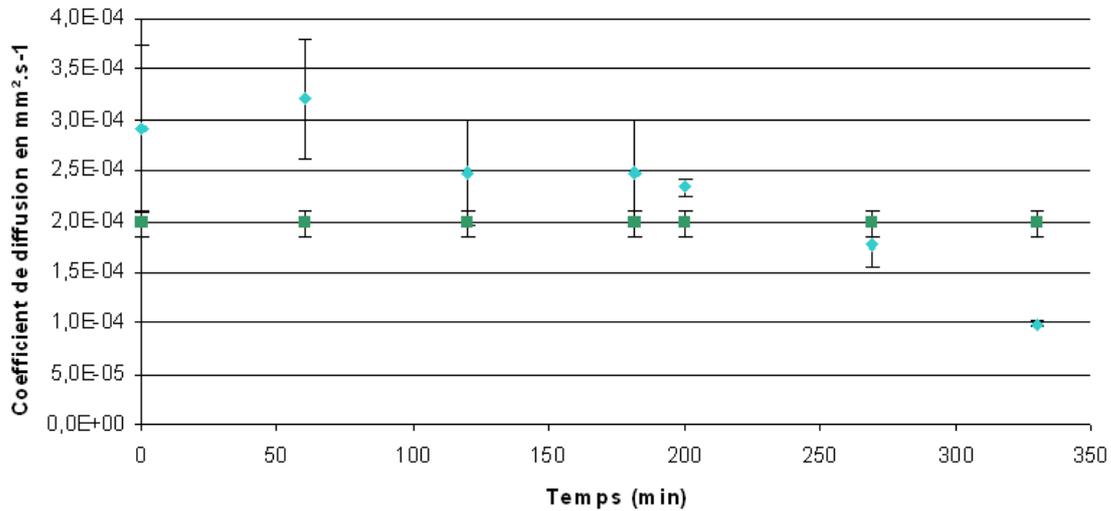


Figure 61 : Evolution du coefficient de diffusion au cours du temps lors de la diffusion de l'Aa-PME dans un gel de pectines préformé (bleu) en comparaison avec le coefficient de diffusion obtenu en tampon MES (vert).

A la différence du comportement observé pour l'O-PME, une diminution du coefficient de diffusion de l'Aa-PME intervient dans les premiers temps suivant le dépôt de l'enzyme pour ensuite approcher la valeur du coefficient de diffusion dans le tampon : 24h après le dépôt, le coefficient de diffusion moyen est de  $1,8 \cdot 10^{-4} \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ .

Ainsi la diffusion de l'Aa-PME a tendance à être influencée par le gel dans les premiers temps après le dépôt de l'enzyme.

L'effet de l'activité sur la diffusion de l'Aa-PME a aussi été étudié grâce à l'étude de l'Aa-PME inactivée. Tout comme l'Aa-PME active, la mesure de la diffusion locale s'effectue en même temps que la mise en place d'un gradient de concentration dans le gel. Le nombre de molécules d'Aa-PME augmente au cours du temps plus rapidement que dans le cas de l'Aa-PME active (Figure 62).

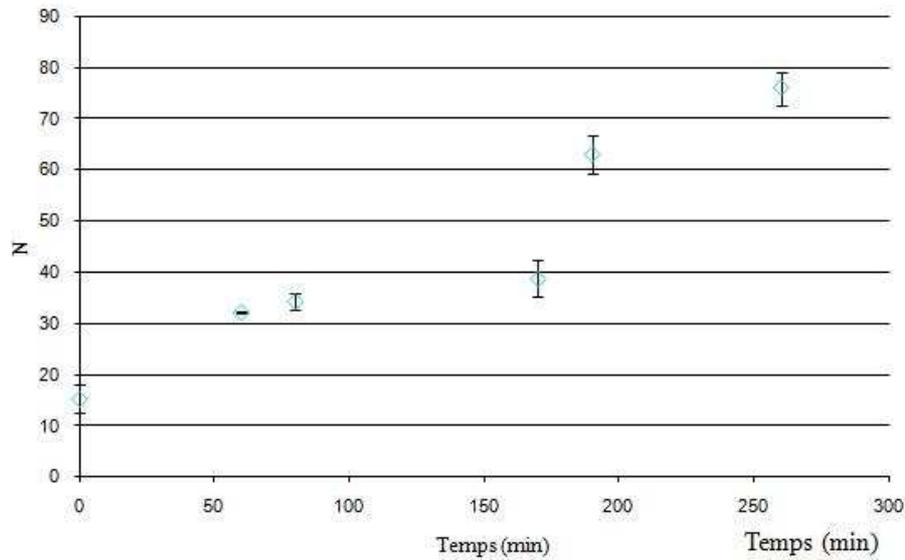


Figure 62 : Evolution du nombre de molécules diffusant dans le gel préformé lors de la diffusion de l'Aa-PME inactivée.

Le nombre maximal de molécules est atteint à partir de 250 minutes après quoi il se stabilise autour de 73 molécules dans le volume d'observation. En revanche, aucune tendance particulière n'émerge pour l'évolution du coefficient de diffusion au cours du temps : il oscille autour de la valeur obtenue dans le tampon et, après 24h de migration, est mesuré autour de  $1,74 \cdot 10^{-4} \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  (Figure 63).

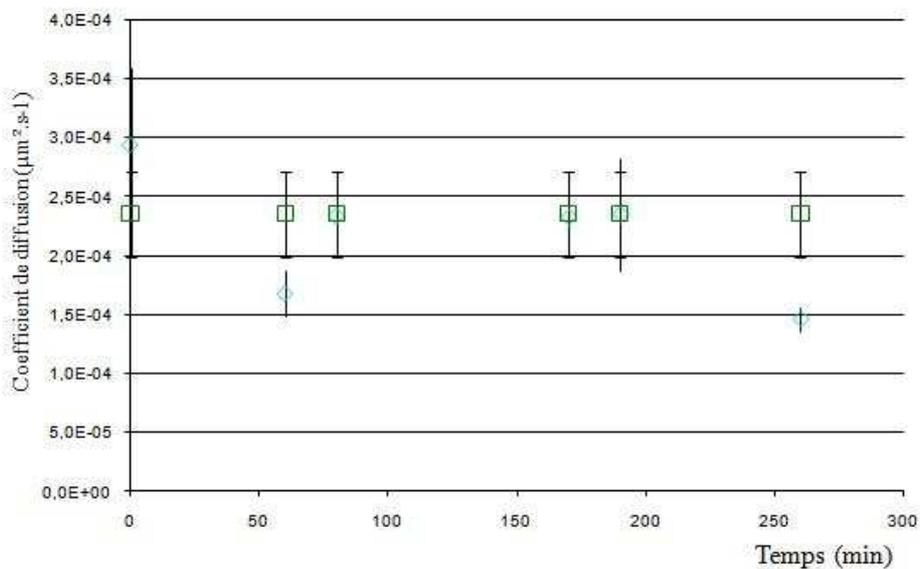


Figure 63 : Evolution du coefficient de diffusion au cours de la migration de l'Aa-PME inactivée au cours du temps dans un gel préformé (ronds bleus) et comparaison avec le coefficient de diffusion obtenu dans le tampon (carrés verts).

Ces résultats prouvent que l'activité de l'Aa-PME n'influence pas le comportement de diffusion de l'Aa-PME en gel. L'évolution du coefficient de diffusion de l'Aa-PME au cours du temps a tendance à diminuer dans la première heure après le dépôt de l'enzyme tandis qu'une augmentation est notée pour l'O-PME. D'autre part, le nombre de molécules diffusant dans le volume d'observation atteint un plateau plus rapidement pour l'O-PME que pour l'Aa-PME.

De plus, l'inactivation de l'Aa-PME ou de l'O-PME a tendance à augmenter leur coefficient de diffusion. Cette tendance soutient l'hypothèse que l'activité des enzymes influe sur leur diffusion en la ralentissant. D'autre part, les coefficients de diffusion déterminés sont tous du même ordre de grandeur ( $\approx 2 \cdot 10^{-4} \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ) pour les deux enzymes et dans les différents environnements considérés, seules des tendances ont pu être observées. Cela suggère que l'étude de la diffusion à cette échelle est trop locale et les durées d'acquisition trop faibles pour pouvoir observer des comportements de diffusion contrastés. Une échelle de taille et de temps supérieure a donc été adoptée pour la suite de ce travail.

### **7.3. Etude de la diffusion à une échelle intermédiaire**

L'emploi de la FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) sur les mêmes systèmes a permis d'effectuer des mesures sur des échelles de temps et de longueur plus importantes.

Afin d'obtenir un signal suffisant pour exploiter les courbes de retour d'intensité de la fluorescence, les concentrations en O-PME et en Aa-PME marquées au FITC ont été augmentées. Elles ont été multipliées par 10 et par 20 pour l'Aa-PME et l'O-PME respectivement.

Les mesures sont effectuées dans les mêmes environnements qu'en FCS : en solution de pectines et en gel en formation, en gel préformé. Une mesure de référence correspondant à la diffusion libre de l'enzyme est aussi réalisée dans le tampon MES ( $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ ). L'exploitation des données est effectuée par comparaison graphique des courbes moyennes et par calcul du coefficient d'autodiffusion moyen à partir des ajustements des différentes acquisitions. Par ailleurs, le temps de diffusion ( $\tau_d$ ) et le taux de retour de fluorescence à l'infini ( $F_0$ ) ont aussi été reportés dans les tableaux.

Par ailleurs, il a été noté un ralentissement de la diffusion au voisinage de la lamelle. Plusieurs distances du point d'observation à la lamelle ont été testées (3, 5, et  $10 \mu\text{m}$ ). La diminution du coefficient à l'approche de la lamelle est probablement due à une interaction indésirable des PME avec cette dernière. Néanmoins, la décroissance importante du signal avec l'éloignement par rapport à la lamelle a conduit à effectuer les expériences à  $3 \mu\text{m}$  de la lamelle.

#### **7.3.1. Etude de la diffusion de l'O-PME**

##### **7.3.1.1. Comparaison des trois environnements**

La diffusion de l'O-PME a été étudiée en tampon, en solution de pectines et dans un gel en cours de formation (Figure 64).

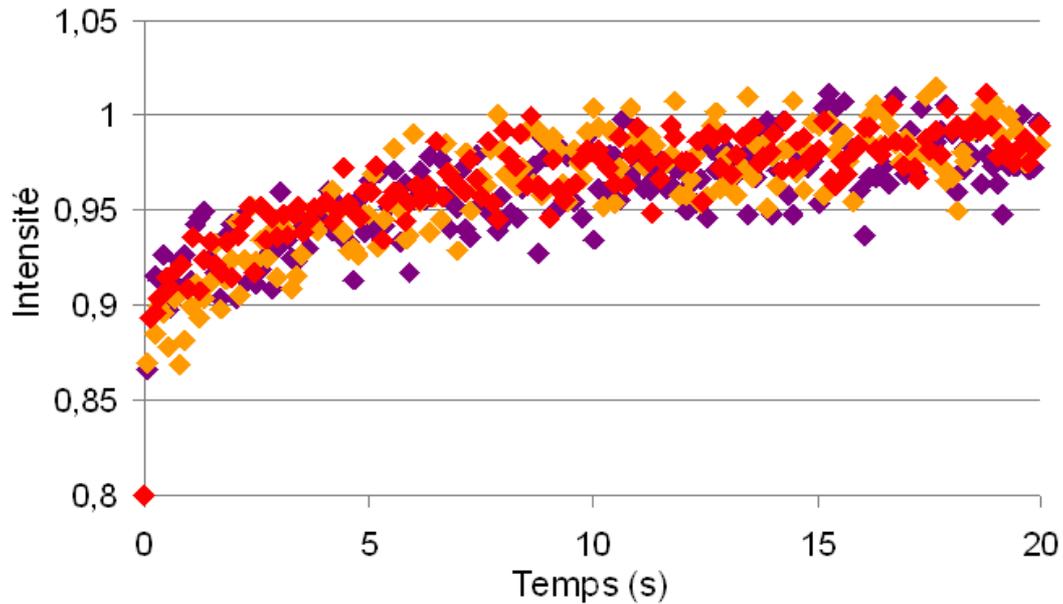


Figure 64: Comparaison des courbes normalisées de retour de fluorescence pour la diffusion de l'O-PME dans le tampon (violet), dans une solution de pectines (orange), dans un gel en cours de formation (rouge).

Comme le montre la figure 64, les données obtenues pour la diffusion de l'O-PME en solution sont très dispersées et ne permettent pas de distinguer nettement la diffusion en solution de la diffusion en gel en formation.

	Tampon		Solution de pectines		Gel en formation		Gel préformé
	moyenne	écart-type	moyenne	écart-type	moyenne	écart-type	
$\tau_d$ (s)	17,11	0,81	9,00	1,70	6,00	1,75	9,10
$F_0$	0,96	0,00	0,96	0,00	0,94	0,01	0,98
$D$ ( $\mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ )	0,40	0,02	1,05	0,24	1,32	0,38	0,82

Tableau 16: Comparaison des caractéristiques de diffusion obtenues suite à la diffusion de l'O-PME en tampon, dans une solution de pectines et dans un gel en cours de formation.

Les données extraites à partir des courbes de retour de la fluorescence confirment les tendances observées graphiquement (Tableau 16). L'augmentation du coefficient de diffusion en présence de pectine pourrait s'expliquer par une diminution de l'interaction entre la lamelle et l'enzyme. Les analyses des courbes de retour de la fluorescence de l'O-PME en solution de pectine ou dans un gel en formation conduisent à des coefficients de diffusion similaires. La

diffusion de l'O-PME dans un gel préformé n'a été réalisée que sur un seul échantillon par conséquent ; aucun écart-type n'est disponible. Toutefois, il est possible de noter que l'O-PME diffuse plus lentement que dans un gel en formation ou en solution de pectine.

### 7.3.1.2. Influence de l'activité sur la diffusion

L'influence de l'activité de l'O-PME sur sa diffusion a été évaluée en réalisant un suivi de diffusion de l'enzyme inactivée dans le tampon et dans la solution de pectines (Figure 65).

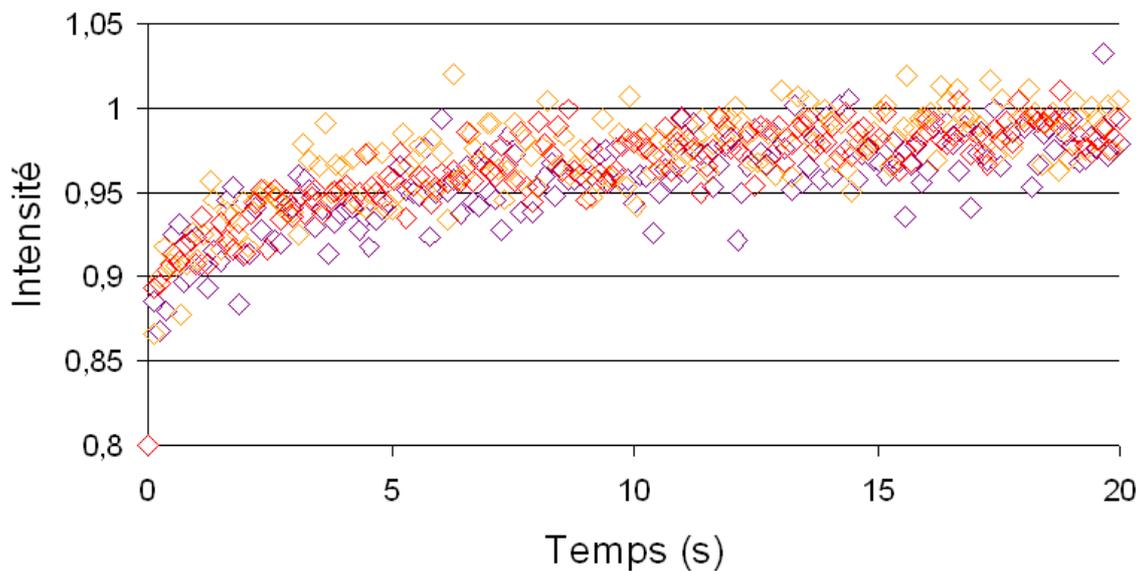


Figure 65 : Comparaison des courbes normalisées de retour de fluorescence normalisées obtenues lors de la diffusion de l'O-PME inactivée dans le tampon (violet), dans une solution de pectines (orange) et dans un gel en formation (rouge).

Les courbes de retour de la fluorescence de l'enzyme dans le tampon et dans la pectine sont pratiquement superposées. La différence de diffusion entre les deux environnements doit donc être faible.

	Tampon		Solution de pectines		Gel en formation	
	moyenne	écart-type	moyenne	écart-type	moyenne	écart-type
$\tau_d$ (s)	9,06	3,83	2,88	1,20	6,19	1,13
$F_0$	0,95	0,00	0,98	0,01	0,95	0,02
$D$ ( $\mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ )	0,98	0,41	3,01	1,11	1,22	0,22

Tableau 17 : Comparaison des caractéristiques de diffusion obtenues lors de la diffusion de la PME inactivée dans le tampon et dans une solution de pectines.

La similarité des courbes de retour se retrouve dans les coefficients de diffusion calculés (Tableau 17). La légère différence entre les coefficients de diffusion de l'enzyme en présence de pectines et en solution tampon peut être liée à une interaction indésirable de l'O-PME avec la lamelle : la présence des pectines pourrait limiter cette interaction et conduire à un coefficient de diffusion supérieur. D'autre part, les coefficients obtenus pour l'O-PME active sont plus faibles que ceux mesurés avec l'O-PME inactive dans une solution de pectines (tableaux 16 et 17). Cet écart n'est plus visible lors du suivi de diffusion en présence de calcium.

Comme pour les résultats obtenus en FCS, il est possible de conclure que l'O-PME active a tendance à diffuser moins rapidement que l'O-PME inactive, ce qui laisse supposer un effet de l'activité sur la diffusion de l'O-PME.

### 7.3.2. Etude de la diffusion de l'Aa-PME

#### 7.3.2.1. Comparaison des trois environnements

Tout comme pour l'O-PME, la diffusion de l'Aa-PME a été suivie dans les trois environnements suivants : en tampon, dans une solution de pectines et dans un gel en formation. Dans un premier temps, les courbes de retour de la fluorescence de l'enzyme dans les trois environnements ont été comparées (Figure 66).

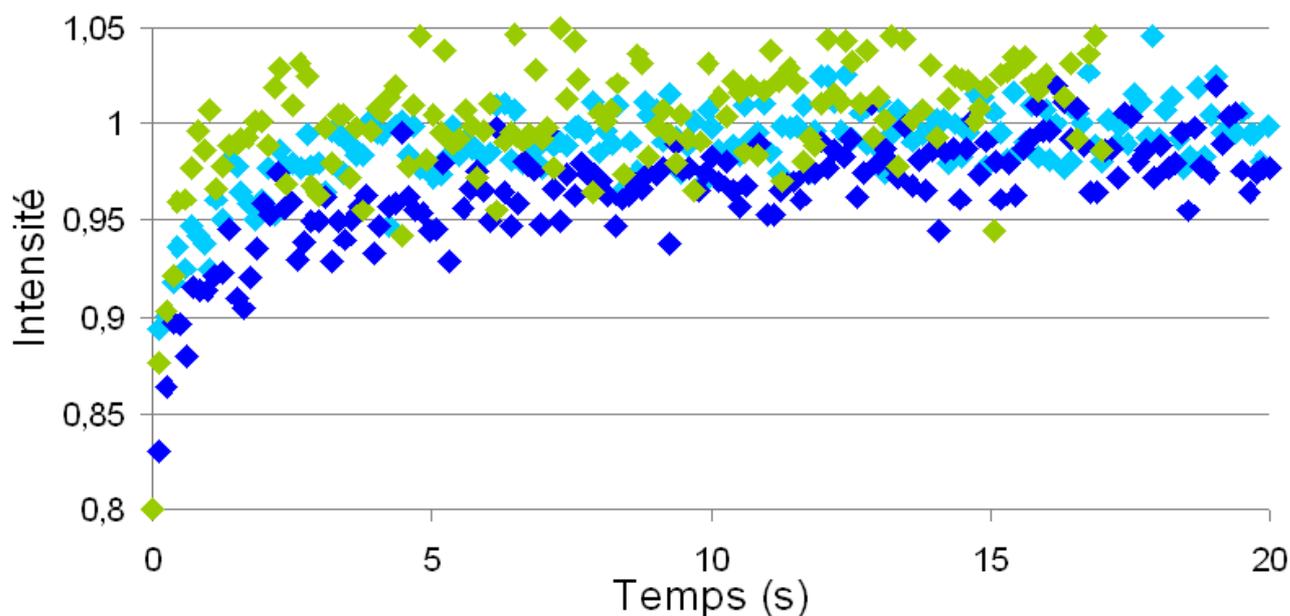


Figure 66 : Comparaison des courbes normalisées de retour de fluorescence normalisées obtenues lors de la diffusion de l'Aa-PME dans le tampon (vert), dans une solution de pectines (bleu clair), dans un gel en formation (bleu foncé).

Les courbes de retour de la fluorescence concernant la diffusion de l'Aa-PME en tampon et dans une solution de pectine sont proches. La courbe concernant la diffusion de l'enzyme dans un gel en formation met en évidence un retour de fluorescence plus long par rapport aux deux autres environnements.

	Tampon		Solution de pectines		Gel en formation	
	moyenne	écart-type	moyenne	écart-type	moyenne	écart-type
$\tau_d$ (s)	0,89	0,08	0,71	0,09	1,67	0,37
$F_0$	0,96	0,01	0,98	0,00	0,97	0,01
$D$ ( $\mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ )	8,52	0,81	10,36	1,27	4,58	1,00

Tableau 18: Comparaison des coefficients de diffusion obtenus pour l'Aa-PME dans différents environnements.

Les valeurs de coefficients de diffusion extraites des analyses confirment les tendances observées sur les courbes de retour de fluorescence (Tableau 18). Les coefficients de diffusion de l'Aa-PME dans une solution tampon et en présence de pectines sont proches et plus élevé

que des le gel en formation : la diffusion de l'enzyme dans une solution de pectines est donc plus rapide que dans un gel en formation.

#### 7.3.2.2. Influence de l'activité sur la diffusion.

L'influence de l'activité de l'Aa-PME sur sa diffusion a été évaluée en réalisant une série d'expériences avec la PME inactivée (Figure 67).

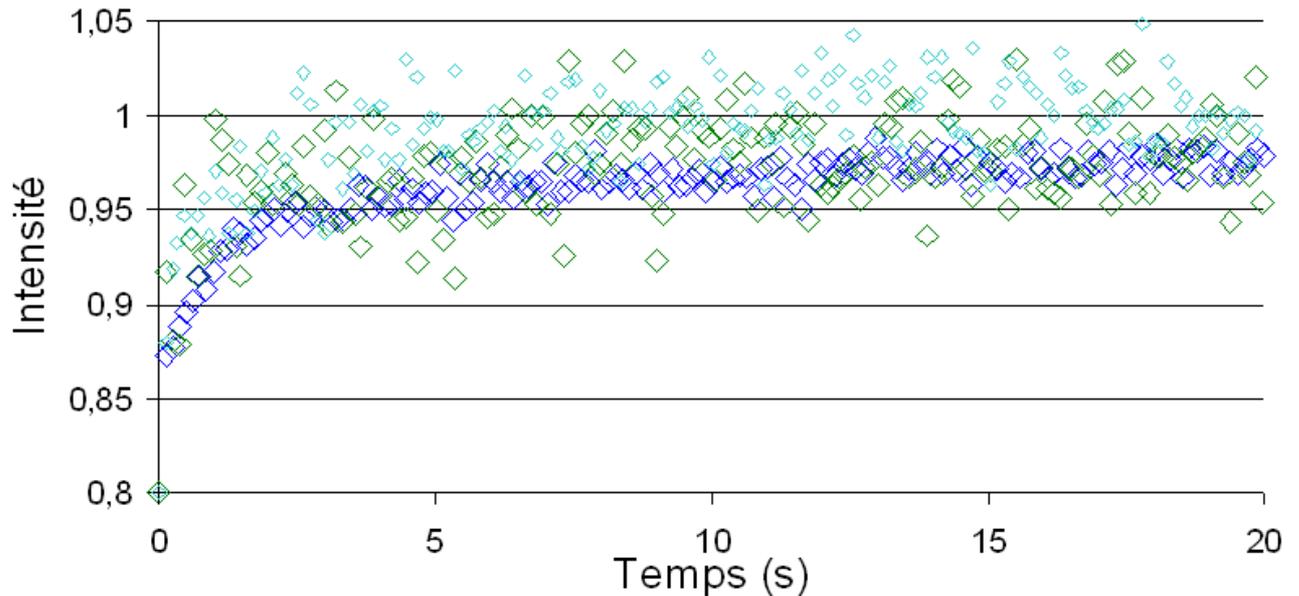


Figure 67 : Comparaison des courbes normalisées de retour de fluorescence obtenues lors de la diffusion de l'Aa-PME inactivée dans le tampon (vert), dans une solution de pectines (bleu clair) et dans un gel en formation (bleu foncé).

Les courbes de retour de fluorescence apparaissent proches compte tenu de la dispersion des points, quel que soit l'environnement considéré.

	Tampon		Solution de pectines		Gel en formation	
	moyenne	écart-type	moyenne	écart-type	moyenne	écart-type
$\tau_d$ (s)	0,69	0,20	0,59	0,00	1,41	0,02
$F_0$	0,96	0,01	0,97	0,02	0,97	0,01
$D$ ( $\mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ )	11,74	3,62	12,62	0,13	5,17	0,07

Tableau 19 : Comparaison des caractéristiques de la diffusion de l'Aa-PME inactivée dans trois environnements.

Les valeurs extraites des courbes de retour de fluorescence montrent cependant une différence de diffusion entre les trois environnements considérés (Tableau 19). L'Aa-PME inactive diffuse à des vitesses similaires dans le tampon et la solution de pectines. Par contre, la diffusion dans un gel en formation est plus lente. Cette évolution des coefficients de diffusion est semblable à celle observée dans le cas de l'Aa-PME active. Toutefois, les coefficients de diffusion mesurés pour la PME inactive tendent à être supérieurs à ceux de la PME active. L'activité ralentirait donc la diffusion de l'Aa-PME.

### 7.3.2.3. Diffusion de l'Aa-PME en gel préformé

La diffusion de l'Aa-PME a été suivie en gel préformé pendant plusieurs heures. D'après un suivi de la diffusion des PME à travers le gel par une expérience de Time Lapse en microscopie confocale, il a été montré précédemment que la PME fongique est répartie dans la totalité du volume de gel préformé après 2h30 (résultats non décrits dans le manuscrit). L'influence de l'activité sur la diffusion de la PME a été évaluée en déterminant le coefficient de diffusion 4h après le dépôt de l'enzyme sur le gel. La comparaison des courbes de retour de fluorescence montre que l'Aa-PME active diffuse plus rapidement que l'enzyme inactive (figure 68), ce qui est contraire aux observations faites en gel en formation.

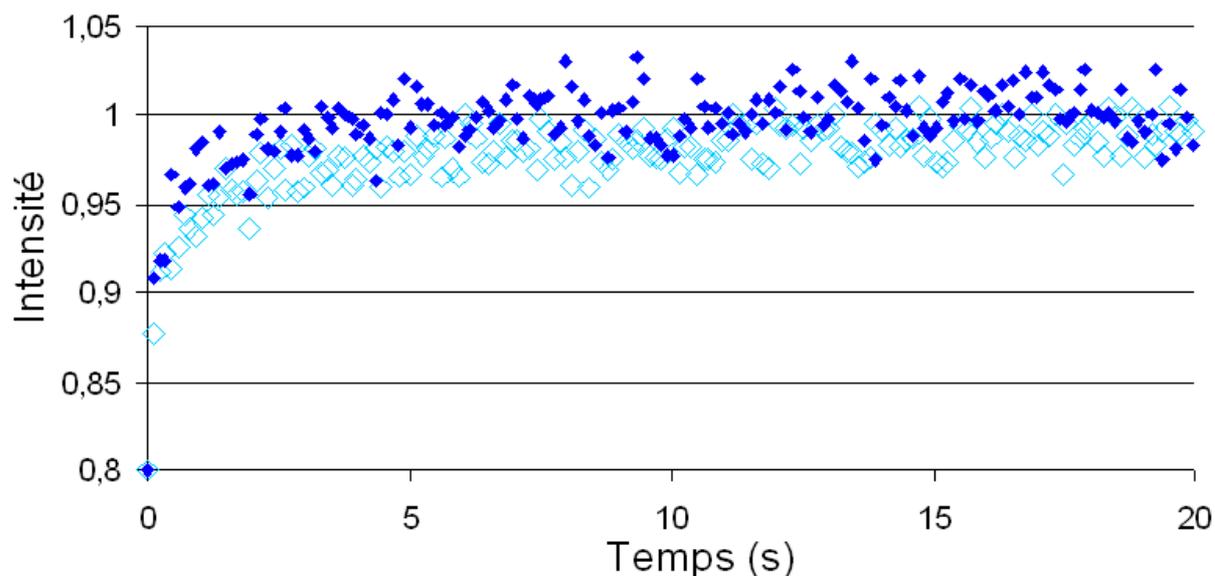


Figure 68 : Comparaison des courbes normalisées de retour de fluorescence obtenues lors d'expérience réalisées après 4h de diffusion de l'Aa-PME active (symboles pleins) et inactive (symboles vides) dans un gel de pectine préformé.

Les coefficients de diffusion mesurés pour les PME actives et inactives confirment les observations graphiques (Tableau 20).

	Aa-PME active		Aa-PME inactive	
	moyenne	écart-type	moyenne	écart-type
$\tau_d$ (s)	0,34	0,01	0,81	0,09
$F_0$	0,99	0,00	0,98	0,00
$D$ ( $\mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ )	21,69	0,63	9,14	1,06

Tableau 20 : Comparaison des caractéristiques de la diffusion de l'Aa-PME active et inactive dans un gel de pectine préformé

Cette différence de diffusion peut être due à la modification de la structure du gel par l'Aa-PME. Ces modifications pourraient faciliter la diffusion de l'enzyme dans le gel via la création de chemins de diffusion préférentiels. En comparaison avec les autres environnements, la PME inactivée présente un coefficient de diffusion plutôt proche de celui obtenu pour la diffusion en solution de pectines. L'Aa-PME active quant à elle diffuse de façon plus rapide en gel préformé que dans les autres environnements considérés. Il serait intéressant de réaliser un suivi de la diffusion de l'Aa-PME active pendant un temps plus long

dans un gel en formation pour déterminer s'il est possible de retrouver des coefficients de diffusion proche de ceux observé dans un gel préformé.

De plus, les coefficients de diffusion observés en FRAP ( $1\mu\text{m}^2.\text{s}^{-1} = 10^{-6}\text{mm}^2.\text{s}^{-1}$ ) sont inférieurs aux coefficients déterminés en FCS ( $10^{-4}\text{mm}^2.\text{s}^{-1}$ ). Cette modification peut être liée à la différence de concentration employé entre les deux techniques. Il est aussi possible que cette diminution soit en partie due à l'interaction avec la lamelle. D'autre part, l'observation de la diffusion en FRAP met en évidence des différences de comportement de diffusion marquées entre l'Aa-PME et l'O-PME ainsi que pour l'Aa-PME dans les différents environnements considérés. La FRAP constitue donc probablement la technique qui sera la plus adaptée pour mettre en évidence les différences de comportements de l'Aa-PME et l'O-PME entre les différents environnements.

## **7.4. Etude macroscopique de la diffusion des PME dans un gel de pectines**

La diffusion globale des PME a été étudiée sur les gels préformés suite à leur dépôt au sommet du gel comme décrit au § 2.2.9.4. Après plusieurs essais infructueux avec différentes méthodes, la présence des PME en différents points du gel a finalement été mise en évidence indirectement en suivant leur effet sur le DM résiduel et le DBabs de la pectine, et directement en déterminant le nombre moyen de molécules à différents endroits du gel en FCS.

### **7.4.1. Caractérisation de l'activité des PME**

Des gels de pectines ont été préparés dans un moule cylindrique. Après démoulage, l'une ou l'autre des PME a été déposée à sa surface et leurs migrations ont été évaluées en tranchant les gels et en caractérisant les pectines dans chacune des tranches. A partir de la masse des tranches de gel, il est possible de remonter à leur épaisseur grâce à la formule

Formule 7.4.1 I : 
$$d = \frac{m}{(r^2 \times \pi \times \mu)}$$

Où

$m$  est la masse de la tranche en kg

$r$  est le rayon du moule en m

$\mu$  est la masse volumique de la pectine 1012 kg.m<sup>-3</sup>

Les épaisseurs obtenues pour chaque tranche sont cumulées pour pouvoir représenter le DM et DBabs des pectines en fonction de l'éloignement au point de dépôt de l'enzyme.

La présence de la PME sera notée par une modification des DM et DBabs observée par rapport aux DM et DBabs initiaux. La distance parcourue correspond donc à la distance à laquelle les valeurs initiales de DM et DBabs sont retrouvées, respectivement 46 % et 16%.

Pour l'Aa-PME, la migration s'effectue sur 6,5 mm après 6h et 10 mm après 24h (Figure 69). D'après ces distances, il est possible de calculer une vitesse de migration : pour 6h, la vitesse calculée est de 1,1 mm.h<sup>-1</sup> et, entre 6 et 24 h de migration, la vitesse calculée est de 0,4 mm.h<sup>-1</sup>. Un ralentissement de migration intervient donc au cours du temps.

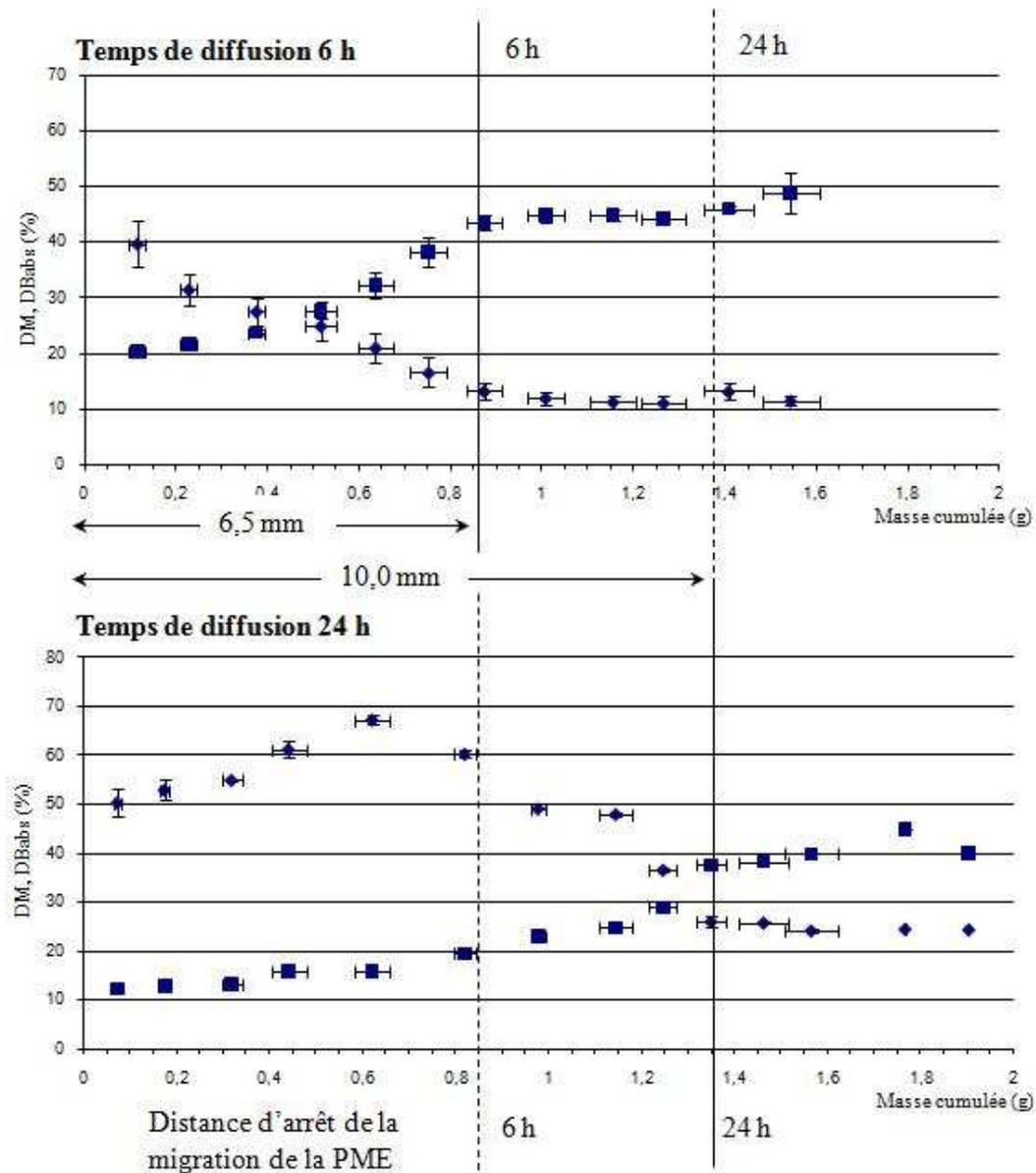


Figure 69 : Evolution du DM (carrés) et du DBabs (losange) de la pectine lors de la diffusion de l'Aa-PME dans un gel de pectines.

Pour l'O-PME, la migration s'effectue différemment (Figure 70). La comparaison des modifications de la pectine après 6 et 24h de migration de l'O-PME présente peu de différences : la distance de migration est sensiblement la même pour 6 et 24h (Figure 70). L'O-PME migre très peu.

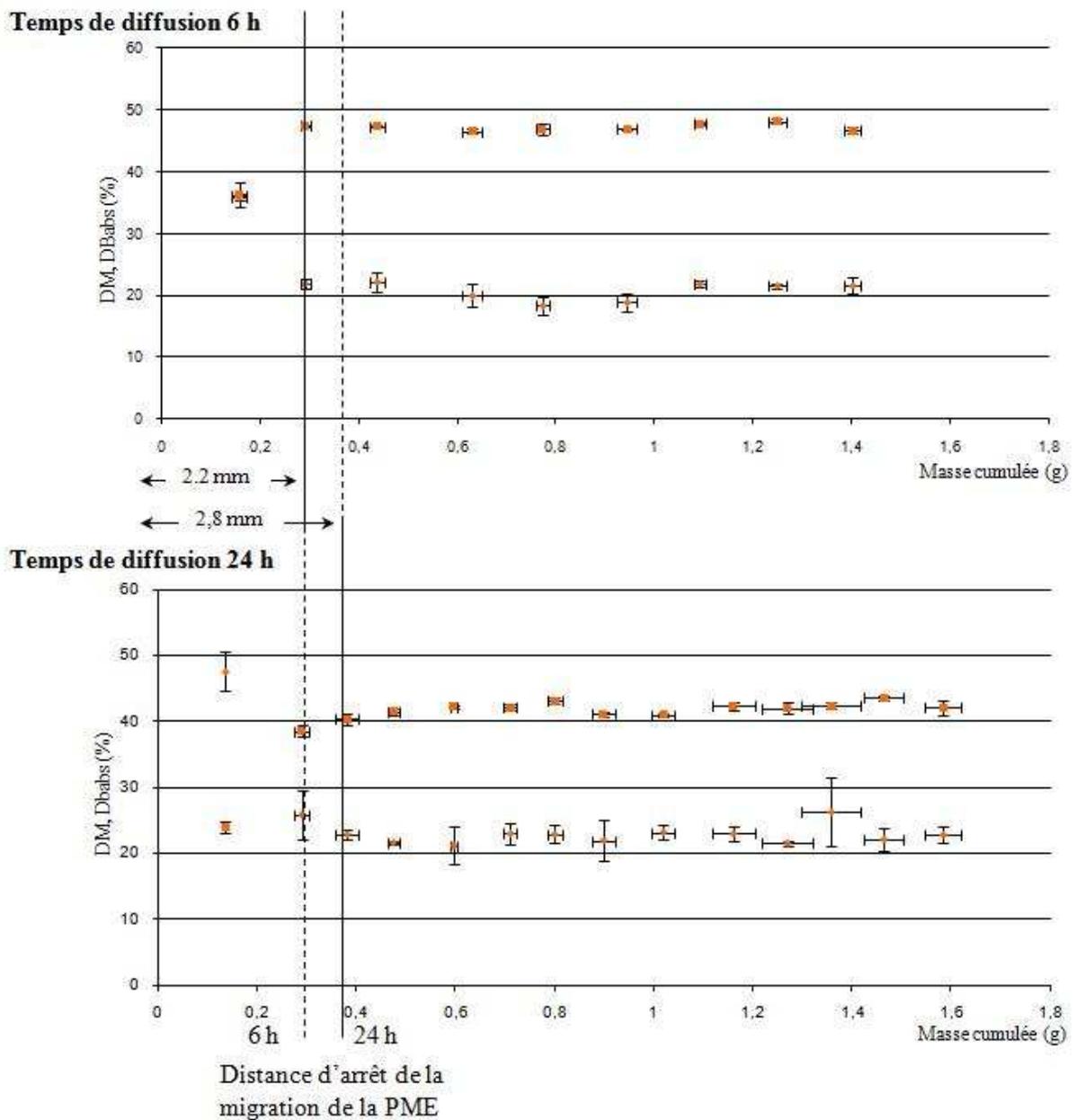


Figure 70 : Evolution du DM (carrés) et du DBabs (losanges) lors de la migration de l'O-PME pendant 6 et 24h.

Les comportements de migration observés pour l'O-PME et l'Aa-PME peuvent être reliés à leurs modes d'action respectifs ainsi qu'à leurs rôles *in planta*. Le rôle de l'O-PME est de modifier les pectines dans la paroi au voisinage de la cellule sécrétrice, ce qui peut expliquer ses faibles capacités de migration. Le rôle de l'Aa-PME est de préparer les parois végétales à leur dégradation pour permettre l'invasion de la plante par le champignon. Par conséquent, son efficacité est améliorée lorsque la proportion de pectines dé-méthylées dans la paroi augmente. L'Aa-PME doit donc présenter des propriétés de migration importantes.

Les deux PME présentant des comportements de migrations différents, il est possible de caractériser la diffusion des enzymes en calculant le coefficient de diffusion mutuel (§ 7.4.2). Pour cela, il faut pouvoir quantifier chaque PME tout au long de sa migration dans le gel.

## 7.4.2. Transport par diffusion des PME dans un gel de pectine

### 7.4.2.1. Le transport par diffusion

Le transport par diffusion peut être défini comme un mode de transport passif qui intervient en l'absence de mouvement d'ensemble (convection) et qui est dû à la présence d'une inhomogénéité dans le milieu (température, concentration...). Au niveau microscopique, le transport par diffusion résulte uniquement des mouvements browniens. Son effet tend à rendre le milieu uniforme vis-à-vis de l'inhomogénéité. C'est un processus de retour à l'équilibre thermodynamique. Le transport par diffusion est différent de l'autodiffusion définie précédemment comme la diffusion dans un système thermodynamiquement homogène. L'important pour caractériser l'efficacité du phénomène de diffusion est la valeur du coefficient de diffusion  $D$ , ici appelé coefficient de diffusion mutuel. Pour mesurer  $D$ , un protocole possible consiste à injecter  $N_0$  particules à  $t = 0$  au sommet d'un cylindre.

Devant un problème de diffusion, pour calculer  $D$ , il est possible de passer par l'établissement et la résolution de la seconde loi de Fick ou équation de diffusion issue de l'association de la première loi de Fick avec une équation de conservation de la matière.

Equation 7.4.2 I :

$$\frac{\partial n_a}{\partial t} = D \left( \frac{\partial^2 n_a}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 n_a}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 n_a}{\partial z^2} \right)$$

Où

$n_a$  le nombre de molécules par unité de volume

$x, y, z$  les directions considérées de la diffusion

$D$  le coefficient de diffusion

$t$  le temps

La seconde loi de Fick relie la façon dont varie la concentration ( $C$ ) en un point  $x_0$  en fonction

du temps,  $\frac{\partial n_a}{\partial t}$ , à la façon dont varie la pente,  $\frac{\partial n_a}{\partial x}$ , (gradient de concentration) à un temps

donné en fonction de la distance,  $\frac{\partial^2 n_a}{\partial x^2}$ . Afin de résoudre cette équation, la situation de diffusion doit être précisée. Deux situations sont considérées (Figure 71).

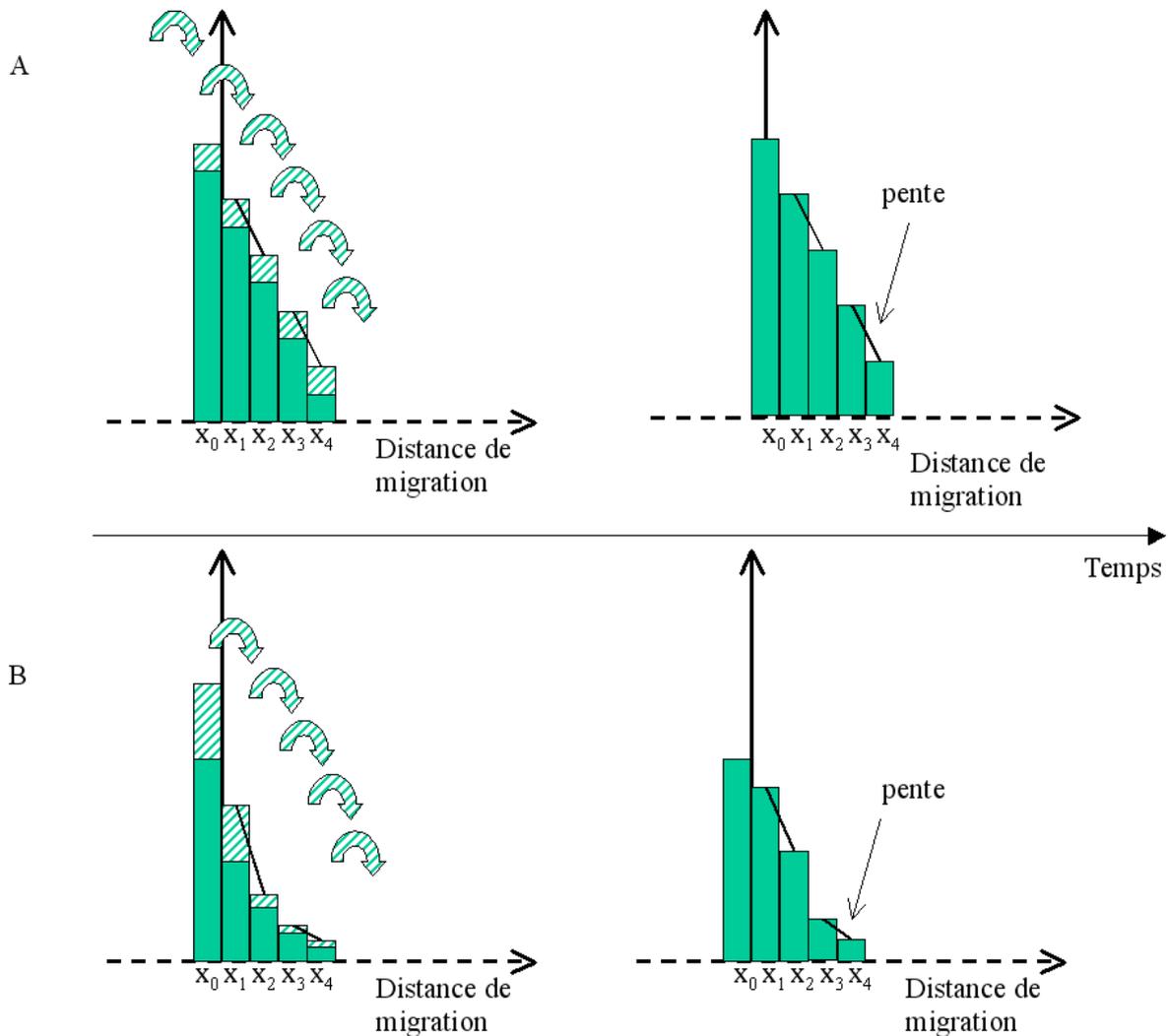


Figure 71 : Schéma représentant deux situations de diffusion en régime stationnaire (A) et en régime transitoire (B).

Dans la situation A, le gradient de concentration  $\left(\frac{\partial n_a}{\partial x}\right)$  ou la pente considérée entre deux positions ( $x$ ) ne varie pas avec  $x$ , ce qui, d'après la deuxième loi de Fick, entraîne que la concentration reste identique en fonction du temps. C'est ce qui se passe en tout point à tout instant en régime permanent : autant de molécules entrent et sortent à chaque point considéré. La quantité de molécules diffusantes ne dépend alors que de la position. Sa variation peut être représentée par une droite. Dans cette situation, la première loi de Fick suffit pour dresser le bilan de la diffusion.

Equation 7.4.2 II :

$$J = -AD \frac{\partial n_a}{\partial x}$$

Où

J est le courant volumique de particules ( $\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$ )

A est l'aire traversée par le flux de molécules ( $\text{m}^2$ )

D est le coefficient de diffusion ( $\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ )

$n_a$  est la concentration ( $\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}$ )

x est la distance de migration (m)

$\frac{\partial n_a}{\partial x}$  est le gradient de concentration le long de l'axe x

Le signe négatif de cette loi indique que le courant de molécules s'effectue des fortes concentrations vers les faibles concentrations. Cette loi traduit le lien entre le courant volumique de particules et le gradient de concentration.

Dans la situation B, le nombre de molécules dépend à la fois de la distance de migration et du temps : la pente entre  $x_1$  et  $x_2$  est plus importante que celle entre  $x_3$  et  $x_4$ . De plus, ces pentes tendent à être de moins en moins négatives au cours du temps. Ce régime est transitoire et est décrit par la seconde loi de Fick.

Dans le cas d'une diffusion monodirectionnelle, l'équation 7.4.2 I se simplifie en équation 7.4.2 III.

Equation 7.4.2 III :

$$\frac{\partial n_a}{\partial t} = D \frac{\partial^2 n_a}{\partial x^2}$$

Cette équation représente la variation de concentration en un point donné en fonction du temps. Cette situation correspond à la situation expérimentale :  $N_0$  particules sont injectées à  $t = 0$  au sommet d'un cylindre. Puis, ces particules diffusent dans le milieu, et lorsque la distance au point de dépôt est suffisamment importante, le nombre de particules est nul. On considère que le nombre de particules tend vers 0 avec le temps. Ces paramètres expérimentaux peuvent se traduire par les conditions initiales aux limites suivantes :

Equation 7.4.2 IV :  $N_a(x,0) = 0$

$$N_0 = \int_0^{\infty} N_a(x,t) dx$$

$$N_a(\infty, t) = 0$$

Dans le cas où l'on considère que le transport s'effectue dans une seule direction et que le coefficient de diffusion reste constant, il est possible de résoudre analytiquement l'équation de la diffusion.

Equation 7.4.2 V :

$$N_a(x, t) = \frac{N_0}{\sqrt{\pi Dt}} e^{-x^2/4Dt}$$

Où

- $N_a$  nombre de molécules
- $N_0$  nombre de molécules initialement déposées
- $x$  distance au point de dépôt de l'enzyme en mm
- $D$  coefficient de diffusion en  $\text{mm}^2 \cdot \text{temps}^{-1}$
- $t$  temps.

#### 7.4.2.2. La diffusion moléculaire en gel

Le transport de soluté à l'intérieur de l'hydrogel intervient dans les régions emplies de solvant dans les espaces limités par les chaînes de polymères (mailles). Les différents facteurs réduisant la taille de ces espaces ont une influence sur les mouvements du soluté : rapport taille du soluté - taille des mailles, mobilité des chaînes de polymère, interactions polymère-soluté. De nombreux modèles théoriques ont été développés pour expliquer la diffusion d'un soluté dans un hydrogel à partir des théories de la diffusion dans les solutions de polymères (Amsden, 1998; Masaro & Zhu, 1999a). D'un point de vue expérimental, l'approche de la diffusion par la seconde loi de Fick a été utilisée pour modéliser et extraire le coefficient de diffusion lors de la diffusion de petites molécules comme le glucose dans un gel de carraghénanes (Johansson & Löfroth, 1991) ou de protéines dans un gel d'amidon (Leloup *et al.*, 1990).

#### 7.4.2.3. Application à la diffusion des PME dans un gel de pectines

La diffusion des PME dans un gel de pectines peut être approchée par la seconde loi de Fick. Le système expérimental correspond à la diffusion d'une quantité de PME fixe en fonction du temps selon une direction donnée (Figure 71). Pour pouvoir employer la solution de l'équation de diffusion, les conditions suivantes doivent être respectées :

- A  $t = 0$ , quelle que soit la distance de migration considérée, le nombre de molécules est nul.

- Le nombre de molécules déposées sur le gel correspond à la totalité des molécules contenues dans le volume sur la distance de migration considérée.

- Pour une distance de migration infinie, le nombre de molécules est nul. D'après les expériences préalables, le temps de migration choisi ne permet pas à la PME de diffuser jusqu'aux limites de la zone de gel considérée.

Grâce au suivi de la présence de la PME *via* son action sur les pectines, il a été montré que seule l'Aa-PME présentait une migration significative au cours du temps. La caractérisation de la diffusion moléculaire a donc été réalisée uniquement pour la migration de l'Aa-PME (Figure 72).

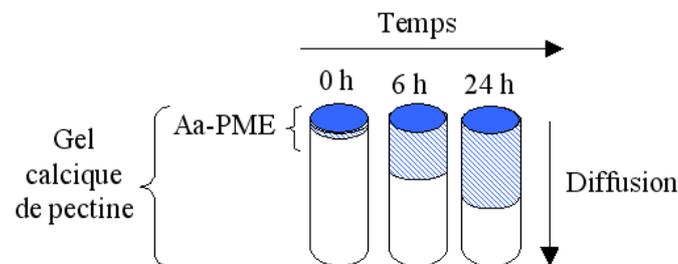


Figure 72 : Schéma de la diffusion de l'Aa-PME dans un gel de pectines.

Plusieurs techniques ont été testées pour déterminer l'évolution de la concentration en PME lors de sa migration dans le gel (*cf.* Méthodes). La technique retenue est la FCS.

Les expériences de migration ont donc été effectuées avec la PME marquée au FITC.

L'Aa-PME est déposée sur un gel de pectines où elle diffuse pendant 6h. Le gel est ensuite tranché. Sur chacune des tranches, le nombre de molécules diffusantes est déterminé en FCS. La comparaison de la diffusion de la PME active avec la PME inactive a été réalisée en utilisant une PME inactivée à 70°C pendant 10 minutes. Dans un premier temps, toutes les données obtenues ont permis de tracer l'évolution de la concentration en enzyme en fonction de la distance de migration (Figure 73).

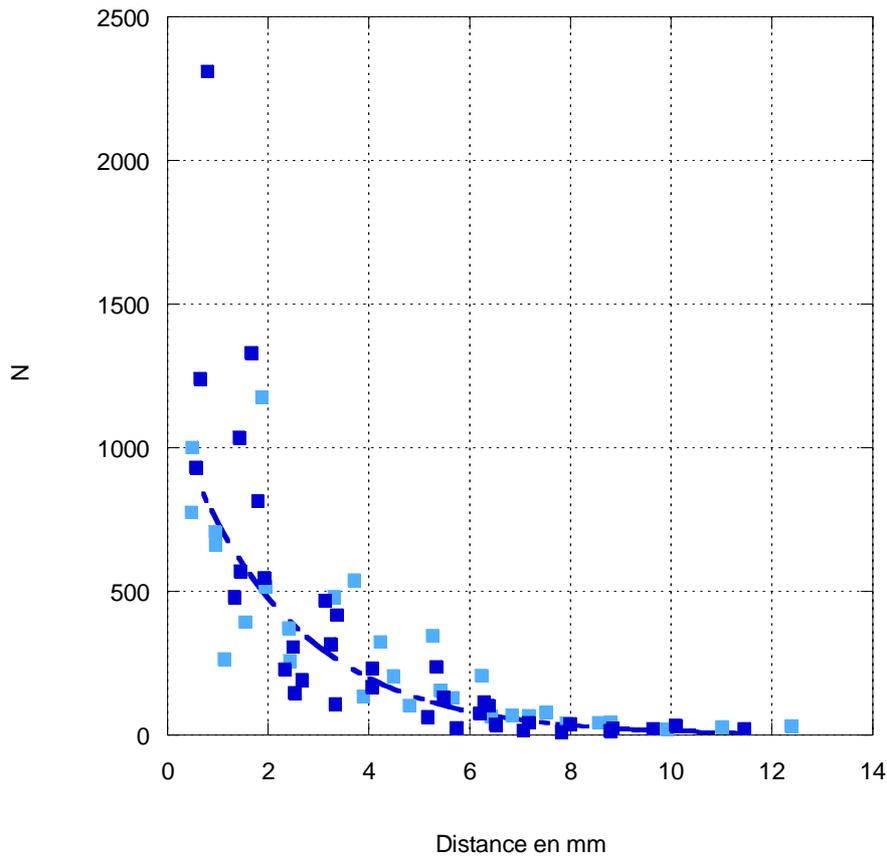


Figure 73 : Evolution de la concentration en fonction du temps lors de la migration de l'Aa-PME active (bleu foncé) et inactivée (bleu clair).

Qualitativement, le comportement observé pour les deux enzymes active et inactive est typique d'un phénomène de diffusion en cours (Figure 72). Les deux séries de données ne sont pas graphiquement distinctes.

Le signal considéré pour la modélisation de la diffusion doit être supérieur au signal donné par le gel seul. Il définit une valeur seuil pour effectuer la modélisation. L'Aa-PME active atteint cette valeur pour une distance de migration de 6,3 mm tandis que l'Aa-PME inactivée l'atteint à 8,5 mm. La distance déterminée ici doit être interprétée avec précaution car elle est déterminée à la limite de détection de la méthode. Néanmoins, la distance observée pour l'Aa-PME active est proche de celle observée dans l'expérience précédente. La distance de migration de l'Aa-PME inactivée tend à être plus importante. L'écart-type pour les distances de migration est évalué à 0,1 mm.

Pour extraire le coefficient de diffusion de ces données, il faut rendre accessible le coefficient de diffusion issu de la solution de l'équation de diffusion donnée par l'équation 7.4.2.V en prenant le logarithme de la concentration :

$$\text{Equation 7.4.2 VI : } \ln N_a = \ln N_0 - \frac{1}{2} \ln \pi Dt - \frac{x^2}{4Dt}$$

En traçant l'évolution du nombre de molécules en logarithme en fonction du carré de la distance de migration, une droite affine est obtenue, de coefficient directeur  $\alpha$  (Figure 74 et 75). Par identification, il est possible d'écrire :

$$\text{Equation 7.4.2 VII : } \alpha = \frac{1}{4Dt}$$

Le mélange des deux séries de données conduit à deux nuages de points non distincts l'un de l'autre. Afin d'exploiter au mieux les différentes répétitions réalisées, chacune des répétitions a été mise sous la forme  $\ln(N)$  en fonction du carré de la distance au point de dépôt de l'enzyme inactive (Figure 74) et active (Figure 75).

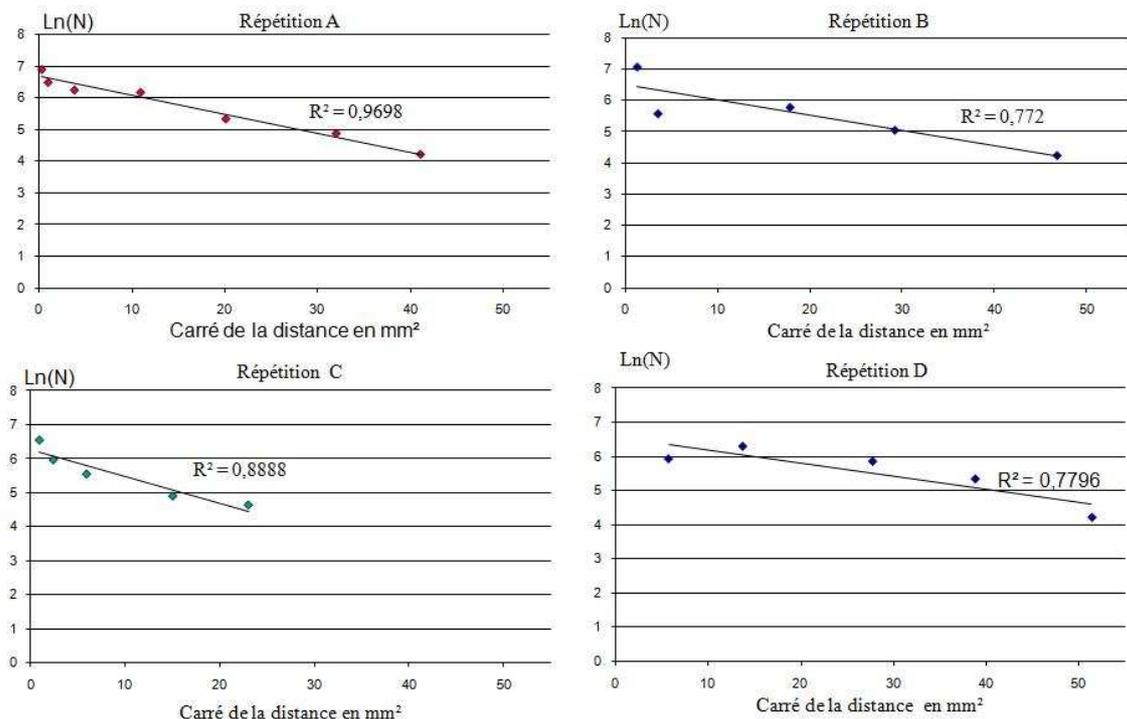


Figure 74 : Variation du nombre de molécules en fonction de la distance au point de dépôt pour l'Aa-PME inactivée.

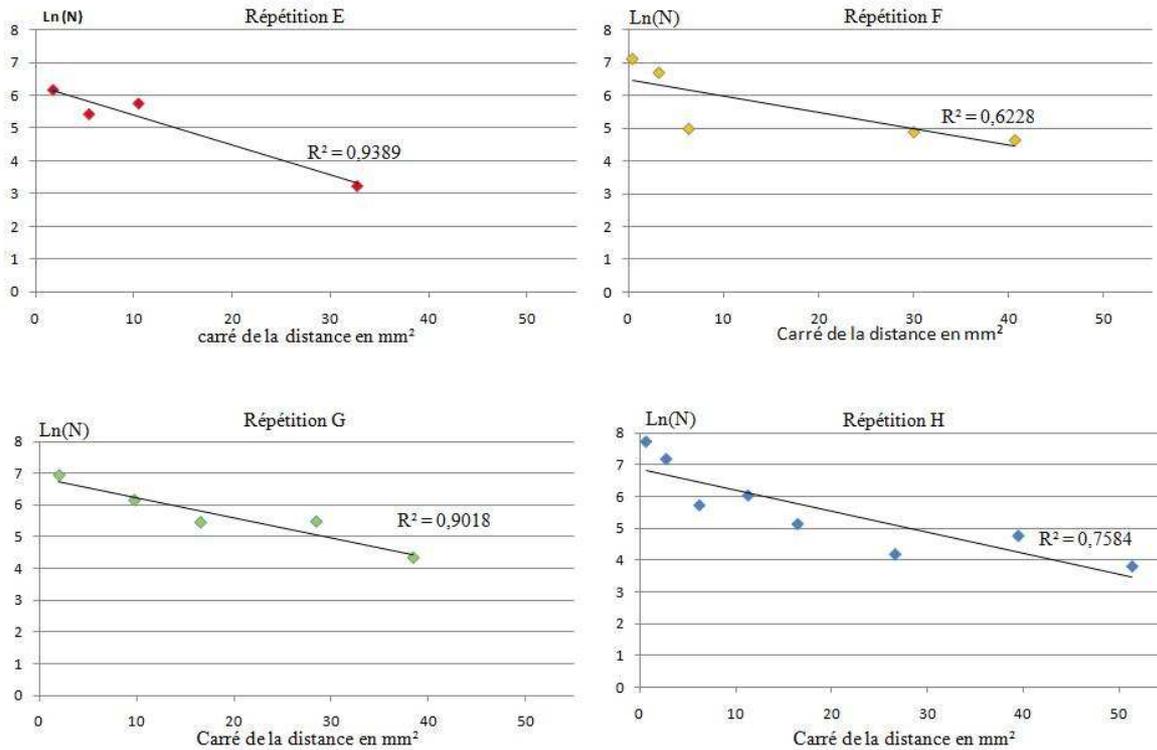


Figure 75 : Variation du nombre de molécules en fonction de la distance au point de dépôt pour l'Aa-PME active.

Les données de chaque série semblent compatibles avec une loi linéaire. Néanmoins, l'observation des coefficients de corrélation linéaire ( $R^2$ ) met en évidence des écarts par rapport à la droite de régression qui peuvent être parfois notables. Mais il est important de noter que les coefficients de régression des séries individuelles sont meilleurs que ceux obtenus pour l'ensemble des données. Cette démarche permet aussi d'éviter les biais pouvant être engendrés par la première tranche. En effet, si l'on mixe les données, deux séries avec une pente proche, mais des points de départ différents conduiront à une augmentation de la dispersion des valeurs.

Le calcul du coefficient de diffusion a été réalisé à partir des coefficients directeurs des différentes répétitions ainsi que de l'équation 7.4.2.III, les résultats sont donnés dans le tableau 20.

Aa-PME inactive		Aa-PME active	
Répétitions	D en mm <sup>2</sup> .s <sup>-1</sup>	Répétitions	D en mm <sup>2</sup> .s <sup>-1</sup>
<b>A</b>	(1,96 +/-0,15). 10 <sup>-4</sup>	<b>E</b>	(1,68 +/- 0,35). 10 <sup>-4</sup>
<b>B</b>	(2,40 +/- 0,75). 10 <sup>-4</sup>	<b>F</b>	(2,30 +/- 0,10). 10 <sup>-4</sup>
<b>C</b>	(1,45 +/- 0,29). 10 <sup>-4</sup>	<b>G</b>	(1,83 +/-0,35). 10 <sup>-4</sup>
<b>D</b>	(2,98 +/- 0,65). 10 <sup>-4</sup>	<b>H</b>	(1,51 +/- 4,46). 10 <sup>-4</sup>

Tableau 21 : Comparaison des coefficients de diffusion obtenus pour les différentes expériences de diffusion de l'Aa-PME-FITC inactive et active dans un gel de pectines.

Les valeurs de coefficients obtenues sont situées entre 1,45 et 2,98. 10<sup>-4</sup> mm<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup> (Tableau 20). Les deux répétitions avec le meilleur coefficient de corrélation (A et C pour l'Aa-PME inactive et E et G pour l'Aa-PME active), permettent de calculer un coefficient de diffusion moyen de 1,75.10<sup>-4</sup> mm<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup> pour l'Aa-PME inactive et de 1,70.10<sup>-4</sup> mm<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup> pour l'Aa-PME inactive.

Ces résultats ne permettent pas de conclure à une différence significative entre la diffusion de la PME active et celle de la PME inactive dans un gel préformé. Néanmoins, les coefficients de diffusion rencontrés sont du même ordre de grandeur que ceux déterminés en FCS. Il est aussi possible de noter que les coefficients de diffusion obtenus pour les différentes méthodes considérées sont de l'ordre de grandeur de la diffusion dans un liquide (10<sup>-4</sup> mm<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup> = 10<sup>-10</sup> m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>)

#### 7.4.2.4. Approximations de la modélisation de la diffusion moléculaire

Dans cette étude, la seconde loi de Fick a été utilisée pour extraire les coefficients de diffusion de l'Aa-PME active et inactive. Les conditions d'applications de cette loi sont respectées par l'état initial du système.

Plusieurs conditions doivent être remplies pour permettre l'application de la loi de Fick :

- Cette loi est applicable pour un milieu homogène et isotrope.

Les gels sont, par définition, des milieux hétérogènes à cause de la présence de parties solides définissant les mailles. Mais ils peuvent être considérés comme homogènes si, à l'échelle microscopique, les caractéristiques géométriques de ces pores sont les mêmes. Toutefois, l'action de la PME génère de nouvelles zones de jonction et modifie ainsi la taille des pores. Les résultats précédents ont montré que

l'action de l'enzyme et la modification de son environnement par son action n'ont pas mis en évidence de réelle évolution entre le milieu non structuré et structuré. L'influence de la modification des mailles par la PME pourrait être évaluée de façon plus précise en déterminant leur taille avant et après l'action de l'enzyme.

- Cette loi s'applique en l'absence d'interactions électrostatiques entre la molécule diffusante et son environnement. Cette condition est remplie à l'état initial du système. En effet, le gel de pectines et la solution d'enzymes sont réalisées toutes deux dans un tampon MES dont la concentration molaire est supérieure à la concentration de l'enzyme. La force ionique ne dépend pas de la présence de l'enzyme dans un premier temps. Mais l'action de la PME génère des protons qui modifient la force ionique. Après 6h, le pH d'un gel de pectines a été mesuré, la partie du gel contenant la PME présente un pH de l'ordre de 5,5 et le reste du gel est situé autour de 5,8. Cette condition n'est donc plus remplie. L'établissement de ce gradient n'a pas été pris en compte dans cette étude.



## **Discussion générale**



## **8. Discussion générale**

Lors de ce travail, nous avons tenté de donner des éléments d'explications aux comportements différents de l'Aa-PME et de l'O-PME dans un système en cours de gélification. La modification de la structure de l'environnement direct de l'enzyme, contraignant le comportement de celle-ci, a été choisie comme hypothèse de départ.

Afin de comprendre l'impact de la structuration du milieu sur le comportement de l'enzyme, trois systèmes de différentes structures ont été comparés :

Solution de pectines

Gel en cours de formation

Gel préformé

D'une part, le mode d'action des PME a été caractérisé dans une solution de pectines et dans un gel en cours de formation. D'autre part, pour évaluer l'impact de la structure, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la diffusion des PME dans les trois environnements cités précédemment.

### **8.1. Influence de l'environnement sur le comportement de l'O-PME**

Les PME végétales sont connues pour être des enzymes processives, qui introduisent des blocs de GalA libres dans les régions homogalacturonanes (Catoire *et al.*, 1998; Daas *et al.*, 1999; Willats *et al.*, 2001; Ralet & Thibault, 2002). La majorité des plantes exprimant plusieurs PME, le degré de processivité dépend de l'isoforme considérée (Catoire *et al.*, 1998; Goldberg *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2005). D'autre part, le mode d'action des PME végétales suit généralement un mécanisme simple chaîne, elles se fixent sur la chaîne et dé-estérifient jusqu'à rencontrer la fin de la chaîne ou une structure conduisant à la dissociation du complexe enzyme-substrat. Le mode d'action et les constantes catalytiques des PME sont sensibles à plusieurs paramètres :

- Les variations de pH (basique à acide) peuvent modifier le mode d'action selon l'origine et l'isoforme de la PME considérée. Par contre, chez la pomme, cette diminution de pH conduirait également d'un mécanisme simple chaîne à un mécanisme multiples chaînes (Denès *et al.*, 2000). Dans le cas de la PME d'orange considérée dans cette étude, le passage d'un pH basique (7,5) vers un pH plus acide (4,5) conduit à une diminution du degré de processivité de l'O-PME et par conséquent à une diminution de la taille des blocs (Cameron *et al.*, 2008).

- Une diminution de la taille des blocs de GalA libérés a été constatée dans cette étude lorsque l'action de l'O-PME a lieu en présence de calcium, ce qui est en accord avec les travaux précédents (Slavov *et al.*, 2009; Vincent *et al.*, 2009). D'autre part, il a aussi été montré que l'affinité de la PME pour la pectine chute en présence d'une certaine proportion de calcium en accord avec la littérature (Nari *et al.*, 1991), tandis que la vitesse maximale de réaction augmente. Ces effets sont respectivement dus à la compétition entre le calcium et la PME pour les sites présentant des GalA libres sur la pectine et par la diminution de l'inhibition de la PME par les GalA libres.
- Le degré de méthylation initial de la pectine influe aussi sur le mode d'action. Dans le cas de l'O-PME il a été montré que plus le DM initial était bas plus la taille des blocs générée était faible (Tanhatan-Nasser *et al.*, 2011). Selon les conditions expérimentales et l'isoforme considéré, l'affinité des PME végétales pour la pectine est augmentée ou diminuée lorsque le DM est modifié (Macdonald & Evans, 1996; Christensen *et al.*, 1998).

L'importance relative de ces trois paramètres sur le mode d'action n'a pas encore été évaluée. Mais leurs effets devraient se recouper. Par exemple, une isoforme de PME du haricot mungo est inhibée par l'acide polygalacturonique à pH 5,6 mais pas à pH 7,6 (Goldberg *et al.*, 2001). Par conséquent, l'ajout de calcium à l'un ou l'autre des pH devrait conduire à des effets différents. La compréhension de l'influence respective du pH, de la concentration en calcium et du DM initial ouvrent des possibilités de modifications très fines du mode d'action des PME. Selon l'influence relative de ces paramètres, il serait possible, par exemple, de moduler l'action des PME végétales à pH basique par le calcium ou le DM initial et inversement, en présence d'une proportion donnée de calcium de moduler le mode d'action par ajustement du pH.

Dans le cas des PME *in vivo*, l'influence du pH, du degré de méthylation, et du calcium est aussi associée à d'autres facteurs. On retiendra notamment la présence d'autres solutés comme les polyamines (Charnay *et al.*, 1992), la cohabitation entre les différentes isoformes de PME, l'encombrement du milieu généré par les autres polymères pariétaux....

La régulation de l'action des PME dans la paroi est très complexe, comme en témoigne la diversité des DM le long de la paroi végétale selon les différents états physiologiques de la cellule (Guillemin *et al.*, 2005). Un modèle basé sur le contrôle du potentiel électrostatique de la paroi a été proposé à partir d'observations menées sur la PME de soja pour expliquer le rôle des PME dans la croissance de la cellule végétale (Moustacas *et al.*, 1986; Ricard & Noat,

1986). La paroi végétale est un milieu plutôt acide. L'incorporation de nouveaux polymères neutres dans la paroi lors de la croissance cellulaire, dilue la proportion de charges négatives présentes dans la paroi : le pH de la paroi remonte. Ce phénomène induit l'activation de la PME dont le pH optimal est basique et inhibe l'activité des polygalacturonases et glycosyle transférases qui interviennent à un pH acide. Les polygalacturonases hydrolysent les pectines conduisant à un ramollissement de la structure et les glycosyle transférases permettent la néosynthèse de la paroi en ajoutant de nouvelles unités sur des chaînes existantes. L'action de la PME libère donc des protons, diminue le pH, et ainsi réactive les autres enzymes. La proportion de charges négatives générées par la PME conduit aussi à une attraction vers la pectine des ions calcium (Moustacas *et al.*, 1991) et des polyamines (Charnay *et al.*, 1992). Un autre modèle a été proposé pour expliquer le rôle et la régulation des PME lors de leur implication dans la défense des plantes (Pelloux *et al.*, 2007). Ces modèles sont très complexes, et impliquent de nombreux paramètres.

Du point de vue fonctionnel, la modulation de la structure fine des pectines confère aux pectines résultantes une gamme étendue de propriétés de gélification. Par exemple, il a été montré que les gels formés à partir de pectine dé-méthylée par l'O-PME en présence ou en absence de calcium, conduisent à des gels plus ou moins flexibles (Vincent & Williams, 2009). D'autre part, l'action des PME en présence de calcium conduit à la formation d'un système gélifié. En effet, la texturation du système, concomitante à l'action de l'enzyme, modifie l'action de l'O-PME au fur et à mesure de la gélification (Slavov *et al.*, 2009). Il a été montré que la présence d'obstacles peut réduire l'efficacité de la diffusion et altérer la cinétique enzymatique (Park & Agmon, 2008). La modification de l'environnement physique de la PME pourrait conduire à modifier sa diffusion, et par conséquent modifier son accès au substrat et son mode d'action.

Dans ce travail, l'étude de la diffusion de l'O-PME a été étudiée dans différents environnements et à différentes échelles. L'usage de plusieurs échelles d'observation est important lors de l'étude en milieu hétérogène pour permettre d'apprécier l'impact des hétérogénéités sur la diffusion. Selon l'échelle de longueur considérée, les mesures de diffusion peuvent donner différents résultats, puisque le déplacement considéré pour la particule est plus ou moins long.

La diffusion de macromolécules dans les solutions et les gels de polymères est complexe, et dépend fortement de la concentration et du degré d'hydratation des polymères (Masaro & Zhu, 1999a). Dans plusieurs cas, il a été montré que la diffusion de macromolécules dans une solution concentrée ou dans un gel de polymères est ralentie par rapport à sa diffusion en

solvant. En FRAP, la diffusion de la  $\alpha$ -chymotrypsine dans une solution de dextrans présente une diffusion anormale, *i.e.* une diminution du coefficient de diffusion en fonction de la concentration en dextrane (Pastor *et al.*, 2010). D'autre part, le même ralentissement de la diffusion a été noté lors de l'étude du transport de diffusion de la sérum albumine bovine dans un gel d'amidon en fonction de la concentration en amidon (Leloup *et al.*, 1987). Ces travaux portent sur des macromolécules qui n'interagissent pas avec le milieu dans lequel elles diffusent. Dans le cas d'enzymes diffusant dans un milieu substrat, une interaction intervient, comme pour la dégradation d'un gel de protéines par la thermolysine, où une diffusion plus lente est observée en gel en FCS par rapport à la diffusion libre en solution tampon (Fadda *et al.*, 2003). Dans ce travail, les mesures réalisées en FCS sur l'O-PME dans les différents systèmes pectiques ont mis en évidence des tendances, montrant de même un ralentissement de la diffusion lorsque l'enzyme est en présence de son substrat. Il est à souligner que ce ralentissement est lié à l'activité de l'enzyme, car ce phénomène n'a pas été observé lors des mesures réalisées avec la PME inactive. Ces observations sont d'autant plus marquées à l'échelle d'observation de la FRAP, même si quelques expériences supplémentaires seraient nécessaires pour confirmer ces observations. Le rapprochement des données de diffusion avec les données issues des mesures biochimiques d'activité des PME permet de comprendre la cause de ce phénomène. Les mesures biochimiques ont permis de déterminer des temps de conversion du substrat de l'ordre de la dizaine de millisecondes à la centaine de millisecondes. Ces temps de conversion permettent de donner une idée du temps pendant lequel la PME est fixée à la chaîne de pectine. En FCS, les temps mesurés sont de l'ordre de la centaine de microsecondes. Les temps mesurés en FCS ne permettent donc pas d'apprécier en totalité le phénomène de liaison de la PME à la pectine. Le temps de diffusion mesuré ainsi que le coefficient qui en découle correspondent donc plutôt aux molécules diffusant dans les espaces libres. En FRAP, l'échelle de temps plus importante permet d'observer une formation et une dissociation du complexe PME-pectine sur un nombre important de molécules. Cette mesure prend en compte ces complexations et permet d'observer des comportements de diffusion plus contrastés qu'en FCS.

Ces observations sont également à relier au mode d'action de l'O-PME et à ses caractéristiques catalytiques. En effet, en FCS, lors de la diffusion de l'O-PME dans une solution de pectine, une tendance à un temps de diffusion plus long couplé à une population plus importante diffusant avec un temps long a été observée. Inversement, ce phénomène n'est pas observé pour la diffusion dans un gel en cours de formation. Ceci peut être relié à la différence d'affinité et de mode d'action de l'enzyme entre ces deux environnements.

## **8.2. Influence de l'environnement sur le comportement de l'Aa-PME**

Le mécanisme d'action des PME fongiques est généralement décrit comme étant de type chaînes multiples (Limberg *et al.*, 2000; Willats *et al.*, 2001; Ralet & Thibault, 2002). Le mode d'action de l'Aa-PME contrairement à celui de l'O-PME n'est pas sensible au pH (Duvetter *et al.*, 2006). Le mode d'action de l'Aa-PME sur une pectine HM présente un mode d'action plus processif en présence qu'en absence de calcium (Slavov *et al.*, 2009). Toutefois, nous n'avons pas noté cet effet dans ce travail où des modes d'action semblables ont été observés en solution et dans un gel en cours de formation. L'une des explications avancée est que le DM initial de la pectine, inférieur à 50%, est relativement faible et ne conduit pas à une modification de la répartition des méthyles. Néanmoins, en accord avec la littérature, il a été montré dans cette étude que la présence de calcium augmentait l'activité spécifique de l'Aa-PME, son affinité pour la pectine, tout en diminuant sa vitesse maximale de catalyse (Christgau *et al.*, 1996; Slavov *et al.*, 2009). L'Aa-PME n'est pas sensible à la présence d'acide galacturonique libre probablement car elle est fortement chargée négativement (Christgau *et al.*, 1996; Slavov *et al.*, 2009). De plus, le calcium ne rentre pas en compétition avec cette PME pour la pectine, son action s'étendant aussi aux acides polygalacturoniques entièrement méthylés (Massiot *et al.*, 1997). On peut donc en déduire que l'effet du calcium sur l'Aa-PME est lié à l'écrantage des charges entre la protéine et la pectine, conduisant à l'augmentation de son affinité pour son substrat et une meilleure efficacité. Les mesures de diffusion sur l'Aa-PME en FRAP ont montré une tendance à une diminution du coefficient de diffusion dans un gel en cours de formation, ce qui peut être relié aux résultats de biochimie concernant l'augmentation de l'affinité de l'Aa-PME pour la pectine dans ces conditions.

## **8.3. Rôle des enzymes in vivo**

*In vivo*, l'Aa-PME est synthétisée par un champignon phytopathogène. Celui-ci produit des enzymes de dégradation des polymères pariétaux pour assurer la colonisation de son hôte. Le rôle de l'Aa-PME est donc de faciliter l'action des enzymes dégradant les pectines quel que soit l'état de la paroi. Ces PME seraient peu influencées par le pH. D'autre part, les résultats présentés ici suggèrent que l'action de l'Aa-PME est favorisée par le calcium présent dans la paroi. Au contraire, l'O-PME agit sur la paroi végétale dans le but de moduler sa structure finement en fonction de l'état physiologique de la cellule et en réponse aux contraintes environnementales (Micheli, 2001; Jolie *et al.*, 2010). Pour cela, de nombreux

paramètres permettent d'influencer son mode d'action comme le pH (Cameron *et al.*, 2008; Luzio & Cameron, 2008) ou la présence de concentrations de calcium plus ou moins importantes dans le milieu, montré dans cette étude et en accord avec la littérature, (Slavov *et al.*, 2009; Vincent *et al.*, 2009) pour obtenir un mode d'action adapté à la situation physiologique.

Par ailleurs, d'un point de vue efficacité l'Aa-PME doit diffuser le plus rapidement possible dans la paroi, pour préparer la dégradation par les autres enzymes. A l'inverse, les PME végétales peuvent être libérées tout au long de la paroi de la cellule et leur champ d'action reste vraisemblablement limité à la paroi de la cellule libératrice. Cela se traduirait par une diffusion limitée de l'O-PME.

Cette étude a montré que les PME fongiques et végétales ont un comportement de diffusion totalement différent, ce qui peut être relié à leur rôle respectif *in vivo*. Cette différence apparaît particulièrement suite aux mesures de diffusion en FRAP ainsi qu'à partir de la comparaison des distances de migration obtenues lors de l'étude du transport par diffusion.

Lors de la comparaison des distances de migration, l'O-PME présente une migration très faible par rapport à celle de l'Aa-PME. Par conséquent, l'influence du mode d'action sur la diffusion peut être observée et c'est ce que montrent les résultats de FRAP de cette étude pour les deux PME. Par ailleurs, les études en FRAP ont aussi mis en évidence un effet de l'activité de l'enzyme sur sa diffusion. En effet, pour les deux PME, les coefficients de diffusion des enzymes inactives sont peu différents entre les différents environnements considérés.

Ainsi, les PME ont un comportement particulier selon leur origine. C'est aussi le cas d'autres enzymes comme les  $\alpha$ -amylases. Ces enzymes spécialisées dans la dégradation de l'amidon, peuvent présenter comme les PME différents mécanismes : un mécanisme d'attaques multiples ou un mécanisme simple chaîne. Leur mécanisme d'action est modulé à la fois par l'origine du substrat, sa structure et sa longueur, le pH, la température, la présence d'inhibiteurs et l'origine de l'enzyme (Robertson *et al.*, 2005). Néanmoins à la différence des PME, les  $\alpha$ -amylases possèdent une taille supérieure à la taille des pores de l'amidon et doivent « creuser » pour diffuser dans le gel (Robertson *et al.*, 2005). Il a été montré que la digestion enzymatique de l'amidon était contrôlée par la diffusion des amylases et le coefficient de diffusion entre les grains broyés de Sorgho a été estimé en fonction de la taille des grains à  $0,4-0,9 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ , soit  $4-9 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ , ce qui est l'ordre de grandeur des coefficients de diffusion déterminés en FRAP pour l'Aa-PME en gel et en solution de pectine. L'approche de la diffusion à plusieurs échelles a aussi permis de mettre en évidence une autre différence entre l'O-PME et l'Aa-PME. Les coefficients de diffusion déterminés en FCS pour

les deux enzymes sont semblables (ordre de grandeur  $10^{-4} \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ), alors du passage à une échelle de diffusion plus importante par l'étude du transport par diffusion, l'Aa-PME présente un coefficient de diffusion mutuel de même ordre de grandeur que celui observé en FCS. La correspondance entre la mesure des coefficients d'auto-diffusion et mutuel a été montrée par différentes études et apparaît lorsque la taille du diffusant est très petite par rapport à la taille des pores du réseau dans lequel il diffuse (Labille *et al.*, 2006; Gagnon & Lafleur, 2009).

Or, pour un même coefficient de diffusion en FCS, il a été montré que l'O-PME migre beaucoup moins, par conséquent, le coefficient de diffusion mutuel pourrait être inférieur à celui obtenu en FCS. Ce coefficient n'a pas été mesuré dans cette étude car le modèle expérimental n'était pas adapté à la faible migration de l'O-PME.

Pour expliquer ce phénomène, il est possible d'avancer que l'interaction avec la pectine est très forte et ralentit l'enzyme. En effet, en gel de pectine, le calcium est en partie piégé par les pectines, les constantes catalytiques sont donc probablement entre celles calculées pour l'action de l'O-PME sans calcium et celles calculées en présence de  $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  de calcium. Le temps de catalyse d'une réaction est alors plus élevé que celui de l'Aa-PME et conduit à une immobilisation plus longue de l'O-PME et par conséquent à une diffusion plus faible.

Globalement, l'étude de la diffusion des PME dans différents systèmes pectiques, tend à montrer que c'est l'activité de l'enzyme qui module sa diffusion, plus que la structure environnante, à l'exception de la diffusion de l'O-PME. Cette dernière en gel peut moduler la structure du gel qui, à son tour, pourrait influencer sur la diffusion de l'O-PME, par la réduction des pores.



## **Conclusion et perspectives**



## **9. Conclusion et perspectives**

La caractérisation de l'action de l'O-PME et de l'Aa-PME dans une solution de pectines et dans un système en cours de gélification a montré l'existence de différents comportements suivant l'environnement considéré, modulé par la présence ou non de calcium. Par ailleurs, l'étude de la diffusion des PME dans différents systèmes pectiques a mis en évidence de fortes différences entre les comportements de l'O-PME et de l'Aa-PME selon l'échelle de diffusion considérée. Ces différentes observations ont pu être reliées au rôle de chacune des PME *in vivo*.

Le calcul des grandeurs catalytiques des deux enzymes a permis d'obtenir plusieurs éléments d'explication concernant le comportement des PME en solution et en gel en formation, *i.e.* sur l'influence du calcium sur les enzymes. Néanmoins, il pourrait être intéressant de poursuivre l'étude de l'influence du calcium sur les deux enzymes, soit en travaillant dans un rapport constant entre les quantités de calcium et de GalA libre (R constant), soit en réalisant les mêmes études à différentes concentrations de calcium pour déterminer à quelle concentration en calcium, *i.e.* à quelle valeur de R, débute l'inhibition de la PME. Par ailleurs, d'autres paramètres comme le pH et le degré de méthylation initial de la pectine influencent le comportement des PME. La détermination de l'importance relative de ces paramètres pour une PME donnée pourrait être intéressante pour mieux comprendre les mécanismes de régulation ainsi que le mode d'action des PME et pouvoir les contrôler.

L'étude de la diffusion a permis de mettre en évidence des tendances reliant le mode d'action des pectines, leurs constantes catalytiques et leur diffusion. D'autre part, il a été montré que la FRAP représente l'échelle de temps et de longueur adaptée à l'étude de la diffusion des PME. Afin de conforter ces résultats, de nouvelles expériences de FRAP pourraient être réalisées pour préciser les coefficients de diffusion. Par ailleurs, afin d'essayer de comprendre la cause de la faible migration de l'O-PME, une caractérisation plus fine de la structure du gel s'attachant notamment à la détermination de la taille des pores ainsi qu'à la mobilité des chaînes de pectine avant et pendant l'action des PME pourrait permettre de connaître l'évolution de ces paramètres consécutive à l'action des PME.

Enfin, ce travail constitue une première étape dans l'étude du comportement des enzymes dans un modèle de paroi. Par la suite, la matrice dans laquelle les enzymes seront étudiées sera d'une part, densifiée pour approcher les conditions de concentration *in vivo* et d'autre part, complexifiée avec les autres polysaccharides de la paroi comme des

xyloglucanes ou par des microfibrilles de cellulose. Il sera possible ensuite d'étudier l'évolution des propriétés du système lors de différents types d'action enzymatique agissant sur l'un ou l'autre des composants et inversement d'étudier le comportement de différentes enzymes dans cette matrice.

## **Références bibliographiques**



## 10. Références bibliographiques

- Aboughe-Angone, S., Nguema-Ona, E., Ghosh, P., Lerouge, P., Ishii, T., Ray, B., & Driouich, A.** (2008). Cell wall carbohydrates from fruit pulp of *Argania spinosa*: structural analysis of pectin and xyloglucan polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 343(1), 67-72.
- Al-Qsous, S., Carpentier, E., Klein-Eude, D., Burel, C., Mareck, A., Dauchel, H., Gomord, V., & Balangé, A.** (2004). Identification and isolation of a pectin methylesterase isoform that could be involved in flax cell wall stiffening. *Planta*, 219(2), 369-378.
- Alonso, J., Rodriguez, T., & Canet, W.** (1995). Effect of Calcium Pretreatments on the Texture of Frozen Cherries. Role of Pectinesterase in the Changes in the Pectic Materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(4), 1011-1016.
- Alonso, J. s., Howell, N., & Canet, W.** (1997). Purification and characterisation of two pectinmethylesterase from persimmon (*Diospyros kaki*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 75(3), 352-358.
- Amsden, B.** (1998). Solute Diffusion within Hydrogels. Mechanisms and Models. *Macromolecules*, 31(23), 8382-8395.
- Anthon, G. E., & Barrett, D. M.** (2004). Comparison of Three Colorimetric Reagents in the Determination of Methanol with Alcohol Oxidase. Application to the Assay of Pectin Methylesterase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(12), 3749-3753.
- Arias, C. R., & Burns, J. K.** (2002). A Pectinmethylesterase Gene Associated with a Heat-Stable Extract from Citrus. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(12), 3465-3472.
- Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., & Schwede, T.** (2006). The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 22(2), 195-201.
- Balestrieri, C., Castaldo, D., Giovane, A., Quagliuolo, L., & Servillo, L.** (1990). A glycoprotein inhibitor of pectin methylesterase in kiwi fruit (*Actinidia chinensis*). *European Journal of Biochemistry*, 193(1), 183-187.
- Bashford, D.** (1997). An object-oriented programming suite for electrostatic effects in biological molecules An experience report on the MEAD project. In Y. Ishikawa, R. Oldehoeft, J. Reynders & M. Tholburn (Eds.). *Scientific Computing in Object-Oriented Parallel Environments* (Vol. 1343, pp. 233-240): Springer Berlin / Heidelberg.
- Berardini, N., Knödler, M., Schieber, A., & Carle, R.** (2005). Utilization of mango peels as a source of pectin and polyphenolics. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 6(4), 442-452.
- Blumenkrantz, N., & Asboe-Hansen, G.** (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*, 54(2), 484-489.
- Bonnin, E., Dolo, E., Le Goff, A., & Thibault, J.-F.** (2002). Characterisation of pectin subunits released by an optimised combination of enzymes. *Carbohydrate Research*, 337(18), 1687-1696.
- Bordenave, M., Breton, C., Goldberg, R., Huet, J.-C., Perez, S., & Pernollet, J.-C.** (1996). Pectinmethylesterase isoforms from *Vigna radiata* hypocotyl cell walls: kinetic properties and molecular cloning of a cDNA encoding the most alkaline isoform. *Plant Molecular Biology* (Vol. 31, pp. 1039-1049): Springer Netherlands.
- Bosch, M., Cheung, A. Y., & Hepler, P. K.** (2005). Pectin Methylesterase, a Regulator of Pollen Tube Growth. *Plant Physiology*, 138(3), 1334-1346.
- Braccini, I., & Pérez, S.** (2001). Molecular Basis of Ca<sup>2+</sup>-Induced Gelation in Alginates and Pectins: The Egg-Box Model Revisited. *Biomacromolecules*, 2(4), 1089-1096.

- Braudo, E. E., Soshinsky, A. A., Yuryev, V. P., & Tolstoguzov, V. B.** (1992). The interaction of polyuronides with calcium ions. 1: binding isotherms of calcium ions with pectic substances. *Carbohydrate Polymers*, 18(3), 165-169.
- Briandet, R., Lacroix-Gueu, P., Renault, M., Lecart, S., Meylheuc, T., Bidnenko, E., Steenkeste, K., Bellon-Fontaine, M.-N., & Fontaine-Aupart, M.-P.** (2008). Fluorescence Correlation Spectroscopy To Study Diffusion and Reaction of Bacteriophages inside Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74(7), 2135-2143.
- Brummell, D. A., Dal Cin, V., Crisosto, C. H., & Labavitch, J. M.** (2004). Cell wall metabolism during maturation, ripening and senescence of peach fruit. *Journal of Experimental Botany*, 55(405), 2029-2039.
- Burapapadh, K., Kumpugdee-Vollrath, M., Chantasart, D., & Sriamornsak, P.** (2010). Fabrication of pectin-based nanoemulsions loaded with itraconazole for pharmaceutical application. *Carbohydrate Polymers*, 82(2), 384-393.
- Burton, R. A., Gidley, M. J., & Fincher, G. B.** (2010). Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls. 6(10), 724-732.
- Cabrera, J. C., Boland, A., Messiaen, J., Cambier, P., & Van Cutsem, P.** (2008). Egg box conformation of oligogalacturonides: The time-dependent stabilization of the elicitor-active conformation increases its biological activity. *Glycobiology*, 18(6), 473-482.
- Caffall, K. H., & Mohnen, D.** (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 344(14), 1879-1900.
- Cameron, R. G., Baker, R. A., & Grohmann, K.** (1998). Multiple Forms of Pectinmethylesterase from Citrus Peel and Their Effects on Juice Cloud Stability. *Journal of Food Science*, 63(2), 253-256.
- Cameron, R. G., Luzio, G. A., Goodner, K., & Williams, M. A. K.** (2008). Demethylation of a model homogalacturonan with a salt-independent pectin methylesterase from citrus: I. Effect of pH on demethylated block size, block number and enzyme mode of action. *Carbohydrate Polymers*, 71(2), 287-299.
- Cameron, R. G., Luzio, G. A., Vasu, P., Savary, B. J., & Williams, M. A. K.** (2011). Enzymatic Modification of a Model Homogalacturonan with the Thermally Tolerant Pectin Methylesterase from Citrus: 1. Nanostructural Characterization, Enzyme Mode of Action, and Effect of pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(6), 2717-2724.
- Cameron, R. G., Niedz, R. P., & Grohmann, K.** (1994). Variable Heat Stability for Multiple Forms of Pectin Methylesterase from Citrus Tissue Culture Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(4), 903-908.
- Cameron, R. G., Savary, B. J., Hotchkiss, A. T., & Fishman, M. L.** (2005). Isolation, Characterization, and Pectin-Modifying Properties of a Thermally Tolerant Pectin Methylesterase from *Citrus sinensis* Var. Valencia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 2255-2260.
- Cameron, R. G., Savary, B. J., Hotchkiss, A. T., Fishman, M. L., Chau, H. K., Baker, R. A., & Grohmann, K.** (2003). Separation and Characterization of a Salt-Dependent Pectin Methylesterase from *Citrus sinensis* Var. Valencia Fruit Tissue. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(7), 2070-2075.
- Candogan, K., & Kolsarici, N.** (2003). The effects of carrageenan and pectin on some quality characteristics of low-fat beef frankfurters. *Meat Science*, 64(2), 199-206.
- Capel, F., Nicolai, T., Durand, D., Boulenger, P., & Langendorff, V.** (2006). Calcium and acid induced gelation of (amidated) low methoxyl pectin. *Food Hydrocolloids*, 20(6), 901-907.
- Carpita, N. C., & Gibeaut, D. M.** (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal*, 3(1), 1-30.

- Castaldi, P., Lauro, G., Senette, C., & Deiana, S.** (2010). Role of the Ca-pectates on the accumulation of heavy metals in the root apoplast. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 1008-1014.
- Catoire, L., Pierron, M., Morvan, C., Hervé du Penhoat, C., & Goldberg, R.** (1998). Investigation of the Action Patterns of Pectinmethylesterase Isoforms through Kinetic Analyses and NMR Spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry*, 273(50), 33150-33156.
- Charnay, D., Nari, J., & Noat, G.** (1992). Regulation of plant cell-wall pectin methyl esterase by polyamines."Interactions with the effects of metal ions". *European Journal of Biochemistry*, 205(2), 711-714.
- Chatjigakis, A. K., Pappas, C., N.Proxenia, O.Kalantzi, P.Rodis, & Polissiou, M.** (1998). FT-IR spectroscopic determination of the degree of esterification of cell wall pectins from stored peaches and correlation to textural changes. *Carbohydrate Polymers*, 37(4), 395-408.
- Chen, C. H., Wu, M. C., Hou, C. Y., Jiang, C. M., Huang, C. M., & Wang, Y. T.** (2009). Effect of Phenolic Acid on Antioxidant Activity of Wine and Inhibition of Pectin Methyl Esterase. *Journal of the Institute of Brewing*, 115(4), 328-333.
- Chen, M.-H., Sheng, J., Hind, G., Handa, A. K., & Citovsky, V.** (2000). Interaction between the tobacco mosaic virus movement protein and host cell pectin methylesterases is required for viral cell-to-cell movement. *The EMBO Journal*, 19, 913-920.
- Christensen, T. M. I. E., Nielsen, J. E., Kreiberg, J. D., Rasmussen, P., & Mikkelsen, J. r. D.** (1998). Pectin methyl esterase from orange fruit: characterization and localization by in-situ hybridization and immunohistochemistry. *Planta* (Vol. 206, pp. 493-503): Springer Berlin / Heidelberg.
- Christgau, S., Kofod, L. V., Halkier, T., Andersen, L. N., Hockauf, M., Dorreich, K., Dalboge, H., & Kauppinen, S.** (1996). Pectin methyl esterase from *Aspergillus aculeatus*: expression cloning in yeast and characterization of the recombinant enzyme. *Biochemical Journal*, 319, 705 - 712.
- Christiaens, S., Van Buggenhout, S., Nguémazong, E. D., Vandevenne, E., Fraeye, I., Duvetter, T., Van Loey, A. M., & Hendrickx, M. E.** (2011). Anti-homogalacturonan antibodies: A way to explore the effect of processing on pectin in fruits and vegetables? *Food Research International*, 44(1), 225-234.
- Ciardiello, M. A., Tamburrini, M., Tuppo, L., Carratore, V., Giovane, A., Mattei, B., & Camardella, L.** (2004). Pectin Methylesterase from Kiwi and Kaki Fruits: Purification, Characterization, and Role of pH in the Enzyme Regulation and Interaction with the Kiwi Proteinaceous Inhibitor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(25), 7700-7703.
- Coenen, G. J., Bakx, E. J., Verhoef, R. P., Schols, H. A., & Voragen, A. G. J.** (2007). Identification of the connecting linkage between homo- or xylogalacturonan and rhamnogalacturonan type I. *Carbohydrate Polymers*, 70(2), 224-235.
- Corredig, M., Kerr, W., & Wicker, L.** (2000). Molecular characterization of commercial pectins by separation with linear mix gel permeation columns in-line with multi-angle light scattering detection. *Food Hydrocolloids*, 14(1), 41-47.
- Cosgrove, D. J.** (2005). Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(11), 850-861.
- Cros, S., Garnier, C., Axelos, M. A. V., Imberty, A., & Pérez, S.** (1996). Solution conformations of pectin polysaccharides: Determination of chain characteristics by small angle neutron scattering, viscometry, and molecular modeling. *Biopolymers*, 39(3), 339-351.
- Cybulska, J., Vanstreels, E., Ho, Q. T., Courtin, C. M., Craeyveld, V. V., Nicolai, B., Zdunek, A., & Konstankiewicz, K.** (2010). Mechanical characteristics of artificial cell walls. *Journal of Food Engineering*, 96(2), 287-294.

- Cybulska, J., Zdunek, A., & Konstankiewicz, K.** (2011). Calcium effect on mechanical properties of model cell walls and apple tissue. *Journal of Food Engineering*, 102(3), 217-223.
- D'Avino, R., Camardella, L., Christensen, T. M. I. E., Giovane, A., & Servillo, L.** (2003). Tomato pectin methylesterase: Modeling, fluorescence, and inhibitor interaction studies-comparison with the bacterial (*Erwinia chrysanthemi*) enzyme. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 53(4), 830-839.
- Daas, P. J. H., Meyer-Hansen, K., Schols, H. A., De Ruiter, G. A., & Voragen, A. G. J.** (1999). Investigation of the non-esterified galacturonic acid distribution in pectin with endopolygalacturonase. *Carbohydrate Research*, 318(1-4), 135-145.
- Das, S., & Ng, K.-Y.** (2010). Colon-specific delivery of resveratrol: Optimization of multi-particulate calcium-pectinate carrier. *International Journal of Pharmaceutics*, 385(1-2), 20-28.
- Dayod, M., Tyerman, S. D., Leigh, R. A., & Gilliam, M.** (2010). Calcium storage in plants and the implications for calcium biofortification. *Protoplasma*, 247(3-4), 215-231.
- de Assis, S. A., Martins, A. n. B. G., Guaglianoni, D. G., & de Faria Oliveira, O. M. M.** (2002). Partial Purification and Characterization of Pectin Methylesterase from Acerola (*Malpighia glabra* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(14), 4103-4107.
- de Gennes, P.-G.** (1979). *Scaling Concepts in Polymer Physics*. Cornell University Press Ltd.
- Dedeurwaerder, S., Menu-Bouaouiche, L., Mareck, A., Lerouge, P., & Guerineau, F. o.** (2009). Activity of an atypical *Arabidopsis thaliana* pectin methylesterase. *Planta* (Vol. 229, pp. 311-321): Springer Berlin / Heidelberg.
- Déléris, I., Andriot, I., Gobet, M., Moreau, C., Souchon, I., & Guichard, E.** (2010). Determination of aroma compound diffusion in model food systems: Comparison of macroscopic and microscopic methodologies. *Journal of Food Engineering*, 100(3), 557-566.
- Denès, J.-M., Baron, A., Renard, C. M. G. C., Péan, C., & Drilleau, J.-F.** (2000). Different action patterns for apple pectin methylesterase at pH 7.0 and 4.5. *Carbohydrate Research*, 327(4), 385-393.
- Derbyshire, P., McCann, M., & Roberts, K.** (2007). Restricted cell elongation in *Arabidopsis* hypocotyls is associated with a reduced average pectin esterification level. *BMC Plant Biology*, 7(1), 31.
- Di Matteo, A., Giovane, A., Raiola, A., Camardella, L., Bonivento, D., De Lorenzo, G., Cervone, F., Bellincampi, D., & Tsernoglou, D.** (2005). Structural Basis for the Interaction between Pectin Methylesterase and a Specific Inhibitor Protein. *The Plant Cell Online*, 17(3), 849-858.
- Dinu, D., Nechifor, M. T., Stoian, G., Costache, M., & Dinischiotu, A.** (2007). Enzymes with new biochemical properties in the pectinolytic complex produced by *Aspergillus niger* MIUG 16. *Journal of Biotechnology*, 131(2), 128-137.
- Dirix, C., Duvetter, T., Loey, A. V., Hendrickx, M., & Heremans, K.** (2005). The in situ observation of the temperature and pressure stability of recombinant *Aspergillus aculeatus* pectin methylesterase with Fourier transform IR spectroscopy reveals an unusual pressure stability of beta-helices. *Biochem. J.*, 392(3), 565-571.
- Do Amaral, S. H., De Assis, S. A., & Mascarenhas de Faria Oliveira, O. M.** (2005). Partial purification and characterisation of the pectin methylesterase from orange (*Citrus sinensis*) cv. Pera-Rio. *Journal of Food Biochemistry*, 29(4), 367-380.
- Dobies, M., Kućemia, S., & Jurga, S.** (2005). <sup>1</sup>H NMR and rheological studies of the calcium induced gelation process in aqueous low methoxyl pectin solutions. *Acta Physica Polonica A*, 118, 33-45.

- Donato, L., Garnier, C., Novales, B., & Doublier, J. L.** (2005a). Gelation of globular protein in presence of low methoxyl pectin: effect of Na<sup>+</sup> and/or Ca<sup>2+</sup> ions on rheology and microstructure of the systems. *Food Hydrocolloids*, 19(3), 549-556.
- Donato, L., Garnier, C., Novales, B., Durand, S., & Doublier, J. L.** (2005b). Heat-induced gelation of bovine serum albumin/low-methoxyl pectin systems and the effect of calcium ions. *Biomacromolecules*, 6(1), 374-385.
- Dorokhov, Y. L., Frolova, O. Y., Skurat, E. V., Ivanov, P. A., Gasanova, T. V., Sheveleva, A. A., Ravin, N. V., Mäkinen, K. M., Klimyuk, V. I., Skryabin, K. G., Gleba, Y. Y., & Atabekov, J. G.** (2006). A novel function for a ubiquitous plant enzyme pectin methylesterase: The enhancer of RNA silencing. *FEBS Letters*, 580(16), 3872-3878.
- Downie, B., Dirk, L. M. A., Hadfield, K. A., Wilkins, T. A., Bennett, A. B., & Bradford, K. J.** (1998). A Gel Diffusion Assay for Quantification of Pectin Methylesterase Activity. *Analytical Biochemistry*, 264(2), 149-157.
- Dronnet, V. M., Renard, C. M. G. C., Axelos, M. A. V., & Thibault, J.-F.** (1996). Characterisation and selectivity of divalent metal ions binding by citrus and sugar-beet pectins. *Carbohydrate Polymers*, 30(4), 253-263.
- du Penhoat, C. H., Gey, C., Pellerin, P., & Perez, S.** (1999). An NMR solution study of the mega-oligosaccharide, rhamnogalacturonan II. *Journal of Biomolecular NMR* (Vol. 14, pp. 253-271): Springer Netherlands.
- Duvetter, T., Fraeye, I., Sila, D. N., Verlent, I., Smout, C., Hendrickx, M., & Van Loey, A.** (2006). Mode of de-esterification of alkaline and acidic pectin methyl esterases at different pH conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7825-7831.
- Duvetter, T., Loey, A. V., Smout, C., Verlent, I., Nguyen, B. L., & Hendrickx, M.** (2005). *Aspergillus aculeatus* pectin methylesterase: study of the inactivation by temperature and pressure and the inhibition by pectin methylesterase inhibitor. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(4), 385-390.
- Evageliou, V., Richardson, R. K., & Morris, E. R.** (2000). Effect of pH, sugar type and thermal annealing on high-methoxy pectin gels. *Carbohydrate Polymers*, 42(3), 245-259.
- Fadda, G. C., Lairez, D., Arrio, B., Carton, J. P., & Larreta-Garde, V.** (2003). Enzyme-Catalyzed Gel Proteolysis: An Anomalous Diffusion-Controlled Mechanism. *Biophysical journal*, 85(5), 2808-2817.
- Fatin-Rouge, N., Milon, A., Buffle, J., Goulet, R. R., & Tessier, A.** (2003). Diffusion and Partitioning of Solutes in Agarose Hydrogels: The Relative Influence of Electrostatic and Specific Interactions. *The Journal of Physical Chemistry B*, 107(44), 12126-12137.
- Fatin-Rouge, N., Starchev, K., & Buffle, J.** (2004). Size Effects on Diffusion Processes within Agarose Gels. *Biophysical journal*, 86(5), 2710-2719.
- Feng, B., Li, P., Wang, H., & Zhang, X.** (2010). Functional analysis of Pcpme6 from oomycete plant pathogen *Phytophthora capsici*. *Microbial Pathogenesis*, 49(1-2), 23-31.
- Fraeye, I., Doungra, E., Duvetter, T., Moldenaers, P., Van Loey, A., & Hendrickx, M.** (2009). Influence of intrinsic and extrinsic factors on rheology of pectin-calcium gels. *Food Hydrocolloids*, 23(8), 2069-2077.
- Fraeye, I., Duvetter, T., Verlent, I., Ndaka Sila, D., Hendrickx, M., & Van Loey, A.** (2007). Comparison of enzymatic de-esterification of strawberry and apple pectin at elevated pressure by fungal pectinmethylesterase. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(1), 93-101.
- Francis, K. E., Lam, S. Y., & Copenhaver, G. P.** (2006). Separation of *Arabidopsis* pollen tetrads is regulated by QUARTET1, a pectin methylesterase gene. *Plant Physiol*, 142(3), 1004 - 1013.

- Fries, M., Ihrig, J., Brocklehurst, K., Shevchik, V. E., & Pickersgill, R. W.** (2007). Molecular basis of the activity of the phytopathogen pectin methylesterase. *The EMBO Journal*, 26(17), 3879-3887.
- Fritz, E.** (2007). Measurement of Cation Exchange Capacity (CEC) of Plant Cell Walls by X-Ray Microanalysis (EDX) in the Transmission Electron Microscope. *Microscopy and Microanalysis*, 13(04), 233-244.
- Fu, J.-T., & Rao, M. A.** (2001). Rheology and structure development during gelation of low-methoxyl pectin gels: the effect of sucrose. *Food Hydrocolloids*, 15(1), 93-100.
- Gagnon, M.-A.** (2009). Etude des propriétés de transport dans les hydrogels de curdlan. *Chimie* (p. 140). Montréal: thèse de l'université de Montréal.
- Gagnon, M.-A., & Lafleur, M.** (2009). Self-Diffusion and Mutual Diffusion of Small Molecules in High-Set Curdlan Hydrogels Studied by <sup>31</sup>P NMR. *The Journal of Physical Chemistry B*, 113(27), 9084-9091.
- Gajar, A.-M., & Badrie, N.** (2002). Processing and Quality Evaluation of a Low-Calorie Christophene Jam (*Sechium edule* (Jacq.) Swartz). *Journal of Food Science*, 67(1), 341-346.
- Garcia-Saez, A. J., & Schwille, P.** (2008). Fluorescence correlation spectroscopy for the study of membrane dynamics and protein/lipid interactions. *Methods*, 46(2), 116-122.
- Garnier, C.** (1992). Gélification des pectines en présence de calcium: étude physico-chimique et rhéologique. *Science des Aliments* (p. 172). Nantes: Thèse de l'université de Nantes.
- Garnier, C., Axelos, M., & Thibault, J.** (1992). Rheological, potentiometric and <sup>23</sup>Na NMR studies on pectin-calcium systems. *Physics of Polymer Networks* (Vol. 90, pp. 66-69): Springer Berlin / Heidelberg.
- Garnier, C., Axelos, M. A. V., & Thibault, J.-F.** (1993). Phase diagrams of pectin-calcium systems: Influence of pH, ionic strength, and temperature on the gelation of pectins with different degrees of methylation. *Carbohydrate Research*, 240, 219-232.
- Garnier, C., Axelos, M. A. V., & Thibault, J.-F.** (1994). Selectivity and cooperativity in the binding of calcium ions by pectins. *Carbohydrate Research*, 256(1), 71-81.
- Giannouli, P., Richardson, R. K., & Morris, E. R.** (2004a). Effect of polymeric cosolutes on calcium pectinate gelation. Part 2. Dextrans and inulin. *Carbohydrate Polymers*, 55(4), 357-365.
- Giannouli, P., Richardson, R. K., & Morris, E. R.** (2004b). Effect of polymeric cosolutes on calcium pectinate gelation. Part 3. Gum arabic and overview. *Carbohydrate Polymers*, 55(4), 367-377.
- Gilsenan, P. M., Richardson, R. K., & Morris, E. R.** (2000). Thermally reversible acid-induced gelation of low-methoxy pectin. *Carbohydrate Polymers*, 41(4), 339-349.
- Giner, J., Grouberman, P., Gimeno, V., & Martin, O.** (2005). Reduction of pectinesterase activity in a commercial enzyme preparation by pulsed electric fields: comparison of inactivation kinetic models. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(10), 1613-1621.
- Giovane, A., Servillo, L., Balestrieri, C., Raiola, A., D'Avino, R., Tamburrini, M., Clardiello, M. A., & Camardella, L.** (2004). Pectin methylesterase inhibitor. *BBA-Proteins Proteomics*, 1696(2), 245 - 252.
- Gloaguen, V., Brudieux, V., Closs, B., Barbat, A., Krausz, P., Sainte-Catherine, O., Kraemer, M., Maes, E., & Guerardel, Y.** (2010). Structural Characterization and Cytotoxic Properties of an Apiose-Rich Pectic Polysaccharide Obtained from the Cell Wall of the Marine Phanerogam *Zostera marina*. *Journal of Natural Products*, 73(6), 1087-1092.
- Goldberg, R., Pierron, M., Bordenave, M., Breton, C., Morvan, C., & du Penhoat, C. H.** (2001). Control of Mung Bean Pectinmethylesterase Isoform Activities. *Journal of Biological Chemistry*, 276(12), 8841-8847.

- Grasdalen, H., Andersen, A. K., & Larsen, B.** (1996). NMR spectroscopy studies of the action pattern of tomato pectinesterase: generation of block structure in pectin by a multiple-attack mechanism. *Carbohydrate Research*, 289, 105-114.
- Grassin, C., & Coutel, Y.** (2009). Enzymes in Fruit and Vegetable Processing and Juice Extraction. *Enzymes in Food Technology* (pp. 236-263): Wiley-Blackwell.
- Grosso, C. R. F., & Rao, M. A.** (1998). Dynamic rheology of structure development in low-methoxyl pectin+Ca<sup>2+</sup>+sugar gels. *Food Hydrocolloids*, 12(3), 357-363.
- Guex, N., & Peitsch, M. C.** (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: An environment for comparative protein modeling. *ELECTROPHORESIS*, 18(15), 2714-2723.
- Guglielmino, N., Liberman, M., Catesson, A. M., Mareck, A., Prat, R., Mutaftschiev, S., & Goldberg, R.** (1997a). Pectin methylesterases from poplar cambium and inner bark: localization, properties and seasonal changes. *Planta*, 202(1), 70-75.
- Guglielmino, N., Liberman, M., Jauneau, A., Vian, B., Catesson, A. M., & Goldberg, R.** (1997b). Pectin immunolocalization and calcium visualization in differentiating derivatives from poplar cambium. *Protoplasma* (Vol. 199, pp. 151-160): Springer Wien.
- Guillemin, A., Degraeve, P., Guillon, F., Lahaye, M., & Saurel, R.** (2006). Incorporation of pectinmethylesterase in apple tissue either by soaking or by vacuum-impregnation. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(5), 610-616.
- Guillemin, F., Guillon, F., Bonnin, E., Devaux, M.-F., Chevalier, T., Knox, J., Liners, F., & Thibault, J.-F.** (2005). Distribution of pectic epitopes in cell walls of the sugar beet root. *Planta*, 222(2), 355-371.
- Guillon, F., Auffret, A., Robertson, J. A., Thibault, J.-F., & Barry, J.-L.** (1998). Relationships between physical characteristics of sugar-beet fibre and its fermentability by human faecal flora. *Carbohydrate Polymers*, 37(2), 185-197.
- Guillotin, S. E., Bakx, E. J., Boulenger, P., Mazoyer, J., Schols, H. A., & Voragen, A. G. J.** (2005). Populations having different GalA blocks characteristics are present in commercial pectins which are chemically similar but have different functionalities. *Carbohydrate Polymers*, 60(3), 391-398.
- Ha, M.-A., Viëtor, R. J., Jardine, G. D., Apperley, D. C., & Jarvis, M. C.** (2005). Conformation and mobility of the arabinan and galactan side-chains of pectin. *Phytochemistry*, 66(15), 1817-1824.
- Hahn, M. G., Darvill, A. G., & Albersheim, P.** (1981). Host-Pathogen Interactions : XIX. The endogenous elicitor, a fragment of a plant cell wall polysaccharide that elicits phytoalexin accumulation in soybeans. *Plant Physiology*, 68(5), 1161-1169.
- Harholt, J., Suttangkakul, A., & Vibe Scheller, H.** (2010). Biosynthesis of Pectin. *Plant Physiology*, 153(2), 384-395.
- Hess, S. T., Huang, S., Heikal, A. A., & Webb, W. W.** (2001). Biological and Chemical Applications of Fluorescence Correlation Spectroscopy: A Review. *Biochemistry*, 41(3), 697-705.
- Hotchkiss, Arland T., Savary, B. J., Cameron, R. G., Chau, H. K., Brouillette, J., Luzio, G. A., & Fishman, M. L.** (2002). Enzymatic Modification of Pectin To Increase Its Calcium Sensitivity while Preserving Its Molecular Weight. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10), 2931-2937.
- Hou, W.-C., Chang, W.-H., & Jiang, C.-M.** (1999). Qualitative distinction of carboxyl group distributions in pectin with ruthenium red. *Botanical Bulletin Academia Sinica*, 40, 115-119.
- Hunter, J. L., Thomas, A. G. A., De Haset, J. A., & Wicker, L.** (2006). Valencia orange pectinmethylesterase modified pectin characterised by fourrier transform infrared spectroscopy, charge fractionnating and gelling. *Journal of Food Quality*, 29(5), 479-491.

- Hwang, J., & Kokini, J. L.** (1992). Contribution of the side branches to rheological properties of pectins. *Carbohydrate Polymers*, 19(1), 41-50.
- Ishii, T.** (1997). Structure and functions of feruloylated polysaccharides. *Plant Science*, 127(2), 111-127.
- Ishii, T., & Matsunaga, T.** (2001). Pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II is covalently linked to homogalacturonan. *Phytochemistry*, 57(6), 969-974.
- Ishii, T., Matsunaga, T., Pellerin, P., O'Neill, M. A., Darvill, A., & Albersheim, P.** (1999). The Plant Cell Wall Polysaccharide Rhamnogalacturonan II Self-assembles into a Covalently Cross-linked Dimer. *Journal of Biological Chemistry*, 274(19), 13098-13104.
- Jarvis, M. C.** (1984). Structure and properties of pectin gels in plant cell walls. *Plant, Cell & Environment*, 7(3), 153-164.
- Jarvis, M. C., & Apperley, D. C.** (1995). Chain conformation in concentrated pectic gels: evidence from <sup>13</sup>C NMR. *Carbohydrate Research*, 275(1), 131-145.
- Jarvis, M. C., Briggs, S. P. H., & Knox, J. P.** (2003). Intercellular adhesion and cell separation in plants. *Plant, Cell & Environment*, 26(7), 977-989.
- Jayani, R. S., Saxena, S., & Gupta, R.** (2005). Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry*, 40(9), 2931-2944.
- Jenkins, J., Mayans, O., Smith, D., Worboys, K., & Pickersgill, R. W.** (2001). Three-dimensional structure of *Erwinia chrysanthemi* pectin methylesterase reveals a novel esterase active site. *Journal of Molecular Biology*, 305(4), 951-960.
- Jensen, S., Rolin, C., & Ipsen, R.** (2010). Stabilisation of acidified skimmed milk with HM pectin. *Food Hydrocolloids*, 24(4), 291-299.
- Johansson, K., El-Ahmad, M., Friemann, R., Jörnvall, H., Markovic, O., & Eklund, H.** (2002). Crystal structure of plant pectin methylesterase. *FEBS Letters*, 514(2-3), 243-249.
- Johansson, L., & Löfroth, J.-E.** (1991). Diffusion and interaction in gels and solutions: I. Method. *Journal of Colloid and Interface Science*, 142(1), 116-120.
- Johansson, L., Skantze, U., & Loefroth, J. E.** (1991). Diffusion and interaction in gels and solutions. 2. Experimental results on the obstruction effect. *Macromolecules*, 24(22), 6019-6023.
- Johnson, E. M., Berk, D. A., Jain, R. K., & Deen, W. M.** (1996). Hindered diffusion in agarose gels: test of effective medium model. *Biophysical journal*, 70(2), 1017-1023.
- Jolie, R. P., Duvetter, T., Van Loey, A. M., & Hendrickx, M. E.** (2010). Pectin methylesterase and its proteinaceous inhibitor: a review. *Carbohydrate Research*, 345(18), 2583-2595.
- Joye, D. D., & Luzio, G. A.** (2000). Process for selective extraction of pectins from plant material by differential pH. *Carbohydrate Polymers*, 43(4), 337-342.
- Kashyap, D. R., Vohra, P. K., Chopra, S., & Tewari, R.** (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology*, 77(3), 215-227.
- Kim, Y., Teng, Q., & Wicker, L.** (2005). Action pattern of Valencia orange PME de-esterification of high methoxyl pectin and characterization of modified pectins. *Carbohydrate Research*, 340(17), 2620-2629.
- Knox, J. P., Linstead, P. J., King, J., Cooper, C., & Roberts, K.** (1990). Pectin esterification is spatially regulated both within cell walls and between developing tissues of root apices. *Planta* (Vol. 181, pp. 512-521): Springer Berlin / Heidelberg.
- Kratchanova, M., Slavov, A., & Kratchanov, C.** (2004). Interaction of pectin with amino acids and other amino compounds in aqueous solution. *Food Hydrocolloids*, 18(4), 677-683.
- Labille, J., Fatin-Rouge, N., & Buffle, J.** (2006). Local and Average Diffusion of Nanosolutes in Agarose Gel: The Effect of the Gel/Solution Interface Structure. *Langmuir*, 23(4), 2083-2090.

- Lacoux, J., Roger, D., Domon, J., Duval, I., Burel, C., Klein-Eude, D., Balangé, A., Morvan, C., & Laine, E.** (2003). Transgenesis with an antisense construct and a promoter-reporter fusion for the study of *Lupme3*, a flax pectin methyltransferase gene. In A. G. J. Voragen, F. Voragen, H. Schols & R. Visser (Eds.). *Advances in pectin and pectinase research*: Kluwer academic publisher.
- Lairez, D., Cathala, B., Monties, B., Bedos-Belval, F., Duran, H., & Gorrichon, L.** (2005). Aggregation during Coniferyl Alcohol Polymerization in Pectin Solution: A Biomimetic Approach of the First Steps of Lignification. *Biomacromolecules*, 6(2), 763-774.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., & Thornton, J. M.** (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, 26(2), 283-291.
- Le Goff, A., Renard, C. M. G. C., Bonnin, E., & Thibault, J.-F.** (2001). Extraction, purification and chemical characterisation of xylogalacturonans from pea hulls. *Carbohydrate Polymers*, 45(4), 325-334.
- Lead, J. R., Starchev, K., & Wilkinson, K. J.** (2003). Diffusion Coefficients of Humic Substances in Agarose Gel and in Water. *Environmental Science & Technology*, 37(3), 482-487.
- Leboeuf, E., Guillon, F., Thoiron, S. v., & Lahaye, M.** (2005). Biochemical and immunohistochemical analysis of pectic polysaccharides in the cell walls of *Arabidopsis* mutant QUASIMODO 1 suspension-cultured cells: implications for cell adhesion. *Journal of Experimental Botany*, 56(422), 3171-3182.
- Lee, H., Rivner, J., Urbauer, J. L., Garti, N., & Wicker, L.** (2008). De-esterification pattern of Valencia orange pectinmethyltransferases and characterization of modified pectins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(12), 2102-2110.
- Leloup, V. M., Colonna, P., & Ring, S. G.** (1987). Diffusion of a globular protein in amylose and amylopectin gels. *Food Hydrocolloids*, 1(5-6), 465-469.
- Leloup, V. M., Colonna, P., & Ring, S. G.** (1990). Studies on probe diffusion and accessibility in amylose gels. *Macromolecules*, 23(3), 862-866.
- Lewis, K. C., Selzer, T., Shahar, C., Udi, Y., Tworowski, D., & Sagi, I.** (2008). Inhibition of pectin methyl transferase activity by green tea catechins. *Phytochemistry*, 69(14), 2586-2592.
- Lievens, S., Goormachtig, S., Herman, S., & Holsters, M.** (2002). Patterns of Pectin Methyltransferase Transcripts in Developing Stem Nodules of *Sesbania rostrata*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(2), 164-168.
- Limberg, G., Körner, R., Buchholt, H. C., Christensen, T. M. I. E., Roepstorff, P., & Mikkelsen, J. D.** (2000). Analysis of different de-esterification mechanisms for pectin by enzymatic fingerprinting using endopectin lyase and endopolygalacturonase II from *A. Niger*. *Carbohydrate Research*, 327(3), 293-307.
- Liners, F., Letesson, J.-J., Didembourg, C., & Van Cutsem, P.** (1989). Monoclonal Antibodies against Pectin: Recognition of a Conformation Induced by Calcium. *Plant Physiology*, 91(4), 1419-1424.
- Lionetti, V., Raiola, A., Camardella, L., Giovane, A., Obel, N., Pauly, M., Favaron, F., Cervone, F., & Bellincampi, D.** (2007). Overexpression of Pectin Methyltransferase Inhibitors in *Arabidopsis* Restricts Fungal Infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology*, 143, 1871 - 1880.
- Liu, H., Xu, X. M., & Guo, S. D.** (2007a). Rheological, texture and sensory properties of low-fat mayonnaise with different fat mimetics. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 40(6), 946-954.
- Liu, H., Zhu, D. S., Xu, X. M., Guo, S. D., & Jin, Z. Y.** (2007b). Rheological, textural and microstructure analysis of the high-methoxy pectin/gelatin mixed systems. *Journal of Texture Studies*, 38(5), 577-600.

- Liu, L., Fishman, M., & Hicks, K.** (2007c). Pectin in controlled drug delivery - a review. *Cellulose*, 14(1), 15-24.
- Löfgren, C., Guillotin, S., Evenbratt, H., Schols, H., & Hermansson, A.-M.** (2005). Effects of Calcium, pH, and Blockiness on Kinetic Rheological Behavior and Microstructure of HM Pectin Gels. *Biomacromolecules*, 6(2), 646-652.
- Longland, J. M., Fry, S. C., & Trewavas, A. J.** (1989). Developmental Control of Apiogalacturonan Biosynthesis and UDP-Apiose Production in a Duckweed. *Plant Physiology*, 90(3), 972-976.
- Lorén, N., Nydén, M., & Hermansson, A.-M.** (2009). Determination of local diffusion properties in heterogeneous biomaterials. *Advances in Colloid and Interface Science Food Colloids 2008 - Creating Structure, Delivering Functionality*, 150(1), 5-15.
- Luzio, G. A., & Cameron, R. G.** (2008). Demethylation of a model homogalacturonan with the salt-independent pectin methylesterase from citrus: Part II. Structure-function analysis. *Carbohydrate Polymers*, 71(2), 300-309.
- Ly-Nguyen, B., Van Loey, A. M., Smout, C., Verlent, I., Duvetter, T., & Hendrickx, M. E.** (2004). Effect of Intrinsic and Extrinsic Factors on the Interaction of Plant Pectin Methylesterase and Its Proteinaceous Inhibitor from Kiwi Fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 8144-8150.
- Macdonald, H. M., & Evans, R.** (1996). Purification and Properties of Apple Pectinesterase. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 70(3), 321-326.
- MacDougall, A. J., Brett, G. M., Morris, V. J., Rigby, N. M., Ridout, M. J., & Ring, S. G.** (2001). The effect of peptide-pectin interactions on the gelation behaviour of a plant cell wall pectin. *Carbohydrate Research*, 335(2), 115-126.
- Maldonado, M. C., Desaad, A. M. S., & Callieri, D.** (1994). Purification and characterization of pectinesterase produced by a strain of *Aspergillus niger*. *Current Microbiology*, 28(4), 193 - 196.
- Markovic, O., & Janecek, S.** (2004). Pectin methylesterases: sequence-structural features and phylogenetic relationships. *Carbohydrate Research*, 339(13), 2281-2295.
- Masaro, L., & Zhu, X. X.** (1999a). Physical models of diffusion for polymer solutions, gels and solids. *Progress in Polymer Science*, 24(5), 731-775.
- Masaro, L., & Zhu, X. X.** (1999b). Self-Diffusion of End-Capped Oligo(ethylene glycol)s in Poly(vinyl alcohol) Aqueous Solutions and Gels. *Macromolecules*, 32(16), 5383-5390.
- Massiot, P., Perron, V., Baron, A., & Drilleau, J.-F.** (1997). Release of Methanol and Depolymerization of Highly Methyl Esterified Apple Pectin with an Endopolygalacturonase from *Aspergillus niger* and Pectin Methylesterases from *A. niger* or from Orange. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 30(7), 697-702.
- Matoh, T., & Kobayashi, M.** (1998). Boron and calcium, essential inorganic constituents of pectic polysaccharides in higher plant cell walls. *Journal of Plant Research* (Vol. 111, pp. 179-190): Springer Japan.
- Matsunaga, T., Ishii, T., Matsumoto, S., Higuchi, M., Darvill, A., Albersheim, P., & O'Neill, M. A.** (2004). Occurrence of the Primary Cell Wall Polysaccharide Rhamnogalacturonan II in Pteridophytes, Lycophytes, and Bryophytes. Implications for the Evolution of Vascular Plants. *Plant Physiology*, 134(1), 339-351.
- Mazoyer, J.** (2010). Contribution à la connaissance des propriétés amphiphiles des pectines. *Matériaux polymères* (p. 156). Paris: Thèse de l'université Pierre et Marie Curie.
- Mazoyer, J., Leroux, J., & Bruneau, G.** (1999). Use of depolymerised citrus fruit and apple pectins as emulsifiers and emulsion stabilisers. (Vol. 5,900,268). France: SKW Biosystems.
- McKenna, B. A., Nicholson, T. M., Wehr, J. B., & Menzies, N. W.** (2010). Effects of Ca, Cu, Al and La on pectin gel strength: implications for plant cell walls. *Carbohydrate Research*, 345(9), 1174-1179.

- Mesbahi, G., Jamalian, J., & Farahnaky, A.** (2005). A comparative study on functional properties of beet and citrus pectins in food systems. *Food Hydrocolloids*, 19(4), 731-738.
- Micard, V., Grabber, J. H., Ralph, J., Renard, C. M. G. C., & Thibault, J.-F.** (1997a). Dehydrodiferulic acids from sugar-beet pulp. *Phytochemistry*, 44(7), 1365-1368.
- Micard, V., Renard, C. M. G. C., Colquhoun, I. J., & Thibault, J.-F.** (1997b). End-products of enzymic saccharification of beet pulp, with a special attention to feruloylated oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 32(3-4), 283-292.
- Micheli, F.** (2001). Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends in Plant Science*, 6(9), 414-419.
- Migliori, M., Gabriele, D., Checchetti, A., & Battipede, B.** (2010). Compatibility analysis of pectin at different esterification degree from intrinsic viscosity data of diluted ternary solutions. *Reactive and Functional Polymers*, 70(10), 863-867.
- Min, B., Bae, I. Y., Lee, H. G., Yoo, S.-H., & Lee, S.** (2010). Utilization of pectin-enriched materials from apple pomace as a fat replacer in a model food system. *Bioresource Technology*, 101(14), 5414-5418.
- Miyamoto, A., & Chang, K. C.** (1992). Extraction and Physicochemical Characterization of Pectin from Sunflower Head Residues. *Journal of Food Science*, 57(6), 1439-1443.
- Mohnen, D.** (2008). Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(3), 266-277.
- Moore, J. P., Farrant, J. M., & Driouich, A.** (2008). A role for pectin-associated arabinans in maintaining the flexibility of the plant cell wall during water deficit stress. *Plant Signaling & Behaviour*, 3(2), 102-104.
- Morris, G. A., Castile, J., Smith, A., Adams, G. G., & Harding, S. E.** (2010). The effect of different storage temperatures on the physical properties of pectin solutions and gels. *Polymer Degradation and Stability*, 95(12), 2670-2673.
- Morris, G. A., Foster, T. J., & Harding, S. E.** (2002). A hydrodynamic study of the depolymerisation of a high methoxy pectin at elevated temperatures. *Carbohydrate Polymers*, 48(4), 361-367.
- Morris, V., Gromer, A., & Kirby, A.** (2009). Architecture of intracellular networks in plant matrices. *Structural Chemistry* (Vol. 20, pp. 255-261): Springer Netherlands.
- Mort, A., Zheng, Y., Qiu, F., Nimtz, M., & Bell-Eunice, G.** (2008). Structure of xylogalacturonan fragments from watermelon cell-wall pectin. Endopolygalacturonase can accommodate a xylosyl residue on the galacturonic acid just following the hydrolysis site. *Carbohydrate Research*, 343(7), 1212-1221.
- Moustacas, A.-M., Nari, J., Diamantidis, G., Noat, G., Crasnier, M., Borel, M., & Ricard, J.** (1986). Electrostatic effects and the dynamics of enzyme reactions at the surface of plant cells. *European Journal of Biochemistry*, 155(1), 191-197.
- Moustacas, A. M., Nari, J., Borel, M., Noat, G., & Ricard, J.** (1991). Pectin methylesterase, metal ions and plant cell-wall extension. The role of metal ions in plant cell-wall extension. *Biochemical Journal*, 279, 351-354.
- Munarin, F., Giuliano, L., Bozzini, S., Tanzi, M. C., & Petrini, P.** (2010). Mineral phase deposition on pectin microspheres. *Materials Science and Engineering: C*, 30(3), 491-496.
- Musabayane, C. T., Munjeri, O., & Matavire, T. P.** (2003). Transdermal Delivery of Chloroquine by Amidated Pectin Hydrogel Matrix Patch in the Rat. *Renal Failure*, 25(4), 525-534.
- Nakagawa, T., Miyaji, T., Yurimoto, H., Sakai, Y., Kato, N., & Tomizuka, N.** (2000). A Methylotrophic Pathway Participates in Pectin Utilization by *Candida boidinii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(10), 4253-4257.
- Nakamura, A., Furuta, H., Maeda, H., Takao, T., & Nagamatsu, Y.** (2002). Structural Studies by Stepwise Enzymatic Degradation of the Main Backbone of Soybean Soluble

- Polysaccharides Consisting of Galacturonan and Rhamnogalacturonan. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 66(6), 1301-1313.
- Nari, J., Noat, G., & Ricard, J.** (1991). Pectin methylesterase, métal ions and plant cell-wall extension. Hydrolysis of pectin by plant cell wall pectin methylesterase. *Biochemical Journal*, 279, 343-350.
- Neidhart, S., Hannak, C., & Giershner, K.** (2003). Sol-gel transitions of high-esterified pectins and their molecular structure. In F. V. e. al. (Ed.). *Advances in Pectin and Pectinase Research* (pp. 431-448): Kluwer Academic Publishers.
- Ng, A., & Waldron, K. W.** (1997). Effect of Cooking and Pre-Cooking on Cell-Wall Chemistry in Relation to Firmness of Carrot Tissues. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 73(4), 503-512.
- Ngouemazong, D. E., Tengweh, F. F., Fraeye, I., Duvetter, T., Cardinaels, R., Van Loey, A., Moldenaers, P., & Hendrickx, M.** (2011). Effect of de-methylesterification on network development and nature of Ca<sup>2+</sup>-pectin gels: Toward understanding structure-function relations of pectin. *Food Hydrocolloids, In Press, Accepted Manuscript*.
- Ngouémazong, E. D., Tengweh, F. F., Duvetter, T., Fraeye, I., Van Loey, A., Moldenaers, P., & Hendrickx, M.** (2011). Quantifying structural characteristics of partially de-esterified pectins. *Food Hydrocolloids*, 25(3).
- Ni, Y., & Yates, K. M.** (2002). IN-SITU GEL FORMATION OF PECTIN. United States.
- Nothnagel, E. A., McNeil, M., Albersheim, P., & Dell, A.** (1983). Host-Pathogen Interactions : XXII. A Galacturonic Acid Oligosaccharide from Plant Cell Walls Elicits Phytoalexins. *Plant Physiology*, 71(4), 916-926.
- Noto, R., Martorana, V., Bulone, D., & San Biagio, P. L.** (2005). Role of Charges and Solvent on the Conformational Properties of Poly(galacturonic acid) Chains: A Molecular Dynamics Study. *Biomacromolecules*, 6(5), 2555-2562.
- O'Brien, A. B., Philp, K., & Morris, E. R.** (2009). Gelation of high-methoxy pectin by enzymic de-esterification in the presence of calcium ions: a preliminary evaluation. *Carbohydrate Research*, 344(14), 1818-1823.
- O'Donoghue, E. M., & Somerfield, S. D.** (2008). Biochemical and rheological properties of gelling pectic isolates from buttercup squash fruit. *Food Hydrocolloids*, 22(7), 1326-1336.
- O'Neill, M. A., Ishii, T., Albersheim, P., & Darvill, A. G.** (2004). Rhamnogalacturonan II: Structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 109-139.
- Oliveira, F. S. d., Leite, B. r. C. l. O., Andrade, M. V. A. S. d., & Korn, M.** (2005 ). Determination of total aldehydes in fuel ethanol by MBTH method: sequential injection analysis *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 16 87-92
- Oomen, R. J. F. J., Vincken, J.-P., Maxwell, S. B., Skøt, M. S., Doeswijk-Voragen, C. H. L., Voragen, A. G. J., McCann, M. C., & Visser, R. G. F.** (2003). Towards unravelling the biological significance of the individual components of pectic hairy regions in plants. In A. G. J. Voragen, H. A. Schols & R. G. F. Visser (Eds.). *Advances in pectin and pectinase research* (pp. 15-34): Kluwer academic publishers.
- Ousalem, M., Busnel, J. P., & Nicolai, T.** (1993). A static and dynamic light scattering study of sharp pectin fractions in aqueous solution. *International Journal of Biological Macromolecules*, 15(4), 209-213.
- Park, S., & Agmon, N.** (2008). Theory and Simulation of Diffusion-Controlled Michaelis-Menten Kinetics for a Static Enzyme in Solution. *The Journal of Physical Chemistry B*, 112(19), 5977-5987.
- Pastor, I., Vilaseca, E., Madurga, S., Garcès, J. L., Cascante, M., & Mas, F.** (2010). Diffusion of  $\alpha$ -Chymotrypsin in Solution-Crowded Media. A Fluorescence Recovery after Photobleaching Study. *The Journal of Physical Chemistry B*, 114(11), 4028-4034.

- Pelloux, J., Rustérucchi, C., & Mellerowicz, E. J.** (2007). New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends in Plant Science*, 12(6), 267-277.
- Perez, S., Mazeau, K., & du Penhoat, C. H.** (2000). The three-dimensional structures of the pectic polysaccharides. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38(1-2), 37-55.
- Pérez, S., Mazeau, K., & Hervé du Penhoat, C.** (2000). The three-dimensional structures of the pectic polysaccharides. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38(1-2), 37-55.
- Perrone, P., Hewage, C. M., Thomson, A. R., Bailey, K., Sadler, I. H., & Fry, S. C.** (2002). Patterns of methyl and O-acetyl esterification in spinach pectins: new complexity. *Phytochemistry*, 60(1), 67-77.
- Pilling, J., Willmitzer, L., Bücking, H., & Fisahn, J.** (2004). Inhibition of a ubiquitously expressed pectin methyl esterase in *Solanum tuberosum* L. affects plant growth, leaf growth polarity, and ion partitioning. *Planta*, 219(1), 32-40.
- Pinto, J. F.** (2010). Site-specific drug delivery systems within the gastro-intestinal tract: From the mouth to the colon. *International Journal of Pharmaceutics*, 395(1-2), 44-52.
- Plaza, L., Duvetter, T., Plancken, I. V. d., Meersman, F., Loey, A. V., & Hendrickx, M.** (2008). Influence of environmental conditions on thermal stability of recombinant *Aspergillus aculeatus* pectinmethylesterase. *Food Chemistry*, 111(4), 912-920.
- Portenoy, R. K., Burton, A. W., Gabrail, N., & Taylor, D.** (2010). A multicenter, placebo-controlled, double-blind, multiple-crossover study of Fentanyl Pectin Nasal Spray (FPNS) in the treatment of breakthrough cancer pain. *Pain*, 151(3), 617-624.
- Raiola, A., Lionetti, V., Elmaghraby, I., Immerzeel, P., Mellerowicz, E. J., Salvi, G., Cervone, F., & Bellincampi, D.** (2011). Pectin Methylesterase Is Induced in Arabidopsis upon Infection and Is Necessary for a Successful Colonization by Necrotrophic Pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(4), 432-440.
- Ralet, M.-C., Bonnin, E., & Thibault, J.-F.** (2001a). Chromatographic study of highly methoxylated lime pectins deesterified by different pectin methyl-esterases. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 7th International Symposium of the European Society for Biochromatography (ESBC 2000), 753(1), 157-166.
- Ralet, M.-C., Bonnin, E., & Thibault, J.-F.** (2005a). Pectins. *Biopolymers Online*: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Ralet, M.-C., Cabrera, J. C., Bonnin, E., Quémener, B., Hellin, P., & Thibault, J.-F.** (2005b). Mapping sugar beet pectin acetylation pattern. *Phytochemistry*, 66(15), 1832-1843.
- Ralet, M.-C., Crépeau, M.-J., Buchholt, H.-C., & Thibault, J.-F.** (2003). Polyelectrolyte behaviour and calcium binding properties of sugar beet pectins differing in their degrees of methylation and acetylation. *Biochemical Engineering Journal* *Biopolymers*, 16(2), 191-201.
- Ralet, M.-C., Crépeau, M.-J., Lefèbvre, J., Mouille, G., Höfte, H., & Thibault, J.-F.** (2008). Reduced Number of Homogalacturonan Domains in Pectins of an Arabidopsis Mutant Enhances the Flexibility of the Polymer. *Biomacromolecules*, 9(5), 1454-1460.
- Ralet, M.-C., Dronnet, V., Buchholt, H. C., & Thibault, J.-F.** (2001b). Enzymatically and chemically de-esterified lime pectins: characterisation, polyelectrolyte behaviour and calcium binding properties. *Carbohydrate Research*, 336(2), 117-125.
- Ralet, M.-C., & Thibault, J.-F.** (2002). Interchain Heterogeneity of Enzymatically Deesterified Lime Pectins. *Biomacromolecules*, 3(5), 917-925.
- Redigueri, C. F., de Freitas, O., Lettinga, M. P., & Tuinier, R.** (2007). Thermodynamic Incompatibility and Complex Formation in Pectin/Caseinate Mixtures. *Biomacromolecules*, 8(11), 3345-3354.

- Reignault, P., Mercier, M., Bompeix, G., & Boccara, M.** (1994). Pectin methylesterase from *Botrytis cinerea*: physiological, biochemical and immunochemical studies. *Microbiology*, 140(12), 3249-3255.
- Ren, C., & Kermodé, A. R.** (2000). An Increase in Pectin Methyl Esterase Activity Accompanies Dormancy Breakage and Germination of Yellow Cedar Seeds. *Plant Physiology*, 124(1), 231-242.
- Renard, C. M. G. C., Crépeau, M.-J., & Thibault, J.-F.** (1999). Glucuronic acid directly linked to galacturonic acid in the rhamnogalacturonan backbone of beet pectins. *European Journal of Biochemistry*, 266(2), 566-574.
- Renard, C. M. G. C., & Jarvis, M. C.** (1999a). Acetylation and methylation of homogalacturonans 1: optimisation of the reaction and characterisation of the products. *Carbohydrate Polymers*, 39(3), 201-207.
- Renard, C. M. G. C., & Jarvis, M. C.** (1999b). Acetylation and methylation of homogalacturonans 2: effect on ion-binding properties and conformations. *Carbohydrate Polymers*, 39(3), 209-216.
- Ricard, J., & Noat, G.** (1986). Electrostatic effects and the dynamics of enzyme reactions at the surface of plant cells. *European Journal of Biochemistry*, 155(1), 183-190.
- Ridley, B. L., O'Neill, M. A., & Mohnen, D.** (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, 57(6), 929-967.
- Robertson, G. H., Wong, D. W. S., Lee, C. C., Wagschal, K., Smith, M. R., & Orts, W. J.** (2005). Native or Raw Starch Digestion: A Key Step in Energy Efficient Biorefining of Grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(2), 353-365.
- Rodríguez-Llorente, I. D., Pérez-Hormaeche, J., Mounadi, K. E., Dary, M., Caviedes, M. A., Cosson, V., Kondorosi, A., Ratet, P., & Palomares, A. J.** (2004). From pollen tubes to infection threads: recruitment of Medicago floral pectic genes for symbiosis. *The Plant Journal*, 39(4), 587-598.
- Ros, J. M., Schols, H. A., & Voragen, A. G. J.** (1998). Lemon albedo cell walls contain distinct populations of pectic hairy regions. *Carbohydrate Polymers*, 37(2), 159-166.
- Rosenbohm, C., Lundt, I., Christensen, T. I. E., & Young, N. G.** (2003). Chemically methylated and reduced pectins: preparation, characterisation by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy, enzymatic degradation, and gelling properties. *Carbohydrate Research*, 338(7), 637-649.
- Sakamoto, T., Bonnin, E., & Thibault, J.-F.** (2003). A new approach for studying interaction of the polygalacturonase-inhibiting proteins with pectins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1621(3), 280-284.
- Sattelmacher, B.** (2001). The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. *New Phytologist*, 149(2), 167-192.
- Savary, B. J., Hotchkiss, A. T., & Cameron, R. G.** (2002). Characterization of a Salt-Independent Pectin Methylesterase Purified from Valencia Orange Peel. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(12), 3553-3558.
- Schols, H. A., Bakx, E. J., Schipper, D., & Voragen, A. G. J.** (1995). A xylogalacturonan subunit present in the modified hairy regions of apple pectin. *Carbohydrate Research*, 279, 265-279.
- Schols, H. A., Huisman, M. M. H., Bakx, E. J., & Voragen, A. G. J.** (2003). Differences in the methyl ester distribution of pectins. In F. Voragen, H. Schols & R. Visser (Eds.). *Advances in pectin and pectinesterase research* (pp. 75-90): Kluwer Academic Publishers.
- Schomburg, D., & Salzmann, M.** (1991). *Enzyme Handbook*. Springer-Verlag.
- Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., & Peitsch, M. C.** (2003). SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3381-3385.

- Schwille, P., Haupts, U., Maiti, S., & Webb, W. W.** (1999). Molecular Dynamics in Living Cells Observed by Fluorescence Correlation Spectroscopy with One- and Two-Photon Excitation. *Biophysical journal*, 77(4), 2251-2265.
- Seifert, G. J., & Blaukopf, C.** (2010). Irritable Walls: The Plant Extracellular Matrix and Signaling. *Plant Physiology*, 153(2), 467-478.
- Sengkhampan, N., Bakx, E. J., Verhoef, R., Schols, H. A., Sajjaanantakul, T., & Voragen, A. G. J.** (2009). Okra pectin contains an unusual substitution of its rhamnosyl residues with acetyl and alpha-linked galactosyl groups. *Carbohydrate Research Pectin: Structure and Function - A special issue dedicated to Professor Walter Pilnik*, 344(14), 1842-1851.
- Seymour, T. A., Preston, J. F., Wicker, L., Lindsay, J. A., & Marshall, M. R.** (1991). Purification and properties of pectinesterases of Marsh white grapefruit pulp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(6), 1080-1085.
- Shen, Z., Pappan, K., Mutti, N. S., He, Q.-J., Denton, M., Zhang, Y., Kanost, M. R., Reese, J. C., & Reeck, G. R.** (2005). Pectinmethylesterase from the rice weevil, *Sitophilus oryzae*: cDNA isolation and sequencing, genetic origin, and expression of the recombinant enzyme. *Journal of insect science*, 5(21).
- Siedlecka, A., Wiklund, S., PÅ©ronne, M.-A. I., Micheli, F., Lesniewska, J., Sethson, I., Edlund, U., Richard, L., Sundberg, B. r., & Mellerowicz, E. J.** (2008). Pectin Methyl Esterase Inhibits Intrusive and Symplastic Cell Growth in Developing Wood Cells of *Populus*. *Plant Physiology*, 146(2), 554-565.
- Slavov, A., Garnier, C., Crépeau, M.-J., Durand, S., Thibault, J.-F., & Bonnin, E.** (2009). Gelation of high methoxy pectin in the presence of pectin methylesterases and calcium. *Carbohydrate Polymers*, 77(4), 876-884.
- Somerville, C., Bauer, S., Brininstool, G., Facette, M., Hamann, T., Milne, J., Osborne, E., Paredez, A., Persson, S., Raab, T., Vorwerk, S., & Youngs, H.** (2004). Toward a Systems Approach to Understanding Plant Cell Walls. *Science*, 306(5705), 2206-2211.
- Ström, A., Ribelles, P., Lundin, L., Norton, I., Morris, E. R., & Williams, M. A. K.** (2007). Influence of Pectin Fine Structure on the Mechanical Properties of Calcium-Pectin and Acid-Pectin Gels. *Biomacromolecules*, 8(9), 2668-2674.
- Surh, J., Decker, E. A., & McClements, D. J.** (2006). Influence of pH and pectin type on properties and stability of sodium-caseinate stabilized oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 20(5), 607-618.
- Tanhatan-Nasseri, A., Crépeau, M.-J., Thibault, J.-F., & Ralet, M.-C.** (2011). Isolation and characterization of model homogalacturonans of tailored methylesterification patterns. *Carbohydrate Polymers*, 86(3), 1236-1243.
- Terefe, N. S., Gamage, M., Vilku, K., Simons, L., Mawson, R., & Versteeg, C.** (2009). The kinetics of inactivation of pectin methylesterase and polygalacturonase in tomato juice by thermosonication. *Food Chemistry*, 117(1), 20-27.
- Thakur, B. R., Singh, R. K., Handa, A. K., & Rao, M. A.** (1997). Chemistry and uses of pectin - A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37(1), 47 - 73.
- Thibault, J.-F.** (1979). Automatisation du dosage des substances pectiques par la méthode au m ta-hydroxydiphenyl. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 12, 247-251.
- Thibault, J.-F., & Ralet, M.-C.** (2003a). Physico-chemical proerties of pectins in the cell walls and after extraction. In F. Voragen, H. Schols & R. Visser (Eds.). *Advances in pectin and pectinase research* (pp. 91- 105): Kluwer Academic.
- Thibault, J.-F., & Ralet, M.-C.** (2003b). Physico-chemical properties of pectins in the cell walls and after extraction. In A. G. J. Voragen, F. Voragen, H. Schols & R. Visser (Eds.). *Advances in pectin and pectinase research*.

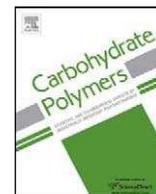
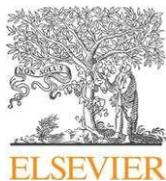
- Thibault, J.-F., Renard, C. M. G. C., Axelos, M. A. V., Roger, P., & Crépeau, M.-J.** (1993). Studies of the length of homogalacturonic regions in pectins by acid hydrolysis. *Carbohydrate Research*, 238, 271-286.
- Thibault, J.-F., & Rombouts, F. M.** (1986). Effects of some oxidising agents, especially ammonium peroxydisulfate, on sugar-beet pectins. *Carbohydrate Research*, 154(1), 205-215.
- Touzel, J.-P., Chabbert, B., Monties, B., Debeire, P., & Cathala, B.** (2003). Synthesis and Characterization of Dehydrogenation Polymers in *Gluconacetobacter xylinus* Cellulose and Cellulose/Pectin Composite. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(4), 981-986.
- Turquois, T., Rinaudo, M., Taravel, F. R., & Heyraud, A.** (1999). Extraction of highly gelling pectic substances from sugar beet pulp and potato pulp: influence of extrinsic parameters on their gelling properties. *Food Hydrocolloids*, 13(3), 255-262.
- van Alebeek, G.-J. W. M., van Scherpenzeel, K., Beldman, G., Schols, H. A., & Voragen, A. G. J.** (2003). Partially esterified oligogalacturonides are the preferred substrates for pectin methylesterase of *Aspergillus niger*. *Biochemical Journal*, 372(1), 211-218.
- Van Rijssel, M., Gerwig, G. J., & Hansen, T. A.** (1993). Isolation and characterization of an extracellular glycosylated protein complex from *Clostridium thermosaccharolyticum* with pectin methylesterase and polygalacturonate hydrolase activity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59(3), 828-836.
- Veronesi, C., Bonnin, E., Calvez, S., Thalouarn, P., & Simier, P.** (2007). Activity of secreted cell wall-modifying enzymes and expression of peroxidase-encoding gene following germination of *Orobancha ramosa*. *Biologia Plantarum*, 51(2), 391-394.
- Versteeg, C., Rombouts, F. M., Spaansen, C. H., & Pilnik, W.** (1980). Thermostability and orange juice cloud destabilizing properties of multiple pectinesterases from orange. *Journal of Food Science*, 45(4), 969-971.
- Vincent, R., Cucheval, A., Hemar, Y., & Williams, M.** (2009). Bio-inspired network optimization in soft materials — Insights from the plant cell wall. *The European Physical Journal E: Soft Matter and Biological Physics*, 28(1), 79-87.
- Vincent, R. R., & Williams, M. A. K.** (2009). Microrheological investigations give insights into the microstructure and functionality of pectin gels. *Carbohydrate Research*, 344(14), 1863-1871.
- Vincken, J.-P., Schols, H. A., Oomen, R. J. F. J., McCann, M. C., Ulvskov, P., Voragen, A. G. J., & Visser, R. G. F.** (2003). If Homogalacturonan Were a Side Chain of Rhamnogalacturonan I. Implications for Cell Wall Architecture. *Plant Physiology*, 132(4), 1781-1789.
- Voragen, A., Coenen, G.-J., Verhoef, R., & Schols, H.** (2009). Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Structural Chemistry* (Vol. 20, pp. 263-275): Springer Netherlands.
- Vorwerk, S., Somerville, S., & Somerville, C.** (2004). The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Trends in Plant Science*, 9(4), 203-209.
- Waharte, F., Steenkeste, K., Briandet, R., & Fontaine-Aupart, M.-P.** (2010). Diffusion Measurements inside Biofilms by Image-Based Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP) Analysis with a Commercial Confocal Laser Scanning Microscope. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76(17), 5860-5869.
- Walkenström, P., Kidman, S., Hermansson, A.-M., Rasmussen, P. B., & Hoegh, L.** (2003). Microstructure and rheological behaviour of alginate/pectin mixed gels. *Food Hydrocolloids*, 17(5), 593-603.
- Warren, M. E., Kester, H., Benen, J., Colangelo, J., Visser, J., Bergmann, C., & Orlando, R.** (2002). Studies on the glycosylation of wild-type and mutant forms of *Aspergillus niger* pectin methylesterase. *Carbohydrate Research*, 337(9), 803-812.

- Wehr, J. B., Menzies, N. W., & Blamey, F. P. C.** (2004). Alkali hydroxide-induced gelation of pectin. *Food Hydrocolloids*, 18(3), 375-378.
- Wellner, N., Kacuráková, M., Malovíková, A., Wilson, R. H., & Belton, P. S.** (1998). FT-IR study of pectate and pectinate gels formed by divalent cations. *Carbohydrate Research*, 308(1-2), 123-131.
- Wen, F., Zhu, Y., & Hawes, M. C.** (1999). Effect of Pectin Methyl-esterase Gene Expression on Pea Root Development. *The Plant Cell Online*, 11(6), 1129-1140.
- Wilkins, D. K., Grimshaw, S. B., Receveur, V., Dobson, C. M., Jones, J. A., & Smith, L. J.** (1999). Hydrodynamic Radii of Native and Denatured Proteins Measured by Pulse Field Gradient NMR Techniques *Biochemistry*, 38(50), 16424-16431.
- Willats, W. G. T., McCartney, L., Steele-King, C. G., Marcus, S. E., Mort, A., Huisman, M., van Alebeek, G. J., Schols, H. A., Voragen, A. G. J., Le Goff, A., Bonnin, E., Thibault, J. F., & Knox, J. P.** (2004). A xylogalacturonan epitope is specifically associated with plant cell detachment. *Planta*, 218(4), 673-681.
- Willats, W. G. T., Orfila, C., Limberg, G., Buchholt, H. C., van Alebeek, G., Voragen, A. G. J., Marcus, S. E., Christensen, T., Mikkelsen, J. D., Murray, B. S., & Knox, J. P.** (2001). Modulation of the degree and pattern of methyl-esterification of pectic homogalacturonan in plant cell walls - Implications for pectin methyl-esterase action, matrix properties, and cell adhesion. *Journal of Biological Chemistry*, 276(22), 19404 - 19413.
- Willats, W. G. T., Schols, H. A., & Knox, J. P.** (2003). Pectin cell biology: complexity in context. In A. G. J. Voragen, H. A. Schols & R. G. F. Visser (Eds.). *Advances in pectin and pectinesterase research* (pp. 147-157): Kluwer Academic Publishers.
- Willats, W. G. T., Steele-King, C. G., Marcus, S. E., & Knox, J. P.** (1999). Side chains of pectic polysaccharides are regulated in relation to cell proliferation and cell differentiation. *The Plant Journal*, 20(6), 619-628.
- Williams, M., Freshour, G., Darvill, A. G., Albersheim, P., & Hahn, M. G.** (1996). An Antibody Fab Selected from a Recombinant Phage Display Library Detects Deesterified Pectic Polysaccharide Rhamnogalacturonan II in Plant Cells. *The Plant Cell Online*, 8(4), 673-685.
- Williams, M. A. K., & Benen, J. A. E.** (2002). A novel enzyme activity involving the demethylation of specific partially methylated oligogalacturonides. *Biochemical Journal*, 367, 511-515.
- Williams, M. A. K., Cucheval, A., Ström, A., & Ralet, M.-C.** (2009). Electrophoretic Behavior of Copolymeric Galacturonans Including Comments on the Information Content of the Intermolecular Charge Distribution. *Biomacromolecules*, 10(6), 1523-1531.
- Williams, M. A. K., Foster, T. J., & Schols, H. A.** (2003). Elucidation of Pectin Methyl-ester Distributions by Capillary Electrophoresis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(7), 1777-1781.
- Williamson, G., Kroon, P. A., & Faulds, C. B.** (1998). Hairy plant polysaccharides: a close shave with microbial esterases. *Microbiology*, 144(8), 2011-2023.
- Winning, H., Viereck, N., Nørgaard, L., Larsen, J., & Engelsen, S. B.** (2007). Quantification of the degree of blockiness in pectins using <sup>1</sup>H NMR spectroscopy and chemometrics. *Food Hydrocolloids*, 21(2), 256-266.
- Winning, H., Viereck, N., Salomonsen, T., Larsen, J., & Engelsen, S. B.** (2009). Quantification of blockiness in pectins--A comparative study using vibrational spectroscopy and chemometrics. *Carbohydrate Research*, 344(14), 1833-1841.
- Wolf, S., Mouille, G., & Pelloux, J.** (2009). Homogalacturonan Methyl-Esterification and Plant Development. *Molecular Plant*, 2(5).

- Yoo, S.-H., Fishman, M. L., Hotchkiss, J., Arland T., & Lee, H. G.** (2006). Viscometric behavior of high-methoxy and low-methoxy pectin solutions. *Food Hydrocolloids*, 20(1), 62-67.
- Zandleven, J., Sørensen, S. O., Harholt, J., & Beldman, G.** (2007). Xylogalacturonan exists in cell walls from various tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, 68(8), 1219-1226.
- Zykwinska, A., Gaillard, C., Boiffard, M.-H., Thibault, J.-F., & Bonnin, E.** (2009). "Green labelled" pectins with gelling and emulsifying properties can be extracted by enzymatic way from unexploited sources. *Food Hydrocolloids*, 23(8), 2468-2477.
- Zykwinska, A., Thibault, J.-F., & Ralet, M.-C.** (2007). Organization of pectic arabinan and galactan side chains in association with cellulose microfibrils in primary cell walls and related models envisaged. *Journal of Experimental Botany*, 58(7), 1795-1802.

# **Annexe**





## Influence of calcium on pectin methylesterase behaviour in the presence of medium methylated pectins

Pauline Videcoq, Catherine Garnier, Paul Robert, Estelle Bonnin\*

INRA, UR 1268, Biopolymères Interactions Assemblages, BP 71627, 44316 Nantes, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 8 April 2011

Received in revised form 13 May 2011

Accepted 30 June 2011

Available online 7 July 2011

#### Keywords:

Pectin

Rheological behaviour

Degree of methoxylation

Degree of blockiness

Demethylation

Enzymes

### ABSTRACT

Pectins account for one of the major polysaccharides of plant cell walls and are commonly used in the food industry as gelling and stabilising agents. Pectin methylesterase (PME) can alter pectin structure and affect their gelling properties by de-esterifying galacturonic acid. Previously, we reported different behaviours of plant and fungal PMEs on high methylated pectins in solution or during the gelling process (Slavov et al., 2009). In the present study, the behaviour of the two PMEs is studied on a medium methylated pectin in solution, i.e. in the absence of calcium, or during the gelling process, i.e. in the presence of calcium. Only slight modifications were observed for *Aspergillus aculeatus* PME behaviour between the two conditions. On the opposite we show a role of calcium on the processivity of orange PME: the processivity decreases in the presence of calcium.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Pectins are a complex group of structural plant polysaccharides, mainly located in primary cell walls of higher plants. They are involved in the control of cell wall properties and in many physiological processes as plant cell growth (Willats, McCartney, Mackie, & Knox, 2001; Wolf, Mouille, & Pelloux, 2009) or plant defence against phytopathogens (Lionetti et al., 2007; Messiaen & Van Cutsem, 1994; Ridley, O'Neill, & Mohnen, 2001). Next to biological interest, pectins are also used for their thickening and gelling properties in the industry. In food industry, pectins can be used as stabilizing agent in acidic milk beverage (Jensen, Rolin, & Ipsen, 2010), gelling agent in dairy dessert or fruit jam (Artoft, Madsen, & Ipsen, 2008) or fat agent replacer (Min, Bae, Lee, Yoo, & Lee, 2010). In pharmaceutical industry, pectins have several utilizations and have been recently used in the treatment of breakthrough cancer pain as transmucosal delivery system (Portenoy, Burton, Gabrail, & Taylor, 2010). Pectin structure is complex (Voragen, Coenen, Verhoef, & Schols, 2009). Commercial pectins are mainly constituted by homogalacturonan, a linear homopolymer of  $\alpha(1\text{--}4)$  linked D-galacturonic acid, which can be esterified with methanol at C6 carboxyl group. The degree of methylation (DM), as the degree of polymerization, affects gelling properties of pectins. The DM subdivides pectins in two classes with different gelling abilities. Pectin

with a high DM (high methoxylated (HM) pectin,  $\text{DM} > 50\%$ ) can form a gel in acidic conditions in the presence of high sugar concentration. In the opposite, gelation of low methoxylated (LM) pectin ( $\text{DM} < 50\%$ ) occurs at higher pH in the presence of divalent ions, such as calcium, which acts as a bridge between pairs of carboxyl groups of different pectin chains. The main industrial sources for pectin extraction are apple pomace and citrus peels, which provide HM pectin. LM pectin can be obtained after chemical de-esterification of HM pectins. However, this process often induces pectin depolymerisation, thus reducing gel forming ability of pectin (Fraeye, Duvetter, Doungra, Van Loey, & Hendrickx, 2010b).

*In planta*, pectins are integrated in plant cell walls and evolve during cell growth and development. They are secreted into the wall as highly methylesterified. They are further modified by endogenous pectin methylesterases (PME) that catalyse the enzymatic de-esterification of pectin. The modulation of PME action allows control of plant cell wall properties like local pH, porosity or stiffness (Denès, Baron, Renard, Péan, & Drilleau, 2000). PMEs can also be found in some plant cell wall degrading microorganisms like phytopathogenic fungi and bacteria. In this case PMEs demethylate the pectin network for facilitating bacterial or fungal invasion (Fries, Ihrig, Brocklehurst, Shevchik, & Pickersgill, 2007). PMEs offer demethylation without molecular weight loss of pectin (Hotchkiss et al., 2002). Moreover, whereas chemical demethylation leads to a random pattern of methylation, PMEs can lead to more ordered pattern depending on their origin. The mode of action of PMEs has been widely studied in pectin solution (Limberg

\* Corresponding author. Tel.: +33 02 40 67 50 58; fax: +33 02 40 67 50 84.  
E-mail address: [estelle.bonnin@nantes.inra.fr](mailto:estelle.bonnin@nantes.inra.fr) (E. Bonnin).

et al., 2000). Most fungal PME demethylate short sequences of GalA residues before attacking next chain. This action generates short sequences of free galacturonic acid with a random-like distribution. Plant PME demethylate in a more blockwise fashion, converting large parts of a chain before attacking next chain (Catoire, Pierron, Morvan, Hervé du Penhoat, & Goldberg, 1998). This action generates long sequences of free contiguous galacturonic acid with a blockwise distribution. A relationship between the strength of calcium pectin gel and the patterns of methylation generated after plant and fungal PME action has been evidenced (Fraeye et al., 2009; Luzio & Cameron, 2008). In the presence of blocks, stronger gels are formed. Moreover, Hotchkiss et al. (2002) demonstrated that a pectin de-esterified by a plant PME exhibits calcium sensitivity at a higher DM than a pectin chemically de-esterified.

Simultaneously, several authors reported about PME's activity on HM pectin in presence of calcium (O'Brien, Philp, & Morris, 2009; Slavov et al., 2009; Vincent & Williams, 2009). In these works, pectin gelation and pectin de-esterification by PME occur concomitantly and the context is closer to PME environment found *in planta*. O'Brien et al. (2009) reported that different calcium concentrations and temperature values influence rheological properties of the system in the presence of fungal PME. However, no change in the gelation time was noticed as a function of temperature (20–40 °C) even when the temperature approaches optimum temperature of the PME. This behaviour was attributed to competition between de-esterification and formation of Ca<sup>2+</sup> induced "eeg-box" junctions. Vincent and Williams (2009) characterized the gelation mechanism in the presence of a plant PME using microrheology. They also investigated the pattern of demethylation by capillary electrophoresis (Vincent, Cuheval, Hemar, & Williams, 2009). They reported a reduction in the block length generated by PME in the presence of calcium. The demethylation pattern generated by plant PME in the presence or in the absence of calcium led to the formation of different networks in presence of calcium, a flexible and semi-flexible, respectively.

In a previous work, we reported how *Aspergillus aculeatus* (Aa-PME) and Orange (O-PME) demethylate HM pectins in the presence or in the absence of calcium (Slavov et al., 2009). We observed an effect of calcium on the mode of action of the enzymes. Aa-PME acted in a more blockwise manner and O-PME acted in a more random manner than in the absence of calcium. The differences have been linked to the gelation behaviour of pectins in the presence of calcium and Aa-PME or O-PME. One hypothesis was that during the demethylation process, gelation occurs which can generate physical constraints for PME and modify its behaviour. In the present work, a medium methylated pectin (MM pectin) of 46% DM was used to study PME's behaviour in a pre-gelled system where it is possible to take into account its physical constraints. We report now the biochemical characterisation of the system with the aim of studying the influence of the media on PME's behaviour in a physical point of view. In this way, the modifications in PME's behaviour can be investigated and connected to the gelation behaviour

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

The citrus MM pectin was kindly provided by Cargill Texturizing solutions (lot n°13830, Baupre, France). It has a DM of 46% and a galacturonic acid content of 77.3%. Pectin solutions were prepared at 25 mg ml<sup>-1</sup> by dissolving the pectin powder in 50 mmol l<sup>-1</sup> MES (2-[N-morpholino] ethane-sulphonic acid) buffer at pH 6 during 2 h at 4 °C under magnetic stirring. The pH was thereafter adjusted to 6 using 0.1 mol l<sup>-1</sup> NaOH and the pectin solutions stored overnight at 4 °C. To remove large aggregates and impurities, pectin solution was centrifuged at 17,000 × g for 30 min and the supernatant was

filtered on nitrocellulose filters with successive porosity ranging from 8 μm to 0.8 μm (Millipore). The concentration was determined by drying 2 ml of solution in an oven at 110 °C overnight and measuring the dry weight.

The pectin methylsterases used were from orange (O-PME, 461 U mg<sup>-1</sup>, lot 087K7435, P4500, Sigma, L'Isle d'Abeau, France) and *A. aculeatus* (Aa-PME, Uniprot Q12535), the later one being kindly provided by Novozyme A/S (Copenhagen, Denmark). The enzymes were solubilised at 5 mg ml<sup>-1</sup> in 10 mmol l<sup>-1</sup> MES buffer (pH 6) and dialysed overnight at 4 °C against the same buffer. Activities of PMEs were determined by the colorimetric method using N-methylbenzothiazolinone-2-hydrazone (MBTH, Sigma M8006-1G) and alcohol oxidase (E.C. 1.1.3.13, Sigma A2404) for oxidation of the released methanol (Anthon & Barrett, 2004). Before enzymatic incubation, enzymes were diluted as necessary with 10 mmol l<sup>-1</sup> MES buffer. The enzymes used in the present work have different pH optima: O-PME has its pH optimum at 9 (Savary, Hotchkiss, & Cameron, 2002) while Aa-PME optimum pH is 4.5 (Duvetter et al., 2006). In order to compare their action without changing the experimental conditions, an intermediate pH value of 6 was chosen.

The endo-polygalacturonase (AnPGII, E.C. 3.2.1.15, Uniprot P26214, Novozymes) was from *Aspergillus niger* and was purified in the laboratory as described elsewhere (Sakamoto, Bonnin, Quemener, & Thibault, 2002).

### 2.2. Methods

#### 2.2.1. Determination of PME kinetic parameters

The kinetic parameters were determined by performing PME activity assays at different MM pectin concentrations from 1 to 20 mg ml<sup>-1</sup>. Activity assays were conducted at 30 °C and pH 6. The Michaelis constant ( $K_m$ ) and the maximum velocity ( $V_{max}$ ) were determined using Lineweaver–Burk double reciprocal plot in which the reciprocal of the initial rates of PME activity were plotted against the reciprocals of the pectin concentration. Assays were performed in duplicate.

#### 2.2.2. Kinetics

Pectin and calcium chloride solutions were preheated at 50 °C during 2 min. Then CaCl<sub>2</sub> solution was added drop by drop to pectin under strong magnetic stirring. The final concentrations were 15 mg ml<sup>-1</sup> for pectin and 5 mmol l<sup>-1</sup> for calcium. The mixture was held at 50 °C under stirring for 1 min. Then O-PME or Aa-PME solution was added to have a final enzyme concentration of 0.4 nkat ml<sup>-1</sup>. The final mixture was split in 150 μl-samples which were incubated at 30 °C. PME activity was stopped by heating the samples at 70 °C (10 min) every hour during 6 h and then at 10 and 24 h. After heating, the samples were diluted in 50 mmol l<sup>-1</sup> MES pH 6 at 2 mg ml<sup>-1</sup> for DM and DBabs determination.

#### 2.2.3. Degree of methylation (DM)

DM was determined using infrared spectroscopy. Infrared spectra were recorded between 1800 and 1535 cm<sup>-1</sup> at 4 cm<sup>-1</sup> intervals using a Bruker spectrometer (Vector 22). Pectin films were prepared in duplicate drying 150 μl of 2 mg ml<sup>-1</sup> pectin–water on BaF<sub>2</sub> window. In the selected spectral range, the absorptions bands at 1740 and 1620 cm<sup>-1</sup> are assigned to C=O stretching vibrations of ester and carboxylate, respectively. An equation of prediction was developed by applying a Principal Components Regression to infrared data of pectins (Danisco Ingredients, Braband, Denmark) which DM varied (DM: 11, 19, 28, 46, 71). The equation of prediction was characterised by a coefficient of determination  $r^2$  0.9914 and a standard error of calibration sec of 2.18%.

#### 2.2.4. Measurement of the absolute degree of blockiness (DBabs)

After enzymatic fingerprinting of the pectins with AnPGII (Slavov et al., 2009), the absolute degree of blockiness

was calculated from the amount of non-methylesterified monomer, dimer and trimer released by AnPGII and was expressed as a percentage of total GalA (Guillotin et al., 2005).

Pectins were diluted at 0.1% in 50 mmol l<sup>-1</sup> acetate buffer pH 4. Then 0.21 nkat AnPGII was added and incubation was carried out at 40 °C for 72 h. Further enzyme (0.21 nkat) was added at 24 and 48 h. Since the preferred substrate of endoPGII is polygalacturonic acid, the more blocky structure the pectin has, the more degradation products are obtained. The degradation products were measured by high performance anion exchange chromatography (HPAEC) at pH 13. HPAEC was performed using a column Carbobac PA-1 (2 × 50 mm, Dionex) at 25 °C and was eluted at 0.250 ml min<sup>-1</sup> with a gradient of sodium acetate. The oligosaccharides were detected by a pulsed amperometric detector. The GalA content of pectins was colorimetrically determined by the automated m-hydroxybiphenyl method (Thibault, 1979). The processivity expresses the multiple attack on a single chain that means the capacity of the enzyme to stay on the pectin chain for many catalytic events. Consequently it generates blocks of free galacturonic acids that are evaluated by DBabs.

### 2.2.5. Rheological measurements

Dynamic rheological measurements were performed at 30 °C using a stress-controlled rheometer (AR2000, TA instrument) equipped with a Peltier temperature controller and with a cone-plane device (40 mm diameter, 2° angle, gap 98 μm). The visco-elastic properties of pectin gels were characterised by measuring the storage ( $G'$ ) and loss moduli ( $G''$ ) over time during 48 h at a frequency of 1 rad s<sup>-1</sup>. Then mechanical spectra were obtained by measuring  $G'$  and  $G''$  over the frequency range 0.01–100 rad s<sup>-1</sup>.  $G'$  and  $G''$  values are given with a standard error of 50 Pa. All experiments were performed with low strain amplitude of 1%. It was checked that the stress applied was well within the linearity domain of visco-elasticity. To prevent evaporation of the solvent, the free surface of the sample was always covered with a thin layer of low-viscosity paraffin oil. Pectin and CaCl<sub>2</sub> solutions were pre-heated at 50 °C during 2 min. CaCl<sub>2</sub> solution was then added drop by drop under strong magnetic stirring. The mixture (final pectin concentration: 15 mg ml<sup>-1</sup>, final calcium concentration: 5 mmol l<sup>-1</sup>) was held at 50 °C under stirring for 1 min before PME addition (Aa-PME or O-PME, 72 μl, final concentration: 0.4 nkat ml<sup>-1</sup>). The mixture was transferred to the plate of the rheometer preheated at 50 °C.

**Table 2**  
Kinetic parameters of O-PME and Aa-PME.

References	Conditions	$K_m$ (mg ml <sup>-1</sup> )	$V_{max}$ (μmol min <sup>-1</sup> ml <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )
<i>Citrus sinensis</i> (Valencia) in this work	DM = 46% pH 6; 30 °C 50 mmol l <sup>-1</sup> MES	8	15.6
<i>Citrus sinensis</i> (Valencia) in this work	DM = 46% pH 6; 30 °C 50 mmol l <sup>-1</sup> MES 5 mmol l <sup>-1</sup> CaCl <sub>2</sub>	19.8	68.6
<i>Citrus sinensis</i> (Navel) (Versteeg, Rombouts, Spaansen, Pilnik, 1980)	DM = 62% pH 7; 30 °C 150 mmol l <sup>-1</sup>	0.083	
<i>Citrus sinensis</i> (Valencia) (Hou, Jeong, Walker, Wei, Marshall, 1997)	DM = 64% pH 7; 22 °C 100 mmol l <sup>-1</sup> NaCl	1.1	0.53
<i>Aspergillus aculeatus</i> in this work	DM = 46% pH 6; 30 °C	92.5	65.7
<i>Aspergillus aculeatus</i> in this work	DM = 46% pH 6; 30 °C 5 mmol l <sup>-1</sup> CaCl <sub>2</sub>	3.53	297
<i>Aspergillus aculeatus</i> (Christgau et al., 1996)	DM = 75% pH 4.6; 30 °C	27	

**Table 1**

Specific activity of O-PME and Aa-PME in the presence or the absence of 5 mmol l<sup>-1</sup> calcium.

Origin of PME	Specific activity (nkat mg <sup>-1</sup> powder)	
	Without calcium	In the presence of calcium
Aa-PME	37.7 ± 2.5	126.6 ± 2.3
O-PME	31.9 ± 2.7	42.3 ± 4.8

## 3. Results

### 3.1. Determination of kinetic parameters of Aa-PME and O-PME

As the pH and temperature chosen for these experiments were not Aa-PME and O-PME optima, specific activity and kinetic parameters were investigated in the conditions applied in this study.

The specific activity was determined in the presence and the absence of calcium (Table 1). As already observed by Slavov et al. (2009) on HM pectin, Aa-PME specific activity was higher in the presence than in the absence of calcium. In the case of O-PME a slight increase in the specific activity was noticed when adding calcium.

$K_m$  and  $V_{max}$  of O-PME and Aa-PME were measured (Table 2). The Michaelis constant ( $K_m$ ) allows quantifying the affinity between the enzyme and its substrate, whereas  $V_{max}$  is the maximum velocity of the enzyme. These two parameters evolve conversely. An efficient enzyme can be defined by a low  $K_m$  in association with a high  $V_{max}$ . In comparison with kinetic parameters found by Christgau et al. (1996) without calcium, our parameters reflected a lower affinity for pectic chains and a lower maximum rate of catalysis of Aa-PME. In the presence of calcium,  $K_m$  and  $V_{max}$  decreased compared to the values characterising the same system without calcium. Thus, calcium ions enhanced the affinity of Aa-PME for pectins and decreased the maximum velocity.

For O-PME, the  $K_m$  found was 10 fold higher and  $V_{max}$  was slightly higher than the values in the literature, showing how these values depend on reaction parameters such as temperature, salt concentration, pH of the reaction medium and pectin structure. In the presence of 5 mmol l<sup>-1</sup> calcium, an increase of  $K_m$  and  $V_{max}$  was noticed. This means that calcium ions decreased O-PME affinity for pectic chains but increased its demethylation velocity.

### 3.2. Characterisation of the demethylation rate of Aa-PME and O-PME in the presence or not of calcium

The DM of MM pectin incubated with PMEs was monitored during 24 h in the presence or not of 5 mmol l<sup>-1</sup> of calcium. With

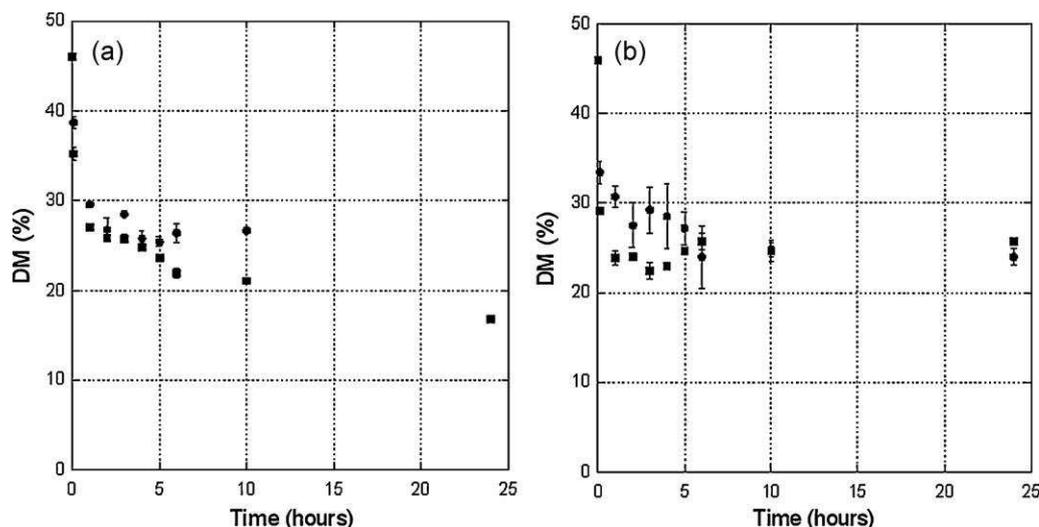


Fig. 1. Evolution of DM during Aa-PME action (a) and O-PME action (b) on MM pectin ( $15 \text{ mg ml}^{-1}$ ) with (squares) or without (circles)  $5 \text{ mmol l}^{-1}$  calcium.

Aa-PME (Fig. 1a), in the absence of calcium, the DM dropped down in the first hour from 46% to 27%, and then decreased until 24 h to reach a final DM of 16%. With O-PME (Fig. 1b), the same DM drop was observed in the beginning of the incubation. Afterward the decrease stopped around 6 h at a DM of 24% that remained rather constant until 24 h. Indeed, Aa-PME can de-esterify MM pectin more extensively than O-PME. In the presence of calcium, for both PMEs, a slight increase in the demethylation rate was observed (Fig. 1a and b). This increase during the first hour of the kinetics did not affect the final respective DM, as similar values with and without calcium were found after 24 h of incubation.

### 3.3. Characterisation of the demethylation pattern by Aa-PME and O-PME in the presence or not of calcium

The initial DBabs of MM pectin was  $16\% \pm 0.41$ . It was further monitored during 24 h on MM pectin incubated with PMEs in the presence or not of  $5 \text{ mmol l}^{-1}$  of calcium (Fig. 2). The higher the DBabs is, the most blocky the methyl distribution is.

For both PMEs and both conditions, the DBabs increased rather quickly until 6 h then the increasing rate slowed down. This deceleration was well marked for Aa-PME kinetics.

As expected, O-PME acted in a more blocky way than Aa-PME in the absence of calcium. This difference between the two enzymes was lowered in the presence of calcium. Slight differences of the methyl distribution were found between the pattern of demethylation of Aa-PME in the presence (DBabs = 42.9%) or in the absence of calcium (DBabs = 37.8%) after 6 h (Fig. 2a). Aa-PME tended to act in a more blocky way in the presence of calcium. On the opposite, with O-PME, the methyl distribution that was expected to be more random, exhibited a higher DBabs in the absence of calcium (Fig. 2b). After 6 h, the DBabs reached 48.1% and 35.4% in the absence or presence of calcium, respectively. This gap was kept constant after 24 h, where the DBabs was 63.3% and 51.1%, without calcium and with calcium, respectively. After 24 h action in the presence of calcium, the DBabs induced by O-PME and Aa-PME were close to each other. Then, in the presence of calcium, O-PME hydrolyses methylesters in a more random way and generates shorter blocks than in the absence of calcium.

### 3.4. Comparison of rheological behaviour of calcium-pectin systems resulting from the action of O-PME and Aa-PME in situ

MM pectin (final concentration,  $15 \text{ mg ml}^{-1}$ ) was mixed with calcium (final concentration,  $5 \text{ mmol l}^{-1}$ ) at  $50^\circ\text{C}$ . Before pouring

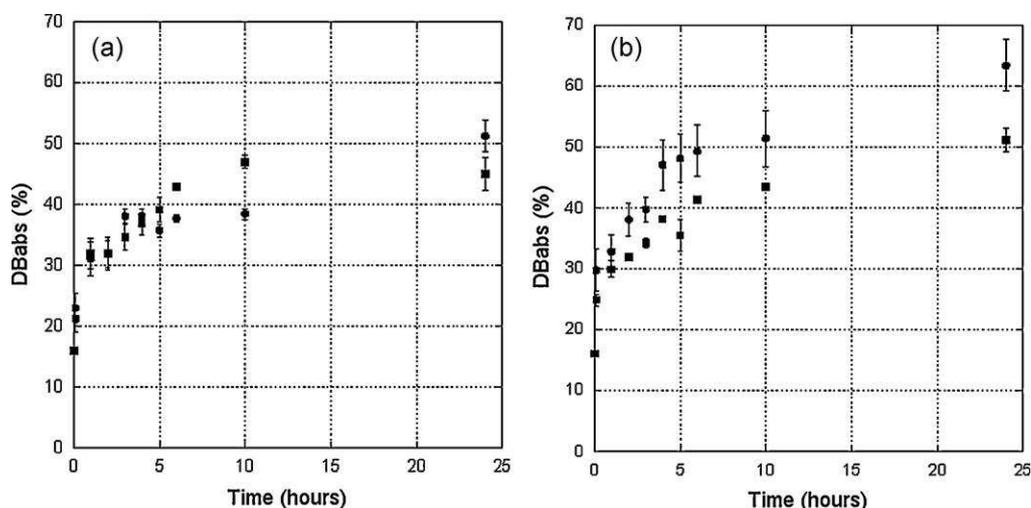


Fig. 2. Evolution of DBabs during Aa-PME action (a) and O-PME action (b) on MM pectin ( $15 \text{ mg ml}^{-1}$ ) with (squares) or without (circles)  $5 \text{ mmol l}^{-1}$  calcium.

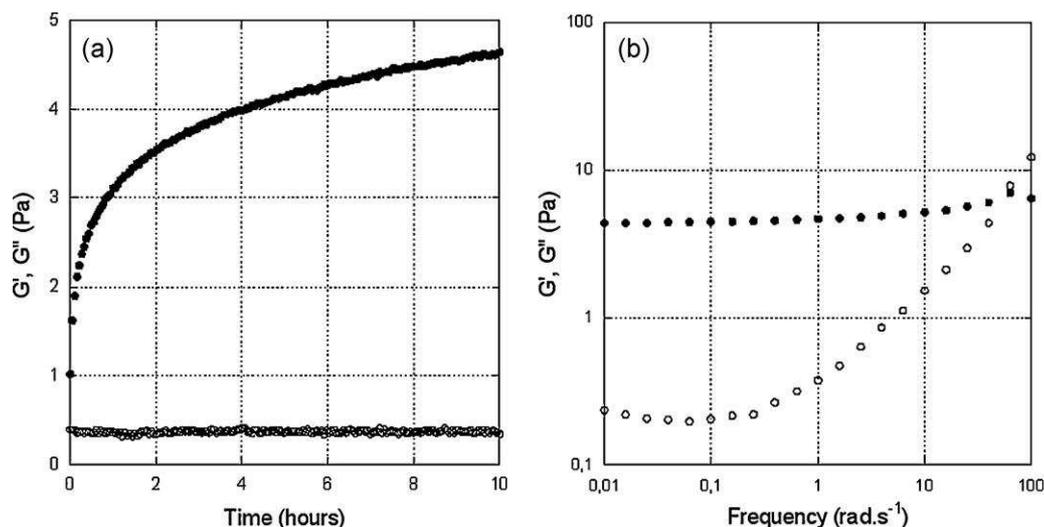


Fig. 3. Kinetics (a) and mechanical spectra (b) for MM pectin (15 mg ml<sup>-1</sup>) in the presence of 5 mmol l<sup>-1</sup> calcium.

the mixture on the rheometer plate, PME was added. The evolution of rheological parameters was followed by measuring  $G'$  and  $G''$  as a function of time at 1 rad s<sup>-1</sup>.

In the absence of PME, the storage modulus  $G'$  of MM pectin gel increased slowly with time until a value of 4.6 Pa (Fig. 3a). Then the mechanical spectra displayed the typical characteristics of a weak physical gel and exhibited a storage modulus of 4.6 Pa at 0.01 rad s<sup>-1</sup> (Fig. 3b).  $G'$  was independent of frequency at least at low frequency and was over  $G''$ .

In the presence of both O-PME and calcium,  $G'$  increased rapidly as a function of time. Gelation kinetics was characteristic of those of LM pectin (Fig. 4a). After 48 h, the equilibrium was reached with a modulus of 3078 Pa. Then, the mechanical spectra exhibited a  $G'$  nearly independent of frequency on all frequency range and largely over  $G''$ . These parameters characterised a strong gel behaviour with a  $G'$  of 2964 Pa at 0.01 rad s<sup>-1</sup> (Fig. 4b).

In the presence of calcium, Aa-PME showed a different behaviour. Its action on pectin led to a slow gelation kinetics (Fig. 5a).  $G'$  increased slowly, in the first 10 h and the slope increased afterwards. Then, the equilibrium took a long time to be reached. After 48 h, the mechanical spectrum characterised a strong gel with a storage modulus of 2762 Pa at 0.01 rad s<sup>-1</sup> (Fig. 5b).

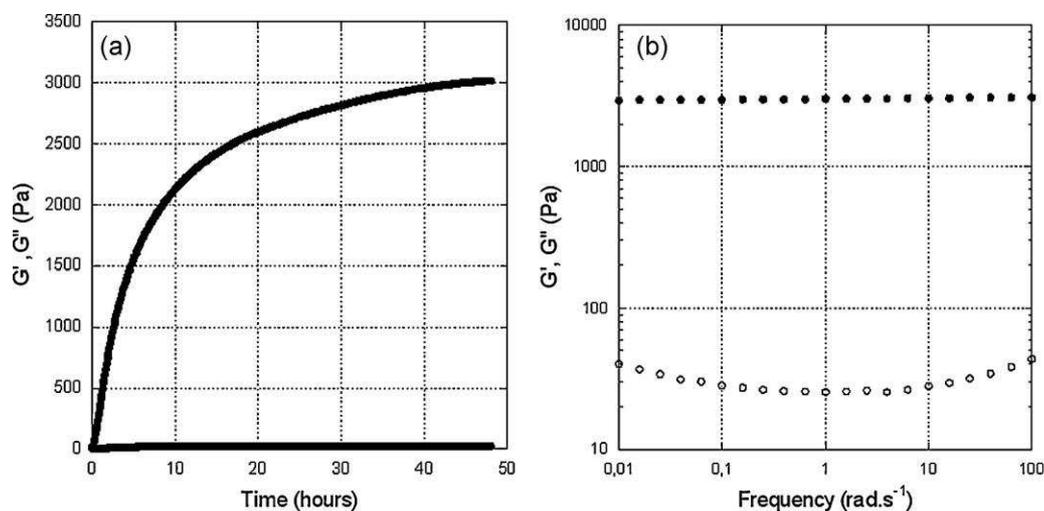


Fig. 4. Kinetics (a) and mechanical spectra (b) for MM pectin (15 mg ml<sup>-1</sup>) incubated with O-PME (0.4 nkat ml<sup>-1</sup>) in the presence of 5 mmol L<sup>-1</sup> calcium.

The rheological characterisation of these mixtures showed differences in the kinetics of action of the two enzymes: after 24 h, Aa-PME-formed gel exhibited a  $G'$  of 1559 Pa whereas O-PME-formed gel reached a  $G'$  of 2699 Pa. On the contrary after 48 h, both systems behaved as strong gels with rather similar final moduli, 2929 Pa for Aa-PME and 3049 Pa for O-PME.

However, the relative importance of viscous and elastic contributions to gel behaviour was slightly different between the two systems, but very different from the one obtained without enzymes. This was indicated by calculating the ratio of  $G''$  over  $G'$ , named the loss tangent ( $\tan \delta$ ). A higher viscous component was observed in the Aa-PME gel ( $\tan \delta = 0.02$  at 0.01 rad s<sup>-1</sup>) than in the O-PME gel ( $\tan \delta = 0.01$  at 0.01 rad s<sup>-1</sup>). The gel formed after 24 h in the presence of O-PME was more elastic, whereas the DM and DBabs were higher than the one obtained with Aa-PME.

## 4. Discussion

### 4.1. Influence of calcium on PME activity

In our experimental conditions, an increase of specific activity was observed for both enzymes in the presence of CaCl<sub>2</sub>. The increase is well marked for Aa-PME and slighter for O-PME.

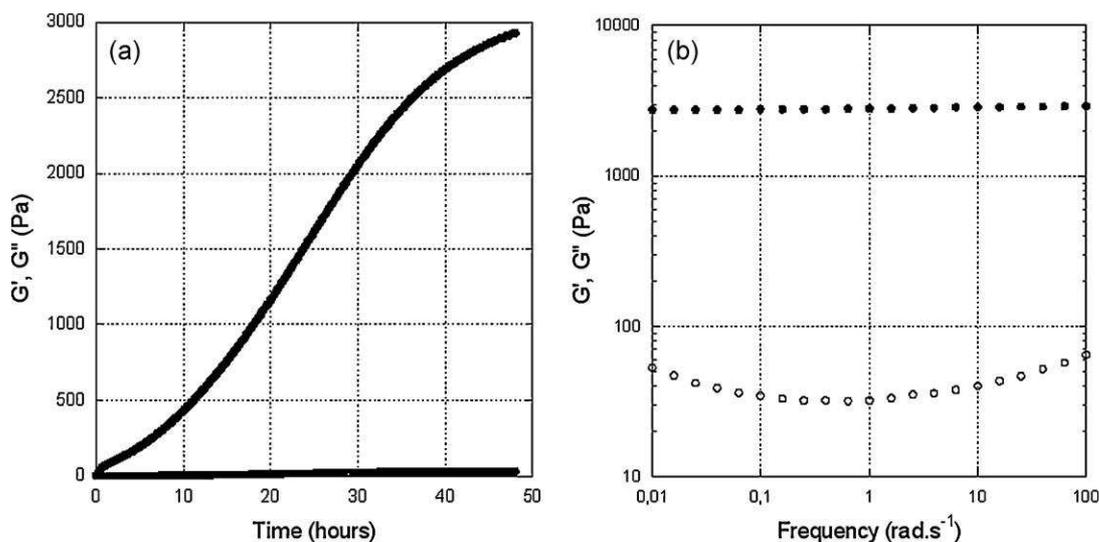


Fig. 5. Kinetics (a) and mechanical spectra (b) for MM pectin ( $15 \text{ mg ml}^{-1}$ ) incubated with Aa-PME ( $0.4 \text{ nkat ml}^{-1}$ ) in the presence of  $5 \text{ mmol l}^{-1}$  calcium.

The activity of plant and fungal PME is known to be enhanced by metal ions. Some plant PMEs referred to as “salt dependant” are unable to hydrolyse methylester in the absence of salt (Cameron et al., 2003). The commercial PME from orange peel has been classified as a thermolabile salt independent (type I) PME (Savary et al., 2002). However, in the presence of NaCl (1.2% w/v), the optimum pH shifted to a neutral range (about 6) instead of 9 in the absence of NaCl (Savary et al., 2002). Moreover, low concentration of calcium ions increases the rate of demethylation of O-PME (Charnay, Nari, & Noat, 1992). Experiments in the presence of methylene blue have been performed to investigate this activation on a PME from soybean (Nari, Noat, & Ricard, 1991). The methylene blue can mimic the interaction between calcium ions and free galacturonic acid. In the range of calcium ion concentration where an enhancement of the de-esterification is observed, methylene blue has the same effect, suggesting that the interaction between ions and pectin is predominant to favour the activity. Moreover, it has been shown that polygalacturonic acid behaves as a competitive inhibitor of the reaction by trapping PME on blocks of free carboxyl groups (Fayyaz, Asbi, Ghazali, Man, & Jinap, 1995; Maldonado, Strasser de Saad, & Callieri, 1994; Nari et al., 1991). The activation observed in the presence of cations may be due to the interactions between free galacturonic acids and cations that can release the PME from free galacturonic acid. However, at high concentration, calcium ions act as a competitive inhibitor, decreasing the enzyme affinity without changing the catalysis rate (Charnay et al., 1992). Indeed, a free carboxylate group adjacent to the ester bond is required to initiate plant PME activity. Massiot, Perron, Baron, and Drilleau (1997) reported that O-PME could not act on totally methylesterified apple pectin. So at high calcium concentration, these required free carboxylate groups could be masked by calcium ions that inhibit enzyme reaction.

This inhibition may also exist for Aa-PME because the presence of one or two free galacturonic acids is preferred at the active-site of *A. niger* PME (van Alebeek, van Scherpenzeel, Beldman, Schols, & Voragen, 2003). Indeed, *A. niger* PME is highly similar to Aa-PME, so their behaviour may be close (Christgau et al., 1996). However, the possible action of *A. niger* PME on totally methylesterified galacturonic acid zone from apple pectins (Massiot, Perron, Baron, & Drilleau, 1997) show that a free galacturonic acid is not required for the enzyme to bind to its substrate. An increase of 150% of Aa-PME activity on HM pectin was already observed by Christgau et al. (1996) in the presence of  $10 \text{ mmol l}^{-1}$  of calcium.

Then, in our system, an interaction divalent cations – pectin might enhance the activity of Aa-PME and O-PME by screening negative charges from galacturonic acid. But this theory alone does not explain the role of cations on PME activity. If divalent cations enhance activity only by screening negative charges, the same activation should have been observed with sufficient amount of monovalent cations (Leiting & Wicker, 1997).

#### 4.2. Modification in the demethylation pattern

By comparing the pattern of demethylation of pectin de-esterified in the presence or not of calcium, we observed that O-PME generates smaller blocks on MM pectin with than without calcium.

A reduction in the length of blocks generated by O-PME action in the presence of calcium was already observed by capillary electrophoresis on HM pectin (Vincent et al., 2009). The same authors have linked these results to the microstructure of pectin gels investigated by microrheology (Vincent & Williams, 2009). Two kinds of gels have been obtained, one network done of semi-flexible polymers, the other one composed of flexible polymers. The flexible one is obtained by de-esterification of HM pectin by a plant PME in the presence of calcium whereas the semi-flexible one is obtained by calcium addition after enzymatic de-esterification with the same enzyme. The length of the generated blocks was short in the flexible network. Each binding calcium pectin zone had only the minimum length for ensuring stability at a pre-requisite temperature (Vincent & Williams, 2009). From the results, it can be hypothesized that the presence of calcium ions could generate a steric hindrance for the interaction between PME and pectin. A junction zone is formed each time enough contiguous free galacturonic acids are liberated by O-PME's action. These junction zones can create steric hindrance, and trigger O-PME uncoupling. This theory concurs with the decrease of O-PME affinity for pectins in presence of calcium reported here and the competitive inhibitor role of calcium reported by Charnay et al. (1992).

The decrease of the block length has also been observed when O-PME acts in an acidic medium suggesting a modification in the O-PME mode of action according to pH (Cameron, Luzio, Goodner, & Williams, 2008). This observation has also been reported on apple PME (Denès et al., 2000).

In the present study, the chosen pH is 6. pH value seems to have no effect on Aa-PME processivity as no differences have been found between the demethoxylation pattern at pH 4.5 and 8 (Duvetter

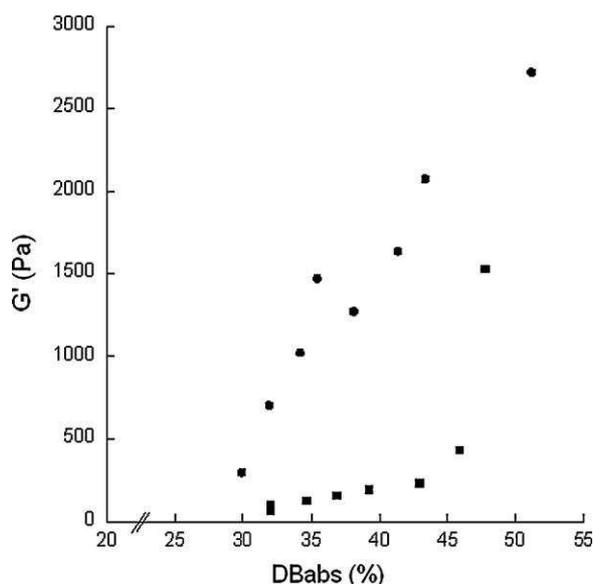


Fig. 6. The storage modulus ( $G'$ ) as a function of DBabs for the kinetics of Aa-PME (squares) and O-PME (circles) in the presence of  $5 \text{ mmol l}^{-1}$  calcium.

et al., 2006). On the opposite, it could lead to an intermediate degree of processivity for O-PME.

Aa-PME led to longer blocks on HM pectin in the presence than in the absence of calcium at pH 6 (Slavov et al., 2009). Indeed, Aa-PME mode of action is giving rise to short blocks of de-esterified residues distributed all over the chain (Fraeye et al., 2007). The block size can be increased by several successive binding as suggested for plant PME (Vincent & Williams, 2009) or by inducing several catalytic events along the chain. Thus, this hypothesis agrees with the increase of Aa-PME affinity for pectin in the presence of calcium.

The influence of calcium on Aa-PME demethylation pattern was not observed on MM pectin. This difference might be due to the lower DM of the pectin used in the present work. The appearance of longer blocks depends on the initial degree of methylation. Christensen, Nielsen, Kreiberg, Rasmussen, and Mikkelsen (1998) measured the  $K_m$  of an orange PME (*Citrus sinensis* Navelina) in the presence of pectin with different DMs (Christensen et al., 1998). They reported an increase in the affinity concomitantly with an increase of DM. Here, the MM pectin used has a relatively low DM, which allows a weak previous gelation in the presence of calcium. It means that pectin with a DM of 46 already have blocks of free galacturonic acid long enough to allow junction formation thanks to calcium ionic linkages, as shown by the initial value of DBabs of 16%. The probability of having contiguous free galacturonic acid is higher with DM 46% than with DM 71%. Moreover, in the presence of calcium, part of the starting points for PME demethylation might be unavailable for the enzyme as they are involved in ionic interactions with calcium. In the case of HM pectin, less galacturonic acid are involved in such interaction and thus available for enzyme action. Hence, the modification of PME behaviour might be a consequence of several factors: a modification of the electrostatic potential, a steric hindrance provoked by the formation of junction zone and destabilizing the PME, less accessibility to the starting sites required for demethylation.

#### 4.3. Relationship between gel properties and pectin structures

The systems formed by Aa-PME or O-PME in the presence of MM pectin and calcium exhibited differences in their evolution into gels. Rheological measurements showed differences in the gel strength after 24 h. O-PME-formed gel exhibited a  $G'$  value 1.7

fold higher than Aa-PME's one whereas the pectin DM is higher than the one obtained for pectin after action of Aa-PME. This phenomenon, already observed with HM pectin (Slavov et al., 2009) can be explained by the differences in DBabs values. Indeed, DBabs seems to better correlate with elastic modulus than the DM does (Fraeye et al., 2010a; Ström et al., 2007). For 24 h of demethylation, the DBabs reached with O-PME is higher than the one obtained with Aa-PME. The delayed gelation kinetics is observed when Aa-PME acts on MM pectin in the presence of calcium and not with O-PME. Even with this delayed gelation, rearrangements occur in the network with Aa-PME and lead to close final characteristics of the gel. Moreover, a linear relation exists between DBabs and the gel strength when O-PME acts on MM pectin in the presence of calcium (Fig. 6). On the contrary, in the presence of Aa-PME, this relation can be divided in two parts: a linear relation at the beginning of the kinetics with a different slope than the one obtained with O-PME, and another part where the values tend to join O-PME's ones. These observations suggest the appearance of a change in Aa-PME kinetics, which can modify the evolution of the gel strength.

## 5. Conclusion

O-PME in the presence of calcium exhibited less processivity on MM pectins than on HM pectin. On the opposite, the effect of calcium on the pattern of demethylation of MM pectin with Aa-PME was reduced. The presence of calcium modulates O-PME activity on MM pectins but may be not the only origin for the modifications observed in PME's behaviour. As already suggested, gel formation can generate physical constraint for PME influencing its diffusion and inducing changes in its activity. The influence of the environment state on the diffusion of PME will be analysed to investigate this issue.

## Acknowledgments

We thank Marie-Jeanne Crépeau and Sylvie Durand for skilful technical assistance and Bernard Quémener for all HPAEC experiments.

## References

- Anthon, G. E., & Barrett, D. M. (2004). Comparison of three colorimetric reagents in the determination of methanol with alcohol oxidase. Application to the assay of pectin methyl esterase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(12), 3749–3753.
- Arltoft, D., Madsen, F., & Ipsen, R. (2008). Relating the microstructure of pectin and carrageenan in dairy desserts to rheological and sensory characteristics. *Food Hydrocolloids*, 22(4), 660–673.
- Cameron, R. G., Luzio, G. A., Goodner, K., & Williams, M. A. K. (2008). Demethylation of a model homogalacturonan with a salt-independent pectin methyl esterase from citrus. I. Effect of pH on demethylated block size, block number and enzyme mode of action. *Carbohydrate Polymers*, 71(2), 287–299.
- Cameron, R. G., Savary, B. J., Hotchkiss, A. T., Fishman, M. L., Chau, H. K., Baker, R. A., et al. (2003). Separation and characterization of a salt-dependent pectin methyl esterase from *Citrus sinensis* Var. Valencia fruit tissue. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(7), 2070–2075.
- Catoire, L., Pierron, M., Morvan, C., Hervé du Penhoat, C., & Goldberg, R. (1998). Investigation of the action patterns of pectinmethyl esterase isoforms through kinetic analyses and NMR spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry*, 273(50), 33150–33156.
- Charnay, D., Nari, J., & Noat, G. (1992). Regulation of plant cell-wall pectin methyl esterase by polyamines "Interactions with the effects of metal ions". *European Journal of Biochemistry*, 205(2), 711–714.
- Christensen, T. M. I. E., Nielsen, J. E., Kreiberg, J. D., Rasmussen, P., & Mikkelsen, D., Jr. (1998). Pectin methyl esterase from orange fruit: Characterization and localization by in-situ hybridization and immunohistochemistry. *Planta*, 206(4), 493–503.
- Christgau, S., Kofod, L. V., Halkier, T., Andersen, L. N., Dörreich, K., Hockauf, M., et al. (1996). Pectin methyl esterase from *Aspergillus aculeatus*: Expression cloning in yeast and characterisation of the recombinant enzyme. *Biochemical Journal*, 319, 705–712.

- Denès, J.-M., Baron, A., Renard, C. M. G. C., Péan, C., & Drilleau, J.-F. (2000). Different action patterns for apple pectin methyl esterase at pH 7.0 and 4.5. *Carbohydrate Research*, 327(4), 385–393.
- Duvetter, T., Fraeye, I., Sila, D. N., Verlent, I., Smout, C., Hendrickx, M., et al. (2006). Mode of de-esterification of alkaline and acidic pectin methyl esterases at different pH conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7825–7831.
- Fayyaz, A., Asbi, B. A., Ghazali, H. M., Man, Y. B. C., & Jinap, S. (1995). Kinetics of papaya pectinesterase. *Food Chemistry*, 53(2), 129–135.
- Fraeye, I., Colle, I., Vandevenne, E., Duvetter, T., Van Buggenhout, S., Moldenaers, P., et al. (2010). Influence of pectin structure on texture of pectin–calcium gels. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(2), 401–409.
- Fraeye, I., Doungla, E., Duvetter, T., Moldenaers, P., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2009). Influence of intrinsic and extrinsic factors on rheology of pectin–calcium gels. *Food Hydrocolloids*, 23(8), 2069–2077.
- Fraeye, I., Duvetter, T., Doungla, E., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2010). Fine-tuning the properties of pectin–calcium gels by control of pectin fine structure, gel composition and environmental conditions. *Trends in Food Science & Technology*, 21(5), 219–228.
- Fraeye, I., Duvetter, T., Verlent, I., Ndaka Sila, D., Hendrickx, M., & Van Loey, A. (2007). Comparison of enzymatic de-esterification of strawberry and apple pectin at elevated pressure by fungal pectinmethyl esterase. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(1), 93–101.
- Fries, M., Ihrig, J., Brocklehurst, K., Shevchik, V. E., & Pickersgill, R. W. (2007). Molecular basis of the activity of the phytopathogen pectin methyl esterase. *The EMBO Journal*, 26(17), 3879–3887.
- Guillotin, S. E., Bakx, E. J., Boulenguer, P., Mazoyer, J., Schols, H. A., & Voragen, A. G. J. (2005). Populations having different GalA blocks characteristics are present in commercial pectins which are chemically similar but have different functionalities. *Carbohydrate Polymers*, 60(3), 391–398.
- Hotchkiss, A. T., Savary, B. J., Cameron, R. G., Chau, H. K., Brouillette, J., Luzio, G. A., et al. (2002). Enzymatic modification of pectin to increase its calcium sensitivity while preserving its molecular weight. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10), 2931–2937.
- Hou, W. N., Jeong, Y., Walker, B. L., Wei, C.-I., & Marshall, M. R. (1997). Isolation and characterization of pectinesterase from Valencia Orange. *Journal of Food Biochemistry*, 21(3), 309–333.
- Jensen, S., Rolin, C., & Ipsen, R. (2010). Stabilisation of acidified skimmed milk with HM pectin. *Food Hydrocolloids*, 24(4), 291–299.
- Leiting, V. A., & Wicker, L. (1997). Inorganic cations and polyamines moderate pectinesterase activity. *Journal of Food Science*, 62(2), 253–255.
- Limberg, G., Körner, R., Buchholt, H. C., Christensen, T. M. I. E., Roepstorff, P., & Mikkelsen, J. D. (2000). Analysis of different de-esterification mechanisms for pectin by enzymatic fingerprinting using endopectin lyase and endopolygalacturonase II from *A. niger*. *Carbohydrate Research*, 327(3), 293–307.
- Lionetti, V., Raiola, A., Camardella, L., Giovane, A., Obel, N., Pauly, M., et al. (2007). Overexpression of pectin methyl esterase inhibitors in *Arabidopsis* restricts fungal infection by botrytis cinerea. *Plant Physiology*, 143(4), 1871–1880.
- Luzio, G. A., & Cameron, R. G. (2008). Demethylation of a model homogalacturonan with the salt-independent pectin methyl esterase from citrus. Part II. Structure–function analysis. *Carbohydrate Polymers*, 71(2), 300–309.
- Maldonado, M. C., Strasser de Saad, A. M., & Callieri, D. (1994). Purification and characterization of pectin esterase produced by a strain of *Aspergillus niger*. *Current Microbiology*, 28(4), 193–196.
- Massiot, P., Perron, V., Baron, A., & Drilleau, J.-F. (1997). Release of methanol and depolymerization of highly methyl esterified apple pectin with an endopolygalacturonase from *Aspergillus niger* and pectin methyl esterases from *A. niger* or from orange. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 30(7), 697–702.
- Messiaen, J., & Van Cutsem, P. (1994). Pectic signal transduction in carrot cells: Membrane, cytosolic and nuclear responses induced by oligogalacturonides. *Plant and Cell Physiology*, 35(4), 677–689.
- Min, B., Bae, I. Y., Lee, H. G., Yoo, S.-H., & Lee, S. (2010). Utilization of pectin-enriched materials from apple pomace as a fat replacer in a model food system. *Bioresource Technology*, 101(14), 5414–5418.
- Nari, J., Noat, G., & Ricard, J. (1991). Pectin methyl esterase, metal ions and plant cell-wall extension. Hydrolysis of pectin by plant cell wall pectin methyl esterase. *Biochemical Journal*, 279, 343–350.
- O'Brien, A. B., Philp, K., & Morris, E. R. (2009). Gelation of high-methoxy pectin by enzymic de-esterification in the presence of calcium ions: A preliminary evaluation. *Carbohydrate Research*, 344(14), 1863–1871.
- Portenoy, R. K., Burton, A. W., Gabrail, N., & Taylor, D. (2010). A multicenter, placebo-controlled, double-blind, multiple-crossover study of fentanyl pectin nasal spray (FPNS) in the treatment of breakthrough cancer pain. *Pain*, 151(3), 617–624.
- Ridley, B. L., O'Neill, M. A., & Mohnen, D. (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, 57(6), 929–967.
- Sakamoto, T., Bonnin, E., Quemener, B., & Thibault, J.-F. (2002). Purification and characterisation of two exo-polygalacturonases from *Aspergillus niger* able to degrade xylogalacturonan and acetylated homogalacturonan. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*, 1572(1), 10–18.
- Savary, B. J., Hotchkiss, A. T., & Cameron, R. G. (2002). Characterization of a salt-independent pectin methyl esterase purified from Valencia orange peel. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(12), 3553–3558.
- Slavov, A., Garnier, C., Crépeau, M.-J., Durand, S., Thibault, J.-F., & Bonnin, E. (2009). Gelation of high methoxy pectin in the presence of pectin methyl esterases and calcium. *Carbohydrate Polymers*, 77(4), 876–884.
- Ström, A., Ribelles, P., Lundin, L., Norton, I., Morris, E. R., & Williams, M. A. K. (2007). Influence of pectin fine structure on the mechanical properties of calcium–pectin and acid–pectin gels. *Biomacromolecules*, 8(9), 2668–2674.
- Thibault, J.-F. (1979). Automatisation du dosage des substances pectiques par la méthode au méta-hydroxydiphényl. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 12, 247–251.
- van Alebeek, G.-J. W. M., van Scherpenzeel, K., Beldman, G., Schols, H. A., & Voragen, A. G. J. (2003). Partially esterified oligogalacturonides are the preferred substrates for pectin methyl esterase of *Aspergillus niger*. *Biochemical Journal*, 372(1), 211–218.
- Versteeg, C., Rombouts, F. M., Spaansen, C. H., & Pilnik, W. (1980). Thermostability and orange juice cloud destabilizing properties of multiple pectinesterases from orange. *Journal of Food Science*, 45(4), 969–971.
- Vincent, R., Cucheval, A., Hemar, Y., & Williams, M. (2009). Bio-inspired network optimization in soft materials: Insights from the plant cell wall. *The European Physical Journal E: Soft Matter and Biological Physics*, 79–87. Springer Berlin/Heidelberg.
- Vincent, R. R., & Williams, M. A. K. (2009). Microrheological investigations give insights into the microstructure and functionality of pectin gels. *Carbohydrate Research*, 344(14), 1863–1871.
- Voragen, A., Coenen, G.-J., Verhoef, R., & Schols, H. (2009). Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Structural Chemistry*, 20(2), 263–275.
- Willats, W. G. T., McCartney, L., Mackie, W., & Knox, J. P. (2001). Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Molecular Biology*, 47(1), 9–27.
- Wolf, S., Mouille, G., & Pelloux, J. (2009). Homogalacturonan methyl-esterification and plant development. *Molecular Plant*, 2(5), 851–860.







## **Diffusion multi-échelle de Pectine Méthylesterases dans différents systèmes pectiques. Conséquences biochimiques et structurales.**

### Résumé :

Les pectines sont des polysaccharides de la paroi végétale couramment utilisés en industrie comme agent gélifiant ou stabilisant. Les pectines méthylesterases (PME) modifient la capacité de gélification des pectines en présence de calcium. L'action des PME en présence de pectine et de calcium permet l'obtention d'un système gélifié. Différentes cinétiques de gélification peuvent être observées selon l'origine de la PME utilisée. Dans ce système, l'action de l'enzyme induit la structuration du milieu qui à son tour influencerait sur le comportement de l'enzyme. Afin d'appréhender ces phénomènes, l'action des PME sur les pectines ainsi que leur diffusion ont été étudiées dans différents systèmes : non structuré (solution de pectine), en cours de structuration (mélange pectine-calcium), et préalablement structuré (gel). Le mode d'action de PME d'origines végétale ou fongique a été étudié en caractérisant les paramètres catalytiques et en mesurant les caractéristiques biochimiques des pectines obtenues après action de l'une ou l'autre des PME. La présence de calcium influence différemment le comportement des deux enzymes sur la pectine, selon leur origine. Différentes techniques macroscopiques et microscopiques (Spectroscopie de Corrélation de Fluorescence, Fluorescence Recovery After Photobleaching) ont été mises en œuvre pour caractériser la diffusion. La comparaison entre les échelles micro- et macroscopique a permis de mettre en évidence des différences de comportement de diffusion des deux PME vis-à-vis de l'environnement et de leur origine, qui ont été reliées à l'activité et au mode d'action des PME.

Mots clés : Gel ; degré de méthylation ; milieu hétérogène ; cinétique de gélification

## **Multi-scales diffusion of Pectin methylesterases in different pectic environments. Structural and biochemical consequences.**

### Abstract :

Pectins are plant cell wall polysaccharides and are commonly used in the food industry as gelling and stabilizing agents. Pectin methylesterases (PME) can alter pectin structure and transform their gelling properties in the presence of calcium. The action of PME in the presence of calcium can lead to a gelified system. Differences in the gelation kinetics can be observed according to the origin of the PME used. In this system, action of the enzyme leads to environment structuring which could thereafter affect the enzyme behavior. In order to grasp this phenomenon, PME's action on pectin and their diffusion have been studied in different environments: unstructured medium (pectin solution), in process structuring medium (pectin-calcium mixture), and structured medium. The modes of action of plant and fungal PME have been studied by determining their catalytic parameters and by measuring pectins biochemical characteristics after the action of the two PME. The presence of calcium affects in a different way PME's behavior according to their origin. Different macro- and microscopic techniques (Fluorescence Correlation Spectroscopy, Fluorescence Recovery After Photobleaching) have been used to characterize PME's diffusion. The comparison between micro- and macroscopic scale showed differences in the diffusion behavior of the two PME towards the environment and their origins. These observations have been linked to activity and mode of action of PME according to the environment.

Keywords : gel ; degree of methylation, gelation kinetics