

Université d'Abobo-Adjamé

Année Universitaire 2005-2006

#### Numéro d'ordre

......

Soutenue publiquement Le 17 Février 2006 République de Côte d'Ivoire Union-Discipline-Travail Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



## THESE

## de Doctorat d'Etat ès Sciences Naturelles

**Option: Biochimie** 

## **KOUAME Lucien Patrice**

Identification de protéases du termite Macrotermes subhyalinus (Rambur) et de son champignon symbiotique Termitomyces sp. Caractérisation des exo-glycosidases thermophiles ou possédant une bonne activité de transglycosylation

Président: M. DIOPOH Koré Jacques, Professeur à l'Université de cocodyDirecteur de thèse: M. KAMENAN Alphonse, Professeur à l'Université d'Abobo-AdjaméExaminateurs: M. EHILE Ehouan Etienne, Professeur à l'Université d'Abobo-Adjamé......M.GNAKRI Dago, Maître de Conférences à l'Université d'Abobo-Adjamé......M.BEKRO Yves-Alain, Maître de Conférences l'Université d'Abobo-AdjaméRapporteur:M. DJE Koffi Alain, Maître de Conférences l'Université d'Abobo-Adjamé

## REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé en alternance:

- en France; à la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université de Nantes, dans le laboratoire de Biochimie dirigé par le professeur **Bernard COLAS**, au sein de l'Unité de Recherche de Biocatalyse (CNRS-UMR 6204)

- et en Côte d'Ivoire, à l'Unité de Formation et de Recherche des Sciences et Technologie des Aliments (UFR-STA) de l'Université d'Abobo-Adjamé, dans le laboratoire de Biochimie dirigé par le professeur Alphonse KAMENAN.

Je voudrais remercier sincèrement toute l'équipe "Biocatalyse" en particulier:

-le professeur **Bernard COLAS** qui m'a proposé ce sujet particulièrement motivant sans jamais douter de ma capacité. Il m'a fait bénéficier d'un cadre idéal de travail. Malgré ses nombreuses tâches universitaires, il n'a pas hésité à consacrer une partie de son temps à orienter et enrichir ce travail. Je dois dire que j'ai beaucoup appris auprès de lui.;

-les professeurs Jean-Pierre SINE, Claude RABILLER et Charles TELLIER pour leurs conseils et encouragements;.

Mes vifs remerciements vont à toutes les personnes dont les compétences scientifiques et techniques m'ont aidé à réaliser ce travail et plus particulièrement aux professeurs **Corinne ROULAND** et **Phillipe MORA** de l'Université Paris Val-de-Marne, au docteur **Sébastien NIAMKE**, Maître-Assistant à l'Université de Cocody.

Je remercie aussi vivement la Mission de Coopération Française qui m'a fait confiance en acceptant de financer ce travail.

Je tiens à remercier le professeur Alphonse KAMENAN, Doyen de l'Unité de Formation et de Recherche des Sciences et Technologie des Aliments de l'Université d'Abobo-Adjamé (Abidjan), Directeur scientifique de ce travail, sans qui ce mémoire n'aurait jamais pu voir le jour. Je le remercie d'autant plus vivement qu'il m' a trouvé une bourse de la Mission de Coopération Française. Qu'il trouve ici le témoignage de mon profond respect, de ma sincère admiration et de mon fidèle attachement; Au professeur **DIOPOH Koré Jacques**, Doyen honoraire de la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université de Cocody (Abidjan), je lui exprime toute ma reconnaissance et ma gratitude car c'est lui qui m'a appris à faire la recherche. Sa rigueur scientifique, son amour pour l'enzymologie et sa bienveillance à mon égard m'ont permis de réaliser ce travail. Qu'il soit encore remercié pour avoir accepté de présider le jury malgré ses nombreuses occupations universitaires.

Je suis sensible à l'honneur que me fait le professeur EHILE Ehouan Etienne, Président de l'Université d'Abobo-Adjamé en acceptant de faire partie de ce jury et l'assure de mes sincères remerciements. Sa présence dans ce jury montre une fois encore son amour pour le travail bien fait.

Je remercie les professeurs **BEKRO Yves Alain** et **DJE Koffi Marcellin** de l'Université d'Abobo-Adjamé (Abidjan) pour avoir accepté de faire partie de ce jury.

Je tiens également à remercier, le professeur GNAKRI Dago, Directeur de l'Unité de Recherche et de l'Enseignement Supérieur de Daloa (URES) pour la sollicitude qu'il m'a témoigné. C'est un réel plaisir pour moi de le retrouver comme membre de ce jury.

Je n'oublie pas tous les enseignants-chercheurs et chercheurs de l'Université d'Abobo-Adjamé et de la filière Biochimie de l'Unité de Formation et de Recherche des Biosciences de l'Université de Cocody à qui je dis merci pour les encouragements et soutiens.

Je voudrais remercier sincèrement du fond de mon cœur le professeur GOURENE Germain pour la sollicitude qu'il m'a témoigné.

Je ne peux oublier mes camarades du SYNARES tels YAPO Angoué Paul, ZIAO Nahossé, KOFFI Rose et GONE Droh.

Je voudrais remercier également tous les membres de l'équipe "Biocatalyse" du Laboratoire de Biochimie et Technologie des Aliments de l'Université d'Abobo-Adjamé qui ont participé activement à la réalisation de ce mémoire.

#### A ma Mère,

Je te remercie infiniment pour les sacrifices énormes que tu as bien voulu consentir pour moi. Que le seigneur te garde longtemps en bonne santé sur cette terre. Ce travail n'est qu'un modeste témoignage de ton amour filial et de ma reconnaissance.

## A mon arrière Grande-Mère,

Je te remercie du fond de mon cœur pour tout ce que tu as fait pour moi. Paix à ton âme.

## A mon père,

Je te suis reconnaissant. Paix à ton âme.

## A mon épouse Joséphine,

Je te dédie ce mémoire pour ton abnégation, ta patience et tes encouragements incessants. Ton soutien indéfectible m'a permis de réaliser ce travail dans les meilleures conditions. Je t'en suis reconnaissant. Je n'ai aucun mot pour traduire la profondeur de mes sentiments à ton égard.

## A mes filles jumelles Trésor et Désiré et leur sœur Iris Francisca,

Que ce travail soit un gage sincère de mon immense amour.

#### A ma sœur Ines,

En témoignage de mon profond amour, je te dédie ce travail.

#### A tous mes frères et sœurs,

Ce mémoire est le votre.

#### A ma grande famille,

Je remercie tout le monde pour les encouragements et conseils

## A tous mes amis,

Je dis Merci pour leur soutien moral et encouragement.

## TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION 1
Chapitre 1 REVUE BIBLIOGRAPHIQUE4
I-Termites 4
1-Classiffication des termites4
1-1-Termites inférieurs 4
1-2-Termites supérieurs 5
2-Rôle des micro-organismes symbiotiques des termites dans la digestion des glucides 5
2-1-Chez les termites inférieurs5
2-2-Chez les termites supérieurs6
3-Société des <i>Macrotermitinae7</i>
3-1-Castes de la termitière7
3-2-Confection de la «meule» et le développement du champignon symbiotique8
3-3-Rôle du champignon dans la symbiose digestive 10
3-4-Micro-organismes symbiotiques du termite Macrotermes subhyalinus10
II-Glycoside-hydrolases11
1-Mécanismes d'action des glycoside-hydrolases11
1-1-Mécanisme d'inversion de configuration12
1-2-Mécanisme de rétention de configuration13
2-Classification des glycoside-hydrolases14
2-1-Classification internationale14

2-2-Classification structurale	15
3-Réactions catalysées par les glycosidases	16
3-1-Réactions d'hydrolyse	16
3-2-Réactions de synthèse	16
3-3-Réactions de transglycosylation	17
4-Nature et propriétés des glycosidases	19
4-1-Glycoside-hydrolases amylolytiques	19
4-1-1-Amylases	19
4-1-2-Enzymes débranchantes	22
4-1-3-α-glucosidases	22
4-2-Glycoside-hydrolases cellulolytiques	23
4-3-Glycoside-hydrolases hémicellulolytiques	27
4-3-1-Glycoside-hydrolases xylanolytiques	27
4-3-2-Galactanases	30
4-3-3-Xylo-glucanases	31
III-Protéases	31
1-Domaines d'intervention	31
2-Classification des protéases	32
2-1-Peptidases à sérine	33
2-2-Peptidases à thréonine	33
2-3-Peptidases à cystéine	34
2-4-Peptidases à acide aspartique	34
2-5-Métallopeptidases	35
2-6-Peptidases dont les types catalytiques sont inconnus	36
Chapitre 2 MATERIEL ET METHODES	37

I-Matériel	37
1-Produits chimiques et réactifs	37
2-Sources enzymatiques	38
II-Méthodes	38
1-Préparation des extraits bruts enzymatiques	38
2-Dosage des activités enzymatiques	38
2-1-Dosage des activités <i>p</i> -nitrophénylglycosidasiques	38
2-2-Dosage des activités protéasiques	39
2-3-Dosage des activités oligosaccharidasiques	39
2-3-1-Préparation de la solution de glucose oxydase-péroxydase	39
2-3-2-Technique de dosage	39
2-4-Dosage des activités polysaccharidasiques	40
2-4-1-Préparation du DNS	40
2-4-2-Technique de dosage	40
2-5-Dosage des activités isomérasiques	40
3-Unité enzymatique	41
4-Dosage des protéines	41
4-1-Méthode de Smith <i>et al.</i> (1985)	41
4-2-Méthode de Lowry <i>et al.</i> (1951)	42
5-Influence du pH sur les activités glycosidasiques	42
5-1-Détermination du pH optimum d'hydrolyse	42
5-2-Influence de la force ionique	42
6-Influence de la température sur les activités glycosidasiques	43
6-1-Détermination de la température optimale, du Q10 et de l'énergie d'activation	43
6-2-Dénaturation et l'inactivation thermiques	43

7-Influence de quelques effecteurs43	
8-Réactions de transglycosylation 44	
9-Identification de la structure du produit de synthèse44	
10-Purification des glycosidases 45	
10-1-Chromatographie d'échange d'ions sur gel de DEAE-Sepharose CL- 6B45	, ,
10-2-Chromatographie d'exclusion moléculaire sur gel de SephacrylS-200 HR45	. ,
10-3-Chromatographie d'interaction hydrophobe sur gel de Phényl Sepharose CL 6B 46	
11-Paramètres cinétiques46	•
12-Etudes de compétitions mutuelles entre deux substrats 46	)
13-Détermination des poids moléculaires des glycosidases 47	,
13-1-Détermination par SDS- PAGE 47	
13-2-Détermination par filtration sur gel 48	i
Chapitre 3 RESUTATS ET DISCUSSION 49	ł
RECHERCHE DE PROTEASES ET DE GLYCOSIDASES A ACTIVITES ORIGINALES CHEZ LE TERMITE MACROTERMES SUBHYALINUS ET SON CHAMPIGNON SYMBIOTIQUE TERMITOMYCES SP49	<b>ə</b>
A-Recherche de protéases à activités originales chez les castes neutres du termite <i>Macrotermes subhyalinus</i> et son champignon symbiotique <i>Termitomyces sp</i> 49	)
Introduction	I
I-Résultats50	ļ
1-Substrats acyl- <i>p</i> NA non hydrolysés par les extraits bruts enzymatiques50	I
2-Substrats acyl- <i>p</i> NA basiques (BA- <i>p</i> NA, Arg- <i>p</i> NA et Lys- <i>p</i> NA) hydrolysés par les extraits bruts enzymatiques50	I
3-Substrats acyl- <i>p</i> NA aliphatiques (Leu- <i>p</i> NA, Ala- <i>p</i> NA et Gly- <i>p</i> NA) hydrolysés par les extraits bruts enzymatiques51	
4-Substrats acyl aromatique Phe-pNA et acyl-hétérocyclique Pro-pNA hydrolysés par les extraits bruts enzymatiques52	,

5-Autres acyl- <i>p</i> NA hydrolysés par les extraits bruts enzymatiques (Asp- <i>p</i> NA et Met- <i>p</i> NA)53
6-Compétitions mutuelles entre substrats acyl- <i>p</i> NA fortement hydrolysés par les substrats bruts enzymatiques de l'ouvrier et son champignon55
II-Discussion56
Conclusion57
B-Recherche d'activités glycosidasiques thermophiles et thermostables chez le termite Macrotermes subhyalinus et son champignon symbiotique Termitomyces sp58
Introduction58
I-Résultats 59
1-Activités glycosidasiques des extraits bruts enzymatiques des castes neutres du termite <i>Macrotermes subhyalinus</i> (Rambur) et de leur champignon symbiotique <i>Termitomyces sp</i> 59
1-1-Activités α-exo-glycosidasiques 59
1-2-Activités β-exo-glycosidasiques60
1-3-Activités endo-glycosidasiques61
2-Détermination des températures et pH optimums des activités glycosidasiques des extraits bruts de l'ouvrier du termite <i>Macrotermes subhyalinus</i> (Rambur) et de son champignon symbiotique <i>Termitomyces sp</i>
2-1-Détermination des températures et pH optimums des activités α-exo- glycosidasiques62
2-2-Détermination des températures et pH optimums des activités β-exo- glycosidasiques63
2-3-Détermination des températures et pH optimums des activités endo- glycosidasiques64
3-Inactivation thermique des activités glycosidasiques thermophiles des extraits bruts de l'ouvrier du termite <i>Macrotermes subhyalinus</i> et de son champignon symbiotique <i>Termitomyces sp</i> 65
3-1-Inactivation thermique des activités xylanasiques des extraits bruts de l'ouvrier du termite <i>Macrotermes subhyalinus</i> (Rambur) et de son champignon symbiotique <i>Termitomyces sp</i>

<b>3-2-Inactivation thermique des activités β-xylosidasiques des extraits bruts de l'ouvrier du termite <i>Macrotermes subhyalinus</i> (Rambur) et de son champignon symbiotique66</b>
II-Discussion68
Conclusion69
C-Réactions de transglycosylation catalysées par les exo-glycosidases de l'ouvrier du termite <i>Macrotermes subhyalinus</i> (Rambur) et de son champignon symbiotique <i>Termitomyces sp</i> 70
Introduction70
I-Résultats71
1-Recherche d'activités d'oses isomérasiques71
2-Réactions de transglycosylation71
2-1-Influence du pH sur les réactions de transglycosylation71
2-2-Influence du temps d'incubation sur les réactions de transglycosylation72
2-3-Influence de la température sur les réactions de transglycosylation72
2-4-Influence de la concentration du donneur sur les réactions de transglycosylation73
2-5-Influence de la concentration de l'accepteur sur les réactions de transglycosylation74
3-Conditions optimales des réactions de transglycosylation76
4-Identification de la structure du produit de synthèse77
II-Discussion 77
Conclusion 79
PURIFICATION ET CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DES $\alpha$ - GLUCOSIDASES ET $\beta$ -XYLOSIDASES DE L'OUVRIER DU TERMITE MACROTERMES SUBHYALINUS (RAMBUR) ET DE SON CHAMPIGNON SYMBIOTIQUE TERMITOMYCES SP80
Introduction 80

ltats	
1-Purificatio	on des α-glucosidases
1-1-S	tratégie de purification
	1-1-1-Chromatographie échangeuse d'anions sur gel de DEAE- Sepharose CL 6B
	1-1-2-Chromatographie d'exclusion moléculaire sur ge Sephacryl S-200 HR
	1-1-3-Chromatographie d'interaction hydrophobe sur ge Phényl-Sepharose CL 6B
1-2-0	ritère de pureté
2-Caractéris	ation physico-chimique des α-glucosidases
2-1-Influenc	e du pH sur les activités des α-glucosidases
	2-1-1- pH optimum d'hydrolyse
	2-1-2- pH optimum de stabilité
	2-1-3-Influence de la force ionique du tampon
2-2-Influenc	e de la température sur les $\alpha$ -glucosidases
	2-2-1-Température optimale d'hydrolyse
	2-2-2-Energie d'activation et Q <sub>10</sub>
	2-2-3-Inactivation thermique
	2-2-4-Dénaturation thermique
	2-2-5-Conservation au froid
2-3-Spécifici	té des α-glucosidases
	2-3-1-Spécificité de substrat
	a-Activités des $\alpha$ -Glc A et B sur les substrats

b-Activités des α-Glc A et B de l'ouvrier du termite <i>Macrotermes subhyalinus</i> (Rambur) sur les malto-dextrines93
c-Activités des α-Glc A et B sur des macromolécules94
2-3-2-Stéréospécificité et régiosélectivité94
2-4-Paramètres cinétiques95
2-5-Recherche du ou des site(s) catalytique(s) hydrolysant le <i>p</i> NP-α-D- glucopyranoside, le saccharose et le maltose97
2-5-1-Etudes de compétition mutuelle entre le maltose et le saccharose97
2-5-2-Inactivation thermique98
2-6-Réactions de transglycosylation98
2-6-1-Influence du pH sur l'activité de transglucosylation99
2-6-2- Influence du temps sur l'activité de transglucosylation100 a-Synthèse de phényléthylglucosides100 b-Synthèse de gluco-aminoacides et de gluco-peptides102
2-7-Action des agents chimiques103
<b>2-8-La détermination de la masse moléculaire des α-glucosidases106</b>
II-Discussion107
Conclusion112
B-Purification et caractérisation physico-chimiques des $\beta$ -xylosidases de l'ouvrier du termite <i>Macrotermes subhyalinus</i> (Rambur) et de son champignon symbiotique <i>Termitomyces sp.</i> 114
I-Résultats114
<b>1-Purification des β-xylosidases de l'ouvrier du termite</b> <i>Macrotermes subhyalinus</i> (Rambur) et de son champignon symbiotique <i>Termitomyces sp</i> 114
1-1-Purification de la β-xylosidase de l'ouvrier du termite <i>Macrotermes subhyalinus</i> (Rambur)114

1-1-1-Stratégie de purification	111	4
---------------------------------	-----	---

a-Chromatographie échangeuse d'anions sur gel de DEAE- Sépharose CL-6B116
b-Chromatographie d'exclusion moléculaire sur gel de Séphacryl S-200 HR117
c-Chromatographie d'interaction hydrophobe sur gel de Phényl-Sépharose CL 6B
1-1-2-Critère de pureté120
1-2-Purification de la β-xylosidase du champignon symbiotique <i>Termitomyces sp.</i> de l'ouvrier du termite <i>Macrotermes subhyalinus</i> (Rambur)121
1-2-1-Stratégie de purification121
a-Chromatographie d'exclusion moléculaire sur gel de Sephacryl S-200 HR121
b-Chromatographie échangeuse d'anions sur gel de DEAE- Sepharose CL-6B122
c-Chromatographie d'interaction hydrophobe sur gel de Phényl-Sepharose CL-6B
1-2-2-Critère de pureté125
2-Caractérisation physico-chimiques des β-xylosidases de l'ouvrier du termite <i>Macrotermes subhyalinus</i> (Rambur) et de son champignon symbiotique <i>Termitomyces sp</i> 125
2-1-Influence du pH sur les activités β-xylosidasiques125
2-1-1-pH optimum d'hydrolyse125
2-1-2-pH optimum de stabilité127
2-1-3-Influence de la force ionique du tampon128
2-2-Influence de la température sur les activités β-xylosidasiques128
2-2-1-Température optimale d'hydrolyse128
2-2-2- $Q_{10}$ et l'énergie d'activation ( $E_a$ )129
2-2-3-Inactivation thermique131
2-2-4-Dénaturation thermique132

2-2-5-Conservation1	33
2-3-Spécificité de substrat1	33
2-3-1-Activités des deux β-xylosidases sur les substrats <i>p</i> - nitrophényl-D-glycoside1	33
2-3-2-Activités des deux β-xylosidases sur les oligosaccharides et polysaccharides1	34
2-4-Paramètres cinétiques1	35
2-5-Action des agents chimiques1	37
2-6-Détermination du poids moléculaire1	35
3-Comparaison des caractéristiques physico-chimiques des deux β-xylosidases1	<b>3</b> 9
II-Discussion1	40
Conclusion1	44
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES1	45
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES1	47

## **LISTE DES FIGURES**

	_
Figure 1 : Nid du termite Macrotermes subhyalinu	- 7
Figure 2 : Castes neutres du termite Macrotermes subhyalinus	- 8
Figure 3 : Meule du termite Macrotermes subhyalinus	- 9
Figure 4 : Mécanisme d'hydrolyse des glycosidases agissant par inversion configuration	de 13
Figure 5 : Mécanisme d'hydrolyse des glycosidases agissant par rétention configuration	de 14
Figure 6 : Schéma général de la réaction d'hydrolyse catalysée par les glycosidases	16
Figure 7 : Schéma général de la réaction de synthèse catalysée par les glycosidases	17
Figure 8 : Schéma général de la réaction de transglycosylation catalysée par l glycosidases	les 18
Figure 9 : Synergie des activités α et β-amylasiques sur une β-dextrine	19
Figure 10 : Etude comparative des activités hydrolysant les substrats BA-pNA, Ar pNA, et Lys-pNA du champignon, de la meule et des castes neutres du termi Macrotermes subhyalinus (Rambur)	g- ite 51
Figure 11 : Etude comparative des activités hydrolysant les substrats Leu-pNA, Ala-pN et Glys-pNA du champignon, des castes neutres du termite <i>Macrotermes subhyalin</i> . (Rambur) et de la meule	IA <i>us</i> 52
Figure 12 : Etude comparative des activités hydrolysant les substrats Pro-pNA et Ph pNA du champignon, des castes neutres du termite <i>Macrotermes subhyalinus</i> (Rambu et de la meule	ie- ir) 53

Figure 13 : Etude comparative des activités hydrolysant les substrats Asp-pNA et MetpNA du champignon, des castes neutres du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) et de la meule ------54

Figure 14 : Inactivation thermique de l'activité xylanasique de l'extrait brut enzymatique de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) et de son champignon symbiotique *Termitomyces sp.* -----66

Figure 15 : Inactivation thermique de l'activité β-xylosidasique de l'extrait brut enzymatique de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) -----67

Figure 16 : Inactivation thermique de l'activité  $\beta$ -xylosidasique de l'extrait brut enzymatique du champignon symbiotique du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) ------67

Figure 17 : Influence du pH sur les réactions de transglycosylation catalysées par les extraits bruts enzymatiques de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* et de son champignon symbiotique *Termitomyces sp.*-----71

Figure 18 : Influence du temps d'incubation sur les réactions de transglycosylation catalysées par les extraits bruts enzymatiques de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* et de son champignon symbiotique *Termitomyces sp.*-----72

Figure 19 : Influence de la température sur les réactions de transglycosylation catalysées par les extraits bruts enzymatiques de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) et de son champignon symbiotique *Termitomyces sp.*-----73

Figure 20 : Influence de la concentration du donneur sur les réactions de transglycosylation catalysées par les extraits bruts enzymatiques de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* et de son champignon symbiotique *Termitomyces sp.* -----74

Figure 21 : Influence de la concentration du l'accepteur sur les réactions de transglycosylation catalysées par les extraits bruts enzymatiques de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* et de son champignon symbiotique *Termitomyces sp.*-----75

Figure 22 : Chromatogramme: mise en évidence du produit d'hydrolyse. -----75

Figure 23 : Chromatogramme: mise en évidence du produit de transglucosylation ---- 76

Figure 24 : Profil chromatographique échangeuse d'anions sur gel de DEAE-Sépharose CL 6B de l'α-glucosidase de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) 81

Figure 25 : Profil chromatographique d'exclusion moléculaire sur gel de Sephacryl S-200 HR de l' $\alpha$ -glucosidase de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) 82

Figure 26 : Profil chromatographique d'interaction hydrophobe sur gel de Phényl-Sepharose CL-6B de l'a-Glc A de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) ------83

Figure 27 : Profil chromatographique d'interaction hydrophobe sur gel de Phényl- Sepharose CL 6B de l'α-Glc B de l'ouvrier du termite <i>Macrotermes subhyalinus</i> (Rambur)84
Figure 28 : Analyse en S.D.SP.A.G.E. de l'α-Glc A de l'ouvrier du termite <i>Macrotermes subhyalinus</i> (Rambur)85
Figure 29 : Analyse en S.D.SP.A.G.E. de l'a-Glc B de l'ouvrier du termite <i>Macrotermes</i> subhyalinus86
Figure 30 : Détermination des pH optimums d'hydrolyse des α-Glc A et B de l'ouvrier du termite <i>Macrotermes subhyalinus</i> 87
Figure 31 : Stabilité visa à vis du pH des α-Glc A et B de l'ouvrier du termite Macrotermes subhyalinus (Rambur) à différentes valeurs de pH dans les tampons acétate et phosphate 20 Mm87
Figure 32 : Détermination des températures optimales d'hydrolyse des α-Glc A et B de l'ouvrier du termite <i>Macrotermes subyalinus</i> (Rambur)89
Figure 33 : Détermination de l'énergie d'activation de l'α-Glc B de l'ouvrier du termite Macrotermes subhyalinus (Rambur)89
Figure 34 : Détermination de l'énergie d'activation de l'α-Glc A de l'ouvrier du termite <i>Macrotermes subhyalinus</i> (Rambur)90
Figure 35 : Inactivation thermique des α-Glc A et B à 45°C de l'ouvrier du termite Macrotermes subhyalinus (Rambur)91
Figure 36 : Inactivation thermique des α-Glc A et B à 37°C de l'ouvrier du termite Macrotermes subhyalinus (Rambur)91
Figure 37 : Dénaturation thermique des α-Glc A et B de l'ouvrier du termite Macrotermes subhyalinus.(Rambur)92
<b>Figure 38 : Cinétique d'hydrolyse du pNP-a-D-glucopyranoside par les a-Glc A et B de l'ouvrier du termite</b> <i>Macrotermes subhyalinus</i> (Rambur). Représentation de Lineweaver et Burk (1934)96
Figure 39 : Cinétique d'hydrolyse du saccharose par les a-Glc A et B de l'ouvrier du termite <i>Macrotermes subhyalinus</i> (Rambur). Représentation de Lineweaver et Burk (1934)
Figure 40 : Cinétique d'hydrolyse du maltose par les a-Glc A et B de l'ouvrier du termite <i>Macrotermes subhyalinus</i> (Rambur)97

Figure 41 : Influence du pH sur les réactions de transglucosylation catalysées par l'α-Glc A de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus*. (Rambur) ------99 Figure 42 : Influence du pH sur les réactions de transglucosylation catalysées par l' $\alpha$ -Glc B de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) ------100

Figure 43 : Influence du temps d'incubation sur les réactions de transglucosylation catalysées par l' $\alpha$ -Glc A de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) -101

Figure 44 : Influence du temps d'incubation sur les réactions de transglucosylation catalysées par l' $\alpha$ -Glc B de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) -101

Figure 45 : Profil chromatographique d'échanges d'anions sur gel de DEAE-Sépharose CL-6B de la β-xylosidase de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) 115

Figure 46 : Profil chromatographique d'exclusion moléculaire sur gel de Séphacryl S-200 HR de la β-xylosidase de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) ---------116

Figure 47 : Profil chromatographique d'échanges d'anions sur gel de DEAE-Sépharose CL-6B de la β-xylosidase de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) 117

Figure 48 : Profil chromatographique d'exclusion moléculaire sur gel de Sephacryl S-200 HR de la β-xylosidase de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) ---------118

Figure 49 : Profil chromatographique d'interaction hydrophobe sur le gel Phényl-Sépharose CL--6B de la  $\beta$ -xylosidase de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) ------119

Figure 50 : Analyse électrophorétique sur gel de polyacrylamide en conditions natives de la  $\beta$ -xylosidase de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) ------120

Figure 51 : Analyse électrophorétique sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS) de la  $\beta$ -xylosidase de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) ------121

Figure 52 : Profil chromatographique d'exclusion moléculaire sur gel de Séphacryl S-200 HR de la β-xylosidase du champignon symbiotique *Termitomyces sp.* de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) ------122

Figure 53 : Profil chromatographique d'échanges d'anions sur gel de DEAE-Sépharose CL-6B de la β-xylosidase du champignon symbiotique *Termitomyces sp.* de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus (Rambur)* ------123

Figure 54 : Profil chromatographique d'interaction hydrophobe sur gel de Phényl-Sépharose CL--6B de la  $\beta$ -xylosidase du champignon symbiotique *Termitomyces sp.* de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) ------124

Figure 55 : Analyse électrophorétique sur gel de polyacrylamide en condition dénarante (SDS) de la B-xylosidase du champignon symbiotique Termitomyces sp. de l'ouvrier du termite Macrotermes subhvalinus (Rambur) -----125 Figure 56 : Détermination du pH optimum d'hydrolyse de la  $\beta$ -xylosidase de l'ouvrier du termite Macrotermes subhyalinus (Rambur) -----126 Figure 57 : Détermination du pH optimum d'hydrolyse de la  $\beta$ -xylosidase du champignonn symbiotique Termitomyces sp. de l'ouvrier du termite Macrotermes subhyalinus (Rambur) ------126 Figure 58 : Stabilité au pH de la  $\beta$ -xylosidase de l'ouvrier du termite Macrotermes subhyalinus (Rambur) -----127 Figure 59 : Stabilité au pH de la  $\beta$ -xylosidase du champignon Termitomyces sp. de l'ouvrier du termite Macrotermes subhyalinus (Rambur) -----127 Figure 60 : Détermination de la température optimale d'hydrolyse de la  $\beta$ -xylosidase de l'ouvrier du termite Macrotermes subhyalinus (Rambur) -----128 Figure 61 : Détermination de la température optimale d'hydrolyse de la  $\beta$ -xylosidase du champignonn symbiotique Termitomyces sp. de l'ouvrier du termite Macrotermes subhyalinus (Rambur) ------129 Figure 62 : Détermination de l'énergie d'activation ( $E_a$ ) de la  $\beta$ -xylosidase du champignon symbiotique Termitomyces sp. de l'ouvrier du termite Macrotermes subhyalinus (Rambur) ------130 Figure 63 : Détermination de l'énergie d'activation (E<sub>a</sub>) de la β-xylosidase de l'ouvrier du termite Macrotermes subhyalinus (Rambur) ------130 Figure 64 : Inactivation thermique de la  $\beta$ -xylosidase de l'ouvrier du termite Macrotermes subhyalinus (Rambur) ------131 Figure 65 : Inactivation thermique de la  $\beta$ -xylosidase du champignon symbiotique Termitomyces sp. de l'ouvrier du termite Macrotermes subhyalinus (Rambur) ------132 Figure 66 : Dénaturation thermique de la  $\beta$ -xylosidase du champignon symbiotique Termitomyces sp. de l'ouvrier du termite Macrotermes subhyalinus (Rambur) ------132 Figure 67: Dénaturation thermique de la  $\beta$ -xylosidase de l'ouvrier du termite Macrotermes subhyalinus (Rambur) -----133 Figure 68 : Cinétique d'hydrolyse du pNP- $\alpha$ -D-glucopyranoside par les  $\beta$ -xylosidases de l'ouvrier du termite Macrotermes subhyalinus (Rambur) et de son champignon

symbiotique Termitomyces sp. Représentation de Lineweaver et Burk (1934) ------136

Figure 69 : Cinétique d'hydrolyse du xylobiose par les β-xylosidases de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) et de son champignon symbiotique *Termitomyces sp.* Représentation de Lineweaver et Burk (1934) ------136

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Résidus d'acide aminés essentiels impliqués dans les mécanismescatalytiques des différentes familles des glycosides hydrolases (GH)12
Tableau II : Glycosides hydrolases à structures en acides aminés connues mais nonregroupées en familles16
Tableau III : Produits de synthèse et leur rendement de transglycosylation      18
Tableau IV : Origines et quelques caractéristiques d'α-amylases mésophiles21
TableauV: Origines et quelques caractéristiques d'enzymes amylolytiquesthermophiles21
Tableau VI : Origines et quelques caractéristiques d'α-glucosidases23
Tableau VII : Origines et quelques caractéristiques de cellulases mésophiles26
TableauVIII : Origines et quelques caractéristiques physiques de cellulasesthermophiles27
Tableau IX : Origines et quelques caractéristiques physiques de xylanases 29
Tableau X : Origines et quelques caractéristiques de β-xylosidases30
Tableau XI : Compétitions mutuelles entre les substrats acyl-pNA fortement hydrolyséspar les extraits bruts enzymatiques de l'ouvrier et le champignon55
Tableau XII : Activités a-exo-glycosidasiques des extraits bruts enzymatiques des castes neutres du termite <i>Macrotermes subhyalinus</i> (Rambur) et de leur champignon symbiotique <i>Termitomyces sp</i> 60
Tableau XIII: Activités B-exo-alycosidasiques des extraits bruts des castos poutres du

Tableau XIII: Activités β-exo-glycosidasiques des extraits bruts des castes neutres du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) et de leur champignon symbiotique *Termitomyces sp* ------61

Tableau XIV : Activités endo-glycosidasiques des extraits bruts enzymatiques des castesneutres du termite Macrotermes subhyalinus (Rambur) et de leur champignonsymbiotique Termitomyces sp62

Tableau XV : Températures et pH optimums d'hydrolyse des activités  $\alpha$ -exoglycosidasiques des extraits bruts enzymatiques de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) et de son champignon symbbiotique *Termitomyces sp* ------63 Tableau XVI : Températures et pH optimums d'hydrolyse des activités  $\beta$ -exoglycosidasiques des extraits bruts enzymatiques de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* et de son champignon symbiotique *Termitomyces sp* ------64

Tableau XVII : Températures et pH optimums d'hydrolyse des activités endo-<br/>glycosidasiques des extraits bruts enzymatiques de l'ouvrier du termite Macrotermes<br/>subhyalinus (Rambur) et de son champignon symbiotique Termitomyces sp

Tableau XVIII : Tableau recapitulatif des conditions expérimentales optimales desréactions de transglycosylation catalysées par les activités exo-glycosidasiques del'ouvrier du termite Macrotermes subhyalinus (Rambur) et de son champignonsymbiotique Termitomyces sp. ------77

Tableau XIX : Bilan global de la purification des α-Glc A et B de l'ouvrier du termite Macrotermes subhyalinus (Rambur) -----85

Tableau XX : Activités des α-Glc A et B de l'ouvrier du termite *Macrotermes* subhyalinus (Rambur) sur les substrats synthétiques -----93

Tableau XXI : Activités des α-Glc A et B de l'ouvrier du termite *Macrotermes* subhyalinus (Rambur) sur les malto-dextrines ------94

Tableau XXII : Stéréospécificité et de la régiosélectitvité des α-Glc A et B de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) -----95

Tableau XXIII : Quelques paramètres cinétiques des  $\alpha$ -Glc A et B de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) -----97

 Tableau XXIV : Etudes de compétitions mutuelles entre le saccharose et le maltose
 -- 98

Tableau XXV : Taux et conditions optimales de transglucosylation des  $\alpha$ -Glc A et B de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) ------102

Tableau XXVI : Taux de transglucosylation des  $\alpha$ -GLC A et B de l'ouvrier du termite Macrotermes subhyalinus (Rambur) de différents dérivés d'acides aminés et de peptides hydroxylés ------103 Tableau XXVII : Effet de quelques agents chimiques sur les activités des  $\alpha$ -glucosidases de l'ouvrier du termite Macrotermes subhyalinus ------105

Tableau XXVIII : Poids moléculaires et sous-unités des α-Glc A et B de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) ------106

Tableau XXIX : Bilan global de la purification de la  $\beta$ -xylosidase de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) ------120

Tableau XXX : Bilan global de la purification de la  $\beta$ -xylosidase du champignon symbiotique *Termitomyces sp.*.de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) ------124

Tableau XXXI : Etude de la spécificité de substrat (*p*-nitrophényl-D-glycoside) des  $\beta$ xylosidases de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) et de son champignon symbiotique *Termitomyces sp* ------134

Tableau XXXII : Etude de la spécificité de substrats (oligosaccarides et polysaccharides) des  $\beta$ -xylosidases de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) et de son champignon symbiotique *Termitomyces sp* ------135

Tableau XXXIII : Quelques paramètres cinétiques des  $\beta$ -xylosidases de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) et de son champignon symbiotique *Termitomyces sp.* ------137

Tableau XXXIV : Effet de quelques agents chimiques sur les activités des  $\beta$ -xylosidases de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus*. et de son champignon symbiotique *Termitomyces sp* -------138

Tableau XXXV : Poids moléculaires et sous-unités des  $\beta$ -xylosidases de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) et de son champignon symbiotique *Termitomyces sp.* ------139

Tableau XXXVI : Résumé des principales propriétés physico-chimiques des  $\beta$ xylosidases de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) et de son champignon symbiotique *Termitomyces sp.*------140

## INTRODUCTION

L'intérêt de l'utilisation des enzymes comme catalyseurs dans les procédés industriels est lié à leur spécificité et à leur efficacité (Potus et Drapron, 1997). Les caractéristiques cinétiques des enzymes sont à l'origine du développement des stratégies originales de modification des macromolécules. Parmi celles-ci, se trouvent la dépolymérisation et la glycosylation.

La glycosylation permet de modifier les propriétés fonctionnelles des macromolécules. L'amélioration de ces propriétés dépend à la fois du degré de glycosylation de ces composés et de la nature des résidus glycosidiques greffés (Caer et al., 1990a et 1990b). Ainsi, la fixation par alkylation réductrice de glucides neutres sur la légumine de pois (*Pisum sativum*) permet-elle d'améliorer, de façon spectaculaire, sa solubilité et ses propriétés moussantes alors que la fixation de dérivés glucidiques chargés entraîne, avant tout, de meilleures propriétés émulsifiantes (Baniel et al., 1992). L'utilisation des méthodes chimiques pour modifier les caractéristiques physico-chimiques et fonctionnelles des protéines reste limitée car ces méthodes présentent des inconvénients majeurs pour des applications médicales et/ou agro-alimentaires du fait:

- de la toxicité des réactifs utilisés;
- de l'hétérogénéité des préparations;
- des produits secondaires formés qui sont difficiles à éliminer lors de la réaction;
- de la réduction de la valeur nutritionnelle des protéines.

Les traitements chimiques mettent souvent en jeu des acides aminés essentiels, comme la lysine, qui ne sont plus nutritionnellement disponibles. De ce fait, l'utilisation de ces méthodes chimiques exige des dispositions rigoureuses de protection et de dé-protection. C'est pourquoi, la méthode enzymatique est de plus en plus valorisée (Toone *et al.*, 1989; Cote et Tao, 1990; Ishikawa *et al.*, 1993). Parmi les enzymes utilisées, il y a les glycosidases qui, en plus de leur action hydrolytique réversible, catalysent des réactions de transglycosylation. Ces enzymes, facilement purifiables, possèdent généralement une bonne thermostabilité et utilisent des substrats bon marché. C'est pour ces raisons qu'elles sont préférées aux glycosyltransférases qui sont relativement difficiles à purifier, car moins stables et exigent des substrats trop coûteux; d'où leur utilisation pour une application biotechnologique (Nilsson, 1988; Crout et Vic, 1998).

Les rendements de synthèse avec ces glycosidases sont souvent modérés en milieu aqueux, du fait que l'équilibre de la réaction soit largement en faveur de la réaction d'hydrolyse. Pour améliorer l'activité de transglycosylation, des conditions expérimentales peuvent être envisagées comme par exemple, l'utilisation d'une grande quantité de solvant organique dans le milieu réactionnel pour limiter l'apport en eau (Finch et Yoon, 1997 ; Becker et Kuhl , 1999). Hormis les conditions de contrôle cinétique de transglycosylation, les rendements sont largement dépendants de la nature et de l'origine de l'enzyme (Turner et Webberley, 1991 ; Leparoux *et al.*, 1994 ; Yoon et Ajisaka, 1996).

Ainsi, la recherche de nouvelles sources originales de glycosidases avec des activités de transglycosylation élevées apparaît être d'un grand intérêt.

Concernant la dépolymérisation, les enzymes thermophiles et thermostables sont devenues des biocatalyseurs pouvant donner une nouvelle dimension à la biocatalyse. Elles offrent des avantages importants en biotechnologie. Ainsi, leur utilisation a-t-elle permis de réduire le risque de contamination en industrie laitière, notamment lors de la dégradation du lactose, et en alimentation animale au cours de l'hydrolyse des fibres (**Bauer et al. 1996**). En effet, une catalyse à haute température permet de détruire les microorganismes présents dans ces aliments. En industrie papetière, les xylanases thermophiles de *Thermotoga* sont utilisées pour hydrolyser le xylane afin de permettre la libération du tanin et de la lignine responsables de la coloration du papier. L'intervention de ces enzymes va donc permettre d'éviter l'emploi de l'acide chlorhydrique dans le blanchiment du papier et par conséquent d'éviter la pollution de l'environnement (**Saul et al., 1995 ; Chen et al., 1997**). Les enzymes thermophiles sont utilisées pour réduire la viscosité des polymères naturels. L'hémicellulase de *T. neapolitina* est capable de diminuer la viscosité d'une solution de galactomanane. On les utilise aussi dans la clarification des jus de fruits (**Bauer et al., 1996**).

La protéolyse joue un rôle central dans plusieurs domaines notamment dans:

-la coagulation du sang et du lait (Lind, 1995);

-l'activation de zymogènes (Volten et Gitlin, 1995), de prohormones (Cohen et al., 1989) et de certains récepteurs (Nystedt et al., 1994);

-la maturation des hormones (Berg et al., 1995);

-la transformation des protéines antigéniques en système immunitaire nécessitant une protéolyse antérieure (Berg et al., 1995; Gacsynska et al., 1994);

-la digestion des macromolécules protéiques présentes dans le tractus digestif;

-la virulence des agents pathogènes qui serait liée à la sécrétion de protéases qui attaquent les tissus hôtes (McKerrow et al., 1993).

Les enzymes protéolytiques constituent aussi un outil majeur pour l'analyse de la séquence des protéines, pour l'identification et l'isolement de domaines protéiques multi-fonctionnelles (Walsh, 1986).

Avec l'avènement de la biologie moléculaire, une nouvelle dimension s'est ajoutée à l'étude des protéases par le clonage et le séquençage des ADN correspondants; ceci a largement contribué à la compréhension de l'organisation de différents domaines des protéases régulatrices complexes, de leur fonction et de leur évolution (Neurath, 1989).

Ces hydrolases (glycosidases et protéases) sont donc très importantes en biotechnologie. Mais, la plupart d'entre elles, distribuées dans le commerce, ne sont pas très stables et possèdent de larges spécificités. Nous nous proposons d'étudier dans ce travail, les glycosidases et les protéases du termite *Macrotermes subhyalinus* et de son champignon symbiotique *Termitomyces sp.* Cette étude consistera à:

-faire l'inventaire des activités glycosidasiques et protéasiques;

-rechercher les activités glycosidasiques thermophiles et thermostables;

-mettre en évidence les activités exo-glycosidasiques possédant de bonnes potentialités d'application en synthèse;

-purifier à homogénéité électrophorétique les enzymes présentant des activités originales afin de les caractériser.

## **Chapitre 1**

## **REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

#### **I-Termites**

## 1-Classification des termites

Les termites sont des Isoptères. Ils se nourrissent essentiellement de matières végétales. Ils sont repartis en deux grands groupes selon l'évolution des microorganismes symbiotes:

-les termites supérieurs, dont les symbiotes sont uniquement des bactéries;

-les termites inférieurs, dont les symbiotes sont des protozoaires et des bactéries (Cleveland, 1923; Honigberg, 1970; Breznak et Pankratz, 1977).

## **1-1-Termites inférieurs**

Les termites inférieurs sont constitués de cinq familles (Bachelier, 1978):

-les *Mastotermitidae* (ils sont représentés par une seule espèce primitive d'Australie septentrionale appelée *Mastotermes darwiniensis*);

-les Kalotermitidae (ce sont des termites primitifs sans ouvriers. Ils forment des colonies renfermant au maximum 5000 individus. Le genre Cryptotermes est commun à toute l'Afrique occidentale);

-les *Hodotermitidae* (ils forment des colonies complètes avec des ouvriers et des soldats. Les espèces sont peu nombreuses dans cette famille);

-les *Rhinotermitidae* (cette famille renferme peu de genres. On y trouve le genre *Coptotermes* dont les soldats possèdent une glande frontale rejetant un liquide blanc visqueux, d'où le nom "termite à latex" donné à ces insectes);

-les Serritermitidae du Brésil (ils représentaient une ancienne sous-famille des Rhinotermitidae).

Ces termites inférieurs possèdent dans leur tube digestif des zooflagellés, des spirochètes et des bactéries qui dégradent les composantes du bois (Cleveland, 1923; Honigberg, 1970; Breznak et Pankratz, 1977).

## 1-2-Termites supérieurs

Ils représentent les deux tiers de l'ensemble des Isoptères. Ils sont regroupés dans une seule grande famille appelée *Termitidae*. Les *Termitidae* représentent les neuf-dixième des termites africains. Cette grande famille est subdivisée en quatre sous-familles qui sont:

-les Apicotermitinae;

-les Nasutitermitinae;

-les Termitinae;

-les Macrotermitinae (Honigberg, 1970).

## 2-Rôle des micro-organismes symbiotiques des termites dans la digestion des glucides

Les termites sont capables de dégrader la plupart des polysaccharides végétaux (la cellulose et les hémicelluloses), la lignine et la pectine (Goyal et al., 1991; Biely, 1985; Crawford et al., 1983).

## 2-1-Chez les termites inférieurs

Le tube digestif des termites inférieurs contient généralement des zooflagellés, des spirochètes et des bactéries (Cleveland, 1923 ; Honigberg, 1970; Breznak et Pankratz, 1977). Ces bactéries appartiennent aux genres Reticulitermes, Parotermes, Kalotermes, Zootermopsis, Neotermes et Amitermes. Elles sont capables de dégrader la cellulose (Beckwith et Rose, 1929). French et Bland (1975) ont montré que des bactéries isolées à partir de la panse rectale de Coptotermes lacteus ne digèrent pas certains sucres simples (cellobiose, xylobiose...), mais produisent une cellulase et plusieurs autres enzymes. La durée de vie du termite abritant ces bactéries est considérablement diminuée par l'ingestion d'antibiotiques qui détruisent la microflore bactérienne (Eutick et al., 1978). Les protozoaires symbiotiques du termite Zootermopsis angusticollis produisent des enzymes capables de transformer la cellulose en glucose (Cleveland, 1923; Trager, 1932 et 1934; Yamin, 1978; Yamin et Trager, 1979). Les travaux de Hungate (1938 et 1946) lui ont permis de conclure que le Zootermopsis, sans l'aide de ses flagellés, digère par lui même un tiers de la cellulose alimentaire. Le reste est digéré par les flagellés symbiotiques. Grassé (1982) a trouvé que l'intestin moyen des termites à zooflagellés produit des cellulases et des cellobiases aboutissant à la dégradation complète de la cellulose. Les zooflagellés de la panse rectale digèrent le bois en totalité et sécrètent dans la panse des cellulases et de la cellobiase. La défaunation des ouvriers de Coptotermes lacteus entraîne une disparition totale en 48 heures des activités cellulasique et cellobiasique détectées dans la panse (Mac Ewen et al., 1980).

#### 2-2-Chez les termites supérieurs

Depuis longtemps, Kovoor (1967), Noirot et Noirot-Timothée (1969) ont pensé que la partie moyenne de l'intestin des termites supérieurs (encore appelée mésenteron) ne contenait pas de micro-organismes symbiotiques. Selon ces auteurs, les enzymes présentes dans cette partie du tube digestif seraient donc sécrétées par le termite lui même parce que la remontée du bol alimentaire de l'intestin postérieur vers l'intestin moyen est impossible. De même, l'utilisation d'antibiotiques chez certains termites tels que *Nasutermes walkeri* et *Nasutermes exitiosus* n'entraîne aucun effet délétère sur l'activité cellulasique (Hogan *et al.*, 1988). Ce constat a permis à Slaytor (1992) de penser que la microflore symbiotique anaérobie ne joue aucun rôle dans la dégradation de la cellulose chez les termites. Cette affirmation sera d'abord contestée par Czoliz *et al.* (1985) ensuite, par Brauman (1989) et par Brauman *et al.* (1990) et à cause, d'une part, de la présence dans l'intestin postérieur (encore appelé proctodéum) des termites xylophages d'une très importante communauté bactérienne et d'autre part, de l'isolement de bactéries cellulolytiques anaérobies à partir du tube digestif de plusieurs espèces de termites supérieurs.

Cinq cents (500) souches d'Actinomycètes cellulolytiques ont été isolées des tubes digestifs de termites (Pasti et Belli, 1985; Brauman, 1989; Pasti et al., 1990) mais leur implication éventuelle dans la dégradation des composés végétaux n'a pas été démontrée. Une souche xylanolytique de *Nasutermes lujae* a été isolée de son segment mixte, mais son implication dans la xylanolyse n'a pu être montrée (Brauman, 1989).



Figure 1: Nid du termite Macrotermes subhyalinus

Les *Macrotermitinae*, en plus des bactéries symbiotiques de leur tube digestif, développent une symbiose originale. Ils ont la particularité de vivre avec un champignon dit termitophile qu'ils cultivent dans leur nid (figure 1) sur des structures particulières appelées «meules» (Grassé, 1984). Ils sont appelés par conséquent termites champignonnistes.

En somme, chez les termites supérieurs, le rôle de la microflore symbiotique dans la cellulolyse et la xylanolyse reste encore ambiguë.

## 3-Société des Macrotermitinae

Les *Macrotermitinae* renferment 12 genres. De part leur taille et l'importance de leurs colonies, ils sont parmi les termites les plus actifs (Abo-Khatwa, 1978 : Rouland, 1986). Ils sont rencontrés dans les savanes sèches et steppes (Noirot, 1955).

## 3-1-Castes de la termitière

Dans la termitière des *Macrotermitinae*, il existe des castes neutres (figure 2) et des castes reproductrices. Les castes reproductrices sont représentées par le roi et la reine. Leur rôle est d'assurer la pérennité des termites. Les castes neutres sont représentées par les ouvriers et les soldats. Parmi ces derniers, on distingue généralement les petits et les grands.



Figure 2 : Castes neutres du termite Macrotermes subhyalinus a et b-les ouvriers, c-les petits soldats, d-les grands soldats

Comme leur nom l'indique, ils assurent la défense de la termitière. Les ouvriers, non seulement construisent la termitière mais assurent la récolte de matériaux à la surface du sol. Les ouvriers se nourrissent de bois et autres matières végétales riches en cellulose qu'ils digèrent par l'intermédiaire de leurs enzymes (Grassé, 1937, 1944, 1945 et 1982; Noirot, 1952). Les soldats quant à eux, sont incapables de se nourrir seuls. Ils sont nourris, comme le couple royal, par trophallaxie stomodéale grâce aux ouvriers (Grassé, 1982).

# 3-2-Confection de la «meule» et le développement du champignon symbiotique

La meule a une forme irrégulière. Elle est construite à partir de débris végétaux récoltés par les ouvriers (figure 3).



Figure 3: Meule du termite Macrotermes subhyalinus

Les matières végétales sont ensuite accumulées et stockées dans la partie supérieure du nid, puis sont ingérées et malaxées par les pièces buccales et imbibées de salive par les ouvriers. Elles subissent un transit intestinal. Au niveau de l'intestin postérieur, il s'opère le tri entre fèces et futurs constituants de la meule déposés par le termite sous forme de mylosphères (Grassé, 1982). Ce passage par le tube digestif permet de fabriquer la meule qui constitue un milieu favorable au développement d'un champignon symbiotique (*Basidiomyces*) (Grassé, 1982). Ce micro-organisme se développe sur la meule, soit sous forme de mycotêtes (qui sont des amas de sphérocytes également appelées conidies), soit sous forme de mycélium.

L'espèce de champignon présente dans la termitière dépend du type de termite étudié. Cette diversité a conduit **Heim (1942)** à les désigner sous le nom générique de *Termitomyces*. Ils ne sont pas les seuls micro-organismes à être présents dans la termitière. Les termitologues ont pu noter la présence de spores de *Xylaria* ou d'*Aspergillus*. Mais la germination et la croissance de ces champignons sont inhibées (**Petch, 1913; Grassé, 1937; Zoberi, 1979; Thomas, 1987**) dans la termitière par cinq facteurs qui sont :

-le mécanisme d'activité du termite;

-l'inhibition par la salive et autres sécrétions du termite;

-le microclimat du nid;

-les antibiotiques produits par les Termitomyces;

-la composition chimique de la meule (Thomas, 1987).

### 3-3-Rôle du champignon dans la symbiose digestive

Les termites champignonnistes consomment la meule sur laquelle se développe le microorganisme symbiotique. Cette situation révèle deux concepts: l'endo-symbiose et l'exosymbiose.

Abo-khatwa (1978), Martin et Martin (1978, 1979) en dosant les activités cellulasiques des mycotêtes et des ouvriers de Macrotermes subhyalinus et Macrotermes natalensis, ont montré que les champignons symbiotiques apportent aux termites les enzymes nécessaires à la digestion de la cellulose. Les travaux de Rouland et al. (1988) ont montré que le termite champignonniste Macrotermes mulleri ne peut digérer la cellulose en absence de mycotête. Ceci est dû à l'absence d'une exo-cellulase chez le champignon, donc produite par le termite et d'une β-glucosidase différente de celle du champignon qui agissent en synergie avec l'endo-cellulase du champignon pour dégrader avec efficacité la cellulose. Matoub (1993) a revelé que le complexe xylanolytique du termite Macrotermes bellicosus est constitué d'une endo-xylanase, d'une exo-xylanase et d'une \beta-xylosidase. Chez le champignon symbiotique, il est constitué d'une endo-xylanase et d'une exo-xylanase. Deux endo-cellulases ont été également purifiées: l'une à partir du tube digestif du termite, l'autre à partir des mycotêtes du champignon symbiotique. La comparaison des propriétés biochimiques et structurales de ces enzymes a montré que l'endo-xylanase et l'endo-cellulase du termite sont d'origine fongique. Sur les trois enzymes purifiées à partir des mycotêtes, seules deux sont présentes dans le tube digestif du termite. Ce phénomène de digestion synergique entre le termite et le champignon symbiotique porte le nom d'endo-symbiose digestive termite/champignon (Rouland et al., 1990). Ce concept est différent de l'exo-symbiose digestive termite/champignon. En effet, le micro-organisme symbiotique va prédégrader la meule sur laquelle il se développe. Le termite, à son tour, va consommer cette meule prédégradée et achever la dégradation par ses propres enzymes digestives. Ce phénomène de digestion synergique entre le termite et le champignon symbiotique est appelé exo-symbiose digestive termite/champignon (Rouland et al., 1990).

## 3-4-Micro-organismes symbiotiques du termite Macrotermes subhyalinus

Le tube digestif du termite *Macrotermes subhyalinus* ne contient pas de protozoaires. L'intestin moyen contient en plus des conidiophores de *Termitomyces*, quelques petites chaînes de *Streptococcus* (bactéries). Une grande population de bactéries gram positif qui peuvent être des *Clostridium* et un grand nombre de *Streptococcus* ont été mis en évidence dans la panse de cet insecte (Abo-Khatwa, 1978).

## **II-Glycoside-hydrolases**

Les glycoside-hydrolases ou glycosidases hydrolysent les liaisons osidiques des polysaccharides et des glycoconjugués. Elles sont très spécifiques de l'anomérie de la liaison osidique. Ce qui permet de les classer en deux grands groupes : les  $\alpha$ -glycosidases et les  $\beta$ -glycosidases suivant qu'elles hydrolysent les liaisons  $\alpha$  ou  $\beta$ . Parmi ces deux grandes classes, on distingue les exo- et endo-glycosidases. Les premières attaquent l'extrémité non réductrice de la chaîne polysaccharidique. Les secondes hydrolysent les liaisons osidiques à l'intérieur des chaînes de polysaccharides.

## 1-Mécanismes d'action des glycoside-hydrolases

Le site actif des glycosidases comporte une paire d'acides carboxyliques jouant un rôle essentiel dans la catalyse enzymatique (tableau I). Hormis ces deux acides carboxyliques, de nombreuses similarités structurales existent entre les sites actifs des deux classes d'enzymes. Chez ces glycoside-hydrolases (endo et exo), deux mécanismes distincts (tableau I) décrivent l'acte catalytique: la rétention ou l'inversion de configuration (Sinnott, 1990; Mc Carter et Withers, 1994). En effet, chacun de ces mécanismes passe par un état de transition (de type oxocarbénium) similaire et chacune des étapes considérées est réversible. L'une des différences entre les deux mécanismes est la distance entre les deux acides carboxyliques. Elle est de 0,95 nm pour les glycosidases avec inversion de configuration, et 0,55 nm pour les glycosidases avec rétention (Ly et Withers, 1999).

Tableau I: Résidus d'acides aminés essentiels impliqués dans les mécanismes catalytiques des différentes familles des glycoside-hydrolases (GH). (d'après Henrissat, 1991: Henrissat et Bairoch, 1993, 1996 : Henrissat et Romeu, 1995)

Familles des glycoside-hydrolases (GH)	Mécanisme	Nucléophile/Base	Proton/Donneur
	catalytique	catalytique	catalytique
1,2,5,7,10,11,12,16,17,26,30,35,39,42,51 53,59,72 et79	rétention	Glu	Glu
3,13,22,32,68,70 et77	rétention	Asp	Glu
4,50,55,58,61,62,63,69,71,73,75,76,81,84 , 87,89,92,93 et 97	inconnu	inconnu	inconnu
6 et 74	inversion	Asp	Asp
8, 9,25,46 et 82	inversion	Asp	Glu
14 et 15	inversion	Glu	Glu
18, 20 et 56	rétention	Oxygène du carbonyle du groupe acétamido des substrats	Glu
19,37,43,44,64,78,80 et 91	inversion	inconnu	inconnu
23,24,47 et 48	inversion	inconnu	Glu
27 et 31	rétention	Asp	Asp
28,45 et 49	inversion	Asp	Asp
33,34 et 83	rétention	Tyr+Glu	inconnu
36,54,66 et 85	rétention	inconnu	inconnu
38	rétention	Asp	inconnu
52	rétention	Glu	Asp
57	rétention	Glu	inconnu
65	inversion	phosphate	Glu
67	inversion	inconnu	Glu
90	inversion	Glu+Asp	Asp
94	inversion	phosphate	Asp

## 1-1-Mécanisme d'inversion de configuration

L'hydrolyse catalytique des liaisons osidiques par les glycosidases agissant avec inversion de configuration se fait en une seule étape synchrone (figure 4). Dans cette catalyse, un acide et une base conjuguée sont impliqués (Withers, 1995). La base conjuguée aide à déprotoner la molécule d'eau nucléophile et l'acide protone l'oxygène du groupe partant O-R. Dans ce mécanisme, c'est la distance de séparation des deux acides carboxyliques d'environ 0,95 nm qui permettrait, en une étape, à une molécule d'eau et à une molécule de substrat de se lier à l'enzyme simultanément en passant par un état de transition de type oxocarbénium.



Figure 4: Mécanisme d'hydrolyse des glycosidases agissant par inversion de configuration. (d'après Schülen, 2000)

## 1-2-Mécanisme de rétention de configuration

Dans ce cas, l'hydrolyse enzymatique de la liaison osidique se fait en deux étapes successives (figure 5). La rétention de configuration passe par une double inversion de configuration comme cela a été décrit par Koshland (1953). Ainsi les deux acides carboxyliques ont des rôles différents. L'un joue le rôle de nucléophile permettant l'attaque du carbone anomérique du substrat et la formation d'un intermédiaire glycosyl-enzyme covalent tandis que l'autre fonctionne à la fois comme un acide et une base (Wang et Withers, 1995).

Lors de la première étape, par catalyse acide, le site catalytique acido-basique protone le groupe partant O-R pour donner l'alcool R-OH. Puis, dans la deuxième étape, il déprotone l'accepteur nucléophile qui vient attaquer le glycosyle. Les deux états de transition sont très semblables et de type oxocarbénium (Mc Leod *et al.*, 1994 ; Mc Intosh *et al.*, 1996).

Dans ce mécanisme, c'est la distance la plus courte entre les deux acides carboxyliques (0,55 nm) qui permettrait une attaque directe de l'ion carboxylate jouant le rôle de nucléophile sur le carbone anomérique du substrat. Ces deux étapes successives sont appelées : étapes de glycosylation (1), et de déglycosylation (2). Les deux étapes sont réversibles (Mc Leod *et al.*, 1994; Mc Intosh *et al.*, 1996).


# Figure 5: Mécanisme d'hydrolyse des glycosidases agissant par rétention de configuration (d'après Schülen, 2000)

#### 2-Classification des glycoside-hydrolases

#### 2-1-Classification internationale

Cette classification repose essentiellement sur la spécificité de substrats. Elle est la plus ancienne et a été réalisée sur la base des recommandations de l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire (I.U.B.M.B : Enzyme nomenclature Recommandations San Diego : Academic Press, 1992). Le grand avantage de ce système, c'est qu'il est très simple et largement appliqué par les enzymologistes. Cette classification internationale présente cependant des limites du fait que les glycosidases sont généralement capables d'hydrolyser plusieurs substrats. En plus, elle omet non seulement les caractéristiques mécanistiques et moléculaires (séquence, structure...) mais aussi toute considération liée à l'évolution de ces enzymes.

Dans cette classification, le code attribué aux glycosidases est EC 3.2.x. y où :

- 3, correspond à la classe des hydrolases ;

- 2, correspond à l'hydrolyse des liaisons glycosidiques ;

- x, représente le type de glycoside hydrolase (1, 2, et 3 sont utilisés respectivement pour les O-, N- et S-glycosidases);

- y, indique le substrat hydrolysé.

14

Comme exemples, nous pouvons citer:

- les  $\beta$ -glucosidases. Elles sont désignées par EC 3.2.1.21 où 21 représente le résidu  $\beta$ -glucosyle ;

- les  $\alpha$ -glucosidases. Elles sont désignées par EC 3.2.1.20 où 20 représente le résidu  $\alpha$ -glucosyle ;

- les  $\beta$ -galactosidases. Elles sont désignées par EC 3.2.1.23 où 23 représente le résidu  $\beta$ -galactosyle ;

-les thioglucosidases sont désignées par EC 3.2.3.1 alors qu'elles possèdent une séquence, un mécanisme moléculaire et une structure tridimensionnelle étroitement corrélés à ceux des O- $\beta$ -D-glucosidases EC 3.2.1.21 et notamment avec la  $\beta$ -glucosidase cyanogénique de *Trifolium refens*. Ces deux enzymes sont impliquées dans le système de défense des plantes laissant supposer un lien étroit dans leur évolution (**Burmeister** *et al.*, 1977).

#### 2-2-Classification structurale

De nombreuses études ont montré des similarités entre les séquences en acides aminés des glycosidases de différentes sources, et ont suggéré que ces enzymes pouvaient dériver de voies d'évolution similaires (Henrissat *et al.*, 1989 ; McGregor et Svensson, 1989 ; Schmidt *et al.*, 1989 ; Gräbnitz *et al.*, 1989 ; Leong-Morgenthaler *et al.*, 1991). Henrissat a apporté une contribution majeure à la compréhension des glycosidases en les classant dans un système de familles avec des homologies significatives de séquences (Henrissat, 1991; Henrissat et Bairoch, 1993; Henrissat et Romomeu, 1995; Henrissat et Bairoch, 1996) (tableau l).

Par ailleurs, les enzymes d'une même famille ont habituellement le même arrangement du site actif et l'on peut prédire que leur super-structure doit être similaire. En conséquence, le mécanisme est conservé au sein des membres d'une famille donnée (tableau I). Quelques similarités entre les familles ont mené au concept de «Superfamilles» ou «Clans». Ainsi, de la séquence d'une enzyme l'on peut prédire les caractéristiques de spécificité de substrat ainsi que le mécanisme. L'utilité de cette approche a été démontrée par Tews et al., (1996). Ainsi, la structure d'une chitobiase bactérienne de la famille 20 a permis à ces auteurs de comprendre les bases structurales du dysfonctionnement des hexosaminidases humaines mutantes de la même famille, responsables de la maladie de "Tay Sachs" (Gravel et al., 1995). Une famille est alors définie quand deux séquences au moins montrent une similarité significative en acides aminés et aucune similarité avec d'autres familles. Les comparaisons structurales avec les autres familles ont amené Henrissat à suggérer la nomenclature « Clan » dans laquelle la Super-famille 4/7 est référée comme étant le « Clan GH-A » (Clan des GlycosylHydrolases A) et subséquemment les

autres sont appelées B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M et N (Henrissat et Davies, 1997). On dénombre actuellement 14 clans notés de A à N. Les glycosidases sont regroupées dans 97 familles dont 4 ont été supprimées au cours de l'avancement des travaux de classification. Les familles supprimées sont les familles 21, 40, 41 et 60. Certaines enzymes dont les structures ont été identifiées n'ont pas été classées en familles encore moins en clans (tableau II).

Tableau II: Glycoside-hydrolases à structures connues en acides aminés mais non regroupées en familles.

Enzymes	Sources	EC
1,6-glucane synthase	Agariccus bisporus Horst U3	n.d
Endo-N-acétylglucosaminidase	Bacillus circulans KST 202	n.d
lysozyme B	Bacillus substilis YT-25	3.2.1.17
endo-rhamnosidase	Entérobacteriophage S16	3.2.1-
endo-1,4-glucanase	Ruminococcus flavefaciens FD-1	3.2.1.4
Exo-sialidase	Tannerella forsythensis ATCC-43037	3.2.1.18
ESAC0000-65D0215	Uncultured bacterium	n.d
Chitinase/lysozyme	Volvox carteri	3.2,1.14

#### 3-Réactions catalysées par les glycosidases.

#### 3-1-Réactions d'hydrolyse

Les glycosidases ont pour premier rôle la catalyse des réactions d'hydrolyse d'oligosaccharides ou de glycoconjugués selon le schéma réactionnel présenté dans la **figure 6** :



#### Figure 6: Schéma général de la réaction d'hydrolyse catalysée par les glycosidases.

Les étapes de la catalyse enzymatique étant toutes réversibles, il est possible d'utiliser les glycosidases pour catalyser la formation de la liaison osidique. En ce sens, deux approches dans la préparation de glycoconjugués par les glycosidases sont émises. La première est la réaction de synthèse, contrôlée thermodynamiquement et la seconde est la réaction de transglycosylation, contrôlée cinétiquement.

#### 3-2-Réactions de synthèse

Cette réaction est la réaction inverse de l'hydrolyse. Le substrat pour l'enzyme est le monosaccharide libre (figure 7).



Figure 7: Schéma général de la réaction de synthèse catalysée par les glycosidases

Les rendements de synthèse sont souvent très faibles en milieu aqueux (aux alentours de 10%) du fait que l'équilibre de la réaction est largement en faveur de la réaction d'hydrolyse. Cependant, en éliminant le produit de la réaction au fur et à mesure de sa synthèse (Ajisaka et al., 1987), ou en diminuant l'activité de l'eau, on peut déplacer cet équilibre vers la réaction de synthèse. Malgré tout, les rendements restent faibles.

#### 3-3-Réactions de transglycosylation.

La transglycosylation constitue une approche cinétique de la synthèse enzymatique de la liaison osidique. Dans ce cas, le transfert du résidu glycosyle ne se fait plus sur une molécule d'eau mais sur accepteur nucléophile (**R'OH**) autre que l'eau (**figure 8**). L'enzyme pouvant à la fois catalyser l'hydrolyse du substrat mais aussi l'hydrolyse du produit de transglycosylation, une compétition s'installe entre les réactions de transglycosylation et d'hydrolyse. Généralement, les rendements sont bien meilleurs en transglycosylation qu'en synthèse (de 30 à 50%) (**tableau III**). Cependant, la transglycosylation dépend de l'accepteur nucléophile ajouté dans le milieu. Ainsi, l'utilisation d'une grande quantité de solvant organique dans le milieu réactionnel s'avère être une approche pour limiter l'apport en eau; la transglycosylation s'effectuant pour des teneurs en solvant organique allant de 50 à 95%. Une autre approche est de travailler en milieu congelé (**Chiffoleau-Giraud** *et al.*, **1997**). Malgré les différentes approches utilisées, le rendement de transglycosylation de la réaction dépend en partie de la source enzymatique utilisée (**Leparoux** *et al.*, **1997**). En général, les glycosidases produisent plus facilement des liaisons glycosidiques (1-6) pendant les réactions de transglycosylation à cause de la grande réactivité du groupement alcool primaire de l'accepteur lorsque celui-ci est un glycosyle.



Figure 8 : Schéma général de la réaction de transglycosylation catalysée par les glycosidases. Compétition entre transglycosylation (1) et hydrolyse (2)

Tableau III: Produits de synthèse et leur rendement de transglycosylation

Source	Donneur de	Accepteur de	Principaux produits	rendement
enzymatique	nzymatique glycosyle et gl		formés	(%)
	enzyme			
Bacillus circulans				
(Vetere et Paoleti,	Lactose	GlcNAc	β-Gal(1-4)GlcNAc	24
1996)	(β-galactosidase)			
Thermus	PNP-β-Gal		Phenylethylgalactoside	31
thermophilus (Dion	PNP-β-Glc	Phényléthanol	Phenylethylglucoside	35
<i>et al.</i> , 1999)	(β-glycosidase)			
Achatina achatina				
(Leparoux <i>et al.</i> ,	PNP-β-Gal	Phényléthanol	Phenylethylgalactoside	25
1997)	(β-galactosidase)			
Trichoderma reesei	P-nitrophényl-β-	éthanol	éthyl-β-lactose	18
(Totani <i>et al.</i> ,	lactoside (cellulase	1-octanol	octyl- $\beta$ -lactoside	5-13
2001)	C1)	dodecanol	octyl- $\beta$ -lactoside	5-13
			$\beta$ -Gal-(1-6)- $\alpha$ -Gal-OMe	14
Escherichia coli	<i>O</i> NP-β-Gal	Me-α-Gal	$\beta$ -Gal-(1-6)- $\beta$ -Gal-OMe	22
Nilsson (1988)	(β-galactosidase)	Me-β-Gal	$\beta$ -Gal-(1-3)- $\beta$ -Gal-OMe	3
		-		
Paecilomyces			oligosaccharide contenant	
lilacinus	maltose	maltose	des liaisons osidiques $\alpha$ -	8-17
(Kobayashi, 2003)	( $\alpha$ -glucosidase)		(1-3) et $\alpha$ -(1-2)	

Elles sont aussi capables de former les autres liaisons osidiques telles que (1-1), (1-2), (1-3) et (1-4). Cependant, ces dernières sont moins stables car plus rapidement et facilement hydrolysées que la liaison osidique (1-6) (Yoon et Ajisaka, 1996).

#### 4-Nature et propriétés des glycosidases

#### 4-1-Glycoside-hydrolases amylolytiques

#### 4-1-1-Amylases

Les  $\alpha$ -amylases (EC 3.2.1.1) sont des endo-enzymes capables de rompre, uniquement et tout à fait au hasard, les liaisons D-glucosidiques  $\alpha$ -(1-4) des constituants de l'amidon endommagé ou gélatinisé mais leur action s'arrête au voisinage des liaisons interchaînes  $\alpha$ -(1-6). Elles libèrent des fragments allant d'une unité glucose à plusieurs dizaines qui correspondent alors à des  $\alpha$ -dextrines (**Potus et Drapron, 1997**).

La  $\beta$ -amylase (EC 3.2.1.2) est une exo-enzyme qui hydrolyse alternativement les liaisons  $\alpha$ -(1-4) D-glucosidiques de l'amidon à partir des extrémités non réductrices des chaînes en libérant du  $\beta$ -maltose. Son action s'arrête au voisinage des liaisons interchaînes  $\alpha$ -(1-6)



Action conjointe de l' $\alpha$ -amylase et de la  $\beta$ -amylase

#### Figure 9: Synergie des activités α et β-amylasiques sur une β-dextrine.

la  $\beta$ -amylase seule est inactive, mais devient active après action de l' $\alpha$ -amylase (d'après Potus et Drapron, 1997)

extrémité réductrice

Les chaînes linéaires d'amylose sont entièrement hydrolysées en maltose lorsqu'elles sont constituées d'un nombre pair d'unités glucose; une petite quantité de glucose est libérée lorsque le nombre d'unités glucose est impair. L'amylopectine n'est que partiellement dégradée en donnant du maltose et des  $\beta$ -dextrines limites (**Potus et Drapron, 1997**).

Les activités  $\alpha$  et  $\beta$ -amylasiques ne sont pas indépendantes entre elles. l'action de l' $\alpha$ amylase favorise celle de la  $\beta$ -amylase puisqu'elle crée à partir de l'amidon de nouvelles extrémités non réductrices qui sont reconnues comme substrat par la  $\beta$ -amylase (figure 9). En conséquence, seules les activités  $\alpha$ -amylasiques sont contrôlées de façon courante et éventuellement corrigées.

La glucoamylase (EC 3.2.1.3) hydrolyse l'amidon à partir de l'extrémité non réductrice pour former du glucose (Fujino et al., 1990).

Deux amylases à activités originales ont été purifiées à homogénéité électrophorétique à partir de l'extrait brut de Sulculus diversicolor aquatilis (Tsao et al., 2003). L'une de ces enzymes possède une activité exo-amylasique, tandis que l'autre est caractérisée par une double activité catalytique à savoir une activité exo-amylasique et une activité endo-amylasique (Tsao et al., **2003)**. Ces deux enzymes hydrolysent les liaisons glycosidiques  $\alpha(1-4)$  et  $\alpha(1-6)$ . Ces mêmes liaisons osidiques sont clivées par l'amylopullulanase de Bacillus sp. DSM 405 grâce à un seul et même site catalytique, ce qui permet à cette enzyme de digérer l'amidon et le pullulane. Lorsque l'amidon est utilisé comme substrat, les produits libérés sont des malto-oligosaccharides. Quand il s'agit du pullulane, on obtient comme produit majeur le maltotriose (Brunswick et al., 1999). Certaines amylases sont capables d'hydrolyser les malto-oligosaccharides. C'est le cas de l'aamylase de la glande salivaire humaine qui est capable d'hydrolyser le maltotriose en maltose et glucose. Cette enzyme glycosylée est capable de libérer du glucose lorsqu'elle dégrade les autres oligo-saccharides (Koyama et al., 2000). L' $\alpha$ -amylase extracellulaire de la bactérie Thermus filiformis ork A2 hydrolyse les malto-oligosaccharides pour libérer le maltose comme produit essentiel. Le glucose et le maltotriose sont libérés comme produits secondaires. Après 6 heures de digestion, la concentration de glucose dans le milieu réactionnel devient la plus importante (Chessa et al., 1999). D'autres par contre ne sont pas capables de dégrader les oligo-saccharides. Parmi celles ci se trouve l'amylase de Bacillus thermooleovirans NP54. Ces deux produits ne sont pas clivés par cette même enzyme amylolytique. Ce qui fait penser à une exo-amylase.

Source enzymatique	pН	Température	PM	Référence
	optimum	Optimale		
		(°C)		
Scytalidium thermophilum	6,0	60	36000	Aquino <i>et al.</i> , 2003
Sulculus diversicolor	6,0	45	55700	Tsao <i>et al.</i> , 2003
aquatilis	6,0	50	65000	
Finger millet	5,0-5,5	45-50	45000	Nirmala et Muralikrishna, 2003
Lactobacillus fermentum	5,0	40	106000	Talamond <i>et al.</i> , 2002
Bacillus circulans GRS 313	4,9	48	-	Dey et al., 2002
Haloferase mediterranei	7-8	50-60	58000	Perez-Pomares <i>et al.</i> , 2003
Bacillus clausii BT-21	9,5	55	101000	Duedahl-Olesen <i>et al.</i> , 2000
Phrostiphamıs trancatus Horn	6,0	-	60200	Mendiola-Olaya <i>et al.</i> , 2000
Lactobacillus manihotivorans LMG	5,5	55	135000	Aguilar <i>et al</i> ., 2000
Trichoderma harzianum	4,0	60	6 <b>87</b> 00	De Azevedo <i>et al.</i> , 2000
Bacillus stearothermophilus	7,0	50	64000	Chakraborty <i>et al</i> ., 2000
Bacillus isolate KSM- K38	8,0-9	55-60	55000	Hagihara <i>et al</i> ., 2001

## Tableau IV: Origines et quelques caractéristiques d'a-amylases mésophiles

PM: poids moléculaire

# Tableau V: Origines et quelques caractéristiques d'enzymes amylolytiques thermophiles

Source enzymatique	pH optimum	Température optimale (°C)	РМ	Référence
*Bacillus thermoeleovorans	8,0	100	-	Malhotra <i>et al.</i> , 2000
*Nocarddiopsis sp	5,0	70	-	Stamford <i>et al.</i> , 2001
*Thermus filiformis Ork A2	5,5	95	60000	Egas <i>et al.</i> ,1998
**Bacillus sp DSM 405	6,0 ou 6,5	70	126000	Brunswich et <i>al.</i> , 1999
***Streptomyces megasporus	6,0	Sup 85	97000	Dey et Agarwal, 1999

**PM** : poids moléculaire \* $\alpha$ -amylase, \*\*amylopullulanase, \*\*\* $\beta$ -amylase

L'analyse des séquences en acides aminés de cette enzyme a révélé une homologie de séquence en acides aminés avec l' $\alpha$ -amylase de *Bacillus sp.* H-167 dont les produits d'hydrolyse sont essentiellement le maltohexaose et le maltotétraose (**Duedahl-Olesen** *et al.*, 2000). L' $\alpha$ -amylase alcalinophile de *Bacillus* n'hydrolyse pas les malto-oligosaccharides dont le nombre de résidus glucosyles varie de 2 à 5 (**Igarashi** *et al.*, 1998).

Dans le groupe des enzymes amylolytiques mésophiles, il existe des enzymes alcalines. C'est le cas des  $\alpha$ -amylases de *Bacillus isolate* KSM-K38 et de *Bacillus clausii* BT 21 dont les pH optimums d'hydrolyse sont compris entre 8,0 et 9,5 (tableau IV). On peut obtenir des enzymes dont les poids moléculaires sont supérieurs à 100000 (tableau IV). Quant aux enzymes amylolytiques thermophiles, ces mêmes caractéristiques ont été notées. L' $\alpha$ -amylase de *Bacillus thermoeleovorans* est alcaline tandis que celle du *Bacillus sp*. DSM 405 a un poids moléculaire supérieur à 100000 (tableau V).

#### 4-1-2-Enzymes débranchantes

Les enzymes débranchantes sont celles qui hydrolysent la liaison  $\alpha(1-6)$ -D-glucosidique contenue dans l'amidon. Il s'agit de l'iso-amylase et de la pullulanase. La pullulanase hydrolyse seulement la liaison  $\alpha(1-6)$ -D-glucosidique du pullulane et de l'amylopectine. Tandis que l'isoamylase hydrolyse la liaison  $\alpha(1-6)$ -D-glucosidique de l'amylopectine et du glycogène. Elle n'hydrolyse pas celle contenue dans le pullulane (**Taniguchi, 1986**).

Une nouvelle pullulanase a été mise en évidence par **Cheong** *et al.* (2002). Cette enzyme hydrolyse la  $\beta$ -cyclodextrine en maltose et glucose. Ces substrats préférés sont la  $\beta$ cyclodextrine, l'amidon et le pullulane. Elle dégrade l'acarbose, un inhibiteur des  $\alpha$ -amylases pour donner un pseudotrisaccharide et du glucose. Cette enzyme est capable de transférer ce pseudotrisaccharide sur l'inhibiteur  $\alpha$ -amylasique pour former l'iso-acarbose. Elle hydrolyse le maltose et peut transférer le glucose sur une autre molécule de maltose pour former le panose lorsque le maltose est présent en faible concentration (0,5%) dans le milieu réactionnel (**Cheong** *et al.*, 2002).

#### 4-1-3-a-glucosidases

Les  $\alpha$ -glucosidases sont des exo-glycosidases qui hydrolysent la liaison  $\alpha$ -Dglucosidique. La liaison glucosidique peut être de type  $\alpha(1-1)$ ,  $\alpha(1-2)$ ,  $\alpha(1-3)$ ,  $\alpha(1-4)$  ou  $\alpha(1-6)$ (Kaushai *et al.*, 1990; Nakao *et al.*, 1994; Bravo-Torres *et al.*, 2004). L'enzyme la plus importante est celle qui hydrolyse la liaison de type  $\alpha(1-4)$ . Elle est appelée  $\alpha(1-4)$ -D-glucosidase ou maltase. C'est elle qui achève l'hydrolyse de l'amidon en scindant en glucose les unités de maltose et de maltodextrines limites provenant de l'action des  $\alpha$ -amylases. L' $\alpha(1-6)$ -D-glucosidase ou iso-maltase clive la liaison  $\alpha(1-6)$ -D-glucosidique contenue dans la structure des maltodextrines branchées.

Les températures et pH optimums d'hydrolyse de ces enzymes hydrolytiques varient en fonction de leurs origines (tableau VI). L'a-glucosidase humain a un poids moléculaire très élevé (500000) (tableau VI).

Source enzymatique	pH optimum	Température optimale (°C)	РМ	Référence
Trichomonas	4,5	-	103000	Ter-Kuile et al., 2000
vaginalis	5,5	-	103000	
Bifidobacterium	6,6	37	-	Van den <i>et al.</i> , 2003
adolescentis	6,8	47	-	
Mortierella alliacea	5-6	55	92000	Tanaka <i>et al.</i> , 2002
Paccilomyces lilacinus	5.0	65	54000	Kobayashi <i>et al.</i> , 2003
Apis mellifera	5,5	-	68000	Nishimoto <i>et al.</i> , 2001
Thermotoga maritima	7,5	90	2 x 55000	Raasch <i>et al.</i> , 2000
Granulocyte humain	6.0	-	500000	Delque-Bayer <i>et al.</i> , 1989
Glande mammaire bovine	6,6-7,0	-	4 x 85000	Shailubhai <i>et al.</i> , 1987
Entamoeba histolytica	6,5	45	55000	Bravo-Torres <i>et al.</i> , 2004
Suspension cellulaire de soja	6,8-7,5	-	110000 x 2	Kaushal <i>et al</i> ., 1990

Tableau VI: Origines et quelques caractéristiques d'α-glucosidases

PM : poids moléculaire

#### 4-2-Glycoside-hydrolases cellulolytiques

La sensibilité de la cellulose à l'hydrolyse enzymatique dépend de trois caractéristiques qui décrivent l'état du substrat: le degré de polymérisation (DP), , le degré de cristallinité et la surface spécifique accessible aux enzymes (Sinitsyn *et al.*, 1989).

Des pré-traitements physiques ou chimiques permettent de modifier l'état de la paroi ou de la cellulose et d'améliorer ainsi sa sensibilité à l'hydrolyse enzymatique. Malgré le caractère

homogène de ce polymère, plusieurs familles d'enzymes regroupées sous le terme de cellulases, interviennent dans sa dégradation. Ces enzymes sont produites par de très nombreux microorganismes: bactéries aérobies ou anaérobies, champignons... Elles sont secrétées sous la forme d'un complexe cellulasique qui renferme trois principaux types d'activité enzymatique que l'on différencie selon leur mode d'action et leur substrat préférentiel:

- les enzymes qui obéissent à un mécanisme endo et hydrolysant les liaisons glucosidiques internes d'une chaîne. Ce sont des endo-glucanases (1,4- $\beta$ -glucane-4-glucanohydrolase EC 3.2.1.4). Les liaisons internes étant plus accessibles dans les zones amorphes que dans les zones cristallines, la réactivité de la cellulose aux endo-glucanases évolue inversement à son indice de cristallinité;

- les enzymes qui agissent selon un mécanisme exo à partir de l'extrémité non réductrice d'une chaîne peuvent être classées en:

\*1,4-β-glucane-4-glucohydrolase (EC 3.2.1.74) qui libère du glucose;

\*1,4-β-glucane-4-cellobiohydrolase (EC 3.2.1.91) qui libère du cellobiose (dimère de glucose).

- les  $\beta$ -glucosidases ( $\beta$ -D-glucoside glucohydrolase EC 3.2.1.21) représentent le dernier groupe d'enzymes impliquées dans la dégradation de la cellulose. Elles hydrolysent le cellobiose en glucose (Bonnin *et al.*,1997).

A la nomenclature officielle basée sur des noms systématiques décrivant le substrat, le produit et le mode d'action de chaque enzyme, se superposent des appelations d'usage courant, tenant compte par exemple de l'utilisation de certains substrats. Une endo-glucanase peut alors devenir une «avicelase» ou une « CMCase », selon qu'elle hydrolyse un substrat cristallin ou amorphe. Les exo-glucanases qui libèrent du cellobiose sont communément appelées cellobiohydrolases, ou CBH (Bonnin et al., 1997).

Il existe une synergie entre ces différentes activités enzymatiques, ce qui signifie que l'activité globale de plusieurs enzymes en mélange est supérieure à la moyenne théorique des activités respectives de chacune. Ainsi, l'action des endo-glucanases produit des extrémités non réductrices et donc des sites de reconnaissance pour les exo-glucanases: c'est la synergie endoexo. De plus, l'hydrolyse du cellobiose par la  $\beta$ -glucosidase lève la rétro-inhibition que celui-ci exerce sur les enzymes qui le libèrent (**Bonnin et al., 1997**).

Afin d'améliorer la capacité d'un micro-organisme à hydrolyser la cellulose, chacune des activités présentées ci-dessus est le plus souvent assurée par plusieurs protéines enzymatiques, qui peuvent varier selon leur pH optimum, leur spécificité ou d'autres caractéristiques. C'est ainsi que le complexe cellulasique synthétisé par le champignon *Trichoderma reesei* renferme au

moins cinq enzymes génétiquement différentes: deux cellobiohydrolases et trois endoglucanases (Labudova et Farkas, 1983). Celui de *Trichoderma viride* se compose d'endo- $\beta$ -D-glucanases, dont trois ont une spécificité plus large et sont capables d'hydrolyser les xylanes (Beldman *et al.*, 1985). *Aspergillus oryzae* possède deux endo- $\beta$ -D-glucanases appelées CelA et CelB. La cellulase CelA appartient à la famille H tandis que la cellulase CelB est de la famille C (Kitamoto *et al.*, 1996).

Des cellulases particulières ont été mises en évidence chez certains organismes. Ainsi, l'enzyme cellobiohydrolase EC 3.2.1.91 de faible poids moléculaire (PM=23000) a été purifiée à homogénéité électrophorétique à partir du suc digestif de l'escargot Achatina fulica. Ce biocatalyseur possède en plus de son activité cellulasique, une activité β-glucosidasique. Une analyse de ses fragments séquencés en acides aminés a montré que cette cellulase ne possède aucune homologie de séquence avec les autres cellobiohydrolases dont les compositions en acides aminés ont été déterminés (Maeda et al., 1996). Une autre cellulase de Bacillus sp. a été isolée par Han et al. (1995). Cette enzyme exerce une double activité catalytique. Elle possède à la fois une activité endo-β-D-glucanasique et une activité exo-β-D-glucanasique. Des cellulases à larges spécificités ont été mises en évidence. L'endo-1,4-B-D-glucanase de Clostridium thermocellum qui est une enzyme alcaline (tableau VII), hydrolyse en plus de la cellulose (CMC, avicel et du papier filtre), la laminarine, le lichenane et le xylane (Hakamada, 1997). L'endo-1,4-B-D-glucanase de Bacillus circulans F2 hydrolyse fortement la cellulose, le pnitrophénylcellobioside, le 4-méthylumbelliferylcellobioside, le xylane et quelques oligosaccharides (Kim, 1995). Il existe aussi des cellulases à spécificités strictes. C'est le cas de l'endo- $\beta$ -D-glucanase de Streptomyces lividans qui n'hydrolyse le pas méthylumbelliferylcellobioside, le p-nitrophénylcellobioside et le xylane. Elle n'hydrolyse que la cellulose. Cette enzyme appartient à la famille A (Theberge et al., 1992). La cellulase de Dolabella auricularia dégrade la cellulose et les cello-dextrines de degré de polymérisation supérieur ou égal à 4. Ces deux substrats sont hydrolysés par l'enzyme en des sites distincts. L'hydrolyse du cellohexaose libère du cellobiose et du cellotétraose. Lorsqu'elle attaque le cellopentaose, elle provoque la libération du cellotétraose et du glucose (Anzai et al., 1984). Ce qui n'est pas le cas avec l'endo- $\beta$ -D-glucanase du termite Nasutitermes takasagoensis qui hydrolyse ce même substrat en deux composés qui sont le cellotriose et le cellobiose. Lorsque le substrat du milieu réactionnel est le cellotétraose, ce dernier est clivé en cellobiose (Tokuda et al., 1997). La différence de produits libérés au cours de l'hydrolyse des substrats s'accentue lorsque la carboxyméthylcellulose (CMC) est utilisée. En ce qui concerne les deux endo-β-D-

glucanases extracellulaires de Bacteroides succinogenes 585, elles hydrolysent la CMC pour libérer le cellobiose et le cellotriose (Mc Gavin et Forsberg, 1988). Quant à l'endo-B-Dglucanase de Clostridium thermocellum, les produits d'hydrolyse sont le glucose, le cellobiose, le cellotriose, le cellotétraose et un autre ose non identifié (Petre et al., 1981). Concernant les deux endo-B-D-glucanases de Thermotoga neapolitana, les produits prépondérants libérés sont le glucose et le cellobiose. L'une de ces enzymes possède une activité transglucosidasique (Bok et al., 1998) tout comme l'endo-\beta-D-glucanase EC 3.2.1.4 de la levure Rhodotorula glutinis qui hydrolyse la cellulose pour donner le glucose, le cellobiose et le cellotriose (Oikawa et al., 1998).

Source enzymatique	pH optimum	Température optimale (°C)	РМ	Référence
Dolabella auricularia	6,3		44 000	Anzai <i>et al.</i> , 1984
Aspergillus oryzae	5,0	55	31000	Kitamoto <i>et al.</i> , 1996
10 2	4,0	45	53 000	
Bacillus circulans	4,5	50	82000	Kim, 1995
Aspergillus niger	3,8-4,0	45	26000	Hurst et al., 1977
Bacteroides succinogenes	6.4	39	65000	McGavin et Forsberg 1988
Irpex lacteurs	4,0	-	15000	Kanda <i>et al</i> ., 1980
Clostridium thermocellum	6,0	_	56000	Petre <i>et al.</i> , 1981
	8,6-9,0	45	86000	Hakamada <i>et al.</i> , 1997
Bacillus sp KSM-S237	5,0-6,0	65	25000	
-	5,0-6,0	65	32500	Bagga <i>et al.</i> , 1990
	5,0-6,0	50	29000	
	5,0-6,0	50	72500	
Aspergillus nidulans	5,0-6,0	50	138000	
Streptomyces lividans 66	5,5	50	46000	Theberge et al., 1990

Tableau VII: Origines et quelques caractéristiques de cellulases mésophiles

PM : poids moléculaire

pH optimum	Température optimale (°C)	РМ	Référence
6,0	95	29000	Bok <i>et al.</i> , 1998
6;0	106	30000	
6,0	95	27000	Bronnenmeier <i>et al.</i> , 1995
7,5	95	29000	
5,0	70	29000	Oikawa <i>et al.</i> , 1998
6,0-6,5	70-73	100000	Lin et Stutzenberger, 1995
5,2	62	94000	Ng et Zeikus, 1981
			-
5,8	65	47000	Tokuda <i>et al.</i> , 1997
	<b>pH</b> <b>optimum</b> 6,0 6,0 7,5 5,0 6,0-6,5 5,2 5,8	pH optimumTempérature optimale (°C)6,0956,01066,0957,5955,0706,0-6,570-735,2625,865	pH optimumTempérature optimale (°C)PM6,095290006,0106300006,095270007,595290005,070290006,0-6,570-731000005,262940005,86547000

Tableau VIII: Origines et quelques caractéristiques physiques de cellulases thermophiles

PM : poids moléculaire

#### 4-3-Glycoside-hydrolases hémicellulolytiques

Leurs effets améliorants apparaissent à plusieurs stades de la panification. Elles conduisent à une augmentation de la machinabilité des pâtes et du volume du pain tout en diminuant la vitesse du rassissement. Cependant, un surdosage peut rendre les pâtes excessivement molles et collantes. L'interprétation biochimique de leur action a fait l'objet de plusieurs hypothèses. La plus fréquemment avancée est qu'elles permettent la solubilisation d'une fraction de pentosanes. Cette solubilisation conduit d'une part à une libération d'eau devenant disponible pour la formation du réseau de gluten et d'autre part à une diminution de l'effet défavorable des hémicelluloses insolubles sur la continuité du film de gluten (Rouau et Moreau, 1993).

#### 4-3-1-Glycoside-hydrolases xylanolytiques

La dégradation complète des hétéroxylanes en monomères nécessite l'action combinée d'endo et d'exo-glycosidases qui, non seulement, hydrolysent les liaisons au sein de la chaîne principale, mais également libèrent les constituants des chaînes latérales (Bonnin et al., 1997).

L'ensemble des activités nécessaires à la rupture des liaisons de la chaîne principale est regroupé sous le terme général de xylanases, alors que celles qui éliminent les chaînes latérales sont très largement répandues dans tous les compartiments du monde vivant. Celles issues des micro-organismes sont l'objet d'une littérature abondante (Bonnin *et al.*, 1997).

Parmi les enzymes xylanolytiques, on peut citer les endo-xylanases (1,4 β-D-xylane-4xylanohydrolase, EC 3.2.1.8.) et les  $\beta$ -xylosidases (1,4- $\beta$ -D-xylane-4-xylohydrolase, EC 3.2.1.37). Les endo-xylanases rompent la liaison  $\beta(1-4)$  à l'intérieur de la chaîne principale de xylane pour libérer des oligomères linéaires ou substitués de fort et de faible degré de polymérisation (DP). La nature, la fréquence et la répartition des substituants sur la chaîne de xylane conditionnent la capacité d'une endo-xylanase à hydrolyser un substrat. Les spécificités de reconnaissance des sites de coupure des endo-xylanases sont multiples et variables selon les sources. La majorité des endo-xylanases décrites dans la littérature sont capables d'hydrolyser une liaison dans un environnement non substitué. Cette règle générale a pourtant des exceptions. Citons à titre d'exemple, une endo-xylanase purifiée de Bacillus subtilis qui reconnaît un résidu d'acide glucuronique latéral et hydrolyse la liaison  $\beta(1-4)$  xylosyle du xylose non substitué adjacent. Elle est ainsi désignée sous le terme de glucuronoxylane xylanohydrolase (Nishitani et Nevins, 1991). De même, les spécificités de trois endo-xylanases produites par Aspergillus awamori se différencient par la présence ou la disposition nécessaire de résidus d'arabinose autour de la liaison hydrolysée (Kormelink et al, 1993). Parmi les endo-xylanases, certaines libèrent également de l'arabinose, en même temps que du xylose et des xylo-oligosides. C'est le cas pour un certain nombre provenant de souches d'Aspergillus niger (Siner et Dietrichs, 1975). Dans le groupe des endo-xylanases, on dénombre aussi des enzymes thermophiles, mésophiles, acides, neutres et alcalines (tableau IX). Les  $\beta$ -xylosidases (1,4- $\beta$ -D-xylane-4-xylohydrolase, EC 3.2.1.37) hydrolysent les petits oligomères libérés par les endo-xylanases, en monomère xylose. Elles sont généralement très acides. Certaines d'entre elles hydrolysent le xylane (tableau X). Les endo-arabinases (EC 3.2.1.99) coupent les liaisons a (1-5) entre deux résidus d'arabinose par une attaque au hasard à l'intérieur des chaînes linéaires d'arabinane et libèrent du monomère, dimère ou trimère d'arabinose.

La présence de ramifications limite leur efficacité. Des auteurs japonnais ont purifié une exo-arabinanase de haut poids moléculaire, à partir d'une souche d'*Erwinia carotovora*, active sur l'arabinane ramifié de betterave à sucre et libérant de l'arabinotriose comme produit final (Kaji et Shimokawa, 1984). Certaines sont actives sur les hétéropolymères, d'autres ne sont actives que sur les oligo-arabinosides.

Source	pH optimum	Température	PM	Référence
enzymatique		optimale		
		(°C)		
Aspergillus sp. FP	5,5	60	22000	Camacho et Aguilar,2003
Alcaligenes sp XY- 234	7,5	40	59000	Araki <i>et al.</i> , 1998
Bacillus NCL, 87-6-	6,0-10,0	40-60	45000	Balakrishnan <i>et al.</i> ,
10	8,0	40-60	25000	2002
Aspergillus nidulans KK-99	8,0	55	-	Taneja <i>et al</i> ., 2002
Fusarium	5,5	50	240000	Saha, 2001
verticillioides				
Penicillum sp-40	2,0	-	25000	Kimura <i>et al</i> ., 2000
Caldocellum	5,5-6,0	70	-	Luthi <i>et al</i> ., 1990
saccharolyticum				
Vibrio sp XY-214	7,0	37	52000	Araki <i>et al.</i> , 1999
Bacillus sp K-I	5,5	60	23000	Ratanakhanokchai <i>et</i> <i>al.</i> , 1999
Bacillus megaterium B6 ATCC 51946	7,5	85	-	Ray et Nanda, 1997
Bacillus souche D3	6,0	75	-	Harris <i>et al.</i> , 1997
Cryptococcus sp S-2	2,0	_	22000	Lefuji <i>et al.</i> , 1996

# Tableau IX: Origines et quelques caractéristiques physiques de xylanases

PM : poids moléculaire

Source enzymatique	pН	Température	PM	Hydrolyse	Référence
	optimum	optimale		le xylane	
		(°C)			
Bifidobacterium breve K-110	5,0	37	49000	oui	Shin <i>et al.</i> , 2003
Fusarium proliferatum	4,5	60	92000	non	Saha, 2003
Aureobasidium sp	3,0	65	-	-	lembo <i>et al.</i> , 2002
Fusarium verticilliodes	4,5	65	94500	non	Saha, 2001
Aureobasidium	3,5	80	41100	-	Hayashi <i>et al</i> .,
			0		2001
Aspergillus phoenicis	4,0-4,5	75	13200	non	Rizzatti <i>et al.</i> ,
			0		2001
Candida utilis IFO 0639	6,0	40	92000	non	Yanai et Sato, 2001
Trichoderma reesei	4,0	-	10000 0	oui	Hermann <i>et al.</i> , 1997
Trichoderma harziamım	4,0-4,5	75	60000	non	De Aximeug <i>et</i> al., 1996
Neocallimastix frontalis	6,4	37	83000 +5300 0		Garcia-Campayo et Wood, 1993
Neocallimastix frontalis	6,5	35	180	oui	Hebraud et Fevre, 1990
Aspergillus niger	3,8-4,0	70	12200 0x2	_	Rodionova <i>et al.</i> , 1983
Saccharum officinarum	4,8	78	62000	non	Chinen <i>et al</i> ., 1982

#### Tableau X: Origines et quelques caractéristiques de β-xylosidases

**PM : poids moléculaire** 

#### 4-3-2-Galactanases

Cet ensemble comprend des endo-galactosidases et des exo-galactosidases. Elles hydrolysent toutes les liaisons impliquant des résidus de galactose au sein de galactanes linéaires ou d'arabinogalactanes de type I ou II.

Les  $\beta$ -D-galactosidases (EC 3.2.1.23) ont été isolées de nombreuses sources et largement étudiées du fait de leurs applications industrielles dans l'hydrolyse du lactose. Elles peuvent être d'origine microbienne ou végétale, hydrolysent les liaisons  $\beta(1-4)$  et libèrent les résidus de galactose non réducteurs de galactanes ou d'arabinogalactanes de type I de faible poids moléculaire. Citons cependant les cas particuliers de la  $\beta(1-3)$  et  $\beta(1-6)$  des extrémités non réductrices d'arabinogalactanes de type II (Sekigahara *et al.*, 1989). La majorité des endo-galactanases (EC 3.2.1.89) décrites dans la littérature hydrolyse les liaisons  $\beta(1-4)$  entre deux résidus de galactose et libèrent du monomère ou des oligomères de degré de polymérisation (DP) inférieur ou égal à 4. Une endo  $\beta(1-6)$  galactanase a été mise en évidence dans une culture d'*Aspergillus niger* (Brillouet *et al.*, 1991). Certaines sont actives sur les hétéropolymères, d'autres ne sont actives que sur les oligoarabinosides.

#### 4-3-3-Xylo-glucanases

Lors de la dégradation enzymatique de tissus entiers, l'efficacité de l'hydrolyse de la cellulose est primordiale mais elle est limitée par la présence des autres constituants et par les nombreuses liaisons qui les associent. Par exemple, les xylo-glucanes des fruits et légumes ont un rôle fondamental dans la cohésion de l'édifice pariétal. Leur dégradation sera donc un préalable indispensable à l'hydrolyse de la cellulose. Leur squelette principal étant de même nature que celui de la cellulose, il sera principalement dégradé par des enzymes de type endo-glucanase. Cependant, cette dégradation sera modulée par la spécificité de l'enzyme et la disposition des résidus de xylose, de galactose et de fucose. En particulier, certaines endo-glucanases ne reconnaîtront qu'un résidu de glucose dépourvu de substituants. L'élimination des résidus latéraux de xylose et de galactose peut être catalysée par des osidases qui interviennent également dans la dégradation d'autres polysaccharides pariétaux. Il en est de même pour les  $\beta$ -glucanes mixtes dont la structure proche de celle de la cellulose, permet son hydrolyse par des endo-glucanases qui peuvent être spécifiques de la liaison (1-3) et/ou (1-4) (**Bonnin et al., 1997**).

#### **III-Protéases**

#### **1-Domaines d'intervention**

Les enzymes protéolytiques jouent des rôles importants dans les systèmes biologiques à cause des propriétés intrinsèques et des modifications irréversibles qu'elles réalisent dans les systèmes physiologiques. En effet, ces biocatalyseurs sont impliqués dans une multitude de processus physiologiques importants qui s'étendent de l'activation ou l'inactivation fonctionnelle des protéines par de simples événements protéolytiques, à des dissociations complètes des protéines en leurs constituants de base, les acides aminés. Ces enzymes peuvent donc être utilisées dans les études de séquençage de polypeptides, de structures de peptides et dans la désorganisation des processus pathologiques (Beynon et Bond, 1989).

#### 2-Classification des protéases

La classification des protéases adoptée par la Commission Internationale des Enzymes (1972) de l'Union Internationale de Biochimie et de Microbiologie moléculaire (IUBMB) suggérée initialement par **Hartley (1960)** reposait, comme chez les glycosidases sur la spécificité de substrat en classes, sous-classes et listées selon un ordre arbitraire. Avec le nombre de plus en plus croissant de protéases purifiées et caractérisées dont les structures primaires et tertiaires ont été déterminées, une classification rigoureuse s'imposait. Différentes classifications ont été proposées et elles se sont attachées à les regrouper en clans, familles et sous-familles, à l'intérieur de chaque groupe majeur de mécanisme catalytique (**Rawlings et Barrett, 1993**) et en fonction de leur comportement en présence d'inhibiteurs protéasiques spécifiques (**Beynon et Bond, 1989**).

Selon Rawlings et Barrett (1993, 1995), le "clan" est le terme utilisé pour décrire un groupe de membres de familles ayant évolué à partir d'une seule protéine ancestrale, mais qui ont divergé à tel point qu'on ne peut plus prouver leur lien de parenté par comparaison de leur structure primaire. La différence fondamentale entre les familles au sein d'un clan réside au niveau de la structure tertiaire. Le nom du clan est formé de deux lettres : la première lettre représente le type catalytique et la seconde est ajoutée arbitrairement (MA : Métallopeptidases du clan A). Le type catalytique se réfère à la nature chimique des groupes responsables de la catalyse des protéases. Ainsi, chez les types sérine ou thréonine peptidase, le groupe catalytique nucléophile est généralement le groupe hydroxyle d'un résidu de sérine ou de thréonine au site catalytique. Pour le type cystéine, c'est le groupe sulfhydryle et dans le cas des types acide aspartique et métallopeptidase, c'est une molécule d'eau activée. Une "famille" de peptidases est un groupe dans lequel tout membre montre un lien statistiquement significatif d'homologie de séquence en acides aminés au niveau du site actif avec au moins un autre membre de la famille. Selon ces auteurs, pour certaines familles plus complexes, la subdivision en sous-familles est utilisée. Chaque famille est nommée avec une lettre et un nombre; la lettre représentant le type catalytique, et le nombre est assigné arbitrairement (M1 : Métallopeptidases de la famille 1).

En tenant compte du mécanisme d'action, cinq types catalytiques de peptidases sont maintenant reconnus, parmi lesquels, les groupes sérine, thréonine, cystéine, aspartique ou métallopeptidase jouent un rôle essentiel dans la catalyse (**Barrett** *et al.*, 1998). Les peptidases à sérine, thréonine et cystéine sont très différentes de celles à acide aspartique et à métal car elles sont non seulement les seules à pouvoir se comporter volontier comme des transférases, mais aussi du fait que l'acte catalytique passe par un complexe intermédiaire covalent.

#### 2-1-Peptidases à sérine

Les peptidases à sérine sont regroupées actuellement en 10 clans, 40 familles et 52 sousfamilles par comparaison des structures tertiaires et l'ordre des résidus d'acides aminés dans la séquence catalytique (Barrett et al., 1998). Le clan le plus important est SA, à l'intérieur duquel on trouve la famille S1, la plus représentée de ce clan et qui contient les enzymes les plus connues des peptidases à sérine (trypsine et chymotrypsine). Ces peptidases comptent une trentaine de familles, qui diffèrent les unes des autres par leur séguence en acides aminés (Barrett et al., 1998). Elles sont d'origine diverses et sont rencontrées chez les mammifères, dans le pancréas (trypsines, chymotrypsines, élastases, kallikreines) et le sang (facteur Xa, thrombine). Ces familles sont aussi présentes chez les micro-organismes (subtilisine, V8, protéinase K,...) et les invertébrés (collagénases). La souche GX6638 de l'alcalophile Baccillus sp. contient plusieurs protéases dont deux sont des protéases à sérine. Ces deux enzymes protéolytiques possèdent des activités estérasiques. La protéase AS est très stable en milieu alcalin où elle conserve 88% de son activité à pH 12 pendant 24 heures à 25°C. La protéase HS possède à son tour une thermostabilité exceptionnnelle. A pH 9,5, l'enzyme a une demi vie de 100 min à 50°C et 25 min à 60°C (Durham et al., 1987). Quant à la protéase à sérine de la bactérie photosynthétique Rubrivivase gelatinosus KDDS1, elle a un pH optimum d'hydrolyse de 9,6 et une température optimale d'hydrolyse de 45°C. Cette protéase est stable aux pH compris entre 7 et 10 à 4°C pendant 14 heures. Elle est inhibée par un seul inhibiteur des protéases à sérine: le PMSF (Phénylméthylsulfonylfluoride). Cette enzyme protéolytique préfère les résidus méthionyle et phénylalanyle en position P<sub>1</sub>. Ce qui fait d'elle l'unique protéase à sérine préférant le résidu méthionyle (Kobei et al., 2004). Une autre protéase à sérine d'origine animale, isolée des myofibrilles du muscle du lézard Saurida undosquamis est quant à elle, inhibée par les inhibiteurs de protéases à sérine tels que le leupeptine, le TLCK (Tosylchlorométhylketone), l'inhibiteur trypsique de soja, l' $\alpha_1$ -antitrypsine et l'aprotinine. Cette enzyme ne reconnaît que la liaison peptidique engageant uniquement le groupement carboxylique de l'arginine (Ohkubo et al., 2004).

#### 2-2-Peptidases à thréonine

Cette classe d'hydrolases a été seulement reconnue récemment, et sa connaissance est en pleine évolution (Barrett et al., 1998). Ces biocatalyseurs hydrolytiques sont regroupés au sein d'un même clan (nommé TA), à l'intérieur duquel les peptidases sont divisées en cinq familles (T1A, T1B, T2, T3 et T5). Le nucléophile est la thréonine mais il peut être la sérine ou la

cystéine. La nature des autres acides aminés du site actif reste à élucider, malgré qu'il soit connu qu'au cours de l'hydrolyse, le proton est fourni par le groupe aminé N-terminal. Il faut noter que toutes les peptidases de ce groupe sont des endopeptidases, et des exemples sont connus chez les bactéries, les archaes et les eucaryotes mais pas chez les virus.

#### 2-3- Peptidases à cystéine

Les peptidases à cystéine regroupent plusieurs cathepsines lysosomales de mammifère, les peptidases cytosoliques activées par le calcium (calpaïnes) et les peptidases de plantes (la papaïne et l'actinidine). La papaïne demeure le membre le mieux étudié de ce groupe (**Drenth** *et al.*, 1971). Les peptidases à cystéine sont constituées de 8 clans, 56 familles et 65 sous-familles. Elles ont pour nucléophile, le groupe sulfhydryle du résidu Cys. Leur mécanisme catalytique est similaire à celui du type des peptidases à sérine dans lequel un nucléophile et un donneur de proton sont exigés. Le donneur de proton chez toutes les peptidases à cystéine identifiées à ce jour, est le résidu His. Cependant, dans certaines familles, un troisième résidu est nécessaire pour orienter le noyau imidazole de l'histidine. Les réactions catalysées par les peptidases à cystéine et de l'histidine (Cys/His ou His/Cys) dans la séquence linéaire des acides aminés du site catalytique diffère entre les familles; ce qui laisse supposer que les peptidases à cystéine ont évolué à partir de plusieurs origines séparées (**Rawlings et Barrett, 1994**).

#### 2-4-Peptidases à acide aspartique

Elles sont regroupées en 6 clans à l'intérieur desquels il y a 13 familles et 20 sous familles dont les structures tertiaires des peptidases sont connues. Le clan majoritaire est AA. Il comprend la famille la plus importante (A1), dans laquelle se trouve la pepsine A, la chymosine, la rénine, et la penicillopepsine. Les peptidases décrites sont des endopeptidases (Barrett *et al.*, 1998). A la différence des peptidases à sérine et à cystéine, ce groupe d'enzymes tout comme celui des métallopeptidases ne forme pas de complexe intermédiaire covalent. De ce fait, ce groupe catalyse les liaisons peptidiques sans l'utilisation de l'attaque nucléophile par un groupe fonctionnel de l'enzyme (Hofmann et Fink, 1984 ; Hofmann *et al.*, 1984 ; Dunn et Fink, 1984).

#### Peptidases à acide glutamique

Les peptidases à acide glutamique représentent le type le moins représentatif des peptidases. Elles sont regroupées en un "**clan**" (GA) à l'intérieur duquel il y a une seule famille (G1) caractérisée par une seule sous-famille (G1). La peptidase acytalidoglutamique du microorganisme *Scytalidium lignicolum* dont la structure est connue, fait partie de ce groupe de peptidases.

#### 2-5-Métallopeptidases

Comme leur nom l'indique, les métallopeptidases ne peuvent fonctionner sans la présence, dans leur site actif, d'un atome de métal, ce qui les différencie des protéases dont la catalyse est uniquement assurée par des acides aminés de la protéine. Elles sont très largement répandues dans le monde vivant, aussi bien chez les bactéries et les champignons que chez les organismes supérieurs. Les métallopeptidases, via la maturation et la dégradation des peptides ou de protéines, participent à la régulation d'un grand nombre de fonctions physiologiques vitales. Les métallopeptidases font partie des hydrolases chez lesquelles une molécule d'eau sert d'intermédiaire à l'attaque nucléophile d'une liaison peptidique. C'est une caractéristique qu'elles partagent avec les peptidases à acide aspartique, sauf que chez les métallopeptidases, un cation divalent, habituellement le zinc, mais quelques fois le cobalt ou le manganèse, active la molécule d'eau. L'ion métallique est maintenu en place par interaction avec les résidus d'acides aminés, habituellement au nombre de trois. Les ligands du métal connus chez les métallopeptidases, sont les résidus His, Glu, Asp ou Lys. En plus de ces ligands, au moins un autre résidu est exigé pour la catalyse. C'est le résidu Glu chez la plupart des métallopeptidases, mais dans certains cas le résidu Lys ou Arg peut être impliqué dans la catalyse (c'est le cas pour la leucyl aminopeptidase) ou le résidu Tyr (certaines peptidases des sous-familles Astacine et Serralysine). Par ailleurs, il faut souligner que le rôle de la Glu n'est pas établi de façon définitive. Initialement, on a pensé qu'elle agissait selon un mécanisme général de catalyse basique (James, 1993), mais une autre observation récente suggère plutôt un rôle électrophile (Mock et Stanford, 1996).

Les métallopeptidases sont regroupées en 15 clans, 52 familles et 77 sous-familles (Barrett et al., 1998):

#### - les clans MA et MB

Ces clans regroupent à eux seuls près de la moitié des enzymes des familles et sous familles des métallopeptidases. Les ligands du zinc de ces protéases sont des résidus His dans le motif His-Glu-Xaa-Xaa-His (pour MA) ou His-Glu-Xaa-Xaa-His-Xaa-Xaa-Gly-Xaa-Xaa-His/Asp (pour MB) où Xaa, représente un acide aminé quelconque.

- le clan MC et les autres clans

Le clan MC regroupe les métallo-carboxypeptidases. Il est constitué d'une seule famille (M14) qui contient aussi bien des enzymes animales (carboxypeptidases A et B) que bactériennes (carboxypeptidase T et γ-D-glutamyl (L)-méso-diaminopimélate peptidase I).

- les autres clans

Ils se rapprochent de l'un ou l'autre des clans MA, MB ou MC, mais diffèrent de ceux-ci et de chacun d'entre eux par les structures tridimensionnelles, l'agencement des acides aminés du site actif impliqués dans la catalyse enzymatique et le lien de parenté ancestral des peptidases qui les constituent.

### 2-6-Peptidases dont les types catalytiques sont inconnus

Certaines peptidases déjà caractérisées, n'ont pas pu être classées dans l'un quelconque des types catalytiques, du fait que leur mécanisme d'action chevauche deux types catalytiques ou tout simplement, parce que le motif du site actif et l'inhibiteur spécifique de groupe appartiennent à deux types catalytiques différents.

On dénombre dix-sept familles de métallopeptidases qui ne peuvent être encore assignées à un clan. Parmi elles, dix possèdent le motif HEXXH mais pas les autres caractéristiques des clans MA ou MB, et les autres, ne possèdent aucun motif similaire à un quelconque clan des métallopeptidases (Barrett *et al.*, 1998). Dans ce groupe de peptidases dont le type catalytique est inconnu, on peut citer:

- le facteur de sporulation SpollGA de Bacillus subtilis (U4);
- l'endopeptidase de la muréine de Escherichia coli (U6);
- la peptidase du bactériophage T4 (U9);
- la collégenase de Porphyromonas gingivalis (U32);
- la peptidase du bactériophage HK97 (U35);
- l'endopeptidase (protéine P5 de la muréine) du bactériophage phi-6 (U40);
- la prényl peptidase 2 de Saccharomyces cerevisiae (U48);
- la lit peptidase de Escherichia coli (U49);
- la protéine yabG de Bacillus subtilis (U57);
- la muramoyl-tétrapeptide carboxypeptidase de Escherichia coli (U61);
- la microcine-processing peptidase 1 de Escherichia coli (U61);
- la pseudomuréine endoisopeptidase Pei de Methanobacterium phage psiM2 (U64).

#### Chapitre 2

#### **MATERIEL ET METHODES**

#### I-Matériel

#### 1-Produits chimiques et réactifs

Les substrats synthétiques: p-nitrophényl- $\beta$ -D-glucopyranoside ( $pNP\betaGlc$ ), pnitrophényl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (pNP $\alpha$ Glc), p-nitrophényl- $\beta$ -D-galactopyranoside (pNP $\beta$ Gal), p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-galactopyranoside  $(pNP\alpha Gal)$ , *p*-nitrophényl-β-D-xylopyranoside  $(pNP\beta Xyl)$ , p-nitrophényl- $\alpha$ -D-xylopyranoside  $(pNP\alpha Xyl)$ , p-nitrophényl- $\beta$ -L-fucopyranoside  $(pNP\betaFuc)$ , p-nitrophényl- $\alpha$ -L-fucopyranoside  $(pNP\alphaFuc)$ , p-nitrophényl- $\alpha$ -D-mannopyranoside p-nitrophényl- $\beta$ -D-mannopyranoside  $(pNP\alpha Man)$ ,  $(pNP\beta Man)$ , p-nitrophényl- $\alpha$ -Larabinopyranoside (pNP $\alpha$ Ara), p-nitrophényl- $\beta$ -L-arabinopyranoside (pNP $\beta$ Ara), p-nitrophényl-N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminide  $(pNP\beta GlcNAc),$ p-nitrophényl-N-acétyl- $\alpha$ -D-galactosaminide phényléthanol (PE), carboxyméthylcellulose (CMC), phényléthyl-B-D- $(pNP\alpha GalNAc)$ . galactopyranoside (PE $\beta$ Gal), Glu-*p*NA, BA(N $\alpha$ -Benzoyl-DL-Arginine)-*p*NA.

Les substrats naturels: saccharose, maltose, nigerose, panose, kojibiose, cellobiose, xylobiose, maltotriose, maltotétraose, maltopentaose, maltohexaose, maltoheptaose, isomaltose, 6-o- $\alpha$ -maltosyl- $\beta$ -cyclodextrine, raffinose, mélizitose, melibiose, pullulane, amidon, xylane et arabogalactane sont des produits fournis par Sigma Aldrich.

Les peptides et les acides aminés bloqués: N-benzyloxycarbonyl thréonyl méthyl ester (Z-Thr-OMe), N-benzyloxycarbonyl séryl thréonyl méthyl ester (Z-Ser-Thr-OMe) et les substrats chromogéniques acyl-*p*-nitroanilides (acyl-*p*NA): Gly-*p*NA, Ala-*p*NA, Val-*p*NA, His-*p*NA, BZ(Benzoyl)-Tyr-*p*NA, Leu-*p*NA, Ile-*p*NA Nac(N-acétyl)-Leu-*p*NA, Met-*p*NA, Pro-*p*NA, Phe-*p*NA, Lys-*p*NA, Arg-*p*NA, Asp-*p*NA et (Cys-*p*NA)<sub>2</sub> proviennent de la firme Bachem.

Les gels: Sephacryl S-200 HR, DEAE-Sepharose CL-6B et Phényl- Sepharose CL-6B sont des produits de Pharmacia Biotech.

Les plaques de gel de silice (plaques HPTLC) sont fournis par la société Merck.

Les protéines standards pour la détermination de la masse moléculaire et les produits chimiques utilisés en électrophorèse sur gel de polyacrylamide proviennent de la firme Bio-Rad.

Tous les autres produits chimiques et réactifs utilisés sont de qualité analytique.

#### 2-Sources enzymatiques

Les sources enzymatiques utilisées dans ce travail sont: la meule, les mycotêtes du champignon symbiotique *Termitomyces sp.* et les castes neutres du termite *Macrotermes subhyalinus*. L'ensemble de ce matériel biologique, récolté des termitières de *Macrotermes subhyalinus* du campus de l'Université de Cocody (Abidjan), est stocké au congélateur à -20°C.

#### **II-Méthodes**

#### 1-Préparation des extraits bruts enzymatiques

Environ 10 g de termite sont lavés à l'eau distillée, essorés sur papier filtre puis placés dans un récipient disposé dans un bac à glace. Ils sont ensuite broyés dans 50 ml de NaCl 0,9 % (p/v) à l'aide d'un microbroyeur Ultra-turax (type T 25). Trois grammes de mycotête ou de meule sont broyés dans 50 ml de NaCl 0,9 % (p/v) dans un mortier en porcelaine. Le broyat obtenu dans chaque cas est centrifugé pendant 30 min à 13000 tours/min dans une centrifugeuse réfrigérée SIGMA 3K 20, à une température comprise entre 0 et 5°C. Le surnageant obtenu constitue l'extrait brut enzymatique.

#### 2-Dosage des activités enzymatiques

#### 2-1-Dosage des activités p-nitrophénylglycosidasiques

Dans les conditions standards, les activités p-nitrophénylglycosidasiques de l'extrait brut enzymatique sont mesurées dans 1 ml de tampon acétate 100 mM pH 5,6 contenant 5 mM de pnitrophényl-D-glycopyranoside et 50  $\mu$ l d'extrait brut enzymatique.

Pour les glycosidases purifiées, les activités *p*-nitrophénylglycosidasiques sont déterminées dans un milieu réactionnel contenant 250  $\mu$ l de tampon acétate 20 mM pH 5,6 ou pH 4,0 en présence de 1,25 mM de *p*-nitrophényl-D-glycopyranoside et 50  $\mu$ l de solution enzymatique purifiée.

Dans chaque cas, l'incubation est faite à 37°C pendant 10 min. La réaction est arrêtée par ajout de 2 ml de carbonate de sodium 1,0 M. L'intensité de la coloration du *p*-nitrophénolate libéré est mesurée au spectrophotomètre (spectrophotomètre U.V visible Hitachi U-200) à 420 nm contre un témoin contenant tous les produits excepté la solution enzymatique. La quantité de

*p*-nitrophénolate libéré dans le milieu réactionnel est déterminée à l'aide d'une courbe étalon réalisée dans les conditions standard des tests enzymatiques.

#### 2-2-Dosage des activités protéasiques

Dans les conditions standards, la détermination des activités protéasiques en utilisant les substrats acyl-*p*-nitroanilide a été faite à 37°C pendant 10 minutes dans un mélange réactionnel (1 ml) contenant 950  $\mu$ l de substrat 1 mM préparé dans le tampon phosphate 100 mM pH 8,0 ou dans le tampon acétate 100 mM pH 5,0 et 50  $\mu$ l d'extrait brut enzymatique. La quantité de *p*-nitroaniline est dosée à 412 nm au spectrophotomètre UV-visible Kontron (Unikon 860) thermostaté.

#### 2-3-Dosage des activités oligosaccharidasiques

L'hydrolyse enzymatique des oligosaccharides entraîne la libération de glucose. La quantité de cette substance libérée est dosée par la méthode de Kunst *et al.* (1984) utilisant la glucose oxydase peroxydase.

#### 2-3-1-Préparation de la solution de glucose oxydase-peroxydase

Cette solution préparée extemporanément résulte d'un mélange de deux solutions A et B. La solution A est obtenue par dissolution de 0,6 mg de glucose oxydase et de 0,24 mg de peroxydase dans 60 ml de tampon phosphate 100 mM pH 7,0. La solution B est une solution d'*o*dianisidine (6,6 mg / ml) préparée dans 0,6 ml de tampon phosphate 100 mM pH 7,0.

#### 2-3-2-Technique de dosage

L'essai standard d'extrait brut enzymatique contient 100 mM d'oligosaccharide et 50  $\mu$ l de solution enzymatique dans un volume final de 1 ml de tampon acétate 100 mM pH 5,4.

Quant à celui des glycosidases purifiées, il est constitué de 10 mM d'oligosaccharide et 50  $\mu$ l de solution enzymatique dans un volume final de 250  $\mu$ l de tampon acétate 20 mM pH 5,4 ou 4,0.

L'incubation du milieu réactionnel est faite dans chaque cas à 37°C pendant 10 min. La réaction est arrêtée par chauffage du milieu réactionnel à 100°C pendant 5 min. Le glucose libéré est dosé par la glucose oxydase-peroxydase (Kunst *et al.*, 1984). L'activité peroxydasique est mesurée à 436 nm contre un témoin contenant tous les réactifs excepté le glucose.

La quantité de glucose est déterminée à l'aide d'une courbe étalon réalisée dans les conditions standards des tests enzymatiques.

#### 2-4-Dosage des activités polysaccharidasiques

Les sucres réducteurs libérés au cours de l'hydrolyse enzymatique des polysaccharides ont été dosés selon la méthode de **Bernfeld (1955)** utilisant le DNS.

#### 2-4-1-Préparation du DNS

Deux (2) g de DNS (Acide 3,5 dinitrosalicylique) et 3,2 g de soude sont dissous dans 70 ml d'eau distillée. Ensuite, 60 g de tartrate double de sodium-potassium sont progressivement ajoutés à ce mélange sous chauffage et agitation. Le volume final est complété à 100 ml avec de l'eau distillée.

#### 2-4-2-Technique de dosage

Les activités polysaccharidasiques de l'extrait brut enzymatique sont mesurées après 20 min d'incubation à 37°C dans un essai standard composé de 1 % (p/v) de polysaccharide et 50  $\mu$ l de solution enzymatique dans un volume final de 1 ml de tampon acétate 100 mM pH 5,4.

Les sucres réducteurs libérés, sont dosés par la méthode de **Bernfeld (1955)** utilisant le DNS après chauffage du milieu réactionnel à 100°C pendant 5 min. L'intensité de la coloration est mesurée à 540 nm contre un témoin contenant tous les réactifs excepté la solution enzymatique. La quantité de sucres réducteurs est déterminée à l'aide d'une courbe étalon réalisée dans les conditions standard des tests enzymatiques.

#### 2-5-Dosage des activités isomérasiques

L'activité isomérasique est recherchée à 37°C à chaque 20 min pendant 48 heures. Le mélange réactionnel (1 ml) est constitué de 950 µl de monosaccharide 100 mM (glucose, fructose, galactose) préparés dans le tampon acétate 100 mM pH 5,6 et 50 µl de préparation enzymatique. L'arrêt de la réaction est faite comme précédemment. La recherche de sucres isomérisés est réalisée par chromatographie liquide à haute performance. Après filtration à travers une membrane hydrophilique DURAPORE (millipore 0,45 µm), 20 µl du mélange réactionnel sont analysés quantitativement et qualitativement par la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) à température ambiante.

Les séparations chromatographiques des sucres sont analysées par détection réfractométrique avec comme solvant le mélange acétonitrile/eau (75/25 ; v/v ) et une vitesse du flux maintenue à 0,75 ml/min. La colonne utilisée est le SUPELCOSYL LC-NH<sub>2</sub> (5  $\mu$ m/0,46 x 25 cm ; 120 Å).

#### 3-Unité enzymatique

Une unité enzymatique (UE) est définie comme étant la quantité d'enzyme catalysant l'hydrolyse d'une micromole de substrat par minute dans les conditions standards décrites cidessus. L'activité spécifique est exprimée en unité enzymatique par mg de protéine (UE/mg).

#### 4-Dosage des protéines

Les teneurs en protéine sont déterminées par deux méthodes :

- la méthode de **Smith** *et al.* (1985) utilisant l'acide bicinchoninique (BCA). Elle est utilisée pour déterminer les teneurs en protéine pendant la purification des glycosidases.

- et celle de Lowry et al. (1951) utilisant le réactif de Folin-Ciocalteus. Elle est utilisée pour doser les teneurs en protéine des extraits bruts enzymatiques.

Dans les deux méthodes utilisées, les teneurs en protéine sont estimées par référence à une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions et obtenues avec la sérum albumine bovine (SAB).

#### 4-1-Méthode de Smith et al. (1985)

L'acide bicinchoninique (BCA) permet le dosage des liaisons peptidiques par la formation d'un complexe coloré avec un sel de cuivre. L'échantillon de protéine à doser est mélangé à une solution alcaline de BCA et de sulfate de cuivre de couleur verte. La réaction des ions  $Cu^{2+}$  (ions cuivriques) avec les liaisons peptidiques en milieu alcalin entraîne une oxydation des ions  $Cu^{2+}$  en ion  $Cu^+$  (ions cuivreux). Deux molécules d'acide bicinchoninique réagissent alors spécifiquement avec l'ion cuivreux pour former un complexe de couleur pourpre. Cette réaction repose sur le même principe que celle de Biuret. L'intensité de la coloration obtenue après incubation à 37°C est directement proportionnelle à la concentration en protéine dans l'échantillon. La mesure de la densité optique s'effectue à 562 nm au spectrophotomètre (**Smith et al.,1985**). La grande sensibilité de cette méthode permet d'évaluer de 10 à 50 µg de protéine (**Pelmont, 1995**).

Dix (10) à deux cents (200)  $\mu$ l de solution enzymatique sont dilués dans 2 ml d'un mélange d'une solution contenant du sulfate de cuivre 4 % (p/v) et de la BCA (1/50). Le mélange est agité et incubé au bain-marie à 37°C pendant 30 min. La densité optique de l'essai est mesurée au spectrophotomètre (UV-visible Hitachi U-2000) à 562 nm contre un témoin contenant tous les réactifs excepté la solution enzymatique.

#### 4-2-Méthode de Lowry et al. (1951)

Les protéines réagissent avec le réactif de Folin-Ciocalteus (un mélange de tungstate et de molybdate de sodium en solution dans l'acide phosphorique et l'acide chlorhydrique) pour donner des complexes colorés. La couleur ainsi formée est due à la réaction du cuivre alcalin avec la protéine comme dans le dosage du Biuret et la réduction du phosphomolybdate par la tyrosine et le tryptophane. L'intensité de la coloration dépend donc de la quantité d'acides aminés aromatiques présents et varie selon les protéines. Les densités optiques sont mesurées à 660 nm contre un témoin contenant tous les réactifs exceptés les protéines. Cette méthode permet de doser des concentrations de protéine qui varient de 5 à 100 µg.ml<sup>-1</sup> (Pelmont, 1995).

Dix (10)  $\mu$ l d'extrait brut enzymatique sont dilués dans 2 ml d'un mélange contenant du sulfate de cuivre 0,5 % (p/v), du tartrate double de sodium et potassium 1 % (p/v) et du carbonate de sodium 2 % (p/v) (1/1/100). Le mélange est agité et incubé à la température ambiante pendant 10 minutes à l'obscurité. Ensuite, 200  $\mu$ l de réactif de Folin-Ciocalteus (dilué de moitié dans la soude 0,1N) y sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité et laissé reposer pendant 30 minutes à l'obscurité pour permettre le développement de la coloration. La densité optique de l'essai est mesurée au spectrophotomètre (UV-visible Hitachi U-2000) à 660 nm contre un témoin contenant tous les réactifs excepté l'extrait brut enzymatique.

#### 5-Influence du pH sur les activités glycosidasiques

#### 5-1-Détermination du pH optimum d'hydrolyse

L'influence du pH sur les activités des glycosidases est déterminée en mesurant l'hydrolyse du *p*-nitrophényl-D-glycopyranoside dans une série de tampons à différents pH allant de pH 3,6 à 8,0. Les tampons utilisés sont le tampon acétate 100 mM (pH allant de 3,6 à 5,6), le tampon phosphate 100 mM (pH allant de 5,7 à 8,0) et le tampon citrate phosphate (pH allant de 3,0 à 7,0). La mesure d'activité enzymatique a été faite dans les conditions standards.

#### 5-2-Influence de la force ionique

L'effet de la force ionique sur les activités des glycosidases est mesuré dans les conditions standards. Les expériences sont menées dans les mêmes tampons que ceux utilisés dans la détermination de l'influence du pH sur les activités des glycosidases. Les forces ioniques testées sont : tampon 20 mM, 100 mM et 100 mM contenant du NaCl 300 mM.

#### 6-Influence de la température sur les activités glycosidasiques

L'activité catalytique des enzymes dépend de l'intégrité de leur structure en tant que protéine. Une exposition à des températures inappropriées provoque une dénaturation qui entraîne une perte de leur activité catalytique. Il est nécessaire de connaître donc la température optimale à laquelle chaque enzyme présente un maximum d'activité.

# 6-1-Détermination de la température optimale, du Q10 et de l'énergie d'activation

La température optimale d'hydrolyse des glycosidases est déterminée en mesurant l'hydrolyse du *p*-nitrophényl-D-glucopyranoside dans le tampon acétate 100 mM (20 mM) pH 5,4 pour les glycosidases des extraits bruts (des  $\alpha$ -glucosidases A et B) et pH 4,0 pour les  $\beta$ -xylosidases de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* et de son champignon symbiotique. Le milieu réactionnel est incubé pendant 10 min à une température appropriée comprise entre 30 et 100°C. La réaction est arrêtée en ajoutant 2 ml de carbonate de sodium 1 M. L' absorbance est ensuite mesurée à 420 nm et la quantité de *p*-nitrophénolate libéré est déterminée à l'aide d'une courbe d'étalonnage effectuée dans les mêmes conditions expérimentales.

Le Q10 est déterminé entre 30 et 40 °C pour les exo-glycosidases mésophiles et 60 et 70°C pour les glycosidases thermophiles purifiées. Le graphe d'Arrhénius, qui permet de déterminer l'énergie d'activation a été obtenu dans l'intervalle de 20 à 40°C pour les exo-glycosidases mésophiles et de 60 à 70 °C pour les glycosidases thermophiles purifiées.

#### 6-2-Dénaturation et l'inactivation thermiques

Pour l'étude de la dénaturation thermique, des aliquotes de 50  $\mu$ l de glycosidases ( $\alpha$ glucosidases A et B et  $\beta$ -xylosidase de l'ouvrier du termite et de la mycotête) sont pré-incubées
pendant 10 min à différentes températures (20 à 80°C). L'activité résiduelle avec le *p*NP- $\alpha$ glucopyranoside ou avec le *p*NP- $\beta$ -xylopyranoside est déterminée dans les conditions standards.

Pour l'étude de l'inactivation thermique, des aliquotes de 50  $\mu$ l de glycosidases ( $\alpha$ glucosidases A et B et  $\beta$ -xylosidase de l'ouvrier du termite et de la mycotête) sont pré-incubées à
différentes températures pendant différents temps. L'activité résiduelle avec le *p*NP- $\alpha$ glucopyranoside ou le *p*NP- $\beta$ -xylopyranoside est déterminée dans les conditions standards.

#### 7-Influence de quelques effecteurs

L'activité d'une enzyme peut être modifiée par la présence de composés autres que le substrat; on les appelle effecteurs. Ils jouent un rôle important dans les phénomènes de

régulation et sont également forts utiles dans l'étude des mécanismes d'action des enzymes. On peut les classer en 2 catégories:

- les activateurs, qui augmentent la vitesse de la réaction enzymatique ;

- et les inhibiteurs qui la réduisent.

L'influence de quelques uns de ces effecteurs sur les activités des glycosidases a été déterminée. Ils sont pré-incubés avec les enzymes pendant 20 min à 37°C. Les mesures d'activité sont faites dans les conditions standards.

#### 8-Réactions de transglycosylation

Les réactions de transglycosylation ont été réalisées à 37°C dans 2 ml de mélange réactionnel composé de tampon, une quantité appropriée de solution enzymatique (15 UE pour les extraits bruts enzymatiques ou 80 UE pour les glycosidases purifiées), des concentrations diverses (25 à 800 mM) de donneur de glycosyle (lactose, cellobiose, maltose et saccharose) et d'accepteur de glycosyle (phényléthanol). Le suivi de la réaction est réalisé entre 1 et 130 heures par prélèvement d'aliquotes (150 µl) qui sont ensuite chauffées à 100°C pendant 5 minutes pour arrêter la réaction. Après filtration à travers une membrane hydrophile DURAPORE (millipore 0,45 µm), 20 µl du mélange réactionnel sont analysés quantitativement et qualitativement par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) à température ambiante.

Les séparations chromatographiques des sucres sont analysées par détection réfractométrique avec comme solvant le mélange acétonitrile/eau (75/25 ; v/v ) et une vitesse du flux maintenue à 0,75 ml/min. La colonne utilisée est le SUPELCOSYL LC-NH<sub>2</sub> (5  $\mu$ m/0,46 x 25 cm ; 120 Å). Quant au produit de synthèse, le phényléthylglycoside, son suivi est réalisé par absorption en ultra-violet (UV) à 257 nm avec comme phase mobile, le mélange méthanol/eau (35/65 ; v/v) et un débit de 0,45 ml/min. La colonne utilisée est le HYPERSIL C<sub>1</sub> (5  $\mu$ m / 0,46 x 25 cm ; 120 Å).

#### 9-Identification de la structure du produit de synthèse

Lorsque le saccharose est utilisé comme donneur de glycosyle dans une réaction de transglycosylation catalysée par un extrait brut enzymatique contenant une activité saccharidasique et où le 2-phényléthanol est retenu comme accepteur de glycosyle, il se pose un problème d'identification du produit de synthèse qui peut être le phényléthylfructoside ou le phényléthylglucoside. Pour lever cette équivoque, dans notre étude, plusieurs aliquotes de 5 µl du milieu réactionnel ont été déposées sur une plaque de gel de silice. La migration a été faite dans

un mélange de solvant constitué d'acétate d'éthyle, propanol-1, propanol-2 et d'eau (8/5/1/1). Le phényléthanol et les éventuels produits de synthèse ont été révélés sur le gel de silice grâce à une lampe UV. Les tâches identifiées comme étant les produits de synthèse ont été grattées à l'aide d'une spatule. Le gel de silice obtenu a été délayé dans un tube à centrifuger et broyé avec une tige en verre. La poudre obtenue a été dissoute dans le tampon acétate 100 mM pH 5,4 et centrifugée à 13000 tours/min pendant 30 min. Le surnageant obtenu a été recueilli dans un tube à essai où 45 UE de solution  $\alpha$ -glucosidasique spécifique du résidu glucosyle et de la liaison osidasique  $\alpha$  ont été ajoutées. Le milieu réactionnel a été incubée pendant 12 h. La réaction a été arrêtée par chauffage à 100°C pendant 5 min. Le glucose libéré a été dosé selon la technique de Kunst *et al.* (1984) utilisant le réactif de glucose oxydase peroxydase.

#### **10-Purification des glycosidases**

Dans ce travail, deux types de glycosidases ont été purifiées. Il s'agit d'une part, des  $\alpha$ glucosidases et  $\beta$ -glycosidase de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* et d'autre part, de
la  $\beta$ -xylosidase du champignon symbiotique *Termitomyces sp.* dudit termite. Dans chacun des
cas, la purification a été faite en trois étapes comportant une chromatographie échangeuse
d'anions, un fractionnement sur gel d'exclusion moléculaire et une chromatographie
d'interaction hydrophobe.

#### 10-1-Chromatographie d'échange d'ions sur gel de DEAE-Sepharose CL-6B

Quinze (15) ml d'extrait brut enzymatique sont déposés sur une colonne de gel de diéthylaminoéthyl (DEAE) Sepharose CL-6B (2,4 x 6,5 cm) préalablement équilibrée avec du tampon acétate 20 mM pH 5,4. Le gel est lavé avec 60 ml du même tampon. Les protéines retenues sur la colonne, sont éluées grâce à l'application d'un gradient, linéaire ou par palier, de NaCl contenu dans du tampon acétate 20 mM pH 5,4. La vitesse d'élection est de 21 ml par heure et le volume de chaque fraction est de 1 ml. Les fractions actives sont rassemblées et les protéines sont précipitées au sulfate d'ammonium à 80 % de saturation. Le précipité est centrifugé pendant 15 min à 13000 tours/min dans les mêmes conditions que précédemment.

### 10-2-Chromatographie d'exclusion moléculaire sur gel de Sephacryl S-200 HR

La chromatographie d'exclusion moléculaire permet de séparer les molécules en fonction de leur volume hydrodynamique. Le gel Sephacryl S-200 (PHARMACIA Biotech) est un gel composite formé d'allyles de dextrane liés avec le N, N'-méthylène bis-acrylamide. Il permet de fractionner les protéines globulaires ayant une masse moléculaire comprise entre 10000 et 250000.

Le culot de la précipitation au sulfate d'ammonium des fractions actives de la première étape de purification est repris dans 1 ml de tampon acétate 20 mM pH 5,4 et déposé sur une colonne de Sephacryl S-200 HR (1,6 x 63 cm) préalablement équilibrée avec le même tampon. Les protéines sont éluées avec le tampon acétate 20 mM pH 5,4. Des fractions de 1 ml sont collectées. La vitesse d'élution est de 16,8 ml par heure.

#### 10-3-Chromatographie d'interaction hydrophobe sur gel de Phényl Sepharose CL 6B

La solution enzymatique issue de la chromatographie d'exclusion moléculaire est saturée en sel (1,7 M) par ajout de sulfate d'ammonium solide. Elle est déposée sur une colonne Phényl-Sepharose CL 6B (1,4 x 4,5 cm) préalablement équilibrée avec du tampon acétate 20 mM pH 5,4 contenant du sulfate d'ammonium 1,7 M. Après avoir lavé 3 fois la colonne avec ce même tampon, les protéines retenues sont éluées avec un gradient linéaire décroissant de sulfate d'ammonium de 1,7 à 0 M préparé dans le tampon acétate 20 mM pH 5,4. La vitesse d'élution est de 16,8 ml par heure et le volume de chaque fraction est de 1 ml. Les fractions actives sont rassemblées et dialysées pendant 12 heures contre le tampon acétate 20 mM pH 5,4.

#### 11-Paramètres cinétiques

Les paramètres cinétiques ( $K_M$  et  $V_{max}$ ) sont déterminés à l'aide de la représentation de **Lineweaver et Burk (1934)** en utilisant différentes concentrations de *p*-nitrophényl glycopyranoside (0,25 -10 mM), de maltose (0,25-10 mM) ou de saccharose (2-100 mM). Chaque point expérimental est réalisé en triple et dans tous les cas, la vitesse initiale est utilisée pour les graphiques. La mesure de l'activité enzymatique est réalisée dans les conditions standards.

#### 12-Etudes de compétitions mutuelles entre deux substrats

Le schéma réactionnel simplifié en présence d'un mélange de deux substrats S<sub>1</sub> et S<sub>2</sub> peut s'écrire de la manière suivante:

$$E + S_1 \leftrightarrow ES_1 \rightarrow E + P_1$$
$$E + S_2 \leftrightarrow ES_2 \rightarrow E + P_2$$

Dans le cas où les deux substrats sont hydrolysés par deux enzymes distinctes ou par deux sites de la même enzyme, la vitesse totale  $(V_t)$  de la réaction en présence d'un mélange des deux substrats doit être la somme des vitesses des réactions effectuées en présence de chacun des substrats. Dans le cas où l'on observe une compétition,  $S_1$  agit comme un inhibiteur compétitif de  $S_2$  et réciproquement. La vitesse totale de la réaction  $(V_t)$  est alors donnée par l'équation établie par **Dixon et Webb (1979)**:

$$V_{t} = \frac{V_{1}(1 + [S_{1}] \setminus K_{M1}) + V_{2}(1 + [S_{2}] \setminus K_{M2})}{1 + [S_{1}] \setminus K_{M1} + [S_{2}] \setminus K_{M2}}$$

 $[S_1]$  et  $[S_2]$  représentent les concentrations respectives des substrats  $S_1$  et  $S_2$ .  $K_{M1}$  et  $K_{M2}$ sont les constantes de Michaelis et Menten correspondantes.  $V_1$  est la vitesse mesurée en présence de  $S_1$  seul à la concentration  $[S_1]$  et  $V_2$ , celle mesurée en présence de  $S_2$  seul à la concentration  $[S_2]$ .

Les expériences de compétitions mutuelles faisant intervenir dans chaque cas, un mélange de deux substrats ont été effectuées à 37°C dans du tampon phosphate 100 mM pH 8,0 pour les protéases ou dans du tampon acétate 200 mM pH 5,4 pour les glycosidases.

#### 13-Détermination des poids moléculaires des glycosidases

#### 13-1-Détermination par SDS-PAGE

Les poids moléculaires des glycosidases ont été déterminés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE )en présence de SDS (sodium dodecyle sulfate). L'échantillon enzymatique purifié est mélangé avec du tampon Tris-HCl pH 6,8 contenant 4 % (p/.v) de SDS, 1 % (v/v) de  $\beta$ -mercaptoéthanol, 20 % (p/v) de glycérol et 0,025 % (p/v) de bleu de bromophénol. Ce mélange est chauffé au bain-marie bouillant (100°C) pendant 5 min.

L'électrophorèse est réalisée selon la méthode décrite par Laemmli (1970) sur un gel (7 x 8 cm) contenant 12 % d'acrylamide (p/v). L'appareil utilisé est de type Bio-Rad protean slab cell. Les protéines ont été colorées avec le bleu de Coomassie R-250. Les protéines de référence utilisées sont la phosphorylase  $\beta$  (97000), le sérum albumine bovine (66200), l'ovalbumine (45000), l'anhydrase carbonique (31000), l'inhibiteur trypsique de soja (21500) et le lysozyme (14400).

#### 13-2-Détermination par filtration sur gel

La détermination des poids moléculaires des  $\beta$ -glycosidases natives s'est faite sur gel filtration. Nous avons utilisé des protéines de référence de poids moléculaires connus : catalase (240000), sérum albumine bovine (68000), ovalbumine (45000), chymotrypsinogène (25000). Les différentes protéines de référence et les glycosidases sont chargées séparément sur une colonne TSK (1 x 30 cm) de chromatographie liquide à haute performance. Le temps d'élution de chaque protéine est marqué sur le chromatogramme. Connaissant les poids moléculaires des différentes protéines de référence et leur temps d'élution, nous avons pu tracer la courbe des poids moléculaires en fonction des temps d'élution. Les temps d'élution des glycosidases étant connus, nous avons pu déterminer leur poids moléculaire.

Chapitre 3

# **RESUTATS ET DISCUSSION**

# RECHERCHE DE PROTEASES ET DE GLYCOSIDASES A ACTIVITES ORIGINALES CHEZ LE TERMITE MACROTERMES SUBHYALINUS ET SON CHAMPIGNON SYMBIOTIQUE TERMITOMYCES SP.

A-Recherche de protéases à activités originales chez les castes neutres du termite *Macrotermes subhyalinus* et de son champignon symbiotique *Termitomyces sp.* 

#### Introduction

Les insectes supérieurs appartenant à la sous-famille des Macrotermitinae sont des termites champignonnistes. Ils cultivent dans leur nid un champignon de la classe des Basidiomycètes et du genre Termitomyces. Ce micro-organisme se développe sur la meule qui est composée de fragments de bois, feuilles et de chaumes de graminée malaxés par les pièces buccales et imbibés de salive d'ouvriers (Grasse, 1982, 1984). Ce champignon symbiotique donne sur la meule des mycotêtes constituées de filaments de conidiophore (Grasse, 1970). Dans la termitière, les castes neutres sont l'ouvrier, le petit soldat et le grand soldat. Ils se nourrissent de bois et autres matières végétales. C'est ainsi que le termite Macrotermes subhyalinus dans un écosystème semi-aride (Kajiado, Kenya) consomme à lui seul 20 à 30% de la totalité de l'herbe disponible. En période de disette, il peut subsister quelque temps grâce à sa réserve (Lepage, 1981). Ces matières végétales, hydrolysées par les enzymes digestives de ces insectes, sont constituées essentiellement de cellulose, d'hémicellulose et de lignine. On y trouve une faible quantité de substances azotées. Le bois par exemple, en contient seulement 0,03-0,1 % de matière sèche (Cowling et Merril, 1966). C'est pour ces raisons que la plupart des travaux effectués pour la détermination du rôle de la meule dans la termitière, la compréhension du métabolisme digestif et des relations symbiotiques qui existent entre le termite et son champignon sont axés sur les glycosidases
(Abo-khatwa, 1978; Martin et Martin, 1978, 1979; Matoub, 1993; Rouland, 1986; Rouland *et al.*, 1987, 1988, 1991). Les castes neutres de termite, leur champignon symbiotique et leur meule ne possèdent-ils pas d'activités protéasiques? Si oui, quelles sont ces activités? Les activités chez les ouvriers sont-elles plus actives que celles trouvées chez les soldats comme cela a été relevé chez les glycosidases par Rouland, (1986), Matoub (1993) et Kouamé (1994)?

C'est pour répondre à toutes ces questions que nous nous sommes proposés de rechercher dans un premier temps quelques activités protéasiques susceptibles d'être présentes chez les castes neutres du termite *Macrotermes subhyalinus*, leur champignon symbiotique et leur meule. Dans un second temps, nous allons les comparer entre elles si elles existent effectivement et définir les différents sites d'hydrolyse des substrats des enzymes des extraits bruts à travers des études de compétitions mutuelles entre les substrats les mieux hydrolysés.

#### **I-Résultats**

#### 1-Substrats acyl-pNA non hydrolysés par les extraits bruts enzymatiques

Lorsque le tampon acétate 100 mM pH 5,0 est utilisé pour la préparation du milieu réactionnel, aucune activité hydrolysant les substrats acyl-*p*NA n'est observée. Avec le tampon phosphate 100 mM pH 8,0, seuls les substrats Ile-*p*NA, Nac-Leu-*p*NA, His-*p*NA, (Cys-*p*NA)<sub>2</sub>, Val-*p*NA, BZ-Tyr-*p*NA et Glu-*p*NA sur l'ensemble des substrats chromogéniques testés ne sont pas hydrolysés par les extraits bruts enzymatiques des castes neutres, du champignon et de la meule. Toutes les activités enzymatiques hydrolysant les substrats acyl-*p*NA ont été obtenues en milieu alcalin.

## 2-Substrats acyl-pNA basiques (BA-pNA, Arg-pNA et Lys-pNA) hydrolysés par les extraits bruts enzymatiques

Les substrats chromogéniques acyl-pNA tels que le BA-pNA, l'Arg-pNA et la LyspNA sont utilisés généralement pour le dosage de l'activité trypsique. Les castes neutres du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur), leur champignon symbiotique *Termitomyces sp.* représenté par leur mycotête et leur meule, hydrolysent ces différents substrats (figure 10).





Les dosages des activités protéasiques ont été faits en milieu alcalin comme décrits dans la partie « Matériel et Méthodes ».

Seul l'ouvrier possède une bonne activité trypsique. Le champignon symbiotique *Termitomyces sp.*, la meule et les autres castes neutres possèdent une faible activité trypsique par rapport à celle de l'ouvrier. Le champignon symbiotique a des activités hydrolysant les substrats Arg-pNA et Lys-pNA inférieures à celles du petit soldat, ce qui n'est pas le cas pour le substrat BA-pNA (figure 10).

## 3-Substrats acyl-pNA aliphatiques (Leu-pNA, Ala-pNA et Gly-pNA) hydrolysés par les extraits bruts enzymatiques

Parmi ces trois substrats chromogéniques, c'est le substrat Leu-pNA qui est le plus hydrolysé par les castes neutres du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) (figure 11).



Figure 11 : Etude comparative des activités hydrolysant les substrats Leu-pNA, Ala-pNA et Glys-pNA du champignon, des castes neutres du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) et de la meule.

Les dosages des activités protéasiques ont été faits en milieu alcalin comme décrits dans la partie « Matériels et Méthodes ».

Par ailleurs, ce substrat Leu-*p*NA est le plus hydrolysé par nos sources enzymatiques parmi tous les substrats synthétiques chromogéniques testés. Le champignon symbiotique a une activité hydrolytique Leu-*p*NA inférieure à celle du petit soldat. L'ouvrier a les activités hydrolytiques Leu-*p*NA et Ala-*p*NA les plus élevées, ce qui n'est pas le cas pour l'activité hydrolytique Gly-*p*NA où celle du champignon est la plus élevée tandis que les castes neutres n'en possèdent pas (figure 11).

## 4-Substrats acyl-aromatique Phe-*p*NA et acyl-hétérocyclique Pro-*p*NA hydrolysés par les extraits bruts enzymatiques

Nous avons constaté que le substrat Phe-pNA est difficilement hydrolysé par les castes neutres du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur). Chez le champignon symbiotique, cette activité est faible.



Figure 12 : Etude comparative des activités hydrolysant les substrats Pro-pNA et Phe-pNA du champignon, des castes neutres du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) et de la meule.

Les dosages d'activités protéasiques ont été faits en milieu alcalin comme décrits dans la partie « Matériels et Méthodes ».

Nous notons cependant que l'activité hydrolysant le substrat Pro-*p*NA est plus élevée que celle de la Phe-*p*NA dans toutes les sources enzymatiques testées. Le champignon symbiotique a l'activité hydrolytique Pro-*p*NA la plus élevée. Chez les castes neutres, nous avons noté que les activités chez l'ouvrier sont plus actives que chez le petit soldat qui, à leur tour, sont plus actives que le grand soldat (figure 12).

## 5-Autres acyl-pNA hydrolysés par les extraits bruts enzymatiques (Asp-pNA et Met-pNA)

Les soldats du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) n'hydrolysent pas le substrat Asp-*p*NA. Nous avons noté chez l'ouvrier, le champignon et son support de croissance, la meule, une très faible activité hydrolytique Asp-*p*NA (figure 13). Par contre, avec le substrat Met-*p*NA, nous avons obtenu une bonne activité chez les castes neutres et le champignon. Cependant, les activités hydrolytiques Met-*p*NA de l'ouvrier et du petit soldat sont supérieures à celle du champignon symbiotique (figure 13).



Figure 13 : Etude comparative des activités hydrolysant les substrats Asp-pNA et MetpNA du champignon, des castes neutres du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) et de la meule.

Les dosages des activités protéasiques ont été faits en milieu alcalin comme décrits dans la partie « Matériels et Méthodes ».

6-Compétitions mutuelles entre substrats acyl-pNA fortement hydrolysés par les substrats bruts enzymatiques de l'ouvrier et son champignon

Tableau XI: Compétitions mutuelles entre les substrats acyl-pNA fortement hydrolysés par les extraits bruts enzymatiques de l'ouvrier et le champignon.



Ouvrier

<sup>+</sup> et – signifient respectivement hydrolysé par un site commun et aux moins deux sites distincts d'hydrolyse par l'enzyme dans l'extrait brut enzymatique. Les dosages des activités protéasiques ont été faits en milieu alcalin comme décrits dans la partie « Matériel et Méthodes »

Les substrats acyl-pNA fortement hydrolysés par les extraits bruts enzymatiques de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) et de son champignon symbiotique *Termitomyces sp.* sont la Leu-pNA, l'Ala-pNA, la Met-pNA, la BA-pNA, l'Arg-pNA, la LyspNA et la Phe-pNA. L'étude de compétitions mutuelles entre ces différents substrats au niveau de chaque source enzymatique (champignon et ouvrier), nous a donné les résultats consignés dans le **tableau XI**. Les résultats obtenus avec les deux sources enzymatiques sont identiques. Les substrats Arg-pNA, BA-pNA et Lys-pNA sont hydrolysés par un même site. Il en est de même pour Leu-pNA et Met-pNA. Les autres substrats acyl-pNA sont hydrolysés par des sites distincts.

#### **II- Discussion**

Les extraits bruts enzymatiques des castes neutres du termite Macrotermes subhyalinus (Rambur), leur champignon symbiotique et leur meule ne sont pas capables d'hydrolyser en milieu acide (pH 5,0) les substrats chromogéniques acyl-pNA testés. Par contre, en milieu alcalin (pH 8,0), certains d'entre eux sont clivés par les protéases de ces mêmes sources enzymatiques. Ce comportement nous permet de dire qu'il n'existe pas chez ces matériels biologiques de protéases acides capables d'hydrolyser ces différents substrats à pH 5,0. En tenant compte des proportions de chaque substrat clivé par ces différentes sources enzymatiques, nous constatons que l'ouvrier possède des activités protéasiques plus élevées que celles des soldats. Chez ces derniers, les petits sont plus actifs que les grands. Ces résultats s'apparentent à ceux obtenus chez les espèces de termite de la sous-famille des Macrotermitinae pour les glycosidases (Kouame, 1994; Matoub, 1993; Rouland, 1986). Ces différences d'activités enzymatiques peuvent être dues à la présence de substances toxiques défensives chez les soldats. Ces substances sont des quinones. En se basant sur cette hypothèse, nous pouvons dire que ces composés toxiques exercent une forte inhibition sur l'activité trypsique révélée par les substrats Arg-pNA et BA-pNA et sur l'activité hydrolysant Asp-pNA. En effet, avec l'ouvrier, nous avons une activité trypsique très intense, ce qui n'est pas le cas chez les soldats surtout chez le grand soldat dont le rôle essentiel dans la termitière est de défendre la population (Grassé, 1984). Les activités protéolytiques chez l'ouvrier sont généralement supérieures à celles du champignon lorsque les deux sources enzymatiques possèdent les mêmes activités sauf dans les cas des activités hydrolysant les substrats PhepNA et Asp-pNA. L'étude de compétitions mutuelles entre substrats acyl-pNA, exprimée

par l'activité trypsique (Arg-pNA, la Lys-pNA et le BA-pNA), nous a montré tant chez le champignon que chez l'ouvrier que ces trois substrats seraient hydrolysés par un site commun. Ce résultat fait penser à l'existence d'une seule enzyme responsable de ces activités hydrolytiques dans chaque extrait brut enzymatique.

Les substrats Gly-pNA et Pro-pNA sont hydrolysés par le champignon symbiotique, tandis que l'ouvrier, tout en hydrolysant faiblement le substrat Pro-pNA, n'a aucun effet sur le substrat Gly-pNA. Ces résultats indiquent que les enzymes responsables de ces activités hydrolytiques sont présentes chez le champignon symbiotique mais absentes chez les castes neutres du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur). Le champignon n'est donc pas capable de sécréter dans les tubes digestifs des castes neutres du termite les enzymes responsables de ces activités protéasiques.

Les différentes sources enzymatiques testées hydrolysent fortement le substrat LeupNA. Cependant, elles sont sans effet sur les substrats Ile-pNA et Nac-Leu-pNA qui sont des substrats obtenus à partir du substrat Leu-pNA. En effet, ces substrats sont obtenus à la suite de substitution de groupements chimiques tels que le méthyle et l'acétyle sur la leucine. L'enzyme responsable de l'activité hydrolysant le substrat Leu-pNA ne reconnaît pas la leucine lorsqu'elle est substituée. L'enzyme impliquée dans l'hydrolyse du substrat Leu-pNA est donc probablement une aminopeptidase.

La présence d'activité hydrolytique Met-*p*NA dans les différentes sources enzymatiques testées est très prometteuse. Cette enzyme, si elle est très spécifique du seul résidu méthionyle, va permettre une certaine innovation dans l'hydrolyse des liaisons peptidiques où se trouve engagée la méthionine. En effet, pour hydrolyser ce type de liaison peptidique, on a recours le plus souvent au bromure de cyanogène (CNBr) qui est un produit très toxique et dont la manipulation recommande beaucoup de précautions.

L'étude de compétitions mutuelles entre les substrats Leu-pNA et Met-pNA nous a montré que dans les différents extraits bruts enzymatiques, ces deux activités protéasiques seraient produites par la même enzyme. Cette observation ne ruine pas totalement notre espoir, car une purification suivie d'une caractérisation physico-chimique de cette enzyme pourra nous situer sur les conditions d'utilisation de ces potentialités hydrolytiques.

#### Conclusion

Les extraits bruts des castes neutres du termite Macrotermes subhyalinus (Rambur), leur champignon symbiotique Termitomyces sp. et leur meule sont incapables en milieu acide (pH 5) d'hydrolyser les substrats acyl-pNA testés. Par contre, en milieu alcalin (pH 8), certains d'entre eux sont hydrolysés, montrant ainsi que ces sources enzymatiques possèdent des activités protéasiques. Les activités protéasiques les plus élevées ont été obtenues avec les substrats Leu-pNA et BA-pNA chez l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur). De façon générale, II est donc plus actif que le soldat. Le petit soldat est plus actif que le grand soldat. Les activités protéasiques du champignon sont plus élevées que celles de la meule, son support de croissance. Les études de compétitions mutuelles entre les substrats les mieux hydrolysés par le champignon symbiotique et l'ouvrier ont montré que les activités trypsiques (Arg-pNA, Lys-pNA et BA-pNA) proviendraient d'une même enzyme. Ce comportement enzymatique a été aussi observé avec les substrats Leu-pNA, Met-pNA et Ala-pNA.

## B-Recherche de glycosidases thermophiles et thermostables chez le termite Macrotermes subhyalinus et son champignon symbiotique Termitomyces sp.

#### Introduction

Les termites consomment principalement de la matière végétale. Ils jouent un rôle important dans le recyclage de la matière organique (Bachelier, 1978; Boyer, 1973) et la constitution de l'humus (Mishra et Sen-Sarma, 1980; Garnier-Sillam *et al.*, 1984, 1985); deux paramètres essentiels caractéristiques des sols et de la végétation. Cet impact écologique est dû en grande partie à leurs enzymes digestives capables de dégrader les différents composés complexes de la matière végétale. Parmi ces substances, les plus essentielles sont les glucides, la lignine et les tanins.

La lignine et les tanins sont des composés aromatiques dont la dégradation ne requière généralement pas de glycoside-hydrolases. Les mécanismes enzymatiques responsables de la ligninolyse restent encore mal connus.

Les glucides sont constitués de la cel·lulose, des hémicelluloses, du saccharose, de la pectine et de l'amidon. Les hémicelluloses sont composées en majorité de xylane, de mannane, d'arabane et de galactane. Tous ces glucides sont hydrolysés par des enzymes spécifiques pour donner des sucres simples, indispensables au métabolisme énergétique de la plupart des organismes vivants.

Ces enzymes sont celles de la digestion. Elles sont produites dans les tubes digestifs des termites grâce à une association à bénéfice réciproque entre les termites et leurs organismes microscopiques (protozoaires, bactéries et champignons). Ce phénomène symbiotique permet de penser que certaines enzymes digestives sont synthétisées et sécrétées par le termite lui même (glandes salivaires et mésenteron) et d'autres par des organismes symbiotiques (protozoaires, bactéries et champignons).

Le but de ce travail est dans un:

- premier temps de faire l'inventaire des activités glycosidasiques intervenant dans l'amylolyse, la cellulolyse, la xylanolyse, et dans la dégradation du saccharose;

- second temps de rechercher les conditions optimales d'hydrolyse et de stabilité de ces activités glycosidasiques. Cette partie du travail permettra de déceler (si elles existent) les activités glycosidasiques thermophiles et thermostables du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) et de son champignon symbiotique *Termitomyces sp*.

#### **I-Résultats**

# 1-Activités glycosidasiques des extraits bruts enzymatiques des castes neutres du termite Macrotermes subhyalinus (Rambur) et de leur champignon symbiotique Termitomyces sp.

#### 1-1- Activités a-exo-glycosidasiques

Les activités spécifiques obtenues chez les castes neutres c'est à dire chez l'ouvrier, le petit soldat et le grand soldat du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) se situent entre 11 et 336 UE/mg (tableau XII). L'activité  $pNP-\alpha$ -D-glucopyranosidasique obtenue chez l'ouvrier est la plus élevée de toutes les activités  $\alpha$ -exo-glycosidasiques testées chez les castes neutres du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur). Cependant, le maltose qui est un substrat naturel, n'est pas très bien hydrolysé par les castes neutres du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) contrairement au substrat synthétique  $pNP-\alpha$ glucopyranose qui traduit aussi une activité  $\alpha$ -glucosidasiques plus élevées que celles des autres castres neutres, les activités  $\alpha$ -exo-glycosidasiques du petit soldat étant plus élevées que celles du grand soldat (tableau XII).

Les activités spécifiques obtenues chez la meule se situent entre 7 et 44 UE/mg tandis que chez la mycotête, elles varient entre 12 et 70 UE/mg. La meilleure activité spécifique (70 UE/mg) est obtenue avec l'a-galactosidase des mycotêtes **(tableau XII)**. Tableau XII: Activités a-exo-glycosidasiques des extraits bruts enzymatiques des castes neutres du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) et de leur champignon symbiotique *Termitomyces sp.* 

		Α	ctivité s <sub>l</sub>	pécifique	s (UE/mg)	mg)					
Enzyme	Substrat <sup>a</sup>	Ouvrier	Petit soldat	Grand soldat	Mycotête	Meule					
$\alpha$ Galactosidase	$pNP\alpha Gal (5 mM)$	65	35	11	36	26					
	Melibiose (10 mM)	30	28	23	70	44					
α-Glucosidase	$pNP\alpha Glc (5 mM)$	336	174	165	18	13					
	Maltose (10 mM)	47	31	25	32	41					
	BN $\alpha$ Glc (2,5 mM)	40	38	24	12	7					
α-Mannosidase	$pNP\alpha Man (5 mM)$	23	22	11	20	20					
α-Fucosidase	$pNP\alpha Fuc (5 mM)$	37	18	11	17	16					
a-Arabinosidase	$pNP\alpha Ara (5 mM)$	49	26	15	36	28					
$\alpha$ Galactosidase + $\alpha$ -Glucosidase	Raffinose (10 mM)	28	21	14	70	37					

<sup>a</sup> Pour les abréviations, voir la partie "Matériel et Méthodes"

#### 1-2-Activités β-exo-glycosidasiques

La plupart des activités  $\beta$ -exo-glycosidasiques de l'ouvrier sont plus élevées que celles des soldats. Les activités spécifiques obtenues chez les castes neutres (ouvrier, petit soldat et grand soldat) du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) se situent entre 12 et 640 UE/mg (tableau XIII).

Les activités spécifiques les plus élevées ont été obtenues avec les substrats synthétiques  $pNP-\beta$ -D-glucopyranoside,  $pNP-\beta$ -D-fucopyranoside et le substrat naturel cellobiose. L'hydrolyse de ces trois substrats traduit la présence de deux activités enzymatiques qui sont respectivement les activités  $\beta$ -glucosidasique et  $\beta$ -fucosidasique. L'activité  $\beta$ -fucosidasique est la plus élevée. Les activités  $\beta$ -exo-glycosidasiques du petit soldat sont plus élevées que celles du grand soldat (tableau XIII). Tableau XIII: Activités  $\beta$ -exo-glycosidasiques des extraits bruts des castes neutres du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) et de leur champignon symbiotique *Termitomyces sp.* 

Enzyme	Substrat <sup>a</sup>	Ouvrier	Petit soldat	Grand soldat	Mycotête	Meule
β-Galactosidase	<i>p</i> NPβGal (5 mM)	82	47	23	36	26
<b>,</b>	Lactose (10 mM)	28	20	15	62	43
β -Glucosidase	$pNP\beta Glc (5 mM)$	640	328	302	23	17
,	BNBGlc (2.5 mM)	40	38	24	84	45
	Cellobiose (10 mM)	334	31	19	120	37
	Gentiobiose(10 mM)	19	18	17	75	15
β-Fucosidase	$pNP\betaFuc (5 mM)$	733	360	<b>29</b> 7	31	18
β-Xylosidase	$pNP\betaXyl (5 mM)$	29	25	12	164	23
β-Mannosidase	$pNP\betaMan$ (5 mM)	44	32	18		
β-Fructosidase	Saccharose (10 mM)	53	32	23	89	25
β-N- Acetylgalactosami-	$pNP\betaGalNAc (2,5 mM)$	34	33	27	21	22
β-N- Acetylglucosaminid	$pNP\beta GlcNAc (2,5 mM)$	28	26	23	23	24

Activité spécifiques (UE/mg)

#### <sup>a</sup> Pour les abréviations, voir la partie "Matériel et Méthodes"

Les activités spécifiques de la plupart des  $\beta$ -exo-glycosidases de la mycotête sont plus élevées que celles de la meule, sauf celles de  $\beta$ -N-acétylgalactosamine et  $\beta$ -Nacétylglucosamine où elles sont égales. Chez la mycotête, les activités cellobiasique (120 UE/mg) et *p*NP-xylosidasique (164 UE/mg) sont les plus importantes **(tableau XIII)**.

#### 1-3-Activités endo-glycosidasiques

Les activités endo-glycosidasiques de l'ouvrier sont plus élevées que celles des soldats (petit et grand). L'activité xylanasique est la plus intense de toutes les activités endo-glycosidasiques testées au niveau des castes neutres. Son activité spécifique chez l'ouvrier est de 202 UE/mg (tableau XIV).

Les activités endo-glycosidasiques de la mycotête sont plus élevées que celles de la meule. L'activité xylanasique de la mycotête est la plus élevée. Son activité spécifique est de (474 UE/mg) (tableau XIV).

Tableau XIV: Activités endo-glycosidasiques des extraits bruts enzymatiques des castes neutres du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) et de leur champignon symbiotique *Termitomyces sp.* 

Enzyme			Activité spécifique (UE/mg)							
	Substrat <sup>a</sup>	Ouvrier	Petit soldat	Grand soldat	Mycotête	Meule				
Xylanase	Xylane	202	185	118	474	71				
Cellulase	CMC	45	41	26	63	32				
Amylase	Cellulose	7	5	1	2	0,1				
Pullulanase	Pullulane	5	3	0,5	1	0,1				

<sup>a</sup> Pour les abréviations, voir la partie "Matériel et Méthodes"

2-Détermination des températures et pH optimums des activités glycosidasiques des extraits bruts de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) et de son champignon symbiotique *Termitomyces sp* 

## 2-1-Détermination des températures et pH optimums des activités $\alpha$ -exo-glycosidasiques

Les pH optimums des activités  $\alpha$ -exo-glycosidasiques de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) se situent entre 4,6 et 5,6. Quant aux températures optimales d'hydrolyse, elles sont comprises entre 45 et 50°C. Aucune enzyme responsable de ces activités n'est thermophile (tableau XV).

Les pH optimums des activités  $\alpha$ -exo-glycosidasiques du champignon symbiotique (mycotête) se situent entre 4,6 et 5,6 et les températures optimales se situent quant à elles entre 45 et 50°C. Aucune enzyme responsable de ces activités n'est thermophile (tableau XV).

Tableau XV: Températures et pH optimums d'hydrolyse des activités  $\alpha$ -exoglycosidasiques des extraits bruts enzymatiques de l'ouvrier du termite *Macrotermes* subhyalinus (Rambur) et de son champignon symbiotique *Termitomyces sp* 

			pH op	otimum	Temp Op	vérature timale °C)
Enzyme	Substrat	Concentration (mM)	Ouvrier	Mycotête	Ouvrier	Mycotête
α-Galactosidase	$pNP\alpha Gal$	5	4,6	4,6	45-50	45-50
$\alpha$ -Glucosidase	$pNP\alpha Glc$	5	5,4	4,6	45-50	45-50
$\alpha$ -Mannosidase	$pNP\alpha Man$	5	5,4	5,0-5,6	45-50	50
$\alpha$ -Fucosidase	$pNP\alpha Fuc$	5	5,0-5,6	5,0-5,6	45-50	50
$\alpha$ -Arabinosidase	$\frac{1}{p}$ NP $\alpha$ Ara	5	5,0-5,6	5,0-5,6	50	50

<sup>a</sup> Pour les abréviations, voir la partie "Matériel et Méthodes"

## 2-2-Détermination des températures et pH optimums d'hydrolyse des activités $\beta$ -exo-glycosidasiques

Les pH optimums des activités  $\beta$ -exo-glycosidasiques de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* et de son champignon symbiotique *Termitomyces sp* se situent entre 3,6 et 5,4 et les températures optimales sont comprises entre 45 et 75°C. Chez l'ouvrier, seule l'enzyme responsable de l'activité  $\beta$ -xylosidasique est thermophile (75°C) (tableau XVI). Les enzymes du champignon symbiotique *Termitomyces sp*. responsables des activités  $\beta$ -xylosidasique,  $\beta$ -galactosidasique et  $\beta$ -fucosidasique sont thermophiles (tableau XVI).

Tableau XVI: Températures et pH optimums des activités  $\beta$ -exo-glycosidasiques des extraits bruts enzymatiques de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* et de son champignon symbiotique *Termitomyces sp* 

			рН ој	otimum	Température Optimale (°C)	
Enzyme	Substrat	Concentration (mM)	Ouvrier	Mycotête	Ouvrier	Mycotête
β-Galactosidase	PNPβGal	5,0	5,4	3,6-4,0	60	65
β-Glucosidase	pNPβGlc	5,0	5,4	4,0-4,6	45-50	60
β- Fucosidase	pNPβFuc	5,0	5,4	3,6-4,0	45-50	65
β-Xylosidase	pNPβXyl	5,0	3,6-4,0	3,6-4,0	75	75
β-Fructosidase	Saccharose	10,0	5,4	4,6-5,6	45	50-60
β-N-Acétyl- galactosaminidase	<i>p</i> NPβGalNAc	2,5	4,6-5,0	5,0-5,4	55	55-60
β-N-Acétyl- glucosaminidase	pNPβGlcNAc	2,5	4,6-5,0	5,4	55	60
β-Arabinosidase	pNPβAra	5,0	4,6	3,6-4,6	45-50	55-60

<sup>a</sup> Pour les abréviations, voir la partie "Matériel et Méthodes"

## 2-3-Détermination des températures et pH optimums d'hydrolyse des activités endo-glycosidasiques

Les activités endo-glycosidasiques étudiées chez l'ouvrier du termite *Macrotermes* subhyalinus (Rambur) ont toutes les mêmes valeurs de pH optimum d'hydrolyse (5,4) mais diffèrent par leur température optimale d'hydrolyse (45 à 70°C). Seule l'enzyme responsable de l'activité xylanasique est thermophile (70°C) (tableau XVII). Chez le champignon symbiotique *Termitomyces sp.*, les enzymes responsables des activités xylanasique et cellulasique ont la même valeur de pH optimum d'hydrolyse (5,4) qui diffère de celle des amylase et pullulanase (4,6). Les températures optimales d'hydrolyse se situent entre 45 et 70°C. Seule l'activité xylanasique est thermophile (65-70°C) (tableau XVII).

Tableau XVII: Températures et pH optimums des activités endo-glycosidasiques des extraits bruts enzymatiques de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* et de son champignon symbiotique *Termitomyces sp* 

Enzyme	Substrat	Concentration (%)	Concentration pH op (%)		Temp Op (	érature timale °C)
			Ouvrier	Mycotête	Ouvrier	Mycotête
Xylanase	Xylane	1	5,4	5,4	65-70	65-70
Cellulase	Cellulose	1	5,4	5,4	50-55	50-55
Amylase	Amidon	1	5,4	4,6	45	60
Pullulase	Pullulane	1	5,4	4,6	45	60

**3-Inactivation thermique des activités glycosidasiques thermophiles des extraits bruts de l'ouvrier du termite** *Macrotermes subhyalinus* et de son champignon symbiotique *Termitomyces sp.* 

3-1-Inactivation thermique des activités xylanasiques des extraits bruts de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) et de son champignon symbiotique *Termitomyces sp.* 

Les activités xylanasiques à la fois de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) et de son champignon symbiotique Termitomyces sp. sont stables dans un tampon acétate 20 mM pH 5,4 à des températures de 60 et 65°C pour des temps de préincubation de 60 et 30 min. Au delà de ces temps, une chute brutale de l'activité est observée traduisant une dénaturation de la ou des enzyme (s) responsable (s) de cette activité catalytique (figure 14).



→ Ouvrier 60°C → Ouvruer 65°C → Mycotête 60°C → Mycotête 65°C

## Figure 14: Inactivation thermique de l'activité xylanasique de l'extrait brut enzymatique de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) et de son champignon symbiotique *Termitomyces sp.*

Les expériences ont été menées à 60 et 65°C, le xylane (1%) étant utilisé comme substrat. L'activité enzymatique est dosée dans les conditions standards.

# 3-2-Inactivation thermique des activités $\beta$ -xylosidasiques des extraits bruts de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) et de son champignon symbiotique

L'activité β-xylosidasique de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) est stable dans un tampon acétate 20 mM pH 4,0 pendant environ 120 min à 60°C et 90 min à 65°C. A des températures de 70 et 75°C, l'enzyme n'est plus stable que pendant 60 et 30 min, respectivement (figure 15).

L'activité  $\beta$ -xylosidasique du champignon symbiotique *Termitomyces sp.* du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) est stable dans un tampon acétate 20 mM pH 4,0 pendant environ 210 min à 60°C et 180 min à 65°C. A des températures de 70 et 75°C, l'enzyme n'est plus stable que pendant 20 min et 60 min respectivement (figure 16).



Figure 15: Inactivation thermique de l'activité  $\beta$ -xylosidasique de l'extrait brut enzymatique de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) Les expériences ont été menées à 60, 65, 70 et 75°C, le *p*NPXyl (5 mM) étant utilisé comme

substrat. L'activité enzymatique est dosée dans les conditions standards.



Figure 16: Inactivation thermique de l'activité  $\beta$ -xylosidasique de l'extrait brut enzymatique du champignon symbiotique du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur)

Les expériences ont été menées à 60, 65, 70 et 75°C, le *p*NPXyl (5 mM) étant utilisé comme substrat. L'activité enzymatique est dosée dans les conditions standards.

#### **II-Discussion**

L'incapacité des soldats à se nourrir seuls conduit à un certain nombre d'interrogations. Est-ce un problème comportemental, mécanique ou enzymatique? L'étude de la dégradation des osides par les extraits bruts de broyats totaux des différentes catégories de castes neutres du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) nous a permis de montrer que toutes les activités osidasiques présentes chez les ouvriers se retrouvent chez les soldats mais toujours avec des valeurs plus faibles. Ce comportement enzymatique a été observé chez les termites *Macrotermes mulleri* (Rouland, 1986) et *Macrotermes bellicosus* (Matoub, 1993). Le xylane est le polysaccharide le plus hydrolysé par les extraits bruts enzymatiques de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) et de son champignon symbiotique. Ce qui permet de dire que les castes neutres et le champignon symbiotique du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) sont xylanolytiques, confirmant ainsi les travaux de Matoub (1993) qui a trouvé que le termite champignonniste *Macrotermes bellicosus* (Matoub, 1993). Les enzymes responsables de ces activités hydrolytiques sont thermophiles.

Cette thermophilie a été aussi observée chez des enzymes responsables de l'hydrolyse du *p*-nitrophényl-β-D-xyloside. Ce résultat permet de dire que le complexe xylanasique du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) et celui de son champignon symbiotique sont thermophiles. Cette situation a été déjà notée chez *Macrotermes bellicosus* (Matoub, 1993). L'activité β-xylosidasique du champignon symbiotique est très stable dans le tampon acétate 20 mM pH 4,0, ce qui n'est pas le cas de celle de son hôte. Quant aux activités xylanasiques de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) et de son champignon symbiotique, elles chutent brutalement après 30 min de préincubation à 75°C dans le tampon acétate 20 mM pH 5,4 traduisant ainsi leur instabilité dans le tampon du milieu réactionnel.

L'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) possède dans son tube digestif une forte activité  $\alpha$ -glucosidasique. Tandis que son champignon symbiotique *Termitomyces sp.* à travers sa mycotête possède une très faible activité  $\alpha$ -glucosidasique. Cette situation a été déjà observée chez les termites *Macrotermes mulleri* et *Macrotermes bellicosus* et leur champignon symbiotique respectif (**Rouland**, **1986**; **Matoub**, **1993**). Ce comportement enzymatique fait penser à une situation commune à tous les termites de la sous famille des *Macrotermitinae*. Les *Termitomyces* ne possèdent-ils pas d' $\alpha$ -glucosidase dans leurs cellules? Si la réponse à cette question est négative (ce qui est plausible), elle pourra

68

permettre d'affirmer que l'enzyme responsable de l'activité a-glucosidasique présente chez l'ouvrier du termite Macrotermes subhyalinus (Rambur) est sécrétée soit par les cellules propres de l'Isoptère soit par les bactéries et protozoaires symbiotiques. Lorsque nous analysons les résultats relatifs aux activités amylasiques, nous constatons qu'elles (activités amylasiques) sont faibles tant au niveau des castes neutres qu'au niveau du champignon symbiotique. Chez le champignon symbiotique, l'amidon n'est pratiquement pas hydrolysé. Il est donc difficile d'obtenir le glucose qui est le monosaccharide constitutif de cette molécule glucidique, car l'activité a-glucosidasique est aussi très faible. Quant aux castes neutres, l'hydrolyse de cet homopolysaccharide par amylolyse pose problème. En effet, l'amylase est l'enzyme qui hydrolyse l'amidon en glucose et maltodextrines. Les maltodextrines sont à leur tour hydrolysées en glucose grâce à l'α-glucosidase. Une faible activité amylasique réduirait l'action hydrolytique de l'a-glucosidase. C'est ce comportement enzymatique qui est observé chez les castes neutres du termite Macrotermes subhyalinus (Rambur). Quelle est donc le rôle véritable de cette activité  $\alpha$ -glucosidasique chez le termite Macrotermes subhyalinus (Rambur)? Seule une purification suivie de la caractérisation de la ou des enzyme (s) responsable (s) de cette activité pourra nous permettre de répondre à cette question.

L'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* et son champignon symbiotique possèdent de très bonnes activités  $\beta$ -glucosidasiques. La comparaison de ces activités enzymatiques nous montre que celle de l'ouvrier est à peu près deux fois supérieure à celle du champignon. Ce résultat est en accord avec celui trouvé par Abo-Khatwa (1978) et Rouland (1986). Les enzymes responsables de la dégradation du *p*-nitrophényl- $\beta$ -glucoside chez l'ouvrier et la mycotête ont les mêmes pH et températures optimums. Ce qui laisse penser que ces enzymes sont les mêmes.

Les activités cellulasiques sont aussi fortes tant chez l'ouvrier que chez la mycotête. Cependant, les enzymes responsables de ces activités présentent des températures optimales différentes. Ces deux enzymes sont-elles identiques? Les résultats obtenus dans ce travail ne nous permettent pas de répondre à cette question. Cependant, nous pouvons dire qu'ils confortent l'hypothèse de l'existence du complexe cellulasique dans les extraits bruts enzymatiques de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* et de son champignon symbiotique.

#### Conclusion

Les activités glycosidasiques de l'ouvrier du termite Macrotermes subhyalinus (Rambur) sont plus élevées que celles des soldats (petits et grands). Les activités osidasiques les plus élevées sont celles de l' $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -glucosidase,  $\alpha$ -galactosidase et de la xylanase. Deux activités thermophiles majeures ont été mises en évidence. Il s'agit des activités xylanasique et  $\beta$ -xylosidasique. Chez l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalimus* (Rambur), les activités thermophiles ne sont pas thermostables.

Les activités glycosidasiques du champignon symbiotique *Termitomyces sp.* du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) sont généralement plus élevées que celles de son support de croissance c'est à dire la meule. Les activités  $\beta$ -glucosidasique,  $\beta$ -galactosidasique,  $\alpha$ -galactosidasique et xylanasique sont les plus élevées. Les activités xylanasique et  $\beta$ -xylosidasique sont thermophiles. Seule celle de la  $\beta$ -xylosidase est thermostable.

# C-Réactions de transglycosylation catalysées par les exo-glycosidases de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) et de son champignon symbiotique *Termitomyces sp.*

#### Introduction

La plupart des travaux réalisés à ce jour sur les glycosidases des termites sont axés sur la détermination du rôle de la meule dans les nids, l'étude du métabolisme digestif et la compréhension des relations symbiotiques qui existent entre le termite et son champignon symbiotique (Abo-Khatwa, 1978; Martin et Martin, 1978, 1979; Rouland, 1986; Matoub, 1993; Mora et Rouland, 1994). La recherche de glycosidases à activités spécifiques originales pouvant permettre de développer des stratégies nouvelles de modifications enzymatiques des macromolécules a été ignorée. C'est pour répondre à cette préoccupation que nous nous sommes proposés de rechercher chez l'ouvrier du termite Macrotermes subhyalinus (Rambur) et son champignon symbiotique Termitomyces sp. des exo-glycosidases possédant de bonnes activités de transglycosylation. Pour réaliser cette étude de transglycosylation, le choix des activités exo-glycosidasiques s'est fait en s'appuyant d'une part, sur celles ayant des activités hydrolytiques les plus élevées et d'autre part, sur le coût de leurs substrats naturels respectifs. Chez l'ouvrier du termite Macrotermes subhyalinus (Rambur), les activités  $\alpha$ -glucosidasique,  $\beta$ -glucosidasique et  $\beta$ -galactosidasique ont été retenues. Ces activités hydrolytiques peuvent être révélées grâce à leurs substrats respectifs qui sont le maltose, le saccharose, le cellobiose et le lactose. Quant au champignon symbiotique, les activités  $\beta$ -glucosidasique et  $\beta$ -galactosidasique ont été retenues. Leurs substrats respectifs sont le cellobiose et le lactose. Les substrats des différentes activités exoglycosidasiques sont donc les donneurs de glycosyle. L'accepteur retenu pour cette étude est le phényléthanol.

#### **I-Résultats**

#### 1-Recherche d'activités d'oses isomérasiques

Les extraits bruts enzymatiques de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* et de son champignon symbiotique *Termitomyces sp.* ne contiennent ni activités fructose isomérasique, glucose isomérasique et galactose isomérasique.

#### 2-Réactions de transglycosylation

#### 2-1-Influence du pH sur les réactions de transglycosylation

Les pH optimums des réactions de transglycosylation des extraits bruts de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) et de son champignon symbiotique *Termitomyces sp.* se situent entre 5,0 et 6,5 (figure 17).





Donneurs: Saccharose, Cellobiose, Maltose et Lactose 400 mM. Accepteur: Phényléthanol 100 mM. Tampon acétate 100 mM (pH 3,6, 4,0; 4,6; 5,0; 5,6) tampon phosphate 100 mM (pH 6,0; 6,6; 7,0; 7,6) et tampon glycine-NaOH ( pH 8,0; 8,6; 9,0; 9,6; 10,0; 10,6) Enzyme 15 UE, Température 37°C, Temps d'incubation: 15-20 heures. T et M signifient respectivement termite et mycotête.

## 2-2-Influence du temps d'incubation sur les réactions de transglycosylation

Les taux maximums de transglycosylation sont atteints dans un intervalle de temps compris entre 15 et 20 heures de réactions (figure 18). Au delà de ces temps d'incubation, on observe une chute des taux de transglycosylation.



Figure 18: Influence du temps d'incubation sur les réactions de transglycosylation catalysées par les extraits bruts enzymatiques de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* et de son champignon symbiotique *Termitomyces sp.* Donneurs: Maltose, Saccharose, Cellobiose et Lactose 400 mM. Accepteur: Phényléthanol 100 mM. Tampon acétate 100 mM, pH optimum de transglycosylation. Enzyme 15 UE, Température 37°C, T et M signifient respectivement termite et mycotête.

#### 2-3-Influence de la température sur les réactions de transglycosylation

Les réactions de transglycosylation sont beaucoup plus favorisées aux températures comprises entre 30 et 40°C (figure 19). Entre 60 et 70°C, les taux de transglycosylation sont très faibles.



Figure 19: Influence de la température sur les réactions de transglycosylation catalysées par les extraits bruts enzymatiques de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) et de son champignon symbiotique *Termitomyces sp.* 

Donneurs: Maltose, Saccharose, Cellobiose et Lactose 400 mM. Accepteur: Phényléthanol 100 mM. Tampon acétate 100 mM, pH optimum d'activité de transglycosylation. Enzyme 15 UE. Temps d'incubation (15-20) heures. T et M signifient respectivement termite et mycotête.

## 2-4-Influence de la concentration du donneur sur les réactions de transglycosylation

Les meilleurs pourcentages de transglycosylation sont obtenus avec des concentrations de donneur de glycosyle se situant entre 200 et 500 mM (figure 20). Au delà de 500 mM, les pourcentages de transglycosylation diminuent considérablement.



Figure 20: Influence de la concentration du donneur sur les réactions de transglycosylation catalysées par les extraits bruts enzymatiques de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* et de son champignon symbiotique *Termitomyces sp.* 

Accepteur: Phényléthanol 100 mM. Tampon acétate 100 mM pH optimum de transglycosylation. Enzyme 15 UE. T et M signifient respectivement termite et mycotête.

## 2-5-Influence de la concentration de l'accepteur sur les réactions de transglycosylation

Les meilleurs pourcentages de transglycosylation sont obtenus pour des concentrations d'accepteur variant entre 100 et 150 mM, lorsque la concentration de donneur de glycosyle est de 400 mM (figure 21). Les figures 22 et 24 montrent respectivement les apparitions des produits d'hydrolyse et de transglycosylation.



Figure 21 Influence de la concentration de l'accepteur sur les réactions de transglycosylation catalysées par les extraits bruts enzymatiques de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) et de son champignon symbiotique *Termitomyces sp.* Accepteur: Phényléthanol. Tampon acétate 100 mM pH optimum de transglycosylation. Enzyme 15 UE. Temps d'incubation: 15-20 heures. T et M signifient respectivement termite et mycotête.



Figure 22 : Chromatogramme : mise en évidence du produit d'hydrolyse.

Accepteur: Phényléthanol. Donneur: Maltose Tampon acétate 100 mM pH optimum de transglycosylation. Enzyme 15 UE. Temps d'incubation: 15 heures. (D): étalon interne xylose, (E): glucose, (F): maltose.





#### 3-Conditions optimales des réactions de transglycosylation

La (ou les) enzyme (s) responsable (s) de l'activité  $\alpha$ -glucosidasique de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* présente (nt) les meilleurs pourcentages de transglycosylation. Dans un milieu réactionnel contenant 400 mM de maltose ou de saccharose (préparé dans le tampon acétate 100 mM pH 5,0-6,6), 100 mM de phényléthanol et 15 UE d'activité  $\alpha$ -glucosidasique, incubé à une température comprise entre 35 et 40°C, nous obtenons un pourcentage de transglycosylation avoisinant 65 % lorsque le temps d'incubation se situe entre 10-15 h (tableau XVIII).

Tableau XVIII: Tableau récapitulatif des conditions expérimentales optimales des réactions de transglycosylation catalysées par les activités exo-glycosidasiques de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) et de son champignon symbiotique *Termitomyces sp.* 

Les réactions de transglycosylation ont été incubées à 37°C avec le phényléthanol (100 mM) comme accepteur et une activité enzymatique de 15 UE

Enzyme	Substrat (400 mM)	Temps d'incubation (h)	pH optimum	Température optimale (°C)	Taux de transglyco- sylation
β-galactosidase	lactose	15	6,0	35-40	18
		20*	6,0*	35-40	24*
β-glucosidase	cellobiose	15	5,0	35-40	6,0
		20*	5,0*	35-40	7,0*
$\alpha$ -glucosidase	maltose	10	5,6	35-40	68
-	saccharose	15	6,6	35-40	65

\*Résultats relatifs au champignon symbiotique Termitomyces sp

#### 4-Identification de la structure du produit de synthèse

L' $\alpha$ -glucosidase, spécifique du résidu glucosyle et de l'anomerie  $\alpha$ , hydrolyse le produit de synthèse. Ce résultat permet de penser que le produit de synthèse est le phényléthyl- $\alpha$ -D-glucoside. Ainsi l'enzyme responsable de l'hydrolyse du saccharose serait une  $\alpha$ -glucosidase et non une  $\beta$ -fructosidase.

#### **II-Discussion**

Les extraits bruts de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) et de son champignon symbiotique *Termitomyces sp.* ne contiennentt ni glucose, ni fructose et ni galactose isomérase. Cette absence d'activité isomérasique est intéressante car elle permet d'éviter des erreurs de calcul de concentrations concernant les différents produits libérés et par conséquent de déterminer avec précision les pourcentages de transglycosylation des exo-glycosidases.

L'aptitude de ces exo-glycosidases à catalyser les réactions de transglycosylation a été testée. Les substrats naturels tels que le saccharose, le maltose, le lactose et le cellobiose ont été utilisés comme donneur de glycosyle et le 2-phényléthanol, comme accepteur de glycosyle. L'intérêt du choix de ces substrats naturels comme donneur de glycosyle se situe non seulement au niveau de leur coût relativement bon marché mais aussi au niveau de leur

capacité d'être facilement hydrolysés par leurs enzymes respectives. Quant à l'accepteur de glycosyle, le 2-phényléthanol, il présente également des avantages :

- c'est un composé peu soluble dans l'eau. Cette propriété est caractéristique de la plupart des macromolécules naturelles ;

- le phényléthylglycoside, produit de la transglycosylation est facilement quantifiable par absorbance à 257 nm. Pour cette facilité de détection, le phényléthanol a été utilisé pour les réactions de transglycosylaion (Dion *et al.*,1999 ; Fortun et Colas, 1991 ; Leparoux et Colas, 1994 ; Leparoux *et al.*, 1997).

Les conditions expérimentales ont été optimisées au niveau de certains facteurs capables d'avoir une influence sur le taux de transglycosylation. Dans ce contexte, le temps de réaction est un paramètre important. En effet, les produits formés durant les réactions de transglycosylation peuvent à leur tour être utilisés par l'enzyme comme substrat et être hydrolysés. Le rendement maximum de synthèse de phényléthylglycoside à 37°C dépend du substrat testé.. Pour les glycosides étudiés, un taux maximum de transglycosylation a été obtenu dans un temps relativement court (environ 15 à 20 heures) sans qu'il y'ait eu hydrolyse des produits formés au cours de la réaction de transglycosylation. Une faible teneur en enzyme requiert un temps d'incubation assez long alors que de fortes concentrations provoquent une hydrolyse rapide des produits attendus.

L'effet du pH sur les taux de transglycosylation a été étudié entre pH 3,6 et pH 10,5. Les taux maximums de transglycosylation sont obtenus dans l'intervalle de pH se situant entre 5,0 et 6,6 selon le substrat utilisé. L'efficacité des glycosidases provenant des champignons *Termitomyces sp.* à catalyser les réactions de transglycosylation a également été en grande partie dépendant des concentrations respectives en donneur de glycosyle (le lactose ou le cellobiose) et en accepteur de glycosyle (le 2-phényléthanol). Ainsi, les meilleurs rendements ont été obtenus avec une concentration d'environ 400 mM en donneur de glycosyle et 100 mM en accepteur de glycosyle.

Le saccharose est un disaccharide qui peut être hydrolysé par deux types d'enzymes : une  $\alpha$ -glucosidase et une invertase communément appelée la  $\beta$ -fructosidase. L'hydrolyse de ce composé libère le fructose et le glucose. Lorsque ce clivage est effectué par une  $\alpha$ glucosidase, le produit de synthèse sera le phényléthylglucoside. Dans cette situation, nous aurons une diminution de la concentration du glucose libre et une augmentation de la concentration du fructose dans le milieu réactionnel au cours du temps, lorsqu'on compare l'évolution des concentrations de ces deux produits. Ceci est possible parce que l'extrait brut ne contient pas de glycosides isomérases. Par contre, lorsque cette hydrolyse est effectuée par une  $\beta$ -fructosidase, le produit de synthèse sera le phényléthylfructoside et dans ce cas, nous aurons la situation inverse au niveau des concentrations des produits d'hydrolyse obtenus dans le cas de l' $\alpha$ -glucosidase. La colonne chromatographique que nous avons utilisée en chromatographie liquide à haute performance, n'est pas capable de séparer le phényléthylglucoside du phényléthylfructoside. Les deux produits ont le même temps de rétention. Pour connaître l'enzyme responsable de l'hydrolyse du saccharose, nous avons donc suivi l'évolution des produits libérés au cours des réactions de transglycosylation. Nous avons trouvé que l'enzyme responsable de cet acte catalytique est une  $\alpha$ -glucosidase. Ce résultat a été confirmé par l'hydrolyse de son produit de synthèse, c'est à dire le phényléthyl- $\alpha$ -D-glucoside par une autre  $\alpha$ -glucosidase spécifique du résidu glucosyle et de l'anomie  $\alpha$ . Cette situation suggère que la où les enzymes responsable (s) de l'activité  $\alpha$ -glucosidasique de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalimus* (Rambur) opérait (nt) par un mécanisme de rétention de configuration anomérique.

Cette information est importante, car les meilleurs donneurs de glycosyle sont le saccharose et le maltose. Les rendements obtenus sont presque les mêmes. Nous pouvons de ce fait nous poser la question de savoir si ces deux substrats naturels sont hydrolysés par la même enzyme? Pour éprouver cette hypothèse, il est souhaitable de procéder à la purification des glycosidases de cet extrait brut et de les caractériser afin de pouvoir connaître leur mode d'action.

#### Conclusion

Parmi toutes les activités exo-glycosidasiques retenues (activités  $\alpha$ -glucosidasique,  $\beta$ -glucosidasique et  $\beta$ -galactosidasique) pour catalyser les réactions de transglycosylation, seule l'activité  $\alpha$ -glucosidasique de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* possède une activité importante de transglycosylation. Dans ce cas la synthèse de néoglucoconjugués peut atteindre 68 %, dépassant ainsi les taux obtenus avec la plupart des exo-glycosidases (inférieur à 30 %); ce qui fait de l'enzyme responsable de cette activité, un outil de choix dans les réactions de synthèse de néoglucoconjugués.

### PURIFICATION ET CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DES $\alpha$ -GLUCOSIDASES ET $\beta$ -XYLOSIDASES DE L'OUVRIER DU TERMITE MACROTERMES SUBHYALINUS (RAMBUR) ET DE SON CHAMPIGNON SYMBIOTIQUE TERMITOMYCES SP.

#### Introduction

La recherche de glycosidases, à activités originales à travers les études de détermination des conditions optimales d'hydrolyse et des réactions de transglycosylation, a révélé chez:

-l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur), l'existence d'une activité alpha-glucosidasique possédant une importante activité transglucosidasique et d'une activité beta-xylosidasique thermophile relativement thermostable;

-le champignon symbiotique *Termitomyces sp.*, l'existence d'une activité betaxylosidasique thermophile thermostable.

Dans cette partie du travail, nous nous proposons de purifier et de caractériser les propriétés physico-chimiques et moléculaires des enzymes responsables de ces activités.

## A-Purification et caractérisation physico-chimique des alpha-glucosidases de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur)

#### **I-Résultats**

#### 1-Purification des alpha-glucosidases

#### 1-1-Stratégie de purification

La purification à homogénéité électrophorétique des enzymes est une condition *sine* qua non, à la caractérisation cinétique et moléculaire des enzymes présentes dans les extraits bruts enzymatiques. Elle fait appel à des gels aux propriétés physico-chimiques stables et aisés d'utilisation. Elle doit concilier efficacité et reproductibilité. Pour la purification des alpha-glucosidases de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur), la stratégie suivante a été utilisée:

-Chromatographie échangeuse d'anions sur gel de D.E.A.E.-Sepharose CL 6B; -Chromatographie d'exclusion moléculaire sur gel de Sephacryl S-200 HR; -Chromatographie d'interaction hydrophobe sur gel de Phényl-Sepharose CL 6B.

#### 1-1-1-Chromatographie échangeuse d'anions sur gel de DEAE-Sepharose CL 6B

L'extrait brut enzymatique de l'ouvrier du termite Macrotermes subhyalinus (Rambur), réputée pour sa richesse en activités glycosidasiques est un milieu contenant de nombreux pigments (Kouamé, 1994).



Nombre de fractions

#### Figure 24 : Profil chromatographique échangeuse d'anions sur gel de DEAE-Sepharose CL 6B de l'alpha-glucosidase de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur)

L'activité hydrolytique sur le  $pNP\square$ Glc est mesurée à pH 5,4 dans les conditions standard. Elle est exprimée en UE/ml [•]. Le profil protéique est réalisé à 562 nm [•] Le décrochage des protéines fixées est réalisé avec du chlorure de sodium. Les concentrations utilisées sont exprimées en molarité (M) [•]. La barre horizontale indique les fractions d'intérêt rassemblées pour l'étape suivante.

Nous avons opté, après différents essais, pour une chromatographie échangeuse d'anions sur gel de D.E.A.E.-Sepharose CL 6B comme première étape de purification. Cette chromatographie est intéressante parce qu'elle permet d'éliminer de nombreux pigments présents dans l'extrait brut. L'activité alpha-glucosidasique est éluée sous la forme d'un seul pic, élué pour une concentration en NaCl de 300 mM (figure 24). Avec un facteur de purification de 2,3, le rendement de cette première étape est quantitatif (94,5 %) (tableau XIX).

#### 1-1-2-Chromatographie d'exclusion moléculaire sur gel de Sephacryl S-200 HR

Les fractions actives issues de la première étape sont rassemblées et concentrées par précipitation au sulfate d'ammonium à 80% de saturation. Le culot, obtenu après centrifugation à 13000 tours/min à 4°C, est re-suspendu dans 1 ml de tampon acétate 20 mM pH 5,4 et déposé sur un gel de Sephacryl S-200 HR.

Cette étape permet de séparer deux pics d'activités alpha-glucosidasiques notées alpha -Glc A et B (figure 25). Les enzymes responsables de ces deux activités possèdent respectivement des activités spécifiques de 11157 et 1420 UE/mg de protéine. Les rendements sont respectivement de 41 et 3,7 %. Quant aux facteurs de purification, ils sont respectivement de 23,4 et 3,0 (tableau XIX). A la fin de cette deuxième étape de purification, les pigments sont complètement éliminés.



Figure 25: Profil chromatographique d'exclusion moléculaire sur gel de Sephacryl S-200 HR de l' alpha-glucosidase de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) L'activité hydrolytique sur le *p*NPalphaGlc est mesurée à pH 5,4 dans les conditions standard. Elle est exprimée en UE/ml [ $\bullet$ ]. Le profil protéique est réalisé à 562 nm [ $\circ$ ]. La barre horizontale indique les fractions d'intérêt rassemblées pour l'étape suivante.

#### 1-1-3-Chromatographie d'interaction hydrophobe sur gel de Phényl-Sepharose CL 6B

La chromatographie d'interaction hydrophobe sur gel de Phényl-Sepharose CL-6B de chaque activité alpha-glucosidasique (alpha-Glc A et B) issue de la chromatographie d'exclusion moléculaire précédente a permis d'obtenir un seul pic d'activité alpha-glucosidasique dans chaque cas (figure 26).

L'alpha-Glc A éluée à la concentration de 1 M de sulfate d'ammonium (préparé dans le tampon acétate 20 mM pH 5,4) (figure 26) possède une activité spécifique de 63525 UE/mg de protéine, un facteur de purification de 133,2 et un rendement de 13,3 % (tableau XIX). L'alpha-Glc B, décrochée à une concentration de 0,3 M de sulfate d'ammonium (figure 27) a une activité spécifique de 5120 UE/mg de protéine, un facteur de purification de 10,7et un rendement de 0,53 %. Le rendement global final; si l'on tient compte des deux activités, est de 13,8 % (tableau XIX).



Nombre de fractions

#### Figure 26: Profil chromatographique d'interaction hydrophobe sur gel de Phényl-Sepharose CL-6B de l'alpha-Glc A de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur)

L'activité hydrolytique sur le *p*NPalphaGlc est mesurée à pH 5,4 dans les conditions standard. Elle est exprimée en UE/ml [•]. Le profil protéique est réalisé à 562 nm  $[\circ]$ .

Le décrochage des protéines fixées est réalisé avec du sulfate d'ammonium. Les concentrations utilisées sont exprimées en molarité (M) [•]. La barre horizontale indique les fractions d'intérêt rassemblées.



Nombre de fractions

### Figure 27: Profil chromatographique d'interaction hydrophobe sur gel de Phényl-Sepharose CL 6B de l' alpha-Glc B de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur)

L'activité hydrolytique sur le pNPalphaGlc est mesurée à pH 5,4 dans les conditions standard. Elle est exprimée en UE/ml [•]. Le profil protéique est réalisé à 562 nm [ $\circ$ ] Le décrochage des protéines fixées est réalisé avec du sulfate d'ammonium. Les concentrations utilisées sont exprimées en molarité (M) [•]. La barre horizontale indique les fractions d'intérêt rassemblées.

Etape de la purification	Activité totale (UE)	Protéine (mg)	Activité spécifique (UE/mg)	Facteur de purification	Rendement (%)
Extrait total	19080	40,0	477	1,0	100,0
D.E.A.E.Sepharose CL 6B	18000	14.04	1104	0.2	04.5
Précipitation au sulfate	18022	16,04	1124	2,3	94,5
d'ammonium	17927	12,52	1432	3,0	94,0
Sephacryl S-200 HR					
alpha-Glc A	7810	0,70	11157	23,4	41,0
alpha-Glc B	710	0,50	1420	3,0	3,7
Phényl-Sepharose CL 6B alpha-Glc A					
ml - n	2541	0,04	63525	133,2	13,3
alpha-Glc B	102,40	0,02	5120	10,7	0,53

Tableau XIX: Bilan global de la purification des alpha-Glc A et B de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur)

#### 1-2-Critère de pureté

Une seule bande protéique pour chaque alpha-glucosidase est obtenue après leur électrophorèse en milieu dénaturant (S.D.S.-P.A.G.E) (figures 28 et 29).



## Figure 28 : Analyse en S.D.S.-P.A.G.E. de l'alpha-Glc A de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur)

1 : alpha-Glc A purifiée, après chromatographie sur gel de Phényl Sepharose CL 6B;

2 : marqueurs précolorés de chez Bio-Rad.


### Figure 29 : Analyse en S.D.S.-P.A.G.E. de l'alpha-Glc B de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus*

1 : alpha-Glc B purifiée, après chromatographie sur gel de Phényl-Sepharose CL 6B;

2 : marqueurs précolorés de chez Bio-Rad.

#### 2-Caractérisation physico-chimique des alpha-glucosidases

#### 2-1-Influence du pH sur les activités des alpha-glucosidases

#### 2-1-1-pH optimum d'hydrolyse

L'influence du pH sur l'hydrolyse du *p*-nitrophényl-alpha-D-glucopyranoside par les alpha-Glc A et B de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) a été déterminée à 37°C pour des pH compris entre 3,6 et 8,0 dans différents tampons à une concentration de 20 mM.

Comme le montre la **figure 30**, les alpha-Glc A et B présentent leurs activités catalytiques optimales respectivement aux pH 5,4 et 6,0. L'alpha-Glc A conserve plus de 80 % de son activité hydrolytique dans un domaine de pH allant de 5,0 à 6,0. Quant à l'alpha-Glc B, elle conserve plus de 80 % de son activité hydrolytique dans une gamme de pH allant de 5,4 à 6,6. Aux pH alcalins (7,6 et 8,0), les deux alpha-glucosidases présentent chacune une activité catalytique faible ne dépassant pas 30 % d'activité (**figure 30**).



Figure 30 : Détermination des pH optimums d'hydrolyse des □-Glc A et B de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus*. alpha-Glc A [▲] alpha-Glc B [■]

2-1-2- pH optimum de stabilité



Figure 31: Stabilité vis à vis du pH des alpha-Glc A et B de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) à différentes valeurs de pH dans les tampons acétate et phosphate 20 mM.

alpha-Glc A [▲] alpha-Glc B [■]

La stabilité des alpha-Glc A et B de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) a été étudiée entre pH 3,6 et 8,0 en pré-incubant la préparation enzymatique pendant deux heures à 37°C dans les tampons acétate et phosphate 20 mM puis en mesurant l'activité résiduelle à pH 5,4 pendant 10 min à 37°C, en présence du *p*-nitrophényl-□-D-glucopyranoside 1,25 mM. L'alpha-Glc A est stable aux pH compris entre 5,0 et 6,6 tandis que l'□-Glc B est stable aux pH compris entre 5,4 et 7,0 comme le montre la **figure 31**.

#### 2-1-3-Influence de la force ionique du tampon

La force ionique du tampon n'exerce aucune influence sur la valeur des pH optimums d'hydrolyse des alpha-Glc A et B de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur).

#### 2-2-Influence de la température sur les alpha-glucosidases

#### 2-2-1-Température optimale d'hydrolyse

Les températures optimales d'hydrolyse des alpha-Glc A et B sont déterminées en mesurant leur activité dans le tampon acétate 20 mM pH 5,4 en présence du *p*-nitrophényl-alpha-D-glucopyranoside pendant 10 min à des températures allant de 20 à 80°C.

Les alpha-Glc A et B ont la même température optimale d'hydrolyse. Elle est de 45°C. Les activités maximales sont obtenues dans la zone de température comprise entre 40 et 50°C (figure 32).



Figure 32: Détermination des températures optimales d'hydrolyse des alpha-Glc A et B de l'ouvrier du termite *Macrotermes subyalinus* (Rambur) alpha-Glc A [**A**] alpha-Glc B [**B**]



Les Q<sub>10</sub> des alpha-Glc A et B, déterminés selon Arrhenius (figures 33 et 34) entre 30 et 40°C, sont respectivement de 2,4 et 1,8.



Figure 33: Détermination de l'énergie d'activation de l'alpha-Glc B de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur)



## Figure 34: Détermination de l'énergie d'activation de l'alpha-Glc A de l'ouvrier du termite

Comme le montre **les figures 33 et 34**, les logarithmes des vitesses initiales varie linéairement pour les valeurs de 1/T comprises entre 20 et 40°C. A partir de ces représentations graphiques, l'énergie d'activation ( $E_a$ ) de l'enzyme a pu être calculée. Les valeurs obtenues pour les alpha-GlcA et B sont respectivement de 76,00 et 44,41 kJ/mol avec le substrat *p*nitrophényl-alpha-D-glucopyranoside.

#### 2-2-3-Inactivation thermique

L'étude de l'inactivation des alpha-Glc A et B par la chaleur met en évidence une baisse importante des activités hydrolytiques de ces enzymes à partir de la 30<sup>ème</sup> min de préincubation dans le tampon acétate 20 mM pH 5,4 à 45°C (figure 35). L'alpha-Glc B se désactive beaucoup plus vite que l'alpha-Glc A (figure 35).

A 37°C, les alpha-Glc A et B conservent toute leur activité hydrolytique dans le même tampon pendant plus de 400 min soit plus de 6 h 40 min de temps de pré-incubation (résultats non montrés). Cette situation nous a amené à suivre pendant plusieurs jours dans les mêmes conditions l'évolution de ces deux activités catalytiques. La demi-vie de l'alpha-Glc B à 37°C est de 2 jours tandis que celle de l'alpha-Glc A dans les mêmes conditions est de 6 jours. L'alpha-Glc A est plus stable que l'alpha-Glc B (figure 36).



Figure 35: Inactivation thermique des alpha-Glc A et B à 45°C de l'ouvrier du termite Macrotermes subhyalinus (Rambur) alpha-Glc A [▲] alpha-Glc B [■]



Figure 36: Inactivation thermique des alpha-Glc A et B à 37°C de l'ouvrier du termite Macrotermes subhyalinus (Rambur) alpha-Glc A [▲] alpha-Glc B [■]

#### 2-2-4-Dénaturation thermique

La stabilité thermique des alpha-glucosidases de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) est déterminée en les pré-incubant pendant 10 min à différentes températures de 30 à 100°C en milieu tampon acétate 20 mM pH 5,4 puis en mesurant l'activité résiduelle dans les conditions standards.

La figure 37 montrent que les alpha-Glc A et B sont très stables jusqu'à 40°C où elle conserve 100% de leur activité hydrolytique dans les conditions expérimentales. Au-delà de 45°C, nous avons noté une chute brutale des activités enzymatiques traduisant une importante dénaturation de ces glycosidases. L' alpha-Glc B se dénature plus vite que l' alpha-Glc A. La demi-vie de l'alpha-Glc B est de 10 min à 50°C. Les alpha-Glc A et B sont complètement dénaturées respectivement à 75°C et 65°C.



Figure 37 : Dénaturation thermique des alpha-Glc A et B de l'ouvrier du termite Macrotermes subhyalinus.(Rambur) alpha-Glc A [▲] alpha-Glc B [■]

#### 2-2-5-Conservation au froid

Une conservation prolongée par congélation des alpha-Glc A et B contenues dans le tampon acétate 20 mM pH 5,4 ne modifie pas les activités catalytiques des deux biocatalyseurs et ce, même au bout d'un an.

#### 2-3-Spécificité des alpha-glucosidases

#### 2-3-1-Spécificité de substrat

### a-Activités des alpha-Glc A et B sur les substrats synthétiques

La spécificité de substrats de chacune des alpha-Glc A et B a été testée sur un grand nombre de *p*-nitrophényl- $\alpha$  et  $\beta$ -D-glycosides (tableau XX).

 Tableau XX : Activités des alpha-Glc A et B de l'ouvrier du termite Macrotermes subhyalinus (Rambur) sur les substrats synthétiques

	Activité (%)			
Substrat	alpha-Glc A	alpha-Glc B		
pNP-alpha-Glc (5 mM)	100	100		
PNP- alpha-Xyl (5 mM)	0	0		
PNP- alpha-Gal (5 mM)	0	0		
pNP-alpha-Fuc (5 mM)	0	0		
pNP-alpha-Man (5 mM)	0	0		
pNP-alpha-Ara (5 mM)	0	0		
PNP-beta-Glc (5 mM)	0	0		
PNP-beta-Xyl (5 mM)	0	0		
PNP-beta-Gal (5 mM)	0	0		
PNP-beta-Fuc (5 mM)	0	0		
pNP-beta-Man (5 mM)	0	0		
PNP-beta-Ara (5 mM)	0	0		
pNP-alpha-GlcNAc (5 mM)	0	0		
pNP-beta-GalNAc (5 mM)	0	0		

Seul le substrat *p*-nitrophényl- $\alpha$ -D-glucopyranoside est hydrolysé par les deux alphaglucosidases. Ces enzymes possèdent donc une spécificité stricte vis à vis du résidu glucosyle en position alpha.

#### b-Activités des alpha-Glc A et B de l'ouvrier du termite Macrotermes subhyalinus (Rambur) sur les malto-dextrines

La vitesse d'hydrolyse de l'alpha-Glc A augmente lorsque la chaîne de glucose s'allonge jusqu'à 4 unités glucosyles. Au delà de 4 unités glucosyles, la vitesse de la réaction diminue. Quant à l'alpha-Glc B, plus le nombre d'unités glucosyles augmente, plus la vitesse d'hydrolyse diminue (tableau XXI).

		Activité (%)		
Substrat B	Structure	alpha-Glc A	alpha-Glc	
Maltose	Glc-alpha-(1,4)-Glc	100	100	
Maltotriose	Glc-alpha-(1,4)-Glc-alpha-(1,4)-Glc	162	25	
Maltotetraose	Glc-alpha-(1,4)-Glc-alpha-(1,4)-Glc-alpha-(1,4)-Glc	181	18	
Maltopentaose	Glc-alpha-(1,4)-Glc-alpha-(1,4)-Glc-alpha-(1,4)-Glc-alph (1,4)-Glc	<b>a-</b> 91	7	
Maltohexaose	Glc-alpha-(1,4)-Glc-alpha-(1,4)-Glc-alpha-(1,4)-Glc-alph (1,4)-Glc-alpha-(1,4)-Glc	a- 76	4	
Maltoheptaose	Glc-alpha-(1,4)-Glc-alpha-(1,4)-Glc-alpha-(1,4)-Glc-alph (1,4)-Glc-alpha-(1,4)-Glc-alpha-(1,4)-Glc	a- 62	3	

### Tableau XXI : Activités des alpha-Glc A et B de l'ouvrier du termite Macrotermessubhyalinus (Rambur) sur les malto-dextrines

#### c-Activités des alpha-Glc A et B sur des macromolécules

Les  $\alpha$ -glucosidases de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) n'hydrolysent pas l'amidon, le pullulane, le glycogène, la cellulose, l'inuline, le xylane et l'arabinogalactane.

#### 2-3-2-Stéréospécificité et la régiosélectitvité

Parmi tous les oligosaccharides naturels testés, les alpha-glucosidases de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) n'hydrolysent pas le raffinose, le melizitose et le melibiose. L'alpha-Glc B n'hydrolyse pratiquement pas l'isomaltotriose, l'isomaltose, panose et le nigerose. Elle hydrolyse faiblement le maltoheptaose, le maltohexaose et le maltopentaose (tableaux XXI et XXII). Les substrats les mieux hydrolysés par l'alpha-Glc B sont d'abord le Kojibiose ensuite le saccharose, la 6-O- $\alpha$ -maltosyl- $\beta$ -cyclodextrine et le maltose (tableau XXII). Quant à l'alpha-Glc A, elle n'hydrolyse pratiquement pas le tréhalose. Elle clive faiblement l'isomaltose, isomaltose, panose et le nigerose (tableau XXII). Le substrat le mieux hydrolysé par cette enzyme est le saccharose, ensuite viennent le maltotétraose, le maltotriose et le maltose.

Les résultats présentés dans **le tableau XXII** montrent que les alpha-glucosidases de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) clivent préférentiellement la liaison  $\alpha(1-2)$ . Cela se traduit par la forte hydrolyse du saccharose par l'alpha-Glc A et les fortes dégradations du kojibiose et du saccharose par l'alpha-Glc B. Nous remarquons aussi que la

nature du deuxième sucre (à partir de l'extrémité non réductrice de la molécule) a une influence sur la vitesse d'hydrolyse de la liaison alpha(1-2). Concernant l'alpha-Glc A, le glucose en deuxième position diminue de façon considérable les proportions d'hydrolyse passant de 253 à 91 % d'hydrolyse. Avec l'alpha-Glc B, nous avons obtenus l'effet contraire. La présence de glucose en deuxième position augmente de façon considérablement les proportions d'hydrolyse (tableau XXII). La seconde liaison la plus hydrolysée par les  $\Box$ glucosidases de l'ouvrier du termite *Macrotermes suhyalinus* (Rambur) est la liaison  $\alpha(1-4)$ . Cela se traduit chez l'alpha-Glc A par l'hydrolyse du maltose et des malto-dextrines non branchés (tableau XXI). Quant à l'alpha-Glc B, ce constat a été fait grâce à l'hydrolyse du maltose et du 6-O- $\alpha$ -maltosyl- $\beta$ -cyclodextrine. Les liaisons  $\alpha(1-1)$ ,  $\alpha(1-3)$  et  $\alpha(1-6)$  sont faiblement hydrolysées par les alpha-glucosidases de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) (tableau XXII).

		Activité (%)
Substrat	alpha-Glc B	alpha-Glc A
Maltose	100	100
Nigerose	2	9
Tréhalose	50	2
Kojibiose	288	91
Saccharose	182	253
Isomaltose	0,5	7
Isomaltotriose	0,3	3
Raffinose	0	0
Melezitose	0	0
6-o-alpha-altosyl-alpha-cyclodextrine	146	25
Melibiose	0	0
Panose	3	jane,

Tableau XXII: Stéréospécificité et de la régiosélectitvité des alpha-Glc A et B de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur)

#### 2-4-Paramètres cinétiques

Parmi les substrats les mieux hydrolysés par les deux enzymes  $\Box$ -Glc A et B, on trouve le *pNP*- $\alpha$ -D-glucopyranoside, le maltose et le saccharose. Nous avons donc déterminé les constantes de Michaelis et Menten (K<sub>M</sub>), les vitesses maximales (V<sub>max</sub>) et les efficacités catalytiques (V<sub>max</sub>/K<sub>M</sub>) de ces deux enzymes vis à vis de ces trois substrats. Nous constatons

qu'avec les trois substrats, les enzymes obéissent à une cinétique de type michaelien, traduite par une droite dans la représentation de Lineweaver et Burk (figures 38, 39 et 40).

Les valeurs de K<sub>M</sub>, de V<sub>max</sub>, et de V<sub>max</sub>/K<sub>M</sub>, sont rapportées dans le **tableau XXIII**. L'efficacité catalytique est plus élevée pour le substrat synthétique ( $pNP-\alpha$ -D-glucopyranoside) que pour les substrats naturels (le saccharose et le maltose). L'efficacité catalytique relative à l'hydrolyse du saccharose est plus élevée que celle du maltose. En se referant à l'affinité des enzymes pour les trois substrats testés, nous notons que celle relative au substrat synthétique le  $pNP-\alpha$ -D-glucopyranoside est plus élevée que celle du saccharose qui à son tour est supérieure à celle du maltose. Les vitesses maximales respectent également cet ordre.



Figure 38 : Cinétique d'hydrolyse du pNP-a-D-glucopyranoside par les a-Glc A et B de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur). Représentation de Lineweaver et Burk (1934).



Figure 39 : Cinétique d'hydrolyse du saccharose par les α-Glc A et B de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur). Représentation de Lineweaver et Burk (1934).



Figure 40 : Cinétique d'hydrolyse du maltose par les α-Glc A et B de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur). Représentation de Lineweaver et Burk (1934).

Tableau XXIII: Quelques paramètres cinétiqu	es des alpha-G	lc A e	t B de	l'ouvrier	du
termite Macrotermes subhyalinus (Rambur)					

alpha-Glc A			an a	alpha-Glc	B	
Substrats	K <sub>M</sub>	V <sub>max</sub>	V <sub>max</sub> /K <sub>M</sub>	K <sub>M</sub>	V <sub>max</sub>	V <sub>max</sub> /K <sub>M</sub>
	(mM)	(UE/mg)		(mM)	(UE/mg)	
PNPalphaGlc	0,3	121570	405234	0,5	10946	21892
Saccharose	3,4	14311	4209	4,2	5618	1338
Maltose	2,1	5321	2534	3,1	2880	929

### 2-5-Recherche du ou des site (s ) catalytique (s) hydrolysant le $pNP-\alpha$ -D-glucopyranoside, le saccharose et le maltose.

### 2-5-1-Etudes de compétition mutuelle entre le maltose et le saccharose

Les deux α-glucosidases de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) hydrolysent le maltose et le saccharose. Nous avons voulu savoir si ces hydrolyses sont catalysées au même site ou pas. Les résultats théoriques et expérimentaux obtenus sont présentés dans le **tableau XXIV**.

Les valeurs expérimentales obtenues sont très proches de celle du site commun, ce qui signifie qu'il existe un site commun pour l'hydrolyse de ces deux disaccharides naturels : le saccharose et le maltose.

#### Tableau XIV: Etudes de compétitions mutuelles entre le saccharose et le maltose.

Les concentrations de maltose et de saccharose sont les mêmes (10 mM) dans le milieu réactionnel. Les valeurs (unité arbitraire) calculées dans le cas théorique de sites distincts sont obtenues par la somme des deux activités. Les valeurs calculées dans le cas théorique d'un site commun sont déterminées par l'équation de Dixon (Dixon et Webb, 1979).

			Glucose libéré (unité arbitraire)			
Enzymes	Su	Substrats		eur rique	Valeur expérimentale	
	Maltose	Saccharose	Sites différents	Sites communs		
alpha-Glc A	100,00	182,00	282,00	153,15	148,17	
alpha-Glc B	100,00	253,00	353,00	193,63	189,24	

#### 2-5-2-Inactivation thermique

L'étude de la compétition mutuelle entre le saccharose et le maltose suggère que l'hydrolyse de ces deux substrats est assurée par un site commun chez chacune des deux  $\alpha$ -glucosidases de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur).

Pour confirmer l'hydrolyse des substrats pour un même site actif, nous avons réalisé une étude d'inactivation thermique avec les trois activités hydrolytiques principales ( $pNP-\alpha$ -D-glucopyranose, saccharose et maltose) communes aux deux  $\alpha$ -glucosidases de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur). Nous avons constaté que les cinétiques d'inactivation pour ces trois activités réalisées dans les mêmes et habituelles conditions expérimentales se superposent parfaitement traduisant ainsi la présence d'une constante d'inactivation identique (2,5 et 2,6) pour ces trois activités hydrolytiques. L'allure de la courbe est celle obtenue à la **figure 35**. La superposition des cinétiques d'inactivation de ces trois activités hydrolytiques confirme l'existence d'un site catalytique commun pour l'hydrolyse de ces différents substrats.

#### 2-6-Réactions de transglycosylation

Lorsque l'extrait brut enzymatique de l'ouvrier du termite *Macrotermes* subhyalinus(Rambur) a été utilisé pour réaliser les réactions de transglycosylation, l'activité  $\alpha$ -glucosidasique nous a montré un pH optimum de transglucosylation entre 5,0 et 6,5. La purification des entités moléculaires responsables de cette activité nous a permis d'isoler deux  $\alpha$ -glucosidases. Ces enzymes possèdent-elles les mêmes pH et pourcentages de transglucosylation? C'est pour répondre à ces questions que nous avons essayé de déterminer ces paramètres à travers les études portant sur les influences du pH et du temps sur la réaction de transglucosylation.

#### 2-6-1-Influence du pH sur l'activité de transglucosylation.

L'étude de l'influence du pH sur les activités de transglucosylation des deux  $\alpha$ glucosidases de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) a montré que ces enzymes possèdent un même pH optimum de transglucosylation. Ce pH est de 6,6 (figures 41 et 42). Il est identique à celui obtenu dans l'extrait brut enzymatique du même termite. La zone d'activité maximale de transglucosylation se situe entre pH 5,6 et 7,0. Au delà du pH 7,0, nous notons une chute du pourcentage de transglucosylation (figures 41 et 42).



Figure 41 : Influence du pH sur les réactions de transglucosylation catalysées par l'alpha-Glc A de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus*. (Rambur) Donneurs: saccharose et maltose 400 mM. Accepteur: Phényléthanol 100 mM. Tampon acétate 20 mM (pH 3,6-5,4) phosphate 20 mM (pH 5,4-8). Enzyme 84 UE. Temps d'incubation: 4 heures. saccharose [▲], maltose [■].



Figure 42: Influence du pH sur les réactions de transglucosylation catalysées par l'alpha-Glc B de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur)

Donneurs: saccharose et maltose 400 mM. Accepteur: phényléthanol 100 mM. Tampon acétate 20 mM (pH 3,6-5,4) phosphate 20 mM (pH 5,4-8) Enzyme 84 UE. Temps d'incubation: 4 heures. saccharose []]

#### 2-6-2- Influence du temps sur l'activité de transglucosylation

Concernant l'extrait brut enzymatique, nous avons utilisé 15 UE et le pourcentage maximal de transglucosylation était obtenu en 20 heures de réaction. Afin de réduire ce temps maximum de transglucosylation, nous avons augmenté le nombre d'unités enzymatiques des  $\alpha$ -glucosidases dans le milieu réactionnel en utilisant 84 UE pour chaque enzyme.

#### a-Synthèse de phényléthylglucoside

Le pourcentage maximum de synthèse de phényléthylglucoside est atteint en 4 heures de réaction pour chacun des deux  $\alpha$ -glucosidases. Les  $\alpha$ -Glc A et B ont respectivement des pourcentages maximums de transglucosylation de 55 et 58 % (**Tableau XXV**) lorsque le donneur de glucosyle est le saccharose ou le maltose (figures 43 et 44).



Figure 43 : Influence du temps d'incubation sur les réactions de transglucosylation catalysées par l'alpha-Glc A de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur). Donneurs: maltose et saccharose 400 mM. Accepteur: phényléthanol 20 mM. Tampon acétate 20 mM pH optimum de transglucosylation. Enzyme 84 UE. Saccharose [▲], maltose [■]



Figure 44 : Influence du temps d'incubation sur les réactions de transglucosylation catalysées par l'alpha-Glc B de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur). Donneurs: maltose et saccharose 400 mM. Accepteur: phényléthanol 100 mM. Tampon acétate 20 mM pH optimum de transglucosylation. Enzyme 84 UE. saccharose [▲], maltose [■]

Enzyme (84 UE)	Donneur de glucosyle (400 mM)	Accepteur de glucosyle (100 mM)	Temps d'incubation (h)	pH optimum	Taux de transglucosylation (%)
alpha-Glc	maltose	Phényléthanol	4	6,6	58
А	saccharose	Phényléthanol	4	6,6	55
alpha-Glc	maltose	Phényléthanol	4	6,6	58
В	saccharose	Phényléthanol	4	6,6	55

Tableau XXV: Taux et conditions optimales de transglucosylation des alpha-Glc A et B de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur)

#### a-Synthèse de gluco-aminoacides et de gluco-peptides

Cette étude a été menée d'une part avec un acide aminé et deux dipeptides bloqués aux extrémités N-terminales par le groupement benzyl oxycarbonyl (Z) et d'autre part aux extrémités C-terminales par le groupement méthyle (Me) ou éthyle (ET). Ces différents accepteurs de glucosyle n'ont seulement dans leur structure qu'un seul groupement hydroxyle OH comme groupement nucléophile capable d'accepter le résidu glucosyle. Le **tableau XXVI** montre qu'il n'existe pas de différences significatives entre les pourcentages maximums de transglucosylation obtenus lorsque le saccharose et le maltose sont utilisés comme donneur de glucosyle.

		% de transglucosylation			
accepteur de glucosyle	glucosyle	alpha-Glc A (84 UE)	alpha-Glc B (84 UE)		
Z-Thr-OMe	Maltose	28	25		
	Saccharose	27	23		
Z-Thr-Gly-OET	Maltose	18	16		
	Saccharose	16	14		
Z-Ser-Gly-OET	Maltose	15	12		
	Saccharose	16	11		

Tableau XXVI : Taux de transglucosylation des alpha-GLC A et B de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) de différents dérivés d'acides aminés et de peptides hydroxylés.

Le substrat Z-Thr-OMe est le meilleur accepteur. Il permet d'obtenir pour chaque enzyme un pourcentage maximum de transglucosylation avoisinant 25%. Lorsque les composés Z-Thr-Gly-OET et Z-Ser-Gly-OET sont utilisés comme accepteur de glucosyle, les valeurs des pourcentages maximums de transglucosylation se situent autour de 15±4 % de transglucosylation quelle que, soit l'enzyme utilisée

#### 2-7-Action des agents chimiques

Les  $\alpha$ -glucosidases de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) ont été purifiées à homogénéité électrophorétique. Cette pureté satisfaisante a permis d'étudier aisément l'effet de certains agents chimiques sur les activités catalytiques de ces glycoside-hydrolases. Le substrat utilisé est le *pNP-* $\alpha$ -D-glucopyranoside. Tous les ions métalliques testés sont sous forme de sel de chlorure

Les ions monovalents testés sont  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Li^+$  et  $Cs^+$ . Les trois premiers cités ne montrent aucun effet sur les deux  $\alpha$ -glucosidases pour des concentrations de 0,5 et 2,5 mM dans le milieu réactionnel. L'ion  $Cs^+$  exerce une légère activation sur l'activité de l'alpha-Glc A (111 %) mais ne montre aucun effet sur l'alpha-Glc B (**Tableau XXVII**). Parmi les ions divalents testés, seuls les ions  $Hg^{2+}$  et  $Cu^{2+}$  inhibent totalement les activités des deux  $\alpha$ -glucosidases. Les ions  $Ca^{2+}$  et  $Co^{2+}$  n'exercent aucun effet sur les deux enzymes pour des concentrations de 0,5 et 2,5 mM dans le milieu réactionnel. A 0,5 mM, les activités résiduelles des alpha-Glc A et B sont respectivement de 30 % est de 38 % (**Tableau XXVII**). Lorsque la concentration de chacun des ions  $Mg^{2+}$  et  $Sr^{2+}$  est de 0,5 mM dans le milieu réactionnel, il n'a aucun effet sur les activités catalytiques des deux  $\alpha$ -glucosidases. Cependant à 2,5 mM, il provoque une légère inhibition.

L'ion Zn<sup>2+</sup> montre un effet inhibiteur des activités catalytiques des deux alphaglucosidases. Cette inhibition est totale pour l'alpha-Glc A lorsque la concentration de cet ion divalent est de 2,5 mM dans le milieu réactionnel.

L'ion Sr<sup>2+</sup> inhibe aussi les deux enzymes pour des concentrations supérieures à 0,5 mM dans le milieu réactionnel.

L'ion  $\text{Co}^{2+}$  inhibe les  $\alpha$ -Glc A et B de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) à des concentrations supérieures à 0,5 mM dans le milieu réactionnel.

 

 Tableau XXVII : Effet de quelques agents chimiques sur les activités des alphaglucosidases de l'ouvrier du termite Macrotermes subhyalinus.

Ion	Concentration (mM)	a GlcA	a GlcB
Contrôle	0	100	100
$\mathbf{K}^+$	0,5	100	100
	2,5	100	100
$Na^+$	0,5	100	100
	2,5	100	100
Li <sup>+</sup>	0,5	100	100
	2,5	100	100
$\mathbf{Cs}^+$	0,5	100	100
	2,5	111	100
Ca <sup>2+</sup>	0,5	100	100
	2,5	100	100
$Zn^{2+}$	0,5	30	37
	2,5	0,6	18
$Mg^{2+}$	0,5	100	100
	2,5	91	84
$\mathrm{Hg}^{2+}$	0,5	0	0
	2,5	0	0
Cu <sup>2+</sup>	0,5	0	0
	2,5	0	0
$\mathrm{Sr}^{2+}$	0,5	100	100
	2,5	80	90
$\mathrm{Co}^{2+}$	0,5	100	100
	2,5	100	100
EDTA	0,5	49	23
	2,5	37	11
pCMB	0,5	90	81
	2,5	72	65
$N_3Na$	0,5	100	100
	2,5	100	85

#### Activité résiduelle (%)

L'azide de sodium n'exerce aucun effet sur l'a-Glc A lorsque sa concentration dans le milieu réactionnel est inférieure ou égale à 2,5 mM. L'a-Glc B est inhibée par ce même composé lorsque sa concentration dans le milieu réactionnel est de 2,5 mM.

A 0,5 mM, l'EDTA réduit les activités hydrolytiques des deux enzymes respectivement de 50 et de 70%. Ces inhibitions augmentent lorsque sa concentration dans le milieu réactionnel est de 2,5 mM.

Le *p*CMB est un inhibiteur pour les  $\alpha$ -Glc A et B. L' $\alpha$ -Glc B est plus inhibée que l' $\alpha$ -Glc A.

#### 2-8-Détermination de la masse moléculaire des a-glucosidases

La masse moléculaire est un paramètre essentiel pour les biocatalyseurs. Elle est nécessaire pour déterminer le nombre de moles d'enzyme dans le milieu considéré, calculer le nombre de rotations et pour déterminer certains paramètres moléculaires. Plusieurs méthodes existent pour déterminer la masse moléculaire des enzymes. Parmi celles-ci, nous pouvons citer la détermination par la chromatographie d'exclusion stérique, l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu dénaturant, la séquence des acides aminés, la diffusion de la lumière et la méthode physique faisant appel au rayon de Stokes et au coefficient de sédimentation des enzymes.

La détermination du poids moléculaire des α-glucosidases de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur), s'est faite par deux méthodes : la détermination par chromatographie d'exclusion stérique et l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 12%. Ces deux méthodes classiques nous ont donné des résultats satisfaisants. L'alpha-Glc A est homopentamérique. Elle a un poids moléculaire de 112500 en électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS. Son poids moléculaire déterminé en chromatographie d'exclusion moléculaire est de 106500. L'alpha-Glc B est monomérique. Les valeurs de poids moléculaire déterminées à l'aide des méthodes électrophorétique et chromatographique sont respectivement de 100000 et 93400 (tableau XXVIII).

Enzyme	Sous-unité	Poids moléculaire (électrophorèse)	Poids moléculaire (chromatographie)
alpha-Glc A	5	$112500 \pm 10500$	$106500 \pm 5600$
alpha-Glc B	1	$100000 \pm 3200$	$93400 \pm 4100$

 Tableau XXVIII: Poids moléculaires et sous-unités des alpha-Glc A et B de l'ouvrier du termite Macrotermes subhyalinus (Rambur)

#### **II-Discussion**

La purification d'enzymes par les techniques de chromatographie nécessite des quantités importantes de protéine qu'on ne peut pas obtenir facilement par dissection de tubes digestifs de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalimus* (Rambur) (Rouland, 1986). L'extrait brut enzymatique a été obtenu à partir de broyats totaux de mélange de grands et de petits ouvriers du termite *Macrotermes subhyalimus* (Rambur). Il est fortement coloré en rouge brun (Kouame, 1994). Cette coloration a été notée chez d'autres espèces de termite telles que *Macrotermes mulleri* (Rouland, 1986), *Sphaerotermes sphaerothorax* (Rouland, 1986) et *Macrotermes bellicosus* (Matoub, 1993).

Pour purifier les alpha-glucosidases de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur), trois étapes chromatographiques ont été utilisées. Il s'agit des chromatographies échangeuse d'anions, d'exclusion moléculaire et d'interaction hydrophobe. La troisième étape chromatographique a été très importante et déterminante car elle a permis d'éliminer les dernières protéines contaminantes qui auraient pu modifier le résultat électrophoretique obtenu sur gel de polyacrylamide. Cette dernière étape chromatographique doit être faite dans des conditions strictes en respectant:

- les différentes concentrations de saturation en sulfate d'ammonium du gel de Phényl-Sepharose et des solutions alpha-glucosidasiques;

- les pHs des milieux réactionnels;

- la température de la salle de chromatographie;

- le gradient d'élution des protéines.

Ces différentes dispositions doivent être prises parce que beaucoup d'autres protéines de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) ont des propriétés physico-chimiques très voisines de celles des deux alpha-glucosidases.

L'activité catalytique de l'alpha-Glc B n'est pas élevée. Elle est 12 fois moins active que celle de l'alpha-Glc A. L'alpha-Glc A a une activité spécifique plus élevée que celles des alpha-glucosidases de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (3130 UE/mg) (Faridmoayer et Scanan, 2004) et du champignon *Mortierella alliacea* (3200 UE/mg) (Tanaka et al., 2002). Cette activité est cependant inférieure à celles de l'abeille *Apis mellifera* (9300, 11300 UE/mg) (Kubota et al., 2004; Nishimoto et al., 2001).

Les pH optimums d'hydrolyse des alpha-glucosidases de l'ouvrier du termite Macrotermes subhyalinus (Rambur) font d'elles des enzymes acides. Chez l'insecte Apis mellifera, Nishimoto et al. (2001) ont purifié une alpha-glucosidase acide dont le pH optimum d'hydrolyse est de 5,5. **Delque-Bayer** *et al.* (1989) ont caractérisé une alphaglucosidase acide de pH optimum d'hydrolyse de 6,0 dans le granulocyte humain. Chez le parasite *Trichomanas vaginalis*, deux alpha-glucosidases acides ont été caractérisées. Elles ont des pH optimums d'hydrolyse de 4,5 et 5,5 (Ter-Kuile *et al.*, 2000). Plus récemment, Bravo-Torres *et al.*, (2004) ont montré l'existence chez *Entamoeba histolytica* d'une alphaglucosidase acide dont le pH d'hydrolyse est de 6,5. Ce résultat est différent de ceux obtenus avec les alpha-glucosidases de *Thermotoga maritima* (Raasch *et al.*, 2000) et de la suspension de soja (Kaushal *et al.*, 1990) qui sont des enzymes proche de la neutralité.

Les courbes de variation d'activité en fonction de la température des deux formes d'alpha-glucosidase de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) ont donné des températures optimales d'hydrolyse identiques (45°C). Cette valeur est supérieure à celles des alpha-glucosidases des micro-organismes *Bacillus amyloliquefaciens* (39,1°C) (Urlaud et Wober, 1978), *Torulaspora pretoriensis* YK-1 (35°C) (Oda *et al.*, 1993). Elle est inférieure à celles des bactéries *Bacillus thermoamyloliquefaciens* (81°C) (Suzuki, 1987) et *Bacillus sp.* (75°C).

L'étude de la spécificité de substrat de ces deux enzymes purifiées a été testée sur plusieurs substrats synthétiques et naturels. Seuls le maltose, le saccharose, le kojibiose et le p-nitrophényl-alpha-D-glucoside sont hydrolysés par les deux formes d'alpha-glucosidase de l'ouvrier du termite Macrotermes subhyalinus (Rambur). Ces résultats suggèrent que ces deux biocatalyseurs présentent une spécificité stricte pour le résidu glucosyle et l'anomérie alpha. Ce comportement enzymatique permet de penser que les deux alpha-glucosidases de l'ouvrier du termite Macrotermes subhyalimus (Rambur) sont régio et stéréosélectives. Chez les micro-organismes, quelques alpha-glucosidases sont spécifiques de ce seul résidu. C'est le cas chez les bactéries Candida albicans (Torre-Bouscoulet et al., 2004), Bacillus amyloliquefaciens (Urlaud et Wober, 1978) et le champignon Paccilomyces lilacinus (Kobayashi et al., 2003). Chez les cellules eucaryotes, il existe aussi des alpha-glucosidases possédant cette même spécificité de substrat. C'est le cas du foie de rat (Lavrenova et Presnova, 1994) et du cobaye (Imai et al., 1989). Cependant ces résultats sont différents de ceux obtenus pour les alpha-glucosidases purifiées à partir de la bactérie hyperthermophile Pyroccocus furiosus (Costantino et al., 1990) qui possèdent non seulement une activité sur le résidu alpha-D-glucosyle mais aussi sur le résidu alpha-D-glucosyle. Les deux alphaglucosidases de l'ouvrier du termite Macrotermes subhyalinus (Rambur) n'hydrolysent pas l'amidon, l'amylopectine, l'amylose et le glycogène. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus avec les alpha-glucosidases des bactéries Bacillus amyloliquefactiens (Urlaud et

Wober, 1978), hyperthermophile Pyroccocus furiosus (Costantino et al., 1990), Thermotoga maritima (Raasch et al., 2000), du parasite Trichomonas vaginalis (Ter Kuile et al., 2000) et du cobave (Imai et al., 1989). Cette spécificité de substrat sur les polymères alpha-glucanes n'est pas rencontrée chez les alpha-glucosidases de nombreux organismes tels que le champignon Paccilomyces lilacinus (Kobayashi et al., 2003), le cobaye (Imai et al., 1989), le foie du rat (Lavrenova et Presnova, 1994) et des granulocytes humains (Delque-Bayer et al., 1989). Les deux alpha-glucosidases de l'ouvrier du termite Macrotermes subhyalinus (Rambur) hydrolysent fortement le saccharose comme celles des bactéries Bacillus sp. (Nakao et al., 1994), de Thermus thermophilus (Yang et Zhang, 1992), du chevreau (Brada et Dubach, 1984) et de l'abeille Apis mellifera (Nishimoto et al., 2001). L'étude de la spécificité de substrats sur les maltodextrines a revelé que les deux alpha-glucosidases de l'ouvrier du termite Macrotermes subhyalinus (Rambur) hydrolysent les malto-dextrines, alors que cet isoptère ne possède pas dans son tube digestif une activité amylasique appréciable, laissant même penser que ce termite ne possède pas d'alpha-amylase mais plutôt un pool d'activité amylasique secondaire provenant naturellement d'autres glycosidases. Devant une telle situation, l'existence d'alpha-glucosidases dont le rôle essentiel est d'hydrolyser le maltose et les maltodextrines en glucose dans le tube digestif de l'isoptère est curieuse car l'alpha-amylase et l'alpha-glucosidase sont deux enzymes qui agissent de façon synergique pour hydrolyser l'amidon en glucose. Ces résultats permettent de penser que cette enzyme n'est donc pas présente dans le tube digestif de l'ouvrier du termite Macrotermes subhyalinus (Rambur) dans le but d'hydrolyser les maltodextrines. Cette assertion est soutenue par le fait que ces deux enzymes hydrolysent beaucoup plus le saccharose que le maltose. Les efficacités catalytiques relatives à l'hydrolyse du saccharose sont plus élevées que celles du maltose. Le rôle essentiel donc de ces deux enzymes dans le tube digestif de l'ouvrier du termite Macrotermes subhyalinus (Rambur) serait d'hydrolyser le saccharose.

La spécificité de liaison des deux alpha-glucosidases a été étudiée. Ce paramètre est non seulement essentiel pour l'utilisation des glycosidases en transglycosylation mais aussi comme outil de choix en glycobiologie et notamment dans le séquençage des oligosaccharides de glycoconjugués. Dans la plupart des cas, il est établi que l'hydrolyse des isomères d'oligosaccharides par les glycosidases peut être utilisée pour prédire la régiosélectivité en transglycosylation. C'est ainsi que l'étude de l'hydrolyse de différents disaccharides de type Glc-alpha-(1-X)-Glc a permis de définir la régiosélectivité des deux alpha-glucosidases de l'ouvrier du termite Macrotermes subhyalinus (Rambur) pour les liaisons oligosaccharidasiques. L'alpha-Glc B catalyse préférentiellement l'hydrolyse de la liaison

alpha-(1-4). Cette préférence change au profit de la liaison alpha-(1-2) lorsque le second sucre est remplacé par le fructose. Cette caractéristique cinétique la distingue de la plupart des alpha-glucosidases purifiées et caractérisées jusqu'à ce jour. Quant à l'alpha-Glc B, elle catalyse préférentiellement l'hydrolyse de la liaison alpha-(1-2). Lorsque le second sucre est remplacé par le fructose, la vitesse d'hydrolyse diminue. Ce résultat est en accord avec ceux des alpha-glucosidases du foie de porc (Bause et al., 1989). Il la différencie des alphaglucosidases de la bactérie Candida albicans, du parasite Entamoeba hystolytica (Bravo-Torres et al., 2004) et du soja (Kaushal et al., 1990) qui clivent préférentiellement la liaison osidique alpha-(1-3). La régiosélectivité des deux alpha-glucosidases de l'ouvrier du termite Macrotermes subhyalinus (Rambur) combinée à leur haute spécificité pour le seul résidu alpha-D-glucosyle, en font des glycosidases tout à fait remarquables. Ces caractéristiques cinétiques permettent de classer les alpha-Glc A et B respectivement dans les groupes EC 3.2.1.48 et EC 3.2.1.20 du système international. Les séquences partielles et totales en acides aminés des alpha-glucosidases de l'ouvrier du termite Macrotermes subhyalinus (Rambur) n'ayant pas encore été déterminées, nous ne pouvons les classer au sein d'une famille donnée au risque de nous tromper. La détermination des séquences en acides aminés est nécessaire parce que la classification proposée par Henrissat (1991), est basée sur des similarités de séquence destinées à mieux refléter les traits structuraux des glycosidases, que leur seule spécificité de substrat.

Les sites actifs des deux alpha-glucosidases ont été caractérisés à l'aide d'inhibiteurs d'activités enzymatiques faisant intervenir des groupements SH, et plus particulièrement l'acide aminé cystéine (*p*CMB et le chlorure de mercure). Les deux alpha-glucosidases sont inhibées par les réactifs spécifiques des groupements thiols. Il existe donc dans ces enzymes un ou des groupement (s) sulfhydryle (s) nécessaire (s) pour l'activité catalytique. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par **Yang et Zhang (1992), Kamei et Fujiyama (1995)** respectivement sur les alpha-glucosidases de la bactérie *Thermus thermophilus* et de la fraction insoluble des yeux du bœuf qui sont fortement inhibée par l'ion Hg<sup>2+</sup> ou encore des travaux réalisés par **Shailubhai** *et al.*, (1987) concernant l'alpha-glucosidase I de la glande mammaire de la vache où les agents modificateurs de thiols inactivent l'activité catalytique de l'enzyme. Les deux formes d'alpha-glucosidase de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) ne nécessitent pas la présence d'ions pour une bonne activité catalytique.

L'étude des réactions de transglycosylation catalysées par les exo-glucosidases (alphaglucosidase, alpha-glucosidase et alpha-galactosidase) des extraits bruts enzymatiques de l'ouvrier du termite Macrotermes subhyalinus (Rambur) et de son champignon symbiotique Termitomyces sp., a montré que l'isoptère est une source potentielle d'enzymes de transglucosylation, en particulier pour la glucosylation du 2-phényléthanol. C'est pourquoi, l'aptitude des deux alpha-glucosidases purifiées à catalyser des réactions de transglucosylation a été testée. Les substrats naturels tels que le saccharose et le maltose ont été utilisés comme donneurs de glucosyle. Le 2-phenyléthanol, les dérivés hydroxylés d'acides aminés et de peptides méthyl ou éthyl-esters ayant leurs extrémités N-terminales protégées par le groupement benzyloxycarbonyle (Z) sont utilisés comme accepteurs de glucosyle. L'utilisation d'acide aminés ou de peptides bloqués aux extrémités N et C-terminales présentent des avantages indéniables au niveau de la quantification des produits de synthèse. En effet, Fourage (2000) a montré que lorsque les peptides non bloqués aux extrémités N et C-terminales sont utilisés comme accepteurs de glucosyle dans les réactions de transglycosylation avec un donneur de glucosyle naturel, celles-ci sont "parasitées" par une réaction de condensation qui donne des produits identiques (au niveau de la masse moléculaire) à ceux obtenus au cours des réactions de transglycosylation. Cette situation peut entraîner une erreur dans l'estimation des pourcentages de transglycosylation et par conséquent influencer également la capacité de l'enzyme à pouvoir transférer efficacement un résidu glycosyle sur un peptide.

Les deux alpha-glucosidases purifiées sont capables de catalyser les réactions de transfert de glucosyle. Les rendements de glucosylation avec les acides aminés et peptides aux extrémités bloquées, sont faibles comparativement à ceux obtenus avec le 2-phényléthanol lorsqu'il est utilisé comme accepteur de glucosyle. Cette différence de pourcentage de transglucosylation pourrait s'expliquer par le caractère moins hydrophile de ces composés bloqués qui ne facilitent pas leur solubilisation à forte concentration dans le milieu réactionnel. En effet, la préparation d'une solution d'acides aminés ou de peptides aux extrémités bloquées au delà de 10 mM pose d'énormes problèmes. Le milieu de préparation doit être chauffé à haute température pendant un temps souvent prolongé pour favoriser sa solubilisation. Ce traitement thermique entraîne naturellement une dégradation de ces composés, ce qui ne favorise pas une optimisation des conditions expérimentales. Cependant, les pourcentages de transglucosylation obtenus dans ces conditions avec les deux alphaglucosidases ne sont pas très éloignés de ceux obtenus par Kouamé et al. (2005). Ils sont supérieurs à ceux rapportés à ce jour pour des sources conventionnelles de alphagalactosidases (Escherichia coli, Aspergillus oryzae,...) (Cantacuzene et Attal, 1991; Holla et al., 1992; Nilsson et Scigelova, 1994), mais sont plus faibles que ceux obtenus avec le suc

111

.

digestif d'achatine (Leparoux et al., 1994 et 1996 ; Leparoux et Colas, 1994). Lorsque le 2phényléthanol est utilisé comme accepteur de glucosyle à une concentration de 100 mM dans les milieux réactionnels, des taux maximums de transglucosylation ont été obtenus dans un temps relativement court (4 heures) sans qu'il n'y ait eu d'hydrolyse des produits formés au cours de la translucosylation. Ces pourcentages de transglucosylation sont supérieurs à ceux rapportés à ce jour pour la plupart des glycosidases (Nilsson, 1988; Leparoux et al., 1997; Kobayashi, 2003). Après quatre heures de réaction, une baisse des pourcentages de transglucosylation est observée. Cette situation peut s'expliquer par une hydrolyse des produits issus de la synthèse. Or les alpha-glucosidases n'hydrolysent pas les liaisons glycosidiques de type alpha. Ce résultat suggère que cette enzyme agirait par rétention de configuration anomérique. L'hydrolyse potentielle des produits de synthèse à partir d'un certain temps de réaction nécessite un contrôle cinétique de la réaction. Il faut soit arrêter la réaction lorsque le maximum de transglycosylation est atteint (temps où le substrat n'est totalement pas hydrolysé) soit extraire le produit de transglycosylation après sa formation; ce qui n'est pas chose aisée. C'est pourquoi une mutation au niveau des sites nucléophiles de ces enzymes s'avèrent nécessaires pour les transformer en glycosynthase comme cela avait été fait chez une alpha-glucosidase par Mackenzie et al., (1998). En effet une glycosynthase est capable de faire de la synthèse mais incapable d'hydrolyser les produits formés. Les alphaglucosidases, de l'ouvrier du termite Macrotermes subhyalinus (Rambur) présentent des pHs optimums de transglucosylation (pH) différents de ceux des réactions d'hydrolyse (pH 5,4 et 6 respectivement pour les alpha-Glc A et B). Des différences d'effet de pH sur les réactions d'hydrolyse et les réactions de transglycosylation ont été aussi observées dans le cas de la alpha-galactosidase acide de foie de félin (Holmes et O'brien, 1979) et de l'alpha-glucosidase de la bactérie Mortierella alliacea (Tanaka et al., 2002). Pour expliquer ces différences, Huber et al., (1983) ont été les premiers à suggérer l'existence d'un groupe avec une forte valeur de pKa au site actif, laquelle affecterait l'hydrolyse mais pas la transglycosylation.

#### Conclusion

L'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) possèdent dans son tube digestif deux formes d'alpha-glucosidases acides mésophiles qui ont chacune une spécificité stricte vis à vis du résidu glucosyle. Les alpha-Glc A et B hydrolysent préférentiellement les liaisons osidiques alpha-(1-4) et alpha-(1-2). L'alpha-Glc B hydrolyse plus le maltotétraose que les autres maltodextrines tandis que l'alpha-Glc A préfère le maltose. Elles sont donc des

outils de choix dans l'étude de la détermination des structures primaires des copules glucidiques des glycoconjugués.

Les deux formes d'alpha-glucosidases de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) possèdent des activités transglucosidasiques très intéressantes comparées aux sources classiques utilisées pour la synthèse de néoglucoconjugués. Leurs propriétés transglycosidasiques dépendent de la nature plus ou moins nucléophile de l'accepteur du glucosyle. Ces enzymes ne nécessitent pas d'ions métalliques pour leur activité catalytique et sont inhibées par les réactifs spécifiques du groupement thiol. L'alpha-Glc A est homopentamérique tandis que l'alpha-Glc B est monomérique.

# B-Purification et caractérisation physico-chimiques des $\beta$ -xylosidases de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) et de son champignon symbiotique *Termitomyces sp.*

#### **I-Résultats**

### 1-Purification des $\beta$ -xylosidases de l'ouvrier du termite Macrotermes subhyalinus (Rambur) et de son champignon symbiotique Termitomyces sp.

Pour isoler les glycosidases d'un extrait brut, beaucoup de techniques de purification sont utilisées. Les protéines des extraits bruts enzymatiques sont généralement précipitées grâce au sulfate d'ammonium et aux solvants organiques tels que l'acétone et l'éthanol. La stratégie de purification des protéines présente des variantes quant à l'ordre, au nombre et aux types de chromatographie (échangeuse d'ions, exclusion moléculaire, affinité et interaction hydrophobe).

La stratégie de purification retenue pour isoler à homogénéité électrophorétique les  $\beta$ -xylosidases de l'extrait brut enzymatique de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) et de son champignon symbiotique *Termitomyces sp.* fait appel à des gels aux propriétés physico-chimiques stables et aisés d'utilisation. Elle permet l'élimination de tout contaminant (protéique, enzymatique, pigmentaire...) présent dans l'extrait brut enzymatique. La stratégie utilisée est efficace et reproductible.

### 1-1-Purification de la $\beta$ -xylosidase de l'ouvrier du termite Macrotermes subhyalinus (Rambur)

#### 1-1-1-Stratégie de purification

Elle est constituée de la:

- chromatographie échangeuse d'anions sur gel de DEAE-Sepharose CL-6B;
- chromatographie d'exclusion moléculaire sur gel de Sephacryl S-200 HR;
- chromatographie d'interaction hydrophobe sur gel de Phényl-Sepharose CL- 6B.

Pour purifier la  $\beta$ -xylosidase de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur), le tampon acétate 20 mM a été retenu comme phase mobile dans les processus chromatographiques. La purification a été réalisée dans un premier temps avec de l'acétate 20 mM pH 4,0 comme tampon d'élution. Le choix du pH de ce tampon est dû au fait que l'enzyme semble posséder, comme le montre les résultats sur l'étude de la recherche des enzymes thermophiles de l'extrait brut enzymatique de l'ouvrier du termite *Macrotermes* 

subhyalinus (Rambur), son activité maximale à ce pH. Les essais de purification réalisés à ce pH n'ont pas donné de résultats totalement satisfaisants. En effet, la chromatographie échangeuse d'anions sur gel de DEAE-Sépharose CL-6B a permis d'éliminer une bonne partie des pigments de l'extrait brut enzymatique et d'isoler une seule activité ßxylosidasique dont l'activité spécifique et le facteur de purification sont respectivement de 343.25 UE/mg et 15.35. Elle n'est pas accrochée sur le gel DEAE-Sépharose CL-6B (figure 45). La précipitation au sulfate d'ammonium (80 % de saturation) des protéines de la solution enzymatique issue de la chromatographie précédente, a amélioré le facteur de purification de l'activité  $\beta$ -xylosidasique (17,18). Les derniers pigments présents dans l'extrait brut enzymatique obtenu après la précipitation au sulfate d'ammonium sont éliminés grâce à la chromatographie d'exclusion moléculaire sur gel de Séphacryl S-200 HR (figure 46). Cependant, le facteur de purification obtenu après ce fractionnement a considérablement diminué (2,45) si bien qu'à la troisième étape de la purification (chromatographie d'interaction hydrophobe sur gel de Phényl-Sepharose CL-6B), la βxylosidase a perdu son activité catalytique. Le changement de pH du tampon d'élution a permis de mener cette purification à son terme en conservant non seulement l'activité hydrolytique de l'enzyme mais en améliorant les facteurs de purification. Un pH de 5,6 a été retenu.



### Figure 45 : Profil chromatographique d'échanges d'anions sur gel de DEAE-Sepharose CL-6B de la $\beta$ -xylosidase de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur).

La phase mobile est le tampon acétate 20 mM pH 4,0. L'activité hydrolytique sur le  $pNP\beta Xyl$  est mesurée à pH 4,0 dans les conditions standard. Elle est exprimée en UE/ml

[○]. Le profil protéique est réalisé à 562 nm [▲]. Le décrochage des protéines fixées est réalisé avec du chlorure de sodium. Les concentrations utilisées sont exprimées en molarité (M) [-]. La barre horizontale indique les fractions d'intérêt rassemblées pour l'étape suivante.



Figure 46 : Profil chromatographique d'exclusion moléculaire sur gel de Séphacryl S-200 HR de la  $\beta$ -xylosidase de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur). La phase mobile est le tampon acétate 20 mM pH 4,0. L'activité hydrolytique sur le *p*NP $\beta$ Xyl est mesurée à pH 4,0 dans les conditions standard. Elle est exprimée en UE/ml [ $\circ$ ]. Le profil protéique est réalisé à 562 nm [ $\blacktriangle$ ]. La barre horizontale indique les fractions d'intérêt rassemblées pour l'étape suivante.

### a-Chromatographie échangeuse d'anions sur gel de DEAE-Sepharose CL-6B

Cette chromatographie échangeuse d'anions permet d'éliminer une bonne partie des pigments et d'isoler une seule activité  $\beta$ -xylosidasique. L'enzyme est retenue sur la colonne à pH 5,6 et elle est éluée par une concentration de 0,33 M en NaCl (figure 47).



Figure 47 : Profil chromatographique d'échanges d'anions sur gel de DEAE-Sepharose CL-6B de la  $\beta$ -xylosidase de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur). La phase mobile est le tampon acétate 20 mM pH 5,6.

L'activité hydrolytique sur le  $pNP\betaXyl$  est mesurée à pH 4,0 dans les conditions standard. Elle est exprimée en UE/ml [•]. Le profil protéique est réalisé à 562 nm [ $\blacktriangle$ ]. Le décrochage des protéines fixées est réalisé avec du chlorure de sodium. Les concentrations utilisées sont exprimées en molarité (M) [•]. La barre horizontale indique les fractions d'intérêt rassemblées pour l'étape suivante.

#### b-Chromatographie d'exclusion moléculaire sur gel de Sephacryl S-200 HR

Une précipitation au sulfate d'ammonium (80 % de saturation) des fractions actives issues de la chromatographie précédente, permet de concentrer la solution et d'augmenter l'activité spécifique de la  $\beta$ -xylosidase. La solution ainsi concentrée est soumise à une chromatographie d'exclusion moléculaire sur gel de Sephacryl S-200 HR, qui permet non seulement l'élimination des derniers pigments présents mais aussi d'améliorer de façon considérable le facteur de purification de l'activité  $\beta$ -xylosidasique (figure 48)



Figure 48 : Profil chromatographique d'exclusion moléculaire sur gel de Sephacryl S-200 HR de la  $\beta$ -xylosidase de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur). La phase mobile est le tampon acétate 20 mM pH 5,6. L'activité hydrolytique sur le *p*NP $\beta$ Xyl est mesurée à pH 4,0 dans les conditions standard. Elle est exprimée en UE/ml [•]. Le profil protéique est réalisé à 562 nm [ $\blacktriangle$ ]. La barre horizontale indique les fractions d'intérêt rassemblées pour l'étape suivante.

### c-Chromatographie d'interaction hydrophobe sur gel de Phényl-Sepharose CL 6B.

La chromatographie d'interaction hydrophobe sur gel de Phényl-Sepharose CL-6B est une étape cruciale dans la purification de la  $\beta$ -xylosidase. Cette étape chromatographique permet en effet d'isoler la  $\beta$ -xylosidase de deux protéines contaminantes difficiles à éliminer par d'autres méthodes. L'enzyme est éluée avec le tampon ne contenant pas de sulfate d'ammonium (figure 49). Le bilan de la purification est rapporté dans le tableau XXIX.



Figure 49: Profil chromatographique d'interaction hydrophobe sur le gel Phényl-Sepharose CL--6B de la  $\beta$ -xylosidase de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur).

La phase mobile est le tampon acétate 20 mM pH 5,6. L'activité hydrolytique sur le  $pNP\beta Xyl$  est mesurée à pH 4,0 dans les conditions standard. Elle est exprimée en UE/ml [•]. Le profil protéique est réalisé à 562 nm [ $\blacktriangle$ ]. Le décrochage des protéines fixées est réalisé avec du sulfate d'ammonium. Les concentrations utilisées sont exprimées en molarité (M) [•]. La barre horizontale indique les fractions d'intérêt rassemblées.

Etape de la purification	Activité totale (UE)	Protéine (mg)	Activité spécifique (UE/mg)	Facteur de purification	Rendement (%)
Extrait total	920	40,00	23,00	1,00	100,00
D.E.A.E Sepharose CL- 6B	1777	10,2	174, 20	7,57	193,13
Précipitation au sulfate d'ammonium	1623	8,5	191	8,30	176,41
Sephacryl S-200 HR	1300	1,2	1083	47	141,30
Phényl-Sepharose CL-6B	546	0, 15	3640	158	35,60

Tableau XXIX: Bilan global de la purification de la  $\beta$ -xylosidase de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur)

#### 1-1-2-Critère de pureté

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (12 % en conditions natives) montre une seule bande protéique (figure 50) traduisant une pureté relativement satisfaisante de cette enzyme hydrolytique. Par contre, en conditions dénaturantes, elle présente deux bandes protéiques révélant ainsi la forme dimérique de ce biocatalyseur (figure 51).



Figure 50 : Analyse électrophorétique sur gel de polyacrylamide en conditions natives de la  $\beta$ -xylosidase de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur)

1: extrait brut enzymatique;

2: β-xylosidase purifiée, après passage sur gel de Phényl Sepharose CL-6B;



## Figure 51 : Analyse électrophorétique sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS) de la $\beta$ -xylosidase de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur)

1 : β-xylosidase purifiée, après passage sur gel de Phényl Sepharose CL-6B;

2 : marqueurs précolorés de chez Bio-Rad.

## 1-2-Purification de la $\beta$ -xylosidase du champignon symbiotique *Termitomyces sp.* de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur)

#### 1-2-1-Stratégie de purification

Cette stratégie est constituée de la:

- chromatographie d'exclusion moléculaire sur gel de Sephacryl S-200 HR;

-chromatographie échangeuse d'anions sur gel de DEAE-Sepharose CL -6B;

-chromatographie d'interaction hydrophobe sur gel de Phényl-Sepharose CL-6B.

#### a-Chromatographie d'exclusion moléculaire sur gel de Sephacryl S-200 HR

L'extrait brut enzymatique du champignon *Termitomyces sp.*de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) est un milieu riche en protéines mais très peu pigmenté. La précipitation au sulfate d'ammonium à 80 % de saturation des protéines de cette solution enzymatique, permet de concentrer l'extrait avant de la soumettre à une chromatographie d'exclusion moléculaire sur gel de Sephacryl S-200 HR qui permet d'éliminer beaucoup de protéines contaminantes (figure 52).


Figure 52 : Profil chromatographique d'exclusion moléculaire sur gel de Sephacryl S-200 HR de la  $\beta$ -xylosidase du champignon symbiotique *Termitomyces sp.* de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur).

L'activité hydrolytique sur le  $pNP\betaXyl$  est mesurée à pH 4,0 dans les conditions standard. Elle est exprimée en UE/ml [ $\blacktriangle$ ]. Le profil protéique est réalisé à 562 nm [ $\circ$ ]. La barre horizontale indique les fractions d'intérêt rassemblées pour l'étape suivante.

# b-Chromatographie échangeuse d'anions sur gel de DEAE-Sépharose CL-6B

Les fractions actives de l'étape précédente sont rassemblées et soumises à une chromatographie échangeuse d'anions. L'enzyme est retenue sur le gel de DEAE-Sepharose CL-6B où elle est éluée pour une concentration de 0,3 M en NaCl (figure 53).



# Figure 53 : Profil chromatographique d'échanges d'anions sur gel de DEAE-Sepharose CL-6B de la $\beta$ -xylosidase du champignon symbiotique *Termitomyces sp.* de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus (Rambur)*.

L'activité hydrolytique sur le  $pNP\betaXyl$  est mesurée à pH 4,0 dans les conditions standards. Elle est exprimée en UE/ml [ $\blacktriangle$ ]. Le profil protéique est réalisé à 562 nm [ $\circ$ ] Le décrochage des protéines fixées est réalisé avec du chlorure de sodium. Les concentrations utilisées sont exprimées en molarité (M) [ $\bullet$ ]. La barre horizontale indique les fractions d'intérêt rassemblées pour l'étape suivante.

## c-Chromatographie d'interaction hydrophobe sur gel de Phényl-Sépharose CL-6B

Une chromatographie d'interaction hydrophobe sur gel de Phényl-Sépharose CL 6B est une étape très déterminante dans la purification de la  $\beta$ -xylosidase du champignon symbiotique *Termitomyces sp.* de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur). Cette  $\beta$ -xylosidase est éluée pour une concentration de 0,6 M en sulfate d'ammonium (figure 54). Le bilan de purification est rapporté dans le tableau XXX.



Figure 54 : Profil chromatographique d'interaction hydrophobe sur gel de Phényl-Sepharose CL--6B de la  $\beta$ -xylosidase du champignon symbiotique *Termitomyces sp.* de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur).

L'activité hydrolytique sur le  $pNP\beta$ -Xyl est mesurée à pH 4,0 dans les conditions standard. Elle est exprimée en UE/ml [ $\blacktriangle$ ]. Le profil protéique est réalisé à 562 nm [ $\circ$ ]. Le décrochage des protéines fixées est réalisé avec du sulfate d'ammonium. Les concentrations utilisées sont exprimées en molarité (M) [ $\bullet$ ]. La barre horizontale indique les fractions d'intérêt rassemblées.

Tableau XXX	X : Bilan glob	al de la	purificatio	on de la	β-xylosidase	du champignon
symbiotique	<b>Termitomyces</b>	<i>sp</i> de	l'ouvrier	du tern	nite <i>Macroter</i>	mes subhyalinus
(Rambur).						

Etape de la purification	Activité totale (UE)	Protéine (mg)	Activité spécifique (UE/mg)	Facteur de purification	Rendement (%)
Extrait total	8912	54,3	164	1,00	100,00
Précipitation au sulfate d'ammonium	8394	19,2	437,2	2, 7	94,2
Sephacryl S-200 HR	8073	15,8	510,9	3,4	90,6
D.E.A.E Sepharose CL- 6B	3130	0,30	10433	63,6	35,1
Phényl-Sepharose CL-6B	2656	0,05	53120	323,7	29,8

#### 1-2-2-Critère de pureté

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (12 % en conditions dénaturantes) présente une seule bande protéique (figure 55) traduisant une bonne pureté de la  $\beta$ -xylosidase du champignon symbiotique *Termitomyces sp.* de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur).





- 1:  $\beta$ -xylosidase purifiée, après passage sur gel dePhényl Sépharose CL-6B;
- 2 : marqueurs précolorés de chez Bio-Rad.

2-Caractérisation physico-chimiques des  $\beta$ -xylosidases de l'ouvrier du termite Macrotermes subhyalinus (Rambur) et de son champignon symbiotique Termitomyces sp.

## 2-1-Influence du pH sur les activités β-xylosidasiques

#### 2-1-1- pH optimum d'hydrolyse

Comme le montre les **figures 56 et 57**, les deux  $\beta$ -xylosidases présentent des activités hydrolytiques optimales identiques. Elles se situent entre 3,6 et 4,0 dans un tampon acétate 20 mM. Ce résultat permet de les classer parmi le groupe des  $\beta$ -xylosidases acides. Le tampon citrate-phosphate inhibe partiellement les activités catalytiques des deux  $\beta$ -xylosidases (figure 56).



Figure 56 : Détermination du pH optimum d'hydrolyse de la  $\beta$ -xylosidase de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur)

Tampon acétate de sodium [♦], tampon phosphate [■], tampon citrate-phosphate [▲]



Figure 57 : Détermination du pH optimum d'hydrolyse de la  $\beta$ -xylosidase du champignonn symbiotique *Termitomyces sp.* de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) Tampon acétate de sodium [ $\blacklozenge$ ], tampon phosphate [ $\blacksquare$ ], tampon citrate-phosphate [ $\blacktriangle$ ]

#### 2-1-2- pH optimum de stabilité

La  $\beta$ -xylosidase de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* est stable de pH 3,6 à 7,0 tandis que celle de son champignon symbiotique *Termitomyces sp* l'est de pH 3,6 à 6,6 (figures 58 et 59). Les zones de stabilité au pH des deux  $\beta$ -xylosidases dans les différents tampons utilisés couvrent leur zone de pH optimum d'hydrolyse.



Figure

58 : Stabilité au pH de la  $\beta$ -xylosidase de l'ouvrier du termite Macrotermes subhyalinus (Rambur).

Les tests sont réalisés à différentes valeurs de pH (3,6-8,0) dans les tampons acétate et phosphate 20 mM.





Les tests sont réalisés à différentes valeurs de pH dans les tampons acétate et phosphate 20 mM.

#### 2-1-3-Influence de la force ionique du tampon

La force ionique du tampon n'exerce aucune influence sur les valeurs des pHs optimums d'hydrolyse des deux  $\beta$ -xylosidases.

### 2-2-Influence de la température sur les activités β-xylosidasiques

#### 2-2-1-Température optimale d'hydrolyse

Les températures optimales d'hydrolyse des deux  $\beta$ -xylosidases déterminées dans le tampon acétate 20 mM pH 4,0 sont toutes deux de 75°C (figures 60 et 61). Ce sont des enzymes thermophiles.



Figure 60 : Détermination de la température optimale d'hydrolyse de la  $\beta$ -xylosidase de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur)



Figure 61 : Détermination de la température optimale d'hydrolyse de la  $\beta$ xylosidase du champignonn symbiotique *Termitomyces sp.* de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur)

# 2-2-2-Q<sub>10</sub> et énergie d'activation (E<sub>a</sub>)

Les valeurs de  $Q_{10}$  des  $\beta$ -xylosidases de l'ouvrier du termite *Macrotermes* subhyalinus (Rambur) et de son champignon symbiotique *Termitomyces sp.* déterminées selon Arrhenius entre 40 et 50°C, sont respectivement de 1,56 et 2,23.

Les logarithmes des vitesses initiales des deux activités  $\beta$ -xylosidasiques varient linéairement en fonction de 1/T pour des températures comprises entre 45 et 70°C (figures 62 et 63).



Figure 62 : Détermination de l'énergie d'activation  $(E_a)$  de la  $\beta$ -xylosidase du champignon symbiotique *Termitomyces sp.* de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus (Rambur)* 



Figure 63 : Détermination de l'énergie d'activation ( $E_a$ ) de la  $\beta$ -xylosidase de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur)

A partir de ces représentations graphiques, il est possible de calculer les énergies d'activation ( $E_a$ ) de ces  $\beta$ -xylosidases. L'énergie d'activation de la  $\beta$ -xylosidase de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalimus* (Rambur) pour le substrat *p*-nitrophényl- $\beta$ -D-

xylopyranoside dans le tampon acétate 20 mM pH 4,0 est de 30,15 KJ/mol, tandis que celle de son champignon symbiotique *Termitomyces sp.*, dans les mêmes conditions expérimentales, est de 41,44 KJ/mol.

#### **2-2-3-Inactivation thermique**

L'étude de l'inactivation thermique de chacune des deux  $\beta$ -xylosidases montre que la  $\beta$ -xylosidase du champignon symbiotique *Termitomyces sp.* est plus résistante à la chaleur que celle de son termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) (figures 64 et 65). A 75°C, leur température optimale d'hydrolyse, les  $\beta$ -xylosidases du champignon symbiotique *Termitomyces* sp. et de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) sont stables pendant 30 min dans le tampon acétate 20 mM pH 4,0. Leurs activités résiduelles dans les mêmes conditions expérimentales pour 1 heure de pré-incubation sont respectivement de 85 et 20 % (figures 64 et 65).



Figure 64 : Inactivation thermique de la  $\beta$ -xylosidase de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur)



Temps de pré-incubation (min)

Figure 65 : Inactivation thermique de la  $\beta$ -xylosidase du champignon symbiotique *Termitomyces sp.* de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur)

#### 2-2-4-Dénaturation thermique

Les **figures 66 et 67** montrent que les deux  $\beta$ -xylosidases sont stables de 25 à 75°C pendant 30 min dans le tampon acétate 20 mM pH 4,0. Au delà de 75°C, on note une chute brutale des activités hydrolytiques de ces glycosidases traduisant leur dénaturation.



Figure 66 : Dénaturation thermique de la  $\beta$ -xylosidase du champignon symbiotique *Termitomyces sp.* de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur)



Figure 67: Dénaturation thermique de la  $\beta$ -xylosidase de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur)

#### 2-2-5-Conservation

Les deux  $\beta$ -xylosidases sont stables dans le tampon acétate 20 mM pH 5,6 pendant 2 mois à 4°C. Congelées, elles gardent leur stabilité pendant un an dans le même tampon.

## 2-3-Spécificité de substrat

# 2-3-1-Activités des deux $\beta$ -xylosidases sur les substrats p-nitrophényl-D-glycoside

La spécificité de substrat de chacune des  $\beta$ -xylosidases a été testée sur une variété de *p*-nitrophényl-D-glycopyranoside. Seul le substrat *p*-nitrophényl- $\beta$ -D-xylopyranoside est hydrolysé par les deux  $\beta$ -xylosidases (tableau XXXI). Les deux enzymes ont une spécificité stricte vis à vis du résidu xylosyle.

	Activité (%)				
Substrat	β-xylosidase du termite	β-xylosidase du champignon			
<i>v</i> NP-β-D-Xyl	100	100			
<i>v</i> NP-β-D-Glc	0	0			
vNP-β-D-Gal	0	0			
νNP-β-D-Man	0	0			
pNP-β-D-Ara	0	0			
pNP-β-D-GlcNAc	0	0			
pNP-β-D-GalNAc	0	0			
νNP-β-D-Fuc	0	0			

Tableau XXXI : Etude de la spécificité de substrat (*p*-nitrophényl-D-glycoside) des  $\beta$ xylosidases de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) et de son champignon symbiotique *Termitomyces sp*.

# 2-3-2-Activités des deux β-xylosidases sur les oligosaccharides et polysaccharides

Les deux β-xylosidases n'hydrolysent pas les oligosaccharides saccharose, maltose, cellobiose, gentiobiose, lactose, raffinose, melizitose, laminaribiose, sophorose et melibiose (tableau XXXII).

Elles ne dégradent pas non plus les polysaccharides xylane, pullulane, cellulose microcristalline, carboxyméthylcellulose, amidon, arabinogalactane et inuline. Le seul substrat naturel hydrolysé par ces deux enzymes est le xylobiose (tableau XXXII).

	Activité (%)					
Substrat	β-xylosidase du termite	β-xylosidase du champignon				
xylobiose	100	100				
saccharose	0	0				
maltose	0	0				
cellobiose	0	0				
raffinose	0	0				
laminaribiose	0	0				
sophorose	0	0				
melibiose	0	0				
lactose	0	0				
gentiobiose	0	0				
melizitose	0	0				
xylane,	0	0				
amidon	0	0				
carboxyméthylcellulose	0	0				
arabinogalactane	0	0				
inuline	0	0				
pullulane	0	0				
cellulose microcristalline,	0	0				

Tableau XXXII : Etude de la spécificité de substrats (oligosaccarides et polysaccharides) des  $\beta$ -xylosidases de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) et de son champignon symbiotique *Termitomyces sp.* 

### 2-4-Paramètres cinétiques

Les  $\beta$ -xylosidases de l'ouvrier du termite Macrotermes subhyalinus (Rambur) et de son champignon symbiotique *Termitomyces sp.* hydrolysent le *p*-nitrophényl- $\beta$ -Dxylopyranoside et le xylobiose. Par conséquent, les constantes de Michaelis et Menten (K<sub>M</sub>), les vitesses maximales (Vmax) et les efficacités catalytiques (V<sub>max</sub>/K<sub>M</sub>) ont été déterminées vis à vis de ces deux substrats. Les représentations graphiques de Lineweaver et Burk (figures 68 et 69) traduisent dans tous les cas des cinétiques de type michaélien. Les valeurs des différentes paramètres cinétiques sont rapportées dans le tableau XXXIII. Les efficacités catalytiques de la  $\beta$ -xylosidase du champignon sont plus élevées que celles de l'ouvrier du termite.



Figure 68 : Cinétique d'hydrolyse du pNP- $\beta$ -D-xylopyranoside par les  $\beta$ -xylosidases de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) et de son champignon symbiotique *Termitomyces sp.* Représentation de Lineweaver et Burk (1934).



Figure 69 : Cinétique d'hydrolyse du xylobiose par les  $\beta$ -xylosidases de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) et de son champignon symbiotique *Termitomyces sp.* Représentation de Lineweaver et Burk (1934).

Tableau XXXIII : Quelques paramètres cinétiques des  $\beta$ -xylosidases de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) et de son champignon symbiotique *Termitomyces sp.* 

	β-ху	losidase de l'o	uvrier	β-xylosidase du champign		
Substrats	K <sub>M</sub> (mM)	V <sub>max</sub> (UE/mg)	V <sub>max</sub> /K <sub>M</sub>	K <sub>M</sub> (mM)	Vmax (UE/mg)	Vmax /KM
ΡΝΡβΧγΙ	2,2	12500	5581	0,31	106170	342484
xylobiose	1,6	7544	4805	2,32	65437	28205

#### 2-5-Action des agents chimiques

L'influence des ions métalliques (Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Li<sup>+</sup>, Ce<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, Sr<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, Co<sup>2+</sup> et Hg<sup>2+</sup>), du *p*CMB et de l'EDTA sur les activités catalytiques des deux  $\beta$ -xylosidases a été testée. Tous les agents chimiques testés n'exercent pratiquement pas d'effet sur les activités catalytiques des deux enzymes. Par contre l'ion Hg<sup>2+</sup> exerce un effet inhibiteur sur les deux  $\beta$ -xylosidases. Aucun effet activateur n'a été décelé (tableau XXXIV).

Tableau XXXIV: Effet de quelques agents chimiques sur les activités des  $\beta$ -xylosidases de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* et de son champignon symbiotique *Termitomyces sp.* 

Ion	Concentration (mM)	β-Xylosidase	β-Xylosidase	
		(ouvrier)	(champignon)	
Contrôle	0	100	100	
$\mathbf{K}^+$	0,5	100	100	
	2,5	100	100	
$\mathbf{Na}^+$	0,5	100	100	
	2,5	100	100	
$Li^+$	0,5	100	100	
	2,5	100	100	
$Ce^{2+}$	0,5	100	100	
	2,5	100	100	
Ca <sup>2+</sup>	0,5	100	100	
	2,5	100	100	
$Zn^{2+}$	0,5	100	100	
	2,5	100	100	
$Mg^{2+}$	0,5	100	100	
C	2,5	100	100	
$\mathrm{Hg}^{2+}$	0,5	70	80	
e	2,5	30	23	
Cu <sup>2+</sup>	0,5	100	100	
	2,5	100	100	
$\mathrm{Sr}^{2^+}$	0,5	100	100	
	2,5	100	100	
Co <sup>2+</sup>	0,5	100	100	
	2,5	100	100	
EDTA	0,5	100	100	
	2,5	100	100	
<i>p</i> CMB	0,5	100	100	
1 -	2.5	84	100	

#### Activité résiduelle (%)

#### 2-6-Détermination du poids moléculaire

Les poids moléculaires des  $\beta$ -xylosidases de l'ouvrier du termite *Macrotermes* subhyalinus (Rambur) et de son champignon symbiotique *Termitomyces sp.* déterminés en électrophorèse sur gel de polyacrylamide (12 %) en conditions dénaturantes sont respectivement de 10600 et 89400. Les poids moléculaires de ces mêmes enzymes déterminés par chromatographie sur gel filtration sont respectivement de 89400 et 93400 (tableau XXXV).

Tableau XXXV : Poids moléculaires et sous-unités des  $\beta$ -xylosidases de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) et de son champignon symbiotique *Termitomyces sp.*.

Enzyme	Sous-unité	Poids moléculaire (électrophorèse)	Poids moléculaire (chromatographie)
β-xylosidase de l'ouvrier du termite	2	106000	98500
β-xylosidase de son champignon	1	89400	93400

# 3-Comparaison des caractéristiques physico-chimiques des deux β-xylosidases

Les deux  $\beta$ -xylosidases de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) et de son champignon symbiotique *Termitomyces sp.* ont les mêmes températures et pH optimums d'hydrolyse. Elles ne sont pas influencées par la force ionique des tampons. Cependant, elles diffèrent par plusieurs autres caractéristiques physico-chimiques notamment par leur poids moléculaire et le nombre de sous unités (tableau XXXV). Au vu de ces résultats, on peut suggérer que les deux enzymes sont donc différentes. La  $\beta$ xylosidase de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) est soit sécrétée par le termite lui même soit par ses bactéries symbiotiques.

Tableau	XXXVI:	Résumé	des	principales	propriétés	physi	co-chimiqu	es	des	β-
xylosidas	es de l'or	ıvrier du	tern	nite <i>Macrote</i>	rmes subhy	alinus	(Rambur)	et	de	son
champig	non symbi	otique <i>Ter</i>	mito	myces sp.						

Caractéristiques	physico-	$\beta$ -xylosidase de l'ouvrier	β-xylosidase du	
chimiques		du termite Macrotermes	champignon symbiotique	
		subhyalinus	Termitomyces sp.	
pH optimum d'hydrolys	se	3,6-4,0	3,6-4,0	
pH optimum de stabilité		3,6-7,0	3,6-7,6	
Force ionique		Pas d'influence	Pas d'influence	
Température optimale				
d'hydrolyse (°C)		75	75	
Demie-vie à 75°C		30-50 min	1,5 et 2 h	
Q10	40-50°C	1,56	2,23	
Energie d'activation (K	J/mol)	30,15	41,44	
Sous-unités		2	1	
Masse moléculaire (		106000	89400	

#### **II-Discussion**

Les deux  $\beta$ -xylosidases de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) et de son champignon symbiotique *Termitomyces sp.* ont été purifiées à homogénéité électrophorétique grâce à l'utilisation de trois gels chromatographiques de haute résolution. Ces gels sont le D.E.A.E.-Sepharose CL-6B, le Sephacryl S-200 HR et le Phényl-Sepharose CL-6B. Les chromatographies sur les gels de D.E.A.E.-Sepharose CL-6B et Sephacryl S-200 HR sont des étapes qui ont permis d'éliminer la quasi totalité des pigments contenus dans les extraits bruts enzymatiques et d'améliorer les facteurs de purification. Quant à la chromatographie d'interaction hydrophobe utilisée en dernière étape, elle demeure une technique de choix pour la purification de ces deux biocatalyseurs. Son utilisation dans cette purification a été motivée par les bonnes qualités qui lui sont reconnues en matière de fractionnement des protéines. En effet, selon **Ibrahim-Granet et Bertrand (1996)**, la chromatographie d'interaction hydrophobe est une technique très performante pour la purification de ces ture technique très performante pour la purification hydrophobe est une technique très performante pour la purification de ces deux biocatalyseurs de fraction de pour la purification hydrophobe est une technique très performante pour la purification de ces deux biocatalyseurs de fraction de se protéines et le gel de Phényl-Sépharose semble être le meilleur support pour cette technique. **Soubrier et al. (1988)** ont utilisé dans leur procédé de purification la

chromatographie d'interaction hydrophobe sur support de Phényl-Sépharose comme étape déterminante pour purifier une enzyme de conversion de l'angiotensine du cortex rénal humain. Loomes et al. (1992) et Hasnain et al. (1992) ont purifié par cette méthode en une seule étape chromatographique respectivement une métalloprotéase de bactérie *Proteus mirabilis* et une protéase à sérine de *Termitomyces lanuginosus*.

L'essai d'utilisation du tampon acétate 20 mM pH 4,0 comme phase mobile dans les processus chromatographiques de la purification de la β-xylosidase de l'ouvrier du termite Macrotermes subhyalinus (Rambur) a posé d'énormes problèmes. Cette enzyme, dans son extrait brut, a son activité maximale à pH 4,0. En choisissant ce pH, l'objectif était d'avoir une importante activité de cette enzyme au cours de la purification, ce qui devrait rendre le fractionnement plus aisé. Mais malheureusement, après la deuxième étape de purification (chromatographie d'exclusion moléculaire sur gel de Séphacryl S-200 HR), nous observons une perte totale de l'activité enzymatique. Ce comportement peut s'expliquer soit par la présence d'une coenzyme dans l'extrait brut enzymatique de l'ouvrier du termite Macrotermes subhyalinus qui serait nécessaire à l'activité catalytique de la B-xylosidase de cet insecte soit par l'instabilité de l'enzyme dans ce tampon à pH 4.0. Sachant que la plupart des glycosidases n'utilisent pas de coenzyme dans leur acte catalytique, une modification de pH de la phase mobile chromatographique a été retenue. Effectivement, ce changement de pH a permis non seulement d'améliorer les activités spécifiques mais de conserver l'activité hydrolytique de la  $\beta$ -xylosidase jusqu'à la fin de sa purification. Chez la  $\beta$ -xylosidase du champignon Termitomyces sp. de l'ouvrier du termite Macrotermes subhyalinus, ce comportement n'a pas été observé.. Les deux enzymes sont acides et ont les mêmes pH optimums d'hydrolyse (3,6-4,0). Ces résultats sont comparables à ceux des  $\beta$ -xylosidases de Scytalidium thermophilum (5,0) (Zanoelo et al., 2004), d'Aspergillus niger (4,0-6,5) (John et al., 1979), de Phanerochaete chrusosporium (5,0) (Copa-Patino et Broda, 1994), d'Aspergillus niger 15 (3,8-4,0) (Rodionova et al., 1983), d'Aspergillus phoenicis (Rizzati et al., 2001) et de Trichoderma koningii (3,6-4,0) (Li et al., 2000). Ils sont par contre différents de ceux des  $\beta$ -xylosidases de Streptomyces sp. (7,5) (Belfaquih et Penninckx, 2000), de Clostridium stereorarium (7,0) (Sakka et al., 1993), et de Clostridium cellulolyticum (7,5) (Shailendra et al., 1995).

Les deux  $\beta$ -xylosidases sont thermophiles avec une valeur de température optimale d'hydrolyse de 75°C. Cette température optimale est supérieure à celles des  $\beta$ -xylosidases de *Bacillus stearothermophilus* (70°C) (Nanmori *et al.*, 1990), de *Neeocallimastix frontalis*  (35°C) (Hebraud et Fevre, 1990), de Arscula adeninivorans (60°C) (Buttner et Bode, 1992) et de Phanerochaete chrysosporium (60°C) (Copa-Patino et Broda, 1994), mais elle est inférieure à celles des  $\beta$ -xylosidases de Pyrococcus furiosus (102-105°C) (Kengen et al., 1993) et d'Aureobasidium (80°C) (Havasshi et al., 2001). Par contre, une température optimale de 75°C est aussi obtenue avec les  $\beta$ -xylosidases d'Aspergillus phoenicis (Rizzati et al., 2001) et de Saccharum officinarum (Chinen et al., 1982).

La spécificité de substrat des deux  $\beta$ -xylosidases purifiées a été testée sur plusieurs substrats naturels et synthétiques. Seuls les substrats pNP-β-D-xylopyranoside et xylobiose sont hydrolysés par ces deux biocatalyseurs. Ces résultats montrent que ces enzymes sont non seulement des exo-glycosidases mais possèdent également une spécificité stricte vis à vis du résidu β-D-xylosyle et de l'anomérie β. Chez les eucaryotes, on rencontre aussi quelques β-xylosidases qui sont spécifiques de ce seul résidu. Parmi ceux ci, on peut citer celles de Saccharum officinnrum (Chinen et al., 1982) et de Fusarium proliferatum (Saba, 2003). Cependant, ces résultats sont différents de ceux obtenus avec certaines β-xylosidases que l'on peut scinder en deux groupes. Un premier groupe au sein duquel on retrouve les  $\beta$ xylosidases qui possèdent une activité hydrolytique non seulement sur le xylobiose et les oligoxylosides de degré de polymérisation compris entre 3-8 mais aussi sur les résidus β-Dglucosyle,  $\beta$ -D-fucosyle et  $\beta$ -D-arabinosyle. Dans ce groupe, on peut citer les  $\beta$ -xylosidases d'Aspergillus niger 15 (Rodionova et al., 1983), de Penicillium wortmanni (Deleyn, 1978), de Thermotoga sp. (Ruttersmith et Daniel, 1993), de Thermoanerobacter ethanolicus (Shao et Wiegel, 1992). Dans le second groupe, les  $\beta$ -xylosidases, qui en plus de leur large spécificité hydrolytique, se caractérisent par leur inactivité sur le xylobiose qui est le dimère constitutif du xylane. Ce comportement catalytique caractérise les  $\beta$ -xylosidases de Trichoderma lignorum (John et Schmidt, 1988), de Neurospora crassa ( Deshpande et al., 1986), de la bactérie hyperthermophile exprimée chez Escherichia coli (Hudson et al., 1991) et de l'ouvrier du termite Macrotermes bellicosus (Matoub, 1993). Les deux  $\beta$ xylosidases purifiées dans ce travail diffèrent énormément de la β-xylosidase du microorganisme Streptomyces sp. (EC.10). En effet, cette enzyme, en plus de son activité catalytique possède une activité xylose isomérasique importante qui fait sa particularité. Ces deux activités enzymatiques possèdent des températures et pH optimums différents. L'identification des 35 premiers acides aminés de la séquence N-terminale de cette enzyme montre une analogie structurale avec les séquences N-terminales des xyloses isomérases

produites par les autres micro-organismes mais pas avec celles des séquences N-terminales des  $\beta$ -xylosidases (Belfaquih et Penninckx, 2000).

La β-xylosidase du champignon symbiotique Termitomyces sp. est monomérique alors que celle de l'ouvrier du termite Macrotermes subhvalinus (Rambur) est dimérique. Des  $\beta$ -xylosidases polymériques ont été déjà mises en évidence par plusieurs auteurs. Ainsi Garcia-Campayo et Wood (1983) ont purifié et caractérisé une  $\beta$ -xylosidase hétérodimérique du champignon Neocallimastix frontalis. Les deux sous-unités de cette enzyme ont des poids moléculaires de 83.000 et 53.000. Shao et Wiegel (1992) ont pu isoler une  $\beta$ -xylosidase homodimérique de poids moléculaire de 165.000. Rodionova et al. (1983) en déterminant les propriétés physico-chimiques de la B-xylosidase d'Aspergillus niger 15, ont trouvé en gel filtration un poids moléculaire de 253.000 alors qu'en électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS, le poids moléculaire est de 122.000. Cette situation traduit la forme homodimérique de cette enzyme. La  $\beta$ -xylosidase de Closttridium stercorarium est quant à elle constituée de 4 sous-unités identiques. Le poids moléculaire de cette enzyme est de 220.000 (Sakka et al., 1993). Une autre βxylosidase homotétramerique a été mise évidence par Belfaquih et Penninckx (2000). Cette  $\beta$ -xylosidase a un poids moléculaire de 168.000. Il existe aussi des  $\beta$ -xylosidases monomériques. C'est le cas des β-xylosidases de Scytalidium thermopilum de poids moléculaire de 45.000 (Zanoelo et al., 2004), d'Aspergillus niger (PM, 78.000) (John et al., 1979), de Phanerochaete chrysosporium (PM, 44.000) (Copa-Patino et Broda, 1994), de Bacillus thermantarcticus (PM, 150.000) (Lama et al., 2004) et d'Aspergillus phoenicis (PM, 132.000) (Rizzati et al., 2001).

Les activités des deux  $\beta$ -xylosidases sont inhibées par l'ion mercure. Il existe donc probablement dans ces enzymes un ou des groupement (s) sulfhydryle (s) nécessaire (s) à l'activité catalytique. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par **Rodionova** *et al.*, (1983), Hebraud et Fevre (1990) respectivement sur les  $\beta$ -xylosidases de la moisissure d'*Aspergillus niger* 15 et du champignon *Neocallimastix frontalis* qui sont fortement inhibée par l'ion Hg<sup>2+</sup>, ce qui n'est pas le cas de l'activité catalytique de la  $\beta$ -xylosidase de *Trichoderma koningii* G39 (Li *et al.*, 2000). Les deux  $\beta$ -xylosidases de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) et de son champignon symbiotique *Termitomyces sp.* ne nécessitent pas la présence d'ion essentiel à l'activité catalytique.

# Conclusion

Les deux  $\beta$ -xylosidases de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) et de son champignon symbiotique *Termitomyces sp.* sont acides et thermophiles. Elles ont une spécificité stricte vis à vis du résidu xylosyle et de la configuration anomérique  $\beta$ . La  $\beta$ xylosidase du champignon symbiotique est plus stable que celle de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur). Les deux enzymes ne sont donc pas les mêmes. La  $\beta$ xylosidase de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) est soit sécrétée par le termite lui même soit par ses bactéries symbiotiques. Elles pourraient être des outils interessants pour l'étude de la détermination des structures primaires des copules glucidiques des glycoconjugués.

# CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les castres neutres du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) et son champignon symbiotique *Termitomyces sp.* contiennent une variété d'activités glycosidasiques et protéasiques. Les activités hydrolytiques de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) sont plus élevées que celles des soldats (petits et grands). Tandis que celles du champignon symbiotique *Termitomyces sp.* sont supérieures aux activités hydrolytiques de la meule, son support de croissance.

Les acyl-pNA hydrolysés en milieu alcalin par les castes neutres du termite *Macrotermes* subhyalinus (Rambur) et son champignon symbiotique *Termitomyces sp* sont les substrats Gly-pNA, Leu-pNA, Met-pNA, Phe-pNA, IPro-pNA, Lys-pNA, Arg-pNA, BA-pNA, Ala-pNA et Asp-pNA. Les activités protéasiques les plus élevées ont été obtenues avec les substrats Leu-pNA et le BA-pNA chez l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur). L'activité originale est celle hydrolysant le substrat Met-pNA.

Les activités osidasiques les plus élevées chez les castres neutres sont celles de l' $\alpha$ glucosidase,  $\beta$ -glucosidase,  $\alpha$ -galactosidase et la xylanase. Deux activités thermophiles ont été mises en évidence. Il s'agit des activités xylanasique et  $\beta$ -xylosidasique. Chez l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur), les activités thermophiles ne sont pas thermostables.

Les activités  $\beta$ -glucosidasique,  $\beta$ -galactosidasique,  $\alpha$ -galactosidasique et xylanasique sont les plus élevées chez le champignon symbiotique. Les activités xylanasique et  $\beta$ -xylosidasique sont thermophiles. Seule celle de la  $\beta$ -xylosidase est thermostable.

Toutes les exo-glycosidases thermophiles ou possèdant une bonne activité de transglycosylation ( $\alpha$ -glucosidase de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur)) ont été purifiées et caractérisées. Les  $\beta$ -xylosidases de l'ouvrier et de son

145

champignon symbiotique sont acides et possèdent une spécificité stricte vis à vis du résidu xylosyle. Celle du champignon symbiotique est plus stable que la  $\beta$ -xylosidase de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur). Les deux enzymes sont donc différentes. La  $\beta$ -xylosidase de l'ouvrier du termite est soit sécrétée par lui même soit par ses bactéries symbiotiques. Elles sont des outils potentiels dans l'étude de la détermination des structures primaires des copules glucidiques des glycoconjugués.

L'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) possède dans son tube digestif deux formes d' $\alpha$ -glucosidases acides mésophiles qui ont chacune une spécificité stricte vis à vis du résidu glucosyle. Les  $\alpha$ -Glc A et B hydrolysent préférentiellement les liaisons osidiques  $\alpha(1-4)$  et  $\alpha(1-2)$ . L' $\alpha$ -Glc B hydrolyse plus le maltotétraose que les autres maltodextrines tandis que l' $\alpha$ -Glc A préfère le maltose. Ces deux enzymes possèdent une bonne activité de transglycosylation. Les rendements de transglycosylation dans le cas de la synthèse de néoglucoconjugués peut atteindre 50 %, dépassant ainsi les taux couramment obtenus avec la plupart des exo-glycosidases (inférieur à 30 %); ce qui fait de ces enzymes des outils interessants pour les réactions de synthèse de néoglucoconjugués ou de détermination des structures primaires des copules glucidiques des glycoconjugués.

En pespectives, nous envisageons par une mutation dirigée de transformer les deux  $\alpha$ -glucosidases en glycosynthases à l'effet d'orienter leur activité enzymatique essentiellent vers la catalyse des réactions de synthèse. Quant aux  $\beta$ -xylosidases (surtout celle du champignon), elles seront clonées, exprimées et surexprimées afin de faciliter leur production et leur utilisation en industrie.

# **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

Abo-khatwa N (1978) Cellulase of fungus growing termites: a new hypothesis on its origin. *Exp.*34 : 559-560.

Aguilar G, Morlon-Guyot J, Trejo-Aguilar B & Guyot JP (2000) Purification and characterization of an extracellular  $\alpha$ -amylase produced by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010 (T), an amylolytic lactic acid bacterium. *Enzyme Microb. Technol.* 27 : 406-413.

Ajisaka K, Nishida H & Fujimoto H (1987) Use of an activated carbon column for the synthesis of disaccharides by use of reversed hydrolysis activity of  $\beta$ -galactosidase. Biotechnol Lett. 9: 387-392.

Anzai H, Nisizanwa K & Matsuda K (1984) Purification and characterization of a cellulase from *Dolabella auricularia*. J. Biochem. (Tokyo) 96 : 1381-90

Aquino AC, Jorge JA, Terenzi HF & Polizeli ML (2003) Studies on a thermostable  $\alpha$ -amylase from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. *Appl. Microbiol*. *Biotechnol.* 61 : 323-8.

Araki T, Tani S, Maeda K, Hashikawa S, Nakagawa H & Morishia T (1999) Purification and characterization of  $\beta$ -1,3-xylanase from a marine bacterium, Vibrio sp. XY-214. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*63 : 2017-9.

Araki T, Inoul & Morishita T (1998) Purification and characterization of  $\beta$ -1,3-xylanase from a marine bacterium, Alcaligenes sp.XY-234. *J.Gen.Appl. Microbiol.* 44 : 269-274.

**Bachelier G (1978)** La faune des sols, son écologie et son action. ORSTOM Bondy. Initiations-Documentations techniques **38**: 391p.

Bagga PS, Sandhu DK & Sharma S (1990) Purification and characterization of cellulolytic enzymes produced by *Aspergillus nidulans*. J. Appl. Bacteriol. 68 : 61-8.

Balakrishnan H, Kamal Kumar B, Dutta-choudhury M & Rele MV (2002). Characterization of alkaline theroactive cellulase free xylanases from alkalophilic *Bacillus* (NOL, 87-6-10). J. Biochem. Mol. Biol. Biophys. 6: 325-34.

**Baniel A, Caer D, Colas B & Gueguen J (1992)** Fonctional properties of glycosylated derivatives of the 11 S storage protein from Pea (*Pisum sativum L.*). J. Agric. Food Chem. **41**: 544 - 546.

**Barrett T, Suresh CG, Tolley SP, Dodson EJ & Hughes MA (1995)** The crystal structure of a cyanogenic  $\beta$ -glucosidase from white clover, a family 1 glycosyl hydrolase. *Structure* **3** : 951-960.

Barrett AJ & Rawlings ND (1995) Families and clans of serine peptidases. Arch. Biochem. Biophys. 318 : 247-250

**Barrett AJ, Rawlings ND & Woessner JF (1998)** Handbook of proteolytic enzymes. Barrett AJ., Rawlings ND. & Woessner JF, (eds). Academic press, San Diego, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto. pp. 1-1666.

Bauer MW, Halio SB & Kelly RM (1996) Proteases and glycosyl hydrolases from hyperthermophilic micro-organismes. *Adv. Protein Chem.* 48: 2716310

Bause E, Schweden J, Gross A & Orthen B (1989) Purification and characterization of trimming glucosidase I from pig liver. *Eur. J. Biochem.* 183 : 661-9.

**Becker KC & Kuhl P (1999)** Synthesis of O- $\beta$ -galactopyranosyl-L-serine derivatives using  $\beta$ -galactosidase in aqueous-organic reaction systems. *J.Carbohydr. Chem.* **18** : 121-129.

Beckwith TD & Rose EJ (1929) Cellulase digestion by organisms from the termite gut. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 27: 4-6

Beldman G, Searle-Van LMF, Rombouts FM & Voragen AGJ (1985) The cellulase of *Trichoderma viride* : Purification, characterization and comparison of all detectable endoglucanases, exoglucanases and  $\beta$ -glucosidases. *Eur. J. Biochem.* 196 : 303-308

**Belfaquih N & Penninckx M J (2000)** A bifunctional β-xylosidase-xylose isomerase from *Streptomyces sp.* Ec 10. *Enzyme Microbiol. Technol.* **27** : 114-121.

Berg T, Gjoen T & Bakke O (1995) Physiological functions of endosomal proteolysis. Biochem. J. 307 : 313-328.

**Bernfeld P** (1955). Amylase  $\beta$  and  $\alpha$  (Assay Method), in methods in enzymology I, Colowick and Kaplan, Ed., Academic press, New-york, pp.149-154.

**Beynon RJ & Bond JS (1989)** Proteolytic enzymes, a pratical approach. Beynon R.J., and Bond.J.S. (eds.) IRL Press, Oxford, New York, Tokyo. p. v.

Biely P (1985) Microbial xylanolytic systems. Trends Biotechnol. 3: 286-90.

Bizzatti AC, Jorge JA, Tereuzi HF, Rechia CG & Polizeli ML. (2001) Purification and properties of a thermostable extracellular  $\beta$ -D-xylosidase prooduced by a thermotolerant *Aspergillus phoenicis. J. Ind. Microbiol.* 26: 156-60.

Bok JD, Yermool DA & Eveleigh DE (1998) Purification, characterization, and molecular analysis of thermostable CelA and CelB from *Thermotoga neapolitana*. Appl. Environ. Microbiol. 64 : 4774-81.

Bonnin E, Renard C, Thibault S-F & Ducroo P (1997) Les enzymes de degradation des parois végétales : mode d'action et utilisations alimentaires. In : Enzymes en agroalimentaire (Larreta-Garde V.) ed. Lavoisier Tec. et Doc., Paris pp 168-200.

Boyer P (1973) Action de certains termites constructeurs sur l'évolution des sols tropicaux. Ann. Sci. Nat. Zoo. Paris. 12<sup>ème</sup> serie, 15 : 329-498.

Brada D & Dubach UC (1984) Isolation of homogeneous glucosidase II from pig kidney anicrosomes. *Eur. J. Biochem.* 141: 149-56

Brauman A (1989) Etude du métabolisme bacterien de termites superieurs à régimes alimentaires differenciés. Thèse Université Aix Marseille II, Faculté de Pharmacie de Marseille.

Brauman A, Koenig JF, Dutreix J & Garcia JL. (1990) Characterization of two sulfate reducing bacteria from the gut of the soil-feeding termite *Cubitermes speciosus*. Antonie Van Leeuwenhock 58 : 271-5.

Bravman T, Zolotnitsky G, Shulami S, Belakhov V, Solomon D, Baasov T, Shoham G & Shoham Y (2001) Stereochemistry of family 52 glycosyl hydrolases : a  $\beta$ -xylosidase from *Bacillus stearothermophilus* T-6 is a retaining enzyme. *FEBS Lett.* **495** : 39-43.

Bravo-Torres JC, Villagomez- castro JC, Calvo-Mendez C, Flores-caneon A & Lopez-Romero E (2004) Purification and biochemical characterizetion of a membrane bound  $\alpha$ glucosidase from the parasite *Entamoeba histolytica*. Int. J. Parasitol. 34: 455-62.

Breznak JA & Pankratz HS (1977) In situ morphology of gut microbiota of wood-eating termites *Reticulitermes flavipes* and *Coptotermes lacteus formosanus*. Appl. Environ. Biol. 33 : 406-426.

Brillouet JM, Williams P & Moutounet M (1991) Purification and some properties of a novel endo  $\beta$  (1-6)-D-galactanase from *Aspergillus niger*. *Agric. Biol. Chem.* 55 : 1565-1571.

Brimer L, Nout MJ & Tuncel G (1998) Beta-glycosidase (amygdalase and linamarase) fromEndomyces fibuliger (LU677) : formation and crude enzyme properties. Appl. Microbiol.Biotechnol.49182-8.

Bronnenmeier K, Kern A, Liebl W & Staudenbauer WL.(1995) Purification of *Thermotoga marima* enzymes for the degradation of cellulosic materials. *Appl. Environ. Microbiol.* **61** : 1399-407.

Brunswick JM, Kelly CT & Forgarty WM (1999) The amylopullulanase of *Bacillus* sp. DSM 405. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51: 170-5

Buttner R & Bode R (1992) Purification and characterization of beta-xylosidase activities from the yeast Arscula adeninivorans. J. Basic. Microbiol. 32 : 159-66.

**Cabezas JA, Reglero A, Cabezas JA, Reglero A & Calvo P (1983)** Glycosidases (Fucosidases, galactosidases, glucosidases, hexosaminidases and glucuronidases) from some molluscs and vertebrates and neuraminidases from virus. *Int. J. Biochem.* **15** : 243-59.

Caer D, Baniel A., Gueguen J. & Colas B. (1990a). In vitro glycosylation of Pea Legumin. Effects on some fonctional properties. Sci. Aliments 10: 465 - 472.

Caer D, Baniel A, Gueguen J & Colas B (1990b) Preparation and physicochemical properties of glycosylated derivatives of Pea Legumin. J. Agric. Food Chem. 38:1700 - 1706.

Cabezas JA (1983). Kinetic evidence for two active sites in  $\beta$ -D-fucosidase of *Helicella* ericetorum. Int. J. Biochem. 15: 685-93

Camacho NA & Aguilar OG (2003) Production, purification and characterisation of a low molecular mass xylanase from *Aspergillus sp.* And application baking. *Appl.Biochem. Biotechnol.* 104: 159-72.

Cantacuzene D & Attal S (1991) Enzymic synthesis of galactopyranosyl-L-serine derivatives using galactosidases. Carbohydr. Res. 211 : 327-331.

Chakraborty K, Bhattacharyya BK & Sen SK (2000) Purification and characterization of a thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus stearothermophilus*. Folia Microbiol. (Praha) 45 : 207-10.

Chen JM, Dando PM, Rawlings ND, Brown MA, Young NE, Stevens RA, Hewitt E, Watts C & Barrett AJ (1997) Cloning, isolation, and characterization of mammalian legumain, an asparaginyl endopeptidase. J. Biol. Chem. 272: 8090-8098.

Cheony KA, Kim TJ, Yoon JW, Park CS, Lee TS, Kim YB, Park KH & Kim JW (2002) Catalytic activities of intracellular neopullulanase on cyclodextrin, carbose and maltose. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 35 : 27-34.

**Chessa JP, Feller G & Gerday C (1999)** Purification and characterization of the heat-labile  $\alpha$ -amylase secreted by the psychrophilic bacterium TAC 240B. *Can. J. Microbiol.* **45** : 452-457.

Chiba S (1988) Alpha glucosidase. In hand book of amylases and related enzymes, ed Amylase research. Society of Japan, Pergamon Press, Oxford, pp. 104-116.

Chiffoleau-Giraud V, Spangenberg P & Rabiller C (1997)  $\alpha$ -galactosidase transferase activity in ice and use of vinyl- $\alpha$ -D-galactoside as donor. *Tetrahedron Asymm.* 8 : 1703-1710.

Chinen L, Oouchi K, Tamaki H & Fukuda N (1982) Purification and properties of thermostable beta-xylosidase from immature stables of *Saccharum officinarum* L. (sugar cane). J. Biochem. (Tokyo) 92 : 1873-81.

Cleveland LR (1923) Symbiosis between termites and their intestinal protozoa. *Proc. Nat. Acad.* Sc. U. S A., 9 : 424-428.

Cohen P, Gluschankof, Clamgirand C, Gomez S, Rholan M, Morel A & Camier M (1989) In protein recognition of immobilized ligands. Hutchens T.W., (ed.), New York. pp. 133-140.

**Copa-Patino JL & Broda P (1994)** A *Phanerochaete chrysosporium*  $\alpha$ -D-glucosidase/ $\beta$ -Dxylosidase with specificity for  $(1\rightarrow 3)$ - $\alpha$ -D-glucan linkages. *Carbohydr. Res.* **253** : 265-75.

**Costantino HR, Brown SH & Kelly RM (1990)** Purification and characterizetion of an alpha-glucosidase from a hyperthermophilic archaebacterium. *Pyrococcus furiosus*, enhibiting a temperature optimum of 105 to 115 degrees C. J. Bacteriol. **72** : 3654-60.

**Cote GL & Tao BY (1990)** Oligosaccharide synthesis by enzymatic transglycosylation. *Glycoconj. J.* 7: 145-162.

Cowling EB & Merril W (1966) Nitrogen in wood and its role in wood deterioration. Can. J. Botany 44: 1539-54.

Crawford DL, Pometto AL III & Crawford RL (1983) Lignin degradetion by *Streptomyces viridosporus*: isolation and characterization of a new polymeric lignin degradetion intermediate. *Appl. Environ. Micribiol.* **45** : 898-904.

Crout DHG & Vic G (1998) Glycosidases and glycosyl transferases in glycoside and oligosaccharide synthesis. Curr. Spin. Chem. Biol. 2: 98-111

Czoliz R, Slaytor M & O'brien RW (1985) Bacterial flora of the mixed segment of the higher termite Nasutitermes exitiosus. Appl. Environ. Microbiol. 17 1226-36.

De A Ximenes F, de Paula Silveira FQ & Filho EX (1996) Production of  $\beta$ -xylosidase activity by *Trichoderma harzianum* strains. *Curr. Microbiol.* 33: 71-7.

**De Azevedo AM, De Marco JL & Felix CR (2000)** Characterization of an amylase produced by a *Trichoderma harzianum* isolate with antagonistic activity against *Crinipellis perniciosa*, the causal agent of witches broom of cocoa. *FEMS Microbiol. Lett.* **188** : 171-175.

**Deleyn F, Claeyssens M, Van Beeumen J & De Bruyne CK (1978)** Purification and properties of β-xylosidase from *Penicillium wortmanni Can. J. Biochem.* 56 : 43-50.

Delque-Bayer P, Vittori C, Sudaka P & Giudicelli J (1989) Purification and proprieties of neutral maltase from human granulocytes. *Biochem. J.* 263 : 647-52.

**Deshpande V, Lachke A, Mishra C, Kesbar S & Rao M (1986)** Mode of action and properties of xylanase and  $\beta$ -xylosidase from *Neurospora crassa*. *Biotechnol. Bioeng* **28**: 1832-1837.

**Dey S & Agarwal SO (1999)** Characterization of a thermostable α-amylase from a thermophilic *Streptomyces megasporus* strain SD12. *Ind. J. Biochem. Biophys.* **36** : 150-2.

Dey G, Palit S, Banerjee R & Maiti, BR (2002) Purification and characterization of maltooligosaccharide-forming amylase from *Bacillus circulans* GRS 313. J. Ind. Microbiol. *Biotechnol.* 28: 193-200.

Dion M, Fourage L, Hallet JN & Colas B (1999) Cloning and expression of a  $\beta$ -glycosidase gene from *Thermus thermophilus*. Sequence and biochemical characterization of the encoded enzyme. *Glycoconj. J.* 16: 27-37.

Dixon M & Webb EC (1979) Enzymes, 3rd Ed., London: Longman Group Limited pp. 72-75.

Drenth J, Jansonius JN, Koekoek R & Wolthers BG (1971) The structure of papain. Adv. *Protein Chem.* 25 : 79-115.

**Duedahi-Olesen L, Kragh KM & Zimmernann W (2000)** Purification and characterization of a malto-oligosaccharide forming amylase active at high pH from *Bacillus claussii* BT-21, *Carbohydr. Res.* **329** : 97-107.

**Dunn BM (1989)** Determination of protease mechanism. In proteolytic enzymes, a pratical approach. Beynon R.J., and Bond.J.S. (ed.) IRL Press, Oxford, New York, Tokyo. pp 57-81.

**Dunn BM & Fink AL (1984)** Cryoenzymology of porcine pepsin. *Biochemistry*. **23** : 5241-5247.

**Durant P, Lehn P, Callebaut I, Fabrega S, Henrissat B & Mornon JP (1997)** Active site motifs of lysosomal acid hydrolases : Invariant features of clan GH-A glycosyl hydrolases deduced from hydrophobic cluster analysis. *Glycobiol.* 7 : 277-284.

Durham DR, Stewart DB & Stellway EJ (1987) Novel alkaline and heat stable serine protease from alkalophilic *Bacillus sp.*strain GX 6638 J. *Bacteriol.* 169 : 2762-2768.

Egas MC, Da Costa MS, Cowan DA & Pires EM (1998) Extracellular  $\alpha$ -amylase from *Thermus filiformis* ork A2: Purification and biochemical characterization. *Extremophiles* 2 : 23-32.

Eutick ML, O'brien RW & Slaytor M (1978) Bacteria from the gut of Australian termites. *Appl. Environ. Microbiol.* 35 : 823-828.

Faridmoayer A & Scanan CH (2004) An improved purification procedure for soluble processing alpha-glucosidase. I from Saccharomyces cerevisea overesepnessing CWH41. *Prot. Exp. Purif.* 33: 11-18.

Finch P & Yoon J-H (1997) The effects of organic solvents on the synthesis of galactose disaccharides using  $\beta$ -galactosidases. *Carbohydr. Res.* **303** : 339-345.

Fortun Y & Colas B (1991) Lithium chloride effect on phenylethyl- $\beta$ -D-galactoside synthesis by *Aspergillus Oryzae*  $\beta$ -D-galactosidase in the presence of high lactose concentration. *Biotechnol. Lett.* 13 : 863-866.

**Fourage L (2000)** Caractérisation biochimique et structurale d'une β-glycosidase de *Thermus thermophilus* surexprimée chez *E. coli* Thèse Université Nantes

Fourage L, Helbert M, Nicolet P & Colas B (1999) Temperature dependence of the ultraviolet-visible spectra of ionized and Un-ionized forms of nitrophenol: consequence for the determination of enzymatic activities using nitrophenyl derivatives-A warning. *Anal Biochem.* 270: 184-185.

French JRJ & Bland DE (1975). Lignin degradation in the termites *Coptotermes lacteus* and *Nasutitermes exitiosus*. *Material and organismes*. 10 : 281-286.

Fujino T, Sasaki T, Ohmiya K & Shimizu (1990) Purification and properties of endo-1,4- $\beta$ -glucanase translated from a *Clostridium josui* gene in *Escherichia coli* Appl. Environ. Microbiol. 56 : 1175-1178.

Gacsynska M, Rock KL, Spies T & Goldberg AL (1994) Peptidase activities of proteasomes are differentially regulated by the major histocompatibility complex-encoded genes for LMP2 and LMP7. Proc. Natl. Acad., Sci., 91: 9213-9217.

**Garcia-Campayo V & Wood TM (1993)** Purification and characterization of a  $\beta$ -D-xylosidase from the anaerobic rumen fungus *Neocallimastix frontalis*. *Carbohydrate Res.* **242**: 229-45.

Garnier-Sillam E, Toutain G & Renoux J (1985) Formation de micro-agrégats dans les fecès de termites. C. R. Acad. Sc. Paris 301 : 213-218.

Garnier-Sillam E, Toutain F, Villemin G & Renoux J (1984) Mise en évidence lors du transit intestinal de la formation de différentes humines dans le bol alimentaire des termites. *Act. Coll. Insect. Soc.* 2 : 319-322.

Ghosh M & Nanda G (1993) Thermostability of  $\beta$ -xylosidase from Aspergillus sydowii MG49. FEBS Lett. 330 275-8.

Goyal A, Ghosh B & Eveleigh D (1991) Characteristics of fungal cellulases. *Bioresource*. *Technol.* 36 : 37-50.

Grasse PP (1984) Termitologia. II : Fondation des sociétés, construction. Ed. Masson Cie, Paris. 613pp.

Grasse PP (1982) Termitologia tome I: Anatomie, Physiologie, Reproduction des termites. Paris. Masson Ed., 676p.

Grasse PP (1970) Précis de zoologie I : Invertebrés. Ed. Masson Cie, Paris. 1400pp.

Grasse PP (1945) Recherches sur la biologie des termites champignonnistes (Macrotermitinae). Ann. Sc. Nat. Zool. 7: 115-146.

Grasse PP (1937) Recherches sur la systématique et la biologie des termites de l'Afrique occidentale française. Ann. Soc. Ent. France. 106 : 1-100.

Hagihara H, Igarashi K, Hayashi Y, Endo K, Ikawa-Kitayama k, Ozaki k, Kawai S & Ito S. (2001) Novel alpha-amylase that is highly resistant to chelating reagents and chemical

oxidants from the alkaliphilic *Bacillus* isolate KMS-K38. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 1744-50.

Han SJ, Yao YJ. & Kang HS (1995) Characterization of a bifunctional cellulase and its structural gene. The cell gene of *Bacillus sp* D04 has exo-and endo-glucanase activity. J. Biol. Chem. 270 (43): 26012-9.

Hangauer DG, Monzingo AF & Matthews BW (1984) An interactive computer graphics study of thermolysin-catalysed peptide cleavage and inhibition by N-carboxymethyl dipeptides. *Biochemistry.* 23: 5730-5741.

Hakamada Y, Koike K, Yoshimatsu T, Mori H, Kobuyashi T & Ito S (1997) Thermostable alkaline cellulase from an alKliphilic isolate, *Bacillus sp* KSM-S237 *Extremophiles* 1 : 151-6.

Harris GW, Pichersgill RW, Connerton I, Debrevie P, Touzel JP, Beton C & Peret S (1997) Structurel basis of the properties of an industrially relevant thermophilic xylanase. Proteins 29 : 77-86.

Hasnain S, Adeli K & Storer AC (1992) Purification and characterization of an extracellular thiol-containing serine proteinase from *Thermomyces lanuginosus*. Biochem. Cell. Biol. 70: 117-122.

Hayashi S, Ohno T, Ito M & Yokoi H. (2001) Purification and properties of the cellassociated beta-xylosidase from Aureobasidium. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 26: 276-9.

Hebraud M & Fevre M (1990) Purification and characterization of an extracellular  $\beta$ -xylosidase from the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **60** : 11-6.

Heim R (1942) Les champignons des termitières: nouveaux aspects d'un problème de biologie et de systématique générale. *Rev sci.* 80 : 69-80.

Henrissat B & Bairoch A (1993) New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J.* 293 : 781-788.

Henrissat B & Bairoch A (1996) Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem J* 316 : 695-696.

Henrissat B & Romeu A (1995) Families, superfamilies and subfamilies of glycosyl hydrolases. *Biochem J*.311: 350-351.

Henrissat B (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* 280: 309-316.

Henrissat B, Claeyssens M, Tomme P, Lemesle L & Mornon JP (1989) Cellulase families revealed by hydrophobic cluster analysis. *Gene* 81 : 83-95.

Hermann MC, Vrsanska M, Jurickova M, Hirsch J, Biely P & Kubiak CP (1997) The-Dxylosidase of *Trichoderma reesei* is a multifunctional  $\beta$ -D-xylan xylohydrolase *Biochem J*. 321 : 375-81.

Hofmann T & Fink AL (1984) Cryoenzymology of penicillopepsin. *Biochemistry*. 23 : 5247-5253.

Hofmann T, Dunn BM & Fink AL (1984) Mechanism of action of aspartyl proteinases. Biochemistry. 23 : 5253-5256.

Hogan ME, Schulz MW, Slaytor M, Czolij RT & O'Brien RW (1988) Compnents of termite and protozoal cellulases from the lower termite, *Coptotermes lacteus* Froggatt. *Insect. Biochem.* 18: 45-51.

Holla EW, Schudoh M, Weber A & Zulauf M (1992) Enzyme-catalysed synthesis of Oglycopeptide building blocks. *J Carbohydr Chem* 11: 659-663.

Holmes EW & O'Brien JS (1979) Purification and properties of acid  $\beta$ -galactosidase from feline liver. *Biochemistry.* 18 : 952 – 958.

Honigberg BM (1970) Protozoa associated with termites and their role in digestion. In: KRISHNA K and Weesner F. M, ed, Biology of tremites, Acad. Press, N.Y, london pp 1-36.

Huber RE, Gaunt MT, Sept RL & Babiak MJ (1983) Differences in the effects of pH on the hydrolytic and transgalactosylic reactions of  $\beta$ -galactosidases (*Escherichia coli*). Can. J. Biochem. Cell. Biol. 61: 198-206.

Hudson RC, Schofield LR, Coolbear T, Daniel RM & Morgan HW (1991) Purification and properties of an aryl  $\beta$ -xylosidase from a cellulolytic extreme thermophile expressed in *Escherichia coli*. Biochem. J. 273 : 645-50.

Hungate RE (1938) Studies on nutrition of zootermopsis. II. The relative importance of the termite and the protozoa in wood digestion. *Ecology* 19 : 1-25.

Hungate RE (1946) The symbiotic utilisation of cellulose. J. Elisha Mitchell. Sc. Soc. 62: 9-24.

Hurst PI, Nielsen J, Sullivan PA & Shepherd (1977) Purification and properties of a cellulase from Aspergillus niger. Biochem. J. 165: 33-41.

**Ibrahim-Granet O & Bertrand O (1996)** Separation of proteases: old and new approaches. J. Chromato. B. 684 : 239-263.

Iembo T, Da-silva R, Pagnocca FC & Gomez E (2002) Production, characterization and properties of beta-glucosidase and beta-xylosidase from a strain of Aureobasidium sp. Prikl. *Biokhim. Mikrobiol.* 38 : 639-43.

Igarashi K, Hatada Y, Hagihara H, Sacki K, Takaiwa M, Uemura T, Ara K, Ozaki K, Kawai S, Kobayashi T & Ito S (1998). Enzymatic properties of a novel liquefying  $\alpha$ -amylase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate and entire nucleotide and amino acid sequences.

Appl. Environ. Microbiol. 64: 3282-9.

Imai R, Hanada T, Takano Y, Morikawa S & Tanaka A (1989) Neutral alpha-glucosidase in granule fractions from guinea pig polymorphonuclear leukocytes: enzymic characterizetion and comparative studies with monoclonal antibodies. J. Biochem. 106 : 669-72.

Ishikawa K, Kimura S, Kanaya S, Morikawa K & Nakamura H (1993). Structural study of mutants of *Escherichia coli* ribonuclease HI with enhanced thermostability. *Protein Eng* 6: 85-91.

James MNG (1993) Convergence of active-center geometries among the proteolytic enzymes. In: Proteolysis and protein turnover (Bond, J.S. and Barrett, A.J., eds). London: Portland Press, pp. 1-8.

John M & Schinidt J (1979) Purification and some properties of five endo 1,4-beta-Dxylanases and a beta-D-xylosidase produced by a straisi of *Aspergillus niger*. Can. J. Biochim. 57: 125-34.

John M & Schmidt J (1988) Xylanase and  $\beta$ -xylosidase from *Trichoderma lignorum*. Methods in Enzymol. 160: 662-671.

John M, Schmidt B & Schmidt J (1979) Purification and some properties of fine endo-1,4- $\beta$ -D-xylanases and a  $\beta$ -D-xylosidase produced by a strain of Aspergillus niger. Can. J. Biochem. 57 : 125-34.

José L, Copa P & Broda P (1994) A *Phanaerochaete chrysosprium* beta-D-glucosidase/ $\beta$ -D-xylosidase with specificity for (1-3)- $\beta$ -D-glucan linkages *Carbohydr. Res.* 253 : 265-275.

Kamei A & Fujiyama O (1995) Characterization of partially purified alpha-glucosidase in the insoluble fraction of bovine crystalline Lens. *Biol. Pharm. Bull.* 18 : 1133-7.

Kanda I., Wakabayashi K & Nisizawa K (1980). Purification and properties of a lower molecular weight endo-cellulase from *Ipex lacteus (Polyporus tulipiferae)*. J. Biochem. (Tokyo) 87 : 1625-34.

Kaji A & Shimokawa K (1984) New exo-type arabinanase from *Erwinia carotovora* IAM 1024. *Agric. Biol. Chem.* 48 : 67-72.

Kaushal GP, Pastuszak I, Hatnaka K & Elbein AD (1990) Purification to homogeneity and properties of glucosidase II from mung bean seedlings and suspension cultured soybean. Cells. J. Biol. Chem. 265: 16271-9.

Kengen SW, Luesink EJ, Stams AJ & Zehnder AJ (1993) Purification and characterization of an extremely thermostable beta-glucosidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Eur. J. Biochem.* 213 : 305-12.

Kim CH (1995) Characterization and substrate specificity of an endo- $\beta$ -1,4-D-glucanase 1 (Avicelase 1) from an extracellular multienzyme complex of *Bacillus circulans*. Appl. Environ. Microbiol. 63 : 959-65.

Kimura T, Ito J, Kawans A, Makino T, Kindo H, Karita S, Sakka K & Ohmiya K (2000) Purification, characterization, and molecular cloning of acidophilic xylanase from *Penicillium sp* 40 *Biosci. Biotechnol. Biochem* 64 : 1230-7.

Kitamoto N, Go M, Shibayama T, Kimura T, Kito Y, Ohmiya K & Tsukagoshi N (1996). Molecular cloning, purification and characterization of two endo-1,4-β-glucanases from *Aspergillus oryzae* KBN616. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46** : 538-44

Kobayashi I, Tokuda M, Hashimoto H, Konda T, Nakano II & Kitahata S (2003) Purification and characterizetion of a new type of  $\alpha$ -glucosidase from *Paccilomyces lilacinus* that has transglucosylation activity to produce  $\alpha$ -1,3- and  $\alpha$ -1,2- linked oligosaccharides. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67 : 29-35.

Kobei O, Tanskul S, Oyama H & Noparatraraporn N (2004) Purification and characterization of alkaline serine proteinase from photosynthetic bacterium, *Rubrivivase gelatinosus*. *Biosci. Biotechnol.* **68** : 650-655.

Kormelink FJM, Gruppen H, Viëtor RJ & Voragen AGJ (1993) Mode of action of the xylan-degrading enzymes from *Aspergillus awamori* on alkali-extractable cereal arabinoxylans. *Carbohydr. Res.* 249 : 355-367.

Koshland DE (1953) Stereochemistry and the Mechanism of Enzymatic Reactions. *Biol Rev* 90: 1171-1202.

Kouamé LP (1994) Purification et études physico-chimiques de deux  $\beta$ -glycosidases du termite *Macrotermes subhyalinus (Termitidae, Macrotermitinae)* Thèse d'Université d'Abidjan.

Kouamé LP, Due AE, Niamke SL, Kouame AF & Kamenan A (2005) Synthèses enzymatiques de néoglucoconjugués catalysées par l'α-glucosidase purifié de la blatte Periplaneta americana (Linnaeus). Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 9 : 35-42.

Kouamé LP, Kouame AF, Niamke SL, Faulet BM & Kamenan A (2005) Biochemical and catalytic properties of two  $\beta$ -glycosidases purified from workers of the termite *Macrotermes* subhyalimus (Isoptera: Termitidae). Int. J.Insect. Sci. 25 : 103-113.

Kouamé LP, Niamke S, Diopoh J & Colas B (2001) Transglycosylation reactions by exoglycosidases from the termite *Macrotermes subhyalinus*. *Biotechnol. Lett.* 23 : 1575-1581.

Kovoor J (1967) Etude radiographique du transit intestinal chez un termite supérieur. *Exp.* 23 : 820.

Koyama I, Komine S, Yakushijin M, Hokari S & Komoda T (2000) Glycosylated salirary alpha-amylases are capable of maltotriose hydrolysis and glucose formation. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 26 : 553-60.

Koyama Y, Okamoto S & Furukawa K (1990) Cloning of  $\beta$ - and  $\alpha$ -galactosidase genes from an extreme thermophile, *Thermus* strain T2, and their expression in *Thermus* thermophilus HB27. Appl Environ Microbiol 56: 2251-2254.
Kubota M, Tsuji M, Wongchawalit J, Okuyama M, Mori H, Matsui H, Suranit R, Svasti J, Kinura A & Chiba S (2004) Localization of alpha-glucosidase I, II and III in organs of European honey bees, *Apis mellifera* L, and the origin of alpha-glucosidase in honey. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68 : 2346-52.

Kunst A, Draeger B & Ziegenhorn J (1984) Colorimetric methods with glucose oxidase and peroxidase. In: Bergmeyer HU, ed. Methods of Enzymatic Analysis, Vol. 6. pp. 178-185.Weinheim: Verlag Chemie.

Labudova I & Farkas V (1983) Multiple enzyme form in the cellulase system of *Trichoderma reesei* during its growth on cellulose. *Biochim. Biophys. Acta*, 744 : 135-140.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bactériophage T4. *Nature* (London) 227: 680-685.

Lama L, Calandrelli V, Gambacorta A & Nicolaus B (2004) Purification and characterization of thermostable xylanase and  $\beta$ -xylosidase by the thermophilic bacterium *Bacillus thermantarcticus. Res. Microbiol.* 155 : 283-9.

Lavrenova TP & Presnova VN (1990) Rat liver neutral alpha-glucosidase: isolation and Characterizetion. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 32 : 671-9.

Lefuji H, Chino M, Kato M & Limura Y (1996) Acid xylanase from yeast Cryptococcus sp. S-2: Purification, characterization, Cloning and sequencing. Biosci. Biotechnol. Biochem. 60: 1331-8.

Lepage MG (1981) L'impact des populations récoltantes de Macrotermes michaëlseni (Sjostedt) dans un écosystème semi-aride I : l'activité de récolte et son déterminisme. Insect.Soc 28 : 297-308.

Leparoux S & Colas B (1994) Digestive juice of *Achatina achatina* as a potential source of transglycosylation enzymes. *Int J Biochem* 26 : 247-254.

Leparoux S, Fortun Y & Colas B (1994) Synthesis of  $\beta$ -galactosyl-(hydroxy amino acid) derivatives using  $\beta$ -galactosidase activity of Achatina achatina digestive juice. Biotechnol Lett 16: 677-682.

Leparoux S, Padrines M, Fortun Y & Colas B (1996) O-glycosylation of dipeptides using β-galactosidase activity of *Achatina achatina* digestive juice. *Biotechnol Lett* 18 : 135-138.

Leparoux S, Padrines M, Placier G & Colas B (1997) Characterization of a strictly specific acid  $\beta$ -galactosidase from *Achatina achatina*. *Biochim Biophys Acta* 1336 : 525-532.

Li YK, Yao HJ & Pan IH (2000) Mechanistic study of  $\beta$ -xylosidase from *Trichoderma* koningii G-39. J. Biochem (Tokyo) 127 : 315-20.

Li YK, Yao HJ & Cho Y (2000) Effective induction, purification and characterization of *Trichoderma koningii* G-39  $\beta$ -xylosidase with high transferase activity. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 31: 119-25.

Lin SIB & Stutzenberger FJ (1995) Purification and characterization of the major beta-1,4endoglucanase from *Thermomonospora curvata*. J. Appl. Biotechnol. 79: 447-53.

Lineweaver H & Burk D (1934) The determination of enzyme dissociation constants. J Am Chem Soc 56: 658-666.

Lind SE (1995) In blood, principales and practice of hematology. Handin R.I., Lux S.E. and Stossel, T.P. (Eds), Lippincott, Philadelphia, PA. pp. 949-972.

Loomes LM, Senior BW & Kerr MA (1992) Proteinases of *Proteus* spp.: Purification, properties, and detection in urine of infected patients. *Infect. Immun.* 60 : 2267-2273.

Love DR, Fisher R & Bergquist PL (1988) Sequence structure and expression of a cloned  $\beta$ -glucosidase gene from an extreme thermophile. *Mol Gen Genet* 213: 84-92.

Löwe J, Stock D, Jap B Zwickl P, Baumeister W & Huber R (1995) Crystal structure of 20 S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Sci.* 268 : 533-539.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL & randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

Luthi E, Jasmat NB & Bergquist PL (1990) Xylanase from the extremely therrophilic bacterium *Caldocellum saccarolyticum* Overexpression of the gene in *Escherichia coli* and characterization of the product. Appl. *Environ. Microbiol.* 56 : 2677-83.

Ly HD & Withers SG (1999) Mutagenesis of glycosidases. Annu Rev Biochem 68: 487-522.

Mac Ewen SE, Slavor M & O'brien RW (1980) Cellobiase activity in three species of Australian termites. *Insect. Biochem*. 10: 563-567.

Mackenzie LF, Wang Q, Warren RAJ & Withers SG (1998) Glycosynthases : mutant glycosidases for oligosaccharides synthesis. J Am Chem Soc 120 : 5583-5584.

Maeda I, Shimohigashi Y, Kibara H & hno M (1996) Purification and characterization of a cellulase from the giant snail Achatina fulca. Biosci. Biotechnol. Biochem. 60: 122-4

Malhotra R, Noorwez SM & Satyanarayana T (2000) Production and partial characterization of thermostable and calcium-independent  $\alpha$ -amylase of an extreme thermophile *Bacillus thermooleovorans* NP-54 *Lett. Appl. Microbiol.* **31**: 378-84.

Mendiola-Olaya E, Valencia-Jimenez A, Valdes-Rodriguez S & Delano-labra A (2000) Digestive amylase from the larger grain borer, *Prostephanus truncatus* horn.*Comp. Biochem. Physiol B Biochem. Mol. Biol.* 126: 425-33

Martin MM (1991) The evolution of cellulose digestion in insects. Phil. Trans. R. Soc. Lond. 333 : 281-8.

Martin MM & Martin JS (1978) Cellulose digestion in the midgut of the fungus growing termite *Macrotermes natalensis*: The role of acquired digestive enzymes. *Science*. 199 : 1453-1455.

Martin MM & Martin JS (1979) The distribution and origins of cellulolytic enzymes of the higher termite *Macrotermes natalensis*. *Physiol Zool* 52 :11-21.

**Matoub M (1993)** La symbiose termite-champignon chez *Macrotermes bellicosus* (*Termitidae*, *Macrotermitinae*). Thesis d'Université Paris XII Val de Marne Paris.

Matsui H, Sasavi M, Takemasa E, Kaneta T & Chiber S (1984) Kinetic studies on the substrate specificity and active site of rabbit muscle acid  $\alpha$ -glucosidase. J. Biochem. 96 : 993-1004.

Matsuzaki H, Yamane K, Yamaguchi K, Nagata Y & Maruo B (1974). Hybrid  $\alpha$ -amylase produced by transformants of *Bacillus subtilis*. Purification and characterization of extracellular  $\alpha$ -amylases produced by parental strains and transformants. *Biochim. Biophys. Acta.* 365 : 248-258.

McCarter JD & Withers SG (1994). Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. Curr Opin Struct Biol 4: 885-892.

McGavin M & Forsberg CW (1988). Isolation and characterization of endoglucanases 1 and 2 from *Bacteroides succinogenes* 885. J. Bacteriol. 70 : 2914-22.

McIntosh LP, Hand G, Johnson PE, Joshi MD, Körner M, Plesniak LA, Ziser L, Wakarchuk WW & Withers SG (1996) The pKa of the general acid/ base carboxyl group of a glycosidase cycles during catalysis : a 13C-NMR study of *Bacillus circulans* xylanase. *Biochemistry.* 35 : 9958-9966.

McKerrow JH, Sun E, Rosenthal PJ & Bouvier J (1993) The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. Annu. Rev. Microbiol. 47: 821-853.

McLeod AM, Lindhorst T, Withers SG & Warren RAJ (1994). The acid/ base catalyst in the exoglucanase/ xylanase from *Cellulomonas fimi* is glutamic acid 127 : evidence from detailed kinetic studies of mutants. *Biochemistry*. 33 : 6371-6376.

Mendiola-Olaya E, Valencia-Jimenez A, Valdes-Rodriguez S, Delano-Trier J & Blancolabra A (2000). Digestive amylase from the larger grain borer, *Prostephanus truncatus Horn. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 126 : 425-33.

Mishra SC & Sen-Sarma PK (1980) Studies on deterioration of wood by insects. VI-Degradation and digestion of lignin in the digestive tract of termites. *Mater. Org.* 15 : 119-124.

**Mock WL & Stanford DJ (1996)** Arazoformyl dipeptide substrates for thermolysin. Confirmation of a reverse protonation catalytic mechanism. *Biochemistry*. **35** : 7369-7377.

Mora P & Rouland C (1994) Comparison of hydrolytic enzymes produced during growth on carbohydrate substrates by *Termitomyces* associates of *Pseudacanthotermes spiniger* and *Microtermes subhyalinus* (*Isoptera*: *Termitidae*). Sociobiol. 26: 258-262.

Nakao M, Nakayama T, Harada M, Kakudo A, Ikemoto H, Kobayashi S & Shibano Y (1994) Purification and Characterization of a *Bacillus Sp.* SAM 1606 thermostable  $\beta$ -glucosidase with transglucosylation activity. *Appl., Microbiol. Biotechnol.* 41: 337-43.

Nanmori T, Watanabe T, Shinke R, Kohno A & Kawwamura Y (1990) Purification and properties of thermostable and beta-xylosidase produced by a newly isolated *Bacillus* stearothermophilus strain. J. Bacteriol. 172: 6669-72.

Neurath H (1989) The diversity of proteolytic enzymes. In proteolytic enzymes, a pratical approach. Beynon R.J., and Bond.J.S. (Eds). IRL Press, Oxford, New York, Tokyo. pp. 1-13.

Ng TK & Zeikus JG (1981) Purification and characterization of an endoglucanases  $(1,4-\beta-D)$ -glucan glucanohydrolase) from *Clostridium thermocellum*. *Biochem. J.* 199: 341-50.

Nilsson KGI (1988) Enzymatic synthesis of oligosaccharides. Trends Biotechnol. 6: 256-546

Nilsson KGI & Scigelova M (1994) Synthesis of glycosylated serine and threonine derivatives employing glycosidases. *Biotechnol Lett* 16: 671-676.

Nilsson KGI (1997) Glycosidase-catalysed synthesis of di- and trisaccharide derivatives related to antigens involved in the hyperacute rejection of xenotransplants. *Tetrahedron Lett* **38**: 133-136.

Nirmala M. & Muralikrishna G (2003) Three alpha-amylases from malted finger millet: Purification and partial characterization. *Phytochemistry* 62: 21-30.

Nishimoto M, Kubota M, Tsuji M, Mori H, Kimura A, Matsui H & Chiba S (2001) Purification and substrate specificity of honeybee, *Apis mellifera* L., α-glucosidase III. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 5: 1610-6.

Nishitani K & Nevins DJ (1991) Glucuronoxylan xylanohydrolase, a unique xylanase with the requierement for appendant glucuronosyl units. J. Biol. Chem., 266: 6539-6543.

Noirot Ch (1952) Les soins et l'alimentation des jeunes chez les termites. Ann. Sci. Nat. Zool. 14<sup>è</sup> serie, 14 : 405-414.

Noirot CH (1955) Recherche sur le polymorphisme des termites supérieurs (*Termitidae*). Ann. Sci. Nat. Zool. 17 : 399-595.

Noirot Ch & Noirot-Timothee C (1969) The digestive system. In Biology of termites, K. Krishna et Weesner Ed. Academic Press, N. Y. and London.

Nystedt S, Emilsson K, Wahlestedt C & Sundelin J (1994) Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. *Proc. Natl. Acad., Sci.* 91: 9208-9212.

Oda Y, Iwamoto H, Hiromi K, Tonomura K (1993) Purification and characterizetion of alpha-glucosidase from *Torulaspora pretoriensis* YK-1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57: 1902-5.

Oda K, Tanskul S, Oyama H & Noparatnaraporn (2004) Purification and characterisation of alkaline serine proteinase from photosynthetic Bacterium, *Rubrivivan gelatinosus* KDDS1.*Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68: 650-655.

Ohkubo M, Miyagawa K, Osatomi K, Hara K, Nozaki Y & Ishihara T (2004) Purification and characterization of myofibril-bound serine protease from Lizard fish (*Sawida undosquamis*) muscle. *Comp. Biochem. Phys. Park B* 137: 139-150.

**Oikawa T, Tsukagawa Y& Soda K (1998)** Endo- $\beta$ -glucanase secreted by a psychrotrophic yeast: purification and characterization. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62** : 1751-6.

Pasti MB & Belli ML (1985) Cellulolitic activity of Actinomycetes isolated from tremite (*Termitidae*) gut. FEMS. *Microbiol. Lett.* 36: 107-12

Pasti MB, Pometo AL III, Nutti MP & Crawford DL (1990) Lignin-solubilizing ability of actinomycetes isolated from termite (*Termitidae*) gut. Appl. Environ. Microbiol. 56: 2213-18.

**Perez-Pomares F, Bautista V, Ferrer J, Pire C, Marhuenda-Egea FC & Bonete MJ** (2003) Alpha-amylase activity from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*. *Extremophiles* 7: 299-306.

Pelmont J (1995) Enzymes, catalyseurs du monde vivant. Ed. Grenoble Sciences, Paris 1033p.

Petch (1913) Termite and fungi a resume. Ann. Ray. Bot. Garden Peradeniya Ceylan 5: 303-341.

Petre J, Longin R & Millet J (1981) Purification and properties of an endo- $\beta$ -1,4-glucanase from *Clostridium thermocellum*. *Biochimie* 63: 629-39

**Placier G (1999)** Caractérisation d'une  $\beta$ -galactosidase acide d'*Achatina achatina* strictement spécifique du seul résidu  $\beta$ -D-galactoside. Application potentielle. Thèse Université de Nantes

Potus J & Drapron R (1997) Enzymes en Agro-alimentaires : les enzymes dans les industries de cuisson des céréales. Paris : Lavoisier Tec Doc. p. 380.

**Raasch C, Streit W, Shanzer J, Bidel M, Gosslar U & Liebel W (2000)** Thermotoga maritima Agl A, an extremely thermostable NAD<sup>+</sup>,  $Mn^{2+}$  and thiol dependent  $\alpha$ -glucosidase. Extremophiles 4 : 189-200.

Ratanakhanokchai K, Kyu KL & Tanticharoen M (1999) A novel class of protein from wheat which inhibits xylanases. *Biochem. J.* 338 :: 441-6.

Rawlings ND & Barrett AJ (1993) Evolutionary families of peptidases. *Biochem.* J. 290 : 205-218.

Rawlings ND & Barrett AJ (1994) Families of cysteine peptidases. In proteolytic enzymes : serine and cysteine peptidases. Methods in enzymology. Ed. Alan J. Barrett. vol 244 Academic Press, San Diego, New York, Tokyo, Toronto. pp. 461-486.

Rawlings ND & Barrett AJ (1995) Evolutionary families of metallopeptidases. Methods Enzymol. 248: 183-228.

**Ray RR & Nanda G (1997)** Production and characterization of xylanase from a beta – amylolytic of *Bacillus megaterium*. *Microbios*. **90** : 7-16.

**Rizzatti ACS, Jorge JA, Terenzi H, Rechia CGV & Polizeli MLT (2001)** Purification and properties of a thermostable extracellular  $\beta$ -D-xylosidase produced by a thermotolerant. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 156-160.

Rodionova NA, Tavobilov IM & Bezborodov AM (1983) Beta-xylosidase from Aspergillus niger 15: purification and properties. J. Appl. Biochem. 5: 300-12.

**Rouau X & Moreau D (1993)** Modification of some physicochemical properties of wheat flour pentosans by an enzyme complex recommended for baking. *Cereal Chem.*, **70** : 626-632.

Rouland C (1986) Contribution à l'étude des osidases digestives de plusieurs espèces de termites africains. Thèse d'Université, Paris XII Val-de-Marne, Paris.

Rouland C, Civas A, Renoux J & Petex F (1988) Purification and properties of cellulases from termite *Macrotermes mulleri* (*Termitidae*, *Macrotermitinae*) and its symbiotic fungus *Termitomyces sp. Comp. Biochem. Physio.* 91B : 449-458.

Rouland C, Lenoir F & Lepage M (1991) The role of the symbiotic fungus in the digestive metabolism of several species of fungus growing termites. *Comp. Biochem. Physiol.* 99A : 657-663.

Rouland C, Mora Ph. & Renoux J (1987) Essai d'interprétation de la symbiose digestive chez Macrotermes mulleri (Termitidae, Macrotermitinae) Act. Coll. U.I.E.IS. 4:111-118.

Rouland C, Renoux J & Petek (1988) Purification and properties of two xylanases from Macrotermes mulleri (Termitidae, Macrotermitinae) and its symbiotic fungus Termitomyces sp. Insect Biochem 18: 709-715.

Rouland C, Brauman A, Keleke S, Labat M, Mora P & Renoux J (1990) Endosymbiosis and exosymbiosis in the fungus-growing termites Microbiology of Poecilotherms. R. Lesel editor, Elsevier Science publishers. pp. 79

**Ruttersmith LD & Daniel RM (1993)** Thermostable β-glucosidase and beta-xylosidase from *Thermotoga sp.* Strain FJSS3-B1. *Biochem. Biophys. Acta* 13: 1156 : 167-72.

Saba BC (2001) Purification and characterization of an extracellular  $\beta$ -xylosidase from a newly isolated *Fusarium verticillioides*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 27 : 241-5.

**Saba BC (2003)** Purification and properties of an extracellular  $\beta$ -xylosidase from a newly isolated *Fusarium proliferatum*. *Bioresour*. *Technol*. **90** : 33-8.

Saha BC (2001) Xylanase from a newly isolated *Fusarium verticillioides* capable of utilizing corn fiber xylan *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 762-6.

Sakka K, Yoshikawa K. Kojima Y, Karita S. Ohmiya K & Shimada K (1993) Nucleotide sequence of the *Clostridium stercocarium* xylA gene encoding a bifunctional protein with  $\beta$ -D-xylosidase and  $\beta$ -L-arabinofuranosidase activities and properties of the translated product. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57 : 268-72.

Saul DJ, Williams LC, Reevers RA, Gibbs MD, Bergquist G (1995) Sequence and expression of a xylanase gene from the hyperthermophile *Thermotoga sp.* and characterization of the recombinant enzyme and its activity on kraft pulp. *Appl. Environ. Microbiol.* **61** : 4110-4113.

Schûlen M (2000) Protein engineering of cellulases. Biochim. Biophys. Acta 1543 : 239-252

Sekigahara T (1989) A galactanase from the symbiotic intestinal flagellates of termites and the coackroach, Cryptocerus punctulatus Biochem. J. 27: 281-293.

Shailubhai K, Pratta MA & Vijay IK (1987) Purification and characterization of Glucosidase 1 involved in N-linked glycoprotein processing in bovine mammary gland. *Biochem. J.* 247 : 555-62.

Shao W & Wiegel J (1992) Purification and characterization of a thermostable betaxylosidase from *Thermoanaerobacter ethanolicus*. J. Bacteriol. 174 : 5848-53.

Shin HY, Lee JH, Lee JY, Han YO, Han MJ & Kim DH (2003) Purification and characterization of ginsenoside Ra-hydrolyzing beta-D-xylosidase from *Bifidobacterium* breve K-110, a human intestinal anaerobic bacterium. *Biol. Pharm.bull.* 26: 1170-3.

Sinitsyn AP, Mitkevitch OV, Gusakov AV & Klyosov AA (1989) Decrease in reactivity and change of physicochemical parameters of cellulose in the course of enzymatic hydrolysis. *Carbohydr. Polym.*, 10: 1-14.

Sinner M & Drietrichs HH (1975) Enzymatische Hydrolyse von Laubholzxylanen. III-Kennzeichnung von fünf isolierten  $\beta$  1,4 Xylanasen. *Holzforsch.* 29 : 207-214.

Sinnott ML (1990) Catalytic mechanisms of enzymic glycosyl transfer. Chem Rev 90 : 1171-1202.

Slaytor M (1992) Cellulose digestion in termite and cockroaches: what role do symbionts play? Comp. Biochem. Physiol. 103B : 775-784.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ & Klenk DC (1985) Measurement of protein using Bicinchoninic acid. Anal Biochem 150: 76-85.

Soubrier F, Alhenc-Gelas F, Hubert C, Allegrini J, John M, Tregear G & orvol P (1988) wo putative centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. Proc. Natl. Sci. USA, 85 : 86-9390.

Stamford TL, Stamford NP, Coelho LC & Araujo JM (2001) Production and characterization of a thermostable  $\alpha$ -amylase from *Nocardiopsis sp.* endophyte of yam bean. *Bioresour. Technol.* 76: 137-41.

Suzuki Y, Nabiki M, Matuda M & Sawai T (1997) Bacillus thermoamyloliquefaciens KP1071  $\alpha$ -glucosidase II is a thermostable MG\540 000 homohexameric  $\alpha$ -glucosidase with both exo- $\alpha$ -1,6-glucosidase and oligo-1,6-glucosidase activities. Eur. J. Biochem. 245 : 129-36.

**Talamond P, Desseaux V, Moreau Y, Santimone M & Marchis-Mouren G (2002)** Isolation, characterization and inhibition by acarbose of the α-amylase from *Lactobacillus fermentum*: comparison with *Lactobacillus manihotivorans* and *Lactobacillus plantorum* amylases. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **133** : 351-60.

Tanaka Y, Aki T, Hidaka Y, Furuya Y, Kawamoto S, Shigeta S, Ono K & Suzuki O (2002) Purification and characterization of a novel fungal  $\beta$ -glucosidase from *Mortierella alliacea* with high starch hydrolytic activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66 : 2415-23

Taneja K, Gupta S & Kuhad RC (2002) Properties and application of apartially purified alkaline xylanase from an alkalophilic fungus *Aspergillus nidulans* KK-99. *Bioresour. Technol.* **85**: 39-42.

Taniguchi G (1986) Factor affecting the distribution and other fungi in the nests of *Macrotermitinae*. Soil Biochem. 19: 343-349

**Tashiro K. Iwamasa T, Kato H, Ogata S & Anai M (1986)** Purification and characterization two components of acid  $\alpha$ -glucosidase from pig liver. J. Biochem. **99**: 693-701.

**Ter-Kuile BH, Hrdy I, Sauchet LB & Muller M (2000)** Purification and specificity of two α-glucosidase isoforms of the protist *Trichomonas vaginalis*. J. Eukaryot. Microbial.45: 440-2.

Theberge M, Lacaze P, Shareck F, Morosoli R & Kluepfel D (1992) Purification and characterization of an endo-glucanase from *Streptomyces lividans* 66 and DNA sequence of the gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 : 815-20.

Thomas RJ (1987) Factors affecting the distribution and activity of fungi in the nests of *Macrotermitinae*. Soil. Biol. Biochem. 19: 343-349.

Tokuda G, Watanabe H, Matsumoto T & Noda H (1997) Cellulase digestion in the woodeating higher termite *Nasutermes takasagoensis*: distribution of cellulases and properties of endo-β-1,4-glucanase *Zoolog. Sci.* 14: 83-93

Toone EJ, Simon ES, Bednarski MD & Whitesides GM (1989) Enzyme-catalyzed synthesis of carbohydrates. *Tetrahedron* 45 : 5365-5422.

Torre-Bouscoulet ME, Lopez-Romero, Balcazar-Orozco R, Calvo-Mendez C & Flores-Crreon A (2004) Partial purification and Biochemical characteriz1979of a soluble  $\alpha$ glucosidase II-like activity from *Candida albicans.FEMS Microbiol Lett.* 236 : 123-8 **Totani K, Yasutake N, Ohi H, Murata T & Usui T (2001)** Enzymatic synthesis of aliphatic  $\beta$ -lactosides as mimic units of glycosphingolipids by use of *Trichoderma reesei* cellulase. *Arch. Biochem. Biophys.* **365** : 70-77.

**Trager W (1932)** A cellulase from the symbiotic intestinal flagellates of termites and the roach *Cryptocercus panctulatus*. *Biochem*. J. 26: 287-296.

**Trager W (1934)** The cultivation of cellulose digesting flagellate *Trichomonas termopsidis* and of certain other termite protozoa. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Woods hol* **66** : 182-190.

**Tsao CY, Pan YZ & Jiang ST (2003)** Purification and Characterization of amylases from small abalone (*Sulculus diversicolor aquatilis*) *J.Agric. Food Chem.* **51** : 1064-70.

**Turner NJ & Webberly MC (1991)** Stereospecific attachment of carbohydrates to amino acid derivatives using  $\beta$ -glucosidase and  $\beta$ -xylosidase. *J. Chem. Commun* **19** : 1345-1350

Urlaub H & Wober G (1978) Alpha-glucosidase a membrane-bound enzyme of alphaglucan metabolism in *Bacillus* amylolique faciens. Purification and partial characterization. *Biochim. Biophys. Acta* 522 : 161-73.

Van den Brock LA, Struijs K, Verdoes JC, Beldman G & Voragen AG (2003) Cloning and characterization of two  $\alpha$ -glucosidases from *Bifidobacterium adolescentis* DSM 2008. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61: 55-60.

Vetere A & Paoletti S (1996) High-yield synthesis of N-acetyllactosamine by regioselective transglycosylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 219: 6-13.

Volten HR & Gitlin LD (1995) In blood, principales and practice of hematology. Handin R.I., Lux S.E. and Stossel T.P, (Eds), , Lippincott, Philadelphia, PA., pp.496-501.

Walsh KA (1986) Methods in protein sequence analysis. Humana Press, Clifton, N.J., pp. 117-124.

Wang Q & Withers SG (1995) Substrate-assisted catalysis in glycosidases. J Am Chem Soc 117: 10137-10138.

Withers SG (1995) Enzymatic cleavage of glycoside : how does it happen ? *Pure Appl Chem* 67 : 1673-1682.

Yamin MA (1978) Axenic cultivation of the cellulolytic flagellate *Trichomitopsis* termopsidis from the termite zootermopsis. J. Protozool. 25: 535-538.

Yamin MA & Tager W (1979) Cellulolytic activity of axenically-cultivated termite flagellate *Trichomonas thermopsis*. J. General. Microbiol. 113: 417-420.

Yanai T & Sato (2001) Purification and characterization of an beta-D-xylosidase from candida utilis IFO 0639. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65 : 527-33.

**Yang S & Zhang S (1992)** Purification and characterization of α-glucosidase from an extreme thermophile *Thermus thermophilus*. Wei Sheng Wu Xue Bao **32** : 23-9.

Yoon JH & Ajisaka K (1996) The synthesis of galatopyranosyl derivatives with betagalactosidases of different origins. *Carbohydr. Res.* 292: 153-163.

Zanoelo FF, Polizeli Md Mde L, Terenzi HF & Jorge JA (2004) Purification and biochemical properties of a thermostable xylose-tolerant  $\beta$ -D-xylosidase from *Scytalidium thermophilum*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. **31**: 170-6.

Zoberi MH (1979) The ecology of some fungi in a termite hill. Mycologia 71: 537-545.

Identification de protéases du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) et de son champignon symbiotique *Termitomyces sp.* 

## **Caractérisation des exo-glycosidases thermophiles ou possédant une bonne activité de transglycosylation**

Les castres neutres du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) et son champignon symbiotique *Termitomyces sp.* contiennent une variété d'osidases et de protéases. L'activité protéasique originale est celle hydrolysant le substrat Met-*p*NA. Les exo-glycosidases thermophiles ou possèdant une bonne activité de transglycosylation ont été purifiées et caractérisées. Les  $\beta$ -xylosidases de l'ouvrier et de son champignon symbiotique sont acides et possèdent une spécificité stricte vis à vis du résidu xylosyle. Celle du champignon symbiotique est plus stable que la  $\beta$ -xylosidase de l'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur). Les deux enzymes sont donc différentes. La  $\beta$ -xylosidase de l'ouvrier du termite est soit sécrétée par lui même soit par ses bactéries symbiotiques. Elles sont des outils potentiels dans l'étude de la détermination des structures primaires des copules glucidiques des glycoconjugués.

L'ouvrier du termite *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) possède dans son tube digestif deux formes d' $\alpha$ -glucosidases acides mésophiles qui ont chacune une spécificité stricte vis à vis du résidu glucosyle. Les  $\alpha$ -Glc A et B hydrolysent préférentiellement les liaisons osidiques  $\alpha(1-4)$  et  $\alpha(1-2)$ . L' $\alpha$ -Glc B hydrolyse plus le maltotétraose que les autres maltodextrines tandis que l' $\alpha$ -Glc A préfère le maltose. Ces deux enzymes possèdent une bonne activité de transglycosylation. Les rendements de transglycosylation dans le cas de la synthèse de néoglucoconjugués peut atteindre 50 %, dépassant ainsi les taux couramment obtenus avec la plupart des exo-glycosidases (inférieur à 30 %); ce qui fait de ces enzymes des outils intéressants pour les réactions de synthèse de néoglucoconjugués ou de détermination des structures primaires des copules glucidiques des glycoconjugués.

Mots cles: Termite, *Macrotermes subhyalinus*, *Termitomyces sp*, protéase, glycosidase,  $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -xylosidase.