



## Université de Limoges

Ecole Doctorale n° 258 Sciences-Technologie-Santé

### *Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles*

*Faculté des Sciences et Techniques*

Mémoire de Thèse présenté  
pour obtenir le grade de  
Docteur de l'Université de Limoges

**Discipline : *Chimie appliquée - Chimie des Substances Naturelles***

*Présentée par*

**Véronique BRUDIEUX**

*Soutenance programmée le 16 juillet 2007*

**Extraction, modification enzymatique et caractérisation chimique de nouvelles structures pectiques. Application de la relation structure / activité à la dermocosmétique.**

**Directeurs de Thèse :** M. Vincent GLOAGUEN, Maître de Conférences-HDR  
M. Pierre KRAUSZ, Professeur

**Rapporteurs**

**Henri MORVAN, Professeur**

Université d'Artois

**Philippe MICHAUD, Professeur**

Université Blaise Pascal

**Examineurs**

**Brigitte CLOSS, Docteur**

Société SILAB

**Pierre KRAUSZ, Professeur**

Université de Limoges

**Vincent GLOAGUEN, Maître de Conférences**

Université de Limoges

**Invité**

**Jacques CHRISTEN, Docteur**

Directeur de l'Incubateur du Limousin

## Remerciements

Avant de commencer la présentation de ce travail, j'ai le plaisir de remercier toutes les personnes qui ont contribué de près comme de loin à son aboutissement.

Je remercie le directeur du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles Professeur *Pierre Krausz*, pour m'y avoir accueillie. Je vous remercie de m'avoir soutenu en plusieurs occasions qui ne sont pas limitées à l'aspect scientifique de mon travail.

Merci à Vincent Gloaguen d'avoir encadré ce travail. Je te remercie vivement pour ton esprit critique et ta rigueur en matière de rédaction. Ta passion pour l'analyse des polysaccharides ont largement contribué à l'évolution de ce projet.

J'adresse également tous mes remerciements aux lecteurs attentifs de ce manuscrit, Monsieur Philippe MICHAUD, Professeur à l'Université de Clermont ferrand et Monsieur Henri Morvan, Professeur à l'Université d'Artois, qui ont accepté d'être rapporteurs de ce travail, et à Monsieur Jacques Christen, Directeur de l'incubateur du limousin, qui a participé ce jury.

Je tiens à remercier chaleureusement Rachida Zerrouki pour le soutien permanent qu'elle m'a accordé au cours de ces trois ans. Je vous remercie pour votre écoute et votre disponibilité.

Je voudrais remercier également Danièle Lejolly de l'intérêt et du temps qu'elle a accordé à ce travail. Soyez assuré de toute ma reconnaissance pour avoir éclairé mes idées concernant les polysaccharides. Merci pour votre disponibilité.

Merci encore à Monsieur Robert Granet pour m'avoir fait partager ses compétences et ses conseils avisés.

J'adresse tous mes remerciements à Brigitte Closs, Directrice du département de recherche et développement de SILAB, pour avoir encadré une partie de mon travail, et m'avoir fait bénéficier de toute son aide. Merci pour le temps qu'elle m'a généreusement consacré.

Je remercie l'entreprise SILAB de m'avoir accueilli et soutenu durant l'élaboration de cette thèse.

Je suis très reconnaissante à Monsieur Philippe Bressolier de m'avoir permis d'effectuer quelques essais en CPG-SM et je le remercie également pour ses conseils.

Je tiens enfin à remercier Karine Cleries, Michelle Constantin et Valérie Magliulo, ainsi que tous les doctorants du LCSN pour leur bonne humeur, pour leur soutien et leur aide. Un merci tout particulier à Fabienne, Charlotte, Stéphanie, Géraldine, Benoit, Virginie, qui ont partagé avec moi les moments les plus difficiles, mais aussi les meilleurs.

Je remercie mes parents et ma sœur pour leur soutien. Je remercie Ludovic, pour avoir partagé tous ces moments à mes côtés, pour avoir été une précieuse source réconfort et d'encouragement.

## RESUME DE LA THESE

Véronique BRUDIEUX,

*Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, Université de Limoges / Société SILAB – St Viance.*

### **Extraction, modification enzymatique et caractérisation chimique de nouvelles structures pectiques. Application de la relation structure / activité à la dermo-cosmétique.**

Les phytopolysaccharides sont une classe de biomolécules dont certains présentent des propriétés biologiques susceptibles d'être valorisées à une échelle industrielle. C'est déjà le cas pour les industries papetières et agroalimentaires. L'intérêt des polysaccharides ne se limite pas à leurs propriétés rhéologiques : le rôle biologique de certains d'entre eux les désigne comme des molécules à activités dermocosmétologiques. C'est sur ce thème que la société SILAB - *producteur d'actifs naturels pour l'industrie cosmétique* - et le Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles ont décidé d'engager une étude prospective. En répondant au cahier des charges imposé par la société SILAB, une chimie dans l'eau qui s'affranchit de l'utilisation de solvants ou réactifs chimiques toxiques, nous nous sommes intéressés dans une première partie à l'un des domaines pectiques ubiquitaire, le rhamnogalacturonane de type I (RG-I). La variabilité des compositions chimique du RG-I, détectée au travers d'un screening sur 11 matières premières, laisse espérer un large spectre de propriétés dermocosmétologiques qui pourront être ajustées par modifications enzymatiques. Les protocoles d'extraction d'abord développés au niveau du laboratoire, ont été transférés et optimisés à une échelle permettant, pour trois de ces matières (son de châtaigne, marc de pomme et marc de raisin), leur industrialisation et pour l'une d'elles (son de châtaigne) leur commercialisation. Les structures pectiques isolées et caractérisées ont été passées au crible des tests dermocosmétologiques nous permettant d'identifier leur propriété dans le domaine de la fonction barrière du derme et, plus particulièrement, des mécanismes de régulation de la desquamation et de la différenciation cellulaire. Nos travaux démontrent par ailleurs que la nature chimique des RG-I testés, dont la variabilité repose essentiellement sur la nature des monosaccharides identifiés, leur proportion relative ou encore le type de liaisons glycosidiques qui les associent est capable de moduler l'expression des propriétés biologiques observées. Dans une deuxième partie, nous avons orienté notre approche vers une autre pectine plus rare, le zosteran, l'apiogalacturonane synthétisé par la phanérogame aquatique *Zostera marina*. Après avoir défini les protocoles de laboratoire et les conditions de leurs mises en œuvre à l'échelle pilote, la structure du zosteran a été étudiée. Cette dernière repose sur une chaîne principale composée exclusivement d'acides  $\alpha$ -D-GalA liés en (1-4) substituée par des résidus d'apiose ou d'oligoapiose  $\beta$ -Api -(1 $\rightarrow$ 2)<sub>n</sub>-□Api-(1-). Une étude prospective des propriétés de l'apiogalacturonane dans le domaine de l'oncologie cellulaire et moléculaire nous a permis d'en appréhender le potentiel pharmacodynamique. Nos résultats viennent enrichir le spectre des propriétés biologiques des polysaccharides d'origine végétale de la famille des pectines. Ils servent aussi de support et/ou d'illustration à la définition d'un concept qui demeure du point de vue fondamental et appliqué d'actualité : la relation structure – activité des bio-molécules.

## Liste des abréviations

AG I : arabinogalactane de type I  
AG II : arabinogalactane de type II  
AF : arabinofuranosidase  
AGU : apiogalacturonane purifié  
Al<sup>3+</sup> : ion aluminium  
Api : apiose  
Ara : arabinose  
Arg : arginine  
ARNm : acide ribonucléique messenger  
ATCC : american type collection culture  
BSA : serum albumine bovine  
BSTFA : N,O-bis-triméthylsilyltrifluoroacétamide  
Ca<sup>2+</sup> : ion calcium  
CDTA : trans-1,2-diaminocyclohexane-N,N,N',N'-tetraacetic acid  
COSY : correlation spectroscopy  
CPG : chromatographie en phase gaz  
CPG-SM = GC-SM: chromatographie en phase gaz couplée à la spectrométrie de masse  
CTAB : bromure de cetyltriméthylammonium  
DO : densité optique  
DP : degré de polymérisation  
DM : degré de méthylestérification  
DMEM : milieu de culture  
DMSO : diméthylsulfoxyde  
DS : degré de substitution  
DSG-1 : desmoglécine-1  
ECS : extrait de *Castanea sativa*  
EDTA : acide éthylène-diamine-tétraacétique  
EGF : facteur de croissance épidermique  
EGFR : récepteur de facteur de croissance  
*f* : furanose  
FAE : feruloyl estérase  
FAO : organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture  
FID : détecteur à ionisation de flamme  
FM : pectine faiblement estérifiée  
FNR : fraction neutre non retenue par chromatographie d'échange d'anions

FR : fraction acide retenue par chromatographie d'échange d'anions  
Fuc : fucose  
Gal : galactose  
GalA : acide galacturonique  
Glc : glucose  
GlcA : acide glucuronique  
HG : homogalacturonane  
HGA : acide homogalacturonique  
HMBC : heteronuclear multiple-bond correlation  
HMQC : heteronuclear multiquantum coherence  
HM : pectine hautement méthylestérifiée  
HSQC : heteronuclear single quantum correlation  
IR : indice de réfraction  
K<sup>+</sup> : ion potassium  
M : mole  
Man : mannose  
MMNO : N-méthylmorpholine-N-oxyde  
MS : matière sèche  
MTT : test de viabilité cellulaire  
Na<sup>+</sup> : ion sodium  
NaBD<sub>4</sub> : tetradeuteroborate de sodium  
NMF : natural moisturizing factor  
NOE : nuclear overhauser enhancement  
*p* : pyranose  
PAE : pectine acétyl esterase  
PAHBAH : acide parahydroxybenzoïque hydrazide  
PAL : endo-pectate lyase  
PBS : solution saline de phosphate  
PET : membrane poreuse  
PG : polygalacturonase  
PGL : polygalacturonate lyase  
PIE : perte insensible en eau  
PL : endo-pectine lyase  
PME : pectine méthylestérase  
PMG : polyméthylgalacturonase  
PMGL : polyméthylgalacturonate lyase  
Pro : proline  
R&D : recherche et développement  
Rha : rhamnose  
RG I : rhamnogalacturonane de type I

RG II : rhamnogalacturonane de type II  
RGEA : rhamnogalacturonane acétyl estérase  
RG-galacturonohydrolase : rhamnogalacturonane galacturonohydrolase  
RG-lyase : rhamnogalacturonane lyase  
RMN : résonance magnétique nucléaire  
ROESY : rotating frame overhauser spectroscopy  
RT-PCR : reverse transcription polymerase chain reaction  
SCCE : *stratum corneum* chymotryptic enzyme  
SCTE : *stratum corneum* tryptic enzyme  
SCTP : *stratum corneum* thiol protease  
SLS : sodium lauryl sulfate  
SVF : milieu avec 10% de sérum de veau fœtal  
TMSCl : chlorure de triméthylsilane  
TMS : triméthylsilylation  
TMSd : triméthylsilylation directe  
TOCSY : total correlation spectroscopy  
Tyr : tyrosine  
UE : union européenne  
VEGF : facteur de croissance endothélial vasculaire  
Xyl : xylose  
Z : zosteran issu des chaînes de production de la société Silab  
Zc : zosteran brut

# Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Aspect de la paroi cellulaire végétale en microscopie électronique d'après Sjöström et Westermark (1999)	26
<b>Figure 2</b> : Vue perspective d'une paroi ligneuse, d'après Rolland (1980)	26
<b>Figure 3</b> : Liaisons hydrogène intra- et intermoléculaires dans la cellulose	28
<b>Figure 4</b> : Structure des monolignols et des acides hydroxycinnamiques précurseurs	31
<b>Figure 5</b> : Composés chimiques de la paroi des cellules de bois (exprimés en % massique) et leur distribution d'après Popa (1996)	35
<b>Figure 6</b> : Premier modèle de la paroi primaire végétale présenté par Keegstra et al (1973)	35
<b>Figure 7</b> : Représentation schématique de la paroi primaire végétale des plantes à fleurs (type I) pendant l'élongation cellulaire. Schéma tiré de Carpita et Gibeault (1993)	36
<b>Figure 8</b> : Représentation schématique de la paroi primaire végétale des plantes à fleurs (type I) (A) et de certaines espèces monocotylédones herbacées (type II) (B). Schémas tirés de Carpita et McCann (2000)	37
<b>Figure 9</b> : Exemples de chromogènes	44
<b>Figure 10</b> : Dérivés furfuriques obtenus par déshydratation des pentoses, hexoses et acides uroniques	44
<b>Figure 11</b> : Réaction du dosage des sucres réducteurs	45
<b>Figure 12</b> : Différents types de liaisons glycosidiques entre différentes unités osidiques	47
<b>Figure 13</b> : Préparation des méthylglycosides selon la méthode proposée par Kamerling <i>et al.</i> (1975)	47
<b>Figure 14</b> : Équilibre mutarotationnel du glucose	49
<b>Figure 15</b> : Méthode de préparation des alditols acétates d'après Michalski (1986)	50
<b>Figure 16</b> : Méthode de triméthylsilylation des O-méthylglycosides, d'après Kamerling et al., (1975)	50
<b>Figure 17</b> : Mécanisme général de l'hydrolyse acide des glycosides, d'après Bemiller (1967)	52
<b>Figure 18</b> : Stabilité de la liaison uronosidyle à l'hydrolyse acide, d'après Timell <i>et al</i> (1965)	52
<b>Figure 19</b> : Catalyse intramoléculaire par un groupement carboxyle d'une liaison 1→4 précédant un acide uronique, d'après Ciancia et Cerezo (1993)	54

<b>Figure 20</b> : Mode d'action des enzymes pectinolytiques selon Ralet <i>et al</i> (2002)	56
<b>Figure 21</b> : Analyse de l'enchaînement des monosaccharides	61
<b>Figure 22</b> : Schéma représentant les corrélations 3JH,C carbone/proton observées à partir du proton H-1 dans une expérience HMBC. La corrélation la plus intéressante est celle qui indique la liaison glycosidique	64
<b>Figure 23</b> : Structure de l'homogalacturonane (HG) d'après Ridley <i>et al.</i> (2001)	72
<b>Figure 24</b> : Structure des galacturonanes substitués d'après Schols <i>et al</i> (1995) et Golovchenko <i>et al</i> (2001)	73
<b>Figure 25</b> : Structure du rhamnogalacturonane I	74
<b>Figure 26</b> : Structures des arabinanes et arabinogalactanes de type I et II, d'après Ralet <i>et al</i> (2002)	75
<b>Figure 27</b> : Structure du rhamnogalacturonane II, schéma selon Rodrigues-Carvajal <i>et al</i> (2003)	76
<b>Figure 28</b> : Modèle moléculaire de la structure primaire des pectines d'après Perez <i>et al</i> (2003)	78
<b>Figure 29</b> : Modèle moléculaire de la structure primaire des pectines (Willats <i>et al.</i> , 2001 ). La variabilité interspécifique des domaines est précisée pour chacun d'eux	
<b>Figure 30</b> : Dimère RG-II / RG-II associé au travers d'une liaison 1 :2 borate-diol diester (Ridley <i>et al</i> , 2001)	86
<b>Figure 31</b> : Liaisons chimiques des pectines au sein de la paroi cellulaire végétale, schéma tiré de Vincken <i>et al</i> (2003). (A) interaction avec le calcium ; (B) liaison borate-diol ester entre deux RG-II ; (C) transestérification de fonctions uronyl-ester	86
<b>Figure 32</b> : Représentation tridimensionnelle du dimère de RGII d'après Perez <i>et al</i> , (2003).L'atome de bore est encadré	87
<b>Figure 33</b> : Les modèles pectiques (A) conventionnel et (B) alternatif, schéma selon Willats <i>et al</i> (2006)	90
<b>Figure 34</b> : Le modèle pectique de Vincken <i>et al</i> (2003)	91
<b>Figure 35</b> : Les galactomananes d'après Pauly <i>et al</i> (1999)	98
<b>Figure 36</b> : Le xanthane d'après Martini et Seiller (1992)	98
<b>Figure 37</b> : Les carraghénanes d'après Martini et Seiller (1992)	99
<b>Figure 38</b> : Les xyloglucanes, d'après Pauly <i>et al</i> (1999)	99
<b>Figure 39</b> : Protocole B - extraction, purification et analyses du rhamnogalacturonane de son de châtaigne (Recoverine, Brevet Silab WO 2004100915) en condition de laboratoire R&D de la société SILAB (protocole B)	106
<b>Figure 40</b> : Profil de séparation par chromatographie d'exclusion stérique sur Biogel P6 de l'extrait brut de son de châtaigne	109



<b>Figure 41</b> : Profil de séparation par Chromatographie sur Couche Mince des fractions séparées par chromatographie d'exclusion stérique sur Biogel P6 de l'extrait brut de son de châtaigne	110
<b>Figure 42</b> : Profil de séparation par Chromatographie Liquide Haute Performance sur colonne d'exclusion stérique de l'extrait de son de châtaigne	110
<b>Figure 43</b> : Processus de régulation de la desquamation	114
<b>Figure 44</b> : Influence de l'ECS sur la différenciation kératinocytaire. Etude de la synthèse de cadhérine-E et de l'expression des ARNm codant pour la profilaggrine (Jouandeaud, 2004 )	118
<b>Figure 45</b> : Photographie réalisé après immunomarquage de la cadhérine-E sur explants de peau traité ou non avec Recoverine (Jouandeaud, 2004)	118
<b>Figure 46</b> : Effet de l'ECS sur la synthèse de céramides <i>in vivo</i> (Jouandeaud, 2004)	119
<b>Figure 47</b> : Effet de l'ECS sur le taux de desmogléine-1 (Jouandeaud, 2004)	121
<b>Figure 48</b> : Comparaison de l'activité de la SCCE et de la PIE après traitement avec l'ECS (Jouandeaud, 2004)	121
<b>Figure 49</b> : Evolution du taux d'E-Cadhérine en réponse à la présence de 2% (V/V) d'extrait de Recoverine brut ou de ses fractions F1, F2 et F3 purifiées par chromatographie d'exclusion stérique (Gloaguen <i>et al</i> , 2004 )	123
<b>Figure 50</b> : Protocole d'extraction, de purification et d'analyses des rhamnogalacturonanes issus du screening de matière végétale (adaptation du protocole A)	126
<b>Figure 51</b> : Protocole d'extraction, de purification et d'analyses des rhamnogalacturonanes issus du screening de matière végétale (protocole A)	133
<b>Figure 52</b> : Protocole d'extraction, de purification et d'analyses des rhamnogalacturonanes issus du screening de matière végétale (protocole B)	134
<b>Figure 53</b> : Profil de séparation par Chromatographie sur Couche Mince de la dégradation enzymatique de l'extrait brut C du marc de pomme par une carbohydase	137
<b>Figure 54</b> : Profil de séparation par chromatographie d'exclusion stérique sur Biogel P6 de l'extrait pectique C du marc de pomme	138
<b>Figure 55</b> : Profil de séparation par Chromatographie sur Couche Mince des fractions séparées par chromatographie d'exclusion stérique sur Biogel P6 de l'extrait pectique C du marc de pomme	139
<b>Figure 56</b> : Profil de séparation par Chromatographie Liquide Haute Performance sur colonne d'exclusion stérique (type Aquagel-OH) de l'extrait pectique C du marc de pomme.	139
<b>Figure 57</b> : Profil de séparation par chromatographie d'exclusion stérique sur Biogel P6 de l'extrait pectique C du marc de raisin	143
<b>Figure 58</b> : Profil de séparation par CCM des fractions séparées par chromatographie d'exclusion stérique sur Biogel P6 de l'extrait pectique C du marc de raisin.	144

<b>Figure 59</b> : Profil de séparation par Chromatographie Liquide Haute Performance sur colonne d'exclusion stérique (type Aquagel-OH) de l'extrait pectique C du marc de raisin	144
<b>Figure 60</b> : Expression du taux d'HSP27 (moyenne de 2 essais) par une culture de kératinocytes en réponse au contact des extraits pectiques bruts et purifiés de son de châtaigne, marcs de pomme et de raisin à la concentration de 0,5% (V/V).	152
<b>Figure 61</b> : Protocole d'extraction du zosteran, adapté d'Ovodova <i>et al.</i> (2000) et de Popov <i>et al.</i> (2006)	160
<b>Figure 62</b> : Modèle structural hypothétique de l'apiogalacturonane, schéma adapté de Golovchenko <i>et al.</i> (2002)	161
<b>Figure 63</b> : Structure chimique du D-apiose	161
<b>Figure 64</b> : Analyse en chromatographie en phase gazeuse des dérivés méthylglycosides triméthylsilylés du zosteran	162
<b>Figure 65</b> : Séparation de la fraction AGU par HPLC sur colonne d'exclusion stérique de type Aquagel-OH	165
<b>Figure 66</b> : Cinétique d'autohydrolyse du zosteran purifié (AGU) de 30 minutes à 7 heures	165
<b>Figure 67</b> : Spectre <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C HSQC de la fraction FNR2	167
<b>Figure 68</b> : Les quatre formes furanosiques de l'apiose en solution	168
<b>Figure 69</b> : Spectre <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C HSQC de la fraction FNR1	169
<b>Figure 70</b> : Effets doses - dépendant des fractions AGU et FR testées à des concentrations comprises entre 0.8 et 50 mg.mL <sup>-1</sup> sur la viabilité des cellules A 431. Témoin : pectine commerciale (Sigma)	174
<b>Figure 71</b> : Effets de la fraction AGU sur les capacités de migration des cellules A431. Grossissement x200	176
<b>Figure 72</b> : Effets de la fraction AGU sur les capacités invasives des cellules A431. Grossissement x200	176
<b>Figure 73</b> : Effets de la fraction AGU sur l'expression des métalloprotéinases ProMMP9, MMP9 et ProMMP2 par les cellules A 431	178
<b>Figure 74</b> : Comment modifier les propriétés des polysaccharides (adapté de Pérez, 1997)	183
<b>Figure 75</b> : Principe de la migration et de l'invasion cellulaires en chambre de Boyden	203

## Liste des tableaux

<b><u>Tableau 1</u></b> : Principales sources de pectines d'intérêt industriel d'après Thakur <i>et al.</i> (1997)	41
<b><u>Tableau 2</u></b> : Méthodes de dérivation des monosaccharides.	49
<b><u>Tableau 3</u></b> : Structure chimique des différentes régions pectiques et de leurs substitutions d'après Mollet, 2006	71
<b><u>Tableau 4</u></b> : Les principaux agents texturants utilisés en cosmétique d'après Martini et Seiller (1992)	93
<b><u>Tableau 5</u></b> : Plantes et structures pectiques à activités immunostimulantes d'après Paulsen et Barsett (2005)	101
<b><u>Tableau 6</u></b> : Caractérisation des extraits bruts isolés du son de châtaigne	107
<b><u>Tableau 7</u></b> : Caractérisation des extraits bruts par Chromatographie en Phase gazeuse après méthanolyse et silylation. Valeurs exprimées en % molaire des constituants identifiés	107
<b><u>Tableau 8</u></b> : Caractérisation des fractions séparées par chromatographie d'exclusion stérique sur Biogel P6 à partir de l'extrait brut de son de châtaigne	111
<b><u>Tableau 9</u></b> : Caractérisation des fractions séparées par chromatographie d'exclusion stérique sur Biogel P6 par Chromatographie en Phase gazeuse après méthanolyse et silylation. Valeurs exprimées en % molaire des constituants identifiés	111
<b><u>Tableau 10</u></b> : Liste des matières premières utilisées dans le cadre du screening	125
<b><u>Tableau 11</u></b> : Caractérisation des matières brutes par Chromatographie en Phase gazeuse après méthanolyse et silylation (TMSd). Valeurs exprimées en % molaire des constituants identifiés	128
<b><u>Tableau 12</u></b> : Caractérisation des extraits bruts isolés à partir des matières brutes	128
<b><u>Tableau 13</u></b> : Caractérisation des extraits bruts (TMS) et des résidus d'extraction (TMSd) par Chromatographie en Phase gazeuse après méthanolyse et silylation. Valeurs exprimées en % molaire des constituants identifiés	129
<b><u>Tableau 14</u></b> : Caractérisation des extraits purifiés par chromatographie d'exclusion stérique sur Biogel P6 par Chromatographie en Phase gazeuse après méthanolyse et silylation. Valeurs exprimées en % molaire des constituants identifiés	130
<b><u>Tableau 15</u></b> : Synthèse des analyses issues du screening des matières premières.	131
<b><u>Tableau 16</u></b> : Caractérisation des extraits bruts isolés du marc de pomme	135

<b><u>Tableau 17</u></b> : Caractérisation des extraits bruts (TMS) et des résidus d'extraction (TMSd) par Chromatographie en Phase gazeuse après méthanolyse et silylation. Valeurs exprimées en % molaire des constituants identifiés	135
<b><u>Tableau 18</u></b> :Composition chimique globale de l'extrait pectique C du marc de pomme. Toutes valeurs en g.L <sup>-1</sup>	138
<b><u>Tableau 19</u></b> : Caractérisation de l'extrait pectique isolé du marc de pomme	140
<b><u>Tableau 20</u></b> : Caractérisation des extraits purifiés par chromatographie d'exclusion stérique sur Biogel P6 par Chromatographie en Phase gazeuse après méthanolyse et silylation. Valeurs exprimées en % molaire des constituants identifiés	140
<b><u>Tableau 21</u></b> : Caractérisation des extraits bruts isolés du marc de raisin	142
<b><u>Tableau 22</u></b> : Caractérisation des extraits bruts (TMS) et des résidus d'extraction (TMSd) par Chromatographie en Phase gazeuse après méthanolyse et silylation. Valeurs exprimées en % molaire des constituants identifiés	142
<b><u>Tableau 23</u></b> : Composition chimique globale de l'extrait pectique C du marc de raisin. Toutes valeurs en g.L <sup>-1</sup>	143
<b><u>Tableau 24</u></b> : Caractérisation de l'extrait pectique isolé du marc de raisin	146
<b><u>Tableau 25</u></b> : Caractérisation des extraits purifiés du marc de raisin par chromatographie d'exclusion stérique sur Biogel P6 par Chromatographie en Phase gazeuse après méthanolyse et silylation. Valeurs exprimées en % molaire des constituants identifiés	146
<b><u>Tableau 26</u></b> : Caractéristiques structurales des rhamnogalacturonanes isolés selon les protocoles A, B et C à partir du son de châtaigne, du marc de pomme et du marc de raisin	147
<b><u>Tableau 27</u></b> : Caractérisation des rhamnogalacturonanes isolés selon le protocole pilote C à partir du son de châtaigne, du marc de pomme et du marc de raisin	149
<b><u>Tableau 28</u></b> : Caractérisation des rhamnogalacturonanes isolés selon le protocole pilote C à partir du son de châtaigne, du marc de pomme et du marc de raisin par Chromatographie en Phase gazeuse après méthanolyse et silylation. Valeurs exprimées en % molaire des constituants identifiés	149
<b><u>Tableau 29</u></b> : Evaluation du potentiel cytotoxique des fractions macromoléculaires de Recoverine, du marc de pomme et du marc de raisin. La viabilité cellulaire est exprimée en % (V/V)	151
<b><u>Tableau 30</u></b> : Expression du taux d'HSP27 (moyenne de 2 essais) par une culture de kératinocytes en réponse au contact des extraits pectiques bruts ou purifiés de son de châtaigne, marcs de pomme et de raisin à la concentration de 0,5% (V/V)	152

<b><u>Tableau 31</u></b> : Composition monosaccharidique du zosteran et de ses fractions purifiées. Les valeurs sont exprimées en % molaire des constituants.	163
<b><u>Tableau 32</u></b> : Déplacements chimiques des protons et des carbones 13 (ppm) des quatre formes furanosiques de l'apiose.	168
<b><u>Tableau 33</u></b> : liste des matières premières utilisées et des fournisseurs	185
<b><u>Tableau 34</u></b> : Produits chimiques, solvants et réactifs	186

---

<b>CHAPITRE I : Travaux antérieurs</b>	23
<b>I.1. Localisation des pectines : la paroi cellulaire végétale</b>	25
<b>I.1.1. Organisation anatomique et fonctions</b>	25
<b>I.1.2. Les principaux constituants de la paroi végétale</b>	28
I.1.2.1. La cellulose	28
I.1.2.2. Les hémicelluloses	30
I.1.2.3. Les pectines	30
I.1.2.4. Les lignines	31
I.1.2.5. Les autres constituants	33
<b>I.1.3. Organisation tridimensionnelle de la paroi : <i>des modèles d'hier à aujourd'hui</i></b>	34
<b>I.2. Les pectines : une classe de polysaccharide pariétale typique des végétaux</b>	39
<b>I.2.1. Sources de pectines à usage industriel</b>	39
<b>I.2.2. Extraction des pectines</b>	39
I.2.2.1. Méthodes chimiques	39
I.2.2.2. Prétraitements physiques	40
I.2.2.2.a Ultrasons	40
I.2.2.2.b Micro-ondes	40
I.2.2.2.c Pression	41
<b>I.2.3. Analyse des compositions monosaccharidiques</b>	43
I.2.3.1. Méthodes colorimétriques	43
I.2.3.2. Méthodes chromatographiques	44
I.2.3.2.a Hydrolyse des liaisons glycosidiques	44
I.2.3.2.b Méthodes de dérivation des sucres pour l'analyse par CPG	47
<b>I.2.4. Analyse structurale des polysaccharides pectiques</b>	52
I.2.4.1. Obtention d'oligosaccharides	52
I.2.4.1.a hydrolyse chimique	52
I.2.4.1.b. Hydrolyse enzymatique	56
I.2.4.2 Détermination structurale des oligosaccharides	60
I.2.4.2.a Analyse infrarouge	61



II.1.1. Extraction et caractérisation chimique	105
II.1.2. Evaluation des propriétés dermo-cosmétologiques de Recoverine	112
II .1.2.1. Quels actifs pectiques pour SILAB ?	112
II .1.2.1.a Le processus de desquamation	113
II.1.2.1.b Défaut de fixation de l'eau	115
II.1.2.1.c Rôle du ciment lipidique	115
II.1.2.2. Propriétés dermo-cosmétologique de Recoverine, l'extrait de <i>Castanea sativa</i> (ECS)	116
II.1.2.2. a ECS et différenciation kératinocytaire	116
II.1.2.2. b ECS et synthèse de lipides épidermiques	117
II.1.2.2. c ECS et desquamation	120
II.1.2.3. Origine moléculaire des propriétés biologiques de Recoverine, l'extrait de <i>Castanea sativa</i> (ECS)	122
<b>II.2. Screening de matières végétales : sélection de rhamnogalacturonanes de type I</b>	124
II.2.1. Extraction et caractérisation chimique	124
II.2.2. Développement pilote sur marc de pomme et marc de raisin	132
II.2.2.1 Marc de pomme	132
II.2.2.2 Marc de raisin	141
II.2.3. Bilan et validation du transfert technologique	145
<b>II.3. Rhamnogalacturonanes de type I et valorisation biologique en dermocosmétique</b>	148
II.3.1. Caractéristiques chimiques des rhamnogalacturonanes testés	148
II.3.2. Propriétés dermocosmétologiques des rhamnogalacturonanes	150
<b>CHAPITRE II : 2<sup>ème</sup> partie</b>	
Extraction et analyse structurale du zosteran, l'apiogalacturonane synthétisé par <i>Zostera marina</i>	156
<b>II.4. Extraction, purification et caractérisation chimique du zosteran, l'apiogalacturonane de <i>Zostera marina</i> L.</b>	158
II .4.1. Analyse structurale du zosteran	166



<b>II.5. Evaluation des propriétés pharmacodynamiques du zosteran :</b>	
application en oncologie cellulaire et moléculaire	172
-----	
<b>II.6 CONCLUSION GENERALE</b>	180
-----	
<b>CHAPITRE III : Partie expérimentale</b>	<b>184</b>
<b>III.1. Matériel biologique</b>	185
<b>III.2. Produits chimiques utilisés</b>	186
<b>III.3. Extraction des pectines</b>	186
III.3.1. Rhamnogalacturonanes	186
III.3.1.1. Protocole A ( <i>protocole laboratoire LCSN</i> )	186
III.3.1.2. Protocole B ( <i>protocole laboratoire R&amp;D SILAB</i> )	187
III.3.1.3. Protocole pilote ( <i>hall de développement technologique et commercial de la société SILAB</i> )	188
III.3.2. Apiogalacturonanes	188
III .3.2.1. Protocole LCSN	164
III .3.2.2. Protocole pilote	188
<b>III.4. Obtentions des extraits purifiés ou modifiés</b>	189
III.4.1. Purification des rhamnogalacturonanes	189
III.4.2. Autohydrolyse du zosteran, l'apiogalacturonane de <i>Zostera marina</i>	189
<b>III.5. Analyses des extraits</b>	190
III.5.1. Caractérisation des composés non saccharidiques	190
III.5.1.1. Détermination des matières sèches	190
III.5.1.2. Teneurs en cendres	190
III.5.1.3. Dosage des protéines totales (Kjeldahl)	191
III.5.1.4. Dosage de protéines selon la méthode de Lowry	192

III.5.1.5. Dosage des polyphénols	192
III.5.2. Caractérisation des contenus saccharidiques	193
III.5.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)	193
III.5.2.2. Dosages des sucres par colorimétrie	193
III.5.2.2.a Dosage de Dubois	193
III.5.2.2.b Dosage de Blumenkrantz-Asboe	194
III.5.2.2.c Dosages des sucres réducteurs	194
III.5.2.2.d Identification et dosage des monosaccharides par CPG selon la méthode des méthylglycosides O-triméthylsilylés	194
III.5.3. Analyses structurales	196
III.5.3.1. HPLC	196
III.5.3.2. Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire	196
III.5.3.2.a COSY homonucléaire $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$	196
III.5.3.2.b COSY hétéronucléaire	196
<b>III.6. Evaluation des propriétés biologiques des extraits</b>	197
III.6.1 Efficacité des rhamnogalacturonanes en dermocosmétologie	197
III.6.1.1. Etude de cytotoxicité	197
III.6.1.2 Etude sur la synthèse de HSP 27	198
III.6.2 Efficacité des apiogalacturonanes en oncologie cellulaire et moléculaire	199
III.6.2.1. Lignée cellulaire	200
III.6.2.2. Entretien cellulaire	200
III.6.2.3. Etude de la viabilité cellulaire	200
III.6.2.3.a Tests MTT	200
III.6.2.3.b Etude des effets de la dose et du temps	201
III.6.2.3.c Etude de la migration et de l'invasion cellulaire	201
III.6.2.3.d Zymographie	203

---

<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	205
----------------------	-----

# INTRODUCTION GENERALE

Mille milliards de tonnes de matière vivante se créent chaque année à la surface de la Terre (Pérez, 1997). Une biomasse constituée en majeure partie de molécules ou de macromolécules glucidiques : lignocellulose surtout, mais aussi amidon et autres hémicelluloses. En dépit de cette domination, on a longtemps considéré les sucres et leurs dérivés comme des molécules d'importance biologique secondaire, les cantonnant à un rôle de structure (la cellulose par exemple) ou de stockage de l'énergie (amidon ou saccharose). Ni la découverte de l'intérêt des molécules glucidiques dans la détermination des groupes sanguins ou des glycoconjugués dans le phénomène de cancérisation n'ont modifié cette perception. Il a fallu attendre l'intrusion de la Biologie moléculaire et du génie génétique pour montrer le rôle fonctionnel de la fraction glucidique. Forts de ces nouvelles connaissances, les chercheurs ré-évaluent actuellement l'importance des glucides et envisagent pour eux de nombreuses applications notamment dans le secteur biomédical. C'est le cas des polysaccharides déjà très largement utilisés comme matière première dans les industries papetière et agroalimentaire. Extraits majoritairement des végétaux, ces polymères hydrosolubles établissent des interactions spécifiques avec l'eau et peuvent épaissir, stabiliser ou gélifier une solution, même à faible concentration. L'intérêt des polysaccharides ne se limite pas à leurs propriétés rhéologiques : le rôle biologique de certains d'entre eux les désigne comme des molécules à activités pharmaceutique ou dermocosmétologique.

Sur ce dernier thème, l'évolution des normes a profondément bouleversé les pratiques des industries cosmétiques, les faisant passer en quelques années d'une cosmétologie d'apparat - *maquillage* - à une dermocosmétologie devenue Science s'appuyant sur des faits précis d'ordre biologique et physicochimique (Martini et Seiller, 1992). Les produits cosmétiques actuels sont en effet considérés comme de véritables actifs doués de propriétés hygiéniques et capables de rendre à la peau son équilibre physicochimique sans affecter les fonctions de l'organisme, c'est-à-dire sans intention pharmacologique ou effets médicamenteux. Les cibles des produits cosmétiques sont les déficiences esthétiques dues à l'accélération d'un processus physiologique naturel, le vieillissement. De ce point de vue, l'efficacité des actifs cosmétiques contemporains s'exercera soit en freinant le déroulement du

---

\* Pérez S., Les vertus cachées des sucres, *Biofutur*, **1997**, 171, 21-23.

\* Martini M.C., Seiller M., Actifs et additifs en cosmétologie, *Tec et doc Lavoisier*, **1992**, pp630.

processus de vieillissement par une protection active de la peau, soit en permettant une stimulation du métabolisme cutané. On peut donc parler d'une véritable efficacité cosmétique qui résulte de la présence de constituants bioactifs obéissant à des spécifications physicochimiques précises. Leurs propriétés biologiques sont mises en évidence grâce à des tests fondés sur des méthodologies rigoureuses et l'on sait maintenant mesurer les principales propriétés de la peau à savoir : hydratation, souplesse, élasticité, stimulation de la prolifération et de la différenciation des cellules du derme (kératinocytes, fibroblastes), synthèse de collagène... La nouvelle cosmétologie est donc une cosmétologie scientifique et évolutive à l'écoute permanente des acquisitions les plus récentes dans le domaine de la biologie cutanée et de la chimie des substances actives.

Le réservoir animal a été longtemps le seul capable de fournir les actifs épidermocompatibles doués d'activités cosmétiques. Au nom du principe de précaution et des risques épidémiologiques potentiels, de tels actifs n'ont pas survécu à la crise de la vache folle. Le réservoir végétal reprend alors toute sa valeur bien qu'il soit exploité depuis fort longtemps. Reposant souvent sur une approche empirique, les propriétés biologiques des plantes et des substances naturelles qu'elles renferment, font actuellement l'objet de nombreux travaux. Il semble en effet que les pharmacopées traditionnelles soient revisitées de façon plus systématique ouvrant par là même la voie au développement de champs disciplinaires nouveaux, c'est le cas pour l'éthnopharmacologie et la phytocosmétologie. Les vertus stimulantes des phytopolysaccharides sont déjà utilisées de façon empirique par la pharmacopée traditionnelle (Flandroy, 1996; Srivastava et Kulshreshtha, 1989). L'analyse de la littérature met en lumière trois groupes principaux de polysaccharides naturels d'origine végétale biologiquement actifs (Bonnin *et al.*, 1997 ; Ralet *et al.*, 2002).

- les **homoglycanes neutres**, composés exclusivement d'enchaînement de glucose ; il s'agit essentiellement des  $\beta$ -1,3 glucanes linéaires.

- les **pectines et leurs dérivés** : tel que l'*acide polygalacturonique* constitué exclusivement d'acide galacturonique, le *rhamnogalacturonane* constitué

---

\* Flandroy L., Histoire stimulante des sucres, *Biofutur*, **1996**, 159, 35-41.

\* Srivastava R., Kulshreshtha D., Bioactive polysaccharides from plants, *Phytochemistry*, **1989**, 28 (11), 2877-2883.

\* Bonnin E., Renard C., Thibault J.F., Ducroo P., Les enzymes de dégradation des parois végétales : mode d'action et utilisations alimentaires. Dans : *Enzymes en agro-alimentaire*, V. Larreta-Garde, Editions Lavoisier Tec&Doc, **1997**, 168-193.

\* Ralet M.C., Bonin E., Thibault J.F., Pectins. Dans : *Biopolymers vol. 8, Polysaccharides II*, Steinbüchel A. (Ed.), Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, **2002**, 12, 345-380.

principalement de rhamnose et d'acide galacturonique, les *hétéroglycanes neutres* tel que l'arabinogalactane formé exclusivement d'arabinose et de galactose et enfin les *structures mixtes* tels que les arabinogalactanes acides, composés de galactose, d'arabinose, de rhamnose et d'acide galacturonique.

- les **hémicelluloses et leurs dérivés** : il s'agit essentiellement du *4-O-méthylglucuronoarabinoxylane* et des *xyloglucanes*.

L'activité biologique des phytopolysaccharides est souvent corrélée à leur acidité bien que cette dernière caractéristique ne soit pas un déterminant absolu (Gloaguen et Krausz, 2004). En revanche, une plus grande complexité de leur structure (taux de branchement et ramification, degré de polymérisation) semble influencer positivement sur leur capacité à déclencher une activité biologique. Par ailleurs, il convient dans une seconde approche d'identifier les motifs glucidiques responsables de ces activités. Malheureusement, les polysaccharides extraits de végétaux ont des caractéristiques variables, incompatibles avec la qualité et la pureté nécessaires aux applications biomédicales (Perez, 1997). Les espèces sources sont, en effet, soumises à des aléas climatiques et écologiques qui jouent de manière significative sur la quantité et la qualité des polysaccharides qu'elles produisent. D'où l'idée de recourir d'une part à la culture contrôlée des végétaux et/ou, d'autre part d'ajuster les propriétés d'un polysaccharide en ayant recours au fractionnement par chromatographie d'échanges d'ions ou d'exclusion stérique ou à la modification chimique et/ou enzymatique.

C'est dans ce contexte que la société SILAB – *producteur d'actifs naturels pour l'industrie cosmétique* – et le Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles – *spécialiste de Chimie verte et dont une partie des activités est centrée sur l'extraction, l'analyse structurale et l'évaluation des propriétés biologiques de molécules naturelles glycosylées* – ont décidé d'engager une étude prospective sur le thème : phytopolysaccharides et actifs dermocosmétiques, qui a servi de support à notre étude. Parmi les phytopolysaccharides cibles, les pectines se sont avérées être un modèle de choix. En effet, elles sont une classe de molécules naturelles et bioactives à la structure complexe dont la variabilité est susceptible d'induire un bouleversement de leurs comportements physicochimiques en solution tout comme de profondes modifications de l'expression de leurs propriétés biologiques (Paulsen et

---

\* Gloaguen V., Krausz P., Barrier function and dry skin : Use of rhamnogalacturonans as a new therapeutic strategy, *Söwf Journal*, **2004**, 130, 20-26.

\* Pérez S., Les vertus cachées des sucres, *Biofutur*, **1997**, 171, 21-23.

Barsett, 2005 ). Les pectines appartiennent par ailleurs à la classe des hydrocolloïdes et à ce titre sont solubilisables par l'eau et généralement solubles dans l'eau. Enfin, les outils méthodologiques - *essentiellement enzymatiques* - permettant leur étude sont disponibles y compris à une échelle industrielle.

Quelques travaux suggèrent que les pectines peuvent être utilisées comme actifs par l'industrie dermocosmétique. Un tel développement nécessite des connaissances précises d'une part sur l'origine biologique, la localisation, les structures et l'organisation tridimensionnelle de ces molécules et, d'autre part, la mise en œuvre et la transposition à une échelle pilote des protocoles permettant leur extraction sélective et leur commercialisation. Dans un deuxième temps, les structures pectiques isolées et caractérisées seront passées au crible des tests dermocosmétologiques nous permettant d'engager à cette occasion une réflexion plus large concernant l'origine des propriétés biologiques observées afin d'être en mesure de corrélérer ces propriétés à la présence de domaines pectiques particuliers et, à l'intérieur de ces domaines, de motifs chimiques désignés comme responsables de l'activité. Dans une dernière partie, une attention particulière sera portée aux propriétés pharmacodynamiques de fragments pectiques dans le domaine de l'oncologie cellulaire et moléculaire.

L'entreprise SILAB et le Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles développent des méthodologies préparatives en privilégiant l'eau comme unique solvant et en limitant le recours à l'utilisation de solvants ou de réactifs chimiques toxiques. C'est en intégrant cette contrainte et en prenant appui sur la synergie des savoir faire de ces deux structures qu'a débuté cette thèse à vocation industrielle dont nous souhaitons qu'elle contribue, tant sous l'angle académique que de celui du développement, à affiner le statut des molécules pectiques – *ce polysaccharide typique des végétaux* – en démontrant qu'elles sont bien des molécules naturelles douées d'activités dermocosmétique et thérapeutique.

---

\* Paulsen B.S., Barsett H., Bioactive pectic polysaccharides, *Advances Polymers Sciences*, **2005**, 186, 69-101.

# **CHAPITRE I**

- Les molécules pectiques -

*“New insight into an old polymer”*

## CHAPITRE I : Travaux antérieurs

Les pectines sont une classe complexe de phytopolysaccharides qui entrent dans la composition des parois cellulaires végétales. Ces molécules sont très utilisées par les industries agro-alimentaires et on estime à environ 5 grammes, la quantité de pectines consommées chaque jour dans un régime alimentaire occidental moyen (Pilnik, 1990). La consommation annuelle mondiale de pectines est estimée à 45 millions de kg avec un marché situé aux environs de 400 millions d'euros (Savary *et al.*, 2003). Les pectines sont considérées comme des additifs alimentaires et, à ce titre, sont enregistrées sous le n° E440. Bien plus que de simples additifs alimentaires, les propriétés biologiques des pectines tant dans le domaine thérapeutique en santé humaine que dans celui de l'organisation et de l'évolution des structures pariétales en physiologie végétale, font d'elles une classe de molécules remarquables. La relation étroite entre leur structure et leur fonction a motivé de nombreuses études et explique le nombre considérable de références bibliographiques à leur sujet - à titre indicatif, une recherche utilisant le mot clé pectine produit près de 30 000 références sur Scifinder.

Le terme pectine demeure néanmoins ambiguë en ce sens qu'il décrit plusieurs catégories de molécules distinctes. En fait, « pectine » désigne une famille d'oligo- et polysaccharides qui présentent des caractéristiques communes mais qui, si l'on s'en réfère à leur structure fine, pourront être très différentes (Ridley *et al.*, 2001). Néanmoins, toutes les pectines présentent la caractéristique d'être riches en acide galacturonique - *considéré comme monosaccharide marqueur* - ce qui est aujourd'hui un critère de classification puisque la FAO et l'UE stipule que « tout composé revendiqué comme pectique doit contenir au minimum 65% de ce dernier ».

---

\* Pilnik W., Pectin, a many spendoured thing. G.O. Philips, P.A. Williams & D.J. Wedlock (Eds), In : *Gums and stabilizers for the food industry*, Oxford University Press, **1990**, 313-262.

\* Savary B.J., Hotchkiss A.T., Fishman M.L., Cameron R.G. & Shatters R.G., Development of a Valencia orange pectin methyl esterase for generating novel pectin products. F. Voragen, H. Schols & R. Visser (Eds), In : *Advances in pectin and pectinase research*, Kluwer Academic Publishers , **2003**, 345-361.

\* Ridley B.L., O'Neil M.A., Mohnen D., Pectins : structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling, *Phytochemistry*, **2001**, 57, 929-967.



Il convient donc dans un premier temps de dresser le bilan des données actuellement disponibles dans la littérature sur les pectines en considérant plusieurs aspects complémentaires : leur localisation, les méthodologies permettant leur extraction et leur caractérisation chimique, leur structure fine, leur organisation tridimensionnelle et enfin leur valorisation dans le domaine thérapeutique et cosmétique.

## **I.1. Localisation des pectines : la paroi cellulaire végétale**

### **I.1.1. Organisation anatomique et fonctions**

Parmi les cellules eucaryotes, la paroi cellulaire est l'une des caractéristiques anatomiques qui différencie la cellule végétale de la cellule animale. Compartiment original de la structure cellulaire végétale, la paroi est aussi considérée aujourd'hui comme un organe à part entière. Sa composition unique ainsi que l'ensemble des liens physiques et chimiques qui la structure lui permette d'assurer un véritable *continuum* à l'interface du symplasme et de l'apoplasme (Mollet, 2006). La paroi cellulaire fournit également à la cellule végétale une résistance mécanique importante et explique souvent sa forme caractéristique. Sa structure varie en fonction des espèces végétales, de l'âge et de la nature des tissus considérés rendant ainsi difficile son étude. C'est une structure rigide microfibrillaire enrobée d'une matrice hydrosoluble et gélifiante. Différents niveaux d'organisation vont lui conférer son aspect dynamique et rigide. En effet elle doit être modelable au rythme de la croissance chez les jeunes cellules, tout en restant ferme afin d'assurer son rôle de barrière protectrice et de permettre la cohésion des cellules. Elle doit s'opposer aux chocs osmotiques, à la dessiccation, aux rayons ultraviolets, tout en permettant les échanges intercellulaires et le passage des substances nécessaires au métabolisme cellulaire. Ces exigences, à la fois antagonistes et complémentaires, sont à l'origine de la complexité de la paroi cellulaire végétale.

Du point de vue anatomique, certaines caractéristiques permettent de définir un modèle général de la paroi végétale (figures 1 et 2), se décomposant en trois zones distinctes, de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule :

---

\* Mollet J.C., *La paroi primaire végétale*, Habilitation à Diriger les Recherches, Université d'Artois, 2006, pp 121.

La lamelle moyenne : partie commune située entre deux cellules voisines dont le rôle est d'assurer la cohésion entre les cellules. Son épaisseur varie de 0,2 à 1 µm. La lamelle moyenne est riche en pectine et dépourvue de cellulose.

La paroi primaire : la plus mince (0,1-0,2 µm), constituent la seule enveloppe fibrillaire des cellules en croissance et montre une grande plasticité. Elle présente une structure biphasique, où les microfibrilles de cellulose sont dispersées dans une matrice amorphe fortement hydratée composée de substances pectiques, d'hémicelluloses et de protéines. La paroi cellulaire primaire est composée de 9-25% de cellulose, de 25-50% d'hémicellulose, 10-35% de pectines et 10% de protéines (Bidlack *et al.*, 1992).

La paroi secondaire : Très épaisse (1 à 5 µm) est ajoutée à la paroi primaire lorsque la cellule a cessé de croître. Elle est constituée d'un réseau fibrillaire de cellulose cristalline et d'hémicellulose. En fonction de l'orientation des fibrilles de cellulose, trois régions distinctes sont définies (S1, S2, S3). Ces fibrilles de cellulose ont une orientation déterminée qui change rythmiquement et varie d'une strate à l'autre.

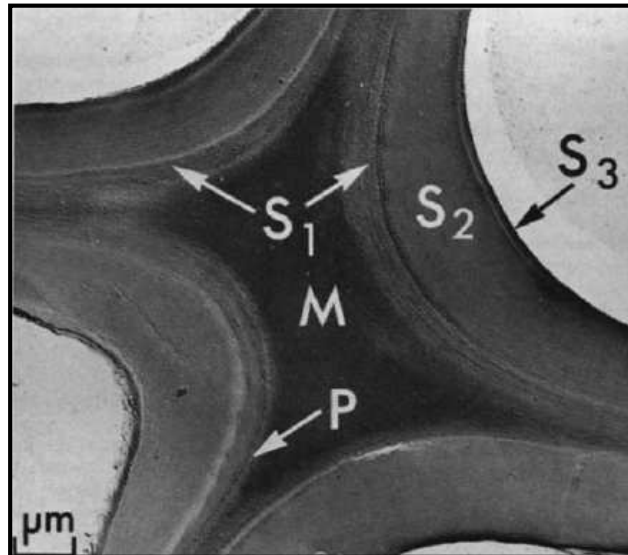
La paroi cellulaire végétale est donc formée majoritairement de polysaccharides dont la structure et les relations intermoléculaires peuvent expliquer cinq grandes fonctions (Perez *et al.*, 2003) : (1) elle assure l'extension du réseau intercellulaire, (2) elle contribue à l'adhésion des cellules dans le lamelle moyenne, (3) elle limite la porosité de la paroi cellulaire, (4) elle contribue au maintien de l'équilibre physico-chimique du symplaste (eau et ions) et (5) elle assure la transduction de signaux extracellulaires vers le milieu intra-cellulaire au travers de la libération d'oligosaccharides bioactifs. Malgré sa localisation extracellulaire, par delà la membrane plasmique, la paroi cellulaire est aujourd'hui considérée comme un compartiment métabolique dynamique de la cellule la rapprochant ainsi davantage – *en référence à la cellule animale* – d'une véritable matrice extracellulaire.

Les polysaccharides sont plus accessibles et plus faciles à extraire dans les parois cellulaires peu ou pas lignifiés, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux parois cellulaires non secondarisées.

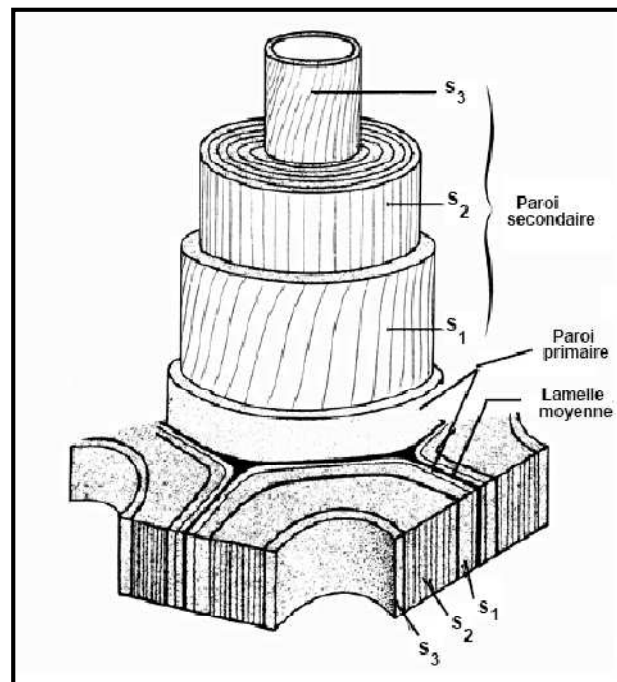
---

\* Bidlack J., Malone M., Benson R., Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants, *Proc. Okla. Acad. Sci.*, **1992**, 72, 51-56.

\* Pérez S., Rodriguez-Carjaval M.A., Doco T., A complex plant cell wall polysaccharide : rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function, *Biochimie*, **2003**, 85, 109-121.



**Figure 1** : Aspect de la paroi cellulaire végétale en microscopie électronique d'après Sjöström et Westermark (1999). M : lamelle moyenne ; P : paroi primaire ; S1, S2, S3 : paroi secondaire.



**Figure 2** : Vue perspective d'une paroi ligneuse, d'après Roland (1980).

\* Sjöström E., Westermark U., Chemical composition of wood and pulps : basic constituents and their distribution, In: Sjöström E., Alén R. (eds), *Analytical Methods in wood chemistry, pulping, and papermaking*. Springer series in wood sciences, **1999**, 1-19.

\* Roland J.C., Visualisation des polysaccharides au niveau ultrastructural. Dans : *Les Polymères Végétaux. Polymères Pariétaux et Alimentaires non azotés*. Ed. Gauthier-Villars, Paris, **1980**, 30-45.

## I.1.2. Les principaux constituants de la paroi végétale

Deux principaux types de polysaccharides entrent dans la composition de la paroi cellulaire :

- Homogènes (homopolysaccharides) comportant un seul type de monosaccharide. La nomenclature systématique mentionne : le type de liaison, la configuration anomérique  $\alpha$  ou  $\beta$ , la forme énantiomérique de chaque glucosyl D ou L, le nom de l'unité monosaccharidique, la forme furanosyl et pyranosyl de chaque résidu puis le suffixe -ane. (1 $\rightarrow$ 4)-  $\beta$ -D-pyranoglucane correspond par exemple à la cellulose.
- Hétérogènes (hétéropolysaccharides) résultant de la condensation de différents types de monosaccharides. La nomenclature systématique mentionne rarement les configurations anomériques. Le nom est formé des préfixes énantiomériques, des noms des sucres classés par ordre alphabétique, précédant le nom de l'unité monosaccharidique constituant la chaîne principale se terminant par le suffixe -ane. D-xylogalacturonane, la chaîne principale est composée d'acide galacturonique et la chaîne latérale est composée de xylose.

La paroi cellulaire est principalement composée de cellulose, d'hémicelluloses, de pectines et de lignine, et dans une moindre proportion de protéines.

### I.1.2.1. La cellulose

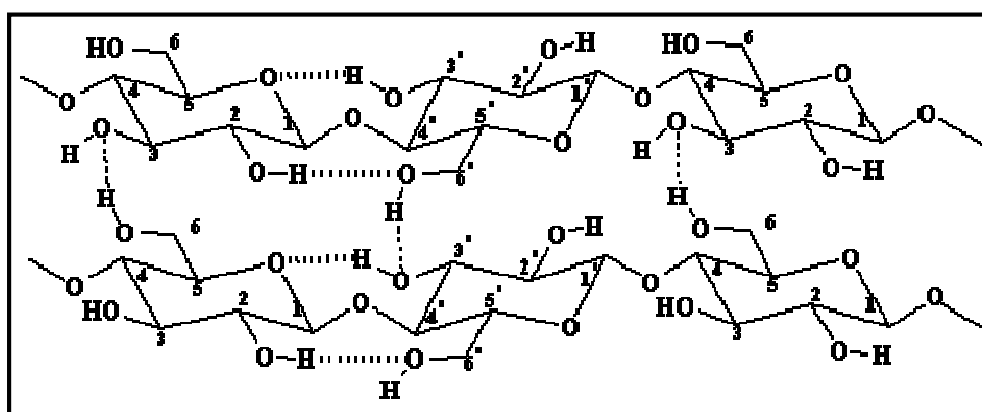
Directement issue de la photosynthèse, la cellulose est la molécule organique la plus abondante sur Terre ainsi que le matériau le plus important de la paroi des cellules végétales. La quantité de cellulose biosynthétisée par les plantes terrestres est estimée à 100 milliards de tonnes par an, constituant à elle seule 50% de la masse végétale (Robert et Roland, 1998). La molécule de cellulose est un homopolymère linéaire formé par un enchaînement d'unités cellobiose, motif composé de deux D-glucopyranose en conformation  ${}^1C_4$  liés par une liaison glucosidique  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4). Le degré de polymérisation (DP) qui représente le nombre d'unités glucosidiques par chaîne de cellulose est compris entre quelques centaines et plusieurs

---

\* Robert D., Roland J.C., *Biologie végétale*, volume 1, Organisation cellulaire, Ed. Doin, Paris, 1998, pp 367.

milliers selon sa provenance et sa situation au sein de la paroi cellulaire. La disposition des hydroxyles libres des glucoses permet l'établissement de liaisons hydrogènes intra-chaînes, stabilisant la molécule dans son orientation linéaire ce qui lui confère une certaine rigidité, et de liaisons inter-chaînes qui relient plusieurs molécules de cellulose et les maintiennent disposées parallèlement (figure 3). Ainsi, l'association de nombreuses molécules de cellulose permet la formation de micro-fibrilles, qui elles-mêmes s'assemblent en fibres et favorisent l'établissement d'un état solide ordonné, cristallin. La structure fibrillaire très condensée de la cellulose explique sa résistance aux attaques chimiques et enzymatiques, sa grande résistance mécanique à la traction, ainsi que son caractère non-soluble dans l'eau. La fraction cellulosique est considérée comme étant le résidu insoluble après l'extraction des autres polysaccharides de la paroi par des agents chélateurs et des bases minérales.

La cellulose est peu soluble dans les solvants organiques usuels du fait de son fort degré de cristallinité. Elle peut cependant être solubilisée dans divers systèmes comme les complexes métal/amine (solutions d'hydroxyde de cuprammonium ou cupriéthylènediamine), les oxydes d'amines tertiaires cycliques (N-méthylmorpholine-N-oxyde ou MMNO ; Johnson, 1969) ; plus récemment, la cellulose a été solubilisée dans le système chlorure de lithium / N,N-diméthylacétamide (McCormick et Shen, 1981).



**Figure 3** : Liaisons hydrogène intra- et intermoléculaires dans la cellulose.

\* Johnson D.L., Cyclic amine oxides as solvents for natural and synthetic polymers, *Brit.*, **1969**, pp 9.

\* Mc Cormick C.L., Shen T.C., A new cellulose solvent for preparing derivatives under homogenous conditions, *Organic Coatings and Plastics Chemistry*, **1981**, 45, 335-338.

### I.1.2.2. Les hémicelluloses

Les hémicelluloses représentent, après la cellulose, le polysaccharide le plus abondant dans la nature. Contrairement à la cellulose, elles ne peuvent pas être décrites de façon succincte du fait de leur importante diversité. De plus leur structure dépend de leur origine variétale, du tissu ou du type cellulaire, de l'âge des cellules et de leur localisation dans la paroi végétale. Elles diffèrent de la cellulose de par l'hétérogénéité de leur composition monosaccharidique. En général elles sont constituées de chaînes moléculaires plus courtes avec un degré de polymérisation souvent inférieur à 200. A l'origine, les hémicelluloses désignent des polysaccharides pariétaux alcalinosolubles ; cependant certains polysaccharides, tels que les arabinanes et les arabinogalactanes sont extraits par l'eau. Donc, par extension, les hémicelluloses regroupent tous les polysaccharides qui ne sont ni cellulosiques, ni pectiques, présents dans les parois cellulaires végétales.

A la linéarité et à la monotonie de constitution de la cellulose, s'opposent les multiples façons selon lesquelles s'associent les unités glucidiques dans les hémicelluloses. Elles sont formées d'une chaîne de monosaccharides liés par des liaisons glycosidiques résultant de la condensation d'un hydroxyle hémiacétalique d'un ose avec un hydroxyle alcoolique d'un autre. Cet enchaînement peut être constitué d'un seul type de monomère (homopolysaccharide) ou de plusieurs types différents (hétéropolysaccharide). Par hydrolyse acide ou enzymatique, les hémicelluloses libèrent des hexoses (glucose, mannose, galactose), des pentoses (xylose, arabinose), des désoxyhexoses (fucose et rhamnose) et des acides uroniques (acide glucuronique et son dérivé 4-*O*-méthyle, acide galacturonique). Les liaisons qui unissent ces motifs sont elles-mêmes variées. Les hémicelluloses sont constituées par un axe osidique principal, le suffixe *-ane* désignant la nature de cet axe ; par exemple, les xyloglucanes sont construits à partir d'une chaîne de glucose, substitué par des unités xylose. Cette chaîne principale peut être ramifiée par des chaînes latérales, qui empêchent le rapprochement des chaînes et donc l'arrangement cristallin.

### I.1.2.3. Les pectines

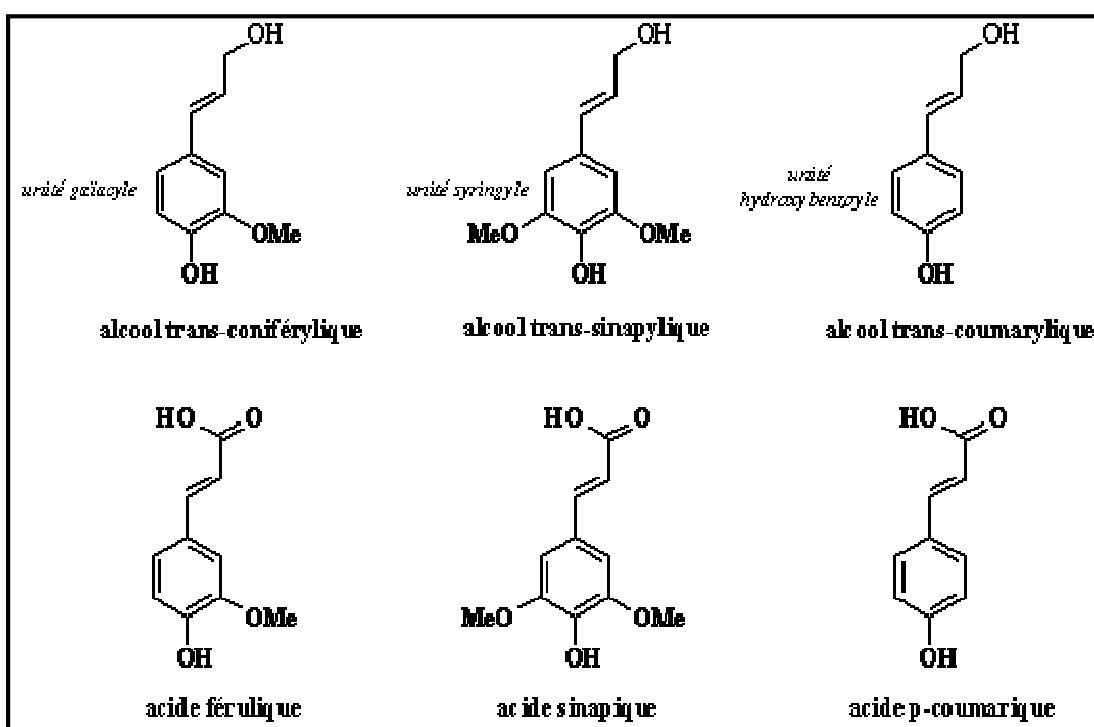
Ce sont les constituants essentiels de la lamelle moyenne à la base du « ciment » qui réunit les cellules entre elles. La structure principale des pectines est formée de chaînes linéaires faiblement polymérisées d'acides galacturoniques liés en  $\alpha$ -(1→4), appelé acide polygalacturonique, sur lesquelles s'insèrent des résidus de L-rhamnose. Cette zone est aussi qualifiée de lisse (« *smooth region* »). Chaque unité rhamnose introduit dans la chaîne un

coude et confère donc à l'ensemble une configuration en zig-zag. Des chaînes latérales de natures diverses, arabinanes, galactanes et arabinogalactanes sont aussi greffées sur le squelette rhamnogalacturonique, d'où la grande diversité de ces polymères. Cette structure ramifiée est aussi appelée zone chevelue (« *hairy region* »). Les fonctions acides sont souvent estérifiées par des groupements méthyles ou salifiées par des ions monovalents ou divalents tels que  $K^+$ ,  $Na^+$  et  $Ca^{2+}$ .

La solubilité des substances pectiques dépend de leur masse moléculaire, de la présence de chaînes latérales, mais aussi et surtout du degré de méthylestérification et de la distribution de ces groupements méthyles. Les pectines sont classées suivant leur mode d'extraction, soit à l'eau chaude pour les pectines hautement méthylestérifiées, soit par des agents chélateurs de cations divalents (EDTA, oxalate d'ammonium) pour les pectines faiblement méthylestérifiées et à l'acide dilué à chaud pour la protopectine (acide polygalacturonique).

#### I.1.2.4. Les lignines

Les lignines sont des polyphénols, macromolécules tridimensionnelles hydrophobes de haut poids moléculaire. Leur structure résulte de la copolymérisation de trois monomères aromatiques de type phénylpropène : l'alcool coumarylique, l'alcool coniférylique et l'alcool sinapylique, que l'on désigne sous le terme général de monolignols (figure 4) ; leurs précurseurs, les acides hydroxycinnamiques (ou alcools phénylpropénoïques), sont produits au niveau du réticulum endoplasmique des cellules en voie de lignification, à partir de la phénylalanine, désaminée en cinnamate, hydroxylée, méthylée et réduite en alcool au niveau de la fonction carboxyle. Au niveau de la paroi cellulaire, les monolignols sont oxydés en radicaux libres sous l'influence d'enzymes (laccases et peroxydases) ; ces radicaux polymérisent, plus ou moins au hasard et sans intervention enzymatique, ce qui explique la variabilité importante dans la structure des lignines. Cette polymérisation *in situ* s'accompagne de la formation de liaisons covalentes avec les glycanes de la paroi. A la fin du développement cellulaire la lignine incruste ainsi la cellulose et les hémicelluloses, ce qui assure la rigidité de la paroi, mais pose des problèmes lors de l'extraction des hémicelluloses.



**Figure 4** : Structure des monolignols et des acides hydroxycinnamiques précurseurs.



La proportion des trois monomères et les liaisons intramoléculaires sont très variables, dépendantes de l'origine botanique, du tissu et de la localisation dans la paroi.

Les lignines sont difficilement dégradées, très résistantes à de nombreux agents chimiques et biochimiques ; seuls certaines bactéries et champignons, comme les polypores, sont capables d'assurer la lignolyse. Elles sont très réactives, parce qu'elles contiennent entre autres des fonctions phénoliques et hydroxyles, et sont insolubles dans les solvants du fait qu'elles constituent un réseau infini. Pour caractériser les lignines, des méthodes de dégradation douces ont été mises au point, qui permettent de dépolymériser le réseau tridimensionnel du polymère sans dégrader ni les noyaux aromatiques, ni la chaîne propane. Cependant, du fait des opérations d'extraction, les lignines isolées (lignines d'extraction) sont différentes des lignines *in situ* (protolignines). Le terme de « klason lignine » est parfois employé et correspond au résidu après avoir débarrassé la paroi des extractibles hydrophiles et lipophiles, et des polysaccharides par de l'acide sulfurique fort.

#### I.1.2.5. Les autres constituants

En marge de ses constituants polysaccharidiques principaux, la paroi comporte d'autres catégories de polysaccharides. C'est notamment le cas de la callose, un  $\beta$ -(1,3) glucane (Aspinall et Kessler, 1957). Cette dernière est souvent détectée en réponse à des blessures ou des infections par des pathogènes. Par ailleurs, les arabinogalactanes protéines (AGP) peuvent être extraits d'un grand nombre de tissus. Elles sont composées de 10% de protéines riches en hydroxyproline, serine, alanine et glycine et de 90% de polysaccharides composés essentiellement d'Ara, Gal, Rha, Man, Gal A, Glc A (Tucker et Mitchell, 1993).

La paroi ne contient pas que des polysaccharides. Les substrats lignocellulosiques renferment également des lipides, des protéines ainsi que des substances de faible poids moléculaire, tels que les extraits et minéraux, spécifiques à chaque espèce végétale. La paroi contient généralement entre 3 et 6% de protéines, souvent sous forme de glycoprotéines, dont les extensines. Les autres sont des enzymes telles que la peroxydase ou diverses glycosidases.

---

\* Aspinall G.O., Kessler G., The structure of callose from te grape vine, *Chem. Ind.* , **1957**, 1296.

\* Tucker G.A., Mitchell J., Cell walls, structure, utilisation and manipulation, *Plant Biotechnology*, **1993**, 55-103.

### I.1.3. Organisation tridimensionnelle de la paroi : *des modèles d'hier à aujourd'hui.*

- Il existe une relation directe entre la conformation d'un polysaccharide et sa fonction à l'intérieur de la paroi. En effet, ces polymères jouent le rôle de matériaux de construction dans la consolidation de la paroi végétale. Ainsi la cellulose constitue l'armature de la paroi de par sa conformation rigide, alors que les hémicelluloses et les pectines, matériaux tampons, assurent une certaine flexibilité qui permet la croissance de la cellule ; enfin la lignine cimente l'édifice. Ces différentes macromolécules forment un réseau tridimensionnel dont la cohésion est assurée aussi bien par des liaisons de faible énergie, comme les liaisons de Van der Waals et des liaisons hydrogènes, que par des liaisons ioniques et covalentes. La proportion des quatre grandes catégories de molécules (cellulose, pectines, hémicelluloses et lignine) est fonction de la localisation dans la paroi cellulaire végétale (figure 5).
- Très peu de revues bibliographiques comparatives ont été, à notre connaissance, réalisées sur le thème de la structure et de l'organisation de la paroi cellulaire végétale. C'est sans doute ce qui explique le nombre limité des modèles moléculaires proposés pour elle. Trois cent cinquante années séparent cependant la première observation microscopique d'un tissu végétal par Robert Hooke (1635-1702) de l'image informatique d'un modèle moléculaire de paroi cellulaire végétale par Carpita et Gibeaut (1993). Récemment, Jean Claude Mollet (2006) a compilé les données publiées sur ce thème au cours des 50 dernières années. Les bases historiques de la structure de la paroi végétale ont été établies d'après des résultats obtenus essentiellement par des techniques de cytologie et de biochimie. Avant les années 50, les premières observations de la paroi sont réalisées à l'aide de colorants cytochimiques (carmin aluné, vert d'iode, rouge de ruthénium...) qui permettent de distinguer plusieurs composés en fonction de leur nature chimique. En microscopie électronique, la paroi primaire apparaît constituée d'une structure fibrillaire baignant dans un matériel matriciel ayant tous deux une nature polysaccharidique (Bonner, 1936). D'autres composés de nature protéique et lipidique (la cuticule), sont aussi mis en évidence. Au cours des années 60 et 70, les outils technologiques permettant l'étude de la composition et des structures des polysaccharides pariétaux conduisent à la classification des différents composés formant la paroi. Ces techniques – CPG, CPG-MS, RMN – sont aujourd'hui utilisées en routine au laboratoire. C'est dans ce contexte, qu'un premier modèle de la paroi primaire végétale est proposé par Keegstra *et al* (1973). Dans ce modèle (figure 6), tous les polymères non cellulosiques sont reliés entre eux par des liaisons covalentes pour former un réseau xyloglucane - pectines – extensines – arabinogalactanes. Les microfibrilles de cellulose sont attachées à la matrice et

---

\* Carpita N.C., Gibeaut D.M., Structural models of primary cell walls in flowering plants : consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth, *Plant Journal*, **1993**, 3(1), 1-30.

\* Mollet J.C., *La paroi primaire végétale*, Habilitation à Diriger les Recherches, Université d'Artois, **2006**, pp 121.

\* Bonner J, The chemistry and physiology of the pectins, *Bot. Rev.*, **1936**, 2, 475-497.

plus particulièrement aux xyloglucanes par l'intermédiaire de liaisons hydrogènes. Dans ce modèle, l'extension cellulaire (acid-induced growth) ne nécessite pas forcément une hydrolyse des liaisons covalentes mais une séparation temporaire des fibrilles de celluloses et des xyloglucanes pourrait permettre un glissement latéral des microfibrilles. Cette hypothèse fut abandonnée quand Valent et Albersheim (1974) montrèrent que les liaisons hydrogènes entre les microfibrilles de cellulose et les xyloglucanes étaient renforcées plutôt qu'amointries en condition de pH acide.

- A partir des années 90, la paroi végétale, perçue jusqu'alors comme une structure inerte extérieure à la cellule, commence à être considérée comme partie intégrante de la cellule. De plus, étant le premier contact avec l'espace environnant ou entre les cellules, elle est donc un lieu de passage où le transfert d'information est inéluctable (Roberts, 1994). La paroi végétale formerait donc un réseau dans lequel les polysaccharides, les protéines et les glycoprotéines sont étroitement interconnectées. Cette vue beaucoup plus dynamique de la paroi végétale est maintenant bien installée. En effet, de nombreuses observations ont montré que des changements structuraux, pouvant être limités à des microdomaines, apparaissent au cours de la maturation, de l'extension et de la dégradation des parois et doivent sans aucun doute être régulés spécifiquement. Deux types de paroi cellulaire végétale primaire (paroi de type I et de type II) sont considérés par Carpita et Gibeault (1993) - figure 7 - repris par Carpita et McCann (2000) - Figure 8. Ces deux types de paroi sont essentiellement basés sur les différences chimiques observées entre la paroi des plantes à fleurs (type I) et certaines espèces herbacées comme les graminées (type II). La paroi primaire de type I est composée principalement de cellulose, de xyloglucanes, de pectines et d'extensine (figure 8A). La paroi primaire de type II est essentiellement composée de cellulose, de glucuronoarabinoxylanes et comprend des groupements phénoliques (figure 8B).

---

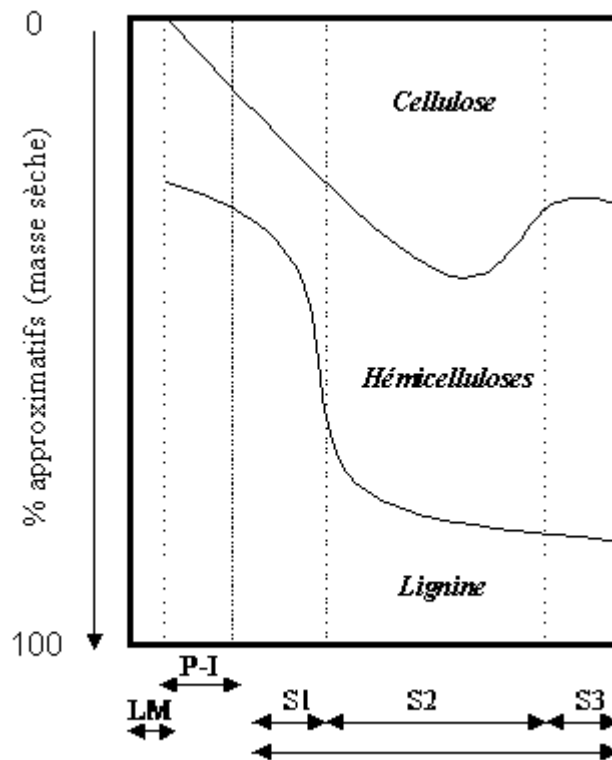
\* Keestra K, Talmadge KW, Bauer WD, Albersheim P, Structure of plant cell walls. III. A model of the walls of suspension-cultured sycamore cells based on the inter-connections of the macromolecular components, *Plant Physiol.*, **1973**, 51, 188-197.

\* Valent BS, Albersheim P, The structure of plant cell walls. V. On the binding of xyloglucan to cellulose fibers. *Plant Physiol.*, **1974**, 54, 105-108.

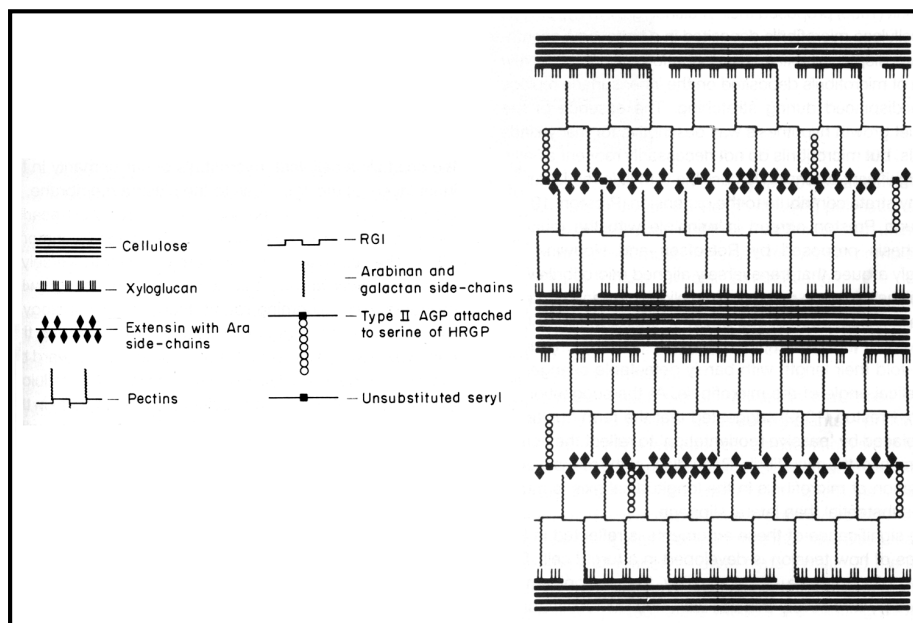
\* Roberts K, The plant extracellular matrix: in a new expansive mood. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **1994**, 6, 1020-1027.

\* Carpita N.C., Gibeault D.M., Structural models of primary cell walls in flowering plants : consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth, *Plant Journal*, **1993**, 3(1), 1-30.

\* Carpita N., Mc Cann M., The cell wall, *American society of plant physiologists*, **2000**, 2,52-76.



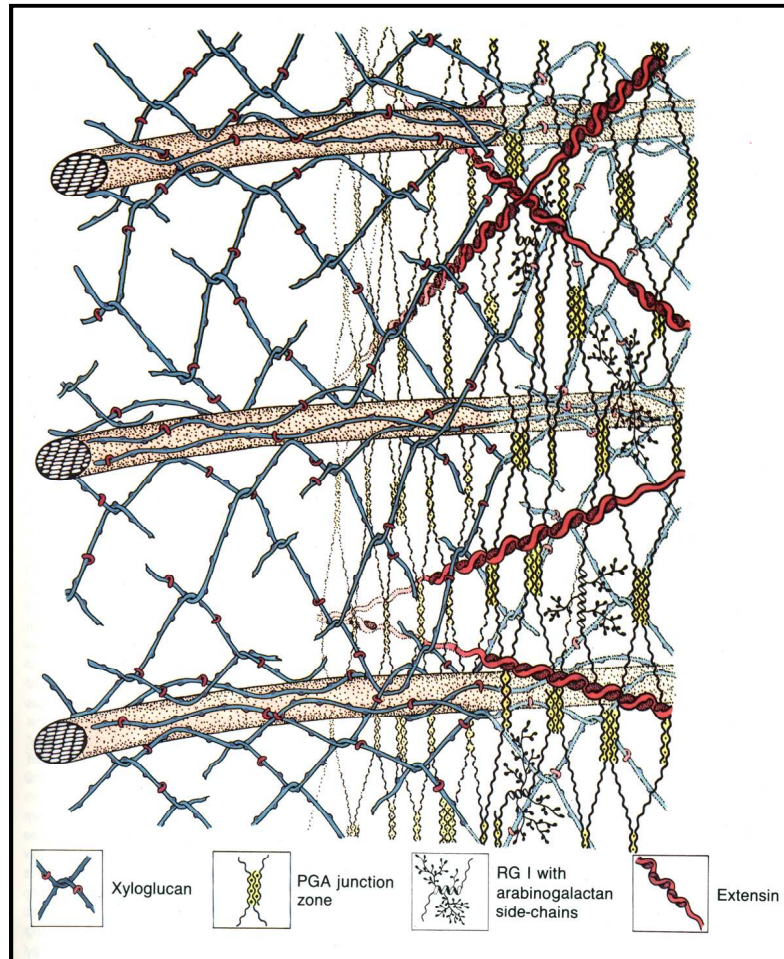
**Figure 5** : Composés chimiques de la paroi des cellules de bois (exprimés en % massique) et leur distribution d'après Popa (1996). LM : Lamelle Moyenne ; P-I : Paroi primaire ; P-II : Paroi



**Figure 6** : Premier modèle de la paroi primaire végétale présenté par Keegstra *et al* (1973).

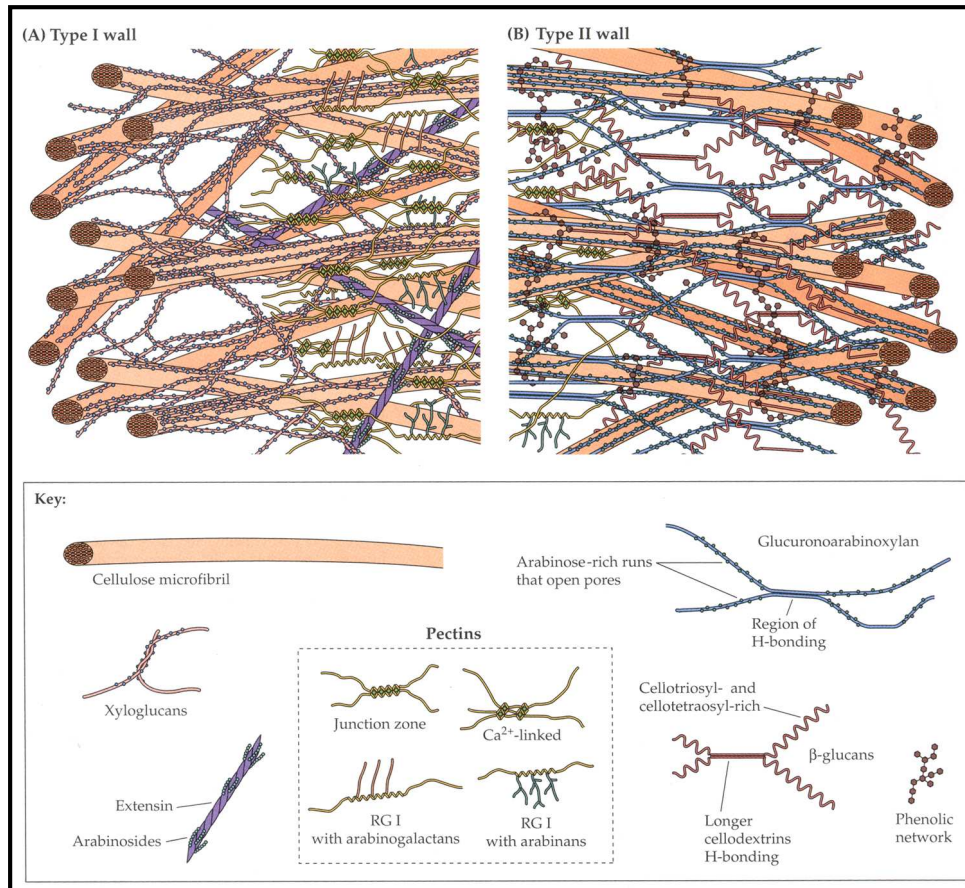
\* Keegstra K., Talmadge K.W., Bauer W.D., Albersheim P., Structure of plant cell walls .III. A model of suspension-cultured sycamore cells based on the inter-connections of macromolecular components, *Plant Physiology*, **1973**, 51, 188-197.

\* Popa V.I., Hemicelluloses, In: *Polysaccharides in Medicinal Applications*, **1996**, 107-124.



**Figure 7 :** Représentation schématique de la paroi primaire végétale des plantes à fleurs (type I) pendant l'élongation cellulaire. Schéma tiré de Carpita et Gibeault (1993).

\* Carpita N.C., Gibeault D.M., Structural models of primary cell walls in flowering plants : consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth, *Plant Journal*, **1993**, 3(1), 1-30.



**Figure 8 :** Représentation schématique de la paroi primaire végétale des plantes à fleurs (type I) (A) et de certaines espèces monocotylédones herbacées (type II) (B). Schémas tirés de Carpita et McCann (2000).

\* Carpita N., Mc Cann M., The cell wall, *American Society of Plant Physiologists*, 2000, 2,52-76.

## **I.2. Les pectines : une classe de polysaccharide pariétal typique des végétaux**

### **I.2.1. Sources de pectines à usages industriels**

Même si les pectines sont très largement répandues dans les tissus végétaux où elles sont un ciment intercellulaire dans la lamelle moyenne et un liant intermoléculaire dans la paroi primaire, le nombre de sources naturelles qui peuvent être utilisées pour des usages industriels est limité. Les propriétés physico-chimiques des pectines - *base de leur utilisation industrielle* - dépendent très largement de leurs caractéristiques structurales qui elles-mêmes sont expliquées par la plante qui est à l'origine de leurs synthèses. C'est pourquoi, la détection de grandes quantités de pectines dans une source végétale n'est pas un argument suffisant pour que ces dernières puissent être valorisées à une échelle industrielle. Le cas des pectines de betteraves dont l'acétylation des fonctions alcools secondaires des acides galacturoniques s'oppose à la gélification en est une parfaite illustration. Le tableau 1, précise les sources actuelles de pectines commerciales.

### **I.2.2. Extraction des pectines**

#### **I.2.2.1. Méthodes chimiques**

Le problème principal auquel est confronté l'expérimentateur est celui de la richesse chimique de la paroi cellulaire végétale qui se traduit par la grande diversité structurale des macromolécules, essentiellement polysaccharidiques, qui y sont représentées. Les protocoles à utiliser doivent donc être suffisamment sélectifs pour permettre l'extraction privilégiée des pectines. Ils doivent également avoir le souci de protéger l'intégrité des structures moléculaires en limitant la dégradation de ces dernières. La question à laquelle doit répondre l'expérimentateur est de savoir quel type de pectine extraire, à partir de quel matériel végétal, pour quelles propriétés, en vue de quelles applications et en utilisant quels protocoles. Accessoirement, et du point de vue de l'industriel, il est également utile de réfléchir au devenir des résidus d'extraction, souvent composés de fibres végétales, qui sont générés lors de la mise en œuvre des procédés.

Il n'existe pas à proprement parler de protocole universel d'extraction des pectines et un grand nombre de pratiques reposent sur un savoir-faire propre à chaque laboratoire. Néanmoins, quelques-unes de ces pratiques sont couramment répertoriées dans la littérature (Thibault *et al.*, 1994 ; Voragen *et al.*, 1995). Les pectines sont des hydrocolloïdes et à ce titre

sont fréquemment isolées après extraction en solution aqueuse (à froid ou à chaud) et précipitation à l'alcool. Le précipité ainsi obtenu est dissout dans l'eau, filtré, dialysé contre de l'eau distillée, parfois dépigmenté par passage sur cartouche C-18 et enfin lyophilisé pour être conservé. L'extraction des pectines acides faiblement méthylestérifiées est facilitée par la présence de chélateur de calcium tel que le CDTA, l'EDTA, l'imidazole ou l'oxalate d'ammonium (Mc Neil *et al.*, 1979 et 1980 ; Redgwell *et al.*, 1992).

A une échelle industrielle, les pectines sont extraites dans l'eau chaude (généralement 90 à 100°C), en milieu acide (pH compris entre 1.5 et 3) et pour des temps variables (0.5 à 6 heures) (Ralet M.C. *et al.*, 2002). Outre une déméthylestérification des pectines, de tels protocoles ont souvent pour conséquence d'induire la dépolymérisation de ces dernières et notamment l'hydrolyse des chaînes neutres d'arabinose plus fragile en conditions acides. On note également l'hydrolyse des dimères de RG-II. Enfin, tout comme la société SILAB, de nombreuses entreprises ont recours aux enzymes pectolytiques pour solubiliser les domaines pectiques. Ce dernier aspect sera abordé de façon spécifique dans le chapitre II.

#### I.2.2.2. Prétraitements physiques

##### I.2.2.2.a Ultrasons

Appliqué à l'extraction des pectines de marc de pomme, la sonication comme préalable de l'extraction augmente de 23 à 28 % les rendements massiques d'extraction sans que la texture du gel obtenue ne soit altérée (Panchev et Kirchev, 1988).

##### I.2.2.2.b Micro-ondes

Très largement employée en Chimie organique contemporaine, l'utilisation des micro-ondes pour extraire les pectines diminuerait les temps et donc les coûts d'extraction (Wang et

---

\* Thibault J.F., Renard C., Guillon F., Physical and chemical analysis of dietary fibres in sugar beet and vegetables, Jackson J.F., Linsken H.F. (Eds), In : *Modern methods of plant analysis, Vegetables and vegetable products*, Springer Verlag Berlin, **1994**, 16, 23-55.

\* Voragen A.G.J., Pilnik W., Thibault J.F., Axelos M.A.W., Renard C.M.G.C., Pectins, In : *Food polysaccharides* (Stephen A.M., Dea Y., Eds), London : Marcel Dekker, **1995**, 287-339.

\* Mc Neil M., Darvill A., Albersheim P., The structural polymers of the primary cell walls of dicots. In : Cantor, Ch(Ed.), *Progress in the chemistry organic natural products*. Viena : Springer-Verlag, **1979**, 29, 191-195.

\* Mc Neil M., Darvill A.G., Albersheim P., Structure of cell walls. X. Rhamnogalacturonan I, a structurally complex pectic polysaccharide in the walls of suspension-cultured sycamore cells, *Plant. Physiol.*, **1980**, 66, 1128-1134.

\* Redgwell R.J., Melton L.D., Brasch D.J., Cell wall dissolution in ripening kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). Solubilization of pectic polymers, *Plant Physiol.*, **1992**, 98, 71-81.

\* Ralet M.C., Bonin E., Thibault J.F., Pectins. Dans : *Biopolymers vol. 8, Polysaccharides II*, Steinbüchel A. (Ed.), Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, **2002**, 12 : 345-380.

\* Panchev I., Kirchev N., Krachanov Kh., Improving pectin technology II. Extraction using ultrasonic treatment, *International Journal of Food Science and Technology*, **1988**, 23(4), 337-341.



Chen, 2007). Appliquée à l'extraction des pectines à partir de l'albedo des agrumes, l'utilisation des micro-ondes limiterait - en comparaison avec des protocoles conventionnels - les phénomènes de dépolymérisation de ces dernières préservant par voie de conséquence leurs propriétés physico-chimiques (Fishman et Chau, 2000).

#### I.2.2.2.c Pression

L'extraction des pectines d'agrumes réalisée sous pression, tout en préservant le rendement massique d'extraction, génère - *par rapport à des protocoles conventionnels* - des extraits de masses moléculaires plus importantes (Brat et al, 2002; Kuribayashi, 1992).

---

\* Wang S., Chen F., Wu J., Wang Z., Liao X., Hu X., Optimization of pectin extraction assisted by microwave from apple pomace using response surface methodology, *Journal of food engineering*, **2007**, 78, 693-700.

\* Fishman M.L., Chau H.K., Hoagland P., Ayyad K., Characterization of pectin, flash extracted from orange albedo by microwave heating, under pressure, *Carbohydr. Res.*, **2000**, 323, 126-138.

\* Brat P., Olle D., Reynes M., Alter P., Low pressure procedure for manufacture of pectin rich citrus extract, **2002**, brevet n° WO 2002013634.

\* Kuribayashi T., Properties of pressure extracted from *Satsuma mandarin* by pressure treatment, Colloque INSERM, **1992**, 224, 337-339.

**Tableau 1** : Principales sources de pectines d'intérêt industriel d'après Thakur *et al.* (1997).

<b>Fruits</b>	<b>% de pectines (% massique)</b>
Pomme ( <i>Malus spp.</i> )	0.5-1.6
Marc de pomme	1.5-2.5
Banane ( <i>Musa acuminata</i> L.)	0.7-1.2
Pulpe de betterave ( <i>Beta vulgaris</i> L.)	1.0
Carambole ( <i>Averrhoa carambola</i> L.)	0.66
Carotte ( <i>Daucus carota</i> L.)	0.2-0.5
Goyave ( <i>Psidium guajava</i> L.)	0.77-0.99
Pulpe de citron ( <i>Citrus lemon</i> L.)	2.5-4.0
Litchi ( <i>Litchi chinesis</i> S.)	0.42
Mangue ( <i>Mangifera indica</i> L.)	0.26-0.42
Zeste d'orange ( <i>Citrus sinensis</i> )	3.5-5.5
Papaye ( <i>Carcia 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 sosmosus</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

\* Thakur B.R, Singh R.K., Handa A.K., Chemistry and uses of pectin a review, *Critical reviews in food science and nutrition*, 1997, 37(1), 47-73.

### I.2.3. Analyse des compositions monosaccharidiques

Le dosage et l'identification des monosaccharides constitutifs des polysaccharides nécessitent la rupture de toutes les liaisons glycosidiques. L'analyse repose d'une part sur des techniques colorimétriques et d'autre part sur des techniques chromatographiques en phase gazeuse.

#### I.2.3.1. Méthodes colorimétriques : *dosages des oses neutres, des acides uroniques et des sucres réducteurs*

Les méthodes colorimétriques sont des techniques de dosage simples à mettre en œuvre et rapides, qui s'appliquent aussi bien à des résidus qu'à des extraits et permettent de doser de manière globale les sucres totaux et de manière spécifique les acides uroniques. Le principe des dosages colorimétriques repose sur la condensation, par estérification, d'un chromogène (figure 9) avec les produits de déshydratation des pentoses, hexoses et acides uroniques. En milieu acide fort et à chaud, ces oses se déshydratent respectivement en des dérivés du furfural, 5-hydroxyméthylfurfural et de l'acide 5-formylfuroïque (figure 10). Les chromophores ainsi formés absorbent dans le domaine du visible proportionnellement avec la quantité de sucres présents. Le dosage de la quantité de sucres totaux, mesurée selon la méthode de Dubois (1956), utilise le phénol plus sensible à la détermination quantitative des oses que des chromogènes tels que le naphthol ou l'antrone. Le *mé*ta-hydroxydiphényle en présence de tétraborate de sodium a été utilisé comme chromophore sélectif lors du dosage des acides uroniques. Les concentrations relatives en oses neutres et en acides uroniques des solutions polysaccharidiques ont été déterminées par la méthode de correction développée par Montreuil et Spick (1963). Il est alors possible de corriger les interférences des acides uroniques dans le dosage des sucres totaux et réciproquement.

Le dosage des oses réducteurs peut être déterminé par la méthode de Nelson-Somogyi ou encore par celle de l'acide parahydroxybenzoïque hydrazide (PAHBAH) de Lever (1972), figure 11.

---

\* Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F., Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.*, **1956**, 28, 350-356.

\* Montreuil J., Spik G., Chosson A., Segard E., Scheppler N., Methods of study of the structure of glycoproteins, *J. Pharm. Belg.*, **1963**, 18, 529-546.

\* Lever M., New reaction for colorimetric determination of carbohydrates, *Anal. Biochem.*, **1972**, 47(1), 273-279.

### I.2.3.2. Méthodes chromatographiques

Afin de déterminer la composition osidique d'un polysaccharide, on procède à son hydrolyse. Les monosaccharides libérés sont ensuite analysés aussi bien par HPLC que par CPG en utilisant diverses procédures de dérivation.

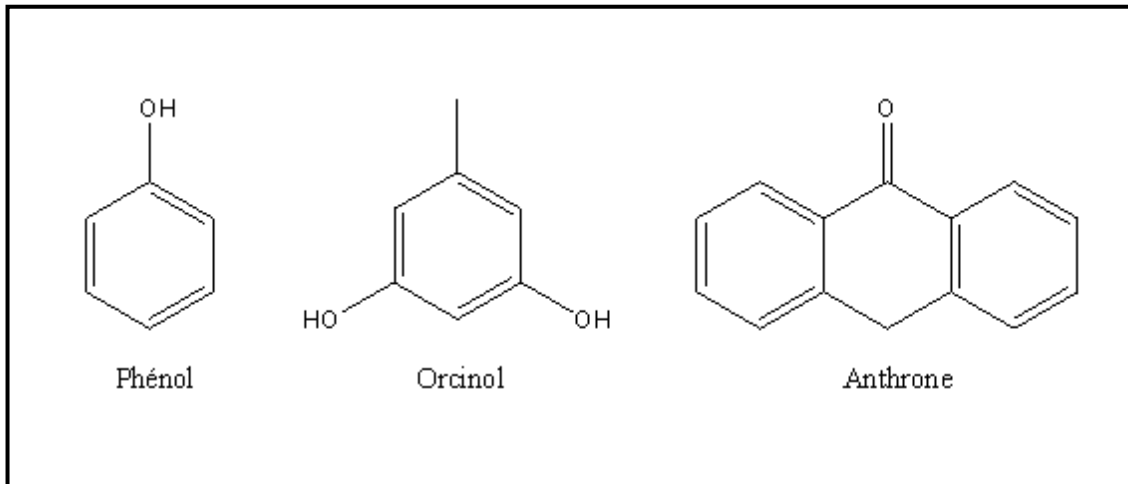
#### I.2.3.2.a Hydrolyse des liaisons glycosidiques

Le principe consiste à hydrolyser l'échantillon à analyser par un acide. La dépolymérisation peut être conduite avec des acides de forces et de concentrations variables sous diverses conditions opératoires (température, temps de réaction) selon la nature et la structure du polysaccharide. En effet, les différents types de liaisons osidiques présentent des taux d'hydrolyse variables en fonction de la stabilité relative des liaisons ( $1,6' > 1,4' > 1,3' > 1,2'$ ). De même, la nature des liaisons glycosidiques entre deux unités osidiques contiguës présente une différence de stabilité par rapport au cas usuel de deux unités glucosidiques liées en  $1,4'$  (figure 12-I). Les liaisons glycosidiques entre une unité osidique et une autre unité portant un groupement carboxylique ou amine (figure 12-II, III) seront plus difficiles à rompre que des liaisons entre un ose et un autre sous la forme furanose, anhydro ou deoxy (figure 12-IV, V, VI), Ciancia et Cerezo. (1993). Des acides minéraux forts peuvent être par exemple employés à chaud pour l'étude des dérivés cellulosiques mais, en raison des dégradations non spécifiques inhérentes à la force de l'acide, l'acide trifluoroacétique est préféré à l'acide sulfurique. Il présente de plus l'avantage d'être simplement éliminé par co-évaporation avec du méthanol. Le rendement d'hydrolyse est très dépendant des conditions opératoires. En effet, une température trop élevée du milieu réactionnel provoque la dégradation de certains oses, notamment le xylose Blakeney *et al* (1983). La force de l'acide peut également entraîner une dégradation des acides uroniques par décarboxylation. La stabilité des monosaccharides libres en solution, variant fortement d'un ose à l'autre, nécessite la mise au point de conditions optimales d'hydrolyse pour chaque type de monosaccharides. Pour pallier aux difficultés d'une hydrolyse acide non quantitative, la méthanolyse a été choisie comme méthode de clivage efficace des liaisons glycosidiques entraînant peu de dégradation

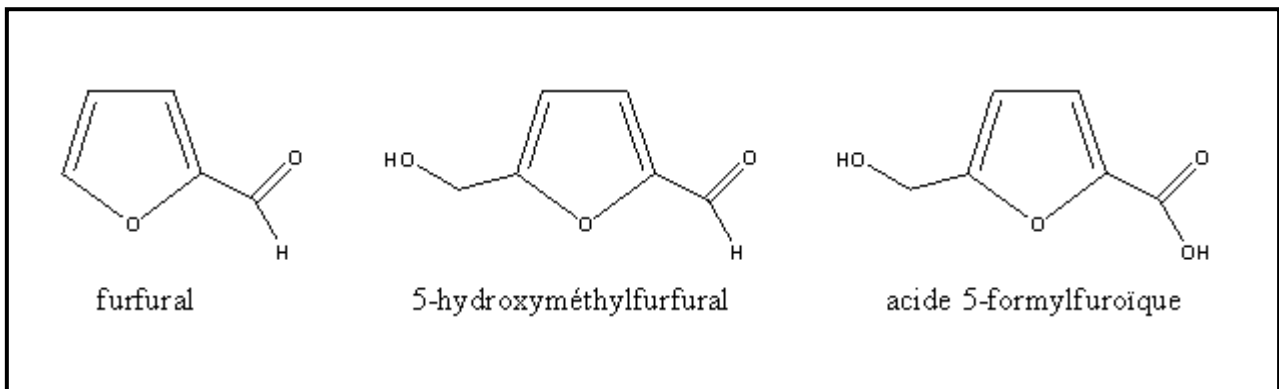
---

\* Ciancia M., Cerezo A.S., Autohydrolysis of polysaccharides, *Carbohydr. Res. Brazil*, **1993**, 45, 54-61.

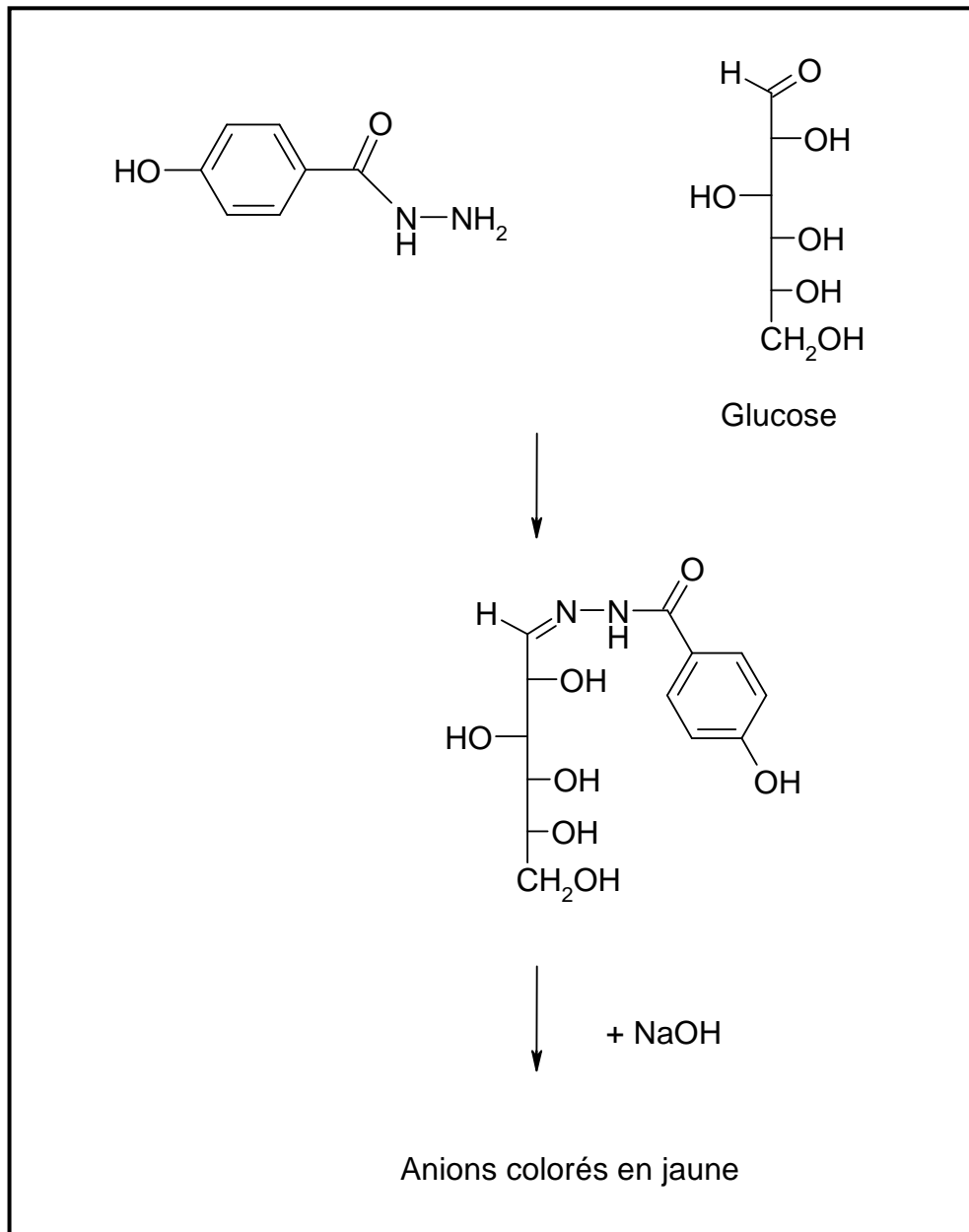
\* Blakeney A.B., Harris P.J., Henry R.J., Stones B.A., A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis, *Carbohydr. Res.*, **1983**, 113, 291-299.



**Figure 9** : Exemples de chromogènes.



**Figure 10** : Dérivés furfuriques obtenus par déshydratation des pentoses, hexoses et acides uroniques.



**Figure 11** : Réaction du dosage des sucres réducteurs.

Chambers *et al* (1971). Ne pouvant être appliquée à l'analyse d'échantillons cristallins, la méthanolyse présente néanmoins l'avantage d'une conversion quasi-totale en méthylglycosides après 24 heures de réaction à 80°C en présence de méthanol chlorhydrique 1M (figure 13). Les méthylglycosides présentent en outre une très forte stabilité en solution.

#### I.2.3.2.b Méthodes de dérivation des sucres pour l'analyse par CPG

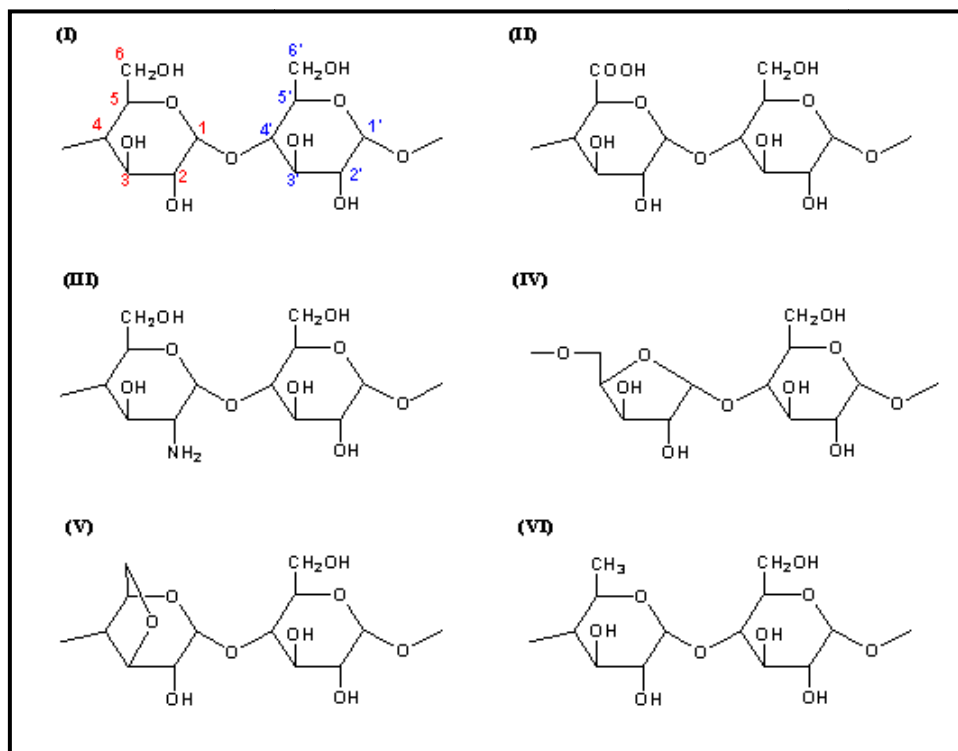
La chromatographie en phase gazeuse est une technique d'analyse rapide, qui du fait de sa grande sensibilité, et de sa capacité à séparer des mélanges complexes permet d'apprécier qualitativement et quantitativement la composition de différents extraits glucidiques. Contrairement à la chromatographie liquide haute performance qui permet de réaliser directement la séparation de différents monosaccharides, la chromatographie en phase gazeuse doit être réalisée sur des composés modifiés rendus plus volatils. Pour cela, les techniques de dérivation sont nombreuses (tableau 2). Les méthodes les plus courantes sont la *per*triméthylsilylation des monosaccharides (ou de leur méthylglycosides) et la réduction des monosaccharides en alditols par le borohydrure de sodium suivie de leur acétylation par l'anhydride acétique en présence de *N*-méthylimidazole. Les dérivés aldonitriles acétates et trifluoroacétates ont été également couramment décrits et les méthylloximes acétates sont parfois employés. Les produits volatils obtenus sont ensuite séparés sur colonnes capillaires puis détectés par CPG équipée d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). Les phases stationnaires utilisées pour la séparation des dérivés glucidiques sont apolaires et greffées par des dérivés siloxanes.

En fonction de la méthode d'analyse sélectionnée, les oses seront observés sous la forme d'un ou plusieurs pics. En effet, en solution, les oses existent en équilibre dynamique entre leurs formes cycliques et ouvertes. Lors de l'équilibre mutarotationnel, deux anomères  $\alpha$  et  $\beta$  peuvent être formés pour chacune des formes furanose et pyranose (figure 14). Ainsi, jusqu'à quatre isomères peuvent être observés par monosaccharides. La méthode des alditols acétates nécessite la réduction préalable des monosaccharides par le borohydrure de sodium puis leur acétylation en présence d'anhydride acétique dans de la pyridine (figure 15 ; Michalski, 1986).

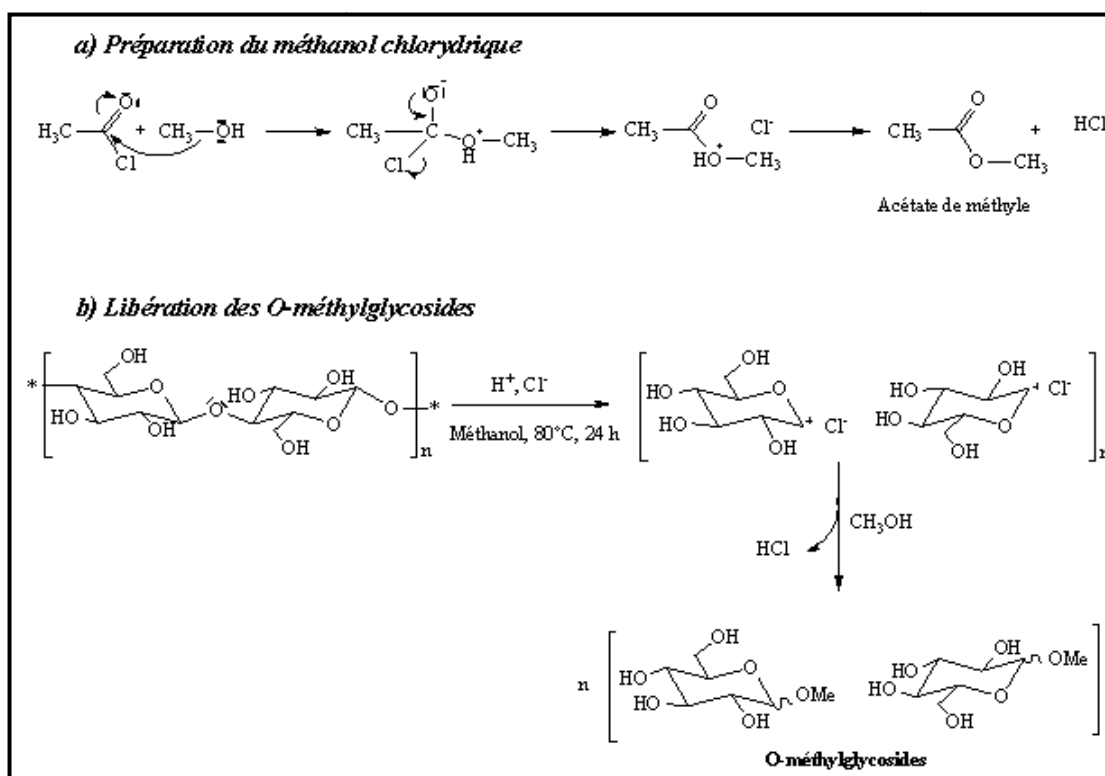
---

\* Chambers R.E., Clamp J.R., An assesment of methanolysis and other factor used in analysis of carbohydrate-containing material, *Biochem. J.*, **1971**, 125, 1009-1018.

\* Michalski J.C., Analysis of monosaccharides by GLC and by HPLC. In : Verbert, A., (Eds.), *Methods on glycoconjugates*, Harwood Academic Press, Chur, Switzerland, **1986**, 31-38.



**Figure 12 :** Différents types de liaisons glycosidiques entre différentes unités osidiques.



**Figure 13:** Préparation des méthylglycosides selon la méthode proposée par Kamerling *et al.*, 1975.

\* Kamerling J.P., Gerwig G.J., Vliegthart J.F.G., Clamp J.R, Characterization by gas liquid chromatography mass spectroscopy of pertrimethylsilyl glycosides obtained in the methanolysis of glycoproteins and glycolipids, *Biochem. J.*, **1975**, 151, 491-495.



Cette méthode est très souvent employée du fait de la stabilité des composés formés et de leur bonne résolution chromatographique. Dans ce cas, chaque monosaccharide modifié sera identifié sous la forme d'un pic. Contrairement à la méthode précédente, la silylation d'un *O*-méthylglycoside conduira à la formation de plusieurs isomères. Cette méthode est cependant souvent employée puisqu'elle présente l'avantage de permettre une identification simultanée des hexoses, déoxyhexoses, pentoses, acides uroniques et osamines. Les dérivés triméthylsilylés sont obtenus selon la méthode de Kamerling et *al.* (1975), modifiée par Montreuil et *al.* (1986), par réaction des *O*-méthylglycosides avec du BSTFA (*N,O*-bis-triméthylsilyltrifluoroacétamide) 95 % stabilisé par du TMSCl (chlorure de triméthylsilane) 5 % dans de la pyridine anhydre (figure 16).

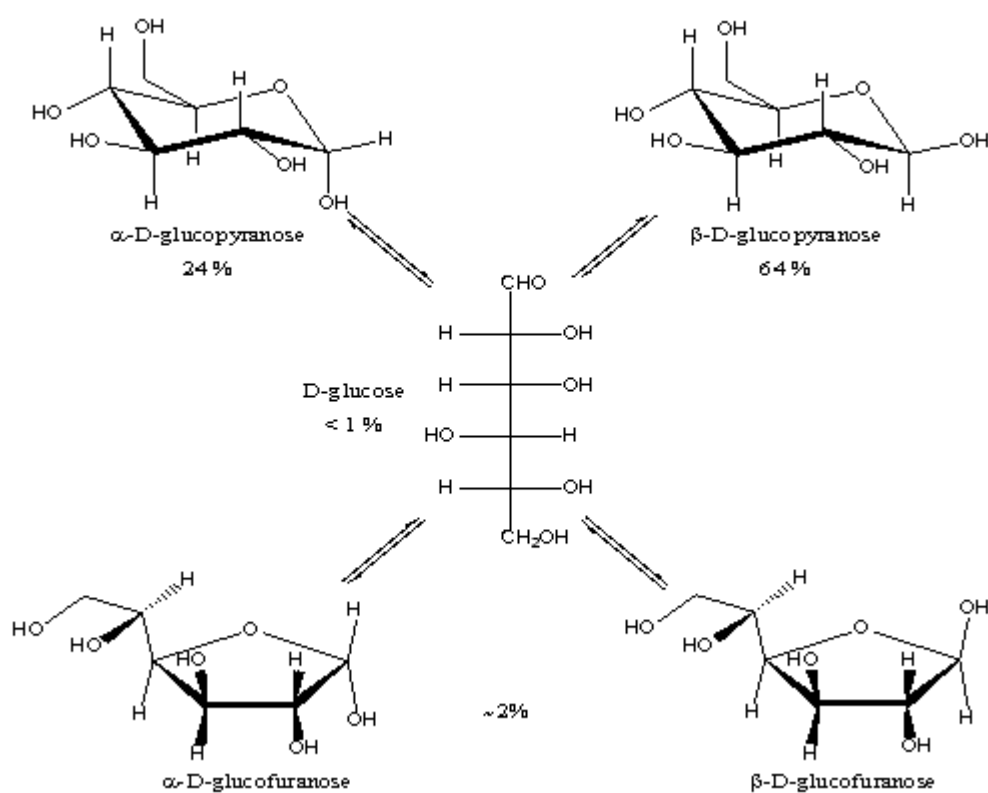
---

\* Kamerling J.P., Gerwig G.J., Vliegthart J.F.G., Clamp J.R., Characterization by gas liquid chromatography mass spectroscopy of pertrimethylsilyl glycosides obtained in the methanolysis of glycoproteins and glycolipids, *Biochem. J.*, **1975**, 151, 491-495.

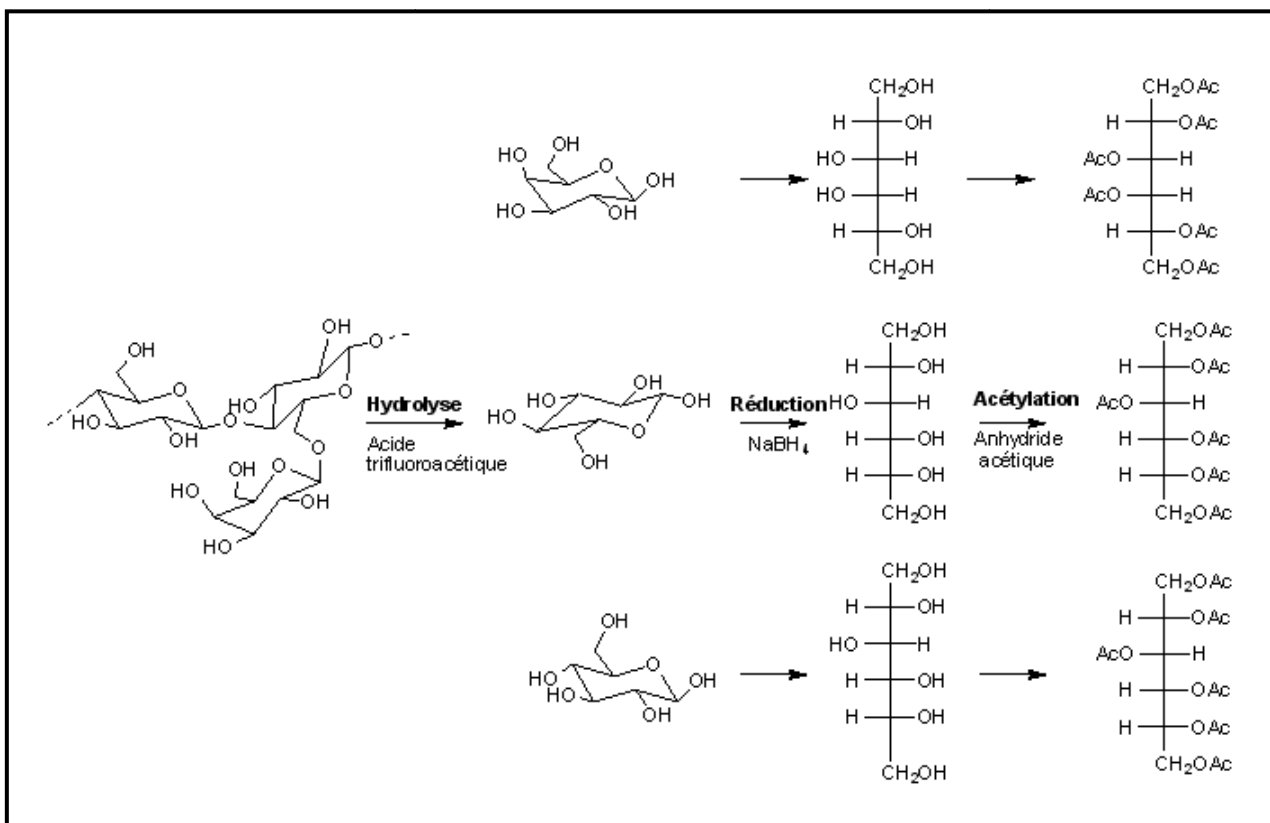
\* Montreuil J., Bouquelet S., Debray H., Fournet B., Spik G., Strecker G., Glycoproteins, In : Chaplin, M.F., Kenedy, J.F. (Eds), *Carbohydrate analysis, a practical approach*, IRL Press, Oxford, Washington D.C., **1986**, 143-204.

**Tableau 2 :** Méthodes de dérivation des monosaccharides

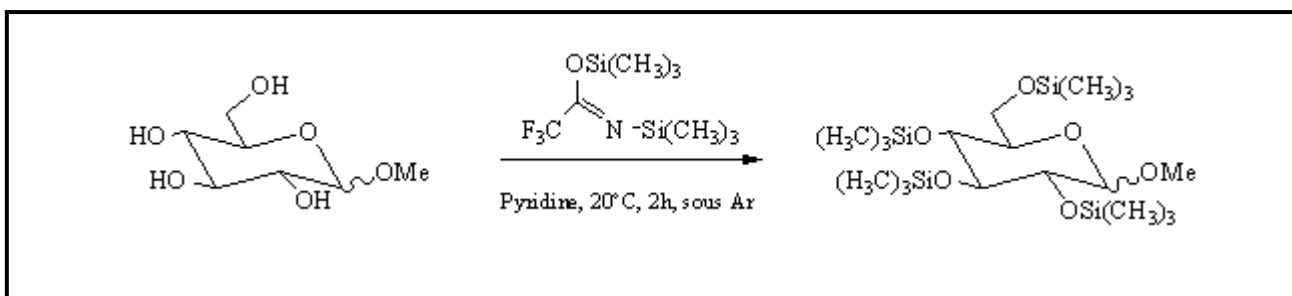
Méthodes de dérivation	dérivés
Pertriméthylsilylation	TMS
Acétylation	acétates
Trifluoroacétylation	trifluoroacétates
Réduction/actéylation	alditols acétates
Oximation/acétylation	aldonitriles acétates
O-méthoxylation/acétylation ou triméthylsilylation	O-méthoxyoxime acétates ou O-méthoxyoxime TMS



**Figure 14 :** Équilibre mutarotationnel du glucose.



**Figure 15 :** Méthode de préparation des alditols acétates d'après Michalski, 1986.



**Figure 16:** Méthode de triméthylsilylation des O-méthylglycosides, d'après Kamerling *et al.*, 1975 .

\* Michalski J.C., Analysis of monosaccharides by GLC and by HPLC. In : Verbert, A., (Eds.), *Methods on glycoconjugates*, Harwood Academic Press, Chur, Switzerland, **1986**, 31-38.

\* Kamerling J.P., Gerwig G.J., Vliegthart J.F.G., Clamp J.R, Characterization by gas liquid chromatography mass spectroscopy of pertrimethylsilyl glycosides obtained in the methanolysis of glycoproteins and glycolipids, *Biochem. J.*, **1975**, 151,491-495.

## I.2.4. Analyse structurale des polysaccharides pectiques

### I.2.4.1. Obtention d'oligosaccharides

La méthodologie d'analyse d'un polysaccharide repose sur l'obtention d'unités oligosaccharidiques plus faciles à caractériser par les techniques de RMN et de spectrométrie de masse. Cependant, dans le cas des polysaccharides contenant des acides uroniques, la stabilité de la liaison uronosidyle rend souvent délicate l'application des méthodes classiquement utilisées en Chimie des sucres. Les liaisons engageant un ou plusieurs acides hexuroniques peuvent néanmoins constituer une zone de rupture privilégiée. Cette propriété est souvent mise à profit pour le développement de méthodes spécifiques applicables aux polysaccharides natifs contenant des acides uroniques. Les méthodes les plus efficaces demeurent toutefois celles qui font appel aux enzymes spécifiques qui vont permettre l'obtention d'unités de répétitions plus facilement analysables. Ce mode de préparation est particulièrement bien adapté à des polymères tels que les pectines qui sont composées d'enchaînements homogènes d'acides galacturoniques.

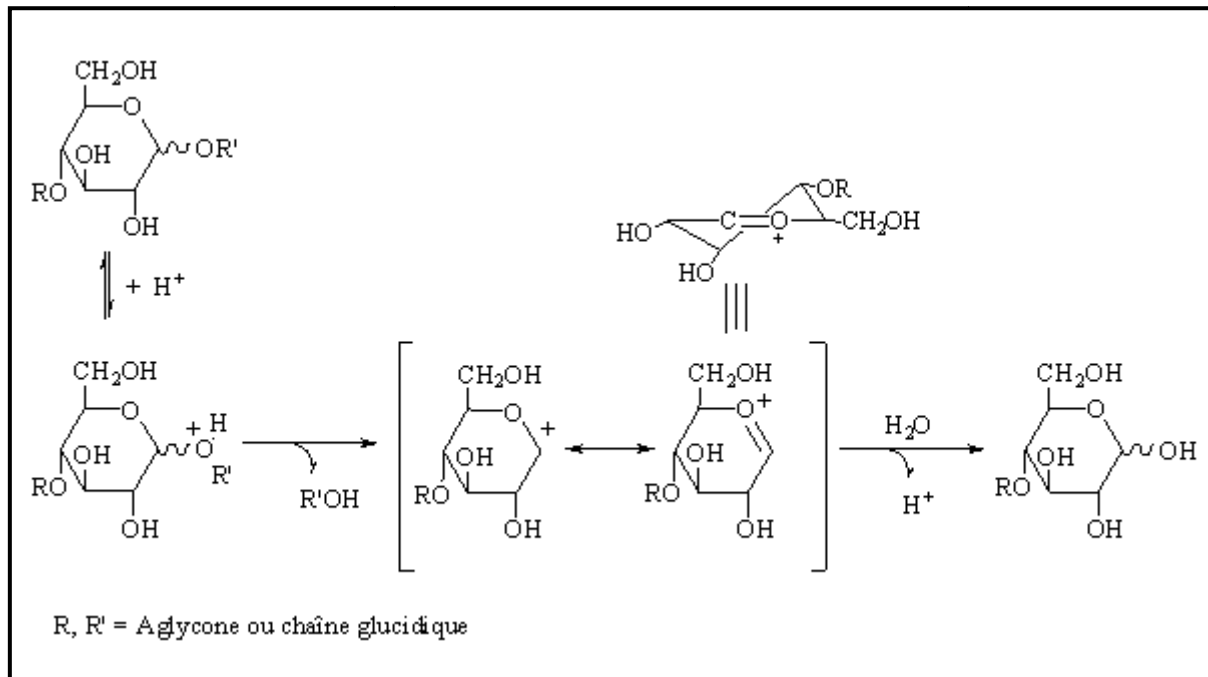
#### I.2.4.1.a Hydrolyse chimique

- **Hydrolyse acide ménagée**

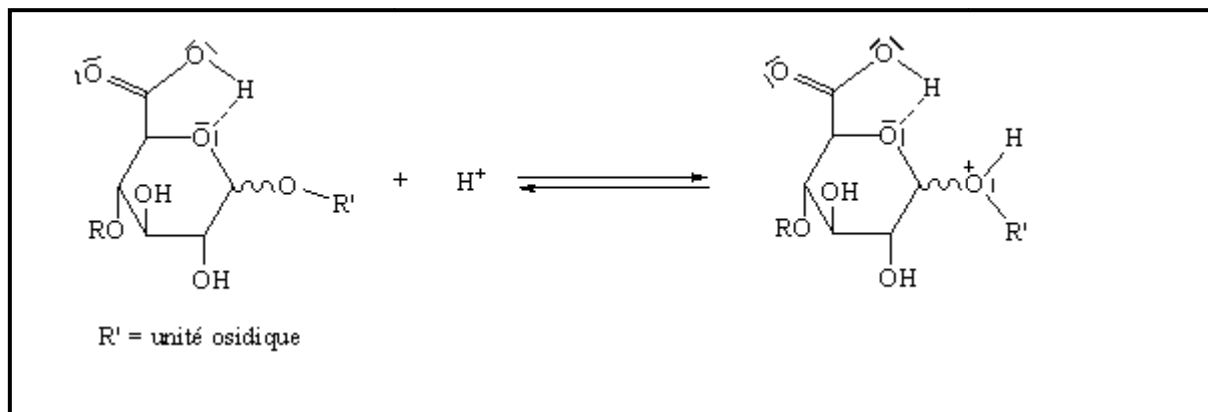
Cette méthode basée sur la résistance différentielle des liaisons glycosidiques permet en théorie de libérer des fragments oligosaccharidiques de masses molaires variables. Le mécanisme général comprend 3 étapes successives (figure 17). En milieu acide, l'oxygène anomérique est protoné. Il s'en suit la décomposition de l'acide conjugué en ion oxonium, stabilisé par résonance sous la forme conformationnelle de demi-chaise. L'extrémité réductrice est enfin régénérée par addition d'eau. Dans le cas des polysaccharides acidocarboxylés, la stabilité chimique des liaisons impliquant les acides uroniques confère aux polymères une certaine résistance aux acides forts, y compris à température élevée. On observe alors une cinétique relativement faible dans le cas de l'hydrolyse d'un polymère engageant des liaisons uronosidyles. La stabilité de ces liaisons à l'hydrolyse acide s'explique par les effets inducteurs et conformationnels du groupement carboxyle en C-5 (figure 18) Timell *et al* (1965). Les électrons du doublet de l'oxygène du cycle forment une liaison hydrogène avec le proton carboxylique diminuant par la même la capacité du doublet de l'oxygène à se délocaliser sur la liaison O-C<sub>1</sub> par effet mésomère. L'état de transition est dans ce cas peu favorisé.

---

\* Timell T.E., Enterman W., Spencer F., Soltes E.J., The acid hydrolysis of glycosides, II, effect of substituents at C-5, *Can. J.Chem*, **1965**, 43, 2296.



**Figure 17:** Mécanisme général de l'hydrolyse acide des glycosides, d'après Bemiller (1967).



**Figure 18:** Stabilité de la liaison uronosidyle à l'hydrolyse acide, d'après Timell *et al*, 1965.

\* Bemiller J.N., Acid-catalysed hydrolysis of glycosides., *Adv. Carbohydr. Chem*, **1967**, 22, 25-108.

\* Timell T.E., Enterman W., Spencer F., Soltes E.J., The acid hydrolysis of glycosides, II, effect of substituents at C-5, *Can. J.Chem*, **1965**, 43, 2296.

- **Autohydrolyse**

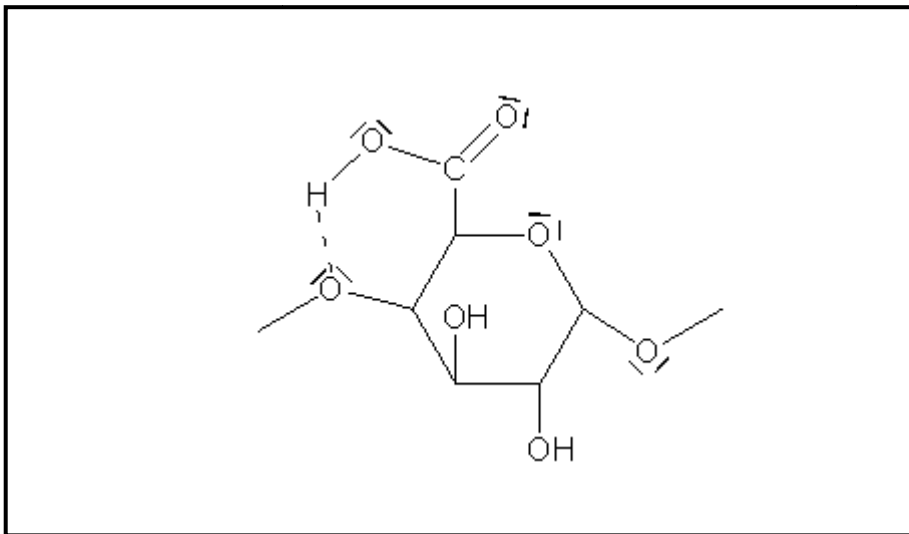
L'autohydrolyse des polysaccharides est une méthode de dégradation extrêmement douce qui suit le même mécanisme qu'une hydrolyse acide. L'acidité est ici apportée par les fonctions carboxyles et/ou sulfates du polysaccharide. Rapportée en 1938 par Hirst et Jones pour l'analyse de gommés végétales, l'autohydrolyse a ensuite largement été employée lors de l'étude des phycocolloïdes et des polysaccharides sulfatés. La sensibilité et la sélectivité du polymère à l'autohydrolyse sont directement dépendantes de la nature des liaisons glycosidiques (figure 12) et de la répartition des charges sur le polysaccharide. Des études relatives au mécanisme de l'autohydrolyse indiquent des différences majeures entre le rôle des sulfates et des groupements carboxyles sur la sélectivité de la réaction. En effet, les groupements sulfatés se dissocient totalement pour des valeurs de  $\text{pH} < 7$  contrairement aux groupements carboxyliques qui s'ionisent en deçà de  $\text{pH} 5$ . De plus, les groupements carboxyliques sont stables en milieu acide à température ambiante ; les acides uroniques ne se décomposent qu'après une période de chauffage prolongée, alors que les groupements sulfates sont rapidement hydrolysés et convertis en acide sulfurique. Ciancia et Cerezo (1993) ont montré une certaine sélectivité de l'autohydrolyse. Contrairement à l'acidité apportée par les sulfates qui n'est pas localisée en un point précis du polymère, la fonction carboxyle catalyse la réaction d'hydrolyse au niveau des liaisons 1→4 précédant un acide uronique (figure 19).

Très facile à mettre en œuvre, l'autohydrolyse nécessite au préalable la mise sous forme acide des polysaccharides par simple passage sur résines acides échangeuses d'ions. Les protocoles se déroulent ensuite dans des conditions de température et de pression variables qui sont directement dépendantes de la résistance des polysaccharides à l'hydrolyse. Classiquement, les conditions retenues vont de la température ambiante sous pression atmosphérique jusqu'à des températures de 190°C à 13 bars dans le cas du vapocraquage du bois. Une telle méthode conduit à la libération d'oligosaccharides de DP variables. Enfin, en raison de son caractère non agressif, l'autohydrolyse protège les substitutions non carbonées des polysaccharides. Elle limite par exemple les phénomènes de dé-sulfatation des phycocolloïdes ou dé-acétylation des xylanes ce qui, du point de vue de l'analyse structurale, apporte des renseignements précieux.

---

\* Hirst E.L., Jones J.K.N., The constitution of Damson gum. Part I. Composition of Damson gum and structure of aldobionic acid (glycuronosido-2-mannose) derived from it, *J.Chem.Soc.*, **1938**, 1174-1180.

\* Ciancia M., Cerezo A.S., Autohydrolysis of polysaccharides, *Carbohydr. Res. Brazil*, **1993**, 45, 54-61.



**Figure 19** : Catalyse intramoléculaire d'une liaison 1→4 par un groupement carboxyle précédant un acide uronique, d'après Ciancia et Cerezo, 1993.

---

\* Ciancia M., Cerezo A.S., Autohydrolysis of polysaccharides, *Carbohydr. Res. Brazil*, **1993**, 45, 54-61.

#### I.2.4.1.b. Hydrolyse enzymatique

Compte tenu de sa complexité et de la diversité des composés pectiques qui la compose, les enzymes impliquées dans les voies de biosynthèse ou de dégradation des pectines pariétales sont nombreuses. Un grand nombre d'entre elles sont par ailleurs commercialisées à une échelle industrielle pour des applications dans le secteur agro-alimentaires. D'autres, plus confidentielles, sont utilisées par les laboratoires de recherche. L'identification et la mise en œuvre des enzymes pectolytiques au cours des dernières années expliquent les avancées majeures qui ont été réalisées dans le domaine de l'analyse de leur structure mais aussi de l'étude leur biosynthèse. La classification des enzymes pectolytiques s'appuie sur la nature du substrat. Ainsi, il est possible de distinguer les enzymes qui interviennent au niveau des zones lisses et des zones hérissées (figure 20) (Ralet *et al*, 2002 ; Kashyap *et al*, 2001).

- **Les enzymes qui dégradent les zones lisses homogalacturonanes**

Trois types principaux de réaction sont catalysées par les enzymes qui dégradent la chaîne principale des pectines : saponification (estérases), dépolymérisation par hydrolyse (polygalacturonases) et dépolymérisation par transélimination ou  $\beta$ -élimination (lyases).

##### Pectine estérase

- *Les pectine-méthylhydrolases* ou pectine méthylestérases (E.C. 3.1.1.11) catalysent la désestérification des groupements méthoxyles des pectines pour former de l'acide pectique et libérer du méthanol.
- *Les pectine-acétylestérases* catalysent la désestérification des fonctions alcools secondaires engagées dans une liaison avec l'acide acétique.

##### Polyméthylgalacturonase (PMG)

*Les polyméthylgalacturonases* hydrolysent la liaison  $\alpha$  1-4 entre deux résidus d'acide galacturonique. Ce sont des glycosyl hydrolases. Selon leur mode d'action, il est possible de distinguer les endo- et les exo-polyméthylgalacturonases

- *Les endopolyméthylgalacturonases* qui hydrolysent de façon aléatoire les liaisons  $\alpha$ 1-4 des pectines fortement estérifiées.

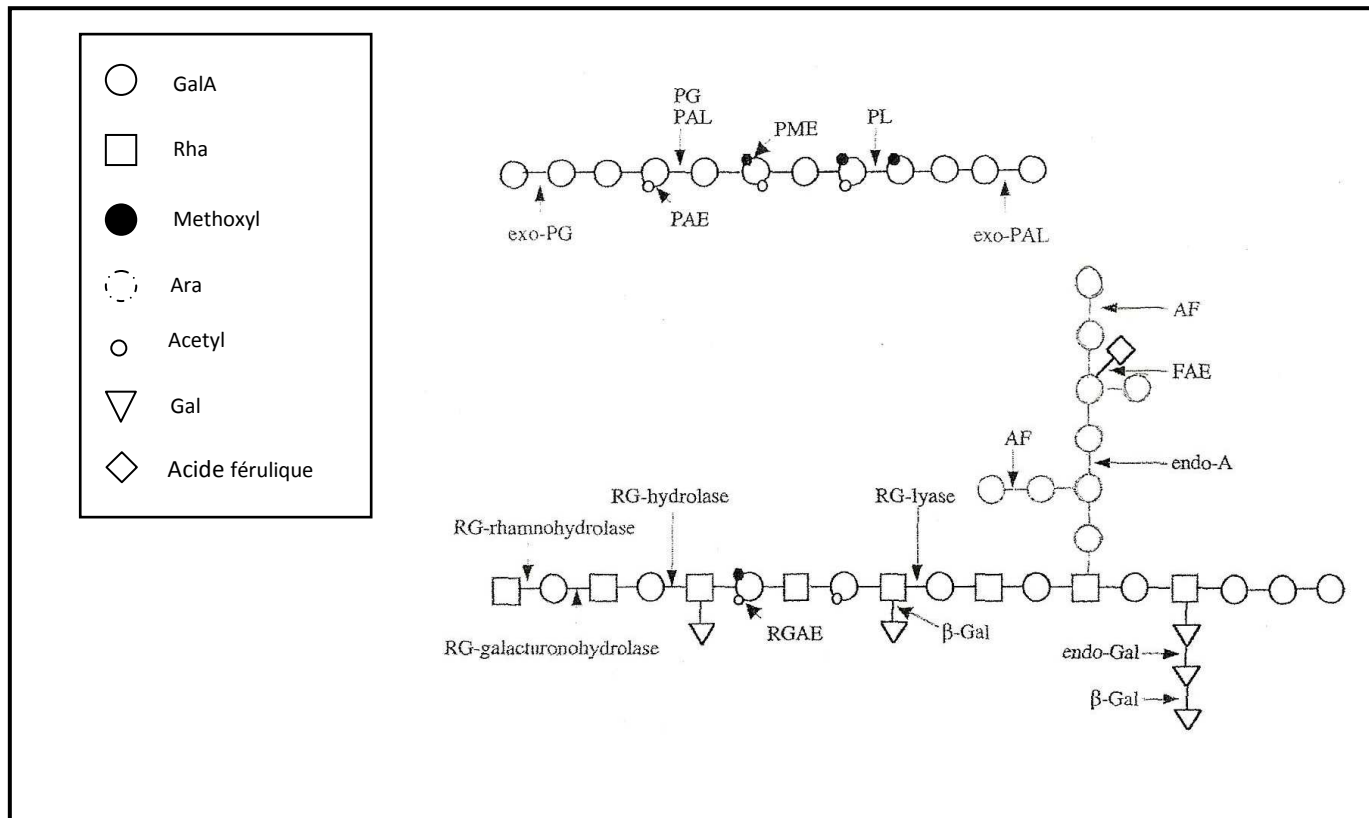
---

\* Ralet M.C., Bonin E., Thibault J.F., Pectins. Dans : *Biopolymers vol. 8, Polysaccharides II*, Steinbüchel A. (Ed.), Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2002, 12 : 345-380.

\* Kashyap D.R., Vohra P.K., Chopra S., Tewari R., Applications of pectinases in the commercial sector : a review, *Bioresource Technology*, 2001, 77, 215-227.



**PAL** : endo-pectate lyase ; **PME** : pectin methyl esterase ; **PL** : endo-pectin lyase ; **exo-PG** : exopolygalacturonase ; **exo-PAL** : exo-pectate lyase ; **PAE** : pectin acetyl esterase ; **GR-hydrolase** : rhamnogalacturonan-rhamnohydrolase ; **RG-galacturonohydrolase** : rhamnogalacturonan-galacturonohydrolase ; **GR-lyase** : rhamnogalacturonan-lyase ; **RGEA** : rhamnogalacturonan acetyl-esterase ; **endo-A** : endo-arabinase ; **AF** : arabinofuranosidase\* ; **FAE** : feruloyl-esterase\* ; **endo-Gal** : endo-galactanase ; **β-Gal** : β-galactosidase. \* Enzymes actives sur des oligosaccharides.



**Figure 20** : Mode d'action des enzymes pectinolytiques selon Ralet *et al* (2002).

\* Ralet M.C., Bonin E., Thibault J.F., Pectins. Dans : *Biopolymers vol. 8, Polysaccharides II*, Steinbüchel A. (Ed.), Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2002, 12 : 345-380.

- *Les exopolyméthylgalacturonases* qui hydrolysent à partir de l'extrémité terminale non réductrice les liaisons  $\alpha$  1-4 des pectines.

### *Polygalacturonases (PG)*

*Les polygalacturonases* hydrolysent de façon aléatoire les liaisons  $\alpha$  1-4 des acides pectiques. Ce sont des glycosyl hydrolases. Selon leur mode d'action, il est possible de distinguer les endo- et les exo-polygalacturonases.

- *Les endopolygalacturonases* ( $\alpha$ -1,4-D-galacturonide) glycanohydrolase (E.C. 3.2.1.15). Leur activité libère principalement des mono-, des di- et des trimères.

- *Les exopolygalacturonases* : attaque la chaîne homogalacturonique par son extrémité non réductrice. La présence de groupements méthyl et de rhamnose bloque leur action. Il y en existe deux types :

- \* Poly (1,4- $\alpha$ -D-galacturonide) galacturonohydrolase (EC 3.2.1.67), qui libère des monomères.
- \* Poly (1,4- $\alpha$ -D-galacturonide) digalacturonohydrolase (EC 3.2.1.82), qui libère des dimères.

### *Les lyases*

Les lyases catalysent la dépolymérisation des homogalacturonanes par  $\beta$ -élimination libérant des oligosaccharides insaturés en 4,5 à l'extrémité non réductrice des acides galacturoniques formés.

### *Polyméthylgalacturonate Lyase (PMGL) – (E.C. 4.2.2.10)*

- *Les endopolyméthylgalacturonate Lyases* qui hydrolysent de façon aléatoire les liaisons  $\alpha$  1-4 des pectines.
- *Les exopolyméthylgalacturonate Lyases* qui hydrolysent de façon récurrentes les pectines par réaction de transélimination.

### Polygalacturonate Lyase (PGL)

- *L'endopolygalacturonate Lyase* (EC 4.2.2.2) ou (poly- $\alpha$ -1,4-D-galacturonide lyase) est spécifique des acides polygalacturoniques ou des pectines faiblement méthyles estérifiées. On distingue l'endo pectates lyases (EC 4.2.2.2) et l'exo pectates lyases (EC 4.2.2.9).
  - *L'exopolygalacturonate Lyase* (EC 4.2.2.9) ou (poly- $\alpha$ -1,4-D-galacturonide exolyase) est spécifique des acides polygalacturoniques ou des pectines faiblement méthyles estérifiées qu'elle hydrolyse de façon récurrente par réaction de transélimination
- **Les enzymes qui dégradent les zones lisses hérissées**

Les zones ramifiées des pectines sont constituées d'un squelette rhamnogalacturonique portant des groupements acétyles et des chaînes latérales d'oses neutres (arabinose et/ou galactose) qui comporteront parfois de l'acide férulique.

### Les rhamnogalacturonases

- *RG lyase* qui catalyse l'hydrolyse de la liaison  $\alpha$ -D-GalpA-(1,2)- $\alpha$ -L-Rhap- par réaction de transélimination.
- *RG rhamnohydrolase* : exo-enzyme qui libère du rhamnose à partir de l'extrémité non réductrice.
- *RG galacturonohydrolase* : exo-enzyme qui libère de l'acide GalA à partir de l'extrémité non réductrice.

### Les arabinanases

- *L'endo- $\alpha$ -L-arabinanase* (EC 3.2.1.99) hydrolyse les liaisons  $\alpha$ -1,5 entre deux résidus d'arabinoses à l'intérieur des chaînes linéaires d'arabinanes.
- *L'exo-arabinanase* libère des résidus arabinoses en partant des extrémités non réductrices des arabinanes et des arabinogalactanes.
- *L' $\alpha$ -L-arabinofuranosidase* (EC 3.2.1.55) hydrolyse les liaisons  $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 3) ou  $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 5) pour libérer l'arabinofuranose terminal non réducteur.

## Les galactanases

Cet ensemble comprend des endo- et exoenzymes. Toutes hydrolysent des liaisons impliquant des résidus galactoses au sein des galactanes linéaires ou d'arabinogalactanes de type I ou II.

- Endo-(1,4)- $\beta$ -D-galactanase (EC 3.2.1.89) hydrolyse au hasard les liaisons  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) entre deux résidus galactoses et libère des mono- et oligomères de galactoses avec des DP inférieurs à 4.
- Endo-(1,6)-  $\beta$ -D-galactanase.
- Exo-galactanase spécifique des liaisons  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) et  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3).
- $\beta$ -D-galactosidase (EC 3.2.1.23) libère les résidus galactoses non réducteurs de galactanes ou arabinogalactanes de type I de faible poids moléculaire.

- **Les estérases**

- *La RG acétylestérase* qui libère les groupements acétyles estérifiés sur les rhamnogalacturonanes.
- *Les férulate estérases* sont impliquées dans la libération de l'acide férulique

- **Les protopectinases**

Capable de solubiliser les protopectines. En fonction des applications visées, les protopectinases sont principalement de deux types : les protopectinases acides et les protopectinase basiques.

### I.2.4.2 Détermination structurale

Les méthodes précédemment décrites permettent l'obtention d'oligosaccharides plus faciles à analyser par spectroscopie. Néanmoins, il faut préalablement purifier ces mélanges complexes par diverses techniques chromatographiques : l'exclusion stérique en fonction de la masse moléculaire des composés ; la chromatographie d'échange d'ions en fonction de la charge des molécules.

#### I.2.4.2.a Analyse infrarouge

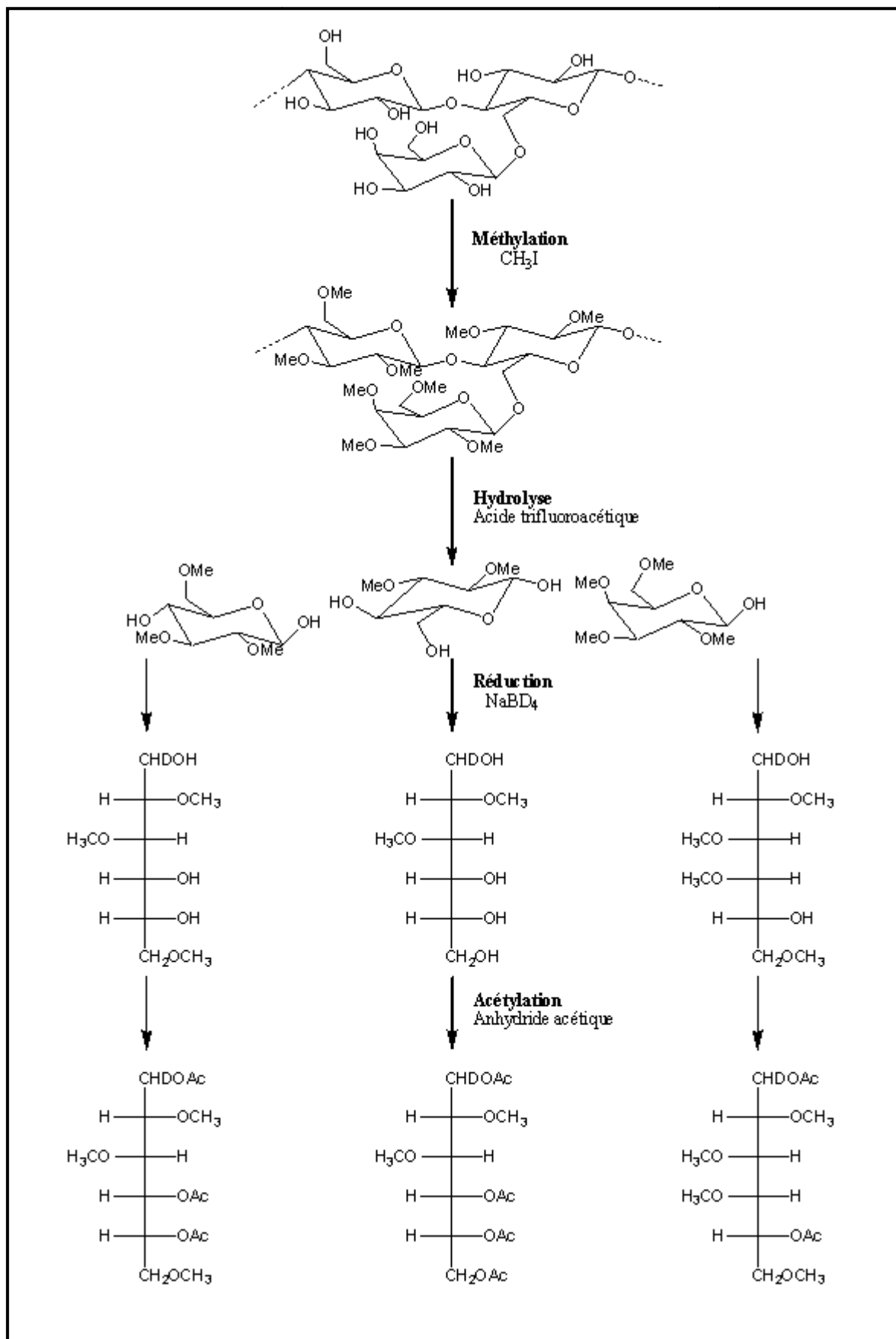
La spectroscopie infra-rouge est une méthode d'analyse physique rapide, simple à mettre en oeuvre et ne nécessitant que peu de quantité de matière à analyser. Basée sur les transitions entre les états vibrationnels et rotationnels d'une molécule, elle peut être employée tout aussi facilement sur des échantillons bruts ou purifiés. Certains groupements ou liaisons, considérés comme marqueurs et notamment les fonctions acides carboxyliques des acides galacturoniques, peuvent révéler la présence des pectines (Kacurakova *et al.*, 2000).

#### I.2.4.2.b Analyse des liaisons glycosidiques

L'étude de la méthylation d'oligosaccharides ou polysaccharides par CPG-SM permet de déduire l'enchaînement des unités osidiques et leurs points de branchements. Cette méthode nécessite la méthylation préalable de toutes les fonctions hydroxyles par de l'iodure de méthyle suivi de la libération, par hydrolyse acide, des monosaccharides partiellement méthylés. Ils sont ensuite réduits par du NaBD<sub>4</sub> afin de pouvoir différencier le C-1 du C-6 puisque seule la fonction réductrice est porteur d'un deutérium. Les alditols partiellement méthylés sont acétylés afin de pouvoir déterminer, par CPG-SM, les fonctions hydroxyles engagées dans une liaison osidique (figure 21).

---

\* Kacurakova M., Capek P., Sasinkova V., Wellner N., Ebringerova A., FT-IR study of plant cell wall model compounds : pectic polysaccharides and hemicelluloses, *Carbohydr. Pol.*, **2000**, 43, 195-203.



**Figure 21 :** Analyse de l'enchaînement des monosaccharides.

#### I.2.4.2.c Analyses RMN

La spectroscopie RMN est une méthode physicochimique non destructive permettant, à partir de quelques micromoles de polysaccharide, de réaliser le dosage et l'identification de chacun des monosaccharides, d'en préciser l'enchaînement, leurs points de branchement et leurs anoméries (Strecker G., 1993 et 1995). Cette étude peut être conduite selon deux directions. Si les déplacements chimiques des protons de la molécule isolée correspondent à ceux déjà décrits, alors l'analyse est terminée. Cette technique nommée "Finger-Print" a été développée par Vliegthart et *al.* (1983) pour la caractérisation des glycanes des glycoprotéines. Si au contraire la comparaison des déplacements chimiques avec la banque de données ne permet pas d'identifier les monosaccharides, leurs substitutions et/ou leurs liaisons, il faut alors étendre l'analyse RMN à des séquences bidimensionnelles. Nous nous sommes ici particulièrement intéressés aux formes pyranoses des sucres.

Le spectre RMN monodimensionnel du proton donne des informations primaires sur la valeur des déplacements chimiques des protons identifiables et permet de les comparer avec ceux déjà décrits dans les banques de données. Il renseigne également sur le nombre de résidus monosaccharidiques par l'intégration des protons anomériques qui se présentent sous forme de doublets entre 4,4 et 5,4 ppm. Les constantes de couplage peuvent être mesurées discriminant l'anomérie  $\alpha$  ou  $\beta$  des sucres.

L'élucidation des structures glycosidiques résulte ensuite de l'utilisation de différentes séquences d'impulsions qui dans une première étape permettent une attribution complète des déplacements chimiques des protons et carbones de la molécule. Les expériences COSY (COrrelation SpectroscopY) homonucléaires  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  permettent notamment de mesurer toutes les constantes de couplage entre les différents protons qui résonnent dans la "bulk region" entre 3,2 et 4 ppm. Cette zone renferme de nombreux protons dont les fréquences de résonance sont voisines ce qui rend leur identification délicate. Néanmoins, il est possible de distinguer les protons portés par les carbones impliqués dans une liaison osidique qui sont généralement déblindés. La nature du cycle (pyranose ou furanose) et l'anomérie peuvent également être précisées par le couplage  $^3\text{J}$  des protons anomériques. La distinction entre un  $\alpha$ -pyranose et un  $\beta$ -pyranose sera fonction de la valeur de la constante de couplage entre le

---

\* Strecker G., Analyse structurale des chaînes glycaniques, *Biofutur*, **1993**, 125, 46-52.

\* Strecker G., NMR, In : Verbert, A.(Eds.), *Methods on glycoconjugates*, Harwood Academic Publishers, **1995**, 137-145.

\* Vliegthart, J.F.G., Dorland, L., Van Halbeck, H., High resolution  $^1\text{H}$ -nuclear magnetic resonance spectroscopy as a tool in structural analysis of carbohydrate related to glycoproteins, *Adv. Carbohydr. Chem.Biochem.*, **1983**, 41, 209-374.

proton anomérique et le H2. Une constante de couplage comprise entre 2 et 4 Hz, dans le cas d'un H2 axial est spécifique d'un  $\alpha$ -pyranose alors que la constante de couplage d'un  $\beta$ -pyranose varie entre 7 et 9 Hz. Pour un proton équatorial en position 2, les variations sont réduites. Les emplacements des liaisons sont ensuite précisés par les déplacements chimiques des  $^{13}\text{C}$  résonnant entre 3 et 10 ppm, mais lorsqu'ils sont engagés dans des liaisons 1 $\rightarrow$ x ils sont déblindés. D'une manière générale, les carbones anomériques des cycles sous forme pyranose portant un substituant axial résonnent vers 100 ppm. Les autres cycles pyranoses résonnent vers 105 ppm tandis que les formes furanoses sont caractéristiques des déplacements chimiques autour de 110 ppm.

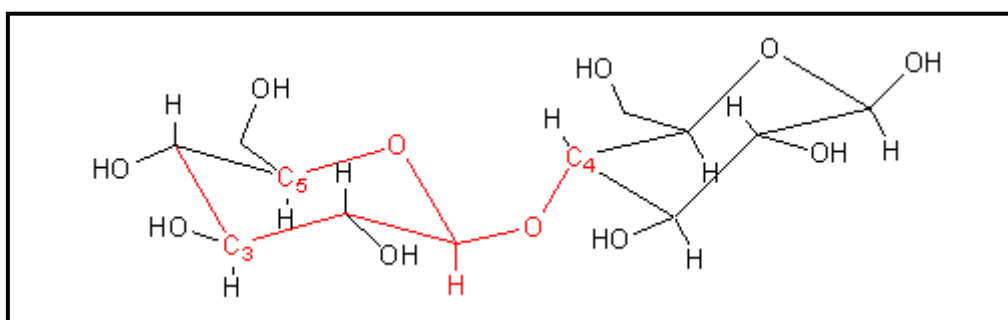
La séquence de la chaîne oligosaccharidique peut ensuite être déterminée par différentes méthodes. Classiquement, elle peut être déduite des interactions dipolaires entre le proton anomérique et les protons adjacents de l'unité osidique (NOE, ROESY). L'effet NOE (Nuclear Overhauser Enhancement) fournit généralement des pics de corrélation intenses entre les protons H1 et Hx de deux sucres reliés par une liaison 1 $\rightarrow$ x. Au travers du ROESY (Rotating Frame Overhauser Spectroscopy), il est possible de visualiser les corrélations dipolaires proton-proton entre deux voisins proches d'au plus de 5 Å. L'expérience TOCSY (Total Correlation Spectroscopy) permet le transfert de la magnétisation sur tous les protons d'un monosaccharide mais présente une lecture délicate des constantes de couplage. Dabrowski en 1989 a proposé de combiner les séquences ROESY et TOCSY afin de relier tous les protons anomériques et ainsi déterminer la séquence des unités osidiques. Les spectres HMQC (Heteronuclear MultiQuantum Coherence) permettent de corréler chaque proton avec le carbone auquel il est lié. Dans ce cas, outre l'identification des carbones et la détermination de leurs déplacements chimiques, l'observation d'un déblindage des carbones permet de déterminer la substitution, c'est-à-dire les points de branchements des monosaccharides.

Les spectres HMBC (Heteronuclear Multiple-Bond Correlation) donnent les couplages  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  et les constantes  $^3\text{J}$  associées. Il est alors possible de corréler les noyaux distants de 3 liaisons covalentes, notamment les constantes  $^3\text{J}_{\text{H1-Cx}}$  où x est la position du carbone du monosaccharide voisin inclus dans la liaison glycosidique (figure 22). Ainsi, on peut préciser l'enchaînement des monosaccharides et donc, la séquence de l'oligosaccharide.

---

\* Dabrowski J., Two-dimensional proton magnetic resonance spectroscopy. In Ginsburg, V. (Eds), *Methods in Enzymology*, Academic Press Inc, **1989**, 179, 122-156.





**Figure 22** : Schéma représentant les corrélations  $^3J_{H,C}$  carbone/proton observées à partir du proton H-1 dans une expérience HMBC. La corrélation la plus intéressante est celle qui indique la liaison glycosidique.

## I.2.5. Propriétés physico-chimiques

### I.2.5.1. Masse moléculaire

La détermination de la masse moléculaire des pectines est une donnée difficile à mesurer et pour trois raisons (Ralet *et al* 2002) .

- Les pectines sont par définition des molécules hétérogènes ;
- Une fois extraites et purifiées, elles deviennent parfois insolubles dans l'eau qui est pourtant le solvant qui a servi à leur extraction ;
- Molécules polyanioniques par définition, les pectines forment - *à la suite d'interactions électrostatiques* - des agrégats multimoléculaires.

La détermination de la masse moléculaire des pectines doit donc être effectuée par plusieurs méthodes physico-chimiques complémentaires, dont la convergence des résultats permettra d'établir une valeur significative de la masse moyenne des pectines. Afin d'en améliorer la précision, les méthodes devront être étalonnées par l'utilisation d'oligogalacturonides et d'acides pectiques et auront recours, pour s'affranchir des interactions électrostatiques intermoléculaires, à l'utilisation de tampons compatibles avec la méthode physico-chimique. Récemment, Ralet *et al* (2002) ont développé une technique HPLC d'exclusion stérique couplée au *laser light scattering* qui améliorerait sensiblement la caractérisation du poids moléculaire des pectines.

En fonction des techniques utilisées pour les extraire et les analyser, la masse moléculaire des pectines peut donc varier de quelques dizaines à quelques centaines de KDa.

### I.2.5.2. Solubilité et précipitation

Les pectines sont des hydrocolloïdes c'est-à-dire des polysaccharides qui, par définition, sont solubles ou solubilisables dans et par l'eau. Cette propriété est à la base même de leur

---

\* Ralet M.C., Bonin E., Thibault J.F., Pectins, Dans : *Biopolymers vol. 8, Polysaccharides II*, Steinbüchel A. (Ed.), Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, **2002**, 12, 345-380.

valorisation dans le secteur agro-alimentaire. Toutefois, lors de la solubilisation d'un polymère, il y a compétition entre les interactions macromolécule / solvant et les interactions macromolécule / macromolécule. La solubilité des pectines sera donc conditionnée par un certain nombre de facteurs liés essentiellement à leurs structures et notamment : leur masse moléculaire, l'importance de leur taux de ramification, la valeur de leur degré de méthylestérification ainsi que la répartition des groupements méthylester le long de la chaîne pectique. Ainsi, il est admis qu'une pectine sera d'autant plus soluble que sa masse moléculaire est faible, que sa structure est fortement ramifiée et que ces fonctions carboxyliques sont engagées dans une estérification avec le méthanol (taux de méthylestérification fort). Le pKa intrinsèque des GalA est de l'ordre de 3. Ainsi, lorsque le pH des solutions est supérieur à 3, les pectines sont sous leur forme ionique Thakur *et al* (1997).

Les substances pectiques sont par ailleurs solubles dans les solvants organiques tels que le formamide, le diméthylformamide, le DMSO (Thibault, 1980). Elles peuvent être aisément précipitées en présence de solvants organiques (acétone, éthanol, isopropanol), de détergents quaternaires (cetavlon ou CTAB – bromure de cetyltriméthylammonium), de cations mono- et multivalents ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{H}^+$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ) et de polymères basiques (protéines et polyamides) Brillouet *et al* (1990).

### ***1.2.5.3. Les propriétés gélifiantes et stabilisantes***

Les substances pectiques peuvent former des gels sous certaines conditions, ces propriétés sont très largement utilisées en industrie agroalimentaire où les pectines sont utilisées comme épaississant des solutions et stabilisant des émulsions. La formation d'un gel nécessite la constitution d'un réseau tri-dimensionnel retenant entre ses mailles la phase liquide, les macromolécules doivent donc fortement s'associer entre elles. Dans le cas des substances pectiques, les groupes hydroxyles et les fonctions acides peuvent permettre l'établissement de

---

\* Thakur B.R., Singh R.K., Handa A.K., Chemistry and uses of pectin a review, *Critical reviews in food science and nutrition*, **1997**, 37(1), 47-73.

\* Brillouet J.M., Bosso C., Moutonet M., Isolation, purification and characterization of an arabinogalactan from a red wine, *American journal of Enology and viticulture*, **1990**, 41, 29-36.

\* Thibault J.F., Les pectines, Dans : *Les polymères végétaux, polymères pariétaux et alimentaires non azotés*, Ed Gauthier-Villars, Paris, **1980**, 232-251.

liaisons hydrogènes ou de liaisons de type ioniques. Les substances pectiques hautement et faiblement méthylées donnent des gels dans des conditions différentes (Thibault, 1980).

- Gels de pectines hautement méthylestérifiées (pectines HM)

Ces pectines ont un DM compris entre 60 à 75%, elles gélifient en milieu acide (pH=2.5 - 3) en présence de sucre (masse de sucre > 55%). En solution aqueuse diluée, les macromolécules pectiques sont fortement hydratées et chargées négativement du fait de la dissociation des acides carboxyliques. Pour qu'elles puissent se rapprocher et former un gel, il faut donc que l'hydratation diminue et que la répulsion entre les groupes ioniques soit rendue aussi faible que possible (diminution du pH). La diminution de l'hydratation est réalisée par addition de saccharose, qui joue le rôle d'un fixateur d'eau puissant et détruit l'enveloppe d'hydratation des pectines (Rees, 1972). Ce comportement des pectines HM est utilisé dans l'industrie des confitures et gelées.

- Gels de pectines faiblement méthylestérifiées (FM)

Ces pectines de faible DM, obtenues par déestérification contrôlée des pectines HM, gélifient en présence de cations alcalino-terreux (le calcium pour les gels alimentaires). Le pH de gélification est large et compris entre 2 et 6 (Ralet *et al*, 2002). L'ion  $\text{Ca}^{2+}$  prendrait part à 9 liaisons de coordination (consulter le paragraphe spécifique consacré aux liaisons entre les pectines page 63) formant une structure originale dite en « boîte à œufs » (Axelos et Thibault, 1991 ; Morris *et al*, 1978). Une telle structure ne peut se former que par interaction entre régions homogalacturoniques suffisamment longues des macromolécules pectiques (au minimum 15 à 20 résidus de Gal A). La présence de substitutions méthylester et/ou acétyle gêneront la formation de cette association et donc limiteront la gélification des solutions. Enfin, pour obtenir un gel plutôt qu'un précipité, la réaction entre le  $\text{Ca}^{2+}$  et les pectines FM doit être lente (Thibault, 1980). Ce comportement des pectines FM est utilisé dans l'industrie des produits lactés.

---

\* Rees D.A., Polysaccharide gel. A molecular view, *Chem. Ind.*, **1972**, 16, 630-636.

\* Ralet M.C., Bonin E., Thibault J.F., Pectins, Dans : *Biopolymers vol. 8, Polysaccharides II*, Steinbüchel A. (Ed.), Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, **2002**, 12 : 345-380.

\* Axelos M.A., Thibault J.F., The chemistry of low methoxyl pectin gelation, In : The chemistry and technology of pectin, Walter R.H. (Ed.), *Academic Press New York*, **1991**, pp 109.

\* Morris E.R., Rees D.A., Thom D., Boyd J., Chiroptical and stoichiometric evidence of a specific primary dimerisation process in alginate gelation, *Carbohydr. Res.*, **1978**, 66, 145-154.

\* Thibault J.F., Les pectines, Dans : *Les polymères végétaux, polymères pariétaux et alimentaires non azotés*, Ed Gauthier-Villars, Paris, **1980**, 232-251.

## I.2.6. Structures chimiques fines des pectines

### I.2.6.1. Les différents domaines pectiques

Le terme de pectines désigne un groupe d'hétéropolysaccharides acides qui comporte des domaines structuraux distincts. Chez les végétaux supérieurs, les pectines représentent environ 30% de la masse des parois primaires de dicotylédones. Elles sont soumises à des voies de biosynthèses complexes et leurs structures peuvent évoluer au cours du développement cellulaire. L'étude de la structure des pectines a fait l'objet d'un grand nombre de travaux. La composition des pectines varie bien évidemment en fonction de l'espèce végétale qui est à l'origine de leur synthèse, des procédés d'extraction et de purification mis en œuvre pour les extraire ainsi que d'un certain nombre de facteurs édaphiques de l'environnement. En dépit de cette grande diversité, trois familles de polysaccharides pectiques ont été isolées des parois primaires : l'homogalacturonane, les galacturonanes substitués, les rhamnogalacturonanes (O'Neill *et al.*, 1990). Les motifs structuraux caractéristiques sont présentés dans le tableau 3.

#### I.2.6.1.a L'homogalacturonane ou acide homogalacturonique (HGA)

L'homogalacturonane est une chaîne linéaire d'acides  $\alpha$ -D-galacturoniques liés en 1-4 dont certains sont méthylestérifiés ou acétylés (figure 23). En fonction de son taux de méthylestérification, l'HGA pourra être désigné par pectine (taux de méthylestérification élevé) ou acide pectique (taux de méthylestérification faible). L'HGA peut représenter jusqu'à 60% des pectines de la paroi primaire. Ses propriétés et ses fonctions biologiques sont souvent corrélées à sa capacité à établir des interactions électrostatiques. La présence de HGA pur a été rarement mise en évidence. Cela a été le cas dans les capitules de tournesol, le sisal, le fruit de Jacquier, l'écorce de sapin et l'ail (Thibault, 1980).

#### I.2.6.1.b Les galacturonanes substitués

Par substitution de l'homogalacturonane par des résidus de D-Xyl<sub>p</sub> ou de D-Api<sub>f</sub>, deux polysaccharides pectiques ont été isolés et partiellement caractérisés. Il s'agit respectivement du xylogalacturonane et de l'apiogalacturonane. Ils constituent la famille des galacturonanes substitués (figure 24). Les xylogalacturonanes sont obtenus par substitution de la chaîne principale de galacturonane par des résidus de  $\beta$ -D-Xyl<sub>p</sub> liés en C-3 des résidus de GalA

\* O'Neill M., Albersheim P., Darvill A.G., The pectic polysaccharides of primary cell walls, *Methods Plant Biochem., academic press london*, 1990, 2, 415-441.

\* Thibault J.F., Les pectines, Dans : *Les polymères végétaux, polymères pariétaux et alimentaires non azotés*, Ed Gauthier-Villars, Paris, 1980, 232-251.

(Schols *et al*, 1995). Les xylogalacturonanes ont été principalement obtenus à partir de tissus reproducteurs (graines de soja, pépins de pomme, pollen de pin). Plus récemment, des motifs xylooligogalacturonides ont été isolés et caractérisés à partir de différents tissus et organes d'*Arabidopsis thaliana* (Zandleven *et al*, 2007). Leur fonction biologique n'est pas connue. Les apiogalacturonanes ont été décrits uniquement dans les parois de monocotylédones aquatiques des genres *Lemna* et *Zostera* (Golovchenko *et al*, 2002). La chaîne principale de type galacturonane est substituée par des chaînes latérales de  $\beta$ -D-Apif et de  $\beta$ -D-Apif-(1,3')- $\beta$ -D-Apif-(1,). La fonction biologique des apiogalacturonanes n'est pas connue.

#### I.2.6.1.c Les rhamnogalacturonanes

Ce groupe comporte deux représentants : les rhamnogalacturonanes de type I (RG-I) et de type II (RG-II).

**Les rhamnogalacturonanes I** ont été décrits pour la première fois par le groupe d'Albersheim (Talmadge *et al*., 1973) et sont associés à un groupe de polysaccharides pectiques qui contiennent une chaîne principale formée de la répétition du motif disaccharidique **-4)- $\alpha$ -D-GalpA-(1,2)- $\alpha$ -L-Rhap-(1-**. Entre 20 et 80 % des résidus de Rha<sub>p</sub> sont substitués sur leur C-4 par des oligosaccharides acides ou neutres. Ces oligosaccharides contiennent des chaînes linéaires ou branchées de résidus  $\alpha$ -L-Araf et  $\beta$ -D-Galp. Il s'agit notamment d'arabinanes et/ou de galactanes et d'arabinogalactanes de type I (arabino - 4 - galactane) ou de type II (arabino - 3,6 - galactane) - (figures 25 et 26 ; Ridley *et al.*, 2001, Paulsen & Barsett, 2005 ; Ralet *al.*, 2002). Quelques unes de ces chaînes latérales pourront être substituées sur leur extrémité terminale par des résidus  $\alpha$ -L-Fuc<sub>p</sub>,  $\beta$ -D-Glc<sub>p</sub>A, et 4-O-méthyl  $\beta$ -D-Glc<sub>p</sub>A. Peu d'information sont disponibles sur les fonctions biologiques des RGs. Toutefois, des données convergentes

---

\* Schols H.A., Bakx E.J., Schipper D., Voragen A.G.J., A xylogalacturonan subunit present in the modified hairy regions of apple pectin, *Carbohydr. Res.*, **1995**, 279, 265-279.

\* Zandleven J, Sorensen SO, Harholt J, Beldman G, Schols HA, Scheller HV, Voragen AJ, Xylogalacturonan exists in cell walls from various tissues of *Arabidopsis thaliana*, *Phytochemistry.*, **2007**, 68(8), 1219-26.

\* Golovchenko V.V., Ovodova R.G., Shashkov A.S., Ovodov Y.S., Structural studies of the pectic polysaccharide from duckweed *Lemna minor* L., *Phytochemistry*, **2002**, 60, 89-97.

\* Talmadge KW, Keegstra K, Bauer WD, Albersheim P, Structure of plant cell walls. I. Macromolecular components of the walls of suspension-cultured sycamore cells with a detailed analysis of the pectic polysaccharides, *Plant Physiol.*, **1973**, 51(1),158-173.

\* Ridley B.L., O'Neill M., Mohnen D., Pectins: structure, biosynthesis and oligogalacturonide-related signalling, *Phytochemistry*, **2001**, 57, 929-967.

\* Paulsen B.S., Barsett H., Bioactive pectic polysaccharides, *Advances Polymers Sciences*, **2005**, 186, 69-101.

\* Ralet M.C., Bonin E., Thibault J.F., Pectins, Dans : *Biopolymers vol. 8, Polysaccharides II*, Steinbüchel A. (Ed.), Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, **2002**, 12 : 345-380.

semblent indiquer que l'évolution de la structure des chaînes latérales d'arabinanes et de galactanes est corrélée à différents stades de développement cellulaire et tissulaire.

**Le rhamnogalacturonane II** a été décrit pour la première fois en 1978 (Darvill *et al.*, 1978).

La masse moléculaire du RG-II est faible (5 à 10 KDa). Sa structure qui repose sur l'association de 11 résidus monosaccharidiques différents est proposée en figure 27. La chaîne principale du RG-II est constituée par au moins 8 résidus d'acide galacturonique liés en  $\alpha$  1,4. La chaîne principale d'acide galacturonique est substituée en C-3 par deux disaccharides distincts (C et D) et en C-2 par deux oligosaccharides distincts (A et B) (Vidal *et al.*, 2000).

Le type et la taille des substitutions des RG-I sont variables chez les espèces monocotylédones et dicotylédones (Darvill *et al.*, 1985 ; York *et al.*, 1986 ; Thomas *et al.*, 1989). En revanche, même si quelques différences de structures ont été signalées par Rodriguez-Carvajal *et al.* (2003), la structure du RG-II apparaît formidablement conservée à travers l'évolution, ce qui laisse supposer qu'ils pourraient avoir une fonction capitale (McNeil *et al.*, 1984).

---

\* Darvill A.G., Mc Neil M., Albersheim P., Structure of plant cell wall. 8. A new pectic polysaccharides, *Plant physiol.*, **1978**, 62, 418-422.

\* Vidal S., Doco T., Williams P., Pellerin P., York W.S., O'Neill M., Gluska J., Darvill A.G., Structural characterization of pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II : evidence for the backbone location of aceric acid-containing oligoglycosyl side chain, *Carbohydr. Res.*, **2000**, 326, 277-294.

\* Darvill A.G., Albersheim P., Mc Neil M., Lau J.M., York W.S., Stevenson T.T., Thomas J., Doares S., Gollin D.J., Chelf P., Davis K., Structure and function of plant cell wall polysaccharides, *J. Cell. Sci. (Suppl.)*, **1985**, 2, 203-217.

\* York W.S., Darvill A.G., MC Neil M., Stevenson T.T., Albersheim P., Isolation and characterization of plant cell walls and cell components, *Meth. Enzymol.*, **1986**, 118, 3-40.

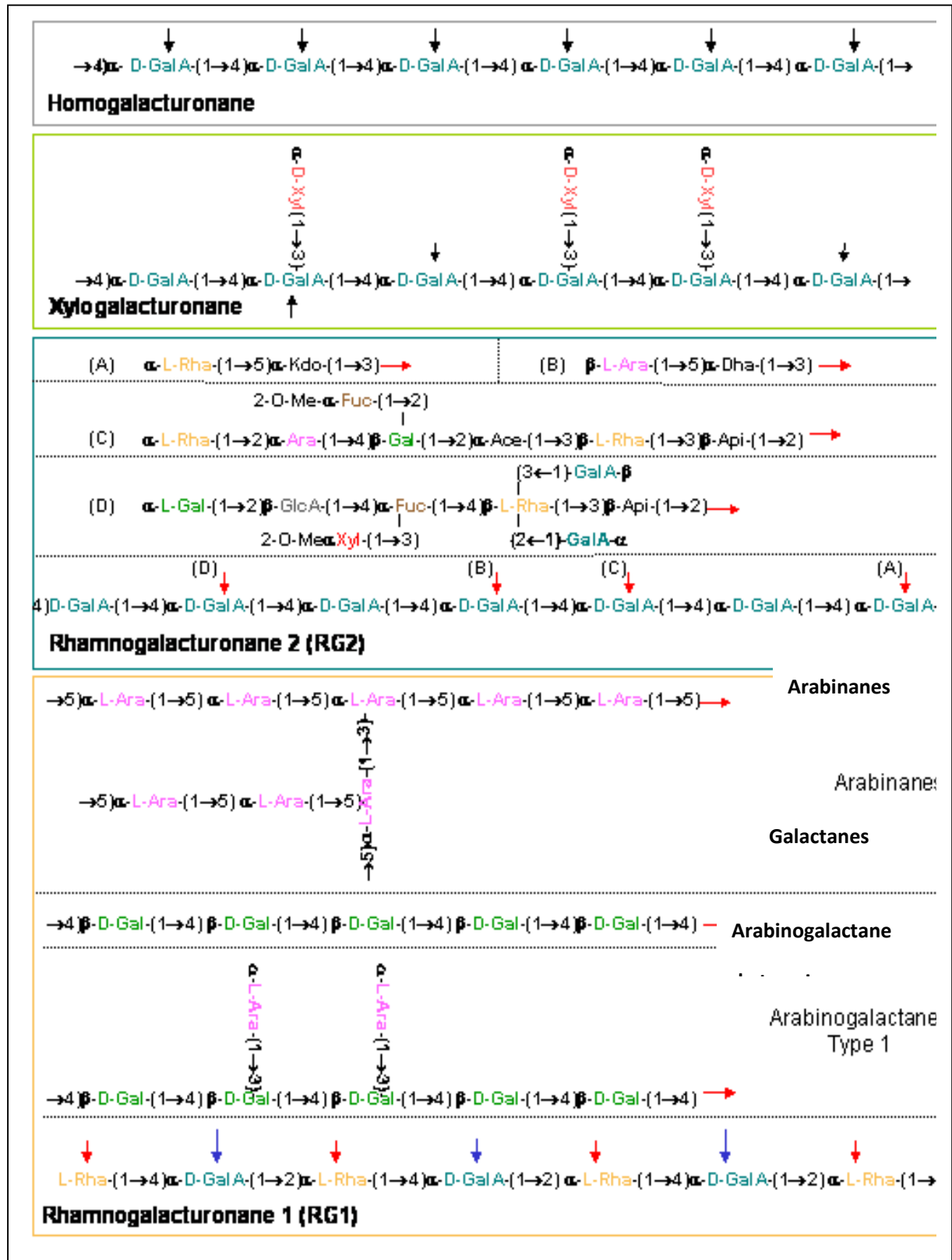
\* Thomas J.R., Darvill A.G., Albersheim P., Rhamnogalacturonan I, a pectic polysaccharide that is a component of monocot cell walls, *Carbohydr. Res.*, **1989**, 185, 279-306.

\* Rodriguez-Carvajal M.A., Du Penhoat C.H., Mazeau K., Doco T., Perez S., The three dimensional structure of mega-oligosaccharide rhamnogalacturonan II monomer : a combined molecular modeling and NMR investigation, *Carbohydrate research*, **2003**, 338, 651-671.

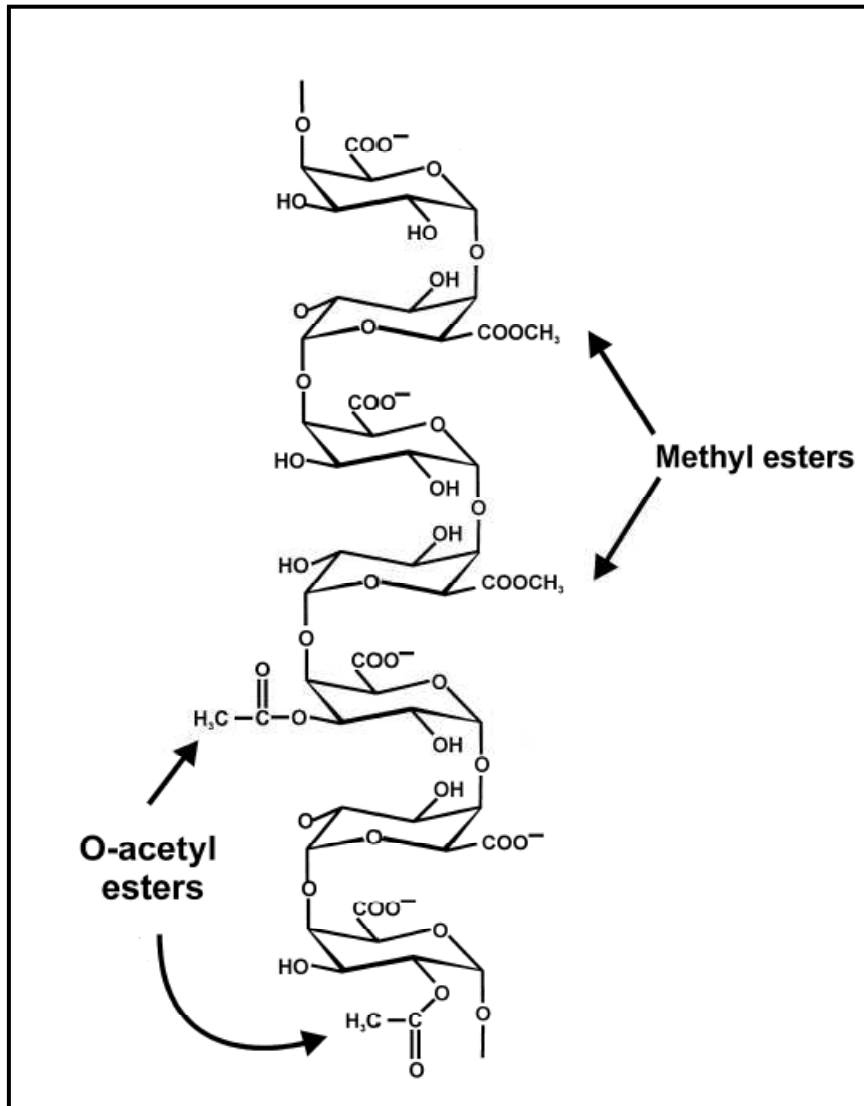
\* Mc Neil M., Darvill A.G., Fry S.C., Albersheim P., Structure and function of the primary cell walls of the primary cell walls of plants, *Annu.Rev.Biochem.*, **1984**, 53,625-664.

**Tableau 3 :** Structure chimique des différentes régions pectiques et de leurs substitutions d'après Mollet, 2006.

- Possibilité de trouver des groupements OCH<sub>3</sub> en C6,
- Possibilité de trouver des groupements OCH<sub>3</sub> en C2,
- Lieu d'encrage des substitutions A, B, C, et D sur l'ossature homogalacturonane dans les RG2 et des arabinanes, galactanes et/ou arabinogalactanes sur l'ossature rhamnogalacturonane dans les RG1 (la moitié des résidus Rha peuvent être substitués).

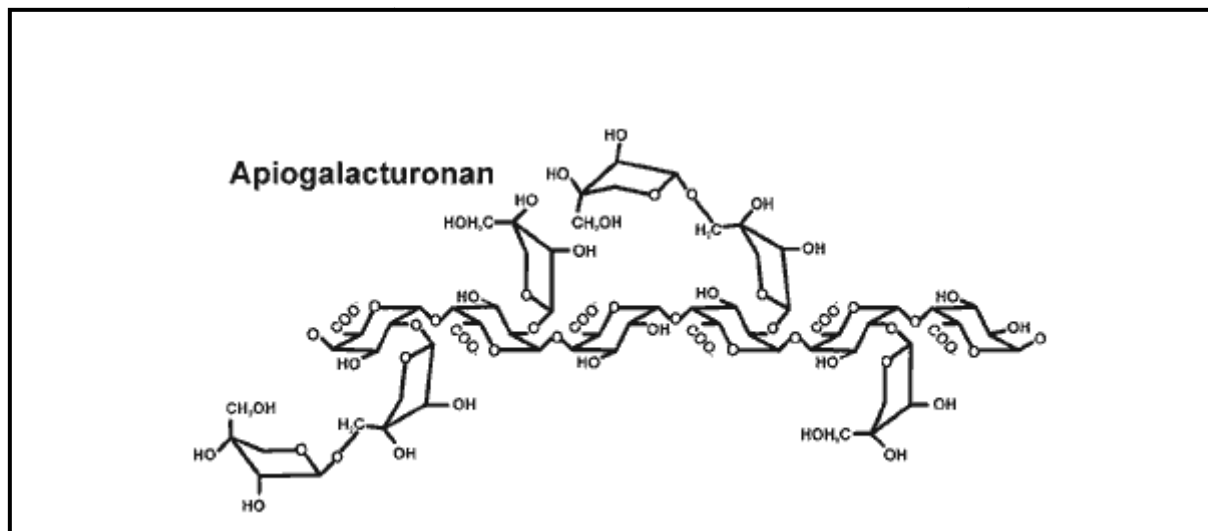
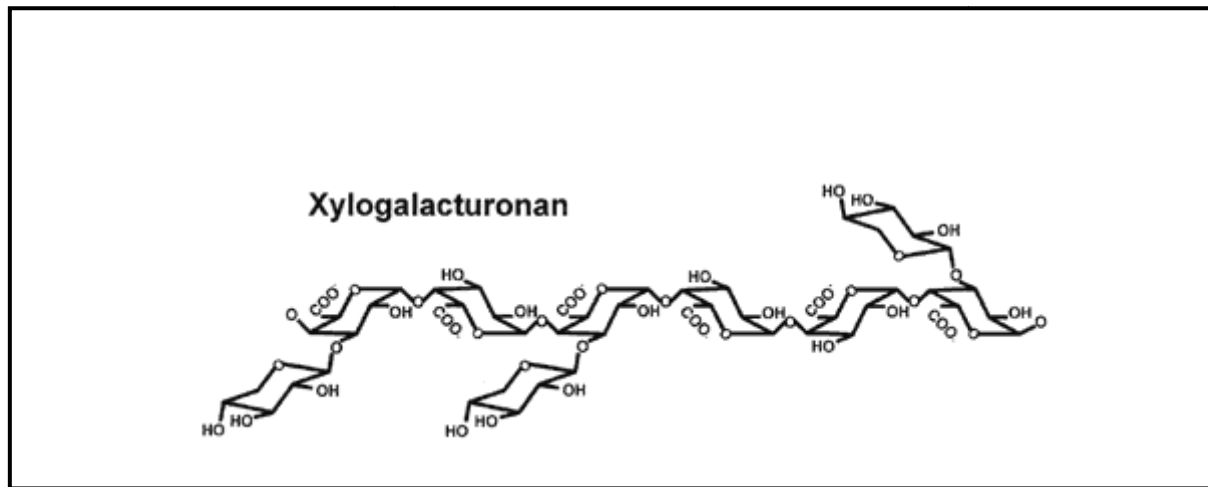






**Figure 23:** Structure de l'homogalacturonane (HG) d'après Ridley *et al.*, 2001 .

\* Ridley B.L., O'Neill M., Mohnen D., Pectins: structure, biosynthesis and oligogalacturonide-related signalling, *Phytochemistry*, **2001**, 57, 929-967.

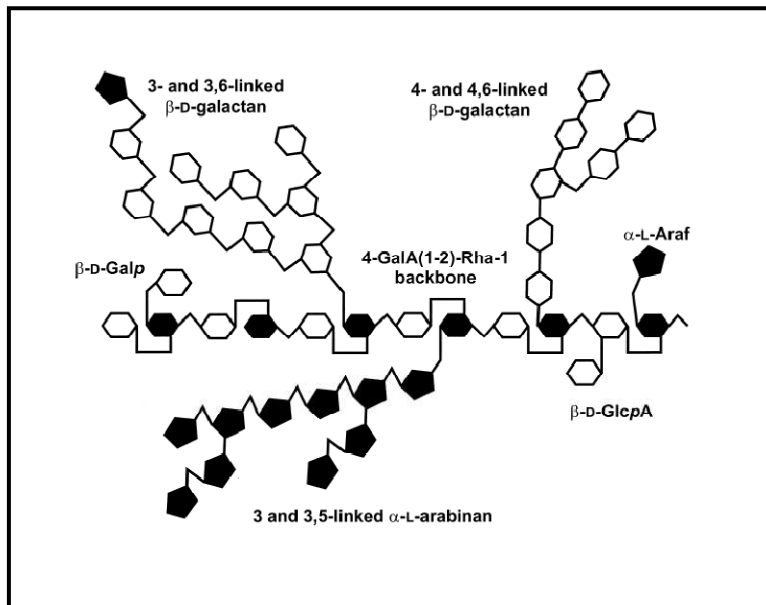


**Figure 24** : Structure des galacturonanes substitués d'après Schols *et al* (1995) et Golovchenko *et al* (2002).

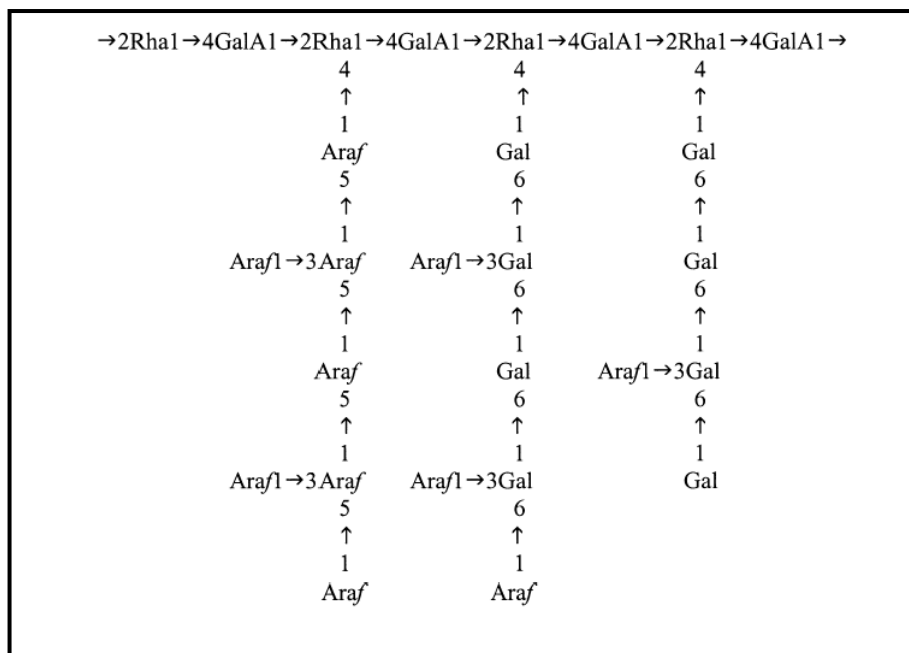
\* Schols H.A., Bakx E.J., Schipper D., Voragen A.G.J., A xylogalacturonan subunit present in the modified hairy regions of apple pectin, *Carbohydr. Res.*, **1995**, 279, 265-279.

\* Golovchenko V.V., Ovodova R.G., Shashkov A.S., Ovodov Y.S., Structural studies of the pectic polysaccharide from duckweed *Lemna minor* L., *Phytochemistry*, **2002**, 60, 89-97.

d'après Ridley *et al.*, 2001.



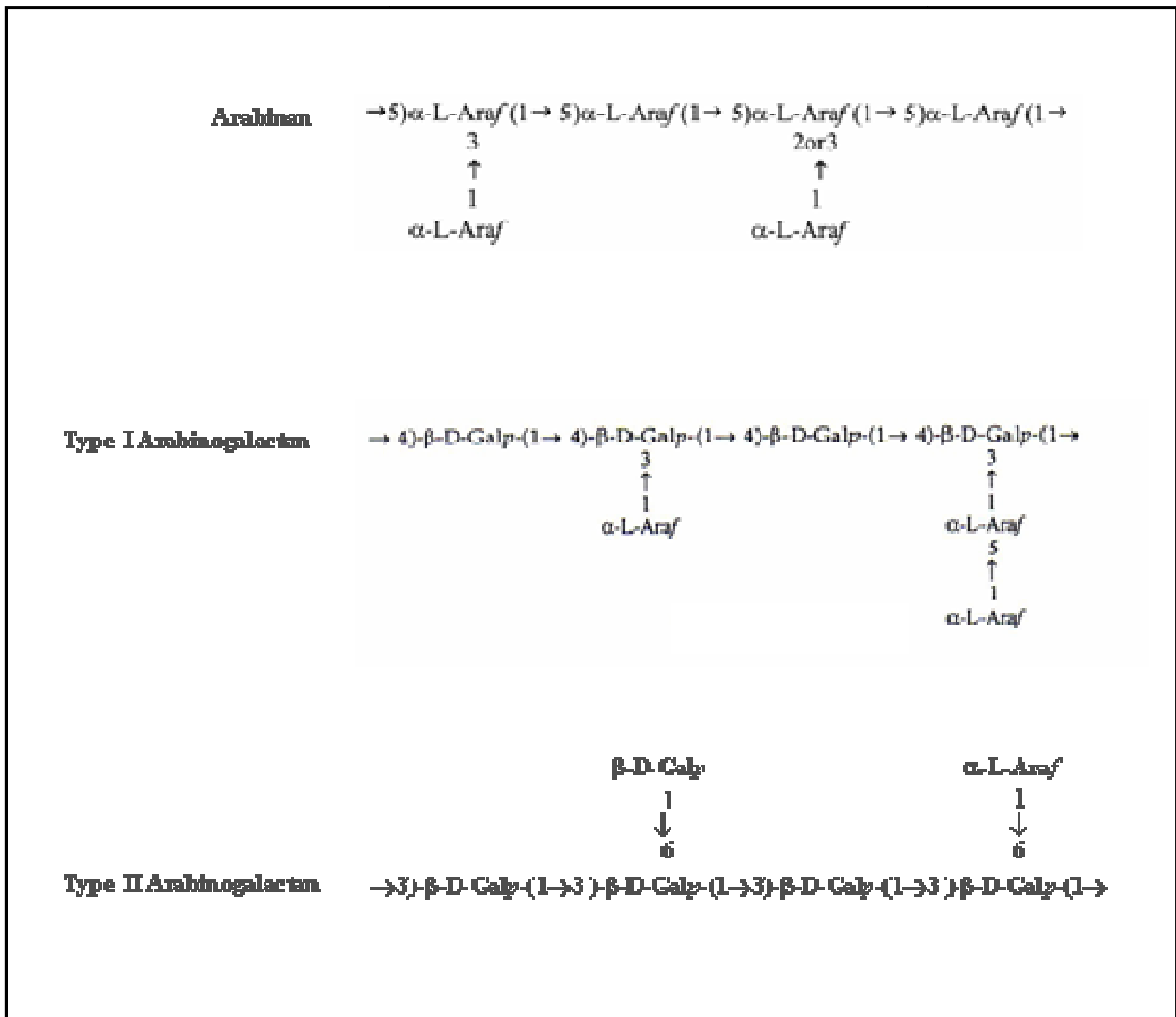
d'après Paulsen & Barsett, 2005



**Figure 25** : Structure du rhamnogalacturonane I

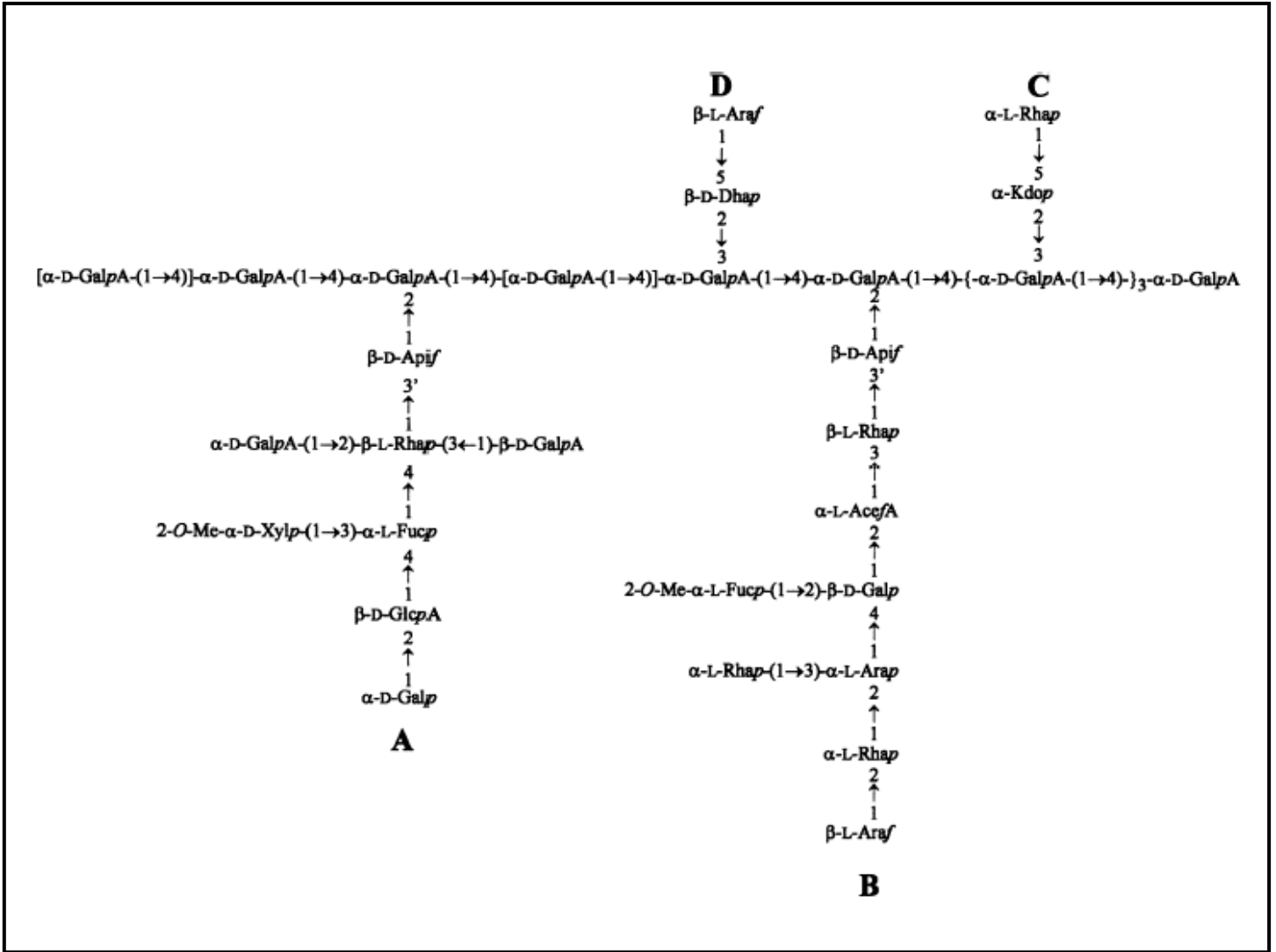
\* Ridley B.L., O'Neill M., Mohnen D., Pectins: structure, biosynthesis and oligogalacturonide-related signalling, *Phytochemistry*, **2001**, 57, 829-967.

\* Paulsen B.S., Barsett H., Bioactive pectic polysaccharides, *Advances Polymers Sciences*, **2005**, 186, 69-101.



**Figure 26** : Structures des arabinanes et arabinogalactanes de type I et II, d'après Ralet *et al*, 2002.

\* Ralet M.C., Bonin E., Thibault J.F., Pectins, Dans : *Biopolymers vol. 8, Polysaccharides II*, Steinbüchel A. (Ed.), Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2002, 12, 345-380.



**Figure 27** : Structure du rhamnogalacturonane II, schéma selon Rodrigues-Carvajal *et al*, 2003 .

\* Rodrigues-Carvajal M.A., Du Penhoat C.H., Mazeau K., Doco T., Perez S., The three dimensional structure of mega-oligosaccharide rhamnogalacturonan II monomer : a combined molecular modeling and NMR investigation, *Carbohydrate research*, **2003**, 338, 651-671.

### I.2.6.2. Organisation tridimensionnelle des domaines pectiques

Si la structure fine des domaines pectiques est très largement documentée, en revanche quelques questions restent à ce jour sans réponse. Elles concernent essentiellement l'assemblage macromoléculaire des domaines pectiques au sein de la paroi cellulaire végétale. En s'appuyant sur une analyse détaillée de la littérature, Willats *et al* (2001) et Perez *et al* (2003) proposent deux modèles de la structure pectique (figures 28 et 29). Similaires dans leur conception, chacune de ces représentations met en exergue les limites des modèles proposés jusqu'alors. Comme l'indiquent les auteurs, si de tels modèles permettent de donner une bonne lisibilité de la structure et de l'organisation des différents domaines pectiques où alterne des zones lisses (« *smooth region* ») de type HGA et hérissées (« *hairy region* ») principalement de type RG-I et RG-II, ils ne témoignent pas de façon absolue des relations entre les domaines pectiques. Ces deux représentations sont en effet proposées en considérant que les domaines HGA, RG-I et RG-II sont liés de façon covalente ce qui, du point de vue de l'analyse, n'est pas formellement établi. Il a cependant été démontré que les domaines HGA et RG-II présentent une chaîne principale d'acides polygalacturoniques. Dans le cas des RG-I, aucune preuve n'a été – à notre connaissance – obtenue qui démontrerait l'existence d'une telle liaison covalente ; cependant les RG-I sont systématiquement solubilisés à partir des parois cellulaires par utilisation d'endopolygalacturonases. De plus, un fragment RG-I like a été détecté au cours de l'étude d'un fragment RG-II indiquant à cette occasion la proximité de ces fragments Rodriguez-Carvajal *et al*,(2003).

### I.2.6.3. Liaisons chimiques des pectines dans la paroi

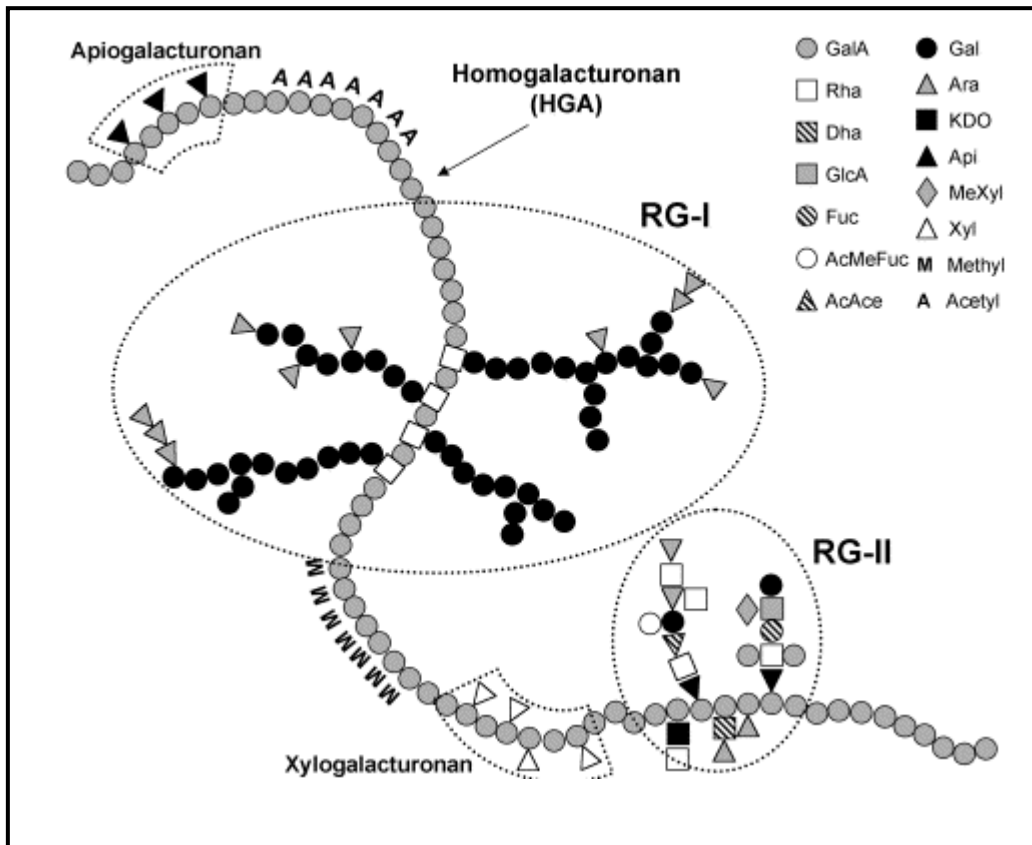
Différents types de liaisons peuvent stabiliser les domaines pectiques en solution mais aussi *in situ*, c'est-à-dire dans la paroi végétale. Dans ce dernier cas, les molécules pectiques y sont stabilisées ce qui s'oppose à leur extractabilité.

---

\* Willats W.G.T., Mc Cartney L., Mackie W., Knox J.P., Pectin : cell biology and prospects for functional analysis, *Plant Molecular Biology*, **2001**, 47, 9-27.

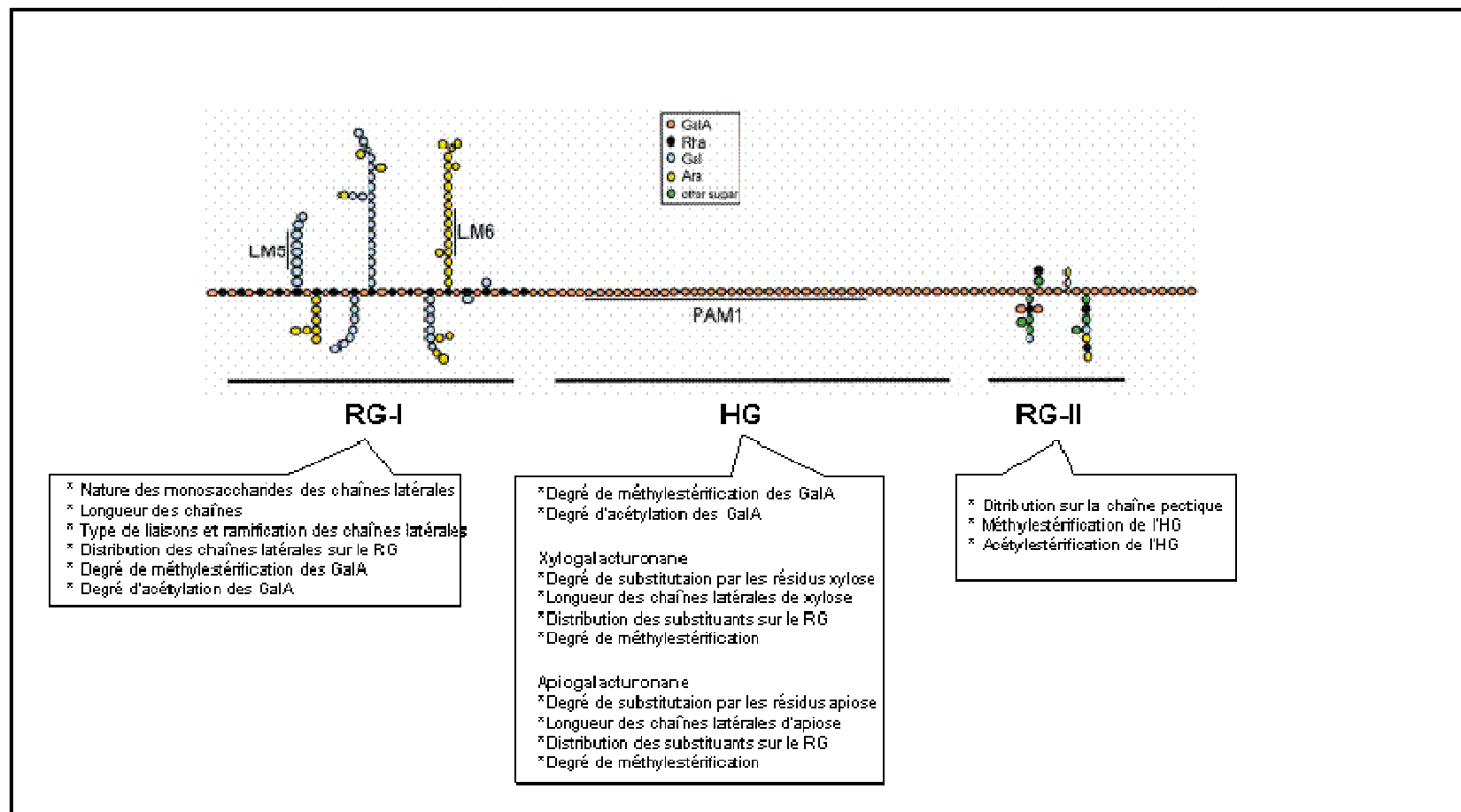
\* Perez.S, Rodriguez-Carvajal M.A., Doco T., A complex plant cell wall polysaccharide : rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function, *Biochimie*, **2003**, 85, 109-121.

\* Rodriguez-Carvajal M.A., Du Penhoat C.H., Mazeau K., Doco T., Pérez S., The three dimensional structure of mega-oligosaccharide rhamnogalacturonan II monomer : a combined molecular modeling and NMR investigation, *Carbohydrate Research*, **2003**, 338, 651-671.



**Figure 28** : Modèle moléculaire de la structure primaire des pectines (d'après Perez *et al*, 2003 ).

\* Pérez.S, Rodriguez-Carjaval M.A., Doco T., A complex plant cell wall polysaccharide : rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function, *Biochimie*, **2003**, 85, 109-121.



**Figure 29 :** Modèle moléculaire de la structure primaire des pectines (Willats *et al.*, 2001). La variabilité interspécifique des domaines est précisée pour chacun d'eux.

\* Willats W.G.T., Mc Cartney L., Mackie W., Knox J.P., Pectin : cell biology and prospects for functional analysis, *Plant Molecular Biology*, **2001**, 47, 9-27.



#### I.2.6.3.a La structure en « eggs box »

Les chaînes HGA de DP suffisamment importants (au moins 15 à 20 résidus de GalA) peuvent interagir avec des ions divalents, le calcium notamment (Axelos et Thibault, 1991). Dans ce cas, l'interaction implique 9 atomes d'oxygènes d'une même chaîne ou de deux chaînes d'HGA contigües - *deux oxygènes des liaisons glycosidiques, deux oxygènes des cycles, deux oxygènes des fonctions acides carboxyliques et trois fonctions alcools secondaires* - par liaison de coordination (figure 31A). La propagation de cette interaction explique l'apparition de gels de bonne tenue en solution ou la mise en place d'interactions intermoléculaires au sein de la paroi cellulaire contribuant ainsi à la stabiliser.

#### I.2.6.3.b La liaison covalente Bore / RG-II

Le RG-II est resté un polysaccharide énigmatique durant de très nombreuses années. En 2000, Matoh *et al* ont démontré l'existence d'un dimère RG-II / RG-II associé au travers d'une liaison 1 : 2 borate-diol diester. L'ester est plus précisément formé entre les résidus apiosyl de la chaîne latérale A (Figure 30 et 31B). Le RG-II est l'un des polysaccharides les plus originaux identifié à ce jour dans la nature. Il suscite actuellement un intérêt grandissant de la part de la communauté scientifique en raison d'une part de ses capacités à interagir avec le bore et, d'autre part, de son rôle supposé dans la structuration de la paroi des cellules végétales. Perez *et al* (2003) ont, par couplage d'études structurale et de dynamique moléculaire, proposé un modèle d'organisation tridimensionnelle d'une telle interaction (figure 32). La compilation des données disponibles dans la littérature sur le sujet, suggère que la fonction élémentaire du bore est de ponter de façon covalente les pectines de la paroi cellulaire. Un tel pontage apparaît par ailleurs nécessaire pour permettre l'expansion du réseau pariétal au cours de la croissance cellulaire et, de façon plus générale, au cours du développement végétal.

---

\* Axelos M.A., Thibault J.F., The chemistry of low methoxyl pectin gelation, In : *The chemistry and technology of pectin*, Walter R.H. (Ed.), Academic Press New York, **1991**, pp 109.

\* Matoh T., Takasaki M., Takabe K., Boron nutrition of cultured tobacco BY-2-cells. III. Characterization of boron rhamnogalacturonan II complex in cells acclimated to low levels of boron, *Plant Cell Physiol.*, **2000**, 41, 363-366.

\* Pérez.S, Rodriguez-Carjaval M.A., Doco T., A complex plant cell wall polysaccharide : rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function, *Biochimie*, **2003**, 85, 109-121.

#### I.2.6.3.c Liaisons entre les groupements carboxyliques des GalA

Environ 2% des résidus GalA peut s'associer par transestérification (figure 31 C). Une telle réaction peut être catalysée par certaines catégories de pectines méthyles estérases (PME) (Fry, 1986 ; Ridley *et al.*, 2001 ; Vincken *et al.*, 2003).

#### I.2.6.3.d Liaisons entre pectines par l'intermédiaire des acides féruliques

Wallace et Fry (1994) ont isolé et caractérisé des liaisons covalentes entre chaînes pectiques impliquant l'interaction d'acides féruliques et de résidus arabinosyl et galactosyl des chaînes latérales des RG-I.

#### I.2.6.3.e Les liaisons entre les macromolécules pectiques et les autres constituants de la paroi

- **avec les protéines** : par interactions ioniques (Tucker et Mitchell, 1993) ou par liaison covalente (Qi *et al.*, en 1995) avec l'extensine.
- **avec les hémicelluloses** : Thompson et Fry (2000) ont démontré la liaison covalente des xyloglucanes avec les chaînes latérales d'arabinanes et de galactanes des RG-I.
- **avec la cellulose** : les pectines sont liées de façon covalente avec les xyloglucanes qui eux même sont liés de façon covalente avec la cellulose (Thakur *et al.*, 1997). Des études RMN montrent par ailleurs des associations fortes des galactanes caractéristiques du RG-I avec des résidus cellulosiques recueillis par solubilisation poussée des hémicelluloses par les alcalis (Willats *et al.*, 2001).

---

\* Fry S.C., Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **1986**, 37, 165-186.

\* Ridley B.L., O'Neil M.A., Mohnen D., Pectins : structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling, *Phytochemistry*, **2001**, 57, 929-967.

\* Vincken J.P., Schols H.A., Oomen R.J.F.J., Mc Cann M.C., Ulvskov P., Voragen A.G.J., Visser R.G.F., If homogalacturonan were a side chain of rhamnoglacturonan I. Implications for cell wall architecture, *Plant physiology*, **2003**, 132, 1781-1789.

\* Wallace G., Fry S.C., Phenolic components of the plant cell wall, *Int. Rev. Cytol.*, **1994**, 151, 229-267.

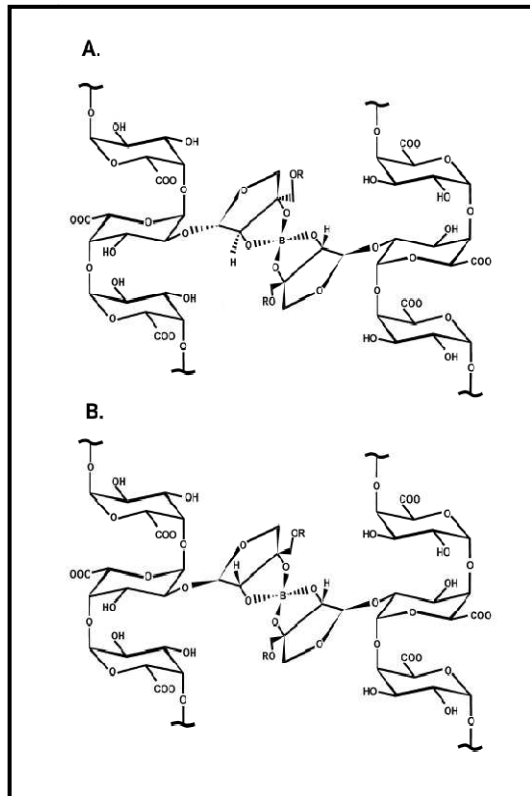
\* Tucker G.A., Mitchell J., Cell walls, structure, utilisation and manipulation. *Plant Biotechnology*, **1993**, 55-103.

\* Qi X.Y., Behrens B.X., West P.R., Mort A.J., Solubilization and partial characterization of extensin fragments from cell-walls of cotton suspension cultures : evidence for a covalent cross-link between extensin and pectin, *Plant physiology*, **1995**, 108, 1691-1701.

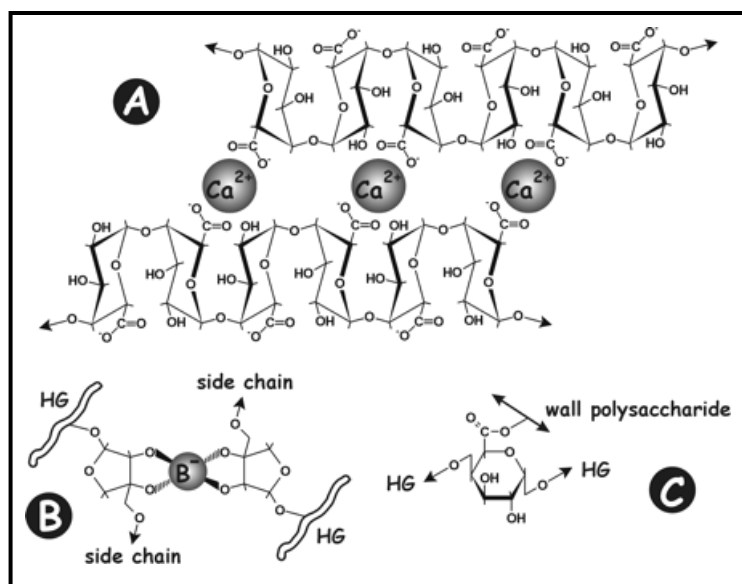
\* Thompson J.E., Fry S.C., Evidence for covalent linkage between xyloglucan and acidic pectin in suspension-cultured rose cells, *Planta*, **2000**, 211, 275-286.

\* Thakur B.R., Singh R.K., Handa A.K., Chemistry and uses of pectin a review, *Critical reviews in food science and nutrition*, **1997**, 37(1), 47-73.

\* Willats W.G.T., Mc Cartney L., Mackie W., Knox J.P., Pectin : cell biology and prospects for functional analysis, *Plant molecular biology*, **2001**, 47, 9-27.



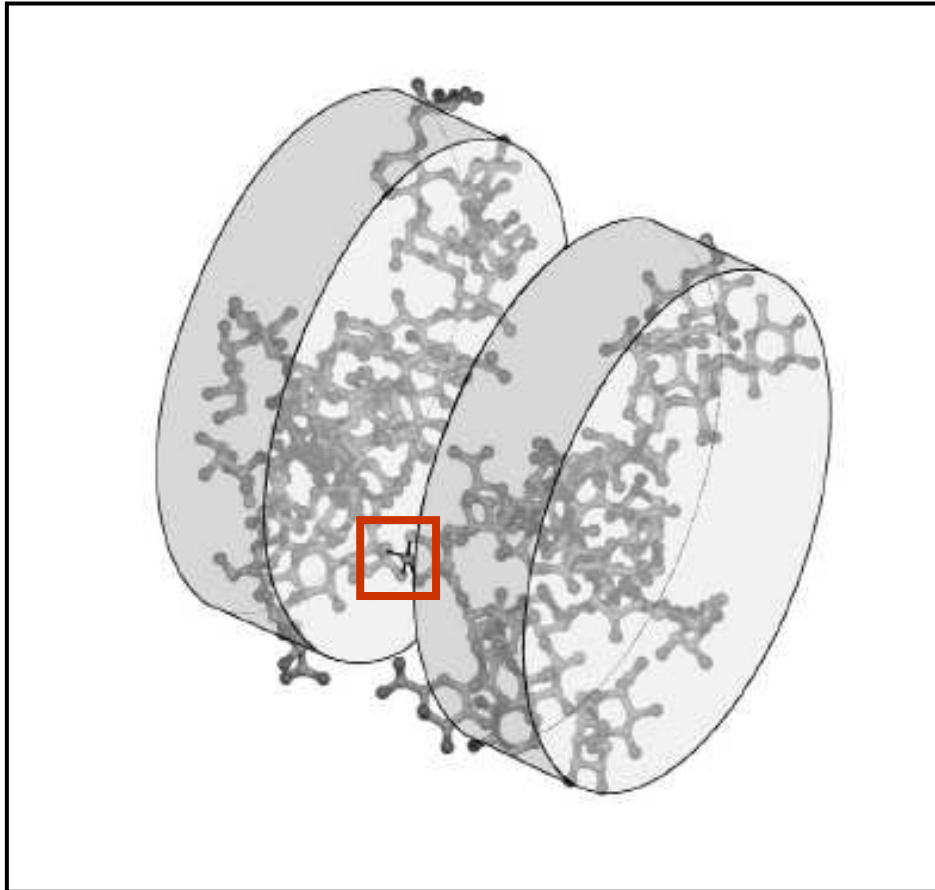
**Figure 30** : Dimère RG-II / RG-II associé au travers d'une liaison 1:2 borate-diol diester (Ridley *et al*, 2001).



**Figure 31** : Liaisons chimiques des pectines au sein de la paroi cellulaire végétale, schéma tiré de Vincken *et al* (2003). (A) interaction avec le calcium ; (B) liaison borate-diol ester entre deux RG-II ; (C) transestérification de fonctions uronyl-ester.

\* Ridley B.L., O'Neil M.A., Mohnen D., Pectins : structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling, *Phytochemistry*, **2001**, 57, 929-967

\* Vincken J.P, Schols H.A., Oomen R.J.F.J., Mc Cann M.C., Ulvskov P., Voragen A.G.J., Visser R.G.F., If homogalacturonan were a side chain of rhamnoglacturonan I. Implications for cell wall architecture, *Plant physiology*, **2003**, 132, 1781-1789.



**Figure 32** : Représentation tridimensionnelle du dimère de RGII (d'après Perez *et al*, 2003 ).

L'atome de bore est encadré.

---

\* Pérez.S, Rodriguez-Carjaval M.A., Doco T., A complex plant cell wall polysaccharide : rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function, *Biochimie*, **2003**, 85, 109-121.

## I.2.7. Vers un nouveau modèle structural des pectines : l'HG est-il en fait une chaîne latérale du RG-I ?

«*If Homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implication for cell wall architecture*». Vincken et al, 2003, *Plant Physiology*, 132, 1781-1789.

Jusqu'à présent, il était communément admis que l'HGA formait la chaîne principale des polymères pectiques comme le montre les figures 28 et 29 (Perez *et al* (2003) et Willats *et al*, 2001). Cependant, une structure alternative a été récemment proposée par Vincken *et al* (2003) (figure 34) dans laquelle l'HGA est désormais considéré comme une des chaînes latérales du RG-I. Le modèle pariétal de Vincken *et al*. repose sur une structure cellulose/xyloglucane enchâssée dans une matrice de pectines interconnectées. Jusqu'à présent, la lamelle moyenne était représentée comme un gel de pectate de calcium (HG de faible DM) séparant deux cellules voisines. La question de savoir pourquoi ces polymères s'accumulent à cet endroit et comment les lamelles moyennes riches en HG sont associées à la paroi primaire n'a cependant pas encore trouvé de réponse. Selon Vincken, les HG méthylestérifiés (potentiellement sans arabinane et galactane) seraient les premiers à être déposés au niveau de la plaque cellulaire d'une cellule en cours de division. Ils pourraient ensuite être déestérifiés par les PME devenant par la même occasion sensible au calcium et pouvant dès lors, former des gels. De tels HG seraient alors extraits de la plupart des végétaux par utilisation de chélateurs de calcium. L'instant à partir duquel la synthèse de la lamelle moyenne est considérée comme achevée ne précède pas forcément la formation de la paroi primaire. En effet, il est admis aujourd'hui que la lamelle moyenne apparaît progressivement avec la paroi primaire (Matar et Catesson, 1988). Vincken suppose par ailleurs que les molécules pectiques déposées par delà la lamelle moyenne seraient stabilisées dans la paroi selon deux mécanismes :

- *Des contraintes physiques* au travers desquelles les RG-I seraient pressés contre les fibrilles de cellulose induisant une gêne stérique qui abaisserait la liberté de mouvement de leurs chaînes latérales. Une telle hypothèse est corrélée par l'étude de mutants déficients en arabinose chez lesquels les composés pectiques sont faiblement retenus dans la paroi. Les arabinanes sont alors considérés comme des points d'ancrage dans la paroi cellulaire. Au contraire, les

---

\* Vincken J.P., Schols H.A., Oomen R.J.F.J., Mc Cann M.C., Ulvskov P., Voragen A.G.J., Visser R.G.F., *If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture*, *Plant physiology*, **2003**, 132, 1781-1789.

\* Pérez.S, Rodriguez-Carjaval M.A., Doco T., *A complex plant cell wall polysaccharide : rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function*, *Biochimie*, **2003**, 85, 109-121.

\* Willats W.G.T., Mc Cartney L., Mackie W., Knox J.P., *Pectin : cell biology and prospects for functional analysis*, *Plant molecular biology*, **2001**, 47, 9-27.

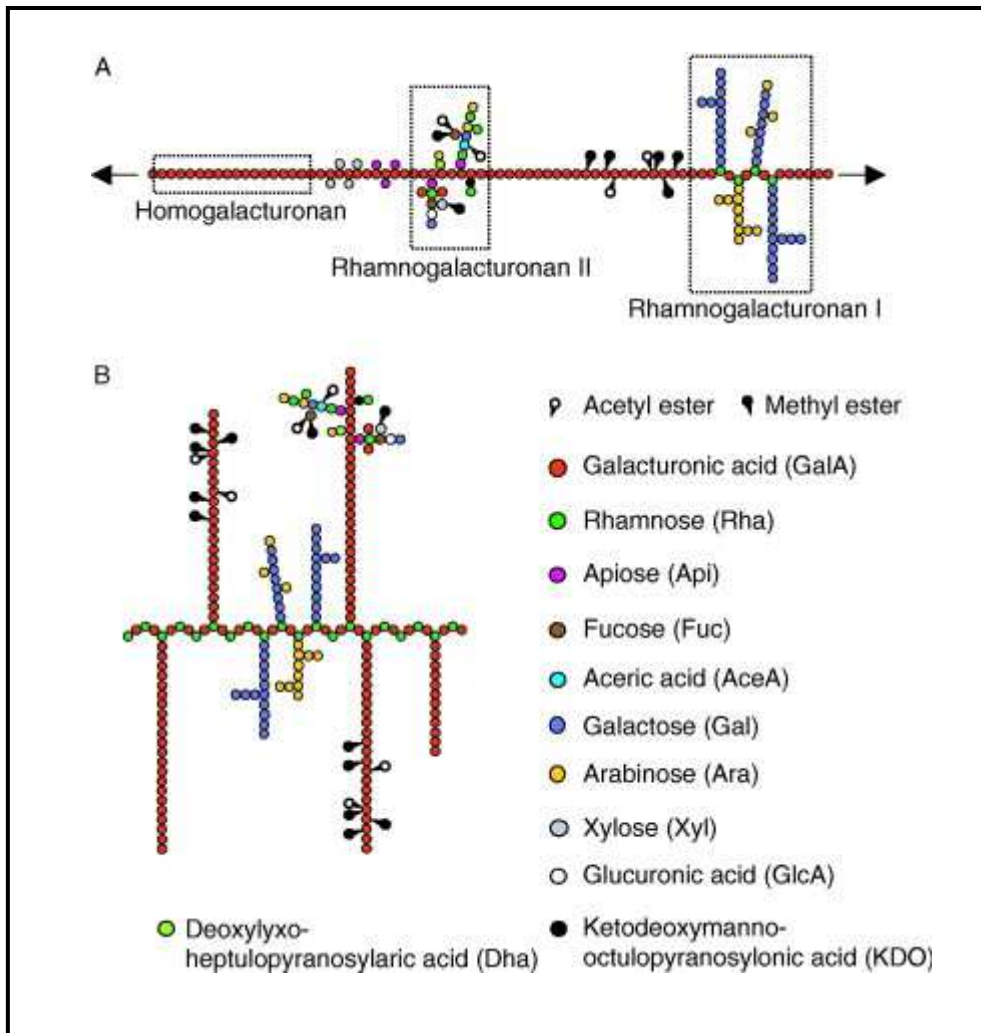
\* Matar D., Catesson A.M., *Protoplasma*, **1988**, 146, 10-17.

galactanes pourraient jouer un rôle prédominant dans la régulation et le contrôle de la porosité des parois.

- *Des liaisons entre les différentes couches pectiques* qui augmenteraient la cohésion de l'édifice. Il semble que les liaisons covalentes entre les domaines RG-II *via* un atome de bore soient les acteurs principaux d'un tel phénomène. Les parois des cellules déficientes en bore apparaissent en effet épaissies. L'ajout de bore aura pour conséquence de rétracter les parois qui apparaîtront dès lors plus condensées, donc plus structurées.

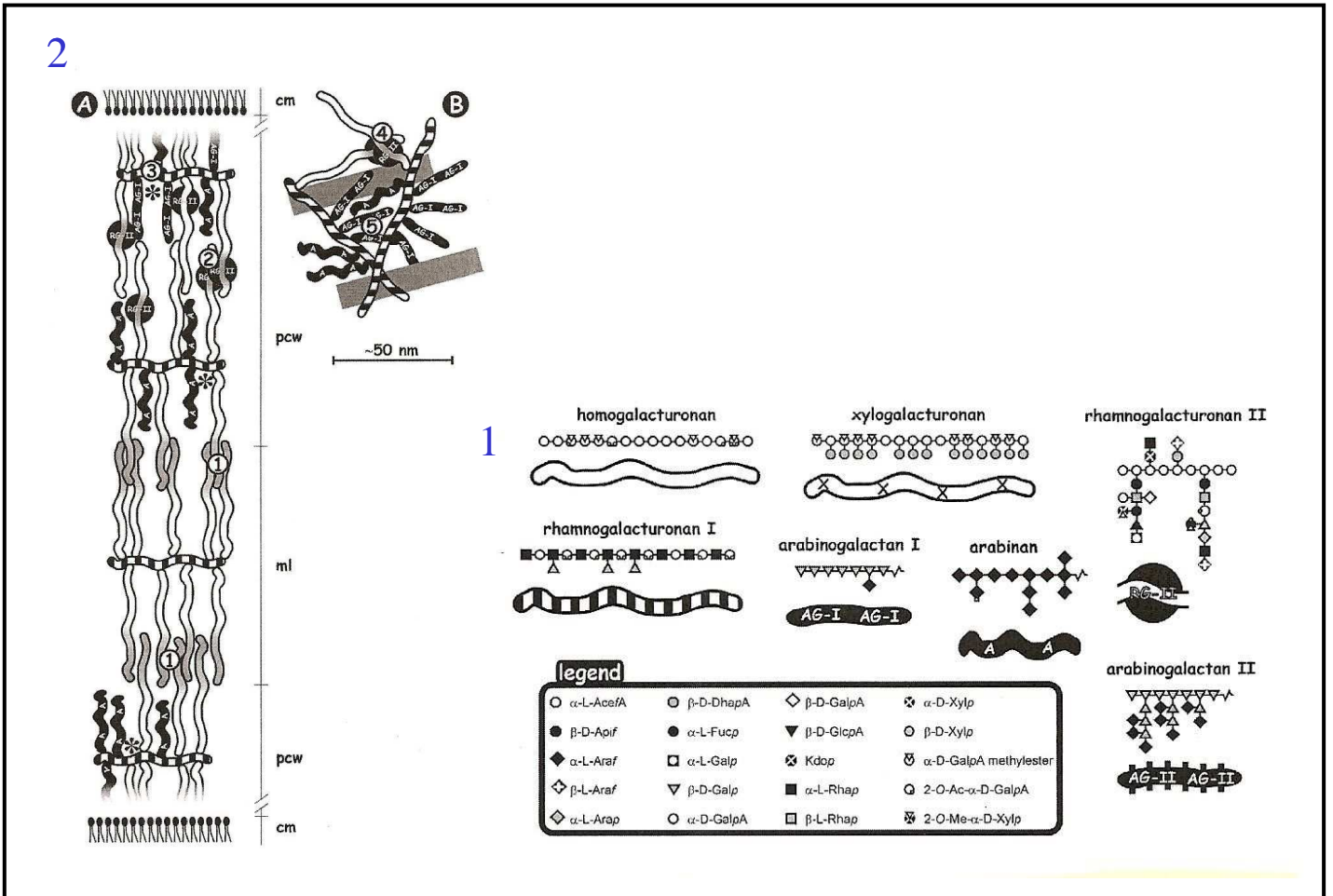
La répartition des différents domaines pectiques au travers de la lamelle moyenne et de la paroi primaire est présentée en figure 34. Vincken propose que les chaînes principales des RG-I soient disposées parallèlement à la membrane cellulaire. En conséquence, les chaînes latérales qui la substituent présenteraient une orientation perpendiculaire à celle-ci. Par ailleurs, les chaînes d'HG seraient plus longues que les autres et présenteraient des zones de recouvrement partielle ou totale avec les couches pectiques adjacentes afin notamment de favoriser la dimérisation des RG-II dans la paroi primaire. Enfin, les domaines pectiques ramifiés par les arabinogalactanes seraient déposés plus tardivement au cours du développement cellulaire et, de façon préférentielle, à proximité de la membrane plasmique et donc des fibres de cellulose en cours de synthèse. Un tel phénomène, outre qu'il permettrait d'expliquer l'établissement d'interactions privilégiées entre les pectines et les fibres de cellulose dans la paroi primaire, explique aussi l'extraordinaire stabilité chimique et physique de la paroi cellulaire végétale.

L'analyse comparative des différents modèles pectiques disponibles dans la littérature met en lumière les pistes restant à explorer en matière d'une part d'analyse structurale des pectines et, d'autre part, de compréhension de l'organisation tridimensionnelle de la paroi cellulaire. C'est notamment le cas pour le mode d'association entre le RG-I et l'HG, la nature ordonnée ou aléatoire de la distribution des chaînes latérales sur le RG-I ou encore le nombre et la distribution des RG-II sur l'HG. Quoiqu'il en soit, et quel que soit le modèle retenu, une chose est admise : les pectines sont une famille de polysaccharides extrêmement complexes dont la structure est très variable. Cette dernière est dépendante de l'espèce végétale, des tissus considérés et dans ces tissus, des groupes cellulaires étudiés. La longueur des chaînes des différents domaines est aussi variable, tout comme la composition monosaccharidique des RG-I. Au contraire, la structure des RG-II semble être très conservée. De plus, les acides galacturoniques des HGA pourront être méthylestérifiés ou acétylés. Chacun des degrés de méthylestérification ou d'acétylation aura d'ailleurs un rôle majeur dans les propriétés fonctionnelles des pectines.



**Figure 33** : Les modèles pectiques (A) conventionnel et (B) alternatif, schéma selon Willats *et al* (2006).

\* Willats G.T.W., Knox J.P., Mikkelsen J.D., Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel, *Trends Food Sci. Technol.*, **2006**, 17, 97-104.



**Figure 34** : Le modèle pectique de Vincken *et al* (2003).

**2A** : vue latérale de deux parois cellulaires séparées par une lamelle moyenne et associant deux cellules voisines. **1** - plaque cellulaire formée par l'association  $\text{Ca}^{2+}$  - HG déméthylestirifiées de cellules opposées. **2** - stabilisation des couches pectiques supérieures par dimérisation des RG-II (liaisons bore-diol esters). **3** - le RG-I est pressé contre les microfibrilles de cellulose. Les ramifications des mêmes RG-I enrobent les microfibrilles avec comme double conséquence de stabiliser à la fois les fibres de celluloses et de limiter l'extractabilité des RG-I.

**2B** : vue de dessus de la paroi orientée de la membrane plasmique vers la lamelle moyenne. **4** – la dimérisation des RG-II peut s'établir dans une même couche pectique ou entre deux couches pectiques différentes. **5** – les AG-I et les arabinanes comblent les interstices dans la paroi et régulent ainsi sa porosité.

**1 - Notes** : les régions déméthylestirifiées des domaines HG sont grisées. Les barres grises correspondent aux microfibrilles de cellulose. \* microfibrilles de cellulose. cm : membrane plasmique. pcw : paroi cellulaire primaire. ml : lamelle moyenne. Pour les autres symboles, consulter la figure 1.

\* Vincken J.P, Schols H.A., Oomen R.J.F.J., Mc Cann M.C., Ulvskov P., Voragen A.G.J., Visser R.G.F., If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture, *Plant physiology*, **2003**, 132, 1781-1789.



### I.3. Phytopolysaccharides, pectines et valorisation

Reposant souvent sur une approche empirique, les propriétés biologiques des plantes et des substances naturelles qu'elles renferment, font actuellement l'objet de nombreux travaux. Sur la base d'une synthèse bibliographique, Paulsen (2002, 2005) précise, tout en expliquant leur origine, les propriétés biologiques des polysaccharides en général et des pectines en particulier. Une telle démarche n'est pas isolée et il semble aujourd'hui que les pharmacopées traditionnelles soient revisitées de façon plus systématique ouvrant par là même la voie au développement de champs disciplinaires nouveaux, c'est le cas pour l'éthnopharmacologie et la phytocosmétologie. Une telle stratégie requiert, d'une part, l'identification des espèces végétales sources et, d'autre part, l'isolement puis l'analyse structurale des molécules biologiquement actives. La compilation des données permettra dans un dernier temps de corréliser les propriétés biologiques observées à la présence de familles de molécules et, à l'intérieur de ces familles, de motifs chimiques désignés comme responsables de l'activité.

#### I.3.1. Valorisation des polysaccharides en cosmétique

Dans le domaine de l'industrie cosmétique, les polysaccharides sont principalement utilisés comme agent de texture (Martini et Seiller, 1992). Ces macromolécules augmentent considérablement la viscosité des phases aqueuses. Ils doivent par ailleurs contribuer à la stabilité de la formule et donner une consistance à celle-ci. Comme l'indique le tableau 4, les agents de texture sont classés - selon leur origine - en trois catégories : les agents de texture naturels, les agents de texture semi-synthétiques et les agents de texture synthétiques.

Ils sont épaississants lorsque les polymères ne peuvent pas s'associer fortement en raison : d'un taux de ramification élevé, de structures trop irrégulières, de la présence de

---

\* Paulsen B.S., Biologically active polysaccharides as possible lead compounds, *Phytochemistry Reviews*, **2002**, 1, 379-389.

\* Paulsen B.S., Barsett H., Bioactive pectic polysaccharides, *Advances Polymers Sciences*, **2005**, 186, 69-101.

\* Martini M.C., Seiller M., Actifs et additifs en cosmétologie, *Tec et doc Lavoisier*, **1992**, pp 630.

**Tableau 4** : Les principaux agents texturants utilisés en cosmétique d'après Martini et Seiller, 1992.

	<b>Origine</b>	<b>Dénomination</b>		
<b><u>Les agents de texture naturels</u></b>				
<i>Origine végétale</i>	Extraits de graines	Gomme de caroube Gomme de Guar		
	Exsudats de plantes	Gomme arabique Gomme Adragante Gomme de Karaya		
	Extraits de fruits	pectines		
	Extraits d'algues	Agar-agar ou gélose Alginates Carraghénanes		
	<i>Origine microbienne</i>	Dérivés exocellulaires	Xanthane Dextrane Gellane	
		<i>Origine animale</i>	Protéines de lait	Caséine
			Peaux-os	Gélatine
	<i>Origine minérale</i>	Carapaces	Chitosane	
		Argiles	Silicates d'aluminium Silicates de magnésium	
		Dioxydes de silicium amorphes	Silices hydratées	
<b><u>Agents de texture semi-synthétiques</u></b>				
	Cellulose	Carboxyméthylcellulose Hydroxypropylcellulose Hydroéthylcellulose Hydroéthylpropylcellulose Hydropropylméthylcellulose		
<b><u>Agents de texture synthétiques</u></b>				
		Polymères acryliques Polyacrylamides		

\* Martini M.C., Seiller M., Actifs et additifs en cosmétologie, *Tec et doc Lavoisier*, **1992**, pp 630.

substituants non hydrocarbonées (MeOH, acétyles, acides pyruviques). Ils présenteront en revanche des propriétés gélifiantes s'ils sont capables de s'associer étroitement pour former un réseau tridimensionnel poreux au sein duquel le liquide de dispersion est immobilisé. De telles associations sont favorisées lorsque les polymères sont peu ramifiés et présentent un taux de substitution non hydrocarbonée faible. Les principaux épaississants utilisés par l'industrie cosmétique sont :

- *Les galactomannanes* (figure 35) obtenus par broyage de l'albumen de graines *Ceratonia siliqua* et de *Cyanopsis tetragonolibus*. Ces extraits sont respectivement la gomme de caroube et la gomme de guar. La chaîne principale est constituée d'enchaînement de motif  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 4)-Man sur lesquels sont greffés des résidus d' $\alpha$ -D-galactose (Martini et Seiller, 1992).
- *La gomme de Karaya* est un exsudat naturel de *Sterculia urens* et d'autres espèces de la famille des *Sterculiacées*, arbres originaires d'Inde et de l'Afrique de l'Ouest. Ce polysaccharide acétylé de très haut poids molaire est constitué de galactose, rhamnose et d'acides galacturoniques et glucuronique. Les interactions entre les chaînes sont rendues difficiles à cause du désordre important occasionné par le mélange très complexe de polysaccharide et de l'encombrement stérique dû à la présence de substitution par des fonctions acétyles (Martini et Seiller, 1992).
- La gomme de Xanthane (figure 36) (Ciullo et Anderson, 2000) est obtenue par fermentation aérobie de sucres par *Xanthomonas campestris*, une bactérie isolée du chou. La chaîne principale est constituée de résidus de  $\beta$ -D-glucose qui sont substitués une fois sur deux par une chaîne latérale trisaccharidique composée d'une unité mannose, d'un acide glucuronique lui-même lié à une unité mannose. Ce polysaccharide a un très haut poids moléculaire. Les résidus de mannose pourront être substitués par du pyruvate lorsqu'ils sont en position terminale ou des acétyles lorsqu'ils sont associés à la chaîne principale. En raison d'un fort degré de substitution et de leur caractère polyanionique (groupements pyruvates et carboxylates qui donnent

---

\* Martini M.C., Seiller M., Actifs et additifs en cosmétologie, *Tec et doc Lavoisier*, 1992, pp 630.

\* Ciullo P.A., Anderson M., Xanthan gum, a clearly better stabilizer, *Söfw journal*, 2000, 126(6),34-36 .

au xanthane un caractère anionique très marqué), ces polymères ne peuvent pas s'associer fortement.

Les principaux gélifiants sont essentiellement extraits à partir d'algues marines :

- Les acides alginiques et les alginates sont extraits d'algues brunes. Ils sont composés d'acides mannuronique et guluronique. Comme c'est le cas pour les pectines, les gels se forment par association de zones polyguluroniques avec un cation divalent, le  $\text{Ca}^{2+}$  (Martini et Seiller, 1992).
- Les carraghénanes (figure 37) sont des polysaccharides sulfatés extraits de certaines algues rouges. Ces macromolécules sont constituées par une chaîne de D-galactose, les différences entre les carraghénanes sont dues au nombre, à la position des groupements sulfates et à la présence ou non d'unités 3,6-anhydro galactose. Il existe cinq types de carraghénanes. La solubilité des carraghénanes est fonction de la teneur en groupement sulfate (hydrophiles) et en groupement 3-6 anhydrogalactose (hydrophobes). La force du gel peut être accrue par ajout d'une solution électrolytique de potassium. Le potassium est un cation de faible taille à l'état hydraté, ce qui lui permet de s'imbriquer facilement dans les hélices de carraghénanes pour neutraliser les charges négatives des groupements sulfates. Cette neutralisation favorise le rapprochement et l'association des chaînes et conduit à la formation d'un gel rigide (Martini et Seiller, 1992) .

S'il est aujourd'hui incontestable que les molécules naturelles en général et les polysaccharides en particulier, bénéficient d'un intérêt toujours grandissant de la part de nombreuses industries - *l'industrie cosmétique en particulier* - il n'en demeure pas moins que le principal frein à la valorisation est souvent la ressource biologique elle-même. Les polysaccharides extraits de végétaux ont en effet des caractéristiques variables car les espèces sources sont soumises à des aléas climatiques et écologiques qui jouent de manière significative sur la qualité et la quantité des molécules qu'elles produisent. Il en résulte un manque de reproductibilité des formulations qui s'oppose à leur mise sur le marché.

---

\* Martini M.C., Seiller M., Actifs et additifs en cosmétologie, *Tec et doc Lavoisier*, 1992, pp 630.

Longtemps, la notion de glucides est restée liée à celle de substances de réserves, de composés énergétiques et de structures de soutien, les reléguant à une place d'agent texturant. Leurs fonctions biologiques aujourd'hui reconnues par la communauté scientifique sont multiples et les polysaccharides sont désormais utilisés en tant qu'actifs par l'industrie cosmétique (Martini et Seiller, 1992). Les recherches sur les actifs polysaccharidiques dans le domaine de la cosmétique restent encore peu abondantes et confidentielles. De façon globale, l'activité biologique des polysaccharides est souvent corrélée à leur acidité. Mais l'acidité n'est pas un déterminant absolu. En revanche, une plus grande complexité de la structure des polysaccharides (taux de branchement et ramification, degré de polymérisation) semble influencer positivement leur capacité à déclencher une activité biologique (Gloaguen et Krausz, 2004). Quelques phytopolysaccharides sont déjà couramment utilisés, c'est par exemple le cas pour:

- **Le phytoglycogène**, d'origine marine ou produit par voie biotechnologique : c'est un homopolymère de Glc lié en  $\alpha$ -1,4 et  $\alpha$ -1,6. Sa structure est similaire à celle de l'amidon mais ces chaînes sont plus ramifiées. Sa masse moléculaire est estimée à  $10^7$  Da. Son utilisation est justifiée par sa capacité à renforcer les mécanismes de défense et de réparation des cellules de l'épiderme Pauly *et al*, 1998<sup>1</sup>.
- **Les galactomannanes** extraits de graines de *Cassia angustifolia* Vahl, légumineuse (*Caesalpinaceae*) exotique originaire d'Inde (Pauly *et al*, 1999). La chaîne principale est constituée d'enchaînement de motif  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 4)-Man sur lesquels sont greffées des unités  $\alpha$ -D-Gal. Les propriétés de ce polymère sont comparables à celles de l'acide hyaluronique et ses revendications sont les suivantes (Pauly *et al*, 1998) :

Sensation de velouté, de douceur et d'émollience (non grasse et non occlusive) de la peau.

---

\* Gloaguen V., Krausz P., Barrier function and dry skin : Use of rhamnogalacturonans as a new therapeutic strategy, *Söwf Journal*, **2004**, 130, 20-26.

\* Pauly M., Freis O., Pauly G., Les polysaccharides en cosmétologie de soins, *Parfums cosmétiques actualités*, **1998**, 140, 41-47.

\* Pauly M., Freis O., Pauly G., Galactomannan and xyloglucan : Bio-active polysaccharides, *Cosmetics and toiletries*, **1999**, 114, 7, 65-78.

\* Martini M.C., Seiller M., Actifs et additifs en cosmétologie, *Tec et doc Lavoisier*, **1992**, pp 630.

Hydratation à long terme, il améliore la capacité du *stratum corneum* à fixer l'eau.

Amélioration des propriétés sensorielles tactiles de la peau : douceur souple, hydratation.

Correction-réparation des peaux rêches et sèches ;

Propriétés filmogènes.

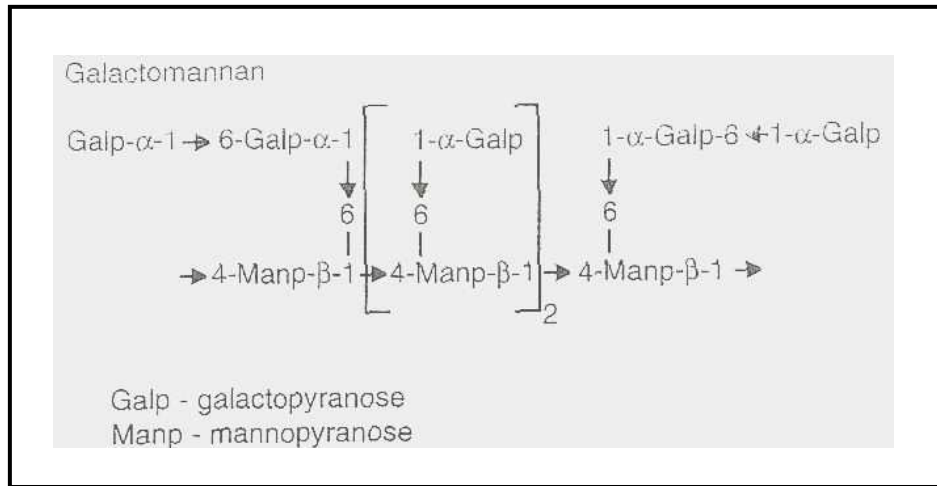
- **Le Xyloglucane** (figure 38) extrait de *Tamarin indica* (Pauly et Freis, 1998). La chaîne principale est constituée d'enchaînement de motif  $\beta$ -D-(1→4)-Glc sur laquelle se greffent en C6 de courtes chaînes latérales d' $\alpha$ -D xylopyrannose, parfois porteuses d'extrémités non réductrices de résidus  $\beta$ -D-galactopyranose (1→2). Le xyloglucane a une activité sur la régénération et la croissance des fibroblastes, son activité est dose dépendante. Une activité anti-radicalaire libre a été rapportée. Ce polysaccharide a des propriétés immunostimulantes (Martini et Seiller, 1992).
- **Les  $\beta$ -D-(1→3)-glucanes** extraits de l'avoine et de l'orge (Mansell, 1994), sont très importants dans les phénomènes de cicatrisation, ils activent les cellules de Langerhans, celles-ci produisent des cytokines qui est une substance qui prévient et combat les infections. Ces polymères sont des activateurs de macrophages.

---

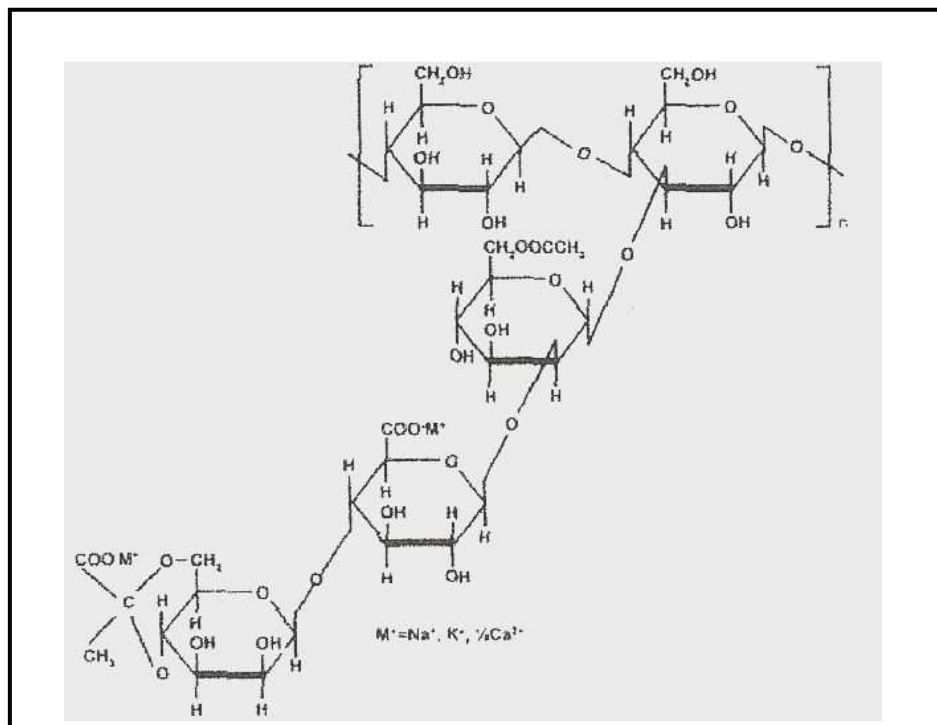
\* Pauly M., Freis O., Pauly G., Les polysaccharides en cosmétologie de soins, *Parfums cosmétiques actualités*, **1998**, 140, 41-47.

\* Martini M.C., Seiller M., Actifs et additifs en cosmétologie, *Tec et doc Lavoisier*, **1992**.

\* Mansell M.A., Polysaccharides in skin care, *Cosmetics & Toiletries*, **1994**, 109, 67-72.



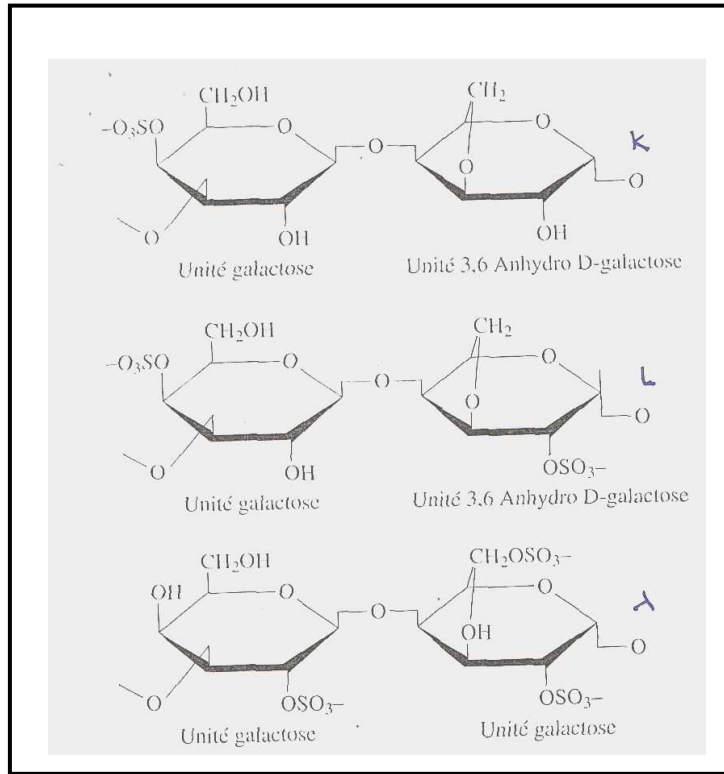
**Figure 35** : Les Galactomanannes d'après Pauly *et al* (1999).



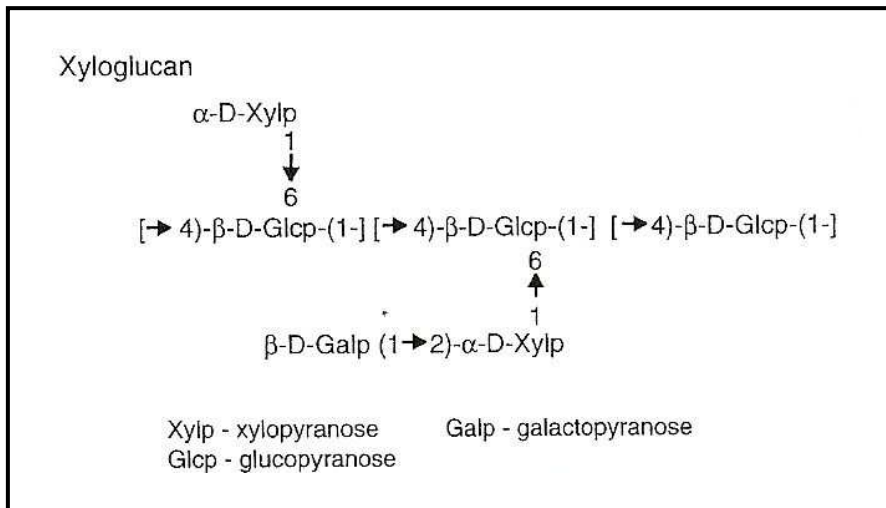
**Figure 36** : Le Xanthane d'après Martini et Seiller (1992).

\* Pauly M., Freis O., Pauly G., Galactomannan and xyloglucan : Bio-active polysaccharides, *Cosmetics and toilettries*, **1999**, 114, 7, 65-78.

\* Martini M.C., Seiller M., Actifs et additifs en cosmétologie, *Tec et doc Lavoisier*, **1992**, pp 630.



**Figure 37 :** Les Carraghénanes d'après Martini et Seiller (1992).



**Figure 38:** Les xyloglucanes, d'après Pauly *et al*, 1999.

\* Martini M.C., Seiller M., Actifs et additifs en cosmétologie, *Tec et doc Lavoisier*, **1992**, pp .630

\* Pauly M., Freis O., Pauly G., Galactomannan and xyloglucan : Bio-active polysaccharides, *Cosmetics and toiletries*, **1999**, 114, 7, 65-78.



### I.3.2. Les Pectines d'intérêt thérapeutiques

Malgré le développement de la pharmacie de synthèse, notre arsenal thérapeutique repose encore largement sur les propriétés médicinales de nombreuses plantes, souvent reconnues de façon empirique depuis des temps immémoriaux par diverses civilisations. Depuis près de vingt années, avec la prise de conscience de la biodiversité et de sa richesse en molécules, l'industrie pharmaceutique se tourne de nouveau vers le monde végétal, en explorant les zones tropicales, mais aussi en revisitant les pharmacopées traditionnelles. L'étude des plantes médicinales a permis de bien comprendre l'activité pharmacologique de composés de faibles poids moléculaires, tels que les alcaloïdes, mais ces petites molécules ne peuvent rendre compte à elles seules, de tous les effets cliniques des extraits végétaux : des molécules de poids moléculaires élevés, les polysaccharides, y ont aussi leur part. Plusieurs activités biologiques ont été découvertes chez les animaux et chez l'homme : stimulation des défenses immunitaires, activité anti-ulcéreuse, anti-métastatique.... On compte également les utiliser pour encapsuler les médicaments et leur permettre d'atteindre leur cible. Parmi ces polysaccharides des plantes médicinales, les pectines se distinguent. La découverte tardive de l'action des pectines n'est pas surprenante. Bien que plusieurs polysaccharides végétaux et microbiens soient utilisés de longue date comme gélifiants et épaississants dans les industries du papier, du textile et de l'agro-alimentaire, la réévaluation de l'importance de ces molécules ne date que d'une trentaine d'années. Les polysaccharides étaient jusque-là éclipsés par les protéines avec lesquels ils ont en commun une structure de polymère. Pourtant, les oligosaccharides et les polysaccharides possèdent la diversité requise pour servir de signaux moléculaires spécifiques dans divers processus biologiques.

Quelques laboratoires se sont spécialisés sur ce thème - *c'est le cas pour les équipes du Pr Yamada au Japon et du Pr Wagner en Allemagne*. Récemment, Paulsen et Barsett (2005), dans leur revue bibliographique, dressent un bilan remarquable de l'état de l'art dans le domaine des pectines d'intérêt biologique. Ils appuient notamment leur argumentaire sur la complémentarité de la relation structure - fonction de cette catégorie de molécules bioactives. Parmi les classes de molécules pectiques biologiquement actives étudiées, se dégagent les rhamnogalactronanes de type I et II (RGI et RII) ainsi que les arabinogalactanes de type I et II (AG-I et -II). Le tableau 5 présente la synthèse de cette étude où ont été répertoriées, en fonction des structures pectiques testées, les propriétés biologiques observées.

---

\* Paulsen B.S., Barsett H., Bioactive pectic polysaccharides, *Advances Polymers Sciences*, **2005**, 186, 69-101.

**Tableau 5:** Plantes et structures pectiques à activités immunostimulantes (d'après Paulsen et Barsett, 2005).

Plantes	Structures pectiques				Activités observées
	AG I	AG II	RG I	RG II	
<i>Acanthus ebracteatus</i>			/		Effet sur le système complément
<i>Angelica acutiloba</i>	/		/		Activité antitumorale
<i>Angelica acutiloba</i>	/	/	/		Effet sur le système complément
<i>Atractylodes lancea</i>		/	/	/	Activité sur le système immunitaire intestinal
<i>Bupleurum falcatum</i>		/	/	/	Anti-ulcer
<i>Bupleurum falcatum</i>		/	/	/	Effet sur le système complément
<i>Cisatnche deserticola</i>	/	/	/		Activité mitogène
<i>Cuscuta chinensis</i>		/	/		Immunostimulant
<i>Cuscuta chinensis</i>		/	/		Antioxydant
<i>Diospyrus kaki</i>		/	/		Immunostimulant
<i>Entada africana</i>	/	/			Effet sur le système complément
<i>Glinus oppositifolius</i>	/	/	/		Effet sur le système complément
<i>Glinus oppositifolius</i>	/	/	/		Propriété chimiotactique envers les macrophages, T et NK-cellules
<i>Glycyrrhiza uralensis</i>			/		Effet sur le système complément
<i>Glycyrrhiza uralensis</i>			/		Activité mitogène
<i>Glycyrrhiza uralensis</i>			/		Augmente la toxicité des cellules NK contre les tumeurs
<i>Glycyrrhiza uralensis</i>		/			Prolifération des cellules de la moelle osseuse
<i>Larix spp</i>		/			Effets variés sur le système immunitaire et fibres intestinales
<i>Lycium barbarium</i>	/				Module le système immunitaire
<i>Melocactus depressus</i>	/				Stimule la phagocytose
<i>Panax ginseng</i>	/	/			Stimulation de la production d'interleukine IL-8
<i>Panax ginseng</i>				/	Activité sur le système immunitaire intestinal
<i>Panax ginseng</i>				/	Augmente l'expression des récepteurs Fc des macrophages, augmentation de la production IL-6 augmente la sécrétion de NGF
<i>Panax ginseng</i>		/	/		Effet sur le système complément
<i>Piper nigrum</i>		/			Effet sur le système complément
<i>Plantago major</i>		/	/		Effet sur le système complément
<i>Plantago major</i>			/		Protection contre l'infection des pneumocoques
<i>Salvia officinalis</i>			/		Effet mitogène
<i>Tinospora cordifolia</i>			/		Activation des cellules B
<i>Tinospora cordifolia</i>			/		antioxydant
<i>Vernonia Kostchyana</i>	/	/	/		Effet sur le système complément

De façon générale, les polysaccharides pectiques bioactifs présentent une chaîne principale de type RG-I. La plupart d'entre eux présente, en position latérale, un arabinogalactane de type II. Très peu d'exemples décrivant les propriétés d'AG-II et de RG-II pures sont disponibles. Comme le remarquent Paulsen et Barsett (2005), il semble que l'activité des pectines soit associée à la présence de leurs zones ramifiées (« hairy region »). Plus précisément, les 1,3 / 1,6 galactanes sont désignés comme groupements actifs. C'est le cas chez *Angelica acutiloba* (Kiyohara *et al.*, 1989, 1997), *Glinus oppositifolius* (Inngjerdingen *et al.*, 2003), *Glycyrrhiza uralensis* (Hirano *et al.*, 1994 ; Kiyohara *et al.*, 1996 ; Hwang *et al.*, 2003) et *Veronia kotschyana* (Nergard *et al.*, 2004, 2005). Cependant, tout les RG-I qui présentent une substitution de type AG-II ne déclenchent pas d'activités biologiques. C'est le cas de l'AG-II extrait de *Larix* (Yamada *et al.*, 1999). D'autres facteurs doivent donc être pris en compte : dimension moléculaire mais aussi nombre de sites actifs présents sur une molécule. C'est le cas pour l'arabinogalactane pectique complexe extrait d'*Angelica acutiloba* qui est capable d'activer le complément. De façon surprenante, la molécule native n'active que la voie classique, mais si l'on élimine les chaînes latérales arabinofuranosyle par voie enzymatique, la molécule résultante active à la fois la voie classique et la voie alterne. Les chaînes arabinofuranosyle semblent donc bloquer l'action de la voie alterne (Yamada *et al.*, 1999). On voit donc, par cet exemple, que les différentes parties d'un même polysaccharide peuvent exercer des effets activateurs ou inhibiteurs. Un autre cas remarquable est celui du RG-II extrait des feuilles de *Panax ginseng* qui ne présente d'activité que sous la forme de dimère (Shin *et al.*, 1998).

- 
- \* Paulsen B.S., Barsett H., Bioactive pectic polysaccharides, *Advances Polymers Sciences*, **2005**, 186, 69-101.
  - \* Kiyohara H., Yamada H., Structure of an anti-complementary arabinogalactan from root of *Angelica acutiloba* kitagawa, *Carbohydr. Res.*, **1989**, 193, 173-192.
  - \* Kiyohara H., Zhang Y., Yamada H., Effect exo- $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 3)-galactanase digestion on complement activating activity of neutral arabinogalactan unit in a pectic arabinogalactan from roots of *Angelica acutiloba* Kitagawa, *Carbohydrates Polymers*, **1997**, 32, 249-253.
  - \* Inngjerdingen K., Michaelsen T.E., Diallo D., Paulsen B.S., In: Perez S. (ed) *Abstracts, 12th European Carbohydrate Symposium*, **2003**, pp 210.
  - \* Hirano M., Kiyohara H., Yamada H., Existence of rhamnogalacturonane II- like region bioactive pectin from medicinal herbs, *Planta Med.*, **1994**, 60(5), 450-454.
  - \* Kiyohara H., Takemoto N., Zhao J.F., Kawamura H., Yamada H., Pectic polysaccharides from roots of *Glycyrrhiza uralensis*: possible contribution of neutral oligosaccharides in the galacturonase-resistant region anti-complementary and mitogenic activities, *Planta Med*, **1996**, 62 (1), 14.
  - \* Hwang J.H., Lee K.H., Yu K.W., Characterization of the immunologically active of *Glycyrrhiza uralensis* prepared as herbal Kinchi, *Neutraceutical Food*, **2003**, 8 (1), 29-35.
  - \* Nergard C.S., Diallo D., Michaelsen T.E., Malterud K.E., Kiyohara H., Matsumoto T., Yamada H., Paulsen B., Isolation partial characterisation and immuno-modulating activities of polysaccharides from *Vernonia Kotschyana* Sch. Bip. Ex Walp, *Journal of ethnopharmacology*, **2004**, 91,141-152.
  - \* Nergard C.S., Matsumoto T., Inngjerdingen M., Inngjerdingen K., Hokputsa S.; Harding S.E., Michaelsen T.E., Diallo D., Kiyohara H., Paulsen S.P., Yamada Structural and immunological studies of pectin and a pectic arabinogalactan *Vernonia kotschyana* Sch. Bip. Ex Walp (*Asteracea*), *Carbohydrate research*, **2005**, 340, 115-130.
  - \* Yamada H., Kiyohara H., Complement-activating polysaccharides from medicinal herbs, In: Wagner H. (Ed), *Immunomodulatory Agents from Plants*, Basel, Switzerland: Birkhauser Verlag, **1999**, 161-202.
  - \* Shin K.S., Kiyohara H., Matsumoto T., Yamada H., Rhamnogalacturonan II dimers cross-linked by borate diesters from the leaves of *Panax ginseng* C.A. Meyer are responsible for expression of their IL-6 production enhancing activities, *Carbohydr. Res.*, **1998**, 307, 97.
  - \* Leung M.Y.K., Liu C., Koon J.C.M., Fung K.P., Polysaccharide biological response modifiers, *Immunology Letters*, **2006**, 105, 101-104.

Les données scientifiques définitives manquent encore afin d'identifier les motifs structuraux bioactifs des pectines. Classiquement associées à la pharmacopée traditionnelle, les pectines sont considérées aujourd'hui comme de véritables « *Biological response modifiers* » (Leung et liu, 2006). Il apparaît cependant clairement que la variabilité des structures peut moduler les activités ou les fonctions. Cette dernière remarque n'est pas sans conséquence puisqu'elle renforce l'intérêt d'une analyse systématique des structures et des fonctions sur un nombre croissant de sources végétales afin d'en croiser les résultats ; elle ouvre aussi la voie à des stratégies de modifications enzymatiques ou chimiques des structures pectiques afin de réguler/moduler leurs propriétés. Une analyse des registres des brevets utilisant les mots clés cosmétiques et pectines conduit encore une fois à des références peu nombreuses et totalement empiriques qui renforcent le positionnement de notre étude située à la croisée des glycosciences (glycochimie et glycobiologie) et de leur application en dermocosmétologie.

---

\* Shin K.S., Kiyohara H., Matsumoto T., Yamada H, Rhamnogalacturonan II dimers cross-linked by borate diesters from the leaves of *Panax ginseng* C.A. Meyer are responsible for expression of their IL-6 production enhancing activities, *Carbohydr. Res.*, **1998**, 307, 97.

\* Leung M.Y.K. , Liu C. , Koon J.C.M. , Fung K.P. , Polysaccharide biological response modifiers, *Immunology Letters*, **2006**, 105, 101-104.

**CHAPITRE II : 1<sup>ere</sup> partie**  
**Extraction, analyse structurale et propriétés dermocosmétiques**  
des rhamnogalacturonanes de type I

## CHAPITRE II : 1<sup>ère</sup> partie

### Extraction, analyse structurale et propriétés dermocosmétiques des rhamnogalacturonanes de type I

#### II.1. Recoverine<sup>®</sup> : un rhamnogalacturonane extrait de son de châtaigne commercialisé par SILAB

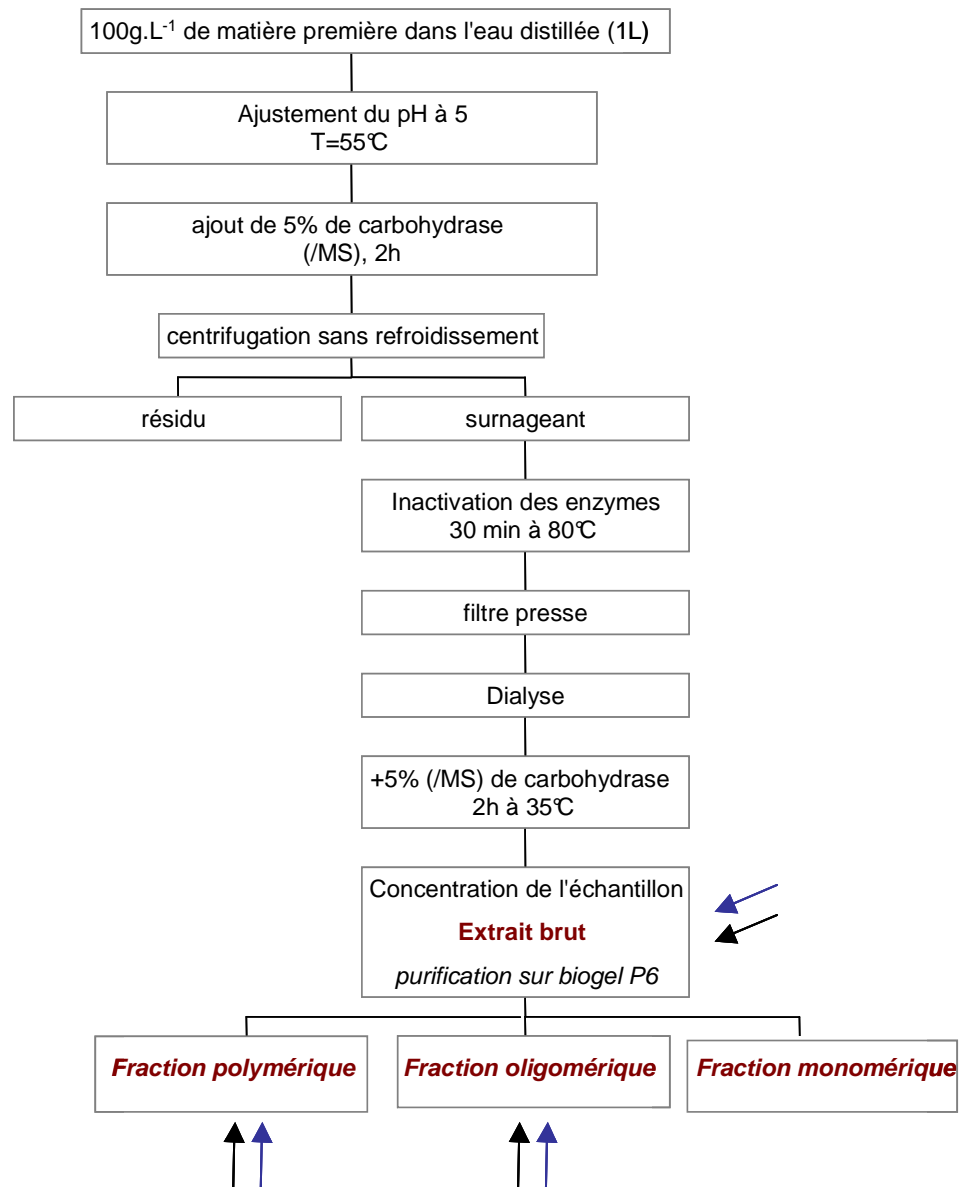
##### II.1.1. Extraction et caractérisation chimique

Débutée en amont de notre travail de thèse, la problématique « *phytopolysaccharides et actifs cosmétiques* » était le support d'un partenariat scientifique pré-existant entre le Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et la société SILAB. Le son de châtaigne est l'une des matières premières qui a servi de modèle biologique pour le démarrage de notre étude. La matière première déshydratée a été soumise au protocole d'extraction présentée en figure 39 au sein du laboratoire R&D de la société SILAB (protocole expérimental B) et transposé – *en l'adaptant aux matériels et aux conditions de l'utilisation de ces matériels* - à une échelle pilote (protocole expérimental C). Dans chacun de ces cas, l'extraction a lieu dans l'eau et requiert la mise en œuvre de cocktail d'enzymes de grade industriel favorisant la solubilisation et la purification des polysaccharides des parois cellulaires végétales.



Dans les conditions expérimentales utilisées, des quantités significatives de fractions glucidiques sont isolées. Elles représentent une part importante de la matière première compris entre 40 à 47% de la masse initiale (tableau 6). La bonne corrélation des données recueillies par utilisation de l'un ou l'autre des protocoles d'extraction est un indice qui assure par ailleurs de la bonne transposition de la méthodologie à l'échelle industrielle. De plus, des teneurs en acides uroniques de l'ordre de 7 à 8 % laissent suspecter la présence - *minoritaire* - de composés pectiques dont les sucres marqueurs GalA, Rha, Ara et Gal ont été caractérisés après méthanolyse et silylation par Chromatographie en Phase gazeuse dans l'extrait brut B (tableau 7). Compte tenu de la nature de la matière première, des teneurs élevées de l'ordre de 96% de Glc peuvent être expliquées par la contamination des extraits bruts par de l'amidon co-extrait au cours de la mise en œuvre des protocoles à partir du son de châtaigne.

---

\* Paufique J., Procédé d'obtention d'un principe actif pour des traitements de la peau sèche, actions générées et actif obtenu, 2004, brevet n°WO2004100915.



### Type d'analyses réalisées

-  Dosages des oses neutres et des acides uroniques
-  Analyse de la composition monosaccharidique par CPG

**Figure 39** : Protocole B - extraction, purification et analyses du rhamnogalacturonane de son de châtaigne (Recoverine, Brevet Silab WO 2004100915) en condition de laboratoire R&D de la société SILAB (protocole B).

**Tableau 6** : Caractérisation des extraits bruts isolés du son de châtaigne.

<b>Extraits bruts</b>	<b>% AU</b>	<b>Rendement matière % ST/matière première</b>	<b>Quantités extraites (en kg)</b>
<b>B</b>	7,0	39,9	0.04
<b>C</b>	8,4	46,4	4.6

*Protocole B* : laboratoire R&D de la société SILAB ;

*Protocole C* : protocole B transposé à une échelle pilote.

**Tableau 7** : Caractérisation des extraits bruts par Chromatographie en Phase gazeuse après méthanolyse et silylation. Valeurs exprimées en % molaire des constituants identifiés.

<b>Extraits bruts</b>	<b>Ara</b>	<b>Rha</b>	<b>Fuc</b>	<b>Xyl</b>	<b>Man</b>	<b>Gal</b>	<b>Gal A</b>	<b>Glc</b>	<b>Glc A</b>
<b>B</b>	0,8	0,5	0	0,6	0,2	3,3	1,9	92,8	3,3
<b>C</b>	T	T	0	0	0	4	T	96	0

*Protocole B* : laboratoire R&D de la société SILAB ;

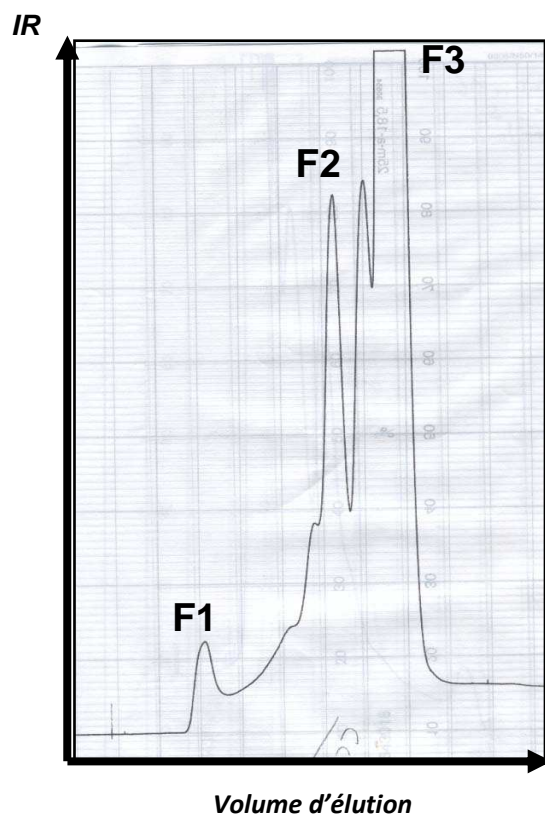
*Protocole C* : protocole B transposé à une échelle pilote ;

*T* : traces.

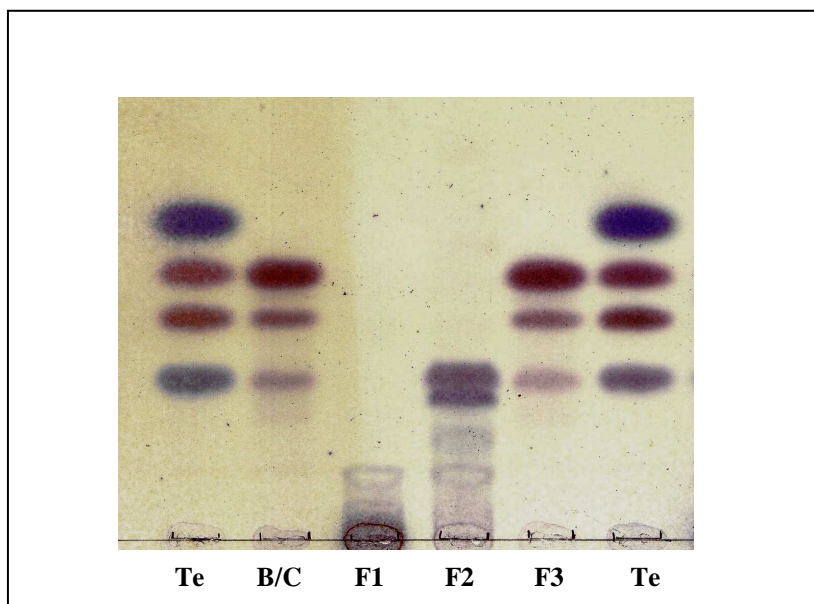


C'est la raison pour laquelle nous avons souhaité affiner nos protocoles en procédant à une séparation des extraits bruts par chromatographie d'exclusion stérique sur Biogel P6 (figure 40). Elués par l'eau, les extraits bruts se séparent en trois fractions principales : F1 (macromoléculaire – éluée avec le volume mort de la colonne), F2 (oligosaccharidique – incluse dans la colonne) et F3 (monosaccharidique – éluée avec le volume total de la colonne) qui, séparées par Chromatographie sur Couche Mince donne un profil caractéristique présenté en figure 41. Un résultat similaire est produit par utilisation de la Chromatographie Liquide Haute Performance sur colonne d'exclusion stérique de type Aquagel-OH (figure 42).

Comme le démontrent les données présentées dans le tableau 8, les extraits bruts de son de châtaigne issus des protocoles B et C se répartissent en trois fractions hétérogènes. Les fractions 1 et 2 - *macro et oligosaccharidiques* - ne représentent qu'une part minoritaire du mélange (environ 1% massique de l'extrait) ; elles présentent en revanche des teneurs élevées en acides uroniques (de 25 à 81,4%, tableau 8). Les fractions F1 macromoléculaires, composés d'acide galacturonique, de rhamnose, d'arabinose et de galactose (tableau 9) présentent par ailleurs la composition attendue d'arabinogalactanes acides de la famille des rhamnogalacturonanes de type I. C'est aussi le cas pour les fractions F2 - *oligosaccharidiques* - qui dérivent probablement de la dégradation enzymatique de fragments RG-I de degrés de polymérisation plus importants. Enfin, les fractions F3 - *monosaccharidiques* - sont composées de glucose libéré par dégradation enzymatique de l'amidon co-extrait.



**Figure 40** : Profil de séparation par chromatographie d'exclusion stérique sur Biogel P6 de l'extrait brut de son de châtaigne.

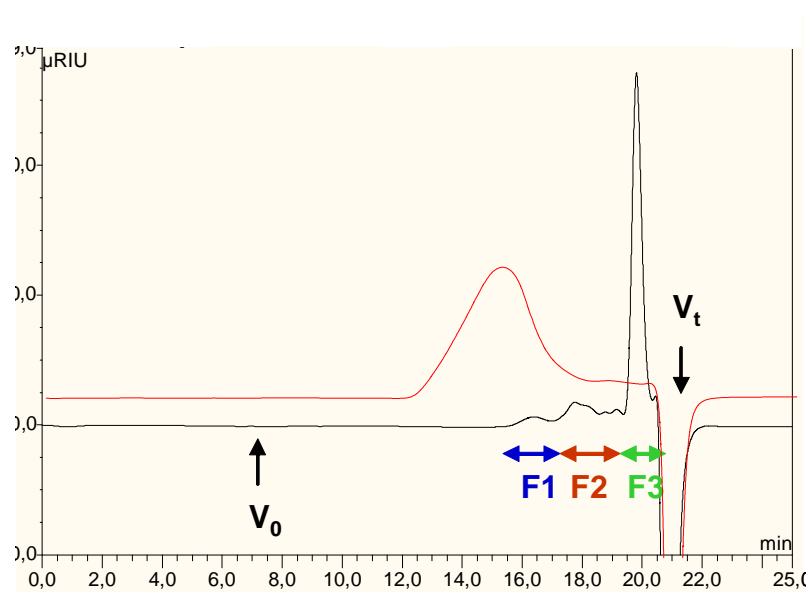


*Te : témoin (de bas en haut) GalA, Saccharose, Glc, Xyl*

*B/C : extraits bruts issus des protocoles B et C*

*F1, F2, F3 : fractions séparées par chromatographie d'exclusion stérique*

**Figure 41** : Profil de séparation par Chromatographie sur Couche Mince des fractions séparées par chromatographie d'exclusion stérique sur Biogel P6 de l'extrait brut de son de châtaigne.



**Figure 42** : Profil de séparation par Chromatographie Liquide Haute Performance sur colonne d'exclusion stérique de l'extrait de son de châtaigne.  $V_0$  : Volume mort ;  $V_t$  : Volume total. La courbe rouge représente le profil d'une pectine commerciale à 4 mg/ml.

**Tableau 8 :** Caractérisation des fractions séparées par chromatographie d'exclusion stérique sur Biogel P6 à partir de l'extrait brut de son de châtaigne.

Extraits	% AU	Rendement matière % ST/matière première
<b><u>Protocole B</u></b>		
<i>Fraction 1</i>	50.5	0.5
<i>Fraction 2</i>	23.2	0.3
<i>Fraction 3</i>	0	39,1
<b><u>Protocole C</u></b>		
<i>Fraction 1</i>	50.4	0.6
<i>Fraction 2</i>	81,4	1.3
<i>Fraction 3</i>	0	44,5

**Tableau 9 :** Caractérisation des fractions séparées par chromatographie d'exclusion stérique sur Biogel P6 par Chromatographie en Phase gazeuse après méthanolyse et silylation. Valeurs exprimées en % molaire des constituants identifiés.

Extraits	Ara	Rha	Fuc	Xyl	Man	Gal	Gal A	Glc	Glc A
<b><u>Protocole B</u></b>									
<i>Fraction 1</i>	<b>23.1</b>	<b>13.7</b>	0.8	11.5	3.9	<b>24.0</b>	<b>17.9</b>	1.5	3.6
<i>Fraction 2</i>	8.6	4.8	0	16.6	1.5	11.1	18.2	39.3	0
<i>Fraction 3</i>	0	0	0	0	0	0	0	100	0
<b><u>Protocole C</u></b>									
<i>Fraction 1</i>	<b>14.6</b>	<b>16.6</b>	0	9.4	1.4	<b>15.0</b>	<b>38.2</b>	2.2	2.5
<i>Fraction 2</i>	6.4	3.6	0	10.2	0.8	1.7	65.9	11.3	0
<i>Fraction 3</i>	0	0	0	0	0	0	0	100	0

## II.1.2. Evaluation des propriétés dermo-cosmétologiques de Recoverine

### II .1.2.1. Quels actifs pectiques pour SILAB ?

L'évaluation des propriétés dermo-cosmétologiques a été réalisée par l'entreprise Silab (Jouandeaud, 2004). La fonction barrière de la peau est principalement assurée par le *stratum corneum* qui grâce à sa position stratégique, en contact direct avec l'extérieur, lui permet de jouer un rôle protecteur des tissus sous-jacents vis-à-vis des agressions de type physique (UV, brûlures), chimique (solvants, détergents) ou encore mécanique (forces de friction). Exposer à des agressions constantes, l'épiderme est contraint de se renouveler en continu. La desquamation des cellules cornées est compensée par les divisions cellulaires des couches profondes (Hafttek, 2002). Grâce à ce processus de différenciation, l'épiderme est capable de maintenir une épaisseur constante et surtout de renouveler à sa surface une couche protectrice fonctionnelle et efficace (Hafttek, 2002 ; Molès, 2001). Cependant, au cours du vieillissement ou encore lors d'affections cutanées, une dérégulation des différents processus participant au maintien d'une fonction barrière efficace peut survenir et être à l'origine d'un état de sécheresse cutanée (Alias et Ghadially, 2002). Plusieurs facteurs sont impliqués dans ce phénomène :

\* Une dérégulation de la desquamation liée principalement à une dégradation inappropriée des cornéodesmosomes, éléments essentiels dans le processus normal de desquamation (Rawlings *et al.*, 1995).

\* Un défaut de fixation de l'eau dû généralement à une altération des processus de synthèse et de dégradation de la profilaggrine entraînant un déficit en NMF (Natural Moisturizing Factor) dont la présence est essentielle pour maintenir les qualités physiques des cornéocytes (Martini, 2002).

\* Une réduction du taux de céramides, lipides jouant un rôle primordial dans le maintien de la barrière épidermique en association avec d'autres classes de lipides. Cette réduction de la synthèse lipidique du *stratum corneum* diminue avec l'âge, notamment celle des céramides et peut également être réduite (quel que soit l'âge) durant la période hivernale (Caro, 2000).

---

\* Jouandeaud M., Moreau L., Chauprade Ch., Guichard N., Closs B., Gloguen V., Barrier function and dry skin : use of rhamnolacturonans as a new therapeutic strategy, *Söfw-Journal*, **2004**, 4, 130.

\* Haftek M., *Stratum corneum*, *Ann Dermatol Venereol*, **2002**, 129, 117-122.

\* Molès J.P., Prolifération et communication kératinocytaire. Rôle des protéines WNT dans le contrôle du potentiel prolifératif des kératinocytes. *Séminaire d'enseignement COBIP*, **2001**, 13-16.

\* Elias P.M., Ghadially R., The aged epidermal permeability barrier: basis for functional abnormalities. *Clin Geriatr Med*, **2002**, 18, 103-120.

\* Rawlings A., Harding C., Watkinson A., Banks J. Ackerman C., Sabin R., The effect of glycerol and humidity on desmosomes degradation in *stratum corneum*, *Arch Dermatol Res*, **1995**, 287, 457-464.

\* Martini M.C. : La riche palette des actifs hydratants en dermocosmétique, *bedc*, **2002**, 10, 8, 245-250.

\* Caro D., *Stratum corneum*, une barrière protectrice à ménager, *Cosmétologie*, **2000**, 28, 10-12.

La formation et la dégradation de la barrière que représente le *stratum corneum*, sont donc des processus dynamiques influençables par les facteurs extrinsèques et intrinsèques. La qualité de la couche cornée sera à chaque instant une résultante de l'équilibre intervenant entre les phénomènes différenciation et desquamation (figure 43).

#### II .1.2.1.a Le processus de desquamation

Dans un épiderme sain, il existe un équilibre entre prolifération, différenciation et desquamation afin d'assurer le renouvellement cellulaire et de maintenir une épaisseur constante du *stratum corneum*. La desquamation correspond au phénomène par lequel les cornéocytes sont détachés de la surface. Ce processus est essentiel dans la préservation du tissu barrière qu'est le *stratum corneum* et participe ainsi à l'hydratation de la peau. La cohésion entre les cornéocytes est assurée par l'intermédiaire d'entités protéiques appelées cornéodesmosomes. Les cornéodesmosomes sont particulièrement importants pour le maintien de l'intégrité du *stratum corneum*. Ils sont constitués par l'association de glycoprotéines : les desmogléines et les desmocollines. On retrouve principalement au niveau des couches superficielles la desmogléine-1 (DSG-1) (Wanner *et al.*, 1999). La dégradation des jonctions intercornéocytaires par protéolyse aboutit à l'élimination des cornéocytes par des phénomènes de friction. Le phénomène de protéolyse est un événement central de la desquamation (Rawlings *et al.*, 1995 ; Egelrud, 2000 ; Watkinson *et al.*, 2000). Plusieurs enzymes protéolytiques sont impliquées dans ce phénomène : la SCCE (*stratum corneum* chymotryptic enzyme), la SCTE (*stratum corneum* tryptic enzyme) et la SCTP (*stratum corneum* thiol protease). D'autres enzymes interviennent également dans le phénomène de desquamation telles que des glycosidases et des actions synergiques entre les protéases et les glycosidases ont pu être observées. Chez les peaux sèches, la desquamation n'est pas efficace, les cornéodesmosomes ne sont pas dégradés et les cornéocytes s'accumulent à la surface de l'épiderme (Haftek, 2002). Ils peuvent alors être à l'origine de l'apparition de problèmes plus du moins importants tels que sécheresse cutanée, xérose, et dans des cas plus grave, psoriasis ou ichtyose.

---

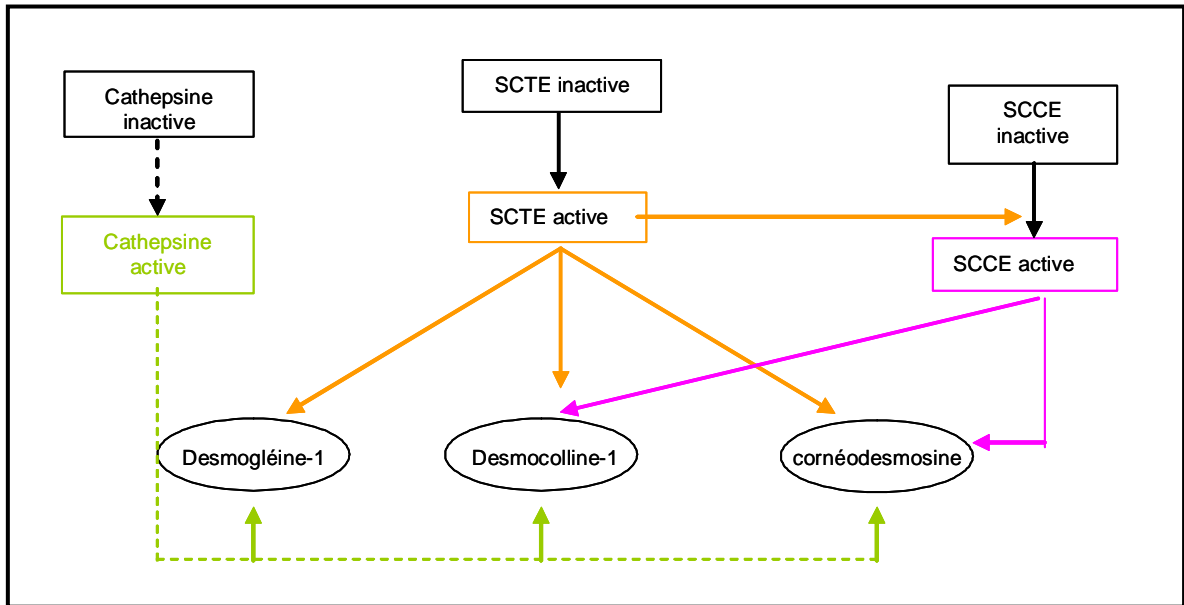
\* Wanner R., Wolff B., Glowacki F., Kolde G., Wittig B., The loss of desmosomes after retinoic acid treatment results in an apparent inhibition of HaCat keratinocyte differentiation, *Arch Dermatol Res*, **1999**, 291, 346-353.

\* Rawlings A., Harding C., Watkinson A., Banks J. Ackerman C., Sabin R., The effect of glycerol and humidity on desmosomes degradation in *stratum corneum*, *Arch Dermatol Res*, **1995**, 287, 457-464.

\* Egelrud T., Desquamation in the *stratum corneum*, *Act Derm Venereol*, **2000**, 208, 44-45.

\* Watkinson A., Smith C., Coan P., Wiedow O., The role of pro-SCCE in desquamation, Proceedings of the XXIth IFSCC Int. Congress, Berlin, **2000**, 16-25.

\* Haftek M., *Stratum corneum*, *Ann Dermatol Venereol*, **2002**, 129, 117-122.



**Figure 43** : Processus de régulation de la desquamation.

#### II.1.2.1.b Défaut de fixation de l'eau

Au niveau de l'épiderme, l'eau se présente sous deux formes : un système dynamique où l'eau est libre et dans laquelle sont dissoutes de nombreuses molécules ionisées ou non (sels métalliques, acides aminés, urée) et un système statique où l'eau est liée aux molécules du *stratum corneum* que sont les protéines et les lipides. Dans le système dynamique, l'eau « en mouvement » se déplace de façon régulière et continue des couches basales vers la surface où elle participera à la préservation de la fonction barrière (Gougerot-Schwartz *et al.*, 2000). A côté de cette eau en mouvement se trouve l'eau « statique » au niveau des kératinocytes et surtout des cornéocytes où elle favorise la plastification de la kératine et lui confère ses propriétés par l'intermédiaire des NMF (Natural Moisturizing Factor). Les NMF sont issus d'une molécule particulière : la filaggrine élaborée à partir d'un précurseur la profilaggrine. La filaggrine a pour rôle principal d'assurer l'agrégation des filaments de kératine (Hafttek, 2002) et la transformation du kératinocytes en cornéocytes. Cette protéine sera dégradée par la suite dans la partie supérieure de la couche cornée aboutissant ainsi à la production des NMF, capteur d'humidité maintenant un minimum d'hydratation des couches moyennes et supérieures du *stratum corneum* (Agache, 2000). Une altération des processus de synthèse ou de dégradation de la filaggrine peut aboutir à une réduction en NMF et ainsi à une réduction de l'hydratation des couches supérieures.

#### II.1.2.1.c Rôle du ciment lipidique

Le *stratum corneum* est constitué de cornéocytes, cellules riches en kératine, entourées par des lipides intercellulaires. Les principaux lipides constitutifs du *stratum corneum* sont les céramides, le cholestérol et les acides gras libres. On trouve aussi d'autres classes de lipides telles que les glycosylcéramides et le cholestérol sulfate. L'espace intercellulaire enrichi de lipides constitue le premier barrage pour limiter les pertes en eau et est essentiel à l'instauration d'une barrière cutanée compétente où les céramides jouent un rôle primordial en tant que principaux constituants du ciment intercellulaire (Caro, 2000). Cependant divers facteurs peuvent être à l'origine de perturbations de la synthèse des lipides épidermiques

---

\* Gougerot-Schwartz A., Hydratation et produits hydratants, Encycl Méd Chir, *Cosmétologie et dermatologie esthétique*, Editions scientifiques et médicales Elsevier, Paris, 2000, 50-160-B-10, pp 7.

\* Haftek M, *Stratum corneum*, *Ann Dermatol Venereol*, 2002, 129, 117-122.

\* Agache P. , *Physiologie de la peau et explorations fonctionnelles cutanées* , *Histopathologie du stratum corneum* , Editions EM inter, 2000, 101-106.

\* Caro D., *Stratum corneum*, une barrière protectrice à ménager, *Cosmétologie*, 2000, 28, 10-12.



comme une affection dermatologique ou un changement de saison. En effet, une déplétion en lipides peut être observée lors d'une affection cutanée. Le taux de lipides cutanés peut également varier au cours des saisons et particulièrement en hiver où la synthèse des lipides est réduite (Wanner *et al.*, 1999). Enfin, avec l'âge, on observe une diminution significative des différents lipides du *stratum corneum* et tout particulièrement des céramides.

De nombreuses recherches au cours de ces dernières années ont permis une meilleure compréhension en termes de structure, composition, formation et fonction du *stratum corneum* et ainsi une meilleure approche des peaux sèches.

#### II.1.2.2. Propriétés dermo-cosmétologiques de Recoverine, l'extrait de *Castanea sativa* (ECS)

##### II.1.2.2. a ECS et différenciation kératinocytaire

Le processus de différenciation est particulièrement important pour aboutir à un *stratum corneum* fonctionnel. Deux molécules qui participent activement à ce processus et sont également marqueurs de cette étape de formation de la couche cornée ont été étudiées :

- La cadhérine-E qui intervient dans la régulation de la prolifération et de la différenciation (Kees & Steinert, 2001) ;
- La profilaggrine, précurseur de la filaggrine et qui participe à la formation de l'enveloppe cornée.

Les kératinocytes humains ont été traités avec l'ECS dilué dans le milieu de culture à différentes concentrations (0,5%, 1% et 2%). Les cellules ont ensuite été incubées pendant 2 jours dans une étuve à 37°C en atmosphère humide. L'étude de la synthèse de cadhérine-E a été réalisée par la technique de western blot. L'étude de l'expression des ARNm codant pour la profilaggrine a, quant à elle, été réalisée par la technique de RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain reaction). Les résultats illustrés sur la figure 44 montrent que l'incubation des kératinocytes humains avec l'ECS à 2% stimule la synthèse de la cadhérine-E de 36%. Cet effet est dose-dépendant. De plus, l'ECS ajouté à 2 % dans le milieu de culture conduit à une nette augmentation de l'expression des ARNm codant pour la profilaggrine.

---

\* Wanner R., Wolff B., Glowacki F., Kolde G., Wittig B., The loss of desmosomes after retinoic acid treatment results in an apparent inhibition of HaCat keratinocyte differentiation, *Arch. Dermatol Res.*, **1999**, 291, 346-353.

\* Kee S.H., Steinert P.M., Microtubule disruption in keratinocytes induces cell-cell adhesion through activation of endogenous E-cadherin, *Mol Biol. Cell.*, **2001**, 12, 1983-1993.

L'expression de la cadhérine-E a également été observée après marquage immunologique sur explants de peau non-traités ou traités avec l'ECS formulé à 1,5% en émulsion ou avec le placebo, 2 jours consécutifs. Les explants de peau sont ensuite récupérés puis congelés dans l'azote liquide. Des sections de 4 µm d'épaisseur sont ensuite réalisées à l'aide d'un microtome sur lesquelles l'immunomarquage de la cadhérine-E est réalisée. Les résultats obtenus après traitement ou non des explants sont présentés sur les photos 1a, 1b et 1c (figure 45). L'immunomarquage de la cadhérine-E montre que les explants non-traités présentent un taux basal de cadhérine-E qui n'est pas modifié lorsque les explants sont traités avec l'émulsion placebo. Le traitement avec l'ECS formulé à 1,5% pendant 48 heures augmente l'expression de la cadhérine-E comparé aux deux autres explants.

En jouant sur les deux molécules essentielles au processus de différenciation, l'ECS stimule la différenciation kératinocytaire et participe ainsi au développement et au maintien d'une barrière efficace.

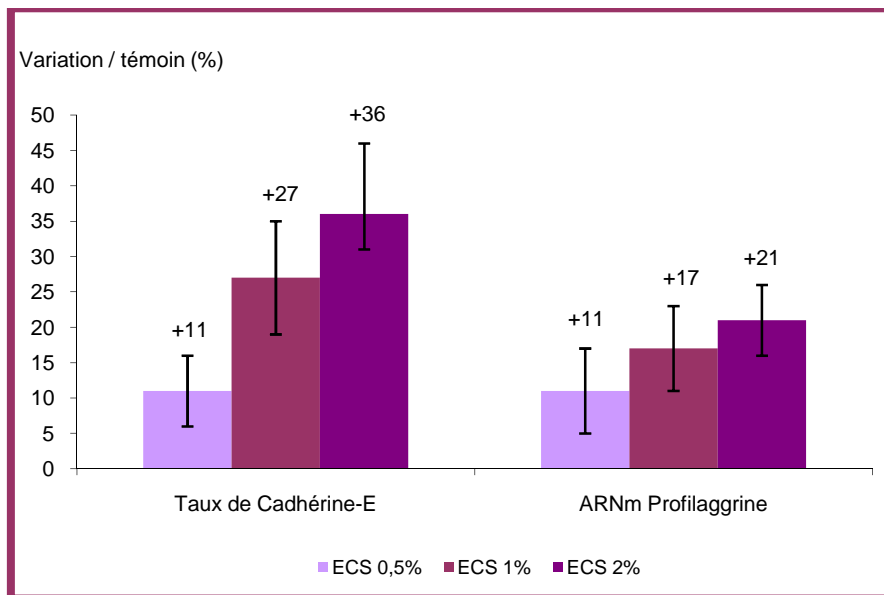
#### II.1.2.2. b ECS et synthèse de lipides épidermiques

La composition lipidique de l'espace intercellulaire est un paramètre essentiel dans le bon fonctionnement du *stratum corneum* et constitue la première barrière pour limiter les pertes en eau. Les céramides en particulier, principaux constituants du ciment intercellulaire, sont essentiels à l'organisation lipidique de la barrière cutanée (Rawlings, 2003).

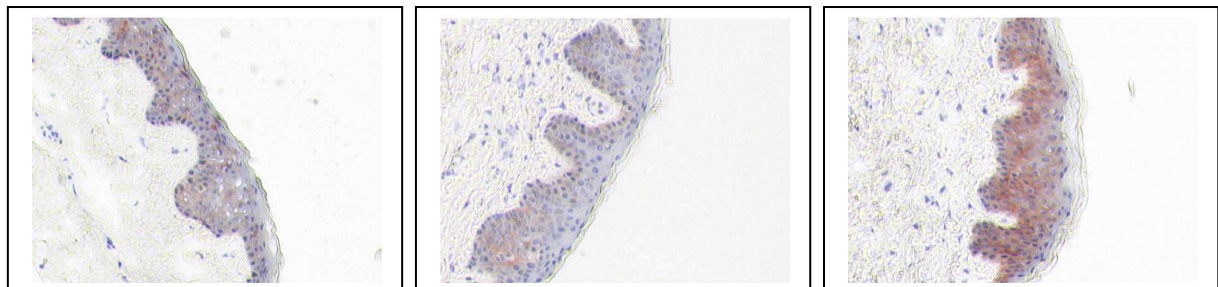
L'effet de l'ECS, formulé à 4% en émulsion, sur la synthèse des céramides a été testé sur neuf volontaires avant et après sept jours de traitement biquotidien et comparé à une émulsion placebo. Les lipides épidermiques ont été prélevés directement au niveau des jambes à l'aide d'un solvant approprié mis en contact direct avec la peau. Les lipides prélevés sur les zones traitées ou non ont ensuite été analysés par chromatographie sur couche mince couplée à l'ionisation de flamme. D'après les résultats présentés figure 46, l'ECS a permis d'augmenter significativement de 8% la synthèse des céramides par rapport à la formule placebo, et ce après sept jours de traitement. Grâce à son action régulatrice sur la synthèse des lipides, l'ECS restaure et préserve la barrière lipidique.

---

\* Rawlings A.V., Advances in stratum corneum biology and understanding of dry skin, *Cosmet. and Toilet.*, **2003**, 118, 8, 26-44.



**Figure 44 :** Influence de l'ECS sur la différenciation kératinocytaire. Etude de la synthèse de cadhérine-E et de l'expression des ARNm codant pour la profilaggrine (Jouandeaud, 2004).



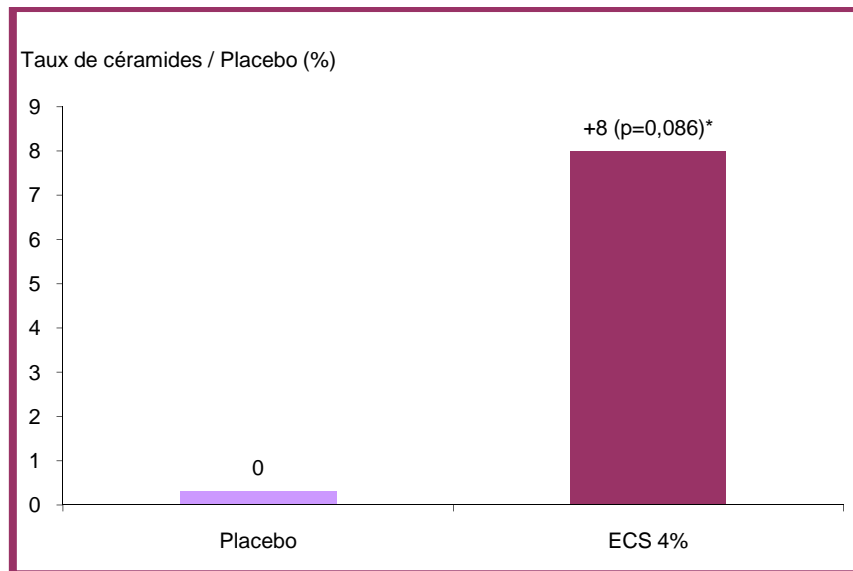
**Photo 1a :** témoin non-traité

**Photo 1b :** Emulsion placebo

**Photo 1c :** Extrait de *C. sativa* formulé à 1,5%

**Figure 45 :** Photographie réalisé après immunomarquage de la cadhérine-E sur explants de peau traité ou non avec Recoverine (Jouandeaud, 2004).

\* Jouandeaud M., Moreau L., Chauprade Ch., Guichard N., Closs B., Gloaguen V., Barrier function and dry skin : use of rhamnogalacturonans as a new therapeutic strategy, *Söfw-Journal*, **2004**, 4, 130.



\* Résultat significatif selon le test de Student ( $p < 0,10$ )

**Figure 46** : Effet de l'ECS sur la synthèse de céramides *in vivo* (Jouandeaud, 2004).

\* Jouandeaud M., Moreau L., Chauprade Ch., Guichard N., Closs B., Gloaguen V., Barrier function and dry skin : use of rhamnogalacturonans as a new therapeutic strategy, *Söfw-Journal*, **2004**, 4, 130.

### II.1.2.2. c ECS et desquamation

- Synthèse de desmogléine-1

L'un des phénomènes essentiels du processus de desquamation est la dégradation de la desmogléine-1 qui favorise les ruptures des liaisons intercornéocytaires et ainsi l'élimination des cornéocytes. Les kératinocytes humains ont été traités avec l'ECS à 0,5%, 1% et 2% dilué dans le milieu de culture. Les cellules ont ensuite été incubées pendant deux jours dans une étuve à 37°C en atmosphère humide. Le taux de desmogléine-1 a été évalué par western blot. Les résultats présentés figure 47 montrent que la desmogléine-1 diminue de façon dose-dépendante après traitement avec l'ECS. Ajouté à 2% dans le milieu de culture, le taux de desmogléine-1 est réduit de 21%.

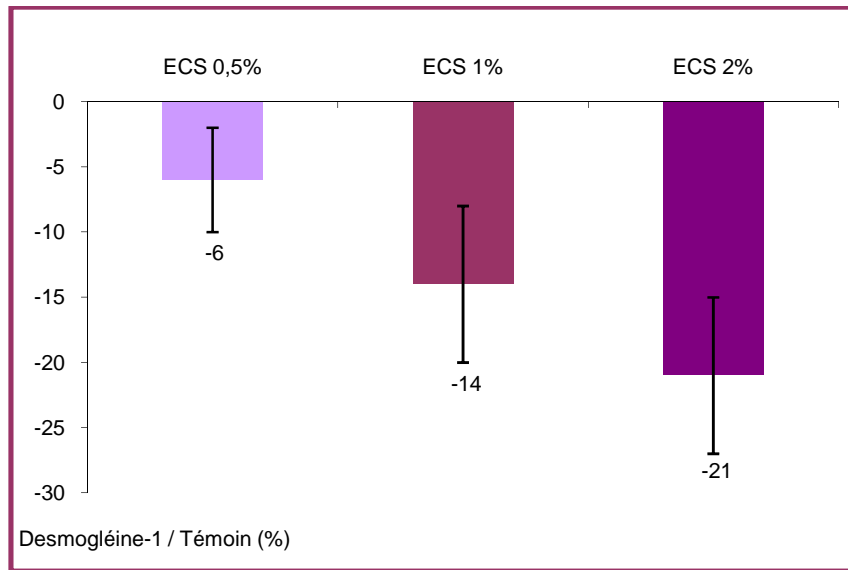
- Activité enzymatique de la SCCE

L'étude de l'influence de l'ECS sur l'activité de la SCCE a été réalisée sur 18 volontaires. La SCCE a été récupérée par stripping avant et après sept jours de traitement biquotidien avec l'ECS ou le placebo. L'activité hydrolytique de la SCCE des échantillons de *stratum corneum* a été mesurée par spectrophotométrie à 405 nm en utilisant comme substrat le peptide synthétique suivant : Meo-Suc-Arg-Pro-Tyr-*p*-nitroanilide hydrochloride selon le protocole décrit par Suzuki *et al* (1996). Testé directement sur volontaires, l'ECS, formulé à 4% en émulsion, augmente significativement par rapport au placebo (+82%) l'activité de la SCCE, enzyme-clé de la desquamation qui participe entre autre à la dégradation de la DSG-1 (figure 48).

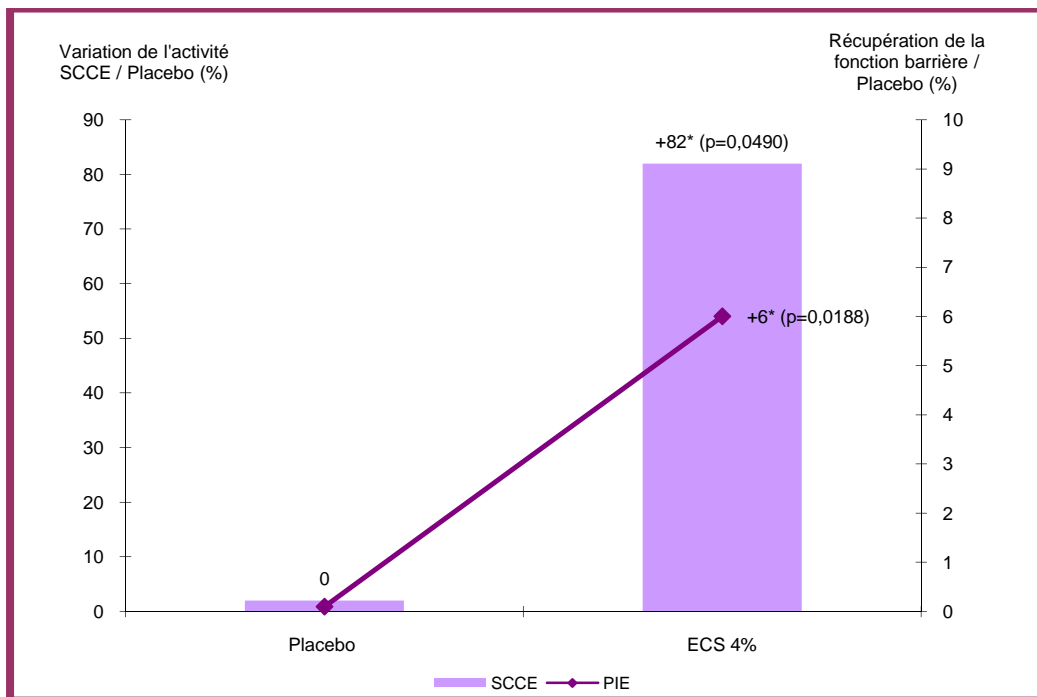
Parallèlement à cette étude, une mesure de la perte insensible en eau (PIE) a été réalisée afin de s'assurer qu'amélioration du processus de desquamation pouvait être relié à restructuration et renforcement du *stratum corneum*. L'ECS formulé à 4% en émulsion favorise la récupération de la fonction barrière (+6%) après seulement sept jours de traitement biquotidien. De plus, une mesure de la PIE a également été réalisée sur des peaux préalablement agressées par une solution de sodium lauryl sulfate (SLS) à 10% de façon quotidienne et traitées avec l'ECS formulé 4% en émulsion. Après 15 jours de traitement biquotidien, l'ECS favorise de façon significative ( $p < 0,05$ ) la récupération de la fonction barrière de 17% en comparaison au placebo.

---

\* Suzuki Y., Koyama J., Moro O., Horii I., Kikuchi K., Tanida K., Tagami H., The role of two endogenous proteases of the stratum corneum in degradation of desmoglein-1 and their reduced activity in the skin of ichthyotic patients, *Br. J. Dermatol.*, **1996**, 134, 3, 460-464.



**Figure 47:** Effet de l'ECS sur le taux de desmogléine-1 (Jouandeaud, 2004).



\* Résultats significatifs selon le test de Student ( $p < 0,05$ )

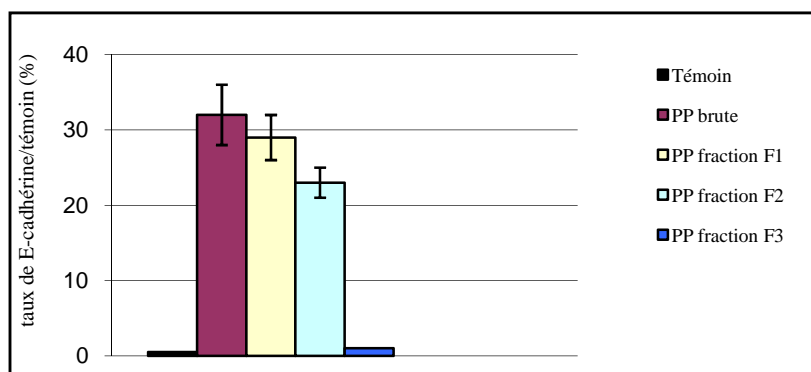
**Figure 48 :** Comparaison de l'activité de la SCCE et de la PIE après traitement avec l'ECS (Jouandeaud, 2004).

\* Jouandeaud M., Moreau L., Chauprade Ch., Guichard N., Closs B., Gloaguen V., Barrier function and dry skin : use of rhamnogalacturonans as a new therapeutic strategy, *S fw-Journal*, 2004, 4, 130.

Pour conclure, l'ECS participe au phénomène de différenciation en stimulant la synthèse de la cadhérine-E et en favorisant l'expression des ARNm codant pour la profilaggrine (respectivement +36% et +21%). Il stimule également la synthèse des lipides épidermiques directement *in vivo* : formulé à 4%, il permet d'augmenter de 8% le taux en céramides du *stratum corneum* par rapport au placebo. Enfin, il participe au processus de desquamation, testé à 2% sur kératinocytes, il diminue le taux de desmoglécine-1 (-21%), protéines dont la dégradation est essentielle au processus de desquamation, et formulé à 4% en émulsion appliqué sur volontaires, il augmente significativement par rapport au placebo (+82%) l'activité de la SCCE, enzyme-clé de la desquamation.

#### II.1.2.3. Origine moléculaire des propriétés biologiques de Recoverine, l'extrait de *Castanea sativa* (ECS)

Comme le démontre l'étude d'efficacité dermo-cosmétique précédente, les propriétés de l'actif Recoverine peuvent être appréciées au travers de la mesure du taux de E-cadhérines produit par une suspension cellulaire de kératinocytes. La synthèse de ces protéines joue en effet un rôle primordial dans la formation des tissus épithéliaux ainsi que dans le maintien de leur intégrité. La mesure du taux de E-cadhérines produit par la suspension cellulaire de kératinocytes en réponse à la présence de cet actif biologique est donc un moyen objectif d'évaluer d'une part, les potentialités de cet extrait et, d'autre part, de comprendre le déterminisme moléculaire de leurs expressions. C'est ce qu'illustre la figure 49 qui présente l'évolution du taux d'E-cadhérines produits par une culture cellulaire de kératinocytes en réponse à la présence de 2% (V/V) d'extrait brut ou des fractions poly-, oligo et monosaccharidiques séparées par chromatographie d'exclusion stérique sur Biogel P6. La fraction F1 - *macromoléculaire* - qui ne représente pourtant que 0.5% des sucres totaux présents dans l'extrait brut, présente un niveau d'activité biologique similaire à celui de l'actif Recoverine. Majoritairement composée d'acide galacturonique, de rhamnose, d'arabinose et de galactose, la fraction F1 présente les caractéristiques attendues d'un arabinogalactane acide de la famille des rhamnogalacturonanes de type I. La fraction oligosaccharidique F2 présente pour sa part un niveau d'activité biologique élevé qui reste cependant en deçà de celui de la fraction macromoléculaire dont il est issu. Une telle observation suggère l'importance du degré de polymérisation des molécules pectiques bioactives dans l'expression des propriétés biologiques observées. Enfin, essentiellement composée de glucose, la fraction F3 ne présente, dans les conditions expérimentales utilisées, aucune activité.



**Figure 49** : Evolution du taux d'E-Cadhérine en réponse à la présence de 2% (V/V) d'extrait de Recoverine brut ou de ses fractions F1, F2 et F3 purifiées par chromatographie d'exclusion stérique (Gloaguen et al 2004).

\* Gloaguen V., Krausz P., Barrier function and dry skin : Use of rhamnogalacturonans as a new therapeutic strategy, *Söwf Journal*, **2004**, 130, 20-26.



Grâce à sa fraction polysaccharidique riche en rhamnogalacturonane de type I, l'ECS en régulant le mécanisme desquamation / différenciation représente donc une stratégie nouvelle dans le traitement des peaux sèches. Ainsi que la partie « *Etat de la question* » en témoigne, aucune donnée bibliographique n'existe, à notre connaissance, qui permettrait d'expliquer les propriétés biologiques du rhamnogalacturonane de son de châtaigne. Toutefois, Paulsen et Barsett (2005), dans leur étude sur les propriétés biologiques des pectines, soulignent l'importance des zones chevelues de ces dernières, essentiellement composées d'arabinanes et d'arabinogalactanes de type I ou II. A ce stade de notre étude, il nous a donc paru opportun d'engager une étude prospective dont l'objectif était d'identifier, puis de sélectionner diverses matières premières sur la base de la variabilité de la composition des chaînes latérales de leurs rhamnogalacturonanes. Il s'agira enfin, dans une dernière phase, d'éprouver l'importance du couple structure / activité biologique des pectines dans le domaine de la dermo-cosmétique.

## **II.2. Screening de matières végétales : sélection de rhamnogalacturonanes de type I**

### II.2.1. Extraction et caractérisation chimique

Sur la base d'une étude de la littérature, mais aussi en fonction de leur liberté d'exploitation (étude des brevets) ou de leur attractivité (études marketing), onze matières premières ont été sélectionnées pour servir de support à l'étude prospective consacrée aux rhamnogalacturonanes de type I (tableau 10). Chacune des onze matières a été soumise au protocole d'extraction et d'analyses présenté en figure 50 au sein du laboratoire R&D de la société SILAB (adaptation du protocole expérimental B). L'extraction a donc lieu dans l'eau et requiert la mise en œuvre de cocktail de carbohydrase de grade industriel.

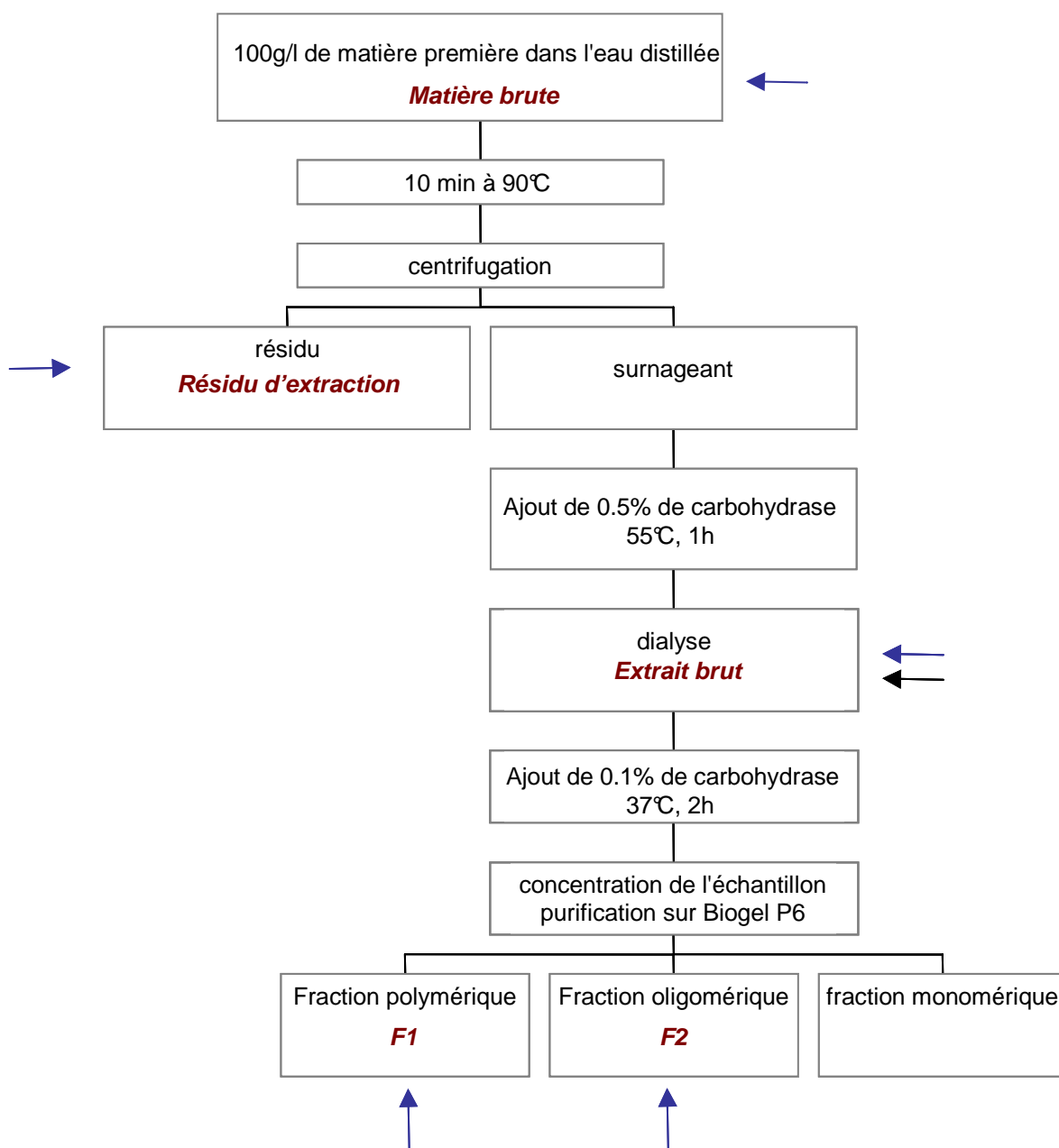
Les extraits bruts seront enfin déposés sur une colonne de chromatographie d'exclusion stérique de Biogel P6 afin d'en isoler, puis d'en caractériser la fraction macromoléculaire de type rhamnogalacturonique.

---



\* Paulsen B.S., Barsett H., Bioactive pectic polysaccharides, *Advances Polymers Sciences*, **2005**, 186, 69-101.

**Tableau 10** : Liste des matières premières utilisées dans le cadre du screening.

<b>Matières premières (poudres)</b>	
<i>Pomme</i>	<i>Malus spp.</i>
<i>Raisin</i>	<i>Vitis vinifera</i>
<i>Pêche</i>	<i>Prunus persica</i>
<i>Igname</i>	<i>Dioscorea villosa</i>
<i>Peau de pomme</i>	<i>Malus spp.</i>
<i>Marc de pomme</i>	<i>Malus spp.</i>
<i>Pépins de raisin</i>	<i>Vitis vinifera</i>
<i>Marc de raisin</i>	<i>Vitis vinifera</i>
<i>Datte</i>	<i>Phœnix dactylifera</i>
<i>Fruit de la passion</i>	<i>Passiflora edulis S.</i>
<i>Rhubarbe</i>	<i>Rheum rhaponticum</i>



### Type d'analyses réalisées

-  Dosages des oses neutres et des acides uroniques
-  Analyse de la composition monosaccharidique par CPG

**Figure 50** : Protocole d'extraction, de purification et d'analyses des rhamnogalacturonanes issus du screening de matière végétale (adaptation du protocole A).

Ainsi que l'indique le tableau 11, la composition des matières premières sélectionnées est très hétérogène ce qui est tout à fait caractéristique de la matière végétale qui présente une très grande diversité de molécules polysaccharidiques. Le glucose y est souvent le monosaccharide majoritaire, ce qui du point de vue botanique n'est pas surprenant compte tenu de l'origine des poudres végétales utilisées pour l'extraction - amidon, saccharose et glucose circulant formant souvent une part non négligeable de la matière végétale. Le tableau 12 est pour sa part plus informatif. Il présente pour chacune des matières, les rendements massiques d'extraction dont les valeurs sont comprises entre 0.3 % (cas du raisin) et 38 % (cas du fruit de la passion). Les teneurs en acides uroniques des extraits sont également très variables. Estimées par dosages colorimétriques, les valeurs oscillent entre 0 % (fruit de la passion) et 83 % (peau de pomme) mais restent très dépendantes d'éventuelles interactions avec des pigments ou colorants co-extraits. Une analyse rapide des ces résultats préliminaires met en valeur quelques unes des matières premières sur la base d'un compromis liant le rendement d'extraction à la teneur en acides uroniques de l'extrait : pomme et ses dérivés (peau de pomme et marc de pomme), dérivés de raisin (marc et pépins), dattes.

L'analyse de la composition monosaccharidique des extraits bruts (tableau 13) complète l'analyse précédente en la précisant. En effet, chacune des matières premières présélectionnées présentent les monosaccharides marqueurs de dérivés pectiques de la famille des rhamnogalacturonanes (Ara, Gal, Rha, GalA). C'est ce que confirme l'analyse des compositions monosaccharidiques des fractions macromoléculaires F1 purifiées à partir des extraits bruts (tableau 14). La variabilité des rapports GalA/Rha est un autre indicateur de la qualité des extraits pectiques. Ce rapport – *compris entre 0.5 (cas de marc de pomme) et 3 (cas des pépins de raisins)* – est relativement stable ce qui témoigne de la bonne reproductibilité des protocoles de dégradation enzymatique préparative qui conduisent à la production de fractions rhamnogalacturoniques homogènes. Enfin, la valeur du rapport Ara/Gal, comprise entre 0.5 (*cas des dattes*) et 13.7 (*cas du marc de pomme*), est nettement plus hétérogène. Elle apparaît donc, avec la valeur de rendement matière, comme un critère de choix pour sélectionner celles des matières qui serviront - *avec le son de châtaigne* - de modèle pour la suite de notre étude dédiée à la relation structure / fonction des rhamnogalacturonanes en dermo-cosmétique (tableau 15). L'utilisation de ces critères nous permet de choisir :

- **le marc de pomme** : rendement matière = 1.28      rapport Ara/gal = 13,7
- **le marc de raisin** : rendement matière = 0.44      rapport Ara/gal = 0,9

**Tableau 11** : Caractérisation des matières brutes par Chromatographie en Phase gazeuse après méthanolyse et silylation (TMSd). Valeurs exprimées en % molaire des constituants identifiés.

<b>Matière première</b>	<b>Ara</b>	<b>Rha</b>	<b>Fuc</b>	<b>Xyl</b>	<b>Man</b>	<b>Gal</b>	<b>Gal A</b>	<b>Glc</b>	<b>Glc A</b>
<i>Pomme</i>	5,9	1,9	0,7	3,8	0,4	2,3	4,1	81	0
<i>Raisin</i>	0,1	0,1	0	0,1	0	0	0	99,7	0
<i>Pêche</i>	0,7	0,2	0,1	0,4	T	T	T	98,7	0
<i>Peau de pomme</i>	14,1	3,4	0,8	9,6	1,2	3,6	8,5	58,7	0
<i>Marc de pomme</i>	26,3	7,1	1,3	15	2,1	8,9	22,9	15,5	1
<i>Pépins de raisins</i>	7,4	3,3	0,4	47,3	5,8	4,1	11,2	19,3	1,3
<i>Marc de raisin</i>	8,7	3,9	1	35,5	3,7	3,7	8,9	34,4	0,2
<i>Igname</i>	1,6	17	T	5,4	1,9	5,8	4,3	63,9	0,2
<i>Datte</i>	0,5	0,2	0	1,4	0,2	0	0	97,6	0
<i>Fruit de la passion</i>	0	0	0	0	0	0	0	100	0
<i>Rhubarbe</i>	0	0	0	0	0	0	0	100	0

**Tableau 12** : Caractérisation des extraits bruts isolés à partir des matières brutes.

<b>Matière première</b>	<b>% AU</b>	<b>Rendement matière % ST/matière première</b>
<i>Pomme</i>	73	4
<i>Raisin</i>	31	0,3
<i>Pêche</i>	32	3,2
<i>Peau de pomme</i>	82,8	1,4
<i>Marc de pomme</i>	67,3	11,7
<i>Pépins de raisins</i>	39,4	2,1
<i>Marc de raisin</i>	31	1,9
<i>Igname</i>	2,3	1,6
<i>Datte</i>	49,3	0,5
<i>Fruit de la passion</i>	0	38
<i>Rhubarbe</i>	11,7	0,4

**Tableau 13 :** Caractérisation des extraits brutes (TMS) et des résidus d'extraction (TMSd) par Chromatographie en Phase gazeuse après méthanolyse et silylation. Valeurs exprimées en % molaire des constituants identifiés.

Matière première		Ara	Rha	Fuc	Xyl	Man	Gal	Gal A	Glc	Glc A
<i>Pomme</i>	<i>Résidu</i>	7,9	2,6	1,6	6,9	0,8	4,0	6,9	69,4	0
	<b>Extrait brut</b>	<b>21,1</b>	<b>6,3</b>	0,4	5,3	2,8	<b>5,9</b>	<b>54,4</b>	3,7	traces
<i>Raisin</i>	<i>Résidu</i>	<i>Pas de résidu</i>								
	<b>Extrait brut</b>	4,2	6,2	0,8	3,2	3,4	6,8	8,4	67,1	0
<i>Pêche</i>	<i>Résidu</i>	8,7	2,2	1,1	6,0	0,6	3,6	9,1	68,6	0
	<b>Extrait brut</b>	19,5	6	0,8	4,7	1,8	7,7	27,9	28,5	3,2
<i>Peau de pomme</i>	<i>Résidu</i>	14,5	4,1	2,2	12,5	0,8	5,9	12,7	47,4	0
	<b>Extrait brut</b>	<b>32,2</b>	<b>7,3</b>	0,7	5,6	1,9	<b>7,0</b>	<b>43,8</b>	1,4	traces
<i>Marc de pomme</i>	<i>Résidu</i>	20,7	7	3,1	18	2,7	11,7	18,1	18	0,6
	<b>Extrait brut</b>	<b>30,1</b>	<b>6,7</b>	0,3	3,6	1,1	<b>5,5</b>	<b>45</b>	6,7	0,9
<i>Pépins de raisins</i>	<i>Résidu</i>	16,4	6,6	0,7	16,9	11,5	8,3	19,2	18,9	1,3
	<b>Extrait brut</b>	<b>18,9</b>	<b>5,4</b>	0,4	8,1	29,3	<b>10,8</b>	<b>18,8</b>	4,6	3,9
<i>Marc de raisin</i>	<i>Résidu</i>	11,9	4,7	1,2	34,3	4,4	5,3	17,3	20,5	0,4
	<b>Extrait brut</b>	<b>29,3</b>	<b>10,6</b>	0,5	5,6	14,4	<b>10,1</b>	<b>18,9</b>	10,2	0,5
<i>Poudre d'igname</i>	<i>Résidu</i>	2,2	19	0	9,1	2,1	6,1	6,2	55,3	0
	<b>Extrait brut</b>	6	32	1	2	15	12	6	25	1
<i>Datte</i>	<i>Résidu</i>	0	0	0	2,5	0	0	0	97,6	0
	<b>Extrait brut</b>	<b>8,7</b>	<b>5,1</b>	0	9,9	0,8	<b>8,9</b>	<b>39,6</b>	22,7	4,2
<i>Fruit de la passion</i>	<i>Résidu</i>	0,8	0	0	1,3	0,6	1,5	0	95,9	0
	<b>Extrait brut</b>	0	0	0	0	0	0	0	100	0
<i>Rhubarbe</i>	<i>Résidu</i>	0	0	0	0	0	0	0	100	0
	<b>Extrait brut</b>	9,0	12,3	0,5	3	1	8,1	50	2,3	13,8

**Tableau 14** : Caractérisation des extraits purifiés par chromatographie d'exclusion stérique sur Biogel P6 par Chromatographie en Phase gazeuse après méthanolyse et silylation. Valeurs exprimées en % molaire des constituants identifiés.

Matière première		Ara	Rha	Fuc	Xyl	Man	Gal	Gal A	Glc	Glc A	Rendement matière en g/g
<i>Pomme</i>	<b>F1</b>	<b>30,3</b>	<b>16,4</b>	1,4	6,7	8,7	<b>18,2</b>	<b>17,4</b>	0,8	0	0,1
	<b>F2</b>	31,1	17,9	1,1	5,0	6,5	6,3	31,1	1	0	0,15
<i>Raisin</i>	<b>F1</b>	9,3	9,6	2,7	7,8	17	19,4	18,1	12,6	3,4	0,15
	<b>F2</b>	4,1	9,6	T	16,6	8,1	4,4	36,2	21	0	0,3
<i>Pêche</i>	<b>F1</b>	18,7	6,9	0,6	7,1	5,1	23,4	5,4	30,1	2,7	0,2
	<b>F2</b>	10,8	16	1,7	1,8	6,7	6,7	22,8	30,3	3,2	0,2
<i>Peau de pomme</i>	<b>F1</b>	<b>17</b>	<b>19</b>	4,8	4,4	6,5	<b>17,7</b>	<b>24,3</b>	3,5	2,8	0,19
	<b>F2</b>	4,9	38,4	3,5	5,5	5,6	8,0	14,3	18,7	1,1	0,05
<i>Marc de pomme</i>	<b>F1</b>	<b>68,5</b>	<b>8,5</b>	0,2	1,6	8,0	<b>5,0</b>	<b>4,6</b>	3,2	0,3	1,28
	<b>F2</b>	56,1	13,5	0,6	4,5	3,0	3,4	15,8	1,0	2,2	0,79
<i>Pépins de raisins</i>	<b>F1</b>	<b>19,5</b>	<b>3,9</b>	0,4	8,5	26,5	<b>17,3</b>	<b>11,6</b>	1,2	11	1,4
	<b>F2</b>	12,8	7,2	0,6	6,9	35,8	13,1	16,4	1,7	5,4	1,1
<i>Marc de raisin</i>	<b>F1</b>	<b>17,1</b>	<b>11,7</b>	2,0	6,1	19,6	<b>18,1</b>	<b>14,9</b>	3,6	7,1	0,44
	<b>F2</b>	14,1	16,5	0	6,1	27,2	8,6	18,9	2,9	5,6	0,23
<i>Igname</i>	<b>F1</b>	6,7	15,1	1,2	1,4	38	15,3	3,7	16,2	2,5	0,16
	<b>F2</b>	7,9	27,7	1,1	3,1	22,5	6,3	16,5	12,8	2	0,23
<i>Datte</i>	<b>F1</b>	<b>13,5</b>	<b>11,1</b>	0	6,8	24,5	<b>28,5</b>	<b>15,5</b>	0	0	0,11
	<b>F2</b>	5,5	7,4	0	6	46,2	5,8	17,5	5,4	6,3	0,13
<i>Fruit de la passion</i>	<b>F1</b>	0	0	0	0	0,2	0	0	99,8	0	14,06
	<b>F2</b>	0	0	0	0	1,6	0	0	98,4	0	2,4
<i>Rhubarbe</i>	<b>F1</b>	9,5	11,9	2,2	5,6	6,1	12,6	43,1	0,8	8,2	0,2
	<b>F2</b>	6,7	8,7	1,2	16,6	5,3	16,3	18,7	14,6	11,7	0,25

**Tableau 15** : Synthèse des analyses issues du screening des matières premières. Les matières sélectionnées pour la suite de l'étude apparaissent en bleues.

<b>Matière première</b>	<b>Rendement matière (fraction F1)</b>	<b>Rapport Ara/Gal</b>	<b>Rapport GalA/Rha</b>
Pomme	0.1	1.7	1.1
Peau de pomme	0.19	1.0	1.3
Marc de pomme	1.28	13.7	0.5
Pépins de raisins	1.4	1.1	3.0
Marc de raisins	0.44	0.9	1.3
Datte	0.11	0.5	1.4
<i>Son de châtaigne</i>	<i>0.54</i>	<i>1.0</i>	<i>1.3</i>

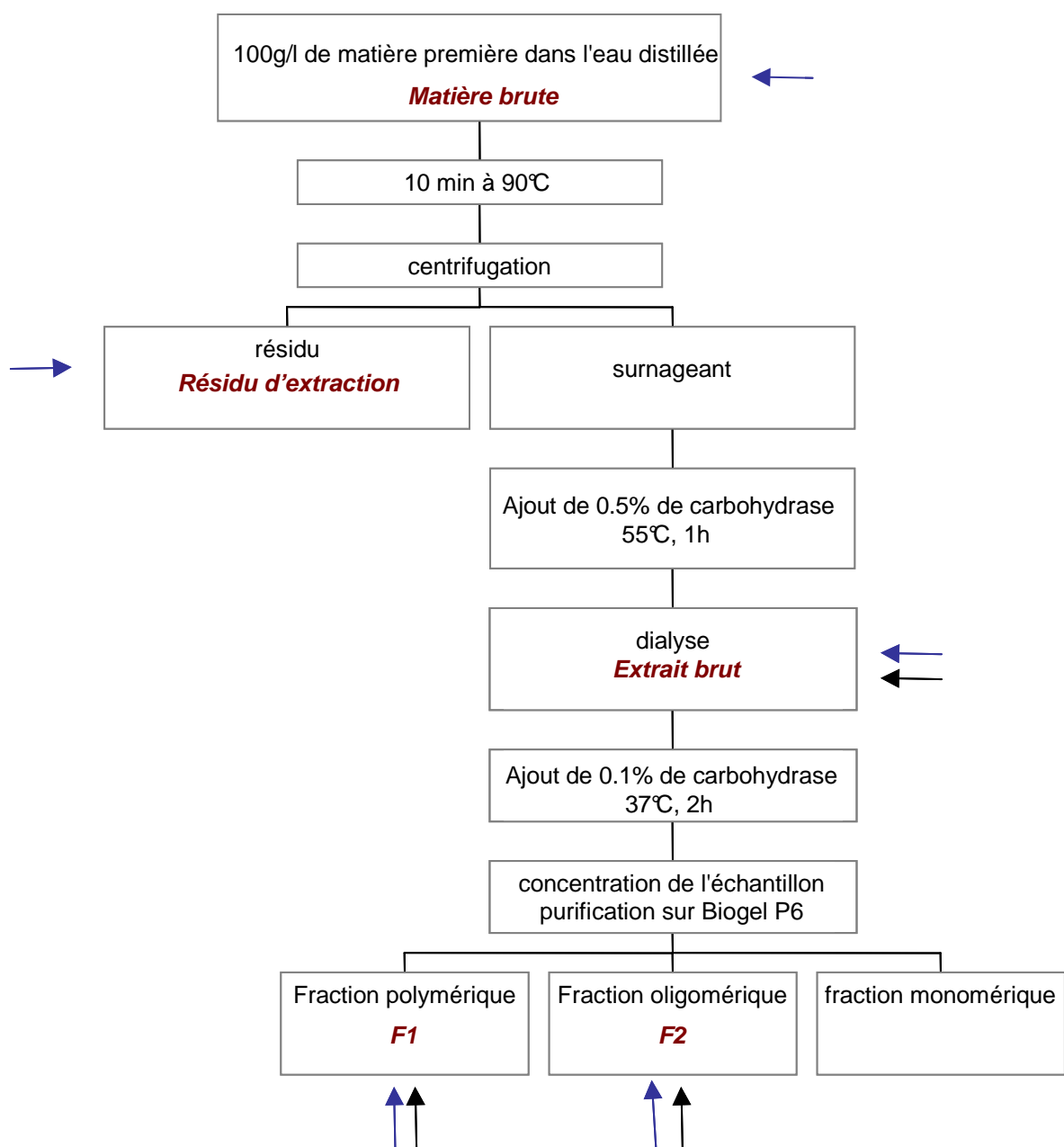


## II.2.2. Développement pilote sur marc de pomme et marc de raisin



Sur la base de la variabilité de leur composition chimique (rapports Ara/Gal et GalA/Rha) mais aussi des rendements liés à leur extraction, les marcs de pomme et de raisin ont été choisis comme modèle pour la suite de notre étude. L'extraction sélective des rhamnogalacturonanes a été renouvelée en condition de laboratoire LCSN (protocole A – figure 51), transférée en condition de laboratoire R&D (protocole B – figure 52) puis transposée en condition pilote dans le hall technologique de l'entreprise (protocole C). Le protocole pilote est une transposition du protocole B dont il reprend les méthodologies en les adaptant aux matériels. Dans ce cas, les quantités et les volumes initiaux sont multipliés par 25-30. Une synthèse des principaux résultats obtenus à cette occasion permet de suivre – *tout en les comparant* – la transposition d'un protocole de l'échelle du laboratoire universitaire (quelques grammes de matière végétale) à la production pilote (plusieurs dizaines de kg de matière végétale).

### II.2.2.1 Marc de pomme

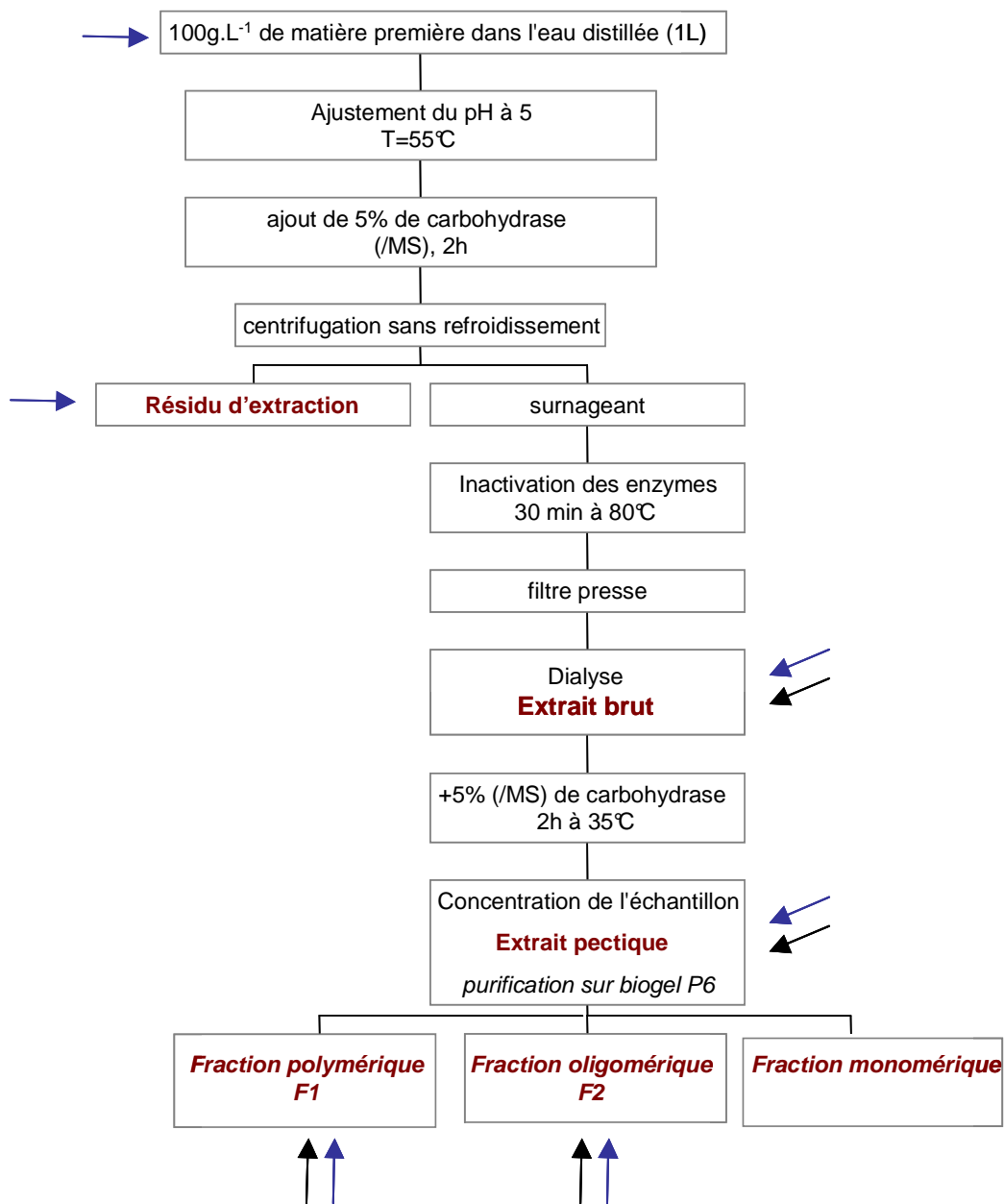
Le tableau 16 présente pour chacun des trois protocoles d'extraction, la valeurs des rendements massiques. Ces dernières sont variables et comprises entre 3.7 (cas du protocole B) et 11.5 % (cas du protocole A). Les teneurs en acides uroniques des extraits bruts sont en revanche très stables et comprises entre 67 (cas du protocole A) et 73 % (cas du protocole C) mais restent très dépendantes d'éventuelles interactions avec des pigments ou colorants co-extraits. Ces résultats préliminaires d'ordre qualitatif et quantitatif s'ils peuvent être pour partie expliqués par la variabilité des méthodes séparatives employées (filtre presse notamment), témoignent également d'une extractabilité différentielle des pectines en fonction des conditions opératoires mises en oeuvre. L'analyse des compositions monosaccharidiques des extraits bruts obtenus selon les protocoles A, B et C (tableau 17) complète les résultats précédents en les précisant. Chacun des extraits bruts présente les monosaccharides marqueurs de dérivés pectiques de la famille des rhamnogalacturonanes et notamment : Ara, Gal, Rha, GalA. Les proportions relatives des monosaccharides identifiés dans ces extraits – *exprimées en % molaire des constituants identifiés* – sont similaires ce qui traduit la bonne transposition des protocoles d'extraction à trois échelles différentes. Enfin, la présence de quantités significatives de GalA dans les résidus d'extraction peut, d'une part, être expliquée



### Type d'analyses réalisées

-  Dosages des oses neutres et des acides uroniques
-  Analyse de la composition monosaccharidique par CPG

**Figure 51:** Protocole d'extraction, de purification et d'analyses des rhamnolacturonanes issus du screening de matière végétale (protocole A).



### Type d'analyses réalisées

- Dosages des oses neutres et des acides uroniques
- Analyse de la composition monosaccharidique par CPG

**Figure 52** : Protocole d'extraction, de purification et d'analyses des rhamnogalacturonanes issus du screening de matière végétale (protocole B).

**Tableau 16** : Caractérisation des extraits bruts isolés du marc de pomme.

<b>Extraits bruts</b>	<b>AU (% <i>massique</i>)</b>	<b>Rendement matière % <i>ST/matière première</i></b>
<b>Protocole A</b>	67,2	11,5
<b>Protocole B</b>	69	3,7
<b>Protocole C</b>	73	6,8

**Tableau 17** : Caractérisation des extraits brutes (TMS) et des résidus d'extraction (TMS*d*) par Chromatographie en Phase gazeuse après méthanolyse et silylation. Valeurs exprimées en % molaire des constituants identifiés.

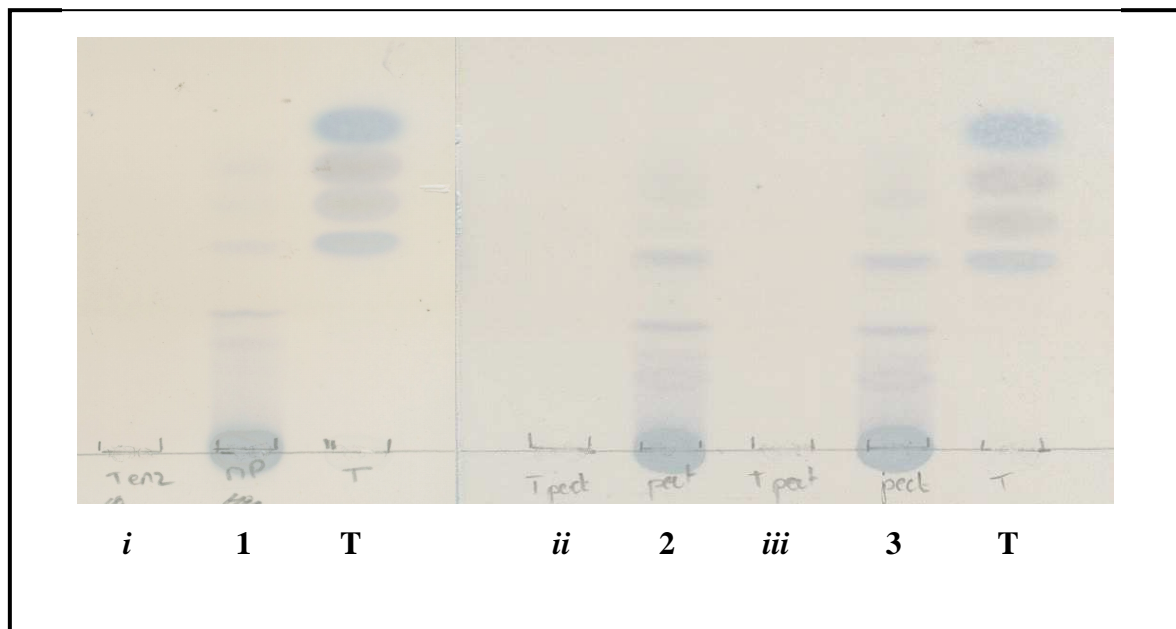
	<b>Ara</b>	<b>Rha</b>	<b>Fuc</b>	<b>Xyl</b>	<b>Man</b>	<b>Gal</b>	<b>Gal A</b>	<b>Glc</b>	<b>Glc A</b>
<b><u>Protocole A</u></b>									
<b>Extrait brut</b>	30.1	6.7	0.3	3.6	1.1	5.5	45.0	6.7	0.9
<b>Résidu d'extraction</b>	20.7	7.0	3.1	18.0	2.7	11.7	18.1	18.0	0.6
<b><u>Protocole B</u></b>									
<b>Extrait brut</b>	30.1	7.1	0.4	4.2	2.1	5.6	39.0	6.7	4.8
<b>Résidu d'extraction</b>	19.8	6.7	1.6	21.8	3.0	10.1	17	19.9	0
<b><u>Protocole C</u></b>									
<b>Extrait brut</b>	33.4	7.4	0.3	4.1	2.0	5.9	44.6	2.2	0

par une extraction non quantitative des pectines mais aussi, d'autre part, par la présence de protopectines peu ou pas extractibles (Thibault, 1980).

Ainsi qu'en attestent les résultats précédents, du point de vue qualitatif - *et dans une moindre mesure, du point de vue quantitatif* - la mise en œuvre des protocoles A, B et C sur le marc de pomme conduit à l'extraction d'une même classe de composés pectiques. L'extrait brut issu du protocole d'extraction C est celui qui a été utilisé pour poursuivre le protocole de purification. Il a été soumis à une dégradation enzymatique en présence de 1, 5 ou 7% (g/g) de carbohydrase dont les produits de la réaction peuvent être analysés par Chromatographie sur Couche Mince (figure 53). Sur la base de l'analyse de cette dernière, une concentration de 5% d'enzyme est retenue pour la suite du protocole. Dans ces conditions, un extrait pectique C est obtenu. Il est principalement composé de sucres acides ou neutres et renferme des quantités mineures de protéines, polyphénols et sels (tableau 18). L'extrait pectique C est enfin purifié par chromatographie d'exclusion stérique sur Biogel P6 (figure 54). Elué par l'eau, il se sépare en trois fractions principales : F1 (macromoléculaire – éluee avec le volume mort de la colonne), F2 (oligosaccharidique – incluse dans la colonne) et F3 (monosaccharidique – éluee avec le volume total de la colonne) qui, analysées par Chromatographie sur Couche Mince donne un profil caractéristique présenté en figure 55. Un résultat similaire est produit par utilisation de la Chromatographie Liquide Haute Performance sur colonne d'exclusion stérique de type Aquagel-OH (figure 56). Les fractions 1 et 2 - *macro et oligosaccharidiques* - représentent une part significative du mélange (près de 90 % massique de l'extrait) ; elles présentent aussi des teneurs élevées en acides uroniques (de 47 à 87 %, tableau 19). L'extrait pectique et la fraction F1 macromoléculaire, composés d'acide galacturonique, de rhamnose, d'arabinose et de galactose (tableau 20) présentent par ailleurs la composition attendue d'un arabinogalactane acide de la famille des rhamnogalacturonanes de type I. Ce résultat est conforme à ceux obtenus dans le cadre du screening des matières végétales. La fraction F2 - *oligosaccharidique* - est majoritairement composée de GalA dérivant probablement de la dégradation par l'endopolygalacturonase de la partie homogalacturonique de l'extrait pectique. Enfin, la fraction F3 - *monosaccharidique* - est composée de monosaccharides neutres issus de la dégradation enzymatique des hémicelluloses, de l'amidon ou de la présence dans le marc de pomme de glucose circulant ou de saccharose.

---

\* Thibault J.F., Les pectines, Dans : *Les polymères végétaux, polymères pariétaux et alimentaires non azotés*, Ed Gauthier-Villars, Paris, 1980, pp 345.



**T :**                   Témoin avec de bas en haut, GalA, Saccharose, Glc, Ara.

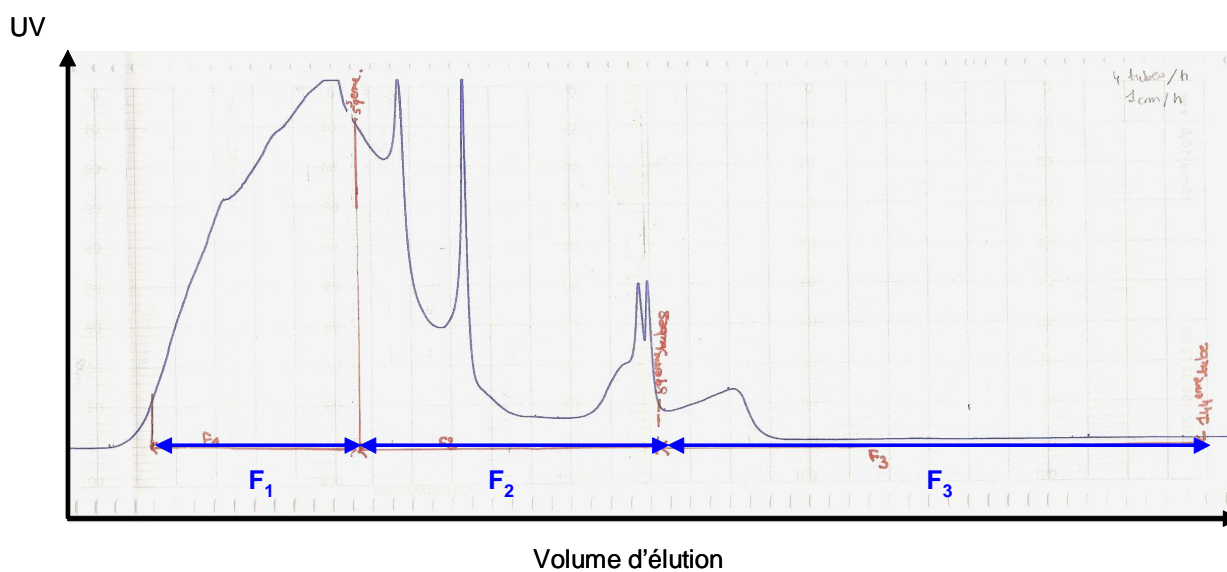
**i, ii, iii :**           Témoins de la solution d'enzyme à 1, 5 et 7% (g/g) respectivement.

**1, 2, 3 :**            Dégradation enzymatique de l'extrait pectique brut C par une carbohydrase à la concentration de 1, 5, 7 % (g/g) respectivement.

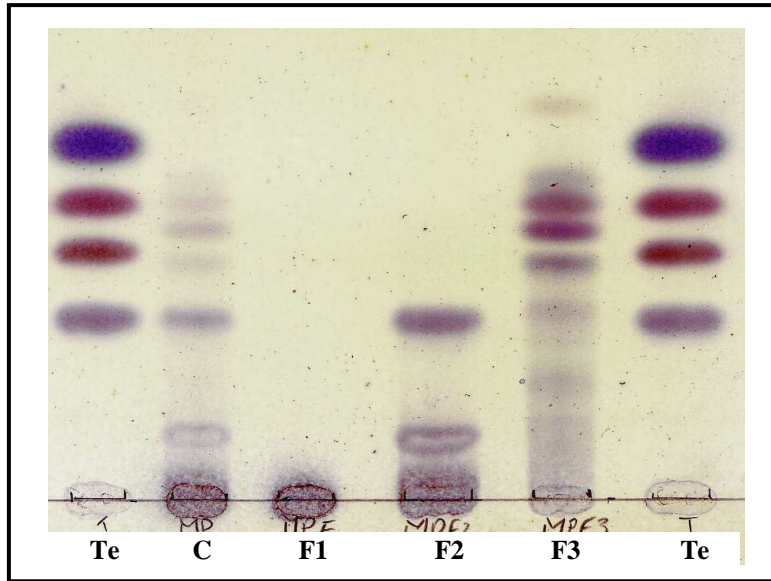
**Figure 53 :** Profil de séparation par Chromatographie sur Couche Mince de la dégradation enzymatique de l'extrait brut C du marc de pomme par une carbohydrase.

**Tableau 18** : Composition chimique globale de l'extrait pectique C du marc de pomme. Toutes valeurs en g.L<sup>-1</sup>

	MS	[ON]	[AU]	Protéines kjedhal	[polyphénols]	[cendres]	[NaCl]
<b>Extrait pectique C</b>	36.6	12	27.3	0.3	0.2	4.6	2.9

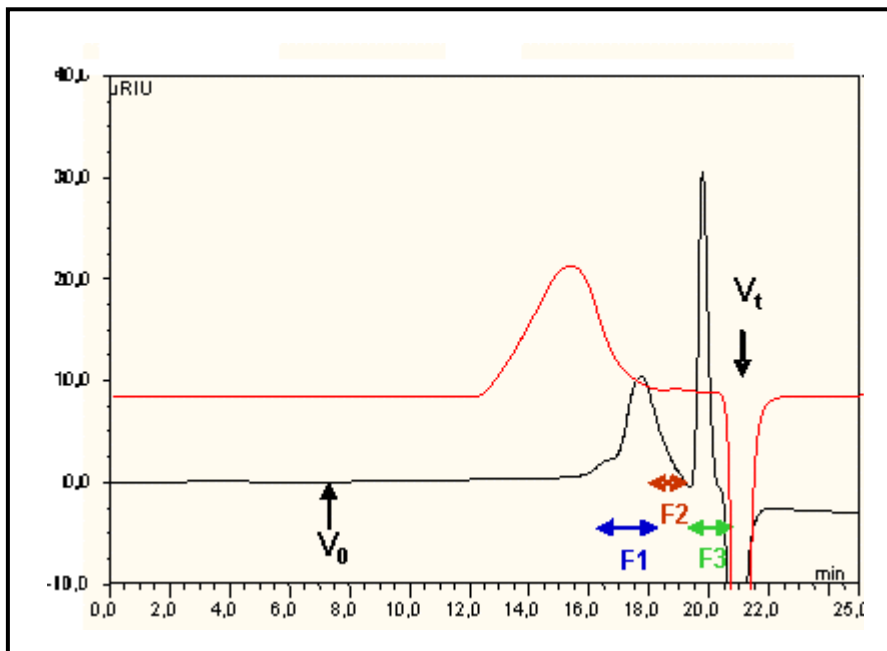


**Figure 54** : Profil de séparation par chromatographie d'exclusion stérique sur Biogel P6 de l'extrait pectique C du marc de pomme.



*Te : témoin (de bas en haut) GalA, Saccharose, Glc, Xyl*  
*C : extrait pectique du marc de pomme*  
*F1, F2, F3 : fractions séparées par chromatographie d'exclusion stérique*

**Figure 55** : Profil de séparation par Chromatographie sur Couche Mince des fractions séparées par chromatographie d'exclusion stérique sur Biogel P6 de l'extrait pectique C du marc de pomme. Eluant : eau distillé, débit = 12,5 ml/h.



**Figure 56** : Profil de séparation par Chromatographie Liquide Haute Performance sur colonne d'exclusion stérique (type Aquagel-OH) de l'extrait pectique C du marc de pomme.  $V_0$  : Volume mort ;  $V_t$  : Volume total. Eluant  $\text{NaNO}_3$  50 mM ; détecteur IR ; débit  $1\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . La courbe rouge représente le profil d'une pectine commerciale Sigma,  $[\text{C}]=4\text{ mg/ml}$ .



**Tableau 19** : Caractérisation de l'extrait pectique isolé du marc de pomme.

	%[AU]	Rendement matière % ST/matière première	%/ extrait pectique
<b>Extrait pectique C</b>	69,5	6,8	-
<b>Fraction polymérique – F1</b>	47,1	3,3	49,3
<b>Fraction oligomérique – F2</b>	86,8	2,7	40,3
<b>Fraction monomérique – F3</b>	8,5	0,7	10,4

**Tableau 20** : Caractérisation des extraits purifiés par chromatographie d'exclusion stérique sur Biogel P<sub>6</sub> par Chromatographie en Phase gazeuse après méthanolyse et silylation. Valeurs exprimées en % molaire des constituants identifiés.

	Ara	Rha	Fuc	Xyl	Man	Gal	Gal A	Glc	Glc A
<b>Extrait pectique C</b>	36,4	6,3	0	0	0	6,8	50,5	0	0
<b>Fraction polymérique – F1</b>	29,1	6	0	2,5	2,3	3,9	53	1,4	1,7
<b>Fraction oligomérique – F2</b>	10	1,9	0	1,2	0	0,5	81,6	0	4,8
<b>Fraction monomérique – F3</b>	34,8	5,9	0	9,7	0,7	20,7	3,5	24,7	0

### II.2.2.2 Marc de raisin

La mise en œuvre des protocoles d'extraction A, B et C sur le marc de raisin produit les valeurs de rendement massique présentées dans le tableau 21. Ces dernières sont comprises entre 0.5 (cas du protocole C) et 2.0 % (cas du protocole A). Les teneurs en acides uroniques des extraits bruts sont une nouvelle fois très stables et comprises entre 30.9 (cas du protocole A) et 36.9 % (cas du protocole C) mais restent très dépendantes d'éventuelles interactions avec des pigments ou colorants co-extraits. L'analyse des compositions monosaccharidiques des extraits bruts obtenus selon les protocoles A, B et C (tableau 22) complète les résultats précédents en les précisant. Chacun des extraits bruts présente les monosaccharides marqueurs de dérivés pectiques de la famille des rhamnogalacturonanes et notamment : Ara, Gal, Rha, GalA. Les proportions relatives des monosaccharides identifiés dans ces extraits – *exprimées en % molaire des constituants identifiés* – sont similaires ce qui traduit la bonne transposition des protocoles d'extraction à trois échelles différentes. Comme cela était le cas pour le marc de pomme, des quantités significatives de GalA sont identifiées dans les résidus d'extraction, ce qui peut être expliqué d'une part par une extraction non quantitative des pectines mais aussi, d'autre part, par la présence de protopectines pas ou pas extractibles (Thibault, 1980).

Ainsi qu'en attestent les résultats précédents, la mise en œuvre des protocoles A, B et C sur le marc de raisin conduit, tant du point de vue qualitatif que quantitatif, à l'extraction d'une même classe de composés pectiques. L'extrait brut issu du protocole d'extraction C est celui qui a été utilisé pour poursuivre le protocole de purification. Il a été soumis à une dégradation enzymatique par une carbohydrase utilisée à la concentration de 5% (g/g). Dans ces conditions, un extrait pectique C est obtenu. Il est principalement composé de sucres acides et neutres et renferme des quantités mineures de protéines, polyphénols et sels (tableau 23). L'extrait pectique C est enfin purifié par chromatographie d'exclusion stérique sur Biogel P6 (figure 57). Elué par l'eau, il se sépare en trois fractions principales : F1 (macromoléculaire – éluée avec le volume mort de la colonne), F2 (oligosaccharidique – incluse dans la colonne) et F3 (monosaccharidique – éluée avec le volume total de la colonne) qui, analysées par Chromatographie sur Couche Mince donne un profil caractéristique présenté en figure 58. Un résultat similaire est produit par utilisation de la Chromatographie Liquide Haute Performance sur colonne d'exclusion stérique de type Aquagel-OH (figure 59).

---

\* Thibault J.F., Les pectines, Dans : *Les polymères végétaux, polymères pariétaux et alimentaires non azotés*, Ed Gauthier-Villars, Paris, **1980**, pp 345.

**Tableau 21** : Caractérisation des extraits bruts isolés du marc de raisin.

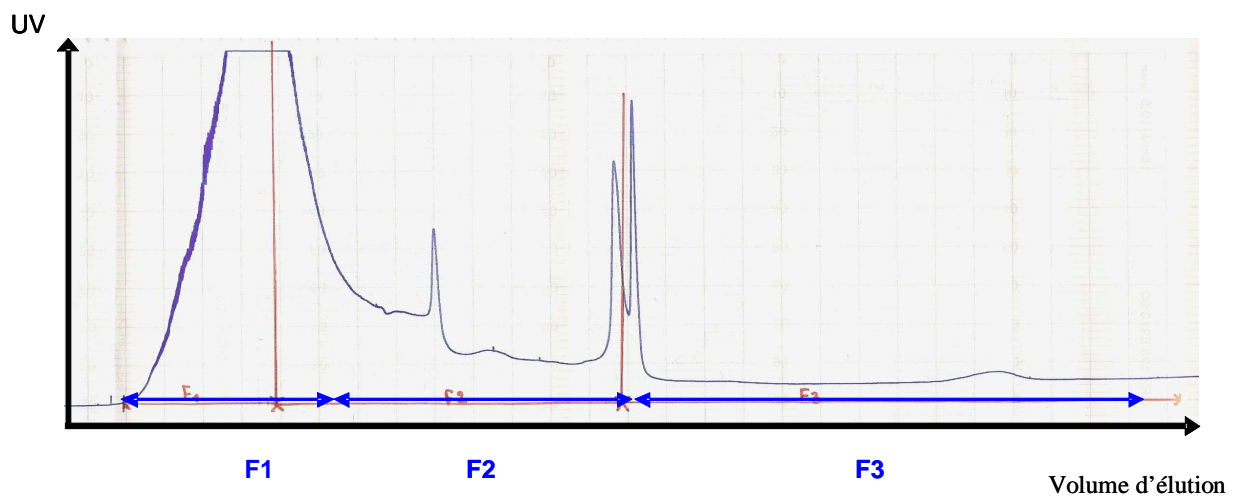
<b>Extraits bruts</b>	<b>AU (% <i>massique</i>)</b>	<b>Rendement matière % <i>ST/matière première</i></b>
<b>Protocole A</b>	30.9	2.0
<b>Protocole B</b>	36.0	0.9
<b>Protocole C</b>	36.9	0.5

**Tableau 22** : Caractérisation des extraits brutes (TMS) et des résidus d'extraction (TMSd) par Chromatographie en Phase gazeuse après méthanolyse et silylation. Valeurs exprimées en % molaire des constituants identifiés.

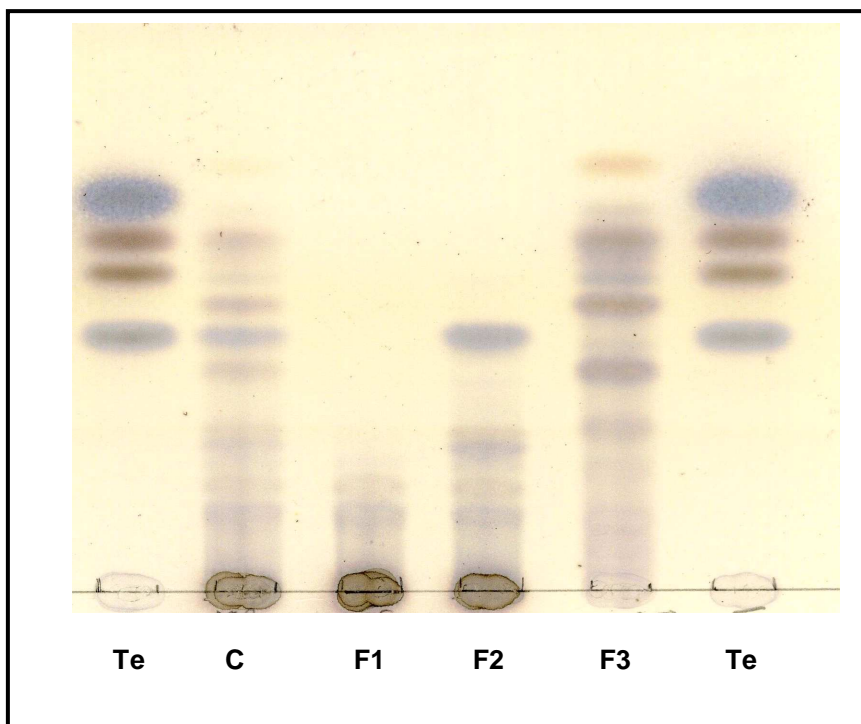
	<b>Ara</b>	<b>Rha</b>	<b>Fuc</b>	<b>Xyl</b>	<b>Man</b>	<b>Gal</b>	<b>Gal A</b>	<b>Glc</b>	<b>Glc A</b>
<b><u>Protocole A</u></b>									
<b>Extrait brut</b>	29.3	10.6	0.5	5.6	14.4	10.1	18.9	10.2	0.5
<b>Résidu d'extraction</b>	11.9	4.7	1.2	34.3	4.4	5.3	17.3	20.5	0
<b><u>Protocole B</u></b>									
<b>Extrait brut</b>	25.9	9.8	0.6	4.3	12.0	12.4	18.5	11.1	5.4
<b>Résidu d'extraction</b>	11.9	5.0	0	29.3	5.4	8.2	11.1	29.1	0
<b><u>Protocole C</u></b>									
<b>Extrait brut</b>	22.4	8.6	0	5.5	17.4	12.4	24.8	5.8	3.1

**Tableau 23** : Composition chimique globale de l'extrait pectique C du marc de raisin. Toutes valeurs en g.L<sup>-1</sup>

	MS	[ON]	[AU]	Protéines kjedhal	[polyphénols]	[cendres]	[NaCl]
<b>Extrait pectique C</b>	40.5	23.4	13.7	1.4	0.04	5.8	3.0

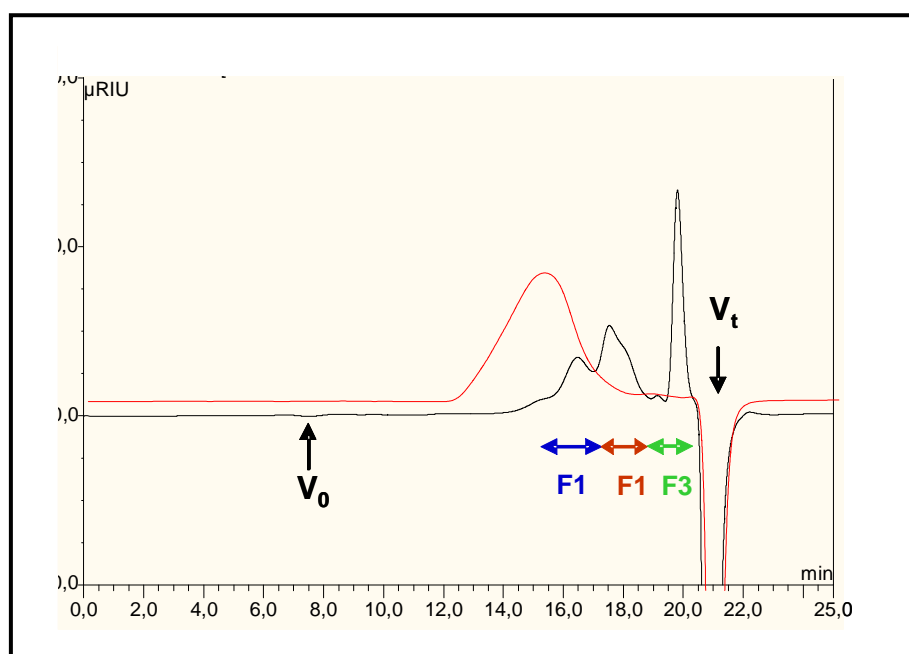


**Figure 57** : Profil de séparation par chromatographie d'exclusion stérique sur Biogel P6 de l'extrait pectique C du marc de raisin.



*Te* : témoin (de bas en haut) GalA, Saccharose, Glc, Xyl  
*C* : extrait pectique du marc de raisin  
*F1, F2, F3* : fractions séparées par chromatographie d'exclusion stérique

**Figure 58** : Profil de séparation par Chromatographie sur Couche Mince des fractions séparées par chromatographie d'exclusion stérique sur Biogel P6 de l'extrait pectique C du marc de raisin. Eluant : eau distillé, débit = 12,5 ml/h.



**Figure 59** : Profil de séparation par Chromatographie Liquide Haute Performance sur colonne d'exclusion stérique (type Aquagel-OH) de l'extrait pectique C du marc de raisin.  $V_0$  : Volume mort ;  $V_t$  : Volume total. Eluant  $\text{NaNO}_3$  50 mM ; détecteur IR ; débit  $1\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . La courbe rouge représente le profil d'une pectine commerciale à 4 mg/ml.

Les fractions 1 et 2 - *macro et oligosaccharidiques* - représentent une part significative du mélange (près de 75 % massique de l'extrait) ; elles présentent aussi des teneurs élevées en acides uroniques (de 43 à 55 %, tableau 24). L'extrait pectique et la fraction F1 macromoléculaire, composés d'acide galacturonique, de rhamnose, d'arabinose et de galactose (tableau 25) présentent par ailleurs la composition attendue d'un arabinogalactane acide de la famille des rhamnogalacturonanes de type I. Ce résultat est conforme à ceux obtenus dans le cadre du screening des matières végétales. La fraction F2 - *oligosaccharidique* - est riche en GalA dérivant probablement de la dégradation par l'endopolygalacturonase de l'extrait pectique C. Enfin, la fraction F3 - *monosaccharidique* - est composée de monosaccharides neutres issus de la dégradation enzymatique des hémicelluloses, de l'amidon ou de la présence dans le marc de raisin de glucose circulant ou de saccharose

### II.2.3. Bilan et validation du transfert technologique

Trois matières premières ont été sélectionnées dans le cadre de notre travail : le son de châtaigne, le marc de pomme et le marc de raisin. Chacune de ces matières a fait l'objet d'une extraction en conditions de laboratoire (protocoles A et/ou B) ou pilote dans le hall technologique de l'entreprise SILAB (protocole C). Avant de conclure cette partie dédiée à l'extraction des rhamnogalacturonanes, nous avons souhaité faire une synthèse des informations recueillies. L'une des questions posées au démarrage de la thèse était liée à la possibilité d'adapter, puis de transférer les protocoles expérimentaux utilisés en routine au Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles aux conditions de productions de l'entreprise SILAB. En quelques sortes, il s'agissait de passer de l'échelle du gramme à celle de la dizaine à la centaine de kg de matière. Plusieurs critères objectifs doivent être utilisés pour répondre à cette question. Ceux-ci reposent essentiellement sur des critères quantitatifs tels que les valeurs de rendements d'extraction ou les teneurs en acides uroniques des extraits mais aussi qualitatifs comme c'est le cas pour le rapport Ara/Gal ou GalA/Rha. Le tableau 26 est une synthèse des résultats obtenus dans ce domaine sur les trois matières végétales modèles. L'ensemble des données qui y sont présentées met en lumière la bonne reproductibilité des extractions de l'échelle du laboratoire à l'échelle pilote. En effet, les teneurs en acides uroniques des extraits, tout comme les rapports Ara/Gal et GalA/Rha obtenus selon l'une ou l'autre des méthodologies, sont similaires ce qui témoigne qu'une même qualité de pectine est bien générée dans l'un et l'autre des cas. Les valeurs de rendement d'extraction sont quant à elles généralement plus faibles en conditions pilote sans

**Tableau 24** : Caractérisation de l'extrait pectique isolé du marc de raisin.

	%[AU]	Rendement matière % <i>ST/matière première</i>	%/ extrait pectique
<b>Extrait pectique C</b>	36.9	23.4	-
<b>Fraction polymérique – F1</b>	42.9	8.0	36.3
<b>Fraction oligomérique – F2</b>	54.6	6.9	39.4
<b>Fraction monomérique – F3</b>	34.0	9.1	24.4

**Tableau 25** : Caractérisation des extraits purifiés du marc de raisin par chromatographie d'exclusion stérique sur Biogel P6 par Chromatographie en Phase gazeuse après méthanolyse et silylation. Valeurs exprimées en % molaire des constituants identifiés.

	Ara	Rha	Fuc	Xyl	Man	Gal	Gal A	Glc	Glc A
<b>Extrait pectique C</b>	26.2	9.1	0	5.7	20.2	13.0	21.2	4.5	0
<b>Fraction polymérique – F1</b>	24.5	11.2	0	5.5	9.4	15.6	29.0	1.3	3.4
<b>Fraction oligomérique – F2</b>	18.9	7.8	0	7.1	7.0	8.9	41.9	0	8.4
<b>Fraction monomérique – F3</b>	12.9	3.9	0	4.1	44.2	14.1	0	20.8	0

**Tableau 26** : Caractéristiques structurales des rhamnogalacturonanes isolés selon les protocoles A, B et C à partir du son de châtaigne, du marc de pomme et du marc de raisin.

<b>Matière première</b>	<b>Rendement matière % ST/matière première</b>	<b>AU (%)</b>	<b>Rapport Ara/Gal</b>	<b>Rapport GalA/Rha</b>
<b><u>Protocole A</u></b>				
<i>Marc de pomme</i>	11.7	67.3	5.5	6.7
<i>Marc de raisin</i>	1.9	31.0	2.9	1.8
<b><u>Protocole B</u></b>				
<i>Son de châtaigne</i>	0.54	50.5	1.0	1.3
<b><u>Protocole C</u></b>				
<i>Marc de pomme</i>	6.8	69,6	5.3	8.0
<i>Marc de raisin</i>	0.5	36.9	1.8	2.9
<i>Son de châtaigne</i>	0.61	50.0	1.0	2.3



que cette dernière remarque ne constitue un frein pour l'entreprise dans le cadre de sa volonté de développement de son activité phytopolysaccharide. Un dernier aspect mérite sans doute d'être commenté, celui de la variabilité de la matière végétale. L'ensemble des résultats produits au cours de cette étude sont issus de lots de matières premières identiques et homogènes afin d'assurer une bonne comparaison des résultats issus de nos différents protocoles. Toutefois, il convient de garder à l'esprit que les polysaccharides extraits de végétaux ont des caractéristiques variables, souvent incompatibles avec la production d'actifs aux propriétés stables. Les espèces sources sont, en effet, soumises à des aléas climatiques et écologiques qui jouent de manière significative sur la quantité et la qualité des polysaccharides qu'elles produisent. Il est néanmoins possible d'ajuster les protocoles - y compris à une échelle pilote - en jouant sur des paramètres physicochimiques (pH, concentrations, températures, étapes de présolubilisation) et/ou en ayant recours à l'outil enzymatique (carbohydase). Ce dernier aspect a fait l'objet d'une étude technologique spécifique qui n'est pas présentée dans ce mémoire.

### **II.3. Rhamnogalacturonanes de type I et valorisation biologique en dermocosmétique**

#### **II.3.1. Caractéristiques chimiques des rhamnogalacturonanes testés**

Trois matières premières - *son de châtaigne, marc de pomme, marc de raisin* - ont été retenues afin d'en évaluer les propriétés dermocosmétiques selon les protocoles développés et mis en œuvre par le laboratoire de culture cellulaire de l'entreprise SILAB. Pour chacune d'elles, les effets des fractions pectiques brutes et purifiées (macro-, oligo- et monomériques) issues du protocole pilote C seront testées sur une culture cellulaire de kératinocytes. Une synthèse des caractéristiques chimiques de ces fractions est proposée dans les tableaux 27 et 28. De façon globale, les extraits bruts renferment des proportions variables de pectines dépendantes d'éventuelles contaminations par des sucres de réserve ou circulant (amidon, glucose ou saccharose). Les fractions macromoléculaires, plus homogènes parce que purifiées par chromatographie d'exclusion stérique, présentent, pour leur part, les caractéristiques attendues de rhamnogalacturonanes de type I. Enfin, les fractions oligo- et monomériques sont souvent des mélanges d'hydrolysats pectiques contaminés par des sucres neutres issus de la dégradation enzymatique de l'amidon, ou de la présence dans les matières de glucose ou de saccharose.

**Tableau 27 :** Caractérisation des rhamnogalacturonanes isolés selon le protocole pilote C à partir du son de châtaigne, du marc de pomme et du marc de raisin.

	%[AU]	Rendement matière % ST/matière première
<b><u>Son de châtaigne</u></b>		
<i>Fraction pectique brute</i>	8.4	46.4
<i>Fraction polymérique</i>	50,4	0.6
<i>Fraction oligomérique</i>	81,4	1.3
<i>Fraction monosaccharidique</i>	0	44.5
<b><u>Marc de pomme</u></b>		
<i>Fraction pectique brute</i>	69.5	6.8
<i>Fraction polymérique</i>	47.1	3.3
<i>Fraction oligomérique</i>	86.8	2.7
<i>Fraction monosaccharidique</i>	8.5	0.7
<b><u>Marc de raisin</u></b>		
<i>Fraction pectique brute</i>	36.9	23.4
<i>Fraction polymérique</i>	42.9	8.0
<i>Fraction oligomérique</i>	54.6	6.9
<i>Fraction monosaccharidique</i>	34.0	9.1

**Tableau 28 :** Caractérisation des rhamnogalacturonanes isolés selon le protocole pilote C à partir du son de châtaigne, du marc de pomme et du marc de raisin par Chromatographie en Phase gazeuse après méthanolyse et silylation. Valeurs exprimées en % molaire des constituants identifiés ; t = traces.

	Ara	Rha	Fuc	Xyl	Man	Gal	Gal A	Glc	Glc A
<b><u>Son de châtaigne</u></b>									
<i>Fraction pectique brute</i>	t	t	-	-	-	4.0	t	96.0	-
<i>Fraction polymérique</i>	14.6	16.6	0	9.4	1.4	15.0	38.2	2.2	2.5
<i>Fraction oligomérique</i>	6.4	3.6	0	10.2	0.8	1.7	65.9	11.3	0
<i>Fraction monosaccharidique</i>	0	0	0	0	0	0	0	100	0
<b><u>Marc de pomme</u></b>									
<i>Fraction pectique brute</i>	36.4	6.3	0	0	0	6.8	50.5	0	0
<i>Fraction polymérique</i>	29.1	6.0	0	2.5	2.3	3.9	53	1.4	1.7
<i>Fraction oligomérique</i>	10.0	1.9	0	1.2	0	0.5	81.6	0	4.8
<i>Fraction monosaccharidique</i>	34.8	5.9	0	9.7	0.7	20.7	3.5	24.7	0
<b><u>Marc de raisin</u></b>									
<i>Fraction pectique brute</i>	26.2	9.1	0	5.7	20.2	13.0	21.2	4.5	0
<i>Fraction polymérique</i>	24.5	11.2	0	5.5	9.4	15.6	29.0	1.3	3.4
<i>Fraction oligomérique</i>	18.9	7.8	0	7.1	7.0	8.9	41.9	0	8.4
<i>Fraction monosaccharidique</i>	12.9	3.9	0	4.1	44.2	14.1	0	20.8	0

### II.3.2. Propriétés dermocosmétiques des rhamnogalacturonanes

Les résultats biologiques ont été réalisés par le laboratoire de culture cellulaire de l'entreprise SILAB. Dans notre étude préliminaire sur Recoverine, l'extrait de son de châtaigne, nous avons démontré que le rhamnogalacturonane de type I stimulait la synthèse de cadhérine-E, une protéine qui intervient dans le phénomène de régulation de la prolifération et de la différenciation kératinocytaire (Kee & Steiner, 2001). HSP-27 est un autre marqueur de la différenciation kératinocytaire dont l'évolution permet de mesurer les effets des molécules exogènes apportées à la culture cellulaire. C'est ce marqueur qui a été choisi pour évaluer les propriétés dermocosmétiques des fractions pectiques brutes et purifiées (macro-, oligo- et monomériques) isolées à partir du son de châtaigne, ainsi que des marcs de pomme et de raisin sur une culture cellulaire de kératinocytes.

Avant d'être utilisée sur des cultures cellulaires de kératinocytes, une étude de cytotoxicité préalable des rhamnogalacturonanes purifiées par chromatographie d'exclusion stérique (fractions macromoléculaires) a été réalisée pour des concentrations variables comprises entre 0.1 et 10 % (V/V). Les résultats obtenus révèlent que l'extrait de son de châtaigne (Recoverine) est non cytotoxique pour une concentration inférieure ou égale à 2%. Les extraits purifiés à partir des marcs de pomme et de raisin sont, pour leur part, non cytotoxiques pour des concentrations inférieures ou égales à 0.5% (V/V) (tableau 29). Une concentration de 0.5% a été retenue pour poursuivre les tests.

Testés à des concentrations équivalentes de 0,5% (V/V), les trois extraits pectiques bruts induisent une augmentation du taux d'expression du marqueur HSP27 qui traduit une stimulation de la différenciation kératinocytaire (tableau 30 ; figure 60). Cette augmentation est variable en fonction des extraits utilisés et est comprise entre 125 et 156 %. La même analyse, reproduit cette fois avec les rhamnogalacturonanes purifiés par chromatographie d'exclusion stérique (fraction F1 macromoléculaire) fait apparaître des différences sensibles. Avec un taux d'expression d'HSP27 égal à 109%, les rhamnogalacturonanes extraits des marcs de pomme et de raisin n'induisent aucune réponse significative. Le rhamnogalacturonane de son de châtaigne confirme quant à lui sa capacité à stimuler la

---

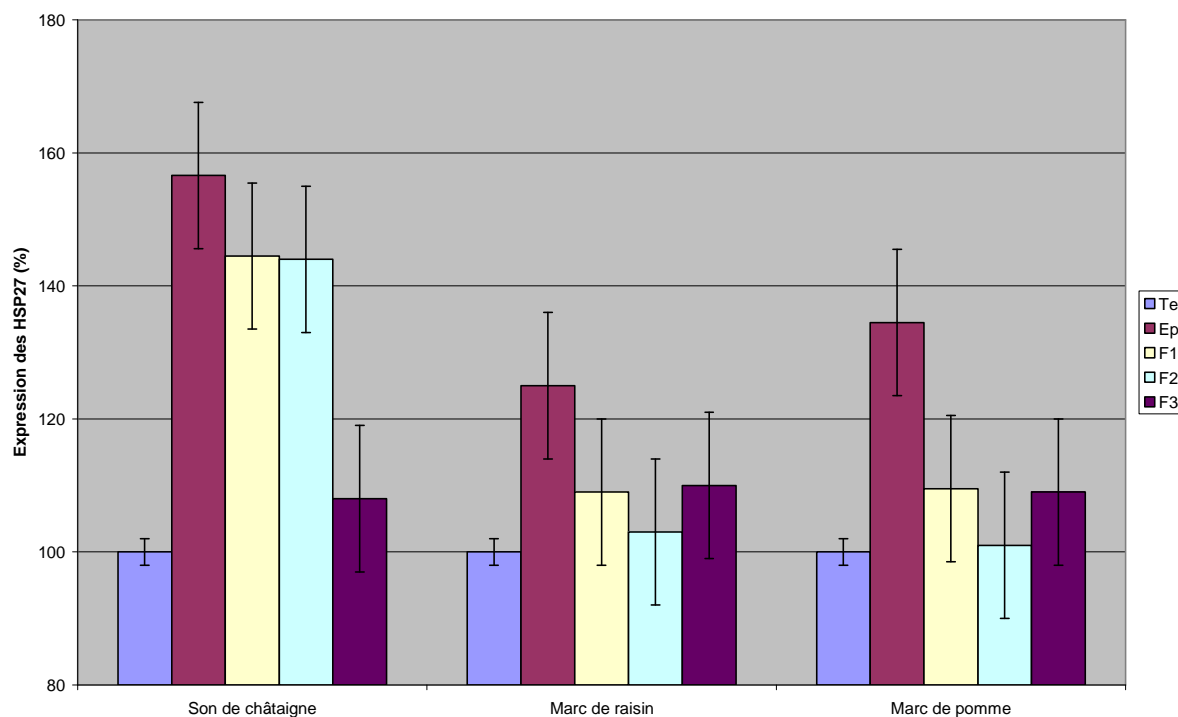
\* Kee S.H., Steinert P.M., Microtubule disruption in keratinocytes induces cell-cell adhesion through activation of endogenous E-cadherin, *Mol. Biol. Cell.*, **2001**, 12, 1983-1993.

**Tableau 29** : Evaluation du potentiel cytotoxique des fractions macromoléculaires de Recoverine, du marc de pomme et du marc de raisin. La viabilité cellulaire est exprimée en %(V/V).

<b>Concentration des fractions macromoléculaires</b>	<b>0,1%</b>	<b>0,25%</b>	<b>0,5%</b>	<b>1%</b>	<b>2,5%</b>	<b>5%</b>	<b>10%</b>
Recoverine®	99	98	100	117	92	78	60
Marc de Pomme	123	130	121	84	13	10	10
Marc de raisin	103	99	100	50	35	20	15

**Tableau 30** : Expression du taux d'HSP27 (moyenne de 2 essais) par une culture de kératinocytes en réponse au contact des extraits pectiques bruts ou purifiés de son de châtaigne, marcs de pomme et de raisin à la concentration de 0,5% (V/V).

Fractions	Moyenne (%)
<b>Témoin</b>	100.0
<b>Son de châtaigne</b>	
<i>Extrait pectique</i>	156,6
<i>Fraction polymérique</i>	144.5
<i>Fraction oligomérique</i>	144.0
<i>Fraction di et monomérique</i>	108.5
<b>Marc de pomme</b>	
<i>Extrait pectique</i>	125.0
<i>Fraction polymérique</i>	109.0
<i>Fraction oligomérique</i>	103.0
<i>Fraction di et monomérique</i>	110.0
<b>Marc de raisin</b>	
<i>Extrait pectique</i>	134,5
<i>Fraction polymérique</i>	109.5
<i>Fraction oligomérique</i>	101.0
<i>Fraction di et monomérique</i>	109.0



**Figure 60** : Expression du taux d'HSP27 (moyenne de 2 essais) par une culture de kératinocytes en réponse au contact des extraits pectiques bruts et purifiés de son de châtaigne, marcs de pomme et de raisin à la concentration de 0,5% (V/V). *Te* : Témoin ; *Ep* : extrait pectique brut ; *F1*, *F2*, *F3* : fraction macro-, oligo- et monomériques isolées par chromatographie d'exclusion stérique à partir de *Ep*.

différenciation kératinocytaire. Le taux d'expression d'HSP27, dans ce cas, atteint une valeur de 144% très proche de celle provoquée par l'extrait pectique brut. Enfin, si l'on excepte la fraction F2 oligomérique du son de châtaigne, les fractions oligo- et monomériques F2 et F3, n'induisent aucune réponse significative. En conclusion, la différenciation des cultures kératinocytaires est bien influencée par les fractions rhamnogalacturoniques ; le taux d'expression du marqueur de différenciation cellulaire HSP27 est par ailleurs modulé par la nature chimique, et donc l'origine des rhamnogalacturonanes testés.

Très peu d'études sont - à *notre connaissance* - accessibles dans la littérature concernant les propriétés biologiques de pectines sur des modèles cellulaires du derme (kératinocytes et fibroblastes). Seuls Deters *et al* (2005 a et b), ont démontré les effets positifs de pectines de kiwi et de kaki sur la prolifération cellulaire, l'activité mitochondriale et la synthèse de collagène, sur des cultures cellulaires de kératinocytes et de fibroblastes, mais aussi sur peau reconstituée. Aux concentrations utilisées, aucun effet cytotoxique ou nécrotique des polysaccharides pectiques testés n'a été constaté par les auteurs. Les extraits pectiques bruts stimulent par ailleurs le *turnover* mitochondrial et augmente la production d'ATP cellulaire. Un effet significatif est aussi enregistré sur la synthèse du collagène. Les auteurs soulignent par ailleurs que les extraits pectiques seraient capables de stimuler la prolifération des kératinocytes et des fibroblastes. Deters *et al* suggèrent que bien plus que la masse moléculaire des pectines, la composition en monosaccharides neutres influencerait les activités biologiques enregistrées. Plus précisément, le pourcentage de rhamnose dans le RG-I pourrait jouer un rôle primordial. Les mêmes auteurs remarquent que les fractions neutres ou acides purifiées à partir des extraits bruts présentent des propriétés similaires sur les lignées de kératinocytes et de fibroblastes. Un tel constat s'oppose à l'idée généralement établie que les polysaccharides anioniques stimuleraient davantage la prolifération cellulaire et seraient capables d'influencer leur activité physiologique (Sagawa *et al*, 2002 ; Gloaguen et Krausz, 2004 ). Afin de préciser le mode d'action des fractions neutres, Deters *et al* (2005) ont

---

\* Deters A.M., Schröder K.R., Hensel A., Kiwi fruit polysaccharides exert stimulating effects on cell proliferation via enhanced growth factors, energy production, and collagen synthesis of human keratinocytes, fibroblasts and skin equivalents, *J. Cell. Physiol.*, **2005**, 202, 717-722.

\* Deters A.M., Lengsfeld C., Hensel A., Oligo- and polysaccharides exhibit a structure dependent bioactivity on human keratinocytes in vitro, *J. Ethnopharmacol.*, **2005**, 102, 391-399.

\* Sagawa H., Sakai T., Kobayashi E., Li T.P., Ohnogi H., Nishimura K., Nishiyama E., Wu H.K., Mizutani S., Kato I., **2002**, European Patent application, EP 1175907A1.

\* Gloaguen V., Krausz P., Barrier function and dry skin : Use of rhamnogalacturonans as a new therapeutic strategy, *Söwif Journal*, **2004**, 130, 20-26.

choisi de mettre en œuvre une *exo- $\alpha$ -L-arabinase*. Cette dernière, en éliminant l'arabinose situé en position terminale des chaînes latérales d'AG-II, réduit de façon significative la prolifération des fibroblastes et des kératinocytes. Une telle démonstration indique une nouvelle fois, tout comme cela était déjà le cas pour l'arabinogalactane d'*Angelica acutiloba* (Yamada & Kiyohara, 1999), que du point de vue structural, l'arabinose terminal pourrait être considéré comme un pré requis nécessaire à l'expression de l'activité biologique. Elle peut également expliquer que les fractions neutres et acides présentent, sur de mêmes modèles cellulaires, des propriétés biologiques similaires puisque chacune de ces fractions comportent, à des teneurs variables, des AG-II.

La variabilité des propriétés observées sur modèle kératinocytaire dans le cas des rhamnogalacturonanes testés dans notre étude ne peut trouver d'explication que dans la nature chimique de ces derniers. Le rhamnogalacturonane de marc de pomme, dont la zone hérissée est exclusivement constituée d'arabinanes (Renard, 1989), ne stimule pas la différenciation kératinocytaire. Il serait alors tentant de suggérer que seules les zones hérissées composées d'arabinogalactanes puissent déclencher une réponse biologique. Malheureusement, avec des zones hérissées dont la composition chimique est caractéristique d'arabinogalactanes, les rhamnogalacturonanes de marc de raisin et de son de châtaigne présentent pourtant des propriétés très différentes. Toutefois, le rhamnogalacturonane de son de châtaigne comporte 2 à 3 fois plus de rhamnose ce qui, ainsi que le suggèrent Deters *et al.* (2005), pourrait avoir une influence positive. La nature des arabinogalactanes (type I ou II) rejetés en position latérale des rhamnogalacturonanes est un autre aspect à considérer. Paulsen et Barsett (2005) dans leur revue bibliographique sur les pectines suggèrent en effet que les RG-I bioactifs sont souvent associés à des arabinogalactanes de type II.

---

\* Yamada H., Kiyohara H., Complement-activating polysaccharides from medicinal herbs, In: Wagner H. (Ed), *Immunomodulatory Agents from Plants*, Basel, Switzerland: Birkhauser Verlag, **1999**, 161–202.

\* Renard C., Etudes des polysaccharides pariétaux de la pomme extraction et caractérisation par des méthodes chimiques et enzymatiques, thèse de l'université de Nantes, **1989**, pp 152.

\* Deters A.M., Schröder K.R., Hensel A., Kiwi fruit polysaccharides exert stimulating effects on cell proliferation via enhanced growth factors, energy production, and collagen synthesis of human keratinocytes, fibroblasts and skin equivalents, *J. Cell. Physiol.*, **2005**, 202, 717-722.

\* Deters A.M., Lengsfeld C., Hensel A., Oligo- and polysaccharides exhibit a structure dependent bioactivity on human keratinocytes in vitro, *J. Ethnopharmacol.*, **2005**, 102, 391-399.

\* Paulsen B.S., Barsett H., Bioactive pectic polysaccharides, *Advances Polymers Sciences*, **2005**, 186, 69-101.

Cette orientation récente de notre étude nous a incité à engager une démarche d'analyse structurale plus fine de la structure des rhamnogalacturonanes afin d'obtenir des informations complémentaires concernant notamment la nature AG-I ou AG-II des zones hérissées des RG-I mais aussi la proportion et la distribution des arabinoses périphériques. Chacune des fractions macromoléculaires a été *perméthylée*, hydrolysée et acétylée afin de pouvoir être analysée par GC-MS en mode impact électronique. Les analyses sont actuellement en cours au laboratoire de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UMR CNRS 8576) de l'Université des Sciences et Technologies de Lille. Les résultats seront prochainement disponibles. Ils viendront compléter notre argumentaire et enrichir la discussion sur l'origine moléculaire des propriétés biologiques des dérivés pectiques sur les cellules du derme.



## **CHAPITRE II : 2<sup>ème</sup> partie**

Extraction et analyse structurale du zosteran,  
l'apiogalacturonane synthétisé par *Zostera marina*

## CHAPITRE II : 2<sup>ème</sup> partie

### Extraction et analyse structurale du zosteran, l'apiogalacturonane synthétisé par *Zostera marina*

Comme l'a démontré la partie précédente consacrée de façon spécifique au rhamnogalacturonane de type I, les pectines regroupent trois grandes catégories d'hétéropolysaccharides acides organisées en trois domaines moléculaires principaux. Si les références sont nombreuses concernant les structures et les rôles biologiques de l'HG, du RG-I et du RG-II, les données relatives aux galacturonanes substitués sont, pour leur part, plus rares. C'est notamment le cas pour l'apiogalacturonane. A notre connaissance, un tel galacturonane substitué n'a été isolé que d'un nombre très limité de plantes. Le « *lemnane* » est l'un d'entre eux, il est extrait de *Lemna minor L.*, la lentille d'eau. Les méthodes qui conduisent à son extraction et à sa composition chimique sont bien documentées dans la littérature (Kindel *et al.*, 1995 ; Cheng et Kindel, 1997 ; Golovchenko *et al.*, 2002). Les applications proposées pour lui sont nombreuses. Elles concernent les domaines médicaux, pharmaceutiques et cosmétiques (Ovodova *et al.*, 2000 ; Khasina *et al.*, 2003 ; Popov *et al.*, 2006 ; Popov *et al.*, 2006 ; Dal Farra *et al.*, 2003). Cette dernière remarque constitue bien évidemment un frein pour la poursuite de notre étude. La structure du *lemnane* repose sur une chaîne principale d'acides  $\alpha$ -1,4-D-galacturoniques substitués par des chaînes latérales courtes de résidus d'apiose (figure 62, Golovchenko *et al.*, 2002) donnant à cette molécule un aspect chevelu (« hairy region ») caractéristique aux molécules pectiques.

---

\* Kindel P. K., Cheng L., Ade, B. *Phytochem.* **1995**, 41, 719-723.

\* Cheng, L., Kindel P. K., Detection and homogeneity of cell wall pectic polysaccharides of *Lemna minor L.*, *Carbohydr. Res.*, **1997**, 301(3-4), 205-212.

\* Golovchenko V.V., Ovodova R.G., Shashkov A.S., Ovodov Y.S., Structural studies of the pectic polysaccharide from duckweed *Lemna minor L.*, *Phytochemistry*, **2002**, 60, 89-97.

\* Ovodova R. G., Golovchenko V. V., Shashkov A. S., Popov S., Ovodov Y. S., Structural studies and physiological activity of lemnan, a pectin from *Lemna minor L.*, *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2000**, 26, 669-676.

\* Khasina E. I., Sgrebneva M., Ovodova R. G., Golovchenko V. V., Ovodov Y. S., Gastroprotective effect of lemnan, a pectic polysaccharide from *Lemna minor L.*, *Doklady Biol. Sci.* **2003**, 390, 204-206.

\* Popov S. V., Golovchenko V. V., Ovodova R. G., Smirnov V. V., Khramova D. S., Popova G. Y., Ovodov Y. S., Characterization of the oral adjuvant effect of lemnan, a pectic polysaccharide of *Lemna minor L.*, *Vaccine* **2006**, 24, 5413-5419.

\* Popov S. V., Ovodova R. G., Ovodov Y. S., Effect of Lemnan, pectin from *Lemna minor L.*, and its fragment on inflammatory reaction, *Phytother. Res.*, **2006**, 20, 403-407.

\* Dal Farra C., Domloge N., Peyronnel D., **2003**, brevet n°FR2838962.

A la fin des années soixante, une autre plante aquatique *Zostera marina* L., la zostère marine, a attiré l'attention d'Ovodova *et al.*, 1968 ; Ovodova *et al.*, 1969 ; Ovodov *et al.*, 1971 ; Ovodov *et al.*, 1971. Sur la base des informations bibliographiques disponibles, cette plante produit un dérivé pectique riche en apiose, le « zosteran ». Au début de notre étude cette source naturelle était libre d'exploitation et a servi de modèle pour la suite de nos recherches.

#### **II.4. Extraction, purification et caractérisation chimique du zosteran, l'apiogalacturonane de *Zostera marina* L.**

Le protocole employé pour extraire le galacturonane riche en apiose produit par *Z. marina* est présenté en figure 61. Il a été adapté des protocoles proposés par Ovodova *et al.* (2000) et Popov *et al.* (2006). L'approche utilisée pour notre étude repose sur une extraction dans l'eau en présence d'un chélateur de calcium, suivie de l'utilisation d'une carbohydrase et d'une précipitation éthanolique. Extrait par l'oxalate d'ammonium, un chélateur de calcium, l'extrait brut ( $Z_c$ ) représente une proportion significative de la biomasse atteignant 11 % de la matière sèche. L'analyse de la composition monosaccharidique de  $Z_c$  par chromatographie en phase gazeuse des méthylglycosides triméthylsilylés indique la présence caractéristique et significative, d'apiose (21 % molaire) et d'acide galacturonique (26.3% molaire) soit près de la moitié de la composition monosaccharidique du zosteran (tableau 31). Une telle composition est typique d'un galactane substitué de la famille de l'apiogalacturonane. L'apiose ou le 3-C-(hydroxyméthyl)-D-glycero-tetrose est un monosaccharide rare chez les végétaux (figure 63) et à ce titre n'est pas disponible dans le commerce. Il présente, dans nos conditions opératoires, deux temps de rétention caractéristiques à 19.03 et 19.74 min (figure 64). Malheureusement, comme l'indiquent Doco *et al.* (2001) dans leur étude sur le

---

\* Ovodova R. G., Vas'Kovskii V. E., Ovodov Y. S., The pectic substances of *Zosteraceae*, *Carbohydr. Res.*, **1968**, 6, 328-332.

\* Ovodova R. G., Ovodov Y. S., **1969**, Pectic substances *Zosteraceae* II, *Carbohydr. Res.*, 10, 387-390.

\* Ovodov Y. S., Mikheiskaya L. V., Ovodova R. G., Krasikova I. N., Pectic substances of *zosteracea*. IV. Pectinase digestion of *zosterine*, **1971**, *Carbohydr. Res.*, 18,311-318.

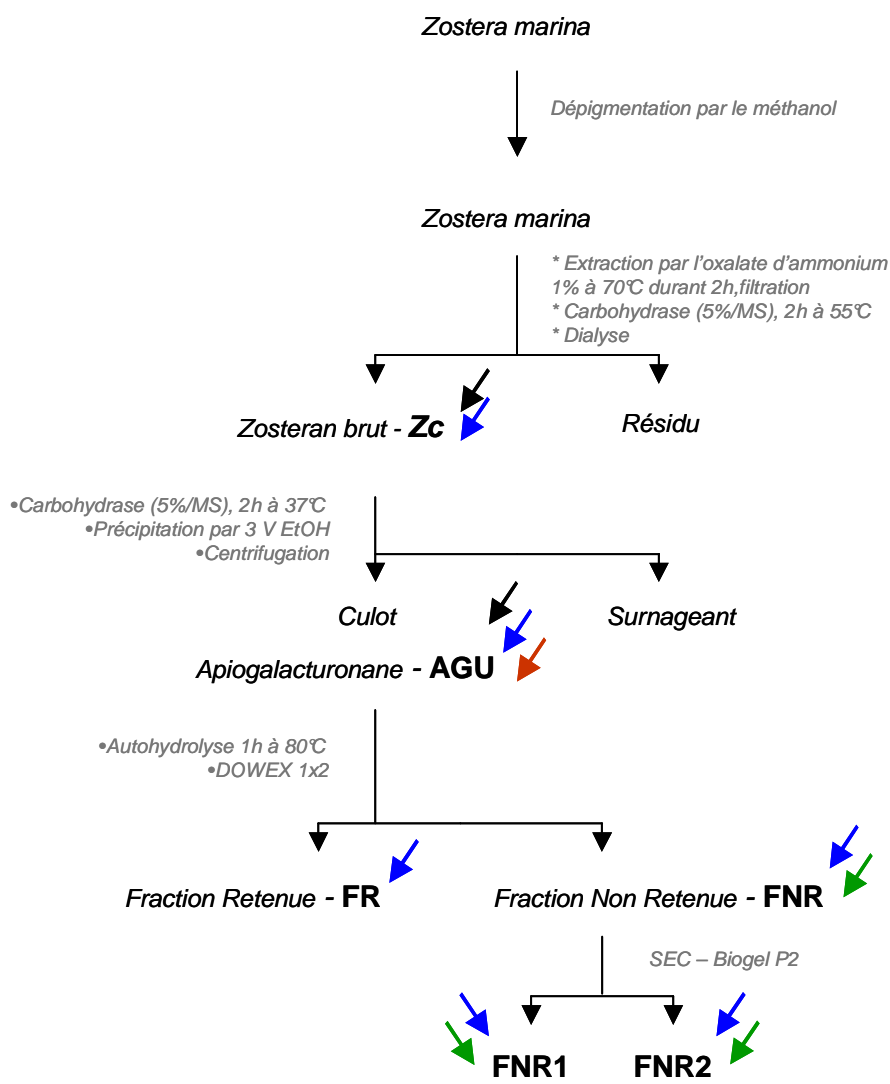
\* Ovodov Y. S., Mikheiskaya L. V., Ovodova R. G., Krasikova I. N., Pectic substances of *zosteraceae*. V. Smith degradation of *zosterine*, **1971**, *Carbohydr. Res.*, 18, 319-322.

\* Ovodova R. G., Golovchenko V. V., Shashkov A. S., Popov S., Ovodov Y. S., Structural studies and physiological activity of lemnan, a pectin from *Lemna minor* L., *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2000**, 26, 669-676.

\* Popov S. V., Ovodova R. G., Ovodov Y. S., Effect of Lemnan, pectin from *Lemna minor* L., and its fragment on inflammatory reaction, *Phytother. Res.*, **2006**, 20, 403-407.

\* Doco T., O'Neill M.A., Pellerin P., Determination of the neutral and acidic glycosyl residue compositions of plant polysaccharides by GC-EI-MS analysis of trimethylsilyl methyl glycoside derivatives, *Carbohydrates Polymers*, **2001**, 46, 249-259.

RG-II, les spectres de masse générés en mode impact électronique à partir des méthylglycosides triméthylsilylés issus de composés pectiques ne présentent pas d'ions caractéristiques qui permettraient de distinguer l'apiose des autres pentoses, l'arabinose en particulier. De plus, si qualitativement l'identification de l'apiose est possible par cette analyse, les conditions chromatographiques employées au laboratoire conduisent à un recouvrement partiel d'un des pics caractéristiques de l'apiose avec l'un des pics caractéristiques de l'arabinose, rendant délicate l'évaluation quantitative de la représentativité de l'apiose dans un extrait pectique. Comparée à Z<sub>c</sub>, la composition de l'extrait Z isolé en conditions pilotes selon les méthodologies propres à la société SILAB, est elle aussi caractéristique d'un apiogalacturonane comme en témoignent les teneurs élevées en apiose et en acide galacturonique (tableau 31).



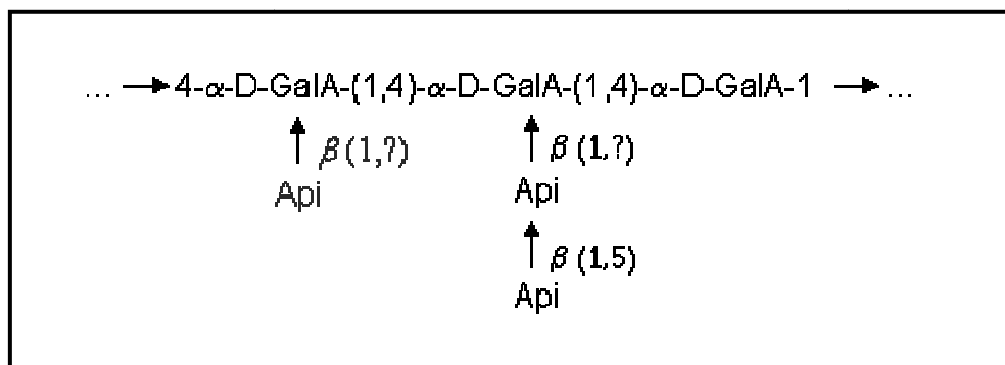
### Type d'analyses réalisées

- Dosages des oses neutres, des acides uroniques et des sucres réducteurs
- Analyse de la composition monosaccharidique par CPG
- Analyse par SEC-HPLC
- Analyse par RMN

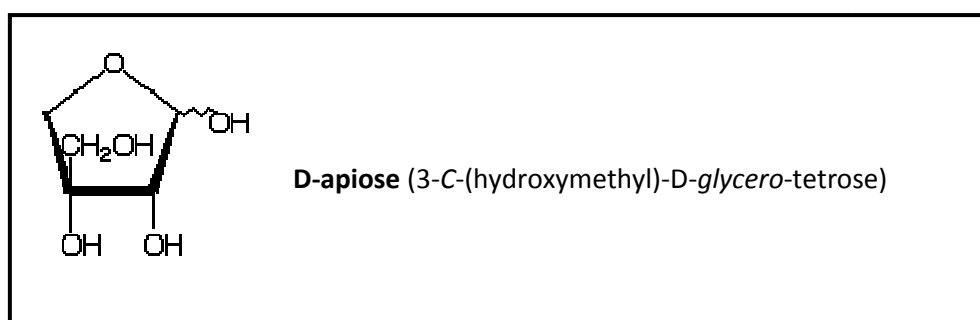
**Figure 61** : Protocole d'extraction du zosteran, adapté d'Ovodova *et al.* (2000) et de Popov *et al.* (2006).

\* Ovodova R.G., Golovchenko V.V., Shashkov A.S., Popov S.V., Ovodov Y.S., Structural studies and physiological activity of lemnan, apectin from *Lemna minor* L., *Russian J. Bioorgan. Chem.*, **2000**, 26, 669-676.

\* Popov S. V., Ovodova R. G., Ovodov Y. S., Effect of Lemnan, pectin from *Lemna minor* L., and its fragment on inflammatory reaction, *Phytother. Res.*, **2006**, 20, 403-407.

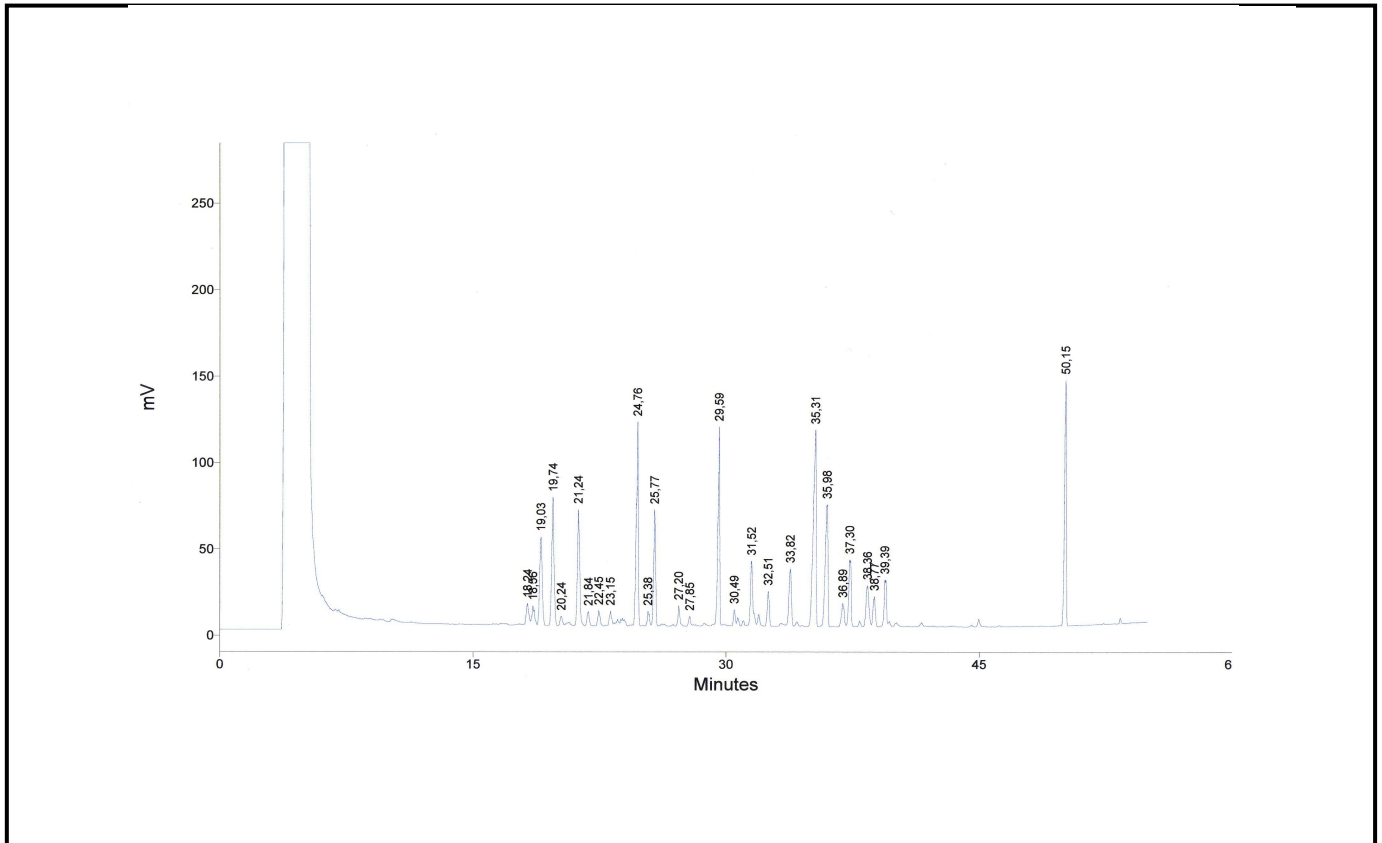


**Figure 62:** Modèle structural hypothétique de l'apiogalacturonane, schéma adapté de Golovchenko *et al.*, 2002.



**Figure 63 :** Structure chimique du D-apiose.

\* Golovchenko V.V., Ovodova R.G., Shashkov A.S., Ovodov Y.S., Structural studies of the pectic polysaccharide from duckweed *Lemna minor* L., *Phytochemistry*, **2002**, 60, 89-97.



**Figure 64:** Analyse en chromatographie en phase gazeuse des dérivés méthylglycosides triméthylsilylés du zosteran. Les temps de rétention caractéristiques de l'apiose, en comparaison avec le méso-inositol utilisé comme étalon interne, sont indiqués par des flèches.

**Tableau 31 :** Composition monosaccharidique du zosteran et de ses fractions purifiées. Les valeurs sont exprimées en % molaire des constituants. T : traces.

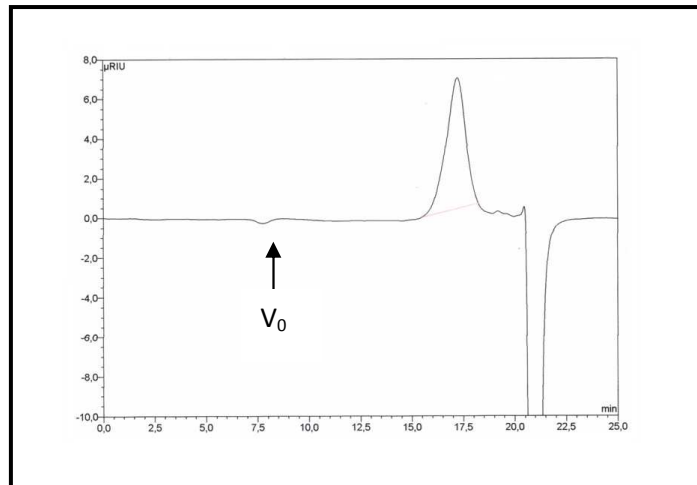
*Z* : zosteran issu des chaînes de production de la société SILAB ; *Zc* : zosteran brut ; *AGU* : apiogalacturonane purifié ; *FNR* : fraction neutre non retenue par chromatographie d'échange d'anions ; *FR* : fraction acide retenue par chromatographie d'échange d'anions.

	Me-Xyl	Api	Ara	Rha	Fuc	Xyl	GalA	Man	Gal	Glc	GlcA
<b>Z</b>	T	21.3	6.7	6.7	1.5	14.5	35.5	0.2	3.8	5.8	4.0
<b>Z<sub>c</sub></b>	T	21.0	3.4	9.4	4.6	17.4	26.3	1.0	5.8	7.2	3.9
<b>AGU</b>	T	53.5	1.9	3.6	1	5.4	30.5	0.2	1.9	0.8	1.2
<b>FNR</b>	T	100	0	0	0	T	0	0	0	0	0
<b>FR</b>	0	T	0	0.8	0	4.2	92.3	0	0.9	1.8	0
<b>FNR1</b>	T	100	0	0	0	T	0	0	0	0	0
<b>FNR2</b>	T	100	0	0	0	T	0	0	0	0	0



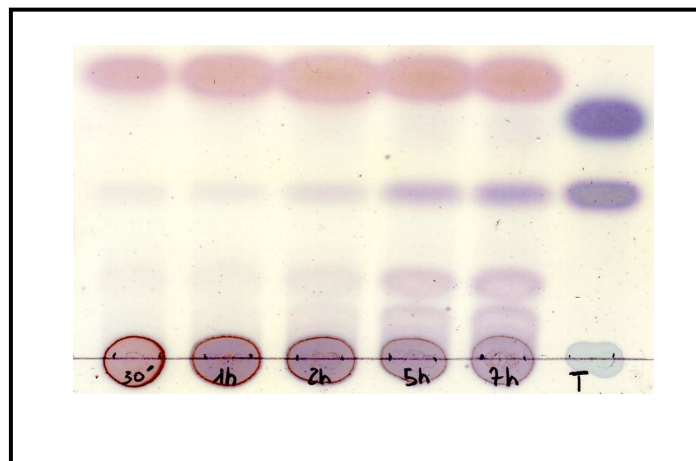
L'utilisation d'une carbohydrase suivi d'une précipitation éthanolique permet de recueillir une fraction enrichie en apiose (AGU) contenant 53.5% d'apiose et 30.5% d'acide galacturonique (Tableau 31). La présence de quantités d'apiose supérieure à celles d'acide galacturonique ne peut être expliquée par ailleurs que par la présence de chaînes latérales d'oligoapiose ou une disubstitution des acides galacturoniques. L'homogénéité de cette fraction a par ailleurs été contrôlée par HPLC sur colonne d'exclusion stérique de type Aquagel-OH (figure 65). Enfin, le rapport de la quantité de sucres réducteurs sur la quantité de sucres totaux obtenus par dosages colorimétriques suggère que le degré de polymérisation de la fraction AGU est égale à 25 ce qui produit, d'un point de vue théorique, une masse moléculaire d'environ 4100 Da.

La fraction AGU présente une très faible résistance à l'autohydrolyse comme en témoigne la cinétique réalisée à 100°C après passage sur résine échangeuses de cations Amberlite IR-120. La chromatographie couche mince présentée en figure 66 suggère la libération rapide de monosaccharides dont la valeur de  $R_f$  est supérieure à celle de l'arabinose, suivie, pour des temps supérieurs, d'une fragmentation de la chaîne principale de nature homogalacturonique produisant des oligogalacturonides à la couleur bleu-violacé caractéristique. Sur la base de cette cinétique, nous avons sélectionné la durée d'une heure comme condition standard pour reproduire de façon quantitative l'autohydrolyse afin de séparer par chromatographie d'échange d'anions sur DOWEX 1x2 une fraction neutre, non retenue, exclusivement composée d'apiose (FNR ; tableau 31), d'une fraction acide, retenue par la résine et riche en GalA (FR, tableau 31). Déposée sur chromatographie d'exclusion stérique basse pression de type Biogel P2, la fraction FNR produit deux sous fractions homogènes FNR1 et FNR2, composées majoritairement d'apiose (tableau 31). Ces deux dernières fractions ont fait l'objet d'une étude par spectroscopie RMN.



**Figure 65** : Séparation de la fraction AGU par HPLC sur colonne d'exclusion stérique de type Aquagel-OH.

*Eluant  $\text{NaNO}_3$  50 mM ; détecteur IR ; débit  $1\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ .*



**Figure 66** : Cinétique d'autohydrolyse du zosteran purifié (AGU) de 30 minutes à 7 heures.

*Solvant* : BuOH/Acide acétique/ $\text{H}_2\text{O}$  dans les rapports 2/1/1 V/V/V. *T* : témoin (de bas en haut) : GalA et Ara.

## II .4.1. Analyse structurale du zosteran

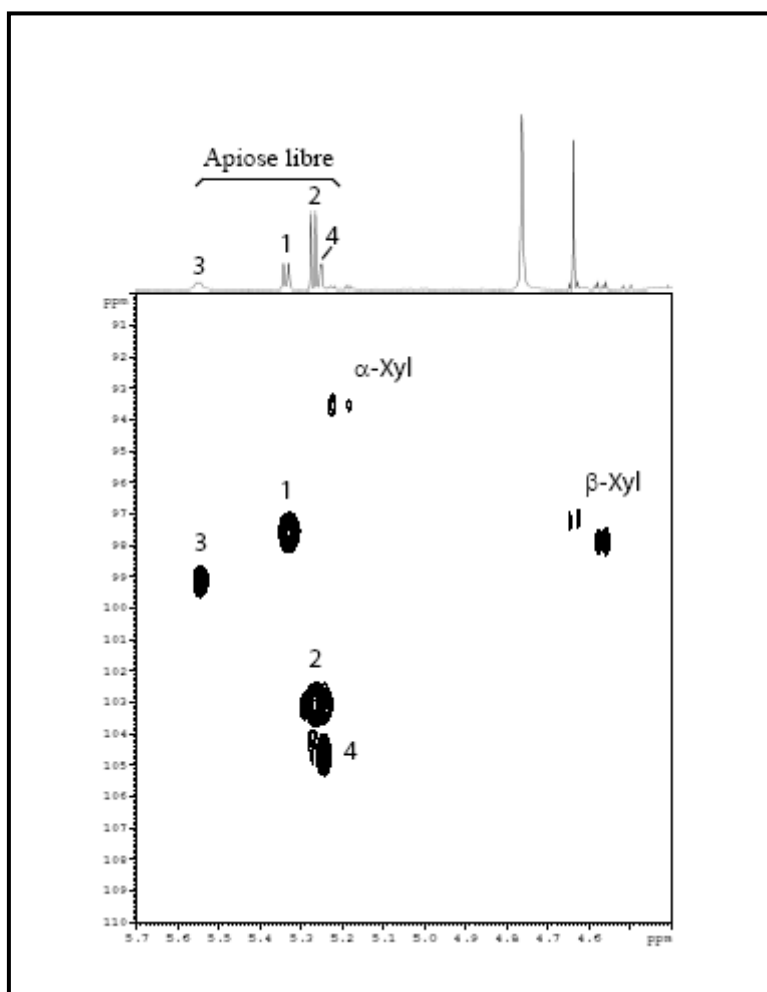
Les fractions FNR1 et FNR2 recueillies par chromatographie d'exclusion stérique sur biogel P2 ont été analysées, dans le D<sub>2</sub>O à 300°K, par RMN homonucléaires <sup>1</sup>H mono- et bi-dimensionnelles ainsi que par RMN hétéro-nucléaires <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC découplées et non-découplées. La réalisation et l'interprétation des spectres RMN ont été effectuées par le Docteur Yann Guerardel du Laboratoire de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UMR CNRS 8576) de l'Université des Sciences et Technologies de Lille.

Le spectre <sup>1</sup>H-RMN de la fraction FNR2 (figure 67) contient quatre signaux majeurs dans la zone des protons anomériques directement attribuables à des anomères de monosaccharides. Les paramètres RMN des carbones ont été déterminés par <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC (figure 67), tandis que les constantes de couplage <sup>1</sup>J<sub>C1,H1</sub> ont été déterminées par <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC non découplés (tableau 32). Les données enregistrées sont conformes avec la présence d'apiose libre majoritaire. Par ailleurs, ce pentose se caractérise par sa capacité à générer en solution quatre formes furanosiques différentes : deux formes de configuration D (figure 68 : molécules 1 et 2) et deux formes de configuration L (figure 68 : molécules 3 et 4). L'abondance relative de ces quatre composés est très similaire à celle observée précédemment (Snyder et Serianni, 1987). L'ensemble des données prouve que l'apiose présent dans l'échantillon est uniquement sous forme monomérique dans le mélange. D'autres signaux minoritaires sont attribuables à des résidus β-Xyl et α-Xyl, laissant présager la présence de résidus de xylose libres dans l'échantillon. Enfin, un signal intense correspondant à un groupement *O*-Me a également été identifié, pouvant partiellement expliquer la multiplicité des signaux anomériques attribués aux Xyl : Xyl et 2-*O*-Me-Xyl se différencieraient dans ces conditions.

Le spectre <sup>1</sup>H-RMN de la fraction FNR1 (figure 69) se caractérise par la présence de trois massifs de signaux hétérogènes à 5.3 (a), 5.6 (b) et 5.8 (c) ppm. Leurs carbones correspondants sont tous observés entre 103 et 104 ppm. (a) est composé d'au moins trois doublets distincts dont les paramètres sont similaires à la forme majoritaire 3-*C*-(hydroxyméthyl)-β -erythrofurano-**(2)** de l'apiofurano-**(2)**. L'absence des trois autres formes minoritaires suggère que l'apiofurano-**(2)** en position terminale réductrice d'un oligo-apiose se stabilise sous sa forme 3-*C*-(hydroxyméthyl)-β -erythrofurano-**(2)**. La multiplicité des signaux

---

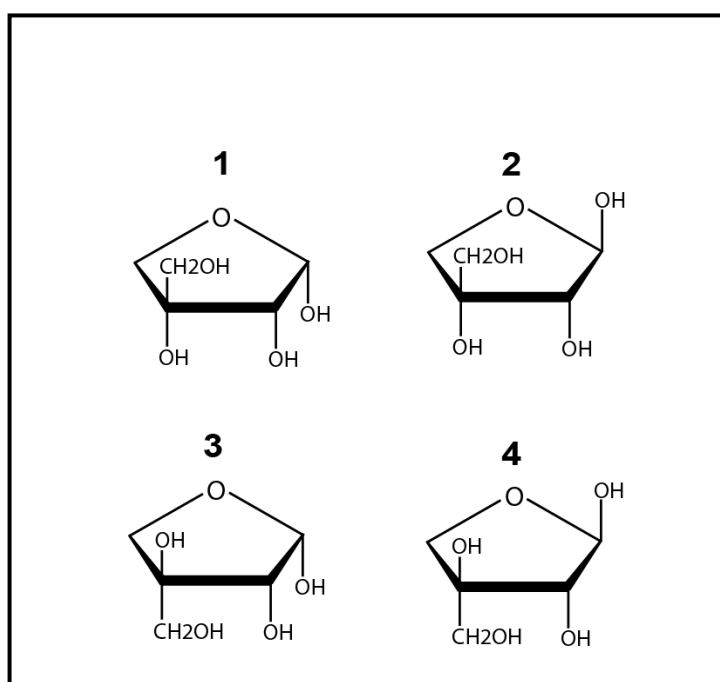
\* Snyder JR, Serianni AS., DL-apiose substituted with stable isotopes: synthesis, n.m.r.-spectral analysis, and furanose anomerization, *Carbohydr Res.*, **1987**, 166(1), 85-99.



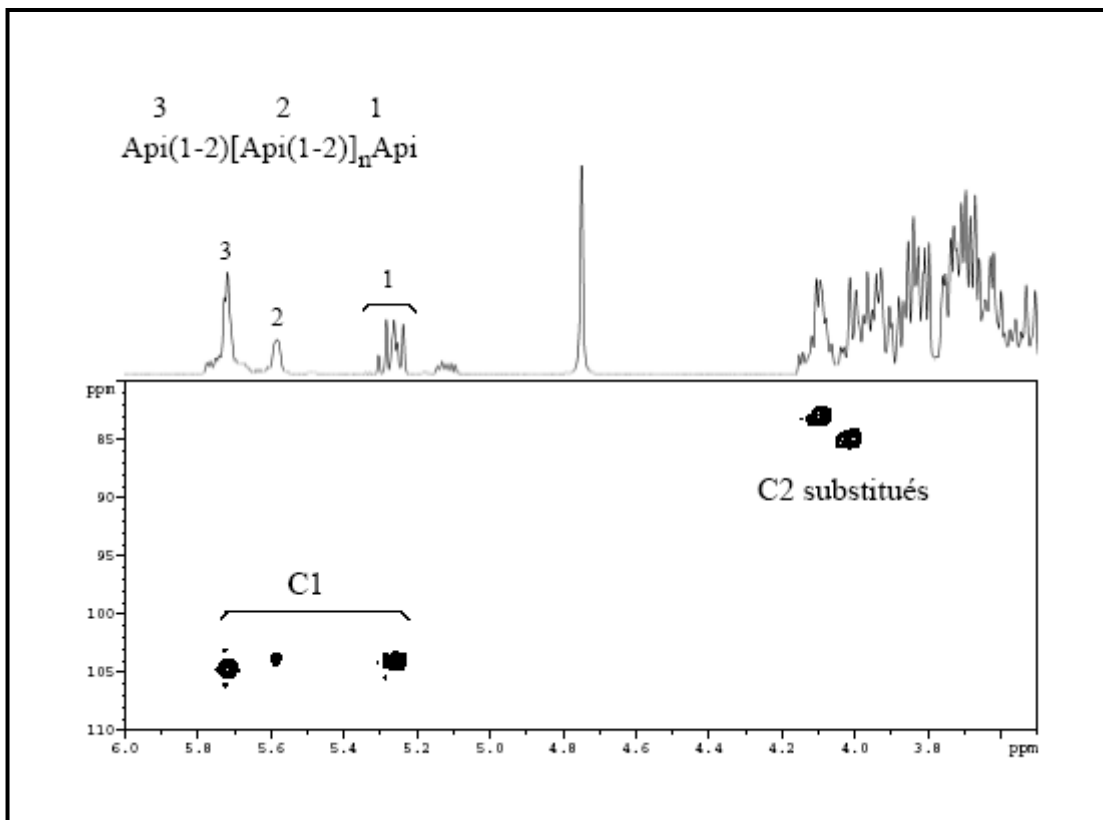
**Figure 67** : Spectre  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC de la fraction FNR2.

**Tableau 32** : Déplacements chimiques des protons et des carbones 13 (ppm) des quatre formes furanosiques de l'apiose.

Composés	Rapport $^1\text{H}$	$^1\text{H}$	$^3J_{\text{H1,H2}}$	$^{13}\text{C}$	$^1J_{\text{C1,H1}}$
<b>1</b>	1	5.34	4.8	97.6	172
<b>2</b>	2	5.27	4.5	103.1	171
<b>3</b>	0.5	5.55	3.8	99.1	173
<b>4</b>	1	5.24	1.32	104.7	171



**Figure 68** : Les quatre formes furanosiques de l'apiose en solution.

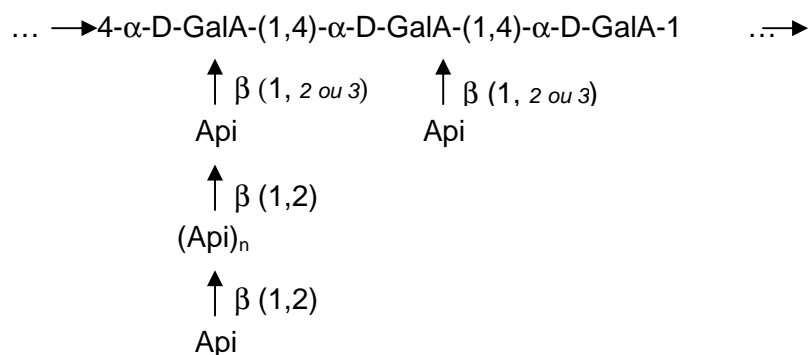


**Figure 69** : Spectre  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC de la fraction FNR1.

dans le massif laisse de plus présager la présence d'un mélange d'oligo-apiooses de longueurs différentes qui induiraient une multiplication des signaux anomériques du monosaccharide réducteur. Les deux massifs (b) et (c), très déblindés, seraient attribués dans ces conditions aux apiofuranoses en positions interne et terminale non réductrice, en accord avec la présence de chaînes d'oligo-apiooses. Enfin, deux signaux observés à 4.05/83.5 et 4.15/82 ppm en  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC indiquent la présence de substitutions en position C-2, suggérant que les chaînes d'oligo-apiooses sont substituées en position 2.

L'absence de données bibliographiques relatives à une telle structure ne nous permet pas, en l'état, d'attribuer de façon définitive les signaux observés. Des purifications et des analyses supplémentaires sont encore nécessaires et en particulier, les connectivités  $^3J_{\text{H,C}}$  des signaux qui pourront être observées par des expériences hétéronucléaires  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  de type HMBC et complétées par des expériences homonucléaires  $^1\text{H}/^1\text{H}$  NOESY. Enfin, tout en la complétant, une étude de la fragmentation spécifique par spectrométrie de masse en tandem devrait permettre l'établissement de conclusions définitives.

Pour conclure, la digestion par une endopolygalacturonase du zosteran produit une fraction résistante (AGU) dont la composition monosaccharidique est caractéristique d'un apiogalacturonane ainsi qu'un mélange d'acides galacturoniques et d'oligogalacturonides révélant la présence d'un homogalacturonane typique des chaînes principales pectiques. L'autohydrolyse du zosteran suggère que les résidus d'apiose ou d'oligoapiose sont rejetés en position latérale de l'homogalacturonane, probablement en C-2 ou C-3 qui seraient devenus les seuls carbones substituables. Nous proposons donc la structure hypothétique suivante comme base de l'architecture de l'apiogalacturonane de *Zostera marina* :



Des résultats similaires ont été obtenus par Ovodov *et al.* (1971) avec le *lemnane*, l'apiogalacturonane produit par les lentilles d'eau. Cependant, dans ce cas, la structure proposée par Golovchenko pour les chaînes latérales (Golovchenko *et al.*, 2002) repose sur l'apiodisaccharide  $\beta$  Api - (1→5) -  $\beta$  Api -(1→... dont la structure est très différente de l'oligoapiose  $\beta$  Api - (1→2)<sub>n</sub> -  $\beta$  Api - (1→... proposé pour le zosteran confirmant par la même occasion l'originalité de cette structure décrite, à notre connaissance, pour la première fois. Enfin, il est intéressant de noter la présence de xylose et de méthyl-xylose obtenu avec l'apiose libre dans les mêmes conditions opératoires pouvant suggérer une relation étroite des deux classes de galacturonanes substitués - apio et xylogalacturonane. Un certain nombre de questions restent toutefois sans réponse, elles concernent :

- La nature des branchements sur le galacturonane ;
- La proportion de mono-substitutions par l'apiose ;
- La nature du degré de polymérisation des chaînes d'oligo-apiose et leur variabilité ;
- La distribution des chaînes latérales sur le galacturonane.

---

\* Ovodov Y. S., Mikheiskaya L. V., Ovodova R. G., Krasikova I. N., Pectic substances of zosteracea. IV. Pectinase digestion of zosterine, **1971**, *Carbohydr. Res.*, 18, 311-318.

\* Golovchenko V.V., Ovodova R.G., Shashkov A.S., Ovodov Y.S., Structural studies of the pectic polysaccharide from duckweed *Lemna minor* L., *Phytochemistry*, **2002**, 60, 89-97.



## II.5. Evaluation des propriétés pharmacodynamiques du zosteran : application en oncologie cellulaire et moléculaire.

Ainsi qu'en témoigne le tableau 5 présenté dans le chapitre I, les propriétés thérapeutiques des pectines ont été signalées par de nombreux auteurs. Bénéficiant d'un partenariat privilégié avec le Laboratoire d'Oncologie Cellulaire et Moléculaire (EA 3410) de l'Université de Paris 13, nous avons souhaité engager une étude prospective des effets pharmacodynamiques des fractions AGU et FR dérivés de l'apiogalacturonane sur la prolifération de lignées de cellules cancéreuses. Les tests biologiques ont été réalisés par Mr Kraemer et Mme Sainte-Catherine, Laboratoire d'Oncologie Cellulaire et Moléculaire. Parmi les lignées cellulaires disponibles, la lignée A431 - issue d'un épiderme vulvaire - a retenu notre attention. Les cellules A431 représentent en effet un bon modèle de tumeur agressive, angiogénique et métastatique (Di Benedetto *et al.*, 2003 ; Guenin *et al.*, 2005 ; Hamma-Kourbaly *et al.*, 2003). Elles sont caractérisées par ailleurs par un taux élevé de récepteurs de facteurs de croissance (EGFR) et produisent des quantités importantes de facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) (Myoken *et al.*, 1991) qui favorisent la neovascularisation et l'angiogénèse (Melnyk *et al.*, 1996). L'augmentation de l'expression des EGFR rend les cellules A431 moins dépendantes d'une source exogène de facteur de croissance épidermique (EGF) et favorise leur prolifération contribuant ainsi à la migration des cellules malignes (Malliri *et al.* 1998).

---

\* Di Benedetto M., Starzec A., Vassy R., Perret GY., Crepin M., Kraemer M., Inhibition of epidermoid carcinoma A 431 cell growth and angiogenesis in nude mice by early and late treatment with a nouvel dextran derivative, *Br J Cancer.*, **2003**, 88,1987-1994.

\* Guenin E., Ledoux D., Oudar O., Lecouvey M., Kraemer M., Structure-activity relationships of new class of aromatic bisphosphonates that inhibit tumor cell prolifération in vitro, *Anticancer Res.* **2005**, 25,1139-1145.

\* Hamma-Kourbali Y., Di Benedetto M., Ledoux D., Oudar O., Leroux Y., Lecouvey M., Kraemer M., A novel non containing-nitrogen bisphosphonate inhibits both in vitro and in vivo angiogenesis, *Biochem Biophys Res Commun.* **2003**, 310, 816-23.

\* Myoken Y., Kayada Y., Okamoto T., Kan M., Sato G. H., Sato J. D., Vascular endothelial cell growth factor (VEGF) produced by A 431 human epidermoid carcinoma cells and identification of VEGF membrane binding sites, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **1991**, 88, 5819-5823.

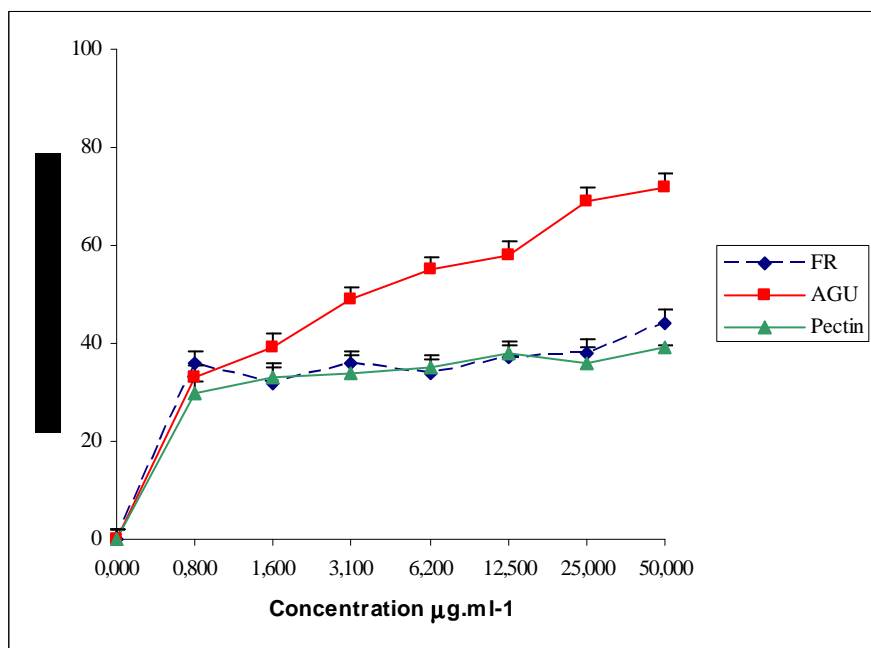
\* Melnyk O., Shuman M.A., Kim K.J., Vascular endothelial growth factor promotes tumor dissemination by a mechanism distinct from its effect on primary tumor growth, *Cancer Res.*, **1996**, 56, 921-924.

\* Malliri A., Symons M., Hennigan R.F., Hurlstone A.F., Lamb R.F., Wheeler T., Ozanne B.W., The transcription factor AP-1 is required for EGF-induced activation of Rho-like GTPases, cytoskeletal rearrangements, mobility , and in vitro invasion of A 431 cells, *J. Cell Biol.*, **1998**, 143, 1087-1099.

Dans un premier temps, les cellules A 431 ont été placées en présence de doses croissantes - 0.8 à 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  - de chacune des fractions. En inhibant de façon dose dépendante la prolifération des cellules A 431, la fraction AGU présente un réel effet cytotoxique dont l'IC<sub>50</sub> – la concentration induisant 50 % d'inhibition – est située à une valeur de 3  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  soit 0.7  $\mu\text{M}$ . Dans les mêmes conditions expérimentales, les fractions FR ou une solution de pectine commerciale utilisée comme témoin, avec des valeurs d'inhibitions (figure 70) maximales de 44 et 39 % à 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivement, ne permettent pas d'atteindre l'IC<sub>50</sub>. Ce résultat préliminaire confirme la bonne efficacité du zosteran dont les propriétés s'avèrent supérieures à celles enregistrées dans des conditions expérimentales identiques avec le 4-O-méthylglucuronoxylane extrait du bois de châtaignier (Moine *et al.*, 2007). Dans ce dernier cas, l'IC<sub>50</sub> était atteinte pour une concentration de glucuronoxylane égale à 50  $\mu\text{M}$  70 fois supérieure à celle d'AGU. Enfin, un tel résultat démontre clairement que l'autohydrolyse, en éliminant les chaînes latérales du zosteran, abaissent sensiblement son efficacité. La fraction FR, cet homogalacturonane obtenu après déramification du zosteran, présente alors à concentrations équivalentes, des propriétés similaires à celles de la pectine commerciale elle-même de nature homogalacturonique. Tout en le validant, cette étude de cytotoxicité confirme l'importance du concept structure-fonction dans l'expression des propriétés biologiques des apiogalacturonanes.

---

\* Moine C., Krausz P., Chaleix V., Kraemer M., Gloaguen V., Structural characterization and cytotoxic properties of a 4-O-Methylglucuronoxylan from *Castanea sativa*. *J. Nat Prod.*, **2007**, 70 (1), 60-66.



**Figure 70:** effets doses - dépendant des fractions AGU et FR testées à des concentrations comprises entre 0.8 et 50  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  sur la viabilité des cellules A 431. Témoin : pectine commerciale (Sigma).

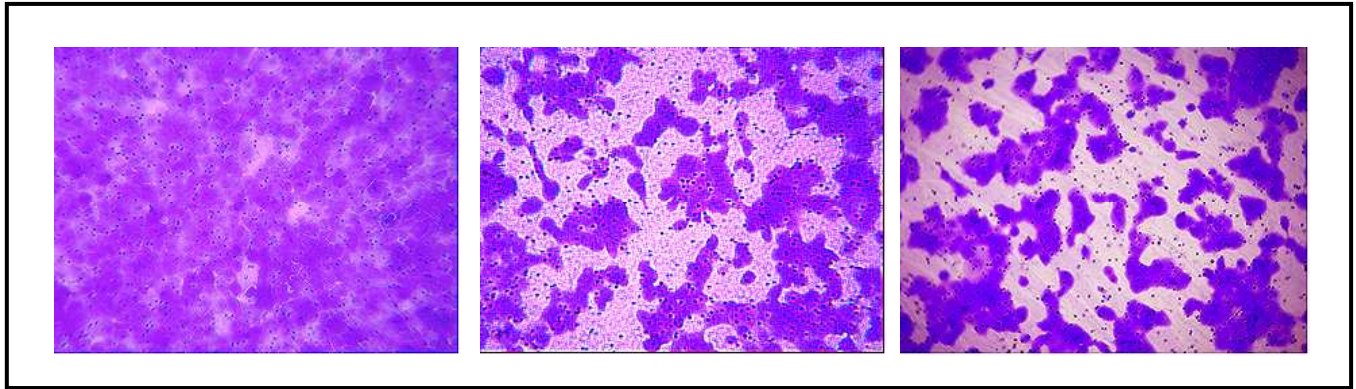
Nous avons donc sélectionné la fraction AGU pour poursuivre notre étude pharmacodynamique et tenté d'identifier les mécanismes moléculaires qui expliquent l'activité de l'apiogalacturonane. En présence de sérum de veau fœtal, un stimulus chimiotactique, dans la partie inférieure de la chambre de migration de Boyden, les cellules A 431 présentent la capacité de migrer au travers des pores vers la surface inférieure de la membrane. Ainsi qu'en témoigne la figure 71, la présence d'AGU réduit de façon sensible la capacité de migration des cellules A 431. En effet, comparé à un témoin, la migration des cellules A 431 décroît de 80 et 60% avec des concentrations d'AGU égales à 25 et 6  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivement.

Une expérience d'invasion sur Matrigel a ensuite été réalisée afin d'étudier, aux mêmes concentrations d'AGU (25 et 6  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), les propriétés invasives des cellules A 431. Ces dernières sont considérablement affectées par la présence d'AGU (figure 72). Comparée à un témoin, l'invasion des cellules A 431 décroît de 90 et 65 % avec des concentrations d'AGU égales à 25 et 6  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivement.

La migration cellulaire caractéristique de l'angiogénèse requiert la dégradation de la matrice extracellulaire par des protéases spécifiques telles que les métalloprotéinases (MMP) (Heissig *et al.*, 2003). Nous avons démontré précédemment que l'AGU inhibait de façon significative la migration et l'invasion des cellules A 431. Une telle propriété est parfois corrélée à l'inhibition de l'expression des gélatinases MMP9 et MMP2 par les lignées cancéreuses modèles, la lignée A 431 en particulier. C'est ce que nous avons étudié par zymographie après que les cellules A 431 aient été placées en contact avec la fraction AGU durant une période de 72 heures (figure 73). Comparé à un témoin, un traitement réalisé avec une concentration d'AGU de 6  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  abaisse l'expression des ProMMP9, MMP9 et ProMMP2 à 20, 45 et 25 % respectivement. Testé à 25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , l'AGU comparé à un témoin, abaisse l'expression des ProMMP9, MMP9 et ProMMP2 à 20, 65 et 45 % respectivement. Un tel résultat suggère donc que l'inhibition des propriétés invasives des cellules A 431 mise en évidence dans la chambre de Boyden est, d'un point de vue moléculaire, expliquée par l'inhibition de l'expression des métalloprotéinases en réponse à la présence de l'AGU dans le milieu de culture.

---

\* Heissig B., Hattori K., Friedrich M., Rafii S, Werb Z., Angiogenesis: vascular remodeling of the extracellular matrix involves metalloproteinases, *Curr. Opin. Hematol.* **2003**, *10*, 136-141.

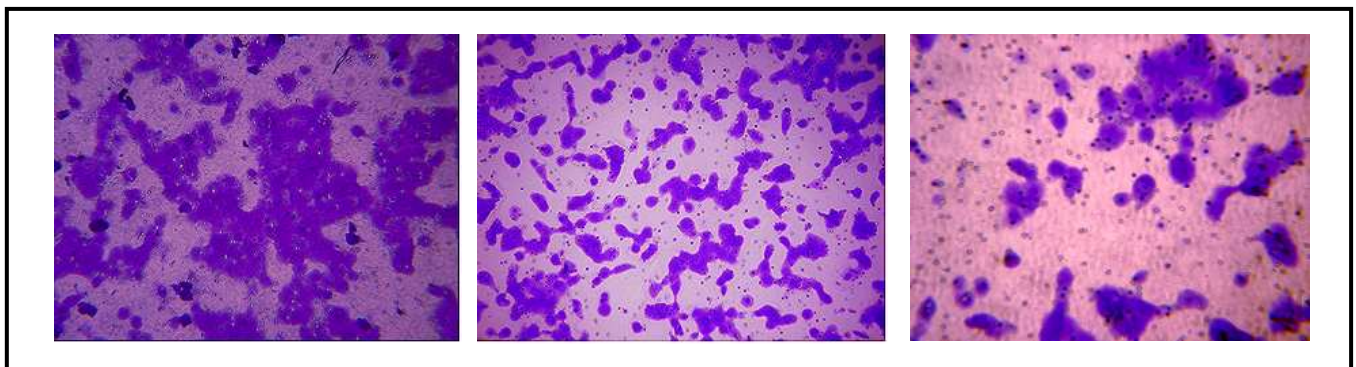


Contrôle

AGU 6 µg. mL<sup>-1</sup>

AGU 25 µg. mL<sup>-1</sup>

**Figure 71** : Effets de la fraction AGU sur les capacités de migration des cellules A431. Grossissement x200



Contrôle

AGU 6 µg. mL<sup>-1</sup>

AGU 25 µg. mL<sup>-1</sup>

**Figure 72** : Effets de la fraction AGU sur les capacités invasives des cellules A431. Grossissement x200.

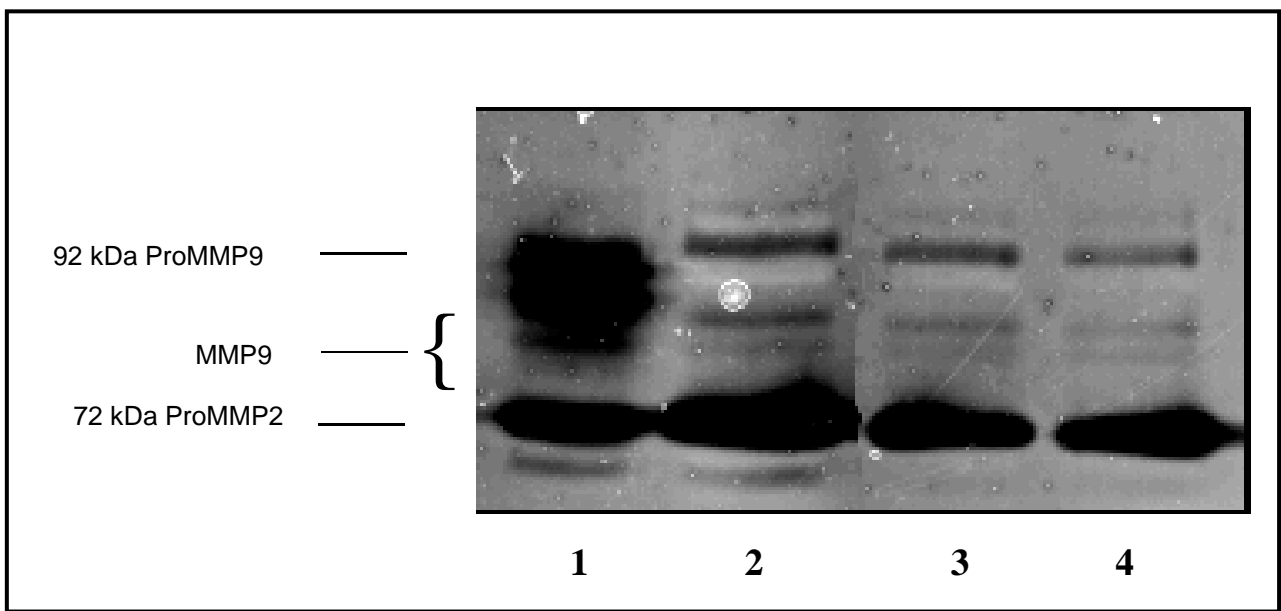
Pour conclure, l'AGU isolé du zosteran présente une activité cytotoxique dose-dépendante sur les cellules A 431. La fraction RF, obtenue par auto-hydrolyse d'AGU et totalement dépourvue d'apiose, présente pour sa part des propriétés cytotoxiques limitées similaires à celles recueillies à partir d'une pectine commerciale de même nature chimique. Il est alors légitime de considérer que les chaînes latérales d'apiose constituent un prérequis nécessaire à l'expression de l'activité cytotoxique de l'apiogalacturonane. Nos résultats en mettant en évidence cette relation structure/fonction étroite, complètent - *en les améliorant* - les résultats obtenus par Popov *et al.* (2006 a et b) sur les propriétés inflammatoires du lemnane. Dans ce dernier cas, l'hydrolyse acide partielle du lemnane, si elle conduit à sa déramification, produit également un abaissement important du degré de polymérisation de la chaîne principale. Les raisons pour lesquelles les hydrolysats de lemnane voient leurs propriétés inflammatoires modulées peuvent alors, dans ce cas, être expliqué par l'une et/ou l'autre de ces observations. Nos résultats démontrent pour leur part que les chaînes latérales d'apiose constituant la zone hérissée de ce galacturonane substitué, jouent un rôle prépondérant dans l'expression de l'activité cytotoxique. Cette conclusion expérimentale est un argument supplémentaire qui, comme le suggèrent Paulsen et Barsett (2005) ou comme en atteste nos travaux sur le rhamnogalacturonane de type I, confirme l'importance des zones chevelues des pectines bioactives.

---

\* Popov S. V., Golovchenko V. V., Ovodova R. G., Smirnov V. V., Khramova D. S., Popova G. Y., Ovodov Y. S., Characterization of the oral adjuvant effect of lemnan, a pectic polysaccharide of *Lemna minor L.*, *Vaccine* **2006**, 24, 5413-5419.

\* Popov S. V., Ovodova R. G., Ovodov Y. S., Effect of Lemnan, pectin from *Lemna minor L.*, and its fragment on inflammatory reaction, *Phytother. Res.*, **2006**, 20, 403-407.

\* Paulsen B.S., Barsett H., Bioactive pectic polysaccharides, *Advances Polymers Sciences*, **2005**, 186, 69-101



**Figure 73** : Effets de la fraction AGU sur l'expression des métalloprotéinases ProMMP9, MMP9 et ProMMP2 par les cellules A 431.

*1 = témoin positif (cellules HT 1080) ; 2 = cellules A431 non traitées ;*

*3 = cellules A431 traitées par AGU  $6 \mu\text{g.ml}^{-1}$  ; 4 = cellules A431 traitées par AGU  $25 \mu\text{g.ml}^{-1}$*

## **CONCLUSION GENERALE**

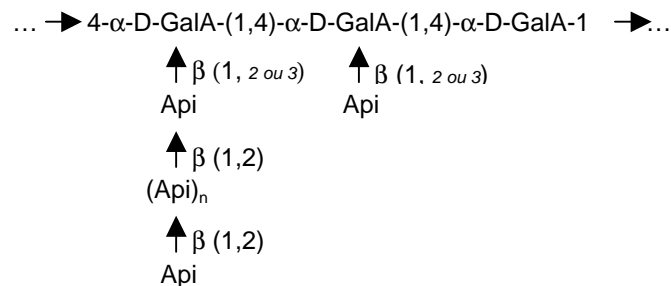


## II.6 CONCLUSION GENERALE

La question qui était posée à l'origine de ce travail de Thèse portait d'une part sur la ressource biologique et plus particulièrement sur l'intérêt de l'utilisation des molécules pectiques en dermocosmétique et, d'autre part, sur l'existence et les possibilités de mise en oeuvre de méthodologies d'extraction, de séparation et de modification enzymatique spécifiques à des coûts économiquement acceptables par l'entreprise pour un développement industriel. L'étude bibliographique prospective des propriétés biologiques des pectines, si elle fait état d'un grand nombre de références dans le domaine thérapeutique, met néanmoins en exergue l'absence de données spécifiques aux cellules du derme (kératinocytes et fibroblastes). Par ailleurs, tous les composés pectiques ne sont pas biologiquement actifs. L'activité biologique des pectines pourrait être associée à la présence sur la chaîne principale, de ramification (« hairy region »). C'est ce que suggèrent nos travaux sur le RGI et l'apiogalacturonane, en effet :

- *Dans le premier cas*, en stimulant la synthèse de E-Cadhérine et en favorisant l'expression des ARNm codant pour la profilaggrine, le RGI participe au phénomène de différenciation des cellules du derme. Il est par ailleurs capable de réguler le processus de desquamation et de modifier le contenu en céramide du *stratum corneum*. De plus, une étude réalisée sur trois RGI (son de châtaigne, marc de pomme et marc de raisin) montre que la variabilité des masses moléculaires et de la nature chimique des chaînes latérales – *arabinanes et arabinogalactanes* – induit une modulation de l'état de différenciation des kératinocytes. D'autres facteurs doivent également être pris en compte. C'est par exemple le cas pour les teneurs en oses neutres tel que le rhamnose dans la chaîne principale ou l'arabinose situé en position latérale terminale. C'est aussi le cas pour le nombre et la répartition des sites actifs ;
- *Dans le second cas*, l'élimination des chaînes latérales d'apiose sous leur forme mono- et oligosaccharidique induit une diminution sensible des propriétés cytotoxiques sur une lignée de carcinome épidermoïde vulvaire humain (cellule A431). Ce deuxième aspect de

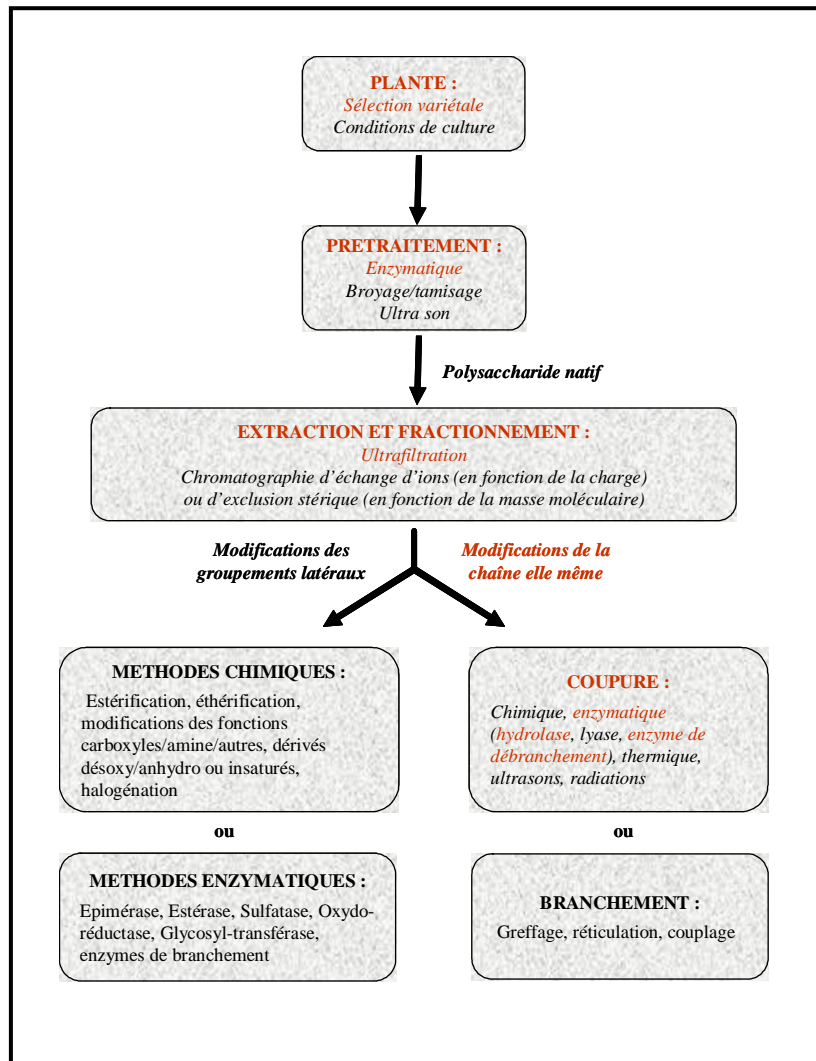
notre étude a par ailleurs permis de préciser la structure du zosteran, pour lequel nous proposons la structure hypothétique suivante :



La variabilité des structures pectiques explique donc la variabilité de leur propriété sur des cultures cellulaires du derme (keratinocytes) ou des lignées cancéreuses (cellules A431) toutes deux d'origine animale. Chez les plantes, le rôle de signal moléculaire a été démontré pour des oligosaccharides issus de la dégradation enzymatique de phytopolysaccharides pariétaux. Historiquement, le terme d'oligosaccharine a été proposé par le groupe de Peter Albersheim à l'Université de Géorgie (Athens, USA) pour désigner de tels oligosaccharides bioactifs. C'est le cas du nonasaccharide issu de la dégradation du xyloglucane ou encore des oligogalacturonides issus de la dégradation des pectines capables d'induire la croissance cellulaire, la formation des fleurs et des racines ou encore la synthèse de phytoalexine. Faut-il opposer ces oligosaccharines aux polysaccharides pectiques, plus gros, qui ont une activité pharmacodynamique chez les animaux ? En fait, certains oligosaccharides dérivés de ces polysaccharides présentent eux aussi une activité sur les cellules animales. Les voies par lesquelles les oligo- et polysaccharides pectiques bioactifs régulent les cellules animales pourraient donc avoir une parenté évolutive. Une telle hypothèse, développée par le groupe du Professeur Yamada du Centre de Recherche en Médecine Orientale de l'Université de Tokyo reste, à l'heure actuelle, purement spéculative.

L'ensemble des données recueillies au cours de notre étude confirme, s'il en était besoin, que la matière végétale est une source inépuisable de polysaccharides dont certains présentent des propriétés biologiques remarquables. Les nombreuses propriétés des oligo- et polysaccharides, tant biologiques qu'applicatives, sont associées à une diversité structurale

quasi-illimitée. Dépendantes de la structure chimique de la molécule, ces propriétés sont intimement liées à leur comportement conformationnel mais aussi à leur capacité à interagir avec d'autres bio-molécules. La connaissance de la structure de ces dernières est donc un préalable nécessaire pour mieux comprendre, prédire et modifier éventuellement le rôle joué par ces macromolécules dans de nombreux phénomènes de reconnaissance et d'interaction, ainsi que leur comportement et propriétés dans différents états. La difficulté à purifier et décrypter la structure exacte de ces composés est cependant le principal frein à leur introduction dans la pharmacopée européenne et, dans une moindre mesure, en dermocosmétique, où s'impose progressivement la norme du monocomposant. Un tel constat ouvre alors la voie à des stratégies de modifications enzymatiques ou chimiques des phytopolysaccharides en général, et des pectines en particulier. Cette dernière, outre le fait qu'elle permette au manipulateur de se soustraire de la variabilité biologique inhérente au monde végétal, permet d'envisager de réguler et/ou moduler les propriétés des biomolécules (figure 74). Appliquée au contexte expérimental de la thèse, la mise en œuvre synergique d'endopolygalacturonase puis d'arabinofuranosidase (hydrolyse) ou d'arabinofuranose transférase (greffage) permettrait d'isoler des RGI aux caractéristiques structurales choisies pour des activités biologiques ciblées. Le développement de nouvelles gammes d'actifs à base de phytopolysaccharides doit donc permettre à la société SILAB d'affiner sa démarche notamment *en amont*, en sélectionnant les plantes sources et, *en aval*, en améliorant *i)* l'extractabilité des polysaccharides en recourant à des techniques préparatives non dénaturantes (prétraitements physiques : broyage/tamisage, ultra son), *ii)* leur pureté par fractionnement chromatographique ou ultrafiltration et *iii)* leur forme active par modification enzymatique ou chimique. Une telle démarche est aussi de nature à garantir la stabilité des préparations et la bonne reproductibilité des activités revendiquées.



**Figure 74** : Comment modifier les propriétés des polysaccharides (adapté de Pérez, 1997).

A la fois constat et perspective immédiate de poursuite de notre travail, cette stratégie impose le maintien d'un équilibre raisonnable entre recherche académique et finalisée ; elle requiert également la mise en œuvre de savoir faire complémentaires situés à l'interface de la Physiologie, de la Chimie et d'une politique de valorisation et de transfert de Technologies spécifique aux substances naturelles d'origine végétale. Cette dernière remarque, tout en favorisant le développement du *continuum* recherche-innovation propre au financement CIFRE, explique mon recrutement au sein du service Recherche et Développement de l'entreprise SILAB.

\* Pérez S., Les vertus cachées des sucres, *Biofutur*, 1997, 171, 21-23.

## **CHAPITRE III : Partie expérimentale**

## CHAPITRE III : Partie expérimentale

### III.1. Matériel biologique

L'ensemble des matières premières utilisées dans le cadre de la thèse a vocation à être utilisé à une échelle industrielle. C'est pourquoi elles sont disponibles en quantité auprès des fournisseurs de la société SILAB (tableau 33). Les matières premières sont livrées déshydratées, broyées et tamisées en conditionnement allant de quelques kilogrammes à plusieurs centaines de kilogrammes, selon les applications.

**Tableau 33** : liste des matières premières utilisées et des fournisseurs.

<b>Matières premières (poudres)</b>	<b>Fournisseur</b>
<i>Pomme</i>	Diana végétal
<i>Raisin</i>	Diana végétal
<i>Pêche</i>	Diana végétal
<i>Igname</i>	Martin Bauer
<i>Peau de pomme</i>	Diana végétal
<i>Marc de pomme</i>	Les tisaniers
<i>Pépins de raisin</i>	Les tisaniers
<i>Marc de raisin</i>	Les tisaniers
<i>Datte</i>	Diana végétal
<i>Fruit de la passion</i>	Diana végétal
<i>Rhubarbe</i>	Diana végétal

## III.2 Produits chimiques utilisés

L'ensemble des produits chimiques, solvants et réactifs utilisés dans le cadre de ces travaux sont stockés à l'abri de la lumière et en atmosphère inerte. L'origine et la pureté des réactifs et solvants utilisés au cours de ce travail sont décrites dans le tableau 34.

**Tableau 34** : Produits chimiques, solvants et réactifs.

Réactifs et solvants	CAS[Reg.Num.]	Pureté	M (g/mol)	Fournisseur
Acide chlorhydrique	[7647-01-0]	37%	34,46	Fischer Labosi
Hydroxyde de sodium	[1310-73-2]		40,00	Acros
Méthanol	[67-56-1]	99,99%	32,04	Fisher
Pyridine	[110-86-1]	99,8%	79,1	Aldrich
Acide sulfurique	[7664-93-9]	95-98%		Acros
Phénol	[108-95-2]	99%	94,11	Sigma
Butanol	[71-36-3]		74,12	Acros
BSTFA+1%TMCS (99:1)				Alltech
Méthanol chlorydrique 3N				Supelco
Méthanol anhydre		>99%	32,04	Fisher
Heptane	[142-82-5]	>99%	100,2	Sigma
Ethanol	[64-17-5]		46,07	Sigma

## III.3 Extraction des pectines

### III.3.1. Rhamnogalacturonanes

#### III.3.1.1. Protocole A (*protocole laboratoire LCSN*)

Dix grammes de matières premières sont placés dans un ballon d'extraction ; 100 ml d'eau distillée sont alors ajoutés. Le système, préalablement surmonté d'un réfrigérant, est porté à 90°C durant 10 minutes à l'aide d'un chauffe ballon. Après refroidissement, le mélange est

centrifugé à 2300 g (centrifugeuse Sigma 5-2) durant 15 minutes à température ambiante. Le surnageant, séparé du culot, est placé au contact d'un cocktail enzymatique de carbohydrase à la concentration finale de 1% (V/V). La dégradation de l'amidon se poursuit à 55°C pendant 1 heure avant d'être stoppée par inactivation thermique 1 minute à 100°C. Après filtration, le surnageant est placé en dialyse (membrane Spectrapor, Molecular Weight Cut Off, 6-8000 Da) contre de l'eau distillée durant 2 jours à 4°C.

#### III.3.1.2. Protocole B (*protocole laboratoire R&D SILAB*)

Le protocole B est une adaptation du protocole A dont il reprend, en les adaptant au laboratoire R&D de la société SILAB, les grandes lignes directrices. Cent grammes de matières premières sont placés dans 1000 ml d'eau distillée. L'extraction se déroule à 90°C durant 10 minutes. Le mélange est refroidi à 50°C puis le pH ajusté à 5 par ajout de HCl ou de NaOH selon la matière. Un cocktail de carbohydrase est alors introduit à la concentration finale de 5% (V/V) et la dégradation se déroule à 50°C durant 2 heures. Le surnageant est alors séparé - *sans refroidissement* - du culot par centrifugation à 1760 g (Heltich rotixa rp) durant 5 minutes puis porté à 80°C durant 30 minutes afin d'inactiver les enzymes. Il est enfin passé sur filtre presse.

#### III.3.1.3. Protocole pilote (*hall de développement technologique et commercial de la société SILAB*)

Le protocole pilote est une transposition du protocole B dont il reprend les méthodologies en les adaptant aux matériels et aux conditions d'utilisation de ces matériels par la société SILAB. Dans ce cas, les quantités et les volumes initiaux par 250-300.



### III.3.2. Apiogalacturonane

#### III .3.2.1. Protocole LCSN

Le protocole d'extraction de l'apiogalacturonane de *Zostera marina* est une adaptation de celui décrit par Ovodova *et al.* (1968) et transposé au Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles. Dix grammes de matières premières sont placés au contact de 100 ml de méthanol afin d'en éliminer les pigments. Après filtration sur verre fritté (porosité 3), le résidu est rincé abondamment par de l'eau distillée. Le résidu est placé dans un ballon d'extraction et 200 ml d'une solution d'oxalate d'ammonium 1% (M/V) sont ajoutés. Le système, préalablement surmonté d'un réfrigérant, est porté à 70°C durant 2 heures à l'aide d'un chauffe ballon. La solution est alors filtré sur verre fritté (porosité 3) et le surnageant est soumis à l'action du cocktail de carbohydrase (5%/MS) puis placé en dialyse (membrane Spectrapor, Molecular Weight Cut Off 6-8000 Da) contre de l'eau distillée durant 2 jours à 4°C pour donner le zoteran brut (Z<sub>c</sub>). La solution est alors congelée et lyophilisée pour être conservée.

La purification de l'extrait brut se déroule selon le protocole publié par Popov *et al.* (2006). Un gramme de zoteran brut est ensuite solubilisé dans 100 ml d'eau distillée. Une carbohydrase à la concentration de 1%(V/V) est ajoutée, et le mélange est placé à 37°C durant 1 heure. A la fin de cette période, le mélange est porté à ébullition durant une minute afin d'inactiver l'enzyme. Le précipité formé est éliminé par centrifugation à 2300 g (centrifugeuse Sigma 5-2) durant 15 minutes à température ambiante. Le surnageant, séparé du culot, est précipité par ajout de 3 volumes d'éthanol absolu. Le précipité préalablement solubilisé dans l'eau est placé en dialyse (membrane Spectrapor, Molecular Weight Cut Off 6-8000 Da) contre de l'eau distillée durant 2 jours à 4°C pour donner le zoteran brut purifié (AGU). La solution est alors congelée et lyophilisée pour être conservée.

#### III .3.2.2. Protocole pilote(*hall de développement technologique et commercial de la société SILAB*)

Le protocole pilote est une transposition du protocole LCSN dont il reprend les lignes directrices en les adaptant aux matériels et aux conditions d'utilisation de ces matériels de la

---

\* Ovodova R. G., Vas'Kovskii V. E., Ovodov Y. S., The pectic substances of *Zosteraceae*, *Carbohydr. Res.*, **1968**, 6, 328-332.

\* Popov S. V., Ovodova R. G., Ovodov Y. S., Effect of Lemnan, pectin from *Lemna minor* L., and its fragment on inflammatory reaction, *Phytother. Res.*, **2006**, 20, 403-407.

société SILAB. Dans ce cas, la quantité initiale de matière première est portée à 28 kg et l'extraction se déroule dans 230 litres d'eau.

### III.4 Obtentions des extraits purifiés ou modifiés

#### III.4.1. Purification des rhamnogalacturonanes

Le pH des extraits pectiques issus des protocoles A et pilote est ajusté à 5.5. Chacun des extraits est alors placé au contact d'une solution de carbohydrase à la concentration finale de 5% (V/V). La dégradation se déroule à 35°C durant 2 heures. A la fin de cette période, le mélange est porté à ébullition durant une minute afin d'inactiver l'enzyme. Le précipité formé est éliminé par centrifugation à 2300 g (centrifugeuse Sigma 5-2) durant 15 minutes à température ambiante.

Chacun des extraits est ensuite purifié par chromatographie d'exclusion stérique sur colonne de gel de polyacrylamide Biogel P6 (Biorad - seuil de séparation 1000-6000 Da ; dimension de la colonne : Ø 2,5 cm × 50 cm) équilibrée dans l'eau sous un débit constant de 12.5 ml.h<sup>-1</sup> assuré par une pompe péristaltique (Pump P-1 ; Amersham Biosciences). L'élution est suivie grâce à un détecteur UV (Biorad, model EM1 econo UV monitor). Les fractions sont recueillies en sortie de colonne à l'aide d'un collecteur (Redifrac ; Pharmacia-Biotech) et leur homogénéité contrôlée par Chromatographie sur Couche Mince (éluant : butanol, acide acétique, eau ; 2/1/1) après révélation par pulvérisation d'une solution d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20 % à 0,1 % d'orcinol et passage à l'étuve à 110°C.

#### III.4.2. Autohydrolyse du zosteran, l'apiogalacturonane de *Zostera marina*

Le protocole d'autohydrolyse utilisé a été adapté de Ciancia et Cerezo. (1993). Une solution aqueuse de zosteran purifié - AGU - à la concentration d'1 mg.mL<sup>-1</sup> est convertie en sa forme acide par passage sur résine Amberlite IR-120 (H<sup>+</sup>). Après filtration sur verre fritté (porosité 3), la solution est placée à l'étuve à 110°C durant 1 heure. L'hydrolysate ainsi obtenu est ensuite déposé sur une colonne de résines basiques échangeuse d'ions DOWEX 1×2 - forme

---

\* Ciancia M., Cerezo A.S., Autohydrolysis of polysaccharides, *Carbohydr. Res. Brazil*, **1993**, 45, 54-61.

Cl<sup>-</sup> (mesh 200-400 ; Fluka; colonne : Ø 1 cm × 50 cm). Un gradient d'éluion linéaire de formiate d'ammonium de 0,05 M à 0,5 M est appliqué pour séparer une fraction neutre non retenue (FNR), d'une fraction chargée retenue (FR). La fraction neutre non retenue (FR) est finalement purifiée par chromatographie d'exclusion stérique sur colonne de gel de polyacrylamide Biogel P2 (Biorad - seuil de séparation 180 à 2000 Da ; dimension de la colonne : Ø 2,5 cm × 70 cm) équilibrée dans l'eau sous un débit constant de 10 ml.h<sup>-1</sup> assuré par une pompe péristaltique (Pump P-1 ; Amersham Biosciences). Les fractions sont recueillies en sortie de colonne à l'aide d'un collecteur (Redifrac ; Pharmacia-Biotech) et leur homogénéité contrôlée par Chromatographie sur Couche Mince (éluant : butanol, acide acétique, eau ; 2/1/1) après révélation par pulvérisation d'une solution d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20 % à 0,1 % d'orcinol et passage à l'étuve à 110°C.

### III.5 Analyses des extraits

#### III.5.1. Caractérisation des composés non saccharidiques

##### III.5.1.1. Détermination des matières sèches

Dix grammes de sable sont déposés dans des coupelles en aluminium, l'ensemble est pesé pour donner une masse PV. Dans chaque coupelle, environ 3 ml d'échantillon sont ajoutés. Le poids est noté (PP). Les prises d'essais sont enfin placées au four à 110°C durant une période de 48 heures. A la fin de cette période, les coupelles sont sorties du four et pesées (PS). La quantité de matière sèche exprimée en g.l<sup>-1</sup> est alors obtenue selon la formule :

$$(PS-PV)/(PP-PV)* 1000$$

##### III.5.1.2. Teneurs en cendres

Dans un premier temps les coupelles en porcelaine et leurs couvercles sont séchés à 600°C pendant 30 minutes dans un four à mouffles électrique. Lorsque leur température est redescendue à 40°C, les coupelles et leurs couvercles sont pesés (M1). Cinq ml d'échantillon sont alors déposés dans chaque coupelle qui sont à nouveau pesés avec leurs couvercles (M2). Les prises d'essais sont placées dans le four. La température du four s'élève selon le

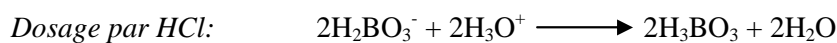
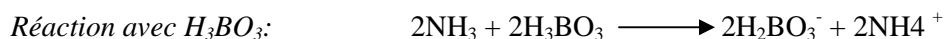
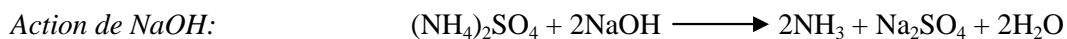
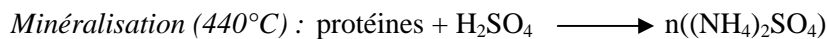
programme suivant : 5°C.min<sup>-1</sup> jusqu'à 110°C avec un palier de 3 heures, puis 15°C.min<sup>-1</sup> jusqu'à 550°C avec un palier de 9 heures. La température redescend alors jusqu'à la valeur de température ambiante. Les coupelles sont alors sorties du four et pesées immédiatement. La teneur en cendres, exprimées en g.l<sup>-1</sup> est alors obtenue selon la formule :

$$(M3-M1)/(M2-M1) * 1000.$$

### III.5.1.3. Dosage des protéines totales (Kjeldahl)

L'échantillon est introduit dans un matras ; 1 pastille de catalyseur SeCu et 15ml d'acide sulfurique concentré sont alors ajoutés. Les matras sont chauffés à 440°C pendant une période d'au moins une heure sous une hotte aspirante. L'acide sulfurique à chaud, transforme l'azote liée en ion ammonium. Cette étape de minéralisation est terminée lorsque la solution prend une teinte vert clair. Les teneurs en protéines totales sont évaluées par l'intermédiaire du lecteur Kjeltex 2300 Foss. Cet appareil ajoute automatiquement à chaque échantillon une solution de soude qui induit un dégagement d'ammoniaque proportionnelle à la quantité d'azote protéique. L'ammoniaque est ensuite distillée et recueillie dans une solution d'acide borique. Les ions borates formés au cours de cette étape sont enfin dosés par une solution titrée d'acide chlorhydrique.

Le bilan réactionnel de ce dosage est le suivant :



La teneur en protéine totale, exprimée en g pour 100 g d'échantillon est obtenue selon la formule :

$$\text{N (\%)} = ((V_{\text{H}_2\text{SO}_4} * M_{\text{Azote}} * m_{\text{H}_2\text{SO}_4} * F) / (P_{\text{Echantillon}} * 1000)) * 100$$

Où

**N :** taux de protéines présent dans l'échantillon (%).

**V<sub>H2SO4</sub> :** volume de solution d'acide sulfurique (ml).

**M<sub>Azote</sub> :** masse molaire de l'azote (g.mol<sup>-1</sup>).

**m<sub>H2SO4</sub> :** molarité de la solution d'acide sulfurique (mol.L<sup>-1</sup>).

**P<sub>Echantillon</sub> :** pesée de l'échantillon (g).

**F :** facteur permettant de passer de la quantité d'azote à la quantité de protéines (F= 6,25).

#### III.5.1.4. Dosage de protéines selon la méthode de Lowry (1951)

La solution alcaline A est composée de 4 g.L<sup>-1</sup> de soude, 20 g.L<sup>-1</sup> de carbonate de sodium et 0,2 g.L<sup>-1</sup> de tartrate double de sodium et de potassium. La solution cuivrique B est composée de sulfate de cuivre à 5 g.L<sup>-1</sup>. La solution C est préparée extemporanément avec 50 ml de la solution A et 1 ml de solution B. La gamme étalon est une solution d'unitrol de 15 µg.ml<sup>-1</sup> à 75 µg.ml<sup>-1</sup>. Dans des tubes à hémolyse en plastique, 1ml d'échantillon puis 3 ml de solution C sont déposés. Les tubes sont mélangés par retournement et laissés au repos 15 min à température ambiante et à la lumière. 0,3 ml du réactif de Folin est ajouté, les tubes sont agités par retournement, placés à l'obscurité pendant 30 min. L'absorbance est lue à 750nm contre le blanc.

#### III.5.1.5. Dosage des polyphénols

Les dérivés phénoliques forment avec le chlorure ferrique des complexes de coordination plus ou moins stables. La sensibilité de la réaction est plus grande en présence de ferrocyanure de potassium (Wesp et Brode 1934, Singh et Sanwal 1978). Une solution de chlorure ferrique à 3 g.L<sup>-1</sup> dans une solution HCl à 0,4 N et une solution de ferricyanure de potassium à 3 g.L<sup>-1</sup> sont préparées. Le réactif est composé de 1 volume de chaque solution et 2 volumes d'eau distillée. La gamme étalon est une solution d'acide gallique de 40 µg.ml<sup>-1</sup> à 120 µg.ml<sup>-1</sup>. Dans des tubes à hémolyse en plastique, 100 µl de solution à doser et 4 ml de réactif sont introduits. Les échantillons sont homogénéisés, ces tubes sont placés à l'abri de la lumière pendant 30 minutes. L'absorbance est lue à 715nm contre un blanc. La teneur en dérivés phénoliques est exprimée en équivalent d'acide gallique.

---

\* Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr L., Randall R.J., Protein measurement with the folin phenol reagent, *J.Biol.Chem.*, **1951**, 193, 265-275.

\* Wesp E.F., Brode W.R., The absorption spectra of ferric compounds. I. The ferric chloride-phenol reaction, *Journal of the American Chemical Society*, **1934**, 56, pp 1037.

\* Singh M., Singh S.S., Sanwal G.G., 1978. A new colorimetric method for determination of phenolics, *Indian Journal of Experimental Biology*, **1978**, 16, 712-714.

### III.5.2. Caractérisation des contenus saccharidiques

#### III.5.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Des plaques de silice Kieselgel 60F<sub>254</sub> de 0.2mm d'épaisseur (Merck) ont été employées pour la chromatographie sur couche mince en phase normale. Une double migration est effectuée dans le solvant n-butanol/acide acétique/eau 2/1/1 (V/V/V). La révélation des plaques est réalisée par pulvérisation d'une solution d'orcinol sulfurique (0,1% d'orcinol dans de l'acide sulfurique à 20%) et passage 5 minutes à l'étuve à une température de 110°C.

#### III.5.2.2. Dosages des sucres par colorimétrie

La quantification des sucres est réalisée par la méthode au phénol sulfurique (Dubois, 1956) pour les oses neutres, la méthode au méta-hydroxydiphényl (*m*-HDP) pour les acides uroniques (Blumenkrantz et Asboe-Hansen, 1973) et la méthode au PAHBAH pour les sucres réducteurs (Lever, 1972). En raison des interférences liées à la présence d'acides uroniques, il est nécessaire d'appliquer la méthode de correction proposée par Montreuil *et al.* (1963) qui permet d'établir les quantités relatives d'oses neutres et d'acides uroniques.

##### III.5.2.2.a Dosage de Dubois

A 200 µl de solution à doser, on ajoute 200 µl d'une solution aqueuse de phénol à 5%. Le mélange est homogénéisé au vortex, puis 1ml d'acide sulfurique concentré est rapidement introduit dans le milieu réactionnel. Après homogénéisation, le mélange est porté au bain-marie à 100°C durant 5 minutes. Les tubes sont refroidis et placés à l'obscurité pendant 30 minutes. Une coloration orange apparaît. La lecture des densités optiques est réalisée à 492

---

\* Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F., Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.*, **1956**, 28, 350-356.

\* Blumenkrantz N., Asboe-Hansen G., New method for quantitative determination of uronic acids, *Anal. Biochem.*, **1973**, 54, 484-489.

\* Lever M., New reaction for colorimetric determination of carbohydrates, *Anal. Biochem.*, **1972**, 47(1), 273-279.

\* Montreuil J., Spik G., Chosson A., Segard E., Scheppeler N., Methods of study of the structure of glycoproteins, *J. Pharm. Belg.*, **1963**, 18, 529-546.

nm. Les quantités de sucres en solution peuvent être établies en comparaison avec une gamme étalon de glucose de concentration de 25, 50, 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

#### III.5.2.2.b Dosage de Blumenkrantz-Asboe

A 200  $\mu\text{l}$  de solution à doser, on ajoute 1.2 ml d'une solution de tétraborate de sodium à 0,125M dans l'acide sulfurique concentré. Le mélange est homogénéisé au vortex, et réfrigéré dans la glace. Les tubes sont ensuite portés à 100°C au bain-marie durant 5 minutes. Après refroidissement dans un bain de glace, on ajoute 20  $\mu\text{l}$  d'une solution de m-HDP (méta-hydroxydiphényle) à 0,15% dans une solution de soude à 0,5%. Les tubes sont agités. Une coloration rose se développe pendant 5 minutes. La lecture des densités optiques est réalisée à 520 nm. Les quantités de sucres en solution peuvent être établies en comparaison avec une gamme étalon d'acide galacturonique de concentration 25, 50, 100 et 200  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

#### III.5.2.2.c Dosages des sucres réducteurs

A 250 $\mu\text{l}$  de solution à doser, on ajoute 750  $\mu\text{L}$  d'une solution de PAHBAH (acide hydrazide para-hydroxybenzoïque) à 5% dans HCl 0,5M, fraîchement diluée au 1/5 par NaOH 0,5M. Le mélange est homogénéisé au vortex et porté à 100°C au bain-marie durant 5 min, puis refroidi. La lecture des densités optiques est réalisée à 410 nm. Les quantités de sucres réducteurs en solution peuvent être établies en comparaison avec une gamme étalon de glucose de concentrations 10, 20, 30 et 40  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

#### III.5.2.2.d Identification et dosage des monosaccharides par CPG selon la méthode des méthylglycosides O-triméthylsilylés

Le principe de cette méthode repose sur l'obtention de méthylglycosides triméthylsilylés par méthanolyse suivie d'une *per*triméthylsilylation des monosaccharides libérés selon les méthodologies proposées par Kamerling *et al.* (1975) modifiées par Montreuil *et al.* (1986).

- **Méthanolyse**

---

\* Kamerling J.P., Gerwig G.J., Vliegthart J.F.G., Clamp J.R., Characterization by gas liquid chromatography mass spectroscopy of pertrimethylsilyl glycosides obtained in the methanolysis of glycoproteins and glycolipids, *Journal of Biochemistry*, **1975**,151,491-495.

\* Montreuil J., Bouquelet S., Debray H., Fournet B., Spik G., Strecker G., Glycoproteins, In : Chaplin, M.F., Kenedy, J.F. (Eds), *Carbohydrate analysis a practical approach*, IRL Press, Oxford, Washington D.C., **1986**, 143-204.

Les monosaccharides sont libérés sous forme de méthylglycosides par ajout de 1 mL d'une solution de chlorure d'acétyle 1 M dans du méthanol anhydre sur 100 µg d'un échantillon polysaccharidique anhydre contenant 10 µg d'un étalon interne, le méso-inositol (MI). La méthanolyse est stoppée après 24 h de réaction à 80°C par évaporation du méthanol chlorhydrique sous un flux d'argon.

- **Triméthylsilylation**

Les méthylglycosides sont triméthylsilylés pendant 2 h à température ambiante par 80 µL d'un mélange V/V pyridine/BSTFA (*N,O*-bis-triméthylsilyl-trifluoroacétamide) à 1 % de triméthylchlorosilane (TMCS).

- **Analyses des dérivés méthylglycosides O-triméthylsilylés par CPG**

Les méthylglycosides triméthylsilylés sont ensuite identifiés et dosés par CPG sur un chromatographe Perichrom PR-2100 en comparaison avec des témoins authentiques. L'élévation de la température du four est programmée de 130 à 210°C à raison de 2°C.min<sup>-1</sup>, avec un palier de 5 min à 190°C, puis de 210 à 260°C à raison de 5°C.min<sup>-1</sup>. Les résultats sont exprimés en pourcentage molaire après correction des aires des pics chromatographiques par des facteurs de correction.

Cette analyse, qui a été adaptée à l'analyse de poudres d'origine végétale par Marga et *al.* (1995), a été également utilisée pour l'étude de la composition monosaccharidique des matières premières. Dans ce cas, la méthanolyse est suivie d'une étape de délipidation par trois lavages successifs à l'heptane.

### III.5.3. Analyses structurales

#### III.5.3.1. HPLC

---

\* Marga F., Freyssac V., Morvan H., Rapid gas liquid chromatography microanalysis of carbohydrates in woody plant tissues, *J. Trace and Microprobe Techniques*, **1995**, 13(4), 473-478.



Les profils HPLC des masses moléculaires sont effectués à l'aide d'un système HPLC (Dionex P-680), équipé de deux colonnes d'exclusion stérique PL-aquagel-OH mixed 8 $\mu$ m (Polymers Laboratories-300\*7,5mm). Débit =1ml.min<sup>-1</sup>, éluant 50 mM NaNO<sub>3</sub>. Ce système est complété par un détecteur à indice de réfraction Shodex (RI-101).

### III.5.3.2. Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire

Les mono- et oligosaccharides obtenus ont été analysés par RMN homo et hétéronucléaire au laboratoire de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UMR 8576 CNRS) de l'Université des Sciences et Technologies de Lille. L'analyse de tels composés repose sur l'utilisation de différentes techniques.

#### III.5.3.2.a COSY homonucléaire <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H

Cette technique permet de corréler des protons qui sont couplés scalairement. En d'autres termes, elle permet de transférer la magnétisation d'un proton voisin et donc de visualiser les constantes de couplage J entre les protons.

#### III.5.3.2.b COSY hétéronucléaire

HMQC : Heteronuclear MultiQuantum Coherence. Cette méthode permet de corréler chaque proton avec le carbone sur lequel il est attaché.

HMBC : Heteronuclear Multiple-Bond Correlation. Cette méthode permet d'obtenir des corrélations de couplage <sup>3</sup>J entre un proton et le carbone voisin. Les informations obtenues permettent de déterminer la séquence d'oligosaccharide. Les couplages <sup>3</sup>J permettent de corréler les noyaux distants de trois liaisons covalentes.

ROESY : Roating Frame Overhauser Effect SpectroscopY. Cette technique permet de visualiser les corrélations dipolaires proton-proton entre deux voisins proches d'au plus 5 Å.

Les analyses RMN ont été réalisées sur un spectromètre Bruker ASX 400-US NB. Les échantillons ont été échangés par D<sub>2</sub>O grâce à trois lyophilisations successives. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm par rapport au 4,4'-diméthyl-4-silapentane-1-sulfonate de sodium, mais ont été en réalité mesurés par rapport à un standard interne d'acétone ( $\delta^1\text{H}=2,225$  et  $\delta^{13}\text{C}=31,55$  dans D<sub>2</sub>O à 27°C). Les spectres de corrélation <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, COSY relayé, TOCSY et ROESY, ainsi que les spectres hétéronucléaires <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C (HMQC) ont été réalisés avec les séquences d'impulsion standard de la librairie Bruker. Pour les expériences ROESY, les temps de mélange étaient de 400ms.

### III.6 Evaluation des propriétés biologiques des extraits

#### III.6.1. Efficacité des rhamnogalacturonanes en dermocosmétologie

##### III.6.1. 1. Etude de cytotoxicité :

- **Principe du test MTT**

Les sels de tétrazolium, comme le MTT (Sigma), peuvent être réduits en milieu alcalin et donner un composé coloré : le bleu de formazan. Les mitochondries sont capables de réaliser cette réduction grâce à leurs déshydrogénases membranaires. Ainsi, le nombre de mitochondries fonctionnelles, proportionnel au nombre de cellules vivantes, peut être quantifié en fonction de l'intensité de la coloration.

- **Protocole opératoire de la cytotoxicité :**

Les cellules sontensemencées dans des plaques de 96 puits (Falcon) à raison de  $45.10^3$  cellules /ml dans un milieu complet KSFM (Invitrogen) et contenant des antibiotiques, 0,2 ml de suspension cellulaire a été répartis par puits. Après 24h à l'étuve à 37°C avec une atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub>, le milieu est enlevé puis 200µl de produits par puits « produits » et 200µl de milieu de culture complet KSFM dans les puits « témoins » sont distribués. Après 24h d'incubation, le milieu est enlevé et les cellules sont rincées au PBS puis incubées avec 200µl de solution MTT pendant 3h. Le milieu colorant est éliminé puis on ajoute 200µl de PBS (Sigma). Ce dernier est enlevé puis 200µl de DMSO (Sigma) est

ajouté. Pendant 15 min, les plaques sont agitées jusqu'à homogénéisation. La densité optique (DO) est mesurée à 540 nm au lecteur IEMS (labsystems). Le pourcentage de viabilité cellulaire (%V) est déterminé selon la formule suivante :

$$\%V = [\text{DO}_{\text{cellules traitées}} / (\text{DO}_{\text{cellules non traitées}})] \cdot 100$$

La moyenne (n=4) de ces pourcentages pour chaque concentration du produit nous donne la teneur maximale du produit non cytotoxique.

#### III.6.1.2. Etude sur la synthèse de HSP 27 :

- **Traitement des cellules**

Les kératinocytes humains sont ensemencés dans des boîtes de diamètre 100 mm, à raison de  $1 \cdot 10^6$  cellules par boîte. Après 96h, les kératinocytes sont traités avec les actifs et les fractions à 0,5 % (V/V) dilués dans le milieu de culture. Les cellules sont incubées pendant 5 jours dans une étuve à 37°C en atmosphère humide contenant 5 % de CO<sub>2</sub>. Les cellules sont récupérées et un extrait cellulaire est réalisé par potterisation. Ces extraits cellulaires sont stockés à -80°C en attente des dosages.

- **Dosage des protéines totales**

Le dosage des protéines totales est réalisé par la méthode BCA (Ref. BCA-1, SIGMA).

#### Réalisation du western blot

- Les extraits cellulaires (10 µg de protéines) sont traités par électrophorèse sur un gel Tris-Glycine polyacrylamide à 15%. Ils sont ensuite transférés sur membrane Immobilon P (IPVH15150, MILLIPORE).

- **Réalisation de l'immunomarquage :**

\* Anticorps primaire = anticorps anti-HSP-27 de souris

(Ref. NCL-HSP27 /Novocastra ).

\* Anticorps secondaire = anticorps anti-IgG de souris couplé au HRP

(horse radish peroxydase) (ref P0447, DAKO – France).

\* Système de révélation : substrat peroxydase et solution chromogène

(Kit OPTI-4CN, BIORAD).

- Visualisation :

Les bandes sont semi-quantifiées par densitométrie après analyse d'images à l'aide du logiciel (système BIO-PROFIL<sup>®</sup> logiciel BIO-1D) (VILBERT-LOURMAT - France).

### III.6.2 Efficacité des apialogalacturonanes en oncologie cellulaire et moléculaire

#### III.6.2.1. Lignée cellulaire

Les études ont été menées sur des cellules de la lignée tumorale A431 provenant de l'ATCC (American Type Collection Culture). Cette lignée d'un carcinome épidermoïde vulvaire humain se caractérise par une morphologie de cellules épithéliales et un grand nombre de récepteurs à l'EGF (Malliri *et al.*, 1998). Par ailleurs, ces cellules sécrètent une quantité importante de VEGF, favorisant l'angiogenèse (Melnyk *et al.*, 1996).

---

\* Malliri A., Symons M., Hennigan R.F., Hurlstone A.F., Lamb R.F., Wheeler T., Ozanne B.W., The transcription factor AP-1 is required for EGF-induced activation of Rho-like GTPases, cytoskeletal rearrangements, mobility, and in vitro invasion of A 431 cells, *J. Cell Biol.*, **1998**, 143, 1087-1099.

\* Melnyk O., Shuman M.A., Kim K.J., Vascular endothelial growth factor promotes tumor dissemination by a mechanism distinct from its effect on primary tumor growth, *Cancer Res.*, **1996**, 56, 921-924.

### III.6.2.2. Entretien cellulaire

La lignée cellulaire est cultivée dans un milieu de culture DMEM (4500mg/mL de glucose, pyruvate de sodium et glutaMAX), enrichi de 10% de sérum de veau foetal (SVF) décomplémenté et contenant un mélange d'antibiotiques (50UI/mL de pénicilline, 50µg/mL de streptomycine) (Invitrogen). Les cellules sontensemencées dans des T75 (Falcon) à raison de  $5 \cdot 10^5$  à  $10^6$  cellules/10mL de milieu de culture et maintenues en culture dans un incubateur à 37 °C et 5 % de CO<sub>2</sub> en atmosphère humide. A confluence, les cellules sont rincées avec une solution saline de phosphate tamponnée (PBS ; Gibco) puis détachées par une solution de trypsine-EDTA (0,025 % de trypsine, 0,01 % d'EDTA ; Invitrogen) et ré-ensemencées au 1/10<sup>ème</sup> de la confluence dans de nouvelles boîtes de culture. Chaque trypsination correspond à un passage numéroté.

### III.6.2.3. Etude de la viabilité cellulaire

#### **III.6.2.3.a Tests MTT**

L'effet des différents composés sur la viabilité cellulaire a été étudié grâce à un test MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium ; Sigma-Aldrich) (Mosmann, 1983).

#### III.6.2.3.b Etude des effets de doses et du temps

Les cellules sontensemencées dans des plaques de 96 puits (Falcon) à raison de  $5 \cdot 10^3$  cellules/100µL dans du milieu complet (10% de SVF). Après 24h de culture, le milieu est enlevé et remplacé par du milieu à 2% de SVF contenant des concentrations croissantes de produits. Après 72h de traitement, les cellules sont rincées au PBS puis incubées avec 100µL de MTT (0,2mg/mL de PBS) pendant 4h à 37 °C et 5 % de CO<sub>2</sub>. Le MTT, réduit en bleu de formazan, est solubilisé par l'addition de 100µL/puits de DMSO (diméthylsulfoxyde ; Sigma-Aldrich). La densité optique (DO) est mesurée à 595nm grâce à un lecteur de plaque

---

\* Mosmann T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxic assays, *J. Immunol. Methods*, **1983**, 65, 55-63.

Labsystem Multiskan MS. Le pourcentage de viabilité cellulaire (%V) est déterminé selon la formule suivante :

$$\%V = [\text{DO}_{\text{cellules traitées}} / \text{Moy}(\text{DO}_{\text{cellules non traitées}})] \cdot 100$$

### III.6.2.3.c Etude de la migration et de l'invasion cellulaire

Nous avons étudié les effets de l'AGU sur la migration et l'invasion des cellules A431. Pour cela, nous avons utilisé des chambres de culture (ou chambre de migration) appelées chambres de Boyden (Becton Dickinson). Ces chambres sont composées d'inserts constitués d'une membrane poreuse (membrane de 0,3cm<sup>2</sup>, pores de 8µm), placés dans des plaques de 24 puits (plaques compagnons ; Falcon ; Becton Dickinson).

- *Préparation des inserts pour la migration*

Pour l'étude de la migration cellulaire, l'intérieur des inserts (déposés dans les puits de la plaque compagnon) est recouvert de 100µL de fibronectine (à 100µg/mL dans du PBS) par insert. Après une nuit à 4 °C, l'excédent de fibronectine est enlevé, les membranes sont rincées deux fois au PBS puis saturées 1 heure avec 1 % de BSA (albumine bovine ; Sigma-Aldrich). Le milieu avec 1 % BSA est enlevé.

- *Préparation des inserts pour l'invasion*

Pour l'étude de l'invasion cellulaire, l'intérieur des inserts (déposés dans les puits de la plaque compagnon) est recouvert par 100µL de Matrigel à (10mg/mL PBS ; Becton Dickinson). La plaque de culture est alors placée dans l'incubateur à 37 °C pendant 3 heures, puis sous une hotte à flux laminaire (12 à 24 heures) pour permettre la polymérisation du Matrigel. Les inserts sont stockés à 4 °C puis réhydratés 24 heures avant l'expérience avec 500µl de milieu.

- *Préparation des cellules pour la migration*

Les cellules A431 sont ensemencées dans des T25 à raison de  $1,7 \cdot 10^6$ - $2 \cdot 10^6$  cellules/5mL/T25 dans du milieu de culture à 10 % de SVF. Après 24h, les cellules sont rincées au PBS puis traitées par 6 µg/ml et 25 µg/ml d'AGU (dilution dans du milieu à 10% de SVF) pendant 24h. Des cellules, servant de témoins, ne sont pas traitées (milieu 10 % SVF). Après les traitements par les différents composés pectiques, les cellules sont rincées au PBS, détachées à la trypsine, puis comptées. Elles sont alors diluées dans du milieu dépourvu de sérum mais additionné de 0,1 % de BSA.

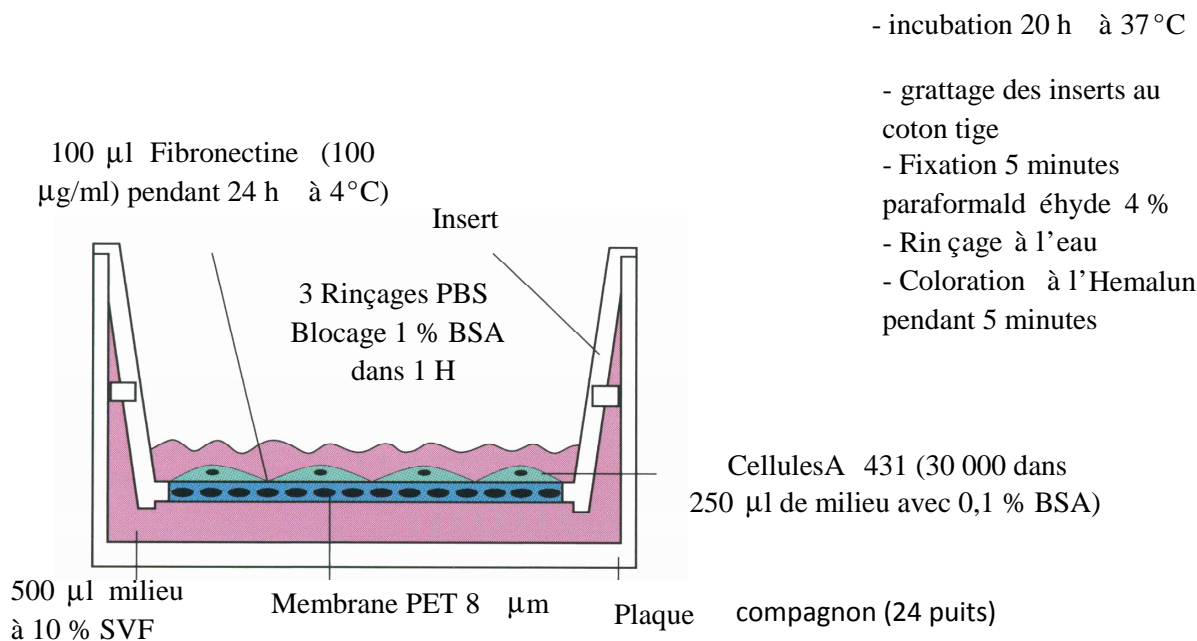
- *Préparation des cellules pour l'invasion*

**Les cellules ne sont pas pré-traitées mais sont mises en même temps que l'AGU à 6µg/ml et 25µg/ml dans les inserts.**

- *Migration cellulaire*

Les cellules pré-traitées et non traitées (témoins) sont déposées dans les inserts recouverts de fibronectine à raison de  $10 \cdot 10^4$  cellules/500µL/insert dans du milieu 0,1 % de BSA. Du milieu à 10 % de SVF est placé comme chémoattractant dans les puits de la plaque compaignon (500µL/puits), afin de permettre la formation d'un gradient chimiotactique de part et d'autre de la membrane poreuse (Figure 75). Après 24h de migration dans l'incubateur à 37 °C, le surnageant est enlevé et les inserts sont rincés au PBS sur chaque face. Les cellules n'ayant pas migré au travers des pores (face interne des inserts) sont éliminées par grattage avec un coton-tige, celles qui ont migré sur la fibronectine (face externe des inserts) sont fixées pendant 10min au méthanol, puis colorées au crystal violet. Les cellules sont comptées au microscope (Zeiss Axiophot). L'ensemble des cellules est compté (grossissement X200) et les pourcentages de migration sont déterminés en comparant le nombre de cellules pré-traitées qui ont migré ( $N_{\text{traitées}}$ ) au nombre de cellules non traitées qui ont migré ( $N_{\text{non traitées}}$ ). Ainsi :

$$\% \text{Migration} = (N_{\text{traitées}} / N_{\text{non traitées}}) \cdot 100$$



**Figure 75** : Principe de la migration et de l'invasion cellulaires en chambre de Boyden.

#### III.6.2.3.d Zymographie

Les cellules non traitées sont déposées dans les inserts recouverts par le Matrigel à raison de  $10 \cdot 10^4$  cellules/500 $\mu$ L/insert dans du milieu 0,1 % de BSA contenant différentes concentrations d'AGU. Comme précédemment, du milieu à 10 % de SVF est placé dans les puits de la plaque compagnon (500 $\mu$ L/puits). Après 24h d'invasion dans l'incubateur à 37 °C, les inserts sont récupérés et les cellules ayant traversé le Matrigel sont lavées, fixées, colorées et comptées comme décrit pour l'étude de la migration. Des pourcentages d'invasion cellulaire sont calculés de la même manière que les pourcentages de migration.

- **Principe**

L'activité gélatinolytique des métalloprotéases 2 et 9 contenues dans les surnageants de culture ainsi que celle de leurs formes zymogènes est étudiée par zymographie. Il s'agit d'une électrophorèse SDS-PAGE effectuée en conditions non réductrices. Le substrat de la protéase étudiée (gélatine) est copolymérisé avec l'acrylamide.



Les cellules sontensemencées dans des plaques de 6 puits (Falcon) à raison de  $50.10^4$  cellules/2mL dans du milieu complet (10 % de SVF). L'expérience comporte des temps de traitement des cellules de 24h, 48h et 72 h. Après 24h de culture, le milieu est enlevé et remplacé par du milieu sans SVF pour les cellules non traitées, et par l'AGU pour les cellules traitées pour la première plaque. Les autres plaques sont maintenues avec 10 % de SVF pour 24h et 48 h supplémentaires. Les surnageants des cellules A431 (sans sérum) sont récoltés toutes les 24 heures de traitement. Les surnageants sont concentrés avec des centricons 1000g pendant 1h30 (Millipore) puis dilués dans un tampon d'échantillon non réducteur SDS 4X, 30 minutes à température ambiante avant le dépôt sur un gel de polyacrylamide 10 % copolymérisés avec 1 mg/mL de Gélatine (Gélatine type B ; Sigma-Aldrich) ; substrat préférentiel des MMP-2 et MMP-9. L'électrophorèse débute à 60V pendant 20 minutes puis continue à 160V à 4 °C. Après migration, le SDS est éliminé par des lavages successifs dans une solution de Triton sous agitation à température ambiante pour permettre la renaturation des protéines, puis à l'eau distillée. Les gels sont incubés dans un tampon de digestion (50mM Tris-HCl pH 7,4 ; 0,2M NaCl ; 5 mM CaCl<sub>2</sub> ; 0,05 % Brij 35) contenant les éléments nécessaires à l'activité enzymatique des MMPs durant 19 heures à 37 °C. Le gel est enfin coloré pendant 1 heure dans une solution à 30 % de méthanol, 10 % d'acide acétique et 0,5 % de Bleu de Coomassie R.250 puis décoloré dans des bains à 30 % de méthanol, 10 % d'acide acétique. Les gélatinases sont révélées par une bande claire sur un fond bleu, correspondant à la protéolyse locale de la gélatine dans le gel.

Sur chacun des zymogrammes réalisés, une fraction de surnageant issue de la culture de la lignée HT1080 (Fibrosarcome humain, ATCC) et sécrétant les pro-MMP2 et pro-MMP9 en quantité importante est déposée en parallèle des échantillons analysés. La quantification des plages de lyse est effectuée par analyse semi-automatique. La surface ( $\mu\text{m}^2$ ), ainsi que la densité grise des plages de lyse sont mesurées pour chaque dépôt effectué, les activités pro-MMP2 sont alors exprimées en teinte gris/ $\mu\text{m}^2$ . Les activités ainsi mesurées sont ramenées au nombre de cellules déterminées dans chaque puits dont sont issus les échantillons analysés (dosage de protéines). De façon à pouvoir normaliser l'ensemble des valeurs obtenues et effectuer une comparaison des activités mesurées à partir des différents gels, la valeur d'activité mesurée pour la plage de lyse correspondant à l'activité pro-MMP2 sécrétée par HT1080 est prise pour référence et chacune des valeurs lui est comparée.

## **Bibliographie :**

## **Bibliographie :**

### **A**

Agache P., *Physiologie de la peau et explorations fonctionnelles cutanées : Histopathologie du stratum corneum*, Editions EM inter, **2000**, 101-106.

Aspinall G.O., Kessler G., The structure of callose from the grape vine, *Chemistry and Industry*, **1957**, 1296.

Axelos M.A., Thibault J.F., The chemistry of low methoxyl pectin gelation, In : *The chemistry and technology of pectin*, Walter R.H. (Ed.), Academic Press New York, **1991**, pp 109.

### **B**

BeMiller J.N., Acid-catalysed hydrolysis of glycosides. *Advances in Carbohydrate Chemistry*, **1967**, 22, 25-108.

Bidlack J., Malone M., Benson R., Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants, *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science*, **1992**, 72, 51-56.

Blakeney A.B., Harris P.J., Henry R.J., Stones B.A., A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis, *Carbohydrate Research*, **1983**, 113, 291-299.

Blumenkrantz N., Asboe-Hansen G., New method for quantitative determination of uronic acids, *Analytical Biochemistry*, **1973**, 54(2), 484-489.

Bonner J., The chemistry and physiology of the pectins, *The Botanical Review*, **1936**, 2, 475-497.

Bonnin E., Renard C., Thibault J.F., Ducroo P., Les enzymes de dégradation des parois végétales : mode d'action et utilisations alimentaires. Dans : *Enzymes en agro-alimentaire*, V. Larreta-Garde, Editions Lavoisier Tec&Doc, **1997**, pp. 168-193.

Brillouet J.M., Bosso C., Moutonet M., Isolation, purification and characterization of an arabinogalactan from a red wine, *American Journal of Enology and Viticulture*, **1990**, 41, 29-36.

## C

Caro D., *Stratum corneum*, une barrière protectrice à ménager, *Cosmétologie*, **2000**, 28, 10-12.

Carpita, N.C., Gibeaut, D.M., Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth, *Plant Journal*, **1993**, 3(1), 1-30.

Carpita N., Mc Cann M., The cell wall, *American society of plant physiologists*, **2000**, 2, 52-76.

Cescutti P., Toffanin R., Pollesello P., Sutherland I.W., Structural determination of acidic exopolysaccharide produced by *Pseudomonas sp.* Strain 1.15., *Carbohydrate Research*, **1999**, 315, 159-168.

Chambers R.E., Clamp J.R., An assesement of methanolysis and other factor used in analysis of carbohydrate-containing material, *Journal of Biochemistry*, **1971**, 125, 1009-1018.

Cheng, L., Kindel P. K., Detection and homogeneity of cell wall pectic polysaccharides of *Lemna minor L.*, *Carbohydrate Research*, **1997**, 301(3-4), 205-212.

Ciancia M., Cerezo A.S., Autohydrolysis of polysaccharides, *Carbohydrate Research Brazil*, **1993**, 45, 54-61.

Ciullo P.A., Anderson M., Xanthan gum, a clearly better stabilizer, *Söfw Journal*, **2000**, 126(6), 34-36 .

## D

Dabrowski J., Two-dimensional proton magnetic resonance spectroscopy, In Ginsburg, V. (Eds), *Methods in Enzymology*, Academic Press Inc, **1989**, 179, 122-156.

Darvill A.G., Mc Neil M., Albersheim P., Structure of plant cell wall. 8. A new pectic polysaccharides, *Plant physiology*, **1978**, 62, 418-422.

Darvill A.G., Albersheim P., Mc Neil M., Lau J.M., York W.S., Stevenson T.T., Thomas J., Doares S., Gollin D.J., Chelf P., Davis K., Structure and function of plant cell wall polysaccharides, *Journal of Cell Science (Suppl.)*, **1985**, 2, 203-217.

Deters A.M., Schröder K.R., Hensel A., Kiwi fruit polysaccharides exert stimulating effects on cell proliferation via enhanced growth factors, energy production, and collagen synthesis of human keratinocytes, fibroblasts and skin equivalents, *Journal of Cellular Physiology*, **2005**, 202, 717-722.

Deters A.M., Lengsfeld C., Hensel A., Oligo- and polysaccharides exhibit a structure dependent bioactivity on human keratinocytes in vitro, *Journal of Ethnopharmacology*, **2005**, 102, 391-399.

Di Benedetto M., Starzec A., Vassy R., Perret GY., Crepin M., Kraemer M., Inhibition of epidermoid carcinoma A 431 cell growth and angiogenesis in nude mice by early and late treatment with a novel dextran derivative, *British Journal of Cancer*, **2003**, 88,1987-1994.

Doco T., O'Neill M.A., Pellerin P., Determination of the neutral and acidic glycosyl residue compositions of plant polysaccharides by GC-EI-MS analysis of trimethylsilyl methyl glycoside derivatives, *Carbohydrates Polymers*, **2001**, 46, 249-259.

Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F., Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Analytical Chemistry*, **1956**, 28, 350-356.

## **E**

Egelrud T., Desquamation in the *stratum corneum*, *Acta Dermato-Venereologica*, **2000**, 208, 44-45.

Elias P.M., Ghadially R., The aged epidermal permeability barrier: basis for functional abnormalities, *Clinics in Geriatric Medicine*, **2002**, 18, 103-120.

## F

Fishman M.L., Chau H.K., Hoagland P., Ayyad K., Characterization of pectin, flash extracted from orange albedo by microwave heating, under pressure, *Carbohydrate Research*, **2000**, 323, 126-138.

Flandroy L., Histoire stimulante des sucres, *Biofutur*, **1996**, 159, 35-41.

Fry S.C., Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms, *Annual Review of Plant Physiology*, **1986**, 37, 165-186.

## G

Gloaguen V., Krausz P., Barrier function and dry skin : Use of rhamnogalacturonans as a new therapeutic strategy, *Söwf Journal*, **2004**, 130, 20-26.

Golovchenko V.V., Ovodova R.G., Shashkov A.S., Ovodov Y.S., Structural studies of the pectic polysaccharide from duckweed *Lemna minor* L., *Phytochemistry*, **2002**, 60, 89-97.

Gougerot-Schwartz A., Hydratation et produits hydratants, *Encycl Méd Chir, Cosmétologie et dermatologie esthétique*, Editions scientifiques et médicales Elsevier, Paris, **2000**, 50-160-B-10, pp 7.

Guenin E., Ledoux D., Oudar O., Lecouvey M., Kraemer M., Structure-activity relationships of new class of aromatic bisphosphonates that inhibit tumor cell proliferation in vitro, *Anticancer Research*, **2005**, 25, 1139-1145.

## H

Hafték M., *Stratum corneum*, *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*, **2002**, 129,

117-122.

Hamma-Kourbali Y., Di Benedetto M., Ledoux D., Oudar O., Leroux Y., Lecouvey M., Kraemer M., A novel non containing-nitrogen bisphosphonate inhibits both in vitro and in vivo angiogenesis, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2003**, 310, 816-23.

Heissig B., Hattori K., Friedrich M., Rafii S., Werb Z., Angiogenesis: vascular remodeling of the extracellular matrix involves metalloproteinases, *Current Opinion in Hematology*, **2003**, 10, 136-141.

Hirano M., Kiyohara H., Yamada H., Existence of rhamnogalacturonane II- like region bioactive pectin from medicinal herbs, *Planta Medica*, **1994**, 60(5), 450-454.

Hirst E.L., Jones J.K.N., The constitution of Damson gum. Part I. Composition of Damson gum and structure of aldobionic acid (glycuronosido-2-mannose) derived from it, *Journal of Chemistry Society*, **1938**, 1174-1180.

Hwang J.H., Lee K.H., Yu K.W., Characterization of the immunologically active of *Glycyrrhiza uralensis* prepared as herbal Kinchi, *Neutraceutical Food*, **2003**, 8 (1), 29-35.

## I

Ishii T., O-acetylated oligosaccharides from pectins of potato tuber cell wall, *Plant Physiology*, **1997**, 113, 1265-1272.

Inngjerdingen K., Michaelsen T.E., Diallo D., Paulsen B.S., In: Perez S. (ed) Abstracts, 12th European Carbohydrate Symposium, **2003**, pp 210.

## J

Johnson D.L., Cyclic amine oxides as solvents for natural and synthetic polymers, *Brit.*, **1969**, pp 9.

Jouandeaud M., Moreau L., Chauprade Ch., Guichard N., Closs B., Gloaguen V., Barrier function and dry skin : use of rhamnogalacturonans as a new therapeutic strategy, *Söfw-Journal*, **2004**, 4, 130.

## K

Kacurakova M., Capek P., Sasinkova V., Wellner N., Ebringerova A., FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses, *Carbohydrate Polymers*, **2000**, 43, 195-203.

Kashyap D.R., Vohra P.K., Chopra S., Tewari R., Applications of pectinases in the commercial sector : a review, *Bioresource Technology*, **2001**, 77, 215-227.

Kamerling J.P., Gerwig G.J., Vliegthart J.F.G., Clamp J.R., Characterization by gas liquid chromatography mass spectroscopy of pertrimethylsilyl glycosides obtained in the methanolysis of glycoproteins and glycolipids, *Journal of Biochemistry*, **1975**, 151, 491-495.

Kee S.H., Steinert P.M., Microtubule disruption in keratinocytes induces cell-cell adhesion through activation of endogenous E-cadherin, *Molecular Biology of the Cell*, **2001**, 12, 1983-1993.

Keegstra K., Talmadge K.W., Bauer W.D., Albersheim P., Structure of plant cell walls .III. A model of suspension-cultured sycamore cells based on the inter-connections of macromolecular components, *Plant Physiology*, **1973**, 51, 188-197.

Khasina E.I., Sgrebneva M., Ovodova R.G., Golovchenko V.V., Ovodov Y.S., Gastroprotective effect of lemnan, a pectic polysaccharide from *Lemna minor L.*, *Doklady Biological Sciences*, **2003**, 390, 204-206.

Kindel P. K., Cheng L., Ade B., *Phytochemistry*, **1995**, 41, 719-723.

Kiyohara H., Yamada H., Structure of an anti-complementary arabinogalactan from root of *Angelica acutiloba kitagawa* , *Carbohydrate Research*, **1989**, 193, 173-192.



Kioyohara H., Takemoto N., Zhao J.F., Kawamura H., Yamada H., Pectic polysaccharides from roots of *Glycyrrhiza uralensis*: possible contribution of neutral oligosaccharides in the galacturonase-resistant reion anti-complementary and mitogenic activities, *Planta Medica*, **1996**, 62 (1), 14.

Kiyohara H., Zhang Y., Yamada H., Effect exo- $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 3)-galactanase digestion on complement activating activity of neutral arabinogalactan unit in a pectic arabinogalactan from roots of *Angelica acutiloba* Kitagawa, *Carbohydrates Polymers*, **1997**, 32, 249-253.

Kuribayashi T., Properties of pressure extracted from *Satsuma mandarin* by pressure treatment, Colloque INSERM, **1992**, 224, 337-339.

## L

Leung M.Y.K. , Liu C. , Koon J.C.M. , Fung K.P. , Polysaccharide biological response modifiers, *Immunology Letters*, **2006**, 105, 101-104.

Lever M., New reaction for colorimetric determination of carbohydrates, *Analytical Biochemistry*, **1972**, 47(1), 273-279.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr L., Randall R.J., Protein measurement with the folin phenol reagent, *Journal of Biological Chemistry*, **1951**, 193, 265-275.

## M

Malliri A., Symons M., Hennigan R.F., Hurlstone A.F., Lamb R.F., Wheeler T., Ozanne B.W., The transcription factor AP-1 is required for EGF-induced activation of Rho-like GTPases, cytoskeletal rearrangements, mobility , and in vitro invasion of A 431 cells, *The Journal of Cell Biology*, **1998**, 143, 1087-1099.

Mansell P.W.A., Polysaccharides in skin care, *Cosmetics and Toiletries*, **1994**, 109, 67-72.

Marga F., Freyssac V., Morvan H., Rapid gas liquid chromatography microanalysis of carbohydrates in woody plant tissues, *Journal of Trace and Microprobe Techniques*, **1995**, 13(4), 473-478.

Martini M.C., Seiller M., *Actifs et additifs en cosmétologie*, Tec et doc Lavoisier, **1992**, pp 630.

Martini M.C., La riche palette des actifs hydratants en dermocosmétique, *bedc*, **2002**, 10, 8, 245-250.

Matar D., Catesson A.M., *Protoplasma*, **1988**, 146, 10-17.

Matoh T., Takasaki M., Takabe K., Boron nutrition of cultured tobacco BY-2-cells. III. Characterization of boron rhamnogalacturonan II complex in cells acclimated to low levels of boron, *Plant and Cellular Physiology*, **2000**, 41, 363-366.

Mc Cormick C.L., Shen T.C., A new cellulose solvent for preparing derivatives under homogenous conditions, *Organic Coatings and Plastics Chemistry*, **1981**, 45, 335-338.

Mc Neil M., Darvill A., Albersheim P., The structural polymers of the primary cell walls of dicots. In : Cantor, Ch(Ed.), *Progress in the chemistry organic natural products*. Viena: Springer-Verlag, **1979**, 29, 191-195.

Mc Neil M., Darvill A.G., Albersheim P., Structure of cell walls. X. Rhamnogalacturonan I, a structurally complex pectic polysaccharide in the walls of suspension-cultured sycamore cells, *Plant Physiology*, **1980**, 66, 1128-1134.

Mc Neil M., Darvill A.G., Fry S.C., Albersheim P., Structure and function of the primary cell walls of the primary cell walls of plants, *Annual Review of Biochemistry*, **1984**, 53, 625-664.

Melnyk O., Shuman M.A., Kim K.J., Vascular endothelial growth factor promotes tumor dissemination by a mechanism distinct from its effect on primary tumor growth, *Cancer Research*, **1996**, 56, 921-924.

Michalski J.C., Analysis of monosaccharides by GLC and by HPLC. In : Verbert, A., (Eds.), *Methods on glycoconjugates*, Harwood Academic Press, Chur, Switzerland, **1986**, 31-38.

Molès J.P. , Prolifération et communication kératinocytaire, Rôle des protéines WNT dans le contrôle du potentiel prolifératif des kératinocytes, Séminaire d'enseignement COBIP, **2001**, 13-16.

Mollet J.C., *La paroi primaire végétale*, Habilitation à Diriger les Recherches, Université d'Artois, **2006**, pp 121.

Moine C., Krausz P., Chaleix V., Kraemer M., Gloaguen V., Structural characterization and cytotoxic properties of a 4-O-Methylglucuronoxylan from *Castanea sativa*, *Journal of Natural Product*, **2007**, 70 (1), 60-66.

Montreuil J., Spik G., Chosson A., Segard E., Scheppler N., Methods of study of the structure of glycoproteins, *Journal de Pharmacie de Belgique*, **1963**, 18, 529-546.

Montreuil J., Bouquelet S., Debray H., Fournet B., Spik G., Strecker G., Glycoproteins, In : Chaplin, M.F., Kenedy, J.F. (Eds), *Carbohydrate analysis a practical approach*, IRL Press, Oxford, Washington D.C., **1986**, 143-204.

Morris E.R., Rees D.A., Thom D., Boyd J., Chiroptical and stoichiometric evidence of a specific primary dimerisation process in alginate gelation, *Carbohydrate Research*, **1978**, 66, 145-154.

Mosmann T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays, *Journal of Immunological Methods*, **1983**, 65, 55-63.

Myoken Y., Kayada Y., Okamoto T., Kan M., Sato G. H., Sato J. D., Vascular endothelial cell growth factor (VEGF) produced by A 431 human epidermoid carcinoma cells and identification of VEGF membrane binding sites, *Proceedings of the National Academy of Sciences, U S A*, **1991**, 88, 5819-5823.

## N

Nergard C.S., Diallo D., Michaelsen T.E., Malterud K.E., Kiyohara H., Matsumoto T., Yamada H., Paulsen B., Isolation partial characterisation and immuno-modulating activities

of polysaccharides from *Vernonia Kotschyana* Sch. Bip. Ex Walp, *Journal of Ethnopharmacology*, **2004**, 91,141-152.

Nergard C.S., Matsumoto T., Inngjerdigen M., Inngjerdigen K., Hokputsa S.; Harding S.E., Michaelsen T.E., Diallo D., Kioyara H., Paulsen S.P., Yamada Structural and immunological studies of pectin and a pectic arabinogalactan *Vernonia kostchyana* Sch. Bip. Ex Walp (*Asteracea*), *Carbohydrate research*, **2005**, 340, 115-130.

## O

O'Neill M., Albersheim P., Darvill A., The pectic polysaccharides of primary cell walls, *Methods in plant biochemistry*, academic press london, **1990**, 415-441.

Ovodova R. G., Vas'Kovskii V. E., Ovodov Y. S., The pectic substances of *Zosteraceae*, *Carbohydrate Research*, **1968**, 6, 328-332.

Ovodova R. G., Ovodov Y. S., Pectic substances *Zosteraceae* II, *Carbohydrate Research*, **1969**, 10, 387-390.

Ovodova R. G., Golovchenko V. V., Shashkov A. S., Popov S., Ovodov Y. S., Structural studies and physiological activity of lemnan, a pectin from *Lemna minor* L., *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, **2000**, 26, 669-676.

Ovodov Y. S., Mikheiskaya L. V., Ovodova R. G., Krasikova I. N., Pectic substances of zosteracea. IV. Pectinase digestion of zosterine, *Carbohydrate Research*, **1971**, 18, 311-318.

Ovodov Y. S., Mikheiskaya L. V., Ovodova R. G., Krasikova I. N., Pectic substances of zosteraceae. V. Smith degradation of zosterine, *Carbohydrate Research*, **1971**, 18, 319-322.

## P

Panchev I., Kirchev N., Krachanov Kh., Improving pectin technology II. Extraction using ultrasonic treatment, *International Journal of Food Science and Technology*, **1988**, 23(4), 337-341.

Paulsen B.S., Biologically active polysaccharides as possible lead compounds, *Phytochemistry Reviews*, **2002**, 1, 379-389.

Paulsen B.S., Barsett H., Bioactive pectic polysaccharides, *Advances Polymers Sciences*, **2005**, 186, 69-101.

Pauly M., Freis O., Pauly G., Les polysaccharides en cosmétologie de soins, *Parfums Cosmétiques Actualités*, **1998**, 140, 41-47.

Pauly M., Freis O., Pauly G., Galactomannan and xyloglucan: Bio-active polysaccharides, *Cosmetics and Toiletries*, **1999**, 114, 7, 65-78.

Pérez S., Les vertus cachées des sucres, *Biofutur*, **1997**, 171, 21-23.

Pérez.S, Rodriguez-Carjaval M.A., Doco T., A complex plant cell wall polysaccharide: rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function, *Biochimie*, **2003**, 85, 109-121.

Pilnik W., Pectin, a many spendoured thing. G.O. Philips, P.A. Williams & D.J. Wedlock (Eds), In: *Gums and stabilizers for the food industry*, Oxford University Press, **1990**, 313-262.

Popa V.I., Hemicelluloses, In: *Polysaccharides in Medicinal Applications*, **1996**, 107-124.

Popov S. V., Golovchenko V. V., Ovodova R. G., Smirnov V. V., Khramova D. S., Popova G. Y., Ovodov Y. S., Characterization of the oral adjuvant effect of lemnan, a pectic polysaccharide of *Lemna minor* L., *Vaccine*, **2006**, 24, 5413-5419.

Popov S. V., Ovodova R. G., Ovodov Y. S., Effect of Lemnan, pectin from *Lemna minor* L., and its fragment on inflammatory reaction, *Phytotherapy Research*, **2006**, 20, 403-407.

## Q

Qi X.Y., Behrens B.X., West P.R., Mort A.J., Solubilization and partial characterization of extensin fragments from cell-walls of cotton suspension cultures : evidence for a covalent cross-link between extensin and pectin, *Plant physiology*, **1995**, 108, 1691-1701.

## R

Ralet M.C., Bonin E., Thibault J.F., Pectins. Dans : *Biopolymers vol. 8, Polysaccharides II*, Steinbüchel A. (Ed.), Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, **2002**, 12, 345-380.

Rawlings A., Harding C., Watkinson A., Banks J. Ackerman C., Sabin R., The effect of glycerol and humidity on desmosomes degradation in stratum corneum, *Archives of Dermatological Research*, **1995**, 287, 457-464.

Rawlings A.V., Advances in stratum corneum biology and understanding of dry skin, *Cosmetics and Toiletries*, **2003**, 118, 8, 26-44.

Redgwell R.J., Melton L.D., Brasch D.J., Cell wall dissolution in ripening kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). Solubilization of pectic polymers, *Plant Physiology*, **1992**, 98, 71-81.

Rees D.A., Polysaccharide gel. A molecular view, *Chemistry and Industry*, **1972**, 16, 630-636.

Reiter W.D., Biosynthesis and properties of plant cell wall, *Current Opinion in Plant Biology*, **2002**, 5, 536-542.

Renard C., *Etudes des polysaccharides pariétaux de la pomme extraction et caractérisation par des méthodes chimiques et enzymatiques*, thèse, **1989**, pp 152.

Ridley B.L., O'Neil M.A., Mohnen D., Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling, *Phytochemistry*, **2001**, 57, 929-967.

Robert D., Roland J.C., *Biologie végétale*, volume 1, Organisation cellulaire, Ed. Doin, Paris, **1998**, pp 367.

Roberts K, The plant extracellular matrix: in a new expansive mood, *Current Opinion in Cell Biology*, **1994**, 6, 1020-1027.

Roland J.C., Visualisation des polysaccharides au niveau ultrastructural. Dans : *Les Polymères Végétaux. Polymères Pariétaux et Alimentaires non azotés*. Ed. Gauthier-Villars, Paris, **1980**, 30-45.

Rodriguez-Carjaval M.A., Du Penhoat C.H., Mazeau K., Doco T., Pérez S., The three dimensional structure of mega-oligosaccharide rhamnogalacturonan II monomer : a combined molecular modeling and NMR investigation, *Carbohydrate research*, **2003**, 338, 651-671.

## S

Savary B.J., Hotchkiss A.T., Fishman M.L., Cameron R.G. & Shatters R.G., Development of a Valencia orange pectin methyl esterase for generating novel pectin products, F. Voragen, H. Schols & R. Visser (Eds), In: *Advances in pectin and pectinase research*, Kluwer Academic Publishers , **2003**, 345-361.

Schols H.A., Bakx E.J., Schipper D., Voragen A.G.J., A xylogalacturonan subunit present in the modified hairy regions of apple pectin, *Carbohydrate Research*, **1995**, 279, 265-279.

Schols H.A., Vierhus E., Bakx E.J., Voragen A.G.J., Different populations of hairy regions occur in apple cell walls, *Carbohydrate Research*, 275, **1995**, 343-360.

Shin K.S., Kiyohara H., Matsumoto T., Yamada H, Rhamnogalacturonan II dimers cross-linked by borate diesters from the leaves of *Panax ginseng* C.A. Meyer are responsible for expression of their IL-6 production enhancing activities, *Carbohydrate Research*, **1998**, 307, 97

Singh M., Singh S.S., Sanwal G.G., 1978. A new colorimetric method for determination of phenolics, *Indian Journal of Experimental Biology*, **1978**, 16, 712-714.

Sjöström E., Westermark U., Chemical composition of wood and pulps : basic constituents and their distribution, In: Sjöström E., Alén R. (eds), *Analytical Methods in wood chemistry, pulping, and papermaking*. Springer series in wood sciences, **1999**, 1-19.

Snyder J.R., Serianni A.S., DL-apiose substituted with stable isotopes: synthesis, n.m.r.-spectral analysis, and furanose anomerization, *Carbohydrate Research*, **1987**, 166(1), 85-99.

Srivastava R., Kulshreshtha D., Bioactive polysaccharides from plants, *Phytochemistry*, **1989**, 28(11), 2877-2883.

Strecker G., Analyse structurale des chaînes glycaniques, *Biofutur*, **1993**, 125, 46-52.

Strecker G., NMR, In: Verbert, A.(Eds.), *Methods on glycoconjugates*, Harwood Academic Publishers, **1995**, 137-145.

Suzuki Y., Koyama J., Moro O., Horii I., Kikuchi K., Tanida K., Tagami H., The role of two endogenous proteases of the stratum corneum in degradation of desmoglein-1 and their reduced activity in the skin of ichthyotic patients, *British Journal of Dermatology*, **1996**, 134, 3, 460-464.

## T

Talmadge KW, Keegstra K, Bauer WD, Albersheim P, Structure of plant cell walls. I. Macromolecular components of the walls of suspension-cultured sycamore cells with a detailed analysis of the pectic polysaccharides, *Plant Physiology*, **1973**, 51(1), 158-173.

Thakur B.R, Singh R.K., Handa A.K., Chemistry and uses of pectin a review, *Critical reviews in food science and nutrition*, **1997**, 37(1), 47-73.

Thibault J.F., Les pectines, Dans : *Les polymères végétaux, polymères pariétaux et alimentaires non azotés*, Ed Gauthier-Villars, Paris, **1980**, 232-251.



Thibault J.F., Renard C., Guillon F., Physical and chemical analysis of dietary fibres in sugar beet and vegetables, Jackson J.F., Linsken H.F. (Eds), In : *Modern methods of plant analysis, Vegetables and vegetable products*, Springer Verlag Berlin, **1994**, 16, 23-55.

Thomas J.R., Darvill A.G., Albersheim P., Rhamnogalacturonan I, a pectic polysaccharide that is a component of monocot cell walls, *Carbohydrate Research*, **1989**, 185, 279-306.

Thompson J.E., Fry S.C., Evidence for covalent linkage between xyloglucan and acidic pectin in suspension-cultured rose cells, *Planta* , **2000**, 211, 275-286.

Timell T.E., Enterman W., Spencer F., Soltes E.J., The acid hydrolysis of glycosides, II, effect of substituents at C-5, *Canadian Journal of Chemistry*, **1965**, 43, 2296.

Tucker G.A., Mitchell J., Cell walls, structure, utilisation and manipulation, *Plant Biotechnology*, **1993**, 55-103.

## V

Valent BS, Albersheim P, The structure of plant cell walls. V. On the binding of xyloglucan to cellulose fibers, *Plant Physiology*, **1974**, 54, 105-108.

Vidal S., Doco T., Williams P., Pellerin P., York W.S., O'Neill M., Gluska J., Darvill A.G., Structural characterization of pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II : evidence for the backbone location of aceric acid-containing oligoglycosyl side chain, *Carbohydrate Research*, **2000**, 326, 277-294.

Vidal S., Williams P., Doco T., Moutounet M., Pellerin P., The polysaccharides of red wine: total fractionation and characterization, *Carbohydrate Polymers*, **2003**, 54, 439-447.

Vincken J.P, Schols H.A., Oomen R.J.F.J., Mc Cann M.C., Ulvskov P., Voragen A.G.J., Visser R.G.F., If homogalacturonan were a side chain of rhamnoglacturonan I. Implications for cell wall architecture, *Plant Physiology*, **2003**, 132, 1781-1789.

Vliegthart, J.F.G., Dorland, L., Van Halbeck, H., High resolution <sup>1</sup>H-nuclear magnetic resonance spectroscopy as a tool in structural analysis of carbohydrate related to glycoproteins, *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, **1983**, 41, 209-374.

Voragen A.G.J., Pilnik W., Thibault J.F., Axelos M., Renard C., Pectins, Stephen A.M., Dea Y., (Eds), In : *Food polysaccharides*, Marcel Decker London, **1991**, 16, 265-270.

## W

Wallace G., Fry S.C., Phenolic components of the plant cell wall, *International Review of Cytology*, **1994**, 151, 229-267.

Wang S., Chen F., Wu J., Wang Z., Liao X., Hu X., Optimization of pectin extraction assisted by microwave from apple pomace using response surface methodology, *Journal of Food Engineering*, **2007**, 78, 693-700.

Wanner R., Wolff B., Glowacki F., Kolde G., Wittig B., The loss of desmosomes after retinoic acid treatment results in an apparent inhibition of HaCat keratinocyte differentiation, *Archives of Dermatological Research*, **1999**, 291, 346-353.

Watkinson A., Smith C., Coan P., Wiedow O., The role of pro-SCCE in desquamation, Proceedings of the XXIth IFSCC Int. Congress, Berlin, **2000**, 16-25.

Wesp E.F., Brode W.R., The absorption spectra of ferric compounds. I. The ferric chloride-phenol reaction, *Journal of the American Chemical Society*, **1934**, 56, pp 1037.

Willats W.G.T., Mc Cartney L., Mackie W., Knox J.P., Pectin: cell biology and prospects for functional analysis, *Plant Molecular Biology*, **2001**, 47, 9-27.

Willats G.T.W., Knox J.P., Mikkelsen J.D., Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel, *Trends in Food Science and Technology*, **2006**, 17, 97-104.

## Y

Yamada H., Kiyohara H., Complement-activating polysaccharides from medicinal herbs, In: Wagner H. (Ed), *Immunomodulatory Agents from Plants*, Basel, Switzerland: Birkhauser Verlag, **1999**, 161–202.

York W.S., Darvill A.G., MC Neil M., Stevenson T.T., Albersheim P., Isolation and characterization of plant cell walls and cell components, *Methods in Enzymology*, **1986**, 118, 3-40.

## **Z**

Zandleven J., Sorensen S.O., Harholt J., Beldman G., Schols H.A., Scheller H.V., Voragen A.J., Xylogalacturonan exists in cell walls from various tissues of *Arabidopsis thaliana*, *Phytochemistry*, **2007**, 68(8), 1219-26.

### **Site internet :**

<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/paroi/autres.htm>

[www.crc.uga.edu/~mao/rg2/intro.htm](http://www.crc.uga.edu/~mao/rg2/intro.htm)

### **Brevet :**

Brat P., Olle D., Reynes M., Alter P., Low pressure procedure for manufacture of pectin rich citrus extract, **2002**, brevet n° WO 2002013634.

Dal Farra C., Domloge N., Peyronnel D., Cosmetic composition for use for a range of cosmetic purposes, e.g. treatment of the signs of aging, comprises an extract of duckweed (*Lemna minor*) rich in apiose, **2003**, brevet n°FR2838962.

Paufique J., Procédé d'obtention d'un principe actif pour des traitements de la peau sèche, actions générées et actif obtenu, **2004**, brevet n°WO2004100915.

Sagawa H., Sakai T., Kobayashi E., Li T.P., Ohnogi H., Nishimura K., Nishiyama E., Wu H.K., Mizutani S., Kato I., **2002**, European Patent application, EP 1175907A1.