

Modèles biomimétiques de la paroi cellulaire végétale et modifications enzymatiques

TOUZARD Maeva¹, HEUX Laurent¹

¹Cermav-CNRS, Grenoble, France
maeva.touzard@cermav.cnrs.fr

Mots clefs : biomimétisme ; paroi ; cellule végétale ; matériau ; PME

Contexte et objectifs

La paroi primaire de la cellule végétale est un matériau composite principalement constitué de microfibrilles de cellulose, d'hémicelluloses, de pectines et de protéines, et hydraté à 80% (Fig. 1). Bien qu'elle ait été étudiée depuis de nombreuses années, les interactions entre ses constituants et leurs rôles, ses propriétés mécaniques et surtout son développement et sa croissance sont des thématiques de recherches encore d'actualité. La reconstitution de parois modèles à partir des constituants majeurs de la paroi végétale primaire pourrait permettre de compléter la compréhension des phénomènes observés *in-vivo*. Par exemple, comprendre le remodelage de la paroi lors de sa croissance et interpréter l'impact d'enzymes sur ce remodelage est rendu compliqué par la capacité d'adaptation des matériaux vivants étudiés. Une paroi cellulaire artificielle biomimétique serait un support contrôlable dans un environnement également contrôlable. La composition de la paroi, et la concentration en ions ou le pH du milieu hydratant sont des exemples de paramètres dont l'impact sur les réactions enzymatiques pourrait être plus facilement évalué avec ces modèles.

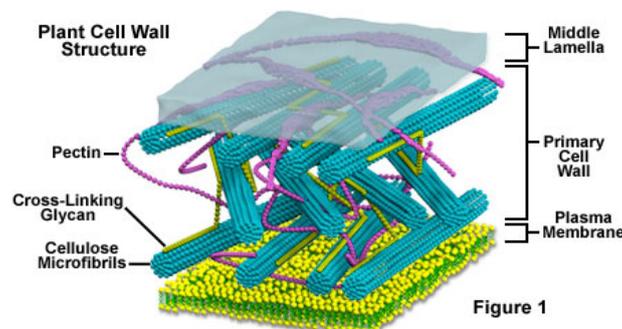


Fig. 1 : représentation schématique d'une paroi primaire de cellule végétale (Davidson 2015)

Le premier enjeu est donc de pouvoir recréer à partir de trois constituants majeurs de la paroi (la cellulose, les hémicelluloses et les pectines) les interactions nécessaires à l'obtention d'un matériau reproduisant le comportement mécanique d'une paroi hydratée. Ces trois composants étant des polysaccharides, leur affinité avec l'eau rend difficile leur cohésion dans ce milieu. Au Cermav, l'étude des interactions entre la cellulose et les hémicelluloses a déjà permis de développer des premiers modèles biomimétiques (Radavidson 2016). Cependant, l'un des principaux constituants, les pectines, reste à intégrer à ces modèles. Or les pectines semblent être un élément au rôle majeur dans la morphogenèse de la cellule végétale (Höfte 2012). Le premier objectif de cette thèse est donc de poursuivre le développement de ces modèles en incorporant les pectines. L'impact d'enzymes identifiées comme actrices du remodelage - les méthylesterases de pectines (PME), les polygalacturonases (PG) et les lyases de pectines (PL) - sur les propriétés mécaniques et la morphologie des modèles sera étudié. Les réactions enzymatiques ayant lieu en milieu aqueux, il est donc essentiel de développer un matériau ayant une tenue mécanique dans cet environnement.

De plus, ces parois modèles dont les propriétés peuvent être modifiées grâce à des enzymes sont également des matériaux innovants. Tous les constituants sont biocompatibles et dégradables ce qui en fait un matériau intéressant concernant les enjeux environnementaux et de santé actuels. La modification des propriétés mécaniques par voie enzymatique pourrait permettre la création de matériaux aux formes contrôlées ou de développer des stratégies d'encapsulation.

Matériel et méthodes

Préparation des matériaux

Les matériaux sont préparés sous forme de films par casting. Une suspension de microfibrilles de cellulose (MFC), issue d'une extraction par procédé kraft, est mélangée à des pectines lyophilisées. La concentration finale en polysaccharides est de 2,5% (m/m). La solution de dispersion contient du calcium à une concentration de 2,6 mM à 6,25 mM selon le degré de méthylation (DM) des pectines. La solution est séchée à 40°C pendant 48h.

Caractérisations chimiques

Les réactions enzymatiques sur les films biomimétiques sont réalisées dans un milieu tampon MOPS (acide 4-morpholinopropanesulphonique) à pH 6. Du chlorure de calcium CaCl_2 est ajouté au milieu, sa concentration finale variant de 0,01 à 0,1 mol/L selon les réactions. Un ratio stœchiométrique est défini par $R = 2 \frac{[\text{Ca}^{2+}]}{[\text{COO}^-]}$ (Fraeye 2010). Des bandes de films de dimensions 50x5 mm sont trempées dans 15 mL de ce milieu pendant 30 min avant d'ajouter 0,5 à 10 $\mu\text{L/mL}$ de PME (issue d'*Aspergillus aculeatus*). La réaction est réalisée à 24°C.

Le dosage du méthanol est utilisé pour quantifier l'activité enzymatique de la PME et permet de suivre l'évolution du DM des pectines au cours de la réaction. Le dosage est adapté de celui de Anthon (2004) qui consiste à oxyder le méthanol par l'alcool oxydase (AO) en présence de 3-méthyl-2-benzothiazolinone hydrazone (MBTH). Le produit de cette réaction forme un complexe bleu (bleu formazan) en milieu acide et en présence de fer (III), détectable par absorbance UV à 620 nm.

Les matériaux sont également analysés par RMN du carbone avec un spectromètre Bruker de 400 MHz en utilisant la méthode CP-MAS (cross-polarization and magical angle spinning). La vitesse de rotation de l'échantillon est de 12000 Hz et une accumulation d'au moins 3000 scans est réalisée.

Caractérisations mécaniques

Les essais de traction sont réalisés sur machine Shimadzu AGS-X avec une cellule de force de 20 N. Les bandes de films de dimension 50x5 mm sont testées après trempage ou réaction enzymatique. La durée d'immersion varie de 30 min à 24h. L'excès d'eau à la surface du film est éliminé à l'aide de papier absorbant avant de placer le film entre des mors de traction plat en caoutchouc. La longueur utile de l'échantillon est 20 mm et la vitesse de traction est de 0.1 mm/s. Les dimensions du film humide sont mesurées après l'essai et les valeurs de contraintes à la rupture et de modules d'élasticités en sont déduites.

Résultats et discussion

Les enzymes sur lesquelles l'étude se concentre agissent sur les pectines. Un premier modèle simplifié constitué seulement de cellulose et pectines est donc réalisé.

Propriétés mécaniques des films biomimétiques

Les films MFC/pectines trempés dans un milieu calcium ont un comportement plutôt élastique (Fig. 2) quel que soit le DM des pectines (P35 : DM = 35%, P52 : DM = 52%). Ce dernier influence fortement la rigidité et la résistance des films. Plus le DM est faible, plus il y a des sites d'interactions du calcium avec les pectines et plus le réseau sera dense. Une force plus importante est alors nécessaire pour déformer et pour rompre ce réseau, comme le montre la comparaison entre des films MFC/P52 et des films MFC/P35 (Fig. 3). A un DM supérieur à 52%, la résistance des films devient très faible et aléatoire et donc difficilement mesurable.

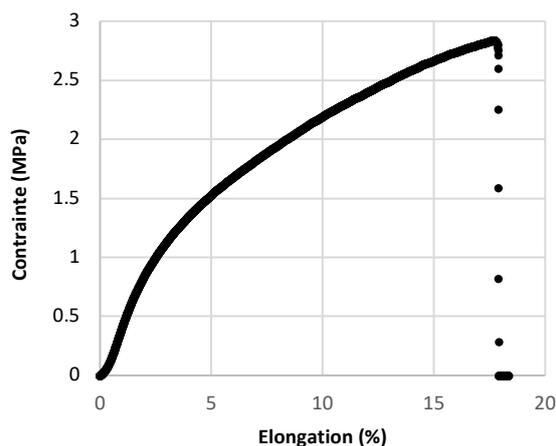


Fig. 2 : exemple d'une courbe de traction (film MFC/P35)

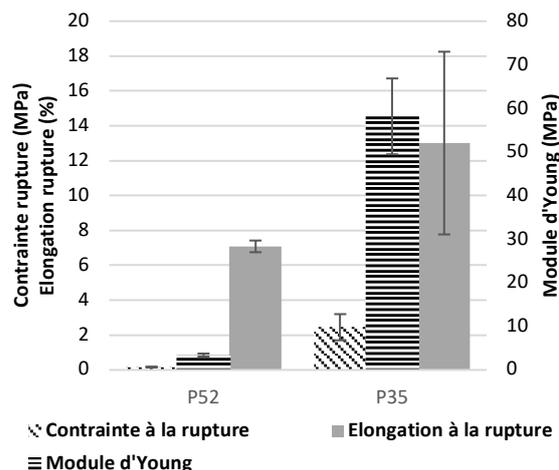


Fig. 3 : comparaison des propriétés mécaniques de films MFC/pectines trempés 1h dans une solution à 0.1 M en Ca²⁺

Impact de la déméthylation enzymatique sur les propriétés mécaniques des films biomimétiques

Un suivi des propriétés mécaniques est réalisé pour différentes durées de réaction, en partant d'un film MFC/P61 en présence de calcium à 0,1 mol/L (Fig. 4). Le film de référence est trempé 1h dans le milieu tampon sans enzyme. Après 1h de réaction avec la PME à 5 µL/mL, un DM = 57% est obtenu, après 3h DM = 48% et après 24h avec la PME à 10 µL/mL DM = 21%. Le DM diminue faiblement entre 0 et 1h de réaction et diminue plus rapidement entre 1h et 3h de réaction. Cela peut s'expliquer par la diffusion de l'enzyme dans le film. Le DM diminue considérablement entre 3h et 24h de réaction mais les pectines de moins en moins méthylées deviennent des substrats de moins en moins favorables pour la PME ce qui ne permet pas d'atteindre des DM plus faibles. Le DM à partir duquel la vitesse de réaction diminue reste encore à déterminer selon les conditions de réaction. Jusqu'à 3h de réaction, on observe une rigidification et une augmentation de la résistance du film avec la diminution du DM, liée à la formation des interactions avec le calcium (Fig. 5). L'allongement à la rupture augmente entre 0 et 1h de réaction mais semble se stabiliser ensuite. Pour une réaction de 24h la résistance et la rigidité diminuent malgré une diminution du DM. La perte de pectines par solubilisation en est la raison principale.

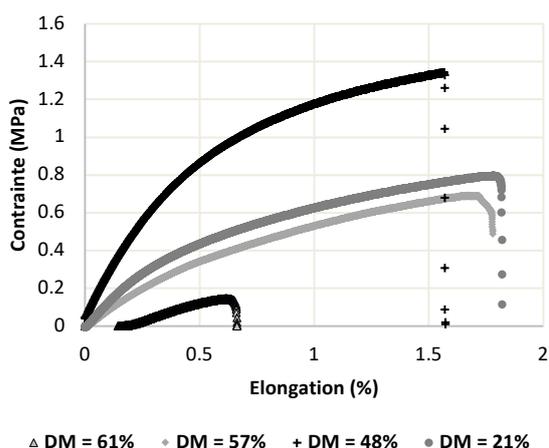


Fig. 4 : exemple de courbes de traction montrant l'évolution des propriétés mécaniques avec la réduction du DM par voie enzymatique

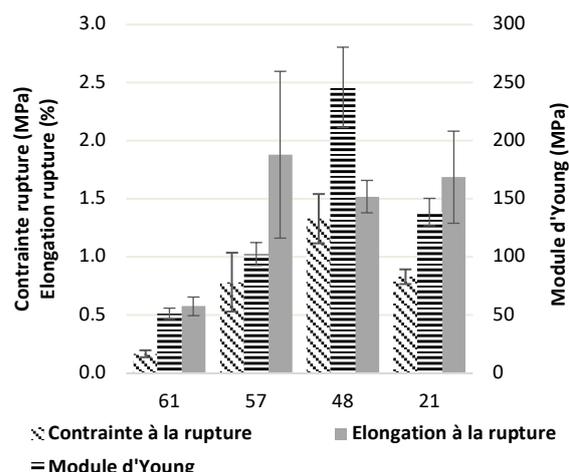


Fig. 5 : évolution des propriétés mécaniques avec la réduction du DM par voie enzymatique

Conclusion et perspective

Un nouveau matériau biomimétique de la paroi cellulaire végétale a été développé à partir de ses constituants principaux : la cellulose, les hémicelluloses et les pectines. Les caractérisations du matériau peuvent être réalisées par RMN du solide et tests de traction. Les films MFC/pectines, notamment ceux avec des pectines faiblement estérifiées, sont des matériaux ayant une résistance à l'état hydraté contrairement à des films MFC simples. De plus, l'activité des PME sur ce milieu hétérogène est observable et quantifiable et les interactions des sites déméthylés par la PME avec le calcium sont également montrées.

L'objectif final est de pouvoir lier ces modifications structurales à des modèles de morphogenèse de la paroi.

Références

- Anthon G.E., Barrett D.M. (2004) Comparison of Three Colorimetric Reagents in the Determination of Methanol with Alcohol Oxidase. Application to the Assay of Pectin Methyltransferase, *J. Agric. Food Chem*, 52 (12), 3749–3753.
- Davidson M.W. (2015) Molecular Expressions Cell Biology: Plant Cell Structure - Cell Wall <https://micro.magnet.fsu.edu/cells/plants/cellwall.html> (accessed Feb 10, 2020).
- Höfte H., Peaucelle A., Braybrook S. (2012) Cell Wall Mechanics and Growth Control in Plants: The Role of Pectins Revisited, *Front. Plant Sci.*, 3.
- Fraeye I., Duvetter T., Doungla E., Van Loey A., Hendrickx M. (2010) Fine-Tuning the Properties of Pectin–Calcium Gels by Control of Pectin Fine Structure, Gel Composition and Environmental Conditions, *Trends in Food Science & Technology*, 21 (5), 219–228.
- Radavidson H. (2016) Vésicules Lipidiques Biomimétiques Décorées Par Un Assemblage Multicouche Nanocristaux de Cellulose/Xyloglucane : Élaboration et Caractérisation Mécanique, thesis, Université Grenoble Alpes.