



CARACTERISATION DE LA B-GLYCOSIDASE DE LA BLATTE PERIPLANETA AMERICANA : APPLICATION A LA VALORISATION DES GLYCOALCALOÏDES DE LA POMME DE TERRE EN DECOMPOSITION

Grokore Yvonne Koffi

► To cite this version:

Grokore Yvonne Koffi. CARACTERISATION DE LA B-GLYCOSIDASE DE LA BLATTE PERIPLANETA AMERICANA : APPLICATION A LA VALORISATION DES GLYCOALCALOÏDES DE LA POMME DE TERRE EN DECOMPOSITION. Microbiologie et Parasitologie. INSA de Toulouse, 2016. Français. NNT : 2016ISAT0040 . tel-01687832

HAL Id: tel-01687832

<https://theses.hal.science/tel-01687832>

Submitted on 18 Jan 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Fédérale



Toulouse Midi-Pyrénées

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse (INSA Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Ingénieries microbienne et enzymatique

Présentée et soutenue par

KOFFI Grokoré Yvonne

Le : 10/11/2016

Titre :

**CARACTERISATION DE LA β -GLYCOSIDASE DE LA BLATTE
PERIPLANETA AMERICANA APPLICATION A LA VALORISATION DES
GLYCOALCALOÏDES DE LA POMME DE TERRE EN DECOMPOSITION**

JURY

Charles TELLIER-Professeur, Université de Nantes-Rapporteur
DOLS-LAFARGUE Marguerite-Professeur, École Nationale Supérieure de Chimie, de
Biologie et de Physique Bordeaux-Rapporteur
MAGALI Remaud-Siméon-Professeur, INSA Toulouse-Présidente
AMANI Georges-Professeur, Université Nangui-Abrogoua Abidjan-Examineur
Didier COMBES-Professeur, INSA Toulouse-Co-Directeur
DUE Ahipo Edmond-Maître de Conférences, Nangui-Abrogoua Abidjan-Co-Directeur

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP)

Directeur(s) de Thèse :

Didier COMBES- Professeur, INSA Toulouse
DUE Ahipo Edmond- Maître de Conférences, Nangui-Abrogoua Abidjan

Rapporteurs :

Charles TELLIER-Professeur, Université de Nantes
DOLS-LAFARGUE Marguerite-Professeur, ENSCBP Bordeaux



THÈSE

En vue de l'obtention du DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse (INSA Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Ingénieries microbienne et enzymatique

Présentée et soutenue par

KOFFI Grokoré Yvonne

Le :

Titre :

CARACTERISATION DE LA β -GLYCOSIDASE DE LA BLATTE PERIPLANETA AMERICANA APPLICATION A LA VALORISATION DES GLYCOALCALOÏDES DE LA POMME DE TERRE EN DECOMPOSITION

JURY

Charles TELLIER-Professeur, Université de Nantes-Rapporteur
DOLS-LAFARGUE Marguerite-Professeur, École Nationale Supérieure de Chimie, de
Biologie et de Physique Bordeaux-Rapporteur
MAGALI Remaud-Siméon-Professeur, INSA Toulouse-Présidente
AMANI Georges-Professeur, Université Nangui-Abrogoua Abidjan-Examinateur
Didier COMBES-Professeur, INSA Toulouse-Co-Directeur
DUE Ahipo Edmond-Maitre de Conférences, Nangui-Abrogoua Abidjan-Co-Directeur

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP)

Directeur(s) de Thèse :

Didier Combes- Professeur, INSA Toulouse

Duè Ahipo Edmond- Professeur, Université Abidjan

Rapporteurs :

Charles TELLIER-Professeur, Université de Nantes

DOLS-LAFARGUE Marguerite-Professeur, ENSCBP Bordeaux

NOM : KOFFI

Prénom : Grokoré Yvonne

Titre : Caractérisation de la β -glycosidase de la blatte *Periplaneta americana* application à la valorisation des glycoalcaloïdes de la pomme de terre en décomposition

Spécialité : Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries, **Filière :** Microbiologie et Biocatalyse industrielle

Année : 2016

Lieu : INSA de Toulouse

RESUME

La pomme de terre, tubercule très consommé de par le monde, appartient à la famille des Solanacées et produit des glycoalcaloïdes comme la plupart des végétaux de cette famille. Deux composés, en particulier, l' α -solanine et l' α -chaconine, sont produits en plus grande quantité lorsque le tubercule est exposé à la lumière et subit des dégradations. Ces molécules sont toxiques et peuvent représenter un danger pour le consommateur et des nuisances pour l'environnement. Dans le cadre de cette thèse, les teneurs en α -solanine et α -chaconine dans la chaire de pomme de terre verdie, en germination ou en décomposition retrouvées sur les marchés d'Abidjan (Côte d'Ivoire) ont été analysées. Les résultats ont montré que la chaire des pommes de terre verdies, en germination ou en décomposition contient des quantités élevées de solanine et de chaconine, dépassant 2 à 5 fois la limite recommandée. Les teneurs vont de 2581 ± 89 mg/kg à 5321 ± 487 mg/kg de matière sèche. Pour des raisons de sécurité sanitaire, ces pommes de terre décomposées doivent être prosrites de l'alimentation humaine. En revanche, la teneur élevée en glycoalcaloïdes dans ces pommes de terre représente une source de solanidine, un précurseur pour la synthèse d'hormones et de composés pharmacologiquement actifs, qui mérite d'être exploitée. Dans cet objectif, nous avons développé une méthode chimio-enzymatique simple, comprenant un traitement acide partiel suivi d'une hydrolyse enzymatique par la β -glycosidase de la blatte *Periplaneta americana* afin de détoxifier ces composés et produire la solanidine. Cette méthode a permis de produire $0,08 \mu\text{mol}$ de solanidine à partir d'un μmol de chaconine. L'enzyme (β -D-glucopyranoside glucohydrolase, E.C. 3.2.1.21) a été purifiée à partir de broyats de blattes entières et son gène a été isolé à partir d'une librairie génomique de cDNA. Elle appartient à la famille 1 des glycoside hydrolases (GH1). Le gène a été sous cloné dans un baculovirus et surexprimé dans les cellules d'insectes. L'enzyme recombinante purifiée présente une masse moléculaire de 55 kDa, un pH optimum d'hydrolyse de 4,6 et une température optimale de 55°C. Les paramètres cinétiques et thermodynamiques ont été également déterminés. La caractérisation fonctionnelle de cette enzyme a montré que la protéine recombinante purifiée hydrolyse à la fois des glycosyl β -glycosides et des aryl β -glycosides ; cette enzyme appartient donc à la première classe des β -glycosidases.

Mots clés : Glycoalcaloïdes ; α -chaconine; α solanine; β -glycosidase, *Periplaneta americana*; pomme de terre (*Solanum tuberosum* L)

Cette thèse a été préparée au laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (UMR CNRS 5504, UMR INRA 792) de l'INSA de Toulouse et au laboratoire de Biochimie et des Bioprocédés de l'université Nangui-Abrogoua

NOM : KOFFI

Prénom : Grokoré Yvonne

Titre : Caractérisation de la β -glycosidase de la blatte *Periplaneta americana* application à la valorisation des glycoalkaloïdes de la pomme de terre en décomposition

Spécialité: Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries, **Filière :** Microbiologie et Biocatalyse industrielle

Année : 2016

Lieu : INSA de Toulouse

Abstrat

A potato, the most widely consumed vegetables in the world belongs to the *Solanaceae* family and produce glycoalkaloids as most plants of this family. The principal glycoalkaloids in potato tubers, α -chaconine and α -solanine are produced in greater quantities when potato tubers are exposed to light and are subject to deteriorations. These compounds are toxic and can represent a real danger for the consumer and the environment where they are discharged during their degradation. In this work, the estimation of glycoalkaloids in the flesh of different types of decayed potatoes usually found in different market places of Abidjan (Ivory Coast) was evaluated. The results showed that turned green and also sprouting or rotting potato flesh contain high amounts of toxic solanine and chaconine, exceeding by 2 to 5-fold the recommended limit, and ranging from 2581 ± 89 mg/kg to 5321 ± 487 mg/kg of dry weight potato flesh. For safety consideration, these decayed potatoes should be systematically set aside. The accumulation of α -chaconine and solanine in potatoes can be seen as an attractive source of solanidine that is an important precursor for hormone synthesis and some pharmacologically active compounds. To this end, we proposed herein a simple chemo-enzymatic protocol comprising a partial acidic hydrolysis followed by an enzymatic treatment with the β -glycosidase from *Periplaneta americana* allowing the efficient conversion of α -chaconine to solanidine. This method has allowed to produce 0.08 μ mol of solanidine from one μ mol of chaconine. The enzyme (β -D-glucopyranoside glucohydrolase, E.C. 3.2.1.21) was purified from whole homogenates of cockroaches and the gene was isolated from a genomic library of cDNA. This enzyme belongs to the family 1 of glycoside-hydrolases (GH1) was cloned and expressed functionally in baculovirus-infected insect cells. The purified recombinant enzyme had a molecular mass of 55 kDa. The optimal pH was 4,6 while the optimum temperature is 55°C. Kinetic and thermodynamic parameters were also determined. Functional characterization through demonstrated that purified recombinant protein hydrolyzed hydrolyse both glycosyl β -glycosides and aryl β -glycosides. These results indicate that β -glycosidase from *Periplaneta americana* belongs to the first class of β -glycosidases.

Mots clés: Glycoalkaloïdes; α -chaconine; α solanine; β -glycosidase, *Periplaneta americana*; pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.)

Cette thèse a été préparée au laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (UMR CNRS 5504, UMR INRA 792) de l'INSA de Toulouse et au laboratoire de Biochimie et des Bioprocédés de l'Université Nangui-Abrogoua

Productions scientifiques

Articles publiés

Koffi, Y. G., Konan, H. K., Kouadio, J. P. E. N., Dabonné, S., Dué, E. A., & Kouamé, L. P. (2012). Purification and biochemical characterization of beta-glucosidase from cockroach *Periplaneta americana*, Journal of Animal & Plant Sciences, Vol. 13, Issue 2: 1747-1757

Grokoré Yvonne Koffi, Magali Remaud-Siméon, Due Ahipo Edmond and Didier Combes (2016). Isolation and chemoenzymatic treatment of glycoalkaloids from green, sprouting and rotting *Solanum tuberosum* potatoes for solanidine recovery. Journal of Food Chemistry Volume 220, 1 April 2017, Pages 257–265.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.014>

Article en cours de rédaction

Grokoré Yvonne Koffi, Magali Remaud-Siméon, Bordes florence, Due Ahipo Edmond and Didier Combes (2016). Molecular cloning, expression, and characterization of a recombinant β -glycosidase from cockroach *Periplaneta americana* produced in insect cells.

Communication par affiche

Grokoré Yvonne Koffi, Magali Remaud-Siméon, Due Ahipo Edmond and Didier Combes (2016). Glycoalkaloids contents of decayed potato *Solanum tuberosum* L. and chemo-enzymatic treatment for recovering solanidine from α -chaconine and α -solanine. *Journées Scientifiques de l'école Doctorale sevab*.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à exprimer ma reconnaissance et toute ma gratitude au Professeur Didier Combes, qui a accepté de diriger cette thèse. Merci à vous Professeur pour la confiance, le soutien permanent dont j'ai bénéficié de votre part durant ces travaux. Vos conseils avisés, votre disponibilité permanente à toutes mes sollicitations ont été un atout indéniable pour l'aboutissement de cette thèse.

Au Professeur Magali Remaud Simeon je ne trouverai jamais assez les mots pour vous traduire ma reconnaissance. Je vous dois ma thèse car en acceptant de m'accueillir dans votre équipe, vous m'avez offert l'opportunité de réaliser un rêve. En plus, de cette opportunité que vous m'avez donnée, vous n'avez pas hésité à vous impliquer dans mon travail. Malgré votre emploi du temps très chargé, vous m'avez toujours accordé du temps tout au long de cette thèse. Vous avez su orienter le travail chaque fois que des difficultés se sont présentées tant dans la phase d'exécution, dans la rédaction des articles et dans le manuscrit. Durant toutes ces étapes, vous m'avez offert la précieuse opportunité de grandir sur le plan scientifique. Sans votre précieuse aide mon travail n'aurait jamais pu être identique. Je resterais à jamais marqué par votre passion pour la recherche votre esprit de créativité votre acharnement au travail et surtout par votre humanisme dont j'ai été frappé pendant les moments délicats de ma vie privée. C'est vraiment une grâce pour moi d'avoir bénéficié de votre présence pendant ces périodes de ma vie, j'en suis profondément touché et j'en ai les larmes aux yeux chaque fois que je réalise tout ce que vous avez fait pour moi. Je vous en serais éternellement reconnaissante.

J'exprime également ma reconnaissance à mon co-directeur de thèse, le Professeur Dué Ahipo Edmond, ainsi qu'à tous les enseignants chercheurs de l'UFR STA, avec à leur tête le Professeur Bohoua Guichard, Doyen de l'UFR STA et le Professeur Patrice Kouamé, Doyen honoraire de cette Unité.

Je tiens à remercier profondément le Professeur Charles TELLIER Directeur de l'Unité Fonctionnalité et Ingénierie des Protéines UMR CNRS 6286 de l'Université de Nantes et le Professeur DOLS-LAFARGUE Marguerite, École Nationale Supérieure de Chimie, de Biologie et de Physique Bordeaux qui nous ont fait l'honneur de juger cette thèse en qualité de rapporteurs et membres du jury malgré leurs nombreuses occupations universitaires.

Qu'il me soit permis de remercier le Professeur AMANI N'guessan Georges, Professeur titulaire à l'Université Nangui-Abgrogoua (Abidjan) pour m'avoir fait l'honneur d'être membre de mon jury de thèse, pour ses conseils riches en enseignements et pour son aide précieuse à la recherche du financement de cette thèse. Merci Professeur pour votre aide indéniable aux jeunes étudiants de l'Université Nangui-Abgrogoua qui aspire à évoluer dans le monde de la recherche.

Je voudrais exprimer toute ma reconnaissance au Professeur Florence Bordes qui malgré ses nombreuses tâches universitaires, n'a jamais hésité à me consacrer une partie de son temps pour répondre à mes interminables sollicitations. Infiniment merci Florence pour ta disponibilité, ta gentillesse inégalable et pour l'aide très précieuse que tu m'as apporté dans la surexpression chez Yarrowia.

J'exprime ma gratitude à Pierre Escalier pour m'avoir formé sur les chaînes de purification AKTA et Nelly Montier pour m'avoir formé sur les chaînes analytiques et surtout pour son aide dans l'analyse des glycoalcaloïdes. Je tiens également à remercier tous le personnel permanent de l'équipe EAD1, Isabelle André, Alain Marty, Sophie Barbe, Gabrielle Veronese, Sophie Bozonnet, Sandrine Morel, Claire Dumon, Claire Moulis, Cédric Montanier, Sophie Duquesne, Régis Faure, Laurence Tarquis, Nathalie Caron, Gianluca Cioci, Sandra Pizzut.

Cette thèse a été réalisée au laboratoire d'ingénierie et des systèmes biologiques LISBP dans l'équipe EAD1 au sein duquel un travail scientifique, mais aussi des échanges amicaux ont été développés. Je remercie tous les membres non permanents de cette équipe encore présents ou partis vers d'autres horizons, avec qui j'ai fait un bout de chemin, je pense notamment à Thomas Martinez, merci Thomas pour avoir été là pour moi à tous les niveaux. Tu m'as soutenu dans les pénibles moments de la thèse; la recherche des résultats et surtout tu as contribué à mon intégration dans ce nouveau monde !!! merci pour tes conseils et surtout pour ton aide dans mes premiers pas de la bio mol. Merci également Bastien pour t'être imprégné dès le début dans mon travail je suis très sensible à l'aide que tu m'as apporté dans la construction de la banque d'ADNc et pour toutes les fois où j'ai eu à t'interrompre dans tes propres recherches pour me venir en aide. Merci à ma Lisa qui a été durant toutes ces années le rayon de soleil de cette équipe cette joie de vie débordante et communicative merci pour ces moments agréables et surtout pour ton soutien indéfectible. Je remercie également tous les thésards et post-Doctorants de cette dynamique équipe en particulier, Etienne, Yoann Brison, Yannick Malbert, Romain, Arnal Gregory, Marlène Villemin, Julien Duran, Florent, Alexandra, Marie Hoarau, Vincianne, Marion Claverie, Louise, Zhongpeng, Julien Robin, Guillaume, Manon... pour la bonne ambiance de travail, une entente et une entraide vraiment très appréciable !!! Que dire des filles avec qui j'ai partagé le même bureau pendant toutes ces quatre longues années: Marlène Cot, Marie-laure Desseroux, Hélène Tessier, Barbara, Marie, Coraline, Pauline, Haiyang, Eleni. Merci pour votre sympathie et tous les moments agréables que nous avons partagés ensemble on a rigolé comme des "folles". Je garderai toujours un très bon souvenir de cette belle ambiance.

Je ne saurai terminer sans une pensée spéciale pour les membres de ma famille, Ma mère YAO Amon Béatrice, Mon Père YAO N'guessan Josué et son épouse N'guessan Blanche tous mes frères et sœurs mes amis avec qui j'ai commencé les études en Côte d'Ivoire qui malgré la distance, m'ont toujours apporté leur soutien Armande Ayé, Anne-marie N'da, Eliane Gnagne, Chantal Soro, Gnanwa Mankambou, Feu Eric Tanon, Hermann Coulibaly, Marina Djeni, Arthur Zebré, Leaticia Manizan, Koumba Maï. Merci également à Modeste Kacou, Evelyne Touré, Guillaume Ohoussou, Donatus et Sekou Touré des amis connus à Toulouse.

SOMMAIRE.....	11
INTRODUCTION GENERALE.....	20
CHAPITRE I: SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	24
I-GENERALITE SUR LES BLATTES.....	24
1-1-Origine	24
1-2- Morphologie.....	24
1-3-Cycle de vie	25
1-4-Habitat	25
1-5-Alimentation et rôle écologique	26
1-6-Généralités sur la blatte <i>Periplaneta americana</i>	26
II- LES GLYCOSIDE HYDROLASES.....	27
2-1-Généralités	27
2-2-REACTIONS CATALYSEES PAR LES GLYCOSIDE HYDROLASES	28
2-1-1-Réactions d'hydrolyse.....	28
2-1-2-Réactions de synthèses enzymatiques de glycoconjugués	28
2-1-2-1-Réactions de synthèse	28
2-1-2-2-Réactions de transglycosylation	29
2-3-Mécanismes d'action	30
2-3-1-Mécanisme avec inversion de configuration.....	30
2-3-2-Mécanisme avec rétention de configuration	31
2-4-Classification des glycoside-hydrolases	33
2-4-1-Classification traditionnelle	33
2-4-2-Classification selon les similarités de séquences	34
2-4-2-1-Structures des β -glucosidases de la famille GH1	35
2-4-2-2-Classification des β -glucosidases selon la spécificité de substrat	36
2-4-2-3-Déterminants structuraux de la spécificité de substrats des β -glucosidases de la famille GH1	40
2-4-2-4-Fonction et utilisations des β -glucosidases	43
2-4-2-5-Rôle des β -glucosidases dans la modification des métabolites secondaires des plantes	
III-LES GLYCOALCALOÏDES DE LA POMME DE TERRE.....	45
3-1-La pomme de terre <i>Solanum tuberosum</i> (L.).....	45
3-2-Métabolites secondaires chez les végétaux	46

3-2-1-Les alcaloïdes.....	47
3-2-2-Les glycoalcaloïdes (GA) de la pomme de terre.....	48
3-2-2-1-Facteurs influençant les concentrations en GA de la pomme de terre.....	49
a-Le cultivar	49
b-Les conditions de culture et de récolte.....	50
c-La maturité.....	50
d-Les conditions de stockage	51
3-2-2-2-Toxicité des GA de la pomme de terre.....	51
3-2-2-3-Etude sur l'homme	53
3-2-2-4-Structure des GA	55
3-2-2-5-La biosynthèse des GA de la pomme de terre.....	57
 IV-RESUME DES TRAVAUX ANTERIEURS.....	59
 4-1-Résumé des travaux antérieurs effectués sur l'extraction et l'hydrolyse des	59
GA de la pomme de terre	
 4-2-Résumé des travaux antérieurs effectués sur la β -glycosidase de la blatte.....	61
<i>Periplaneta americana</i>	
 CHAPITRE II-MATERIEL ET METHODES.....	63
 I-MATERIEL	63
 1-1-Matériel biologique.....	63
1-1-1-Matériel animal.....	63
1-1-2-Matériel végétal	63
 1-2-Plasmides, vecteurs et souches.....	64
1-2-1-Souches bactériennes	64
1-2-2-Souche de levure.....	65
 1-3-Tampons et milieux de culture	69
1-3-1-Solutions et tampons.....	69
1-3-2-Milieux de culture.....	70
1-3-2-1-Milieux de culture pour E.coli.....	70
1-3-2-2-Milieux de culture pour Yarrowia lipolytica	72
 II-METHODE	72
 2-1-Techniques de biologie moléculaire.....	72
2-1-1-Construction d'une banque d'ADNc	72
2-1-1-1-Extraction des ARN totaux	73
2-1-1-2-Purification des ARNm	73
2-1-1-3-Contrôle de qualité des acides nucléiques	74
2-1-1-4-Synthèse des ADNc simple brin.....	74
2-1-1-5-Amplification des ADNc par LD-PCR	75

2-1-1-6-Digestion par la protéinase K et purification de l'ADN	75
2-1-1-7-Digestion par Sfi I	76
2-1-1-8-Fractionnement des ADNc sur colonne Chroma 400	76
2-1-1-9-Ligation dans le vecteur TriplEx2	77
2-1-1-10-Encapsidation des vecteurs recombinants	78
2-1-1-11-Préparation des cellules XL1-Blue compétentes pour.....	79
l'étalement de la banque	
2-1-1-12-Titrage de la banque	79
2-1-1-13-Détermination du pourcentage de clones recombinant (screening bleu/blanc)	80
2-1-1-14-Amplification de la banque	80
2-1-1-15-Contrôle de la taille moyenne des inserts par PCR	81
2-1-1-16-Criblage de la banque d'ADNc	81
2-1-1-16-1-Criblage primaire.....	81
2-1-1-17-2-Criblage secondaire	81
2-1-1-18-Conversion des phages en plasmides par le système cre-lox	82
2-1-2-Sous clonage du gène codant pour la β -glycosidase et production.....	82
de la protéine recombinante	
2-1-2-1-Essai de production chez <i>E.coli</i>	83
2-1-2-1-1-Amplification du fragment d'ADNc par PCR	83
2-1-2-1-2-Purification des produits de PCR.....	84
2-1-2-1-3-Double digestion du vecteur et de l'insert par les	84
enzymes de restriction	
2-1-2-1-4-Extraction d'ADN à partir du gel d'agarose.....	84
2-1-2-1-5-Déphosphorylation du vecteur.....	85
2-1-2-1-6-Ligation	85
2-1-2-1-7-Préparation des cellules compétentes d' <i>E. coli</i> TOP10/ <i>E.coli</i> Dh5 α	85
2-1-2-1-8-Transformation des produits de la ligation	86
2-1-2-1-9-Extraction d'ADN plasmidique	86
2-1-2-1-10-Essai de production de la β -glycosidase chez <i>E.coli</i>	86
2-1-2-2-Essai de production chez la levure <i>Yarrowia lipolytica</i>	87
2-1-2-2-1-Amplification du fragment d'ADNc par PCR	87
2-1-2-2-2-Préparation des cellules compétentes de <i>Yarrowia lipolytica</i> JMY1212	88
2-1-2-2-3-Transformation des produits de la ligation	89
2-1-2-2-4-Essai de Production	89
2-1-2-5-Production en cellules d'insectes	89
a)-Séquence issus de la banque d'ADNc BetaGluc1	91
b) Gène synthétique réalisé à partir de la séquence stockée dans NCBI BetaGluc 2	92
2-2-Techniques de Biochimie	93
2-2-1-Purification et caractérisation de la β -glycosidase native de la blatte.....	93
<i>Periplaneta americana</i>	93
2-2-1-1-Préparation de l'extrait brut enzymatique	94
2-2-1-2-Dosage des activités pNP-glycosidasiques.....	94
2-2-1-3-Dosage des activités oligo et polysaccharidasique.....	94
a-Préparation du réactif glucose oxydase-péroxydase	94
b-Technique de dosage.....	95
2-2-1-4-Dosage des protéines.....	95
2-2-1-5-Technique de purification de la protéine native	96
2-2-1-5-1-Purification par chromatographie d'échange d'anions sur colonne Q sepharose Fast Flow....	96
2-2-1-5-2-Chromatographie d'exclusion moléculaire sur le gel Sephacryl S-100 HR	96

2-2-1-5-3-Chromatographie d'interaction hydrophobe sur gel Phényl-Sepharose CL-4B.....	97
2-2-1-5-4-Electrophorèse en SDS-page	97
2-2-1-6-Etude des caractéristiques physico-chimiques des protéines	97
2-2-1-6-1-Détermination du poids moléculaire de la protéine native par filtration sur gel de Sephacryl S-200 HR.....	97
2-2-1-6-2-Influence du pH sur l'activité β -glucosidase	98
2-2-1-6-2-1-pH optimum d'hydrolyse	98
2-2-1-6-2-2-Stabilité au pH	98
2-2-1-6-3-Influence de la température sur l'activité β -glucosidase	98
2-2-1-6-3-1-Température optimale d'hydrolyse	98
2-2-1-6-3-2-Etude de la stabilité thermique ou thermostabilité	99
2-2-1-6-3-2-1-Inactivation thermique	99
2-2-1-6-3-2-2-Dénaturation thermique.....	101
2-2-1-6-3-3-Influence de quelques agents chimiques.....	101
2-2-1-6-3-4-Effet des solvants organiques	101
2-2-1-6-3-5-Etude de la spécificité de substrat.....	101
2-2-1-6-3-6-Détermination de K_M et V_{max}	102
2-3-Techniques analytiques	102
2-3-1-Analyse protéomique de la protéine native.....	102
2-3-1-1-Préparation de l'échantillon	102
2-3-1-2-Les étapes de lavages	102
2-3-1-3-Réduction-alkylation.....	102
2-3-1-4-Digestion trypsique	103
2-3-1-5-Extraction des peptides	103
2-3-1-6-Analyse protéomique par spectrométrie de masse Q-TOF.....	103
2-3-1-7-Séquençage de novo.....	103
2-3-1-8-Séquençage N-terminal par la dégradation d'Edman.....	104
2-3-2-Analyse des glycoalcaloïdes (GA) de la pomme de terre <i>Solanum tuberosum</i>	104
2-3-2-1-Extraction des glycoalcaloïdes (GA).....	104
2-3-2-1-1-Préparation des échantillons	105
2-3-2-1-2-Préparation des tampons et des solvants.....	105
2-3-2-1-3-Extraction des glycoalcaloïdes (GA).....	106
2-3-2-1-4-Purification sur colonne SPE.....	106
2-3-2-2-Analyse HPLC	106
2-3-2-3-Hydrolyse chimio-enzymatique des composés	107
a)-Hydrolyse partielle	107
b)-Hydrolyse enzymatique.....	107
2-3-2-4-Analyse HPLC-ESI/MS	107
CHAPITRE III : CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DE LA BETA-GLYCOSIDASE NATIVE DE LA BLATTE <i>PERIPLANETA AMERICANA</i>	109
1-INTRODUCTION	109
2-RESULTATS	111
2-1-Isolement et purification de la β-glycoside hydrolase de la blatte <i>Periplaneta americana</i>	111

2-2-Caractéristiques physico-chimiques de la β-glycosidase de la blatte <i>Periplaneta americana</i>.....	114
2-2-1-Poids moléculaire de la β -glycosidase	114
2-2-2-pH optimum et stabilité au pH	115
2-2-3-Influence de la température sur l'activité de la β -glycosidase	115
2-2-3-1-Température optimale d'hydrolyse	116
2-2-3-2-Dénaturation thermique.....	116
2-2-3-3-Inactivation thermique	117
2-2-4-Influence des agents chimiques sur l'activité de la β -glycosidase de la blatte <i>Periplaneta americana</i>	117
2-2-5-Spécificité de substrat	118
2-3-Séquençage de la β-glycosidase par la spectrométrie de masse LC- MS/MS.....	118
2-3-1-Optimisation du protocole de purification pour le séquençage	118
2-3-2-séquençage de la protéine	119
 CHAPITRE IV: CONSTRUCTION D'UNE BANQUE D'ADNC, CLONAGE DU GENE CODANT POUR LA BETA-GLYCOSIDASE DE LA BLATTE <i>PERIPLANETA AMERICANA</i> PRODUCTION ET CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DE LA PROTEINE RECOMBINANTE.....	126
 1-INTRODUCTION	126
 2-RESULTATS	128
 2-1-Construction d'une banque d'ADNc à partir de l'ARNt de la blatte.....	128
 <i>Periplaneta americana</i>	128
2-1-1-Extraction d'ARN total.....	128
2-1-2-Extraction de l'ARNm à partir de l'ARN total	129
2-1-3-Synthèse du 1 ^{er} brin ADNc et amplification par LD-PCR	129
2-1-4-Fractionnement des ADNc.....	130
2-1-5-Titrage de la banque non amplifiée.....	131
2-1-6-Titrage de la banque amplifiée.....	132
2-1-7-Criblage de la banque d'ADNc.....	133
2-1-8-Excision des plasmides	133
 2-2-Sous-clonage de l'ADNc codant pour la β-glycosidase de la blatte <i>Periplaneta americana</i>, puis essai de production de la protéine recombinante.....	135
2-2-1-Chez <i>E.coli</i>	135
2-2-1-1-PCR réalisée à partir de la banque d'ADNc	135
2-2-1-2-Essai de production de la protéine recombinante dans différentes souches d' <i>E.coli</i>	136
2-2-2-Chez <i>Yarrowia lipolytica</i>	136
2-2-2-1-PCR réalisée à partir de la banque d'ADNc	137
2-2-2-2-Vérification de la présence des inserts	137
2-2-3-Production en cellules d'insectes	138
2-2-3-1-Production du gène codant pour la β -glycosidase issus de la banque de d'ADNc (BetaGluc1) ...	139
2-2-3-1-1-Génération du stock de virus P1	139
2-2-3-1-2-Analyse de l'expression de la BetaGluc 1 pendant la génération du stock P1	139
2-2-3-1-3-Amplification et surexpression des virus recombinants	140

2-2-3-1-4-Test de Purification.....	141
2-2-3-2-Production du gène codant pour la β -glycosidase à partir du gène synthétique (BetaGluc 2).....	141
2-2-3-2-1-Clonage du gène dans le vecteur pATXBac1 puis génération du stock de virus P1.....	141
2-2-3-2-2-Amplification et surexpression du virus recombinant	142
2-2-3-1-3-Test de Purification.....	143
2-3-Caractérisation des différentes protéines recombinantes produites.....	143
2-3-1-Effet du pH	143
2-3-1-1-pH optimum	143
2-3-1-2-Stabilité au pH.....	144
2-3-2-Effet de la température.....	145
2-3-2-1-Température optimale d'activité	145
2-3-2-2-Dénaturation thermique.....	145
2-3-2-3- Inactivation thermique	146
2-3-3-Effet de quelques effecteurs.....	146
2-3-4-Effet des solvants organiques.....	147
2-3-5-Etude de la spécificité de substrat.....	148
2-3-6-Paramètres cinétiques KM et Vmax des protéines.....	150
 CHAPITRE V : ÉTUDE CINÉTIQUE ET THERMODYNAMIQUE DE LA BETA-GLYCOSIDASE AU COURS DE L'INACTIVATION THERMIQUE	157
1-INTRODUCTION	157
2-RESULTATS	159
2-1-Paramètres cinétiques de la β-glycosidase native et des protéines.....	159
recombinantes au cours de l'inactivation thermique	159
2-1-1-Cinétique d'inactivation thermique.....	159
2-1-2-Constantes de vitesse k	160
2-1-3-Valeurs des coefficients de température Q_{10} β -glycosidase native et des protéines recombinantes au cours de l'inactivation thermique	161
2-1-4-Valeurs de D, Z et Ea au cours de l'inactivation thermique	162
2-1-5-Ln k en fonction de l'inverse de la température d'inactivation.....	164
2-2-Analyse des paramètres thermodynamiques.....	165
 CHAPITRE IV: TENEUR EN GLYCOALCALOÏDES (ALPHA-CHACONINE ET ALPHA-SOLANINE) DE TROIS TYPES DE LA POMME DE TERRE <i>SOLANUM TUBEROSUM</i> L. GÉNÉRALEMENT RETROUVÉES SUR LES MARCHÉS D'ABIDJAN (CÔTE D'IVOIRE) ET TRAITEMENT CHIMIO-ENZYMATIQUE POUR LA PRODUCTION DE LA SOLANIDINE.....	171
1-INTRODUCTION	171
2-RESULTATS	173

2-1-Identification et analyse des glycoalcaloïdes (α-solanine et α-chaconine) extraits à partir des trois types de pommes de terre utilisées dans cette étude	173
2-2-Identification et analyse des composés formés lors de l'hydrolyse acide partielle de l'α-solanine et de l'α-chaconine.....	177
2-3-Hydrolyse totale de la γ-chaconine par la β-glycosidase acidophile de la blatte <i>Periplaneta americana</i>	182
CONCLUSION GENERALE	190
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	194

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Description anatomique d'un mâle adulte	27
Figure 2: Schéma général de la réaction d'hydrolyse catalysée par les glycosidases.....	28
Figure 3: Schéma général de la réaction de synthèse catalysée par les glycosidases.....	29
Figure 4: Schéma global de la compétition entre transglycosylation	29
Figure 5: Mécanisme de réaction des glycosidases agissant par inversion de configuration	31
Figure 6: Mécanisme de réaction des glycosidases agissant par rétention de	32
Figure 7: Modèle général de l'état de transition.....	33
Figure 8: Structure et résidus d'acides aminés communs aux GH1	36
Figure 9 : structure de quelques substrats hydrolysés par les β -glycosidases	39
Figure 10: Structure du site actif de quelques β -glucosidases de la famille des GH1 en fonction de leur spécificité de substrat	42
Figure 11: Hydrolyse de la dhurrine.....	44
Figure 12: Hydrolyse de la simmondsine.....	45
Figure 13: Structure de l' α -solanine et de l' α -chaconine	48
Figure 14: Glycoalcaloïdes de la pomme de terre <i>Solanum tuberosum</i>	56
Figure 15: Différentes voies et métabolites impliqués dans la biosynthèse des GA de la pomme de terre <i>Solanum tuberosum</i>	57
Figure 16: Biosynthèse des glycoalcaloïdes.....	58
Figure 17: Etapes intervenant dans la synthèse des GA	59
Figure 18: Photographie des différents types de pommes de terre utilisés dans cette étude	63
Figure 19: Excision du plasmide pTriplEx2 à partir du vecteur phagique λ TriplEx2.....	66
Figure 20: Carte physique du pTriplex2 (Clontech).....	67
Figure 21: Carte physique du plasmide pET-28a (Novagen).....	68
Figure 22: Carte de restriction du plasmide JMP60	69
Figure 23: Alignement de séquence entre la séquence issu de notre banque d'ADNc et la séquence stockée dans la banque de donnée NCBI.....	91
Figure 24: Construction pATXbac1-BetaGluc 1.....	92
Figure 25: Profil de la chromatographie d'échange d'anions sur le gel DEAE-Sepharose de la β - glycosidase de la blatte <i>Periplaneta americana</i>	112
Figure 26: Profil de la chromatographie d'exclusion moléculaire sur le gel Sephacryl S-100 HR de la β -glycosidase de la blatte <i>Periplaneta americana</i>	112
Figure 27: Profil chromatographique d'interaction hydrophobe sur gel Phényl-.....	113
Figure 28: β -glycosidase purifiée de la blatte <i>Periplaneta americana</i>	114
Figure 29: Poids moléculaire de la β -glycosidase de la blatte <i>Periplaneta americana</i> déterminé à partir du volume d'élution.....	114
Figure 30: pH optimum de la β -glycosidase de la blatte <i>Periplaneta americana</i>	115
Figure 31: Stabilité au pH de la β -glycosidase de la blatte <i>Periplaneta americana</i>	115
Figure 32: Température optimale d'hydrolyse de la β -glycosidase de la blatte <i>Periplaneta americana</i>	116
Figure 33: Dénaturation thermique de la β -glycosidase de la blatte <i>Periplaneta americana</i>	116
Figure 34: Inactivation thermique à 37 et 55 °C de la β -glycosidase purifiée	117
Figure 35: Influence des agents chimiques sur l'activité catalytique de la β -glycosidase de la blatte <i>Periplaneta americana</i>	117

Figure 36: Electrophorèse en SDS-PAGE des différentes fractions obtenues au cours de la purification optimisée	119
Figure 37: Séparation sur le gel d'électrophorèse après concentration de l'extrait purifié sur millipore en vue du séquençage de la protéine	119
Figure 38:Électrophorèse d'ARN total extrait de la blatte <i>Periplaneta americana</i>	128
Figure 39: ARNm extrait à partir de l'ARNt.....	129
Figure 40: Électrophorèse sur gel d'agarose des produits de la RT-PCR avec 20 cycles de l'ARNm	130
Figure 41: Électrophorèse sur gel d'agarose des différentes fractions après fractionnement des ADNc sur colonne	130
Figure 42: Titrage de la banque non-amplifiée	131
Figure 43: Titrage de la banque amplifiée.....	132
Figure 44: Criblage de la banque d'ADNc	133
Figure 45: Séquence nucléotidique et en acides aminés correspondant au gène de la β -glycosidase isolé à partir de la banque de ADNc	134
Figure 46: PCR à partir de la banque d'ADNc et double digestion du vecteur et des inserts	135
Figure 47: Essai de production de la protéine recombinante dans différentes souches d' <i>E.coli</i>	136
Figure 48: PCR à partir de la banque d'ADNc.....	137
Figure 49: Vecteur et inserts purifiés après la double digestion.....	137
Figure 50: Vérification de la présence des inserts.....	138
Figure 51: Analyse de l'expression de la BetaGluc 2 pendant la génération du stock P1	139
Figure 52: Analyse de l'expression de la BetaGluc1 pendant la génération du stock P2	140
Figure 53: Test de purification	141
Figure 54: Analyse de l'expression de la BetaGluc 2 pendant la génération du stock P1	142
Figure 55: Analyse de l'expression de la BetaGluc pendant la génération du stock P2	142
Figure 56: Purification de la BetaGluc2.....	143
Figure 57: Influence du pH sur l'activité des protéines recombinantes	144
Figure 58: Stabilité au pH des protéines recombinantes	144
Figure 59: Influence de la température sur l'activité des protéines recombinantes.....	145
Figure 60: Etude de la Dénaturation thermique des protéines.....	145
Figure 61: Etude de l'inactivation thermique des protéines	146
Figure 62: Effet de quelques effecteurs sur l'activité des protéines.....	147
Figure 63: Effet de quelques solvants organiques sur l'activité des protéines	148
Figure 64: Courbe d'inactivation thermique de la β -glycosidase native	160
Figure 65: Influence de la température sur les valeurs de D au cours de l'inactivation.....	164
Figure 66: Influence de la température d'inactivation sur la constante de vitesse (k)	165
Figure 67: Chromatogramme HPLC des différents standards.....	173
Figure 68: Chromatogramme HPLC et spectre de masse en ion electrospray positive des principaux GA de la pomme de terre en décomposition	174
Figure 69: Chromatogramme HPLC et spectre de masse en ion electrospray positive des principaux GA de la pomme de terre verdie.....	175
Figure 70: Chromatogramme HPLC et spectre de masse en ion electrospray positive des principaux GA de la pomme de terre en germination.....	176
Figure 71: Produits intermédiaires obtenus lors de l'hydrolyse des chaînes latérales des α -trisaccharides chaconine et solanine jusqu'à l'aglycone la solanidine	178

Figure 72: Chromatogramme HPLC et spectre de masse en ion electrospray positive des principaux composés formés lors de l'hydrolyse acide partielle des GA	180
Figure 73: Chromatogramme HPLC de l'hydrolyse enzymatique des hydrolysats de l' α -chaconine et de l' α -solanine par la β -glycosidase acidophile de la blatte <i>Periplaneta americana</i>	181
Figure 74: Chromatogramme HPLC de la cinétique d'hydrolyse enzymatique de hydrolysats de l' α -chaconine par la β -glycosidase.....	182
Figure 75: Chromatogramme HPLC des principaux composés formés lors de l'hydrolyse acide partielle de l' α -chaconine.....	183
Figure 76: Chromatogramme HPLC de la solanidine (temps de retention 37,5 min).....	184
Figure 77: Hydrolyse totale de la γ -chaconine par la β -glycosidase acidophile de la blatte <i>Periplaneta americana</i>	184

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Bilan global de la purification de la β -glycosidase de la blatte <i>Periplaneta americana</i>	113
Tableau II: Spécificité d'hydrolyse des substrats naturels et synthétiques de la β - glycosidase de la blatte <i>Periplaneta americana</i>	118
Tableau III: Séquençage interne de la β -glycosidase par digestion trypsique et analyse des peptides par spectrométrie de masse LC-MS/MS.....	120
Tableau IV: Titrage de la banque non amplifiée	131
Tableau V: Etude de la spécificité de substrat.....	149
Tableau VI: Détermination des paramètres cinétiques K_M , V_{max} et V_{max}/K_M des protéines.....	150
Tableau VII: Constantes de vitesse et demi-vies de la β -glycosidase native et des protéines recombinantes au cours de l'inactivation thermique	161
Tableau VIII: Coefficients de température (Q_{10}) au cours de l'inactivation.....	162
Tableau IX: Valeurs de D , Z et E_a au cours de l'inactivation thermique.....	163
Tableau X: Paramètres thermodynamiques.....	166
Tableau XI: Contenu en GA (α -solanine et α -chaconine) des trois types de pommes de terre (en mg/kg de matière sèche)	177

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Les plantes possèdent des métabolites dits « secondaires » par opposition aux métabolites primaires que sont les protéines, les glucides et les lipides. Ces composés diffèrent en fonction des espèces et, bien que leurs rôles soient encore mal connus, il est cependant clair qu'ils interviennent dans les relations qu'entretient la plante avec les organismes vivants qui l'entourent. Ils sont probablement des éléments essentiels de la coévolution des plantes avec les organismes vivants, tels que parasites, pathogènes et prédateurs, mais aussi pollinisateurs et disséminateurs. Ces différentes relations ont donné lieu à une extrême diversification des composés secondaires. On peut classer les métabolites secondaires en plusieurs grands groupes: parmi ceux-ci, les composés phénoliques, les terpènes et stéroïdes et les composés azotés dont les alcaloïdes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine. Si leur rôle écologique reste encore à préciser, leur utilisation par l'homme dans de nombreuses préparations thérapeutiques est très largement répandue. En effet, ces substances toxiques possèdent, parfois à faible dose, des propriétés médicamenteuses et peuvent être utilisées à des fins thérapeutiques (**Vronen 2003**). Les molécules naturelles responsables de ces activités servent aujourd'hui de modèle à la créativité des chimistes et biochimistes qui tentent d'en améliorer les activités ou d'en diminuer les effets secondaires et la toxicité. Parmi ces molécules, se trouvent les glycoalcaloïdes (GA) qui sont des molécules naturelles appartenant à la classe des alcaloïdes métabolisés exclusivement par les plantes. Bien que certaines de ces molécules puissent être isolées des plantes de la famille des Liliaceae, on les trouve essentiellement dans la famille des Solanaceae comprenant des espèces alimentaires telles que la pomme de terre, l'aubergine ou la tomate. Les GA de la pomme de terre sont majoritairement représentés (90 à 95%) par deux composés : l' α -solanine et l' α -chaconine (**Friedman and McDonald 1997**). Ces molécules, synthétisées au cours du métabolisme secondaire de la pomme de terre, sont des hétérosides constitués d'une génine stéroïdique en C27 appelée solanidine substituée par un trisaccharide. Elles constituent, pour la pomme de terre, un moyen de défense contre diverses agressions (insectes, champignon, virus etc....) (**Jadhav, Sharma, and Salunkhe 1981; Tingey 1984; Sarquís et al. 2000**). Chez l'homme, elles peuvent être responsables de graves intoxications alimentaires et exercent une activité cytotoxique. Plusieurs études ont en effet montré qu'elles provoquent la lyse de la cellule et inhibent les transports membranaires (**Bushway, Savage, and Ferguson 1987**). De plus, elles ont aussi la capacité d'inhiber deux enzymes essentielles à la transmission nerveuse,

l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BuChE). Différents effets toxicologiques, embryotoxiques, tératogènes ou genotoxiques des GA ont ainsi été révélés tant sur le plan expérimental (**Crawford and Myhr 1995; Friedman, Rayburn, and Bantle 1991; Langkilde et al. 2012; Crawford and Kocan 1993**), que sur le plan clinique (**Benilova et al. 2006; Hellenäs et al. 1992; McGehee et al. 2000; Roddick, Weissenberg, and Leonard 2001**). Compte tenu des propriétés toxiques des GA, les taux de ces substances ont été réglementés par le comité FAO/WHO (**FAO/WHO 1999; Slanina 1990**). La limite de sécurité a été fixée à 200 mg/kg de matière fraîche, dose considérée comme non toxique pour l'homme. Cependant, la biosynthèse des GA est rapidement stimulée par des facteurs environnementaux tels que l'exposition à la lumière, les blessures mécaniques, la température de stockage et les différents traitements post-récolte. Il a été montré, en effet, que cela entraînait une forte augmentation de la teneur en GA de différents cultivars de pomme de terre (**Dale et al. 1993; Percival 1999; Percival and Dixon 1996; Machado, Toledo, and Garcia 2007; Petersson et al. 2013**). Ces pommes de terre contenant de fortes teneurs en GA doivent être proscrites de l'alimentation humaine et la gestion de ces déchets représente un enjeu à la fois environnemental, économique et réglementaire. : La solanidine, partie aglycone de l' α -solanine et l' α -chaconine, est un précurseur de la synthèse de nombreuses molécules d'intérêt thérapeutique (**Vronen, Koval, and Groot 2003**). L'hydrolyse des motifs saccharidiques pourraient ouvrir la voie à de nouvelles voies de production de la solanidine tout en protégeant l'environnement. Plusieurs tentatives d'élimination de cette fraction osidique ont été explorées (**Attoumbré, Giordanengo, and Baltora-Rosset 2013; Filadelfi and Zitnak 1983; Jensen et al. 2009; Nikolic and Stankovic 2005; Nikolic and Stankovic 2003; Oda et al. 2002**) et il ressort qu'à ce jour aucune des méthodes développées n'est parvenue de façon efficace à l'hydrolyse de cette fraction glucidique. Dans le présent travail, l'objectif est d'extraire et évaluer la teneur en α -solanine et α -chaconine dans les pommes de terre en décomposition, prélevées sur différents marchés d'Abidjan et aussi de développer un nouveau procédé d'obtention de la solanidine employant une β glycosidase issue de la blatte. En effet, les plantes ont, à l'origine, produit ces métabolites secondaires pour se défendre contre différents prédateurs comme les insectes. Ces derniers ont, à leur tour, développé une machinerie enzymatique permettant de se protéger des toxines impliquées dans le mécanisme de défense de la plante dont ils se nourrissent (**Vanetten et al. 1994**). Parmi les enzymes retrouvées chez les insectes et qui sont impliquées dans l'hydrolyse de ces composés, se trouvent les β glycosidases qui appartiennent à la famille 1 des glycoside hydrolases (GH1). Ainsi, ce projet de thèse se situe dans le cadre du développement de bioprocédés visant i) à

préserver l'environnement au travers du recyclage de bio-ressources naturelles (pommes de terre en décomposition) en molécules bioactives à visées thérapeutiques et ii) à valoriser d'autres bio-ressources naturelles (enzymes digestives de la blatte).

Le manuscrit de thèse s'organise en cinq chapitres.

Dans une première partie, les bases bibliographiques, sur lesquelles s'est construit le projet de recherche, seront exposées.

Le chapitre II décrira le matériel et les méthodes utilisés pour l'accomplissement des expériences conduites, comprenant les techniques de biologie moléculaire, les techniques de production, purification et caractérisation de la β -glycosidase native et recombinantes, les techniques d'extraction des glycoalcaloïdes et enfin les techniques analytiques.

Les chapitres III, IV, V et VI décriront les résultats obtenus.

Le chapitre III présentera les modes de production et purification de la β -glycosidase native de la blatte *Periplaneta americana*. Le chapitre IV exposera la stratégie de clonage du gène codant pour cette enzyme et les principales caractéristiques biochimiques de l'enzyme. Le chapitre V sera dédiée à l'étude de la stabilité de la β -glycosidase native et recombinante. Enfin, le dernier chapitre exposera le procédé que nous avons développé pour la production de solanidine à partir de déchets de pommes de terre.

Le manuscrit s'achèvera par une conclusion sur l'étude réalisée et par les perspectives qui peuvent en être dégagées.

CHAPITRE I: SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I: Synthèse bibliographique

I-Généralité sur les blattes

1-1-Origine

Les blattes sont encore appelées cafards, cancrelats ou coquerelles. Elles sont apparues sur terre il y a environ 400 millions d'années, et leur aspect a peu évolué depuis 320 millions d'années. Les fossiles indiquent qu'elles proliféraient au Carbonifère, ère de leur apparition (**Lo et al. 2000**). Toutes ces espèces sont plus ou moins cosmopolites et ont colonisé de nombreux pays, à la faveur des transports et des échanges commerciaux internationaux. Les transports maritimes sont à l'origine de l'infestation des grandes zones portuaires, et des villes avoisinantes, par les blattes (**Arruda et al. 2001**). Plusieurs milliers d'espèces de blattes sont connues de par le monde, mais la plupart d'entre-elles habitent les zones équatoriales et tropicales car ces insectes affectionnent tout particulièrement la chaleur et l'humidité (**Grandcolas 1998**).

1-2- Morphologie

Les 4000 espèces de blattes réparties autour de la planète varient selon la forme, la couleur et la taille (**Roth 2003**). Les blattes sont des insectes au corps aplati et ovale. La tête, très mobile est presque entièrement cachée sous une partie du thorax en forme de bouclier, appelée pronotum. Elle porte deux antennes filiformes, très mobiles et flexibles, souvent aussi longues que le corps. Les blattes ont deux grands yeux composés et parfois deux ocelles. Leurs pièces buccales sont de type broyeur. Elles comprennent une paire de robustes mandibules fortement dentées. Au thorax sont rattachées trois paires de pattes semblables, robustes, épineuses et bien adaptées à la course (**Grandcolas 1996**). Les blattes ont généralement deux paires d'ailes, fixées au thorax et posées à plat sur l'abdomen, se chevauchant largement. Les ailes antérieures sont légèrement épaissies et recouvrent les ailes postérieures. Elles sont souvent plus courtes chez la femelle que chez le mâle. Les ailes sont réduites ou absentes chez quelques espèces. L'abdomen porte deux courts appendices plus ou moins développés, appelés cerques. Chez la femelle, il se termine par un ovipositeur, mais celui-ci est peu ou pas visible (**Hui et al. 2009**).

1-3-Cycle de vie

Les blattes sont des insectes à métamorphose incomplète. Les jeunes ressemblent aux adultes, mais ils sont dépourvus d'ailes à leur naissance (**Grandcolas 1999**). Chez plusieurs espèces de blattes, une parade nuptiale précède l'accouplement. Le contact entre les deux partenaires s'effectue à l'aide des antennes. Le mâle tapote parfois le corps de la femelle avec ses antennes. Il se retourne ensuite, soulève ses ailes, les fait vibrer et allonge son abdomen. Cet étirement expose les ouvertures de deux glandes dorsales qui sécrètent une substance spéciale. La femelle lèche cette sécrétion. Puis le mâle recule sous la femelle et pousse son pénis dans son ouverture génitale. Sans quitter sa partenaire, le mâle effectue alors une rotation de 180° (**Grandcolas 1999**). Les deux insectes restent ainsi attachés par l'extrémité de leur abdomen pendant environ une heure, la semence du mâle passant dans le corps de la femelle. Au cours des jours suivants, la génération future se prépare dans le corps de la femelle (**Grandcolas 1991; Gautier 1982; Bell, Gorton, and Tourtellot 1979**). Quelques dizaines d'œufs sont regroupés sur deux rangées à l'intérieur d'une capsule protectrice. Cette coque aux parois rigides porte le nom d'oothèque. D'abord blanchâtre, l'oothèque tourne ensuite au brun. La majorité des larves éclosent moins de 24 heures après le dépôt de l'oothèque. Selon les espèces, les larves subissent entre quatre et quinze mues avant de devenir adulte, avec parfois une mue supplémentaire pour la femelle. Après chaque mue, le corps de l'insecte est mou et blanchâtre. Au fur et à mesure que les heures passent, le squelette externe durcit et prend la couleur caractéristique de l'espèce. Selon les espèces, il faut de 2 à 24 mois aux blattes pour atteindre la maturité. Chez l'adulte, la largeur du corps est au maximum de 10 mm et sa longueur varie entre 35 et 50 mm (**Grandcolas 1999**).

1-4-Habitat

La blatte a une distribution cosmopolite, la grande majorité des espèces de blattes vit dans la nature, sous les débris, les pierres, les feuilles, les écorces ou les troncs d'arbres couchés au sol ainsi que dans les fissures des rochers. Les espèces domestiques habitent les maisons, les entrepôts, les commerces et tout autre endroit où elles trouvent suffisamment d'humidité et de nourriture (caves, égouts, sous-sols, chaufferie). Sous les tropiques, les milieux de vie des blattes sont beaucoup plus variés (cavernes, nids de fourmis ou de rongeurs, tronc et feuillage des arbres, etc.) (**Grandcolas 1998**).

1-5-Alimentation et rôle écologique

Les blattes sont des insectes omnivores. Elles peuvent manger de la matière végétale en décomposition, du papier ainsi que des animaux morts ou des restes de table. En général, les blattes semblent préférer les hydrates de carbones (Hui et al. 2009). Elles sont particulièrement attirées par la viande, les produits laitiers, les aliments sucrés et amylacés (amidon), mais elles s'alimentent aussi de légumes, fruits, cuir, tissus, cartons, plastiques, insectes morts ou vivants, terreau, aliments pour animaux, cheveux, tissus et papier surtout celui enduit de pâte ou de colle. Les blattes sont particulièrement abondantes et diversifiées dans les régions tropicales et subtropicales (Arruda et al. 2001). Elles jouent un rôle important de décomposeurs dans la nature. En effet, en se nourrissant de végétaux et d'animaux morts, elles participent ainsi au recyclage rapide de la matière organique (Wileyto and Boush 1984).

1-6-Généralités sur la blatte *Periplaneta americana*

Les blattes constituent l'ordre des Blattopteres (Blattaria) d'après les classifications phylogénétiques récentes (Bell, Gorton, and Tourtellot 1979). Elles appartenaient auparavant à l'ordre des Dictyoptères. La blatte américaine a pour nom commun Cancrelat américain et pour nom scientifique *Periplaneta americana* (Linnaeus). Elle a été découverte aux Etats-Unis d'Amérique dès 1625 (Roth 2003). Sa classification se présente comme suit:

- Règne: Animal
- Embranchement: Arthropodes
- Sous embranchement: Antennates
- Classe: Insectes
- Sous-classe: Ptérigotes
- Groupe: Néoptères
- Ordre: Blattaria
- Famille: Blattidae
- Genre: *Periplaneta*
- Espèce: *americana*

La blatte *Periplaneta americana* adulte à une coloration brune rouge luisant avec une tâche jaune pâle sur le pronotum et possède une paire de cerques à l'extrémité de l'abdomen. Chez l'adulte, la largeur du corps est au maximum de 10 mm et sa longueur varie entre 35 et 50

mm. Avec les étapes de vie plus jeune incluses (larve et jeune blatte) la durée de vie de la blatte varie entre 1 à 2 ans selon les conditions environnementales (**Grandcolas 1996**). Cette blatte représente le plus grand des cancrelats qui infestent les maisons. Elle possède des ailes entièrement développées et des inscriptions de lumière sur le thorax (**Wall and Oschman., 1975**). Les deux sexes (mâle et femelle) sont presque identiques dans la taille et l'aspect. La femelle a un abdomen plus large que le mâle. Cependant, seul le mâle a un cerci et les stylets (**figure 1**). Les ailes du mâle se prolongent de 4 à 8 mm au-dessus de l'extrémité de l'abdomen alors que chez la femelle, elles sont égales (**Grandcolas 1996**). Comme tous les cancrelats, les œufs de *Periplaneta americana* sont pondus dans une caisse d'œufs appelée oothèque. Chaque oothèque contient environ 12 à 16 œufs (**Fox 2006**). La caisse d'œufs est habituellement cachée dans une crevasse où les œufs se développeront pendant 1 à 2 mois. Une femelle simple peut produire environ 12 à 24 caisses d'œufs durant des mois d'été chauds. Les larves subissent 13 mues pendant 6 à 12 mois avant qu'elles n'atteignent la maturité (**Ramos et al. 2006**).

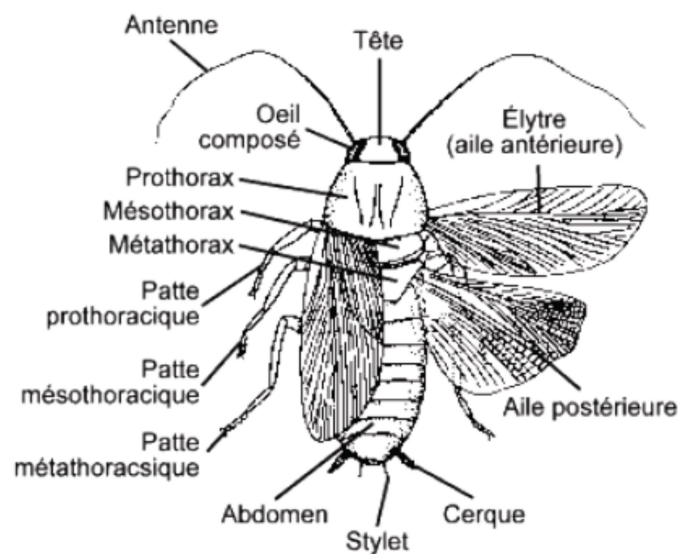


Figure 1: Description anatomique d'un mâle adulte

II- Les glycoside hydrolases

2-1-Généralités

Les glycosides hydrolases encore appelées glycosidases catalysent aussi bien l'hydrolyse des polysaccharides, des saccharides que les liaisons osidiques des glycoconjugués. Cette hydrolyse permet la libération de molécules non saccharidiques, de monosaccharides ou

d'oligosaccharides de plus faible poids moléculaire. Elles sont scindées en deux groupes selon leur spécificité d'action: les α -glycosidases et les β -glycosidases selon qu'elles hydrolysent les liaisons osidiques α ou β . C'est sans doute la propriété la plus caractéristique des glycosidases car si ces enzymes sont peu spécifiques de la partie aglycone du substrat, elles sont toutefois très spécifiques de l'anométrie de la liaison osidique. Selon leur mode d'intervention, elles sont soit des endo ou des exo-glycosidases à l'intérieur de ces deux grands groupes. Les premières interviennent au niveau des liaisons osidiques au hasard à l'intérieur des chaînes polysaccharidiques, tandis que les secondes attaquent les chaînes polysaccharidiques à partir de leurs extrémités non réductrices. Les glycosidases catalysent les réactions d'hydrolyse et de transglycosylation (Crout and Vic 1998).

2-2-Réactions catalysées par les glycoside hydrolases

2-1-1-Réactions d'hydrolyse

La catalyse des réactions d'hydrolyse d'oligosaccharides ou de glycoconjugués représente le premier rôle des glycosidases (figure 2).

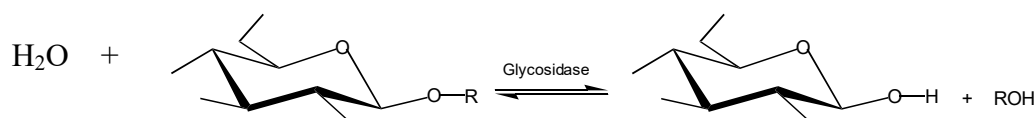


Figure 2: Schéma général de la réaction d'hydrolyse catalysée par les glycosidases.

2-1-2-Réactions de synthèses enzymatiques de glycoconjugués

Les étapes de la catalyse enzymatique étant le plus souvent réversibles, il est possible d'utiliser les glycosidases pour catalyser la synthèse de la liaison osidique. Ainsi, deux approches pour l'obtention de glycoconjugués par les glycosidases sont possibles. La première est la réaction de synthèse, contrôlée thermodynamiquement et la seconde est la réaction de transglycosylation, contrôlée cinétiquement (McCarter and Withers 1994).

2-1-2-1-Réactions de synthèse

Dans cette réaction, l'enzyme utilise le monosaccharide libre comme substrat. C'est la réaction inverse de l'hydrolyse (figure 3).

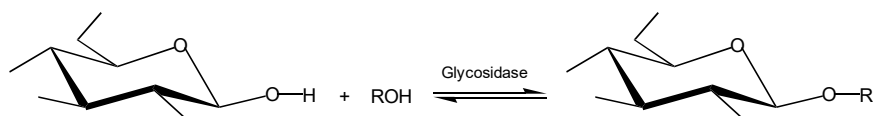


Figure 3: Schéma général de la réaction de synthèse catalysée par les glycosidases

L'équilibre de la réaction est généralement en faveur de la réaction d'hydrolyse, ce qui fait que les rendements de synthèse sont souvent très faibles (environ 10%). Il est possible de déplacer cet équilibre vers la réaction de synthèse en diminuant l'activité de l'eau, ou en éliminant le produit de la réaction au fur et à mesure de sa synthèse. Malgré tout, les rendements demeurent faibles (Ajisaka, Nishida, and Fujimoto 1987).

2-1-2-2-Réactions de transglycosylation

C'est 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 un accepteur nucléophile autre que l'eau ($\text{R}'\text{OH}$, figure 4).

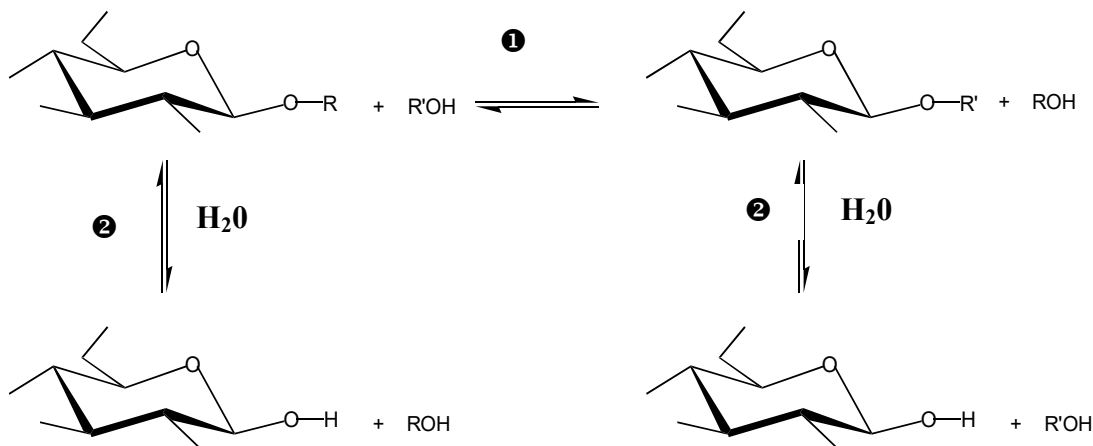


Figure 4: Schéma global de la compétition entre transglycosylation (1) et hydrolyse (2)

L'enzyme pouvant à la fois catalyser l'hydrolyse du substrat mais aussi l'hydrolyse du produit de transglycosylation, une compétition s'installe entre ces deux réactions. Généralement les rendements sont bien meilleurs en transglycosylation qu'en synthèse contrôlée (30 à 50 %) (Sinnott 1990). Cependant, la transglycosylation dépend outre de la qualité et de la concentration du donneur, mais aussi 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 comprises entre 50 et 95%. Malgré les différentes approches utilisées, le rendement en transglycosylation de la réaction dépend essentiellement de la source enzymatique utilisée (Sinnott 1990).

2-3-Mécanismes d'action

L'hydrolyse enzymatique de la liaison glycosidique par les glycosidases peut avoir lieu selon deux mécanismes catalytiques aboutissant à la libération

-Soit d'un glucide ayant un carbone anomérique de même configuration que celui du substrat, on parlera alors d'un mécanisme avec rétention de configuration

-Soit d'un glucide ayant une configuration anomérique inverse de celle du substrat, on parlera alors d'un mécanisme avec inversion de configuration. Ces mécanismes mettent le plus souvent en jeu deux groupements carboxyliques clés provenant de résidus glutamate ou aspartate du site actif de l'enzyme dont les rôles et les positions relatives diffèrent dans les deux cas (Koshland 1953).

2-3-1-Mécanisme avec inversion de configuration

Ce mécanisme correspond à une substitution nucléophile. L'un des groupements carboxyliques permet le départ de l'aglycone par son rôle de catalyseur acide (HA), tandis que l'autre sous forme de carboxylate déprotone (B-) l'eau pour favoriser l'attaque nucléophile sur le carbone anomérique, selon un processus de catalyse acide-base générale. Cette réaction s'effectue en passant par un état de transition dont la structure est proche de celle d'un cation oxocarbénium (**Figure 5**). Dans ce cas, les deux groupements carboxyliques doivent être suffisamment éloignés pour permettre l'insertion du substrat et de la molécule d'eau. En effet, pour ce type de glycosidases, une distance moyenne de 10,5 Å entre les deux acides aminés a été mise en évidence (Sinnott 1990; Davies and Henrissat 1995; McCarter and Withers 1994).

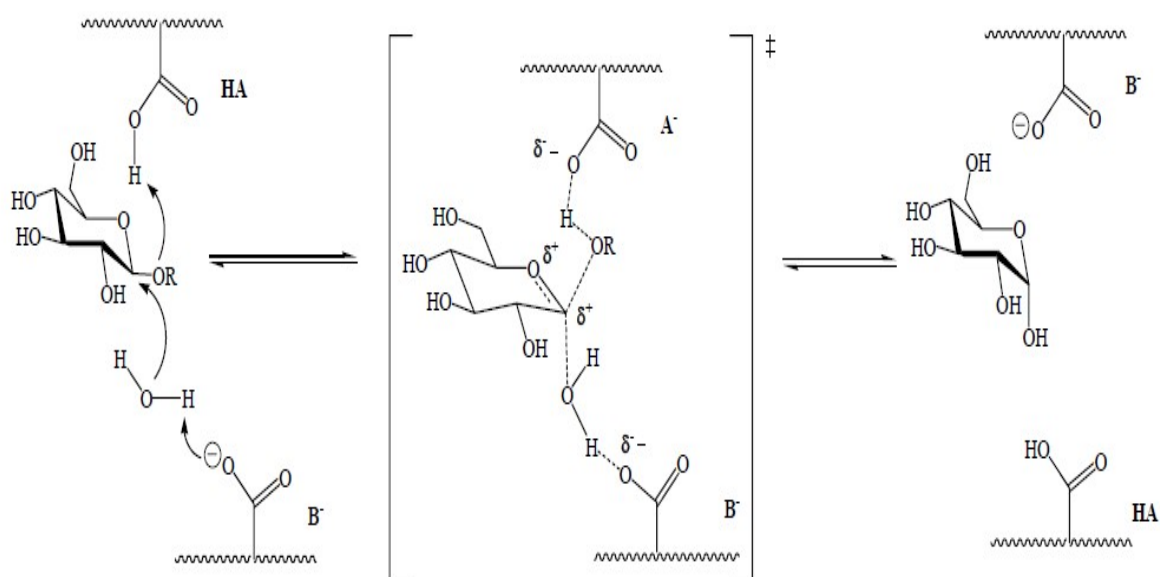


Figure 5: Mécanisme de réaction des glycosidases agissant par inversion de configuration (Withers and Aebersold 1995)

2-3-2-Mécanisme avec rétention de configuration

Les enzymes agissant selon un mécanisme de rétention de la configuration du carbone anomérique, libèrent un produit dont la stéréochimie du carbone anomérique est la même que celle du substrat après deux inversions successives au niveau du carbone anomérique du substrat et implique le passage par un intermédiaire covalent glycosyl-enzyme. Deux groupements acides carboxyliques jouent également un rôle clé dans la catalyse. Ainsi, l'un d'eux 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 intervient comme un acide puis comme une base, (McCarter and Withers 1994; Davies and Henrissat 1995) (Figure 6). Ces groupements carboxyliques sont situés de chaque côté du plan de l'unité glucidique. L'un agit comme donneur de proton (HA), l'autre comme nucléophile (noté B-). Le groupement -OR est protoné par le résidu HA tandis que le deuxième résidu, B-, intervient pour réaliser la substitution nucléophile et former l'intermédiaire glycosyl-enzyme de configuration inverse à celle du substrat initial *via* un état de transition de type oxocarbenium. L'aglycone est libéré sort du site actif. La dé-glycosylation de l'enzyme se produit ensuite selon un processus inverse. Dans la réaction d'hydrolyse, la base conjuguée du catalyseur acide-base HA déprotone l'eau, permettant l'attaque nucléophile du glycosyl-enzyme et la libération de la partie glycone de configuration similaire à celle du substrat initial. Lorsque

l'intermédiaire glycosyl-enzyme est attaqué par un accepteur hydroxylé (par exemple un sucre, polyol etc...) activé par le catalyseur acide-base, la réaction catalysée est alors une réaction de transglycosylation. Les deux états de transition sont très semblables et de type oxocarbénium (**Withers and Aebersold 1995; Sinnott 1990; Davies and Henrissat 1995; Yip and Withers 2004**). Dans ce mécanisme c'est la distance plus courte entre les deux acides carboxyliques (0,55 nm) qui permettrait une attaque directe de l'acide carboxylique jouant le rôle de nucléophile sur le carbone anomérique du substrat.

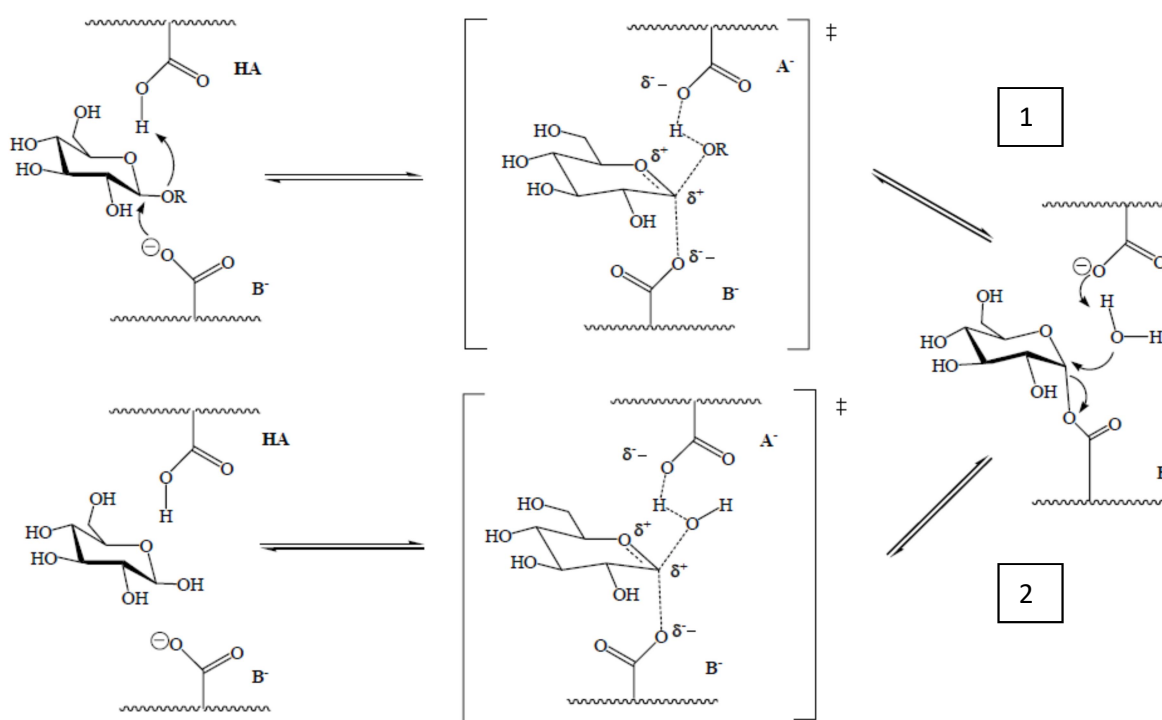


Figure 6: Mécanisme de réaction des glycosidases agissant par rétention de configuration (Withers and Aebersold 1995).

La connaissance des mécanismes, et donc des états de transition impliqués dans les réactions catalysées par des enzymes, est fondamentale. Dans le cas des glycosidases, l'état de transition est similaire quel que soit le mécanisme mis en jeu, et il est généralement représenté de la manière suivant:

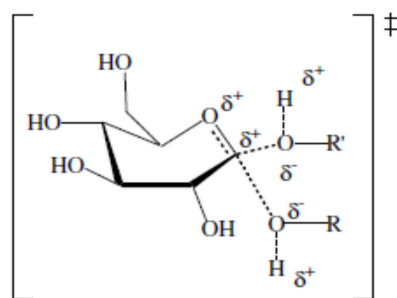


Figure 7: Modèle général de l'état de transition

Deux caractéristiques essentielles peuvent être retenues: le passage par un intermédiaire portant une charge positive partagée entre le carbone anomérique et l'oxygène endocyclique, ce qui implique la présence d'une liaison à caractère sp^2 entre ces deux atomes. L'état de transition posséderait alors une structure proche d'un ion oxocarbénium (**Figure 7**). Une distorsion du cycle du substrat fixé dans le site actif par rapport à l'état fondamental de la molécule. Une telle distorsion faciliterait le passage de l'état de transition à l'intermédiaire cationique. Elle permettrait le recouvrement des orbitales pour la formation de l'ion oxocarbénium et/ou diminuerait des interactions stériques défavorables lors de l'attaque par le nucléophile.

2-4-Classification des glycoside-hydrolases

2-4-1-Classification traditionnelle

Dans la nomenclature de l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire (IUB-MB) basée sur le type de réaction catalysée et la spécificité de substrat, les glycoside hydrolases possèdent un numéro du type EC 3.2.1.x. Les trois premiers chiffres indiquent qu'elles hydrolysent des liaisons O-glycosidiques, le dernier (x) est variable et dépend du substrat transformé. Selon cette classification, les β glucosidases appartiennent à la famille des enzymes qui catalysent les réactions d'hydrolyse, (Hydrolases, 3- - -) des composés glycosylés, (Glycosidases, 3 2 - -) liés par un atome d'oxygène, (o-glycosidases, 3 2 1 -) dont le résidu de base du glycone est le D-glucose. Les β -glucosidases sont alors identifiées par EC 3. 2. 1. 21 (**Sarry 2001**). Cette classification systématique permet de nommer précisément la spécificité de substrat d'une enzyme et possède en outre, l'avantage de pouvoir classer rapidement une enzyme. Cependant, ce système ne tient pas compte des similarités de

séquence protéique et donc de la structure tridimensionnelle. De plus, cette classification n'est pas systématique quant au mécanisme d'action des enzymes. Elle paraît mal adaptée aux glycosidases qui peuvent agir sur différents substrats et ne prennent que partiellement en compte les mécanismes d'action catalytique et les liens de parentés entre enzymes, reflétés par les homologies entre séquences et structures (**Fourage 2000**). Ces raisons ont amené Bernard Henrissat, à chercher une autre alternative pour classer ces enzymes, basée sur la similarité de séquences. Les séquences ayant une forte similarité entre elles sont classées dans la même famille (**Henrissat 1991; Henrissat and Bairoch 1993, 1996; Henrissat and Davies 1997**).

2-4-2-Classification selon les similarités de séquences

Les polysaccharides sont la principale forme de stockage de glucides, dont l'oxydation permet de récupérer de l'énergie. Ils entrent aussi dans la composition d'éléments de structures de la plupart des organismes; le peptidoglycane des bactéries, la carapace chitineuse des insectes, la paroi cellulaire des plantes, etc... Une hydrolyse sélective des liaisons glucosidiques est donc nécessaire pour récupérer l'énergie via différentes voies oxydatives et libérer des monomères pour construire des parois cellulaires. Les enzymes qui modifient, créent ou lysent les liaisons glucosidiques des polysaccharides sont désignées sous le terme «Carbohydrate-Active Enzymes, ou CAZymes». La diversité des "carbohydrates" entraîne donc une grande diversité de glycoside hydrolases, GH dégradant les glucides par hydrolyse. Ces enzymes sont retrouvées chez des organismes provenant de tous les domaines: virus, eubactéries, archéobactéries et eucaryotes, et sont impliquées dans de nombreuses voies métaboliques. Depuis 1998 la base de données en ligne CAZy (URL: <http://www.cazy.org/>) répertorie et organise les CAZymes. Cette base de données regroupe les CAZymes en 4 classes: les Glycoside Hydrolases (GH), les Glycosyltransférases (GT) (**Coutinho et al. 2003**), les Polysaccharide Lyases (PL) et les Carbohydrate Estérases (CE) (**Henrissat 1991**). Elle recense également les Carbohydrates Binding Modules (CBM) qui ne présentent pas d'activité catalytique mais sont des domaines protéiques ayant des propriétés d'adhésion aux oligosaccharides. Pour chacune de ces classes, il existe une subdivision en familles basée sur des enzymes caractérisées biochimiquement auxquelles sont adjointes des protéines avec lesquelles elles partagent une homologie de séquence significative (**Cantarel et al. 2009**).

Cette classification répartie les enzymes et les protéines ayant des relations structurales ou mécanistiques apparentées selon trois niveaux:

- 1) Le repliement, car toutes les protéines ayant un repliement similaire sont susceptibles de descendre d'un ancêtre commun.
- 2) Le 'clan', qui regroupe des familles possédant un même repliement et une machinerie catalytique identique, c'est-à-dire les mêmes résidus catalytiques sur les mêmes éléments de structures (**Jenkins et al. 1995; Henrissat and Bairoch 1996**). A ce jour, il existe 14 clans différents chez les familles de glycoside hydrolases (GH) : GH-A, GH-B, GH-C, GH-D, GH-E, GH-F, GH-G, GH-H, GH-I, GH-J, GH-K, GH-L, GH-M et GH-N.
- 3) La 'famille', regroupe des enzymes similaires entre elles, au niveau du module commun qui les caractérise. Le repliement d'une protéine étant dépendant de la séquence, les modules d'une même famille possèdent donc tous le même repliement, et dans la plupart des cas partagent aussi le même mécanisme d'action et avec des résidus catalytiques qui sont conservés (**Henrissat 2000; Henrissat 1991**). À ce jour, 133 familles de glycoside hydrolases sont répertoriées dans le site (CAZy) site Web (<http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>). Les β -glucosidases décrites dans la littérature appartiennent aux familles GH1, GH3, GH5, GH9 et GH30, (**Cantarel et al. 2009; Henrissat 1991; Opassiri et al. 2007**) des glycoside hydrolases. La β -glucosidase de la blatte *Periplaneta americana* appartient à la famille GH1 et au clan GH-A qui possède le plus grand nombre de familles comprenant les familles GH1, GH5 et GH30 des β -glucosidases. Beaucoup de ces enzymes ont été purifiées et caractérisées, leur structure, leur mécanisme et leur rôle fonctionnel ont été largement décrits.

2-4-2-1-Structures des β -glucosidases de la famille GH1

La plupart des enzymes de la famille GH1 hydrolysent différents substrats, mais agissant toujours sur des substrats de configuration β , elles sont annotées en tant que β -glycosidases (EC 3.2.1.-). On y trouve donc des β -glucosidases (EC 3.2.1.21), des β -galactosidases (EC 3.2.1.23), des 6-phospho- β -galactosidases (EC 3.2.1.85), des 6-phospho- β -glucosidases (EC 3.2.1.86), des myrosinases (EC 3.2.1.147), des lactase-phlorizin hydrolases (EC 3.2.1.62) etc. La majorité de ces enzymes hydrolysent des liaisons de type O-glycosidique, sauf les myrosinases qui hydrolysent des liaisons S-glycosidiques. Les études montrent qu'elles présentent un repliement en forme de tonneau (β/α)₈ et qu'elles agissent par un mécanisme

de rétention de configuration (**figure 8**). La base catalytique est un glutamate et le donneur de proton un acide glutamique, mais ce dernier est absent chez les myrosinases de plantes et serait remplacé par une glutamine (**Burmeister et al. 1997**).

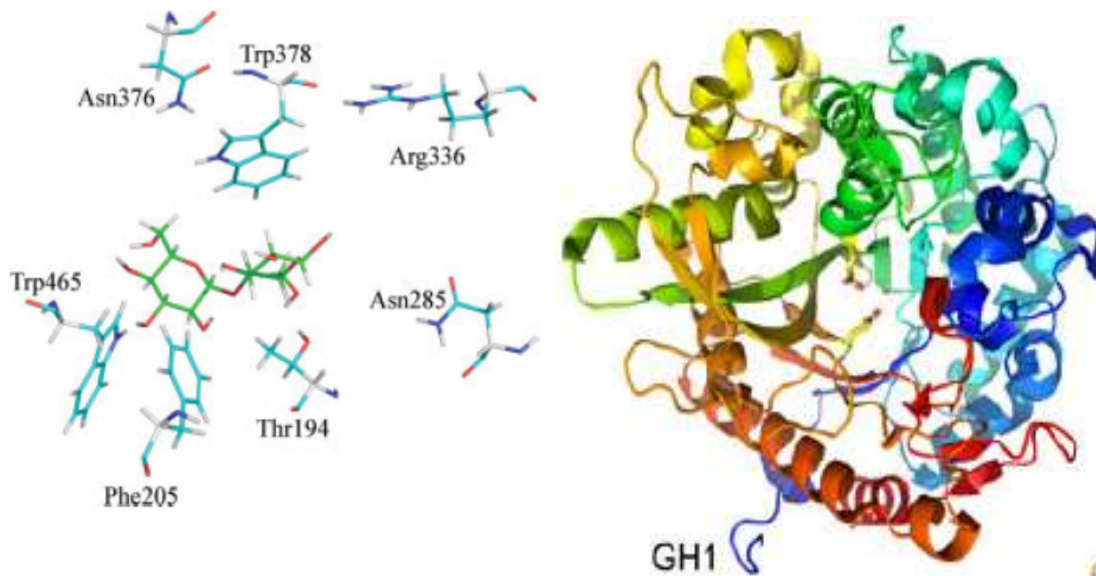


Figure 8: Structure et résidus d'acides aminés communs aux GH1 (Zea mays ZmGlu1, PD code 1E1E)

2-4-2-2-Classification des β -glucosidases selon la spécificité de Substrat

Les β -glucosidases (glucohydrolases β -D-glucopyranoside, EC 3.2.1.21) catalysent l'hydrolyse des liaisons glycosidiques entre un glucose terminal et un aglycone ou un glycone, avec libération de D-glucose. Ces enzymes sont retrouvées chez des organismes provenant de tous les domaines; virus, eubactéries, archéobactéries et eucaryotes. Elles sont impliquées dans de nombreuses voies métaboliques impliquant la conversion de la biomasse, la dégradation des glycolipides, la défense chimique, les interactions entre hôte et parasite, la modification de certains métabolites secondaires, la lignification, la détoxification des aliments etc... Selon la classification E.C basée sur le mécanisme d'action, la structure, et la relation avec d'autres glycoside hydrolases les β -glucosidases appartiennent à la famille des enzymes qui catalysent les réactions d'hydrolyse, (Hydrolases, 3- - -) des composés glycosylés, (Glycosidases, 3 2 - -) liés par un atome d'oxygène, (o-glycosidases, 3 2 1 -) dont le résidu de base du glycone est le D-glucose. Les β -glucosidases agissent généralement sur de nombreux substrats qui diffèrent les uns des autres par leur partie aglycone (aryle: cycle ou alkyle: chaîne) ou glycone (Glc, Gal, Fuc, Xyl) (**figure 9**). En général, les β -glucosidases de

sources différentes présentent une similitude dans leur spécificité pour la partie glycone et se distinguent par leur spécificité pour la partie aglycone (qui peut être glycone aussi) du substrat (Marana and Terra 2000; Daroit, Aline, and Plinho 2008; Wallecha and Mishra 2003; Sarry 2001). L'aglycone est souvent spécifique de l'espèce, c'est pourquoi les β -glucosidases sont souvent identifiées par le nom de ce dernier. Par exemple, dans le cas du manioc, on parlera d'une linamarase (Mkpong et al. 1990) pour l'avoine d'une avénacosidase (Gus-Mayer et al. 1994) ou encore de la primevérosidase pour la feuille de thé (Guo et al. 1996). Selon la classification internationale basée sur la spécificité de substrat (Terra and Ferreira 1994), les β -glucosidases sont subdivisées en 3 classes:

- la première classe (β Gly1) comprend les β -glycosidases qui hydrolysent à la fois les glycosyl β -glycosides et les aryl (ou alkyl) β -glycosides. Ces enzymes hydrolysent les *p*NP β -glycosides, le cellobiose, le lactose etc... Comme exemple de β -glucosidases appartenant à cette classe, on retrouve les β -glucosidases de *Erinnyisello* (Santos 1986) et de *Rhynchosciara americana* (Ferreira and Terra 1983). La β -glucosidase de l'intestin moyen d'*Erinnyisello* hydrolyse les β -D-glucosides, β -D-galactosides et β -D-fucosides. Celle de l'intestin moyen de l'insecte *Rhynchosciara americana*, contrairement aux autres β -glucosidases de l'intestin moyen des autres insectes, est intégrée dans la partie hydrophobe de la membrane cellulaire (C. Ferreira and Terra 1983). Les propriétés cinétiques et le mécanisme réactionnel de cette enzyme sont similaires à ceux de la β -glucosidase d'*Erinnyisello*.

- la deuxième classe (β Gly2) comprend les β -glycosidases qui hydrolysent uniquement les glycosyl β -glycosides. Ces enzymes hydrolysent seulement les substrats tels que le cellobiose et le lactose et sont inactives sur les aryl- ou alkyl-glucosides. C'est le cas des β -glucosidases des insectes adultes *Abracris flavolineata* (Marana, Terra, and Ferreira 1995) et *Sitophilus oryzae* (Baker 1992).

- la troisième classe (β Gly3) comprend les β -glycosidases qui hydrolysent uniquement les oligosides associés à un groupement aryle (ou alkyle) sont appelées alkyl ou aryl- β -glycosidases. Le rôle physiologique des β Gly1 et β Gly3 est d'assurer la digestion des oligo et dissaccharides provenant de la dégradation des hémicelluloses tandis que celui de la β Gly2 est de dégrader les glycolipides. En se référant aux spécificités de substrats, les enzymes de la classe 1 et 2 hydrolysent avec efficacité le cellobiose et d'autres disaccharides. Ce sont de "vrai" β -glucosidases (E.C 3.2.1.21) (Terra and Ferreira 1994). Elles peuvent encore être

appelées cellobiases. Les cellobiases sont des enzymes qui assurent la dégradation du cellobiose issu de la dégradation de la cellulose chez quelques insectes ayant une cellulase. Chez les insectes, la cellobiase est probablement aussi l'enzyme responsable de la finition de la dégradation de l'hémicellulose ou de la partie glucidique des glycoprotéines. Cette assertion est beaucoup plus soutenue par le fait que les enzymes de la classe 3 libèrent préférentiellement les monosaccharides liés à l'aglycone hydrophobique. Il est donc possible que leur substrat naturel soit les glycolipides tels que les glycosyl-céramides. Les β -glucosidases de la classe 3 des insectes sont donc des glycosylcéramidases (EC 3.2.1.62) encore appelées phlozine hydrolases (**Leese 1973**). Des β -glucosidases d'insectes de la classe 1 ayant les mêmes caractéristiques cinétiques que celles des classes 2 et 3 ont été observées chez les insectes *Abracris flavolineata* (**Marana, Terra, and Ferreira 1995**) et *Sitophilus oryzae* (**Baker 1992**).

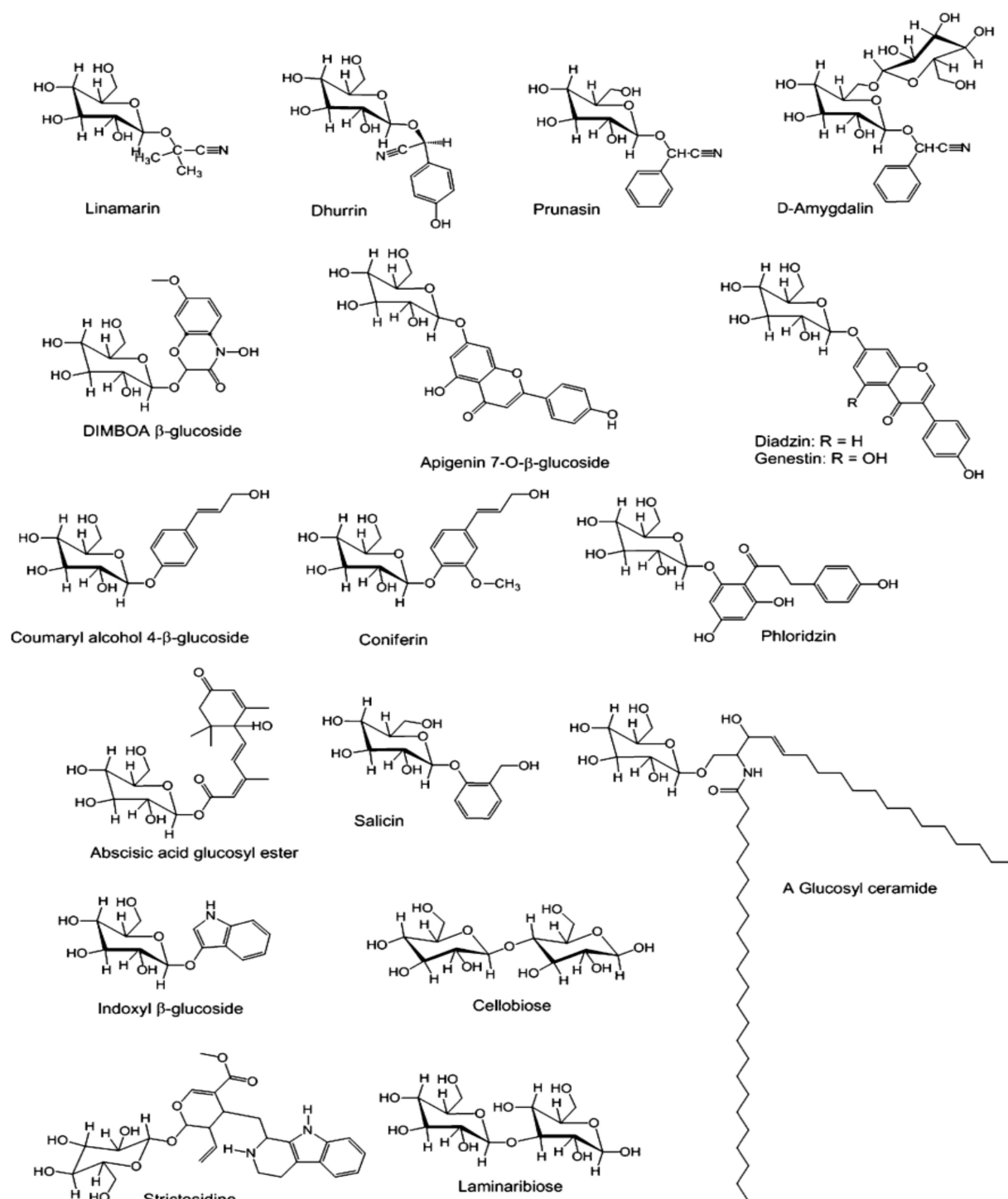


Figure 9 : structure de quelques substrats hydrolysés par les β -glycosidases (Cairns and Esen 2010)

2-4-2-3-Déterminants structuraux de la spécificité de substrats des β -glucosidases de la famille GH1

Toutes les β -glucosidases de la famille GH1 ont une structure similaire (**Figure 10 A**). La spécificité de substrat des β -glucosidases est très importante pour la détermination de leurs fonctions *in vivo*, en particulier lorsque plusieurs substrats et plusieurs iso-enzymes existent dans le même compartiment cellulaire (**Barleben et al. 2007**). Un exemple reflétant cette situation concerne la strictosidine et la raucaffricine, deux glucoside alcaloïdes, et les β -glucosidases retrouvées dans le cytoplasme des cellules de *Rauvolfia serpentina*. En effet, deux glucosidases ont été isolées, la première β -glucosidase présente une activité relative d'environ 1% vis-à-vis de la strictosidine contre 100 % pour la raucaffricine, son substrat naturel, tandis que l'autre β -glucosidase est uniquement active sur la strictosidine et n'a aucune activité sur la raucaffricine (**Barleben et al. 2007**). Des études antérieures sur la β -glucosidase du maïs et du sorgho ont montré qu'un tryptophane conservé correspondant à Trp388 dans la structure de la β -glucosidase active sur la strictosidine et à Trp392 dans la structure de la β -glucosidase active sur la raucaffricine, ainsi que des résidus proches dans le site actif interviendraient dans la spécificité pour l'aglycone (**Czjzek et al. 2000**). L'analyse de la structure de la β -glucosidase spécifique de la strictosidine montre que la chaîne latérale Trp388 est placée dans une position différente de celle observée dans les β -glucosidases du maïs, du sorgho ou de la β -glucosidase spécifique de la raucaffricine (**Figure 10 B**). Cette position semble restreindre l'accès au site actif de la β -glucosidase spécifique de la strictosidine, de sorte que seule la strictosidine peut y entrer et être hydrolysée. Une mutation du Trp392 en Ala dans la β -glucosidase spécifique de la raucaffricine a entraîné une augmentation de l'hydrolyse de la strictosidine, tandis que l'hydrolyse de la raucaffricine son substrat naturel a baissé, confirmant ainsi l'importance de cette position pour la spécificité de substrat. La spécificité de substrat de deux β -glucosidases agissant sur des substrats différents dans le même compartiment cellulaire se distingue donc par de légères différences au niveau de leur site actif (**Barleben et al. 2007**). Un autre exemple, la primeverosidase, une enzyme de la famille des GH1 qui coupe le disaccharide β -primeverose (β -D-xylosyl-1,6- β -D-glucose) à partir du primeveroside. Cette enzyme ne possède pas le résidu Trp, très important dans la spécificité de l'aglycone comme décrit précédemment (**Figure 10 C**) (**Saino et al. 2014**). Le remplacement à cette position du Trp par la Leu permet l'arrimage d'un plus grand nombre de saccharides dans le site actif. Cependant, l'addition d'interactions entre les résidus d'acides aminés du site actif et le résidu xylopyranosyle, ainsi que l'interaction de ce résidu

avec de l'aglycone, font de la primeverosidase une enzyme spécifique des primeverosides (**Figure 10 D**). Afin d'approfondir l'étude des relations structure-activité des β -glucosidases **Cairns et al. (2015)** se sont intéressés aux β -glucosidases du blé et du seigle, qui hydrolysent le 2,4-dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-one-2-O- β -D-glucopyranoside (DIBOA glucoside) et le 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one-2-O- β -D-glucopyranoside (DIMBOA glucoside). Selon ces auteurs, la β -glucosidase du seigle hydrolyse le DIBOA glucoside plus efficacement que le DIMBOA glucoside, tandis que la β -glucosidase du blé serait plus efficace sur le DIMBOA glucoside. L'analyse du site actif montre que la β -glucosidase du seigle présente un site actif plus large en raison de la présence des résidus Gly464 et Ser465 perpendiculaires au résidu Trp379 (crucial pour la liaison avec l'aglycone) tandis que la β -glucosidase du blé possède à ces positions les résidus Ser464 et Leu465 (**Figure 10 D**). Aussi, l'analyse du complexe d'un mutant inactif de la β -glucosidase du blé avec le DIMBOA glucoside a montré qu'il n'y avait qu'une seule faible interaction hydrophobe entre le groupe méthoxy du DIMBOA et la Leu465 (4,8 Å) de l'enzyme. Bien que légère, cette interaction pourrait expliquer en partie la plus grande préférence de la β -glucosidase du blé pour le DIMBOA-glucoside par rapport à la β -glucosidase du seigle. D'autre part, **Chuenchor et al. (2011)** ont montré que des mutations de Gln187, Arg178 et Trp337 dans le site actif de la β -glucosidase du riz, n'ont entraîné qu'une toute petite baisse de l'activité tandis qu'une mutation de l'Asn245 a entraîné une perte presque totale de cette activité. Ces résultats ont amené les auteurs à conclure que les résidus du site actif de cette enzyme, à l'exception de l'Asn245 ne sont pas cruciaux pour cette activité mais qu'ils contribuent à faciliter l'arrimage des oligosaccharides. A l'issue de ces différentes analyses, il ressort qu'il n'y a pas de règle générale pour expliquer la différence dans la spécificité de substrat des β -glucosidases de la famille des GH1.

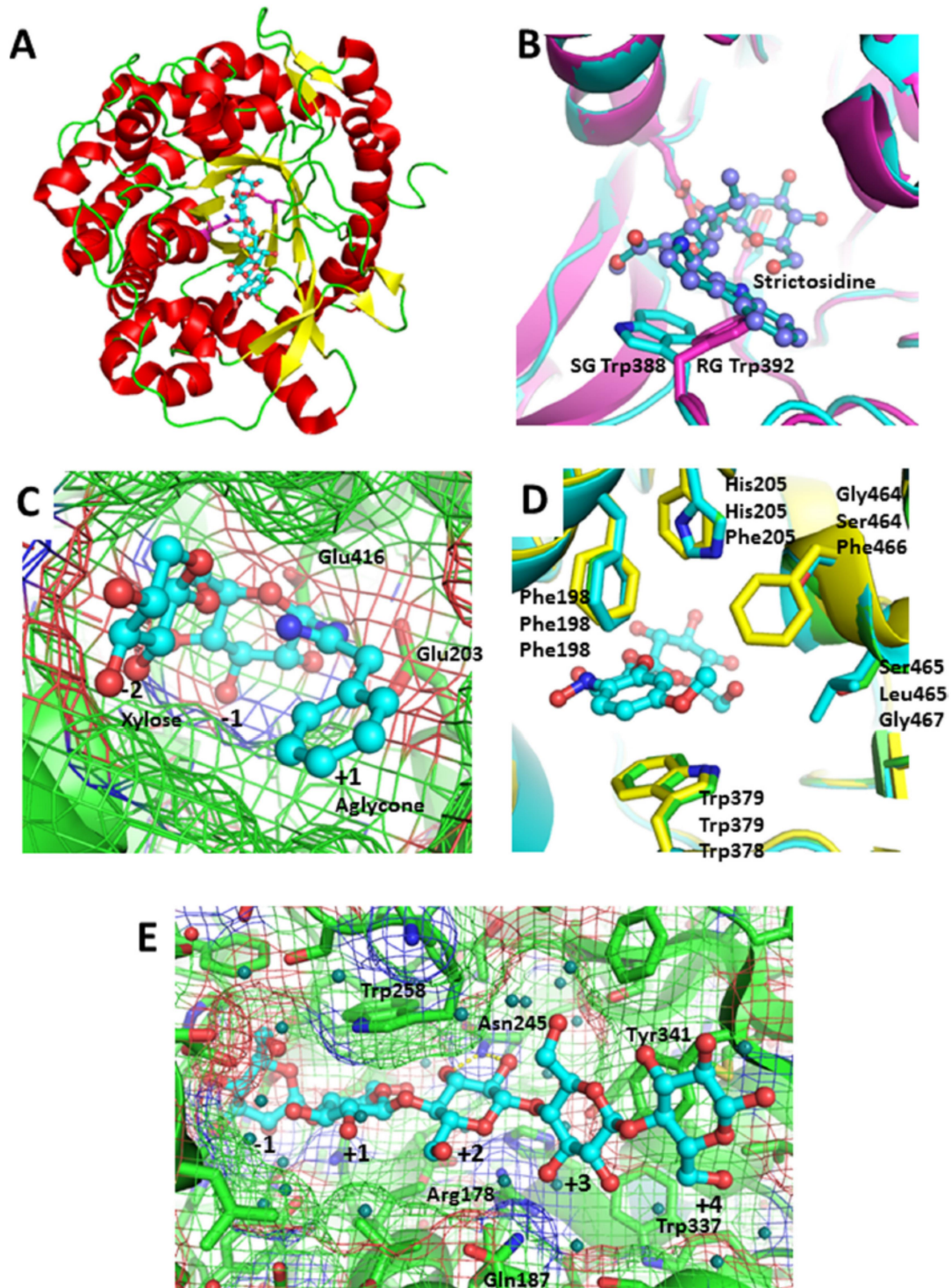


Figure 10: Structure du site actif de quelques β -glucosidases de la famille des GH1 en fonction de leur spécificité de substrat

(A) structure de la β -glucosidase Os3BGlu7 complexée avec la cellopentaose (PDB: 3F5 K). Les hélices α sont indiquées en rouge et les brins β en jaune. (B) Complexe enzyme-substrat (β -glucosidase spécifique de la raucaffricine liée à la strictosidine) la position du Trp392 placé devant le substrat, empêche ce dernier de rentrer prévenant l'hydrolyse (C) site actif de la primeverosidase complexée avec le 2-phenyl-N-(6-O- β -D-xylopyxylopyranosyl- β -D-glucopyranosyl) ethylamidine (D) Comparaison des résidus aglycones de benzoxazinone; β -glucosidases provenant du seigle (vert, APB: 3AIU), du blé (vert, APB: 3AIS) et du maïs (jaune, APB: 1E56). Ces enzymes hydrolysent les mêmes substrats, malgré des différences bien définies entre la β -glucosidase du maïs et les deux autres. La β -glucosidase du seigle et du blé ont des préférences bien différentes pour les glucosides DIBOA et DIMBOA, malgré leur petite différence seulement au niveau du Ser/Gly464 et Leu/Ser465. (E) cellopentaose lié au site actif de Os3BGlu7 (APB: 3F5 K), principalement grâce à des interactions entre les molécules d'eaux et les chaînes latérales aromatiques. Les seules liaisons hydrogène dans le site actif sont les liaisons avec Asn245 et Glc3 présentés en pointillés jaunes (Cairns et al. 2015)

2-4-2-4-Fonction et utilisations des β -glucosidases

Les β -glucosidases sont présentes dans le règne animal, végétal ou microbien. Elles interviennent dans les réactions d'hydrolyse du cellobiose et des β -glucosides de forme aryle et alkyle (**Woodward 1982**). Elles ont fait l'objet de nombreuses recherches en raison du rôle qu'elles jouent dans le monde vivant et pour les applications biotechnologiques, dont elles pourraient faire l'objet. Dans les applications biotechnologiques, les β -glucosidases sont surtout utilisées pour la production des boissons de qualité (**Mizutani et al. 2002; Maicas and Mateo 2005**). En effet, l'hydrolyse des précurseurs d'arômes glycosylés et inodores, présents dans les vins et les jus de fruit contribue à améliorer la qualité organoleptique de ces boissons (**Mizutani et al. 2002; Maicas and Mateo 2005**). Cette hydrolyse peut être réalisée par voie enzymatique et implique alors, l'utilisation de β -glucosidases comme catalyseurs de la réaction (**Dignum, Kerler, and Verpoorte 2002**). Déjà en 1924, Goris avait étudié le mode de formation du parfum de la vanille et mis en évidence le rôle de la β -glucosidase. Selon cet auteur, cette enzyme est responsable de l'hydrolyse de la glucovanilline en vanilline (**Goris 1924**). Sur le plan physiologique, les β -glucosidases interviennent dans la modification des métabolites secondaires chez les plantes et les insectes. Leur rôle dans ce domaine est lié à la nature des aglycones qu'elles libèrent. Chez la plante, une fois libéré, l'aglycone devient actif et intervient dans les mécanismes de défense contre des pathogènes et herbivores (libération des thiocyanates, terpènes, cyanides...), la croissance cellulaire et l'organisation structurale des membranes (**Sarry 2001**).

2-4-2-5-Rôle des β -glucosidases dans la modification des métabolites secondaires des plantes

Les plantes ont développé une large gamme de composés afin de se défendre des différents prédateurs comme les insectes qui en retour ont aussi développé une machinerie enzymatique afin de se protéger des toxines impliquées dans le mécanisme de défense de la plante (**Vanetten et al. 1994**). Ces toxines sont des glycosides synthétisés au cours du métabolisme secondaire chez les plantes. Si certains de ces glycosides comme l'arbutine et la salicyline, ont des propriétés thérapeutiques, d'autres peuvent se révéler être de violents poisons. Parmi les enzymes retrouvées chez les insectes et qui sont impliquées dans l'hydrolyse des glycosides, on retrouve les β glycosidases qui appartiennent à la famille 1 des glycosides hydrolases (GH1). Ces enzymes sont capables d'hydrolyser les gluco-oligosaccharides, les

glycosides des végétaux, tels que les cyanogènes β glucosides comprenant la linamarine du manioc, la dhurrine du sorgho, la prunasine des cerises et de divers fruits du même genre, les alkyl glucosides, les aminoglycosides et divers composés tels que les flavonoïdes, les coumarines; les saponines etc... En général, les glycosides inactifs présents dans les plantes sont stockés dans la vacuole, tandis que les β -glucosidases se retrouvent souvent dans l'apoplaste. L'hydrolyse de ces composés a souvent lieu lorsque les plantes sont agressées. Les enzymes sont alors mises en contact de ces substrats et libèrent les formes actives comme le montrent les exemples décrits dans la suite de ce paragraphe. La dhurrine, et l'amygdaline (**figure 11**) font partie de la famille des glucosides cyanogéniques et sont impliquées dans les mécanismes de défense de la plante. L'hydrolyse par des β glucosidases permet de libérer l'aglycone qui devient actif (Sibbesen et al. 1994; Bak, Nielsen, and Halkier 1998; Jones, Moller, and Hoj 1999). Dans le cas de l'amygdaline, la fraction aglycone correspond au benzaldéhyde responsable de l'arôme caractéristique de ces fruits.

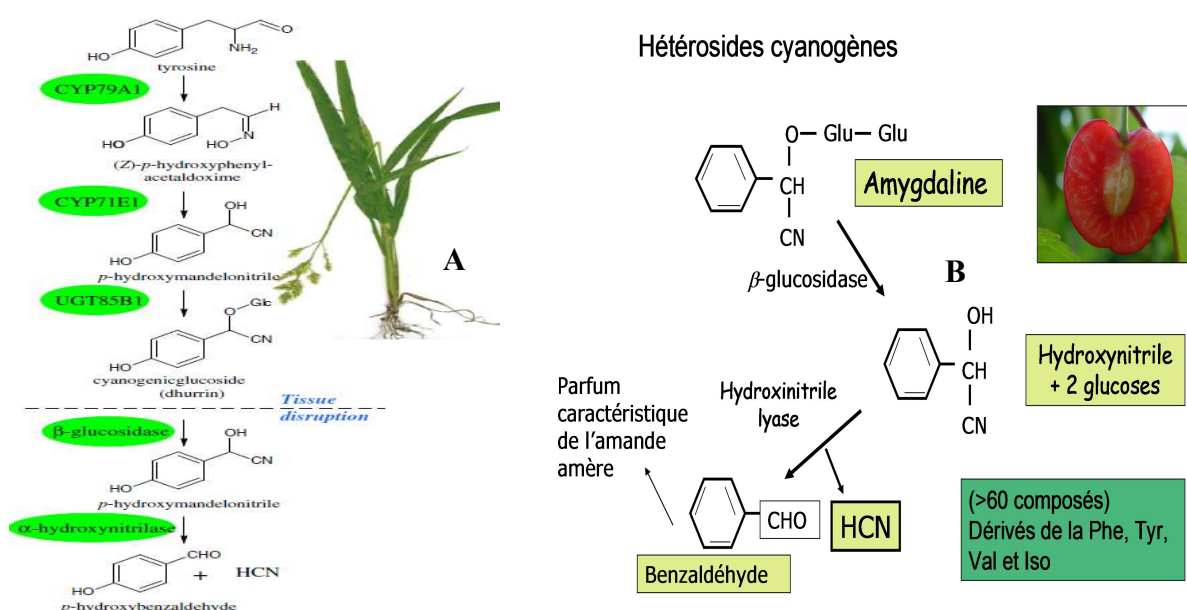


Figure 11: Hydrolyse de la dhurrine (A) et de l'amygdaline (B) par les β -glucosidases (Morant et al. 2008)

Les cyanoglucosides non-cyanogènes ont été isolés d'une large variété de plantes et possèdent la particularité de ne pas libérer facilement d'acide cyanhydrique, leur groupement nitrile n'étant pas porté par le carbone de la liaison glucosidique. Par conséquent, leur hydrolyse enzymatique permet le plus souvent d'obtenir l'aglycone seul sans libération de l'acide cyanhydrique. Une étude approfondie des propriétés biologiques de la simmondsine

(molécule qui inhibe la sensation de faim) menée par **Cokelaere et al. (1998)** a montré que les produits formés par l'action d'une β -glucosidase sur la simmondsine sont de meilleurs anti-appétants que la simmondsine elle-même (**figure 12**). La sinigrine est un thioglucoside que l'on trouve dans les choux de Bruxelles, les brocolis et dans les graines de moutarde noire, d'où elle a été isolée sous forme de son sel de potassium. Lorsque ces plantes de la famille des Brassicacées sont agressées, une enzyme coupe la partie sucre et libère l'isothiocyanate d'allyle (responsable du goût piquant de la moutarde) qui repousse l'animal agresseur. La coumarine est une molécule aromatique qui est utilisée dans la composition de nombreux parfums (au sens olfactif). Elle est présente sous forme glycoconjuguée chez certaines graminées (ex: la flouve odorante), mais c'est lorsque les tissus sont endommagés par la coupe que les glycosidases libèrent la coumarine libre qui est à l'origine de l'odeur caractéristique de ces composés.

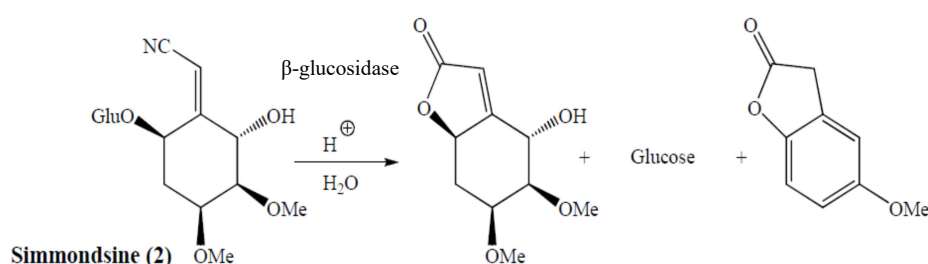


Figure 12: Hydrolyse de la simmondsine (Cokelaere et al. 1998)

III-Les glycoalcaloïdes de la pomme de terre

3-1-La pomme de terre *Solanum tuberosum* (L.)

La famille des Solanacées comprend environ 2 500 espèces. Le genre *Solanum* qui regroupe à lui seul 1500 à 2000 espèces (soit trois quarts de cette famille) a donné son nom à la famille. C'est ce genre qui contient les espèces alimentaires d'une grande importance économique telles que la pomme de terre (*Solanum tuberosum*), la tomate (*Solanum lycopersicum*), l'aubergine (*Solanum melongena*) et le piment (*Capsicum*). La pomme de terre *Solanum tuberosum* cultivée dans plus de 125 pays se situe au 3^{ème} rang mondial dans l'industrie et l'alimentation humaine après le riz et le blé (**Faostat 2015**). La Chine occupe la première place mondiale dans la production de pommes de terre avec plus de 72 millions de tonnes de

pommes de terre produites. L'utilisation de ce tubercule dans le monde selon la FAO se répartit comme suit: 64,4% dans l'alimentation humaine, 12,1% pour l'alimentation animale; 9,9% pour les semences (plants); 6,6% pour les transformations en industrie et 7% dans les pertes (**faostat 2015**). En plus d'être une bonne source d'hydrates de carbone, la pomme de terre contient également des protéines, des vitamines et des minéraux. Ses qualités nutritives et sa facilité de culture font qu'elle est devenue l'un des aliments de base de l'humanité (**Andre et al. 2007; Schieber and Saldaña 2009; Bártoová and Bárta 2009; Murniece et al. 2011**). Cependant, la pomme de terre contient des composés toxiques naturels; les glycoalcaloïdes, en quantité très variable dépendant notamment de différents facteurs. Il s'agit principalement de l' α -chaconine et de l' α -solanine qui proviennent du métabolisme secondaire de la pomme de terre.

3-2-Métabolites secondaires chez les végétaux

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées. En effet, à côté des métabolites primaires classiques (glucides, protides, lipides, acides nucléiques), ils accumulent fréquemment des métabolites dits «secondaires» dont les fonctions physiologiques ne sont pas toujours évidentes, mais qui représentent une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire (**Bourgaud et al. 2001; Schieber and Saldaña 2009**). Ces molécules sont produites à différents endroits de la cellule, dans des parties spécifiques de la plante en fonction du stade de développement, soit durant le développement de la plantule, de la fleur, du fruit, de la graine ou durant la période post-récolte. Chez les végétaux, ces métabolites secondaires exercent une action déterminante dans le processus d'adaptation des plantes à leur environnement. Ils participent ainsi, de manière très efficace, à la tolérance des végétaux à des stress variés (attaques de pathogènes, prédateurs d'insectes, sécheresse, lumière UV...) (**Wink 1988; Maag et al. 2015; Pusztahelyi, Holb, and Pacsi 2015**). Les métabolites secondaires constituent la fraction la plus active des composés chimiques présents chez les végétaux. D'un point de vue appliqué, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on retrouve chez les plantes médicinales. On estime aujourd'hui qu'environ un tiers des médicaments actuellement sur le marché contiennent au moins une telle substance végétale (**Al-Ani et al. 2015; Newman and Cragg 2012**). On distingue classiquement trois grands groupes de métabolites secondaires en

fonction de leur nature biochimique et de leur origine biosynthétique: les composés phénoliques, les terpénoïdes et les alcaloïdes. Chacun de ces groupes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités tant chez la plante qu'en biologie humaine (**Clifford 2008**).

3-2-1-Les alcaloïdes

Cette famille de métabolites secondaires a été particulièrement étudiée du fait des enjeux économiques qui y sont associés. En effet, les alcaloïdes forment une grande famille de molécules chimiquement hétérogène. Leurs caractéristiques communes sont la présence d'au moins un atome d'azote et leur forte activité biologique. L'atome d'azote accepte souvent un proton, ce qui leur confère un caractère légèrement basique en solution (d'où leur nom d'alcaloïde). Dans leur grande majorité, les alcaloïdes sont hétérocycliques, bien que quelques composés azotés aliphatiques (non cycliques) comme la mescaline et la colchicine soient parfois classés dans les alcaloïdes. Les alcaloïdes provoquent chez l'homme diverses réponses physiologiques parce qu'ils interfèrent avec les neurotransmetteurs. A forte dose la plupart des alcaloïdes sont très toxiques, par contre à faible dose ils peuvent avoir une valeur thérapeutique (**Roberts 2013**). Leurs actions biologiques les placent également au cœur de phénomènes d'interactions de défense face aux pressions biotiques (herbivores, microorganismes). Il existe une très grande diversité de sous-familles d'alcaloïdes, qui ont été classés en fonction de leurs origines biosynthétiques et de la nature des hétérocycles azotés. La plupart des alcaloïdes sont dérivés d'acides aminés tels que le tryptophane, L'ornithine, la lysine, l'aspartate, l'anthranilate, la phénylalanine et la tyrosine. Ces acides aminés sont décarboxylés en amines et couplés à d'autres squelettes carbonés (**Panchaud et al. 2004; Levinson 1976**). Les seuls alcaloïdes glycosylés sont les alcaloïdes stéroïdiens; les glycoalcaloïdes dont le squelette carboné est dérivé des terpènes. On retrouve ces molécules chez les solanacées, avec par exemple la solanine, et la chaconine qui sont des composés toxiques présent dans les tubercules la pomme de terre, ou la tomatine impliquée dans la résistance de la tomate à certains pathogènes.

3-2-2-Les glycoalcaloïdes (GA) de la pomme de terre

Les GA de la pomme de terre sont majoritairement représentés (90 à 95%) par deux composés ; l' α -solanine et l' α -chaconine. Ces molécules synthétisées au cours du métabolisme secondaire de la pomme de terre, sont des hétérosides constitués d'une génine stéroïdique en C27 appelée solanidine et d'une partie osidique (**figure 13**)

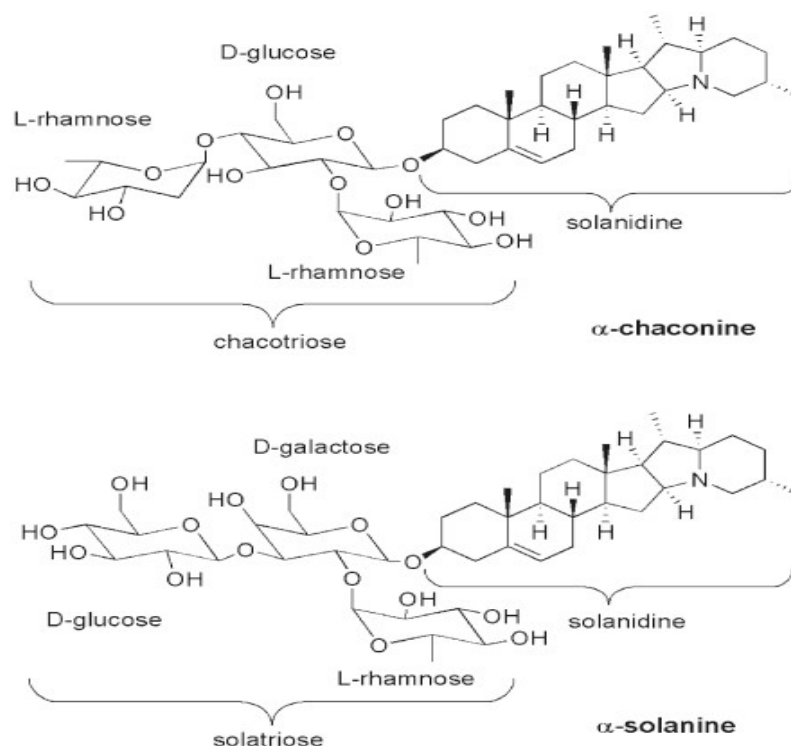


Figure 13: Structure de l' α -solanine et de l' α -chaconine

La glycosylation affecte leurs propriétés biologiques (propriétés pharmacologiques) et leur confère des pouvoirs toxiques. Ces molécules constitueraient un moyen de défense pour la pomme de terre contre les agressions par les insectes, champignons, virus etc....) (**Jadhav, Sharma, and Salunkhe 1981; Tingey 1984; Sarquís et al. 2000**). En effet, ces molécules surtout la chaconine, compromettent la structure et l'intégrité des cellules des prédateurs et des pathogènes. L'action synergique de la chaconine et de la solanine accentue encore la dissolution des membranes cellulaires (**Kuo, Chao, and Lu 2012; Keukens et al. 1995**). Les GA peuvent aussi être responsables de graves intoxications alimentaires chez l'homme d'où la nécessité de contrôler leur taux depuis la récolte jusqu'à la consommation. En général, on trouve les GA dans toutes les parties vertes de la plante; dans les feuilles, les bourgeons, ainsi que dans les fruits et les fleurs. La quantité de ces composés est plus ou moins importante

selon l'organe. Des teneurs élevées sont rencontrées dans les fruits (0,2-1 g/kg), les feuilles (0,2-1 g/kg), les fleurs (2-5 g/kg) et surtout les germes (parfois plus de 5 g/kg). Dans des conditions normales, les tubercules de pommes de terre fraîchement récoltés non pelés n'en renferment que de faibles quantités 20-150 mg/kg de masse fraîche pour la plupart des variétés (**Coxon 1981**). Les GA sont concentrés dans la peau des tubercules (300-600 mg/kg) et les couches cellulaires sous-jacentes. En outre, certains facteurs induisent une augmentation des teneurs en GA, la teneur pouvant ainsi passer de 150 mg/kg de matière fraîche à plus de 700 mg/kg pour certaines variétés (**Tajner-Czopek, Jarych-Szyska, and Lisińska 2008; Percival and Dixon 1996**). En effet, la concentration de ces composés dans le tubercule varie en fonction de la température et de la luminosité (**Percival and Baird 2000; Machado, Toledo, and Garcia 2007; Dale et al. 1993**). D'autres facteurs peuvent aussi influencer le taux de GA total, comme le degré de maturité, certaines pratiques culturales, les conditions de conservation, les dommages physiques subis par les tubercules. Le facteur le plus important étant le verdissement consécutif à l'exposition à la lumière (**Phillips et al. 1996**).

3-2-2-1-Facteurs influençant les concentrations en GA de la pomme de terre

La variation du taux des GA est d'abord fonction du cultivar de pomme de terre ensuite de l'apport en azote, des conditions environnementales (exposition à la lumière, l'humidité, la température) de l'état physiologique de la plante, et des blessures mécaniques et biotiques subies par la plante (**Friedman and McDonald 1997**)

a-Le cultivar

Les critères qui définissent la qualité de la pomme de terre selon son champ d'utilisation, sont sous la dépendance de plusieurs facteurs, dont en premier la génétique de la plante. Etant donné que les cultivars de pomme de terre répondent très différemment aux conditions de culture et aux fertilisants avec des durées de croissance différentes, la composition chimique des tubercules varie selon le cultivar (**Sanford et al. 1992; Sinden, Sanford and Webb 1984**). Il existe des variétés plus riches en GA que d'autres. Compte tenu qu'aujourd'hui environ 3000 variétés de pommes de terre sont commercialisées dans le monde, la teneur en GA de beaucoup d'entre elles reste toujours inconnue. En outre, les espèces sauvages de

pomme de terre contiennent généralement des teneurs plus élevées en GA (Tajner-Czopek, Jarych-Szyska and Lisińska 2008).

b-Les conditions de culture et de récolte

Il est fortement recommandé d'adopter une approche reposant sur une combinaison de moyens culturaux et chimiques bien adaptée à chaque type de cultivar afin d'obtenir des pommes de terre de qualité. Chez *Solanum tuberosum*, (cultivar le plus consommé), il faut habituellement appliquer de l'azote, du phosphore et du potassium pour obtenir une croissance optimale et des tubercules de bonne qualité avec un bon rendement. Ces applications permettent aussi de réduire les teneurs en GA (Hepburn and Matthews 1985; Giroux and Royer 2007). En général, chez la plupart des cultivars, l'azote est le nutriment dont la carence risque le plus de réduire la production de pommes de terre car son apport est indispensable pour assurer le grossissement des tubercules. Par contre, un apport excessif peut aussi être néfaste. En effet, il a été démontré qu'une dose d'azote plus élevée que la normale augmenterait non seulement la teneur en GA des tubercules, car favorisant le développement de la végétation, au détriment de la tubérisation tout en diminuant le rendement de la production (des défauts comme les cœurs creux et les cœurs bruns) et la densité spécifique des tubercules. La culture de la pomme de terre est également fonction des conditions climatiques. Si les conditions de culture sont mauvaises ou extrêmes (périodes de pluie fréquentes, sécheresse...), les pommes de terre peuvent renfermer plus de GA que d'habitude. On a souvent recours à l'irrigation pour contrôler le taux d'humidité, et le buttage afin de protéger les tubercules en développement de la lumière. Ces pratiques permettent d'éviter le verdissement qui entraîne une augmentation du taux de GA, les rendant ainsi impropres à la consommation. Ces procédés facilitent aussi le drainage et la récolte (Morris 1966; Ojala, Stark, and Kleinkopf 1990; Oraby, Lachance, and Desjardins 2015; Ekelöf et al. 2014; Hussey and Stacey 1984; Giroux and Royer 2007; Hepburn and Matthews 1985). La récolte doit se faire en évitant les coups et les blessures qui sont aussi des facteurs importants dans l'augmentation de la teneur en GA.

c-La maturité

Les tubercules de pomme de terre récoltés prématurément renfermeraient plus de GA que lorsqu'ils sont récoltés à maturité. Il a également été montré que pour une même variété, la

teneur en GA diminuait avec l'augmentation de taille de la pomme de terre (**Papathanasiou, Mitchell, and Harvey 1999; Nema et al. 2008; Davies and Blincow 1984**).

d-Les conditions de stockage

Pour garantir une pomme de terre de bonne qualité avec peu de GA au moment de la récolte, la conservation des tubercules doit être réalisée selon des conditions bien définies de température, de lumière et d'humidité. Si les tubercules sont conservés à des températures élevées (25°C), la teneur en GA a tendance à augmenter (**Machado, Toledo, and Garcia 2007**). Dans le cas de certaines variétés, l'exposition du tubercule à la lumière est responsable d'une augmentation importante de la teneur en GA, atteignant parfois des valeurs impropres à la consommation. Habituellement, la lumière induit également une augmentation de la teneur en chlorophylle, se traduisant par le verdissement du tubercule. Selon plusieurs études, il semblerait qu'il n'y ait pas de corrélation entre ces deux phénomènes (**Dale et al. 1993; Dao and Friedman 1994; Percival, Dixon, and Sword 1996; Percival 1999; Papathanasiou, Mitchell, and Harvey 1999; Nema et al. 2008**).

3-2-2-2-Toxicité des GA de la pomme de terre

De nombreuses études ont été effectuées pour élucider les effets toxicologiques, embryotoxiques, tératogènes et genotoxiques des GA. L'intoxication par les GA se manifeste dans le cas le moins grave par des maux de tête et des troubles gastro-intestinaux aigus avec diarrhée, vomissements et douleurs abdominales. Une intoxication plus sévère peut par contre, conduire à des signes d'atteinte neurologique (vertiges, tremblements, perturbations de la vue, confusion) et le cas échéant atteinte du système nerveux central pouvant entraîner la mort dans certains cas (**Hellenäs et al. 1992; Friedman and McDonald 1997; Slanina 1990**). On estime qu'une quantité de 0,4 à 0,6 mg par kg de masse corporelle donne des nausées, que 2,5 mg/kg devient toxique et que des valeurs approchant les 3,6 mg/kg donnent la mort (**Friedman and McDonald 1997; Slanina 1990; Morris and Lee 1984**). L'activité biologique des GA repose tout d'abord, sur leur capacité à se complexer avec les 3- β -hydroxystéroïls membranaires, entraînant une rupture de l'intégrité de la membrane et de ses fonctions, ainsi que sur leurs capacités inhibitrices de l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase. Ces enzymes catalysent l'hydrolyse du neurotransmetteur acétylcholine

en choline et acide acétique, une réaction nécessaire pour permettre à un neurone cholinergique de revenir à son état de repos après l'activation (**Ginzberg et al. 2012; Bushway, Savage, and Ferguson 1987; Dibucaine 1996; Benilova et al. 2006; McGehee et al. 2000; Roddick, Weissenberg, and Leonard 2001**). Les GA contenant le chaconose présentent généralement une forte activité de lyse membranaire contrairement aux GA basés sur le solanose souvent totalement dépourvus d'une telle activité. Ce qui rendrait la chaconine plus toxique que la solanine (**Roddick, Weissenberg, and Leonard 2001; Keukens et al. 1992; Keukens et al. 1995**). En revanche, ces deux types de GA montrent des propriétés anti-acétylcholinestérasiques similaires (**Roddick, Weissenberg, and Leonard 2001**). De nombreuses études ont été effectuées ces dernières années sur divers animaux afin d'élucider les effets embryotoxiques et tératogènes (l'induction d'anomalie au niveau du tube neural) des GA (**Crawford and Kocan 1993; Crawford and Myhr 1995; Moser and Rayburn 2007; Friedman, Rayburn, and Bantle 1991; Wang 1993**). Dans une expérimentation menée par **Wang (1993)**, un extrait de germe de pomme de terre renfermant 80% de GA (α -solanine et α -chaconine dans un rapport 1,5:1) a été administré à des souris Kunming, des effets tératogènes et toxiques sur l'embryon ont été observés. Selon cet auteur, les GA de la pomme de terre pourraient de toute évidence affecter le développement des embryons et conduire à un retard de la croissance intra-utérine. Il a également observé chez la souris qu'une administration de GA de la pomme de terre, par voie intra-abdominale lors du 5e ou du 6e jour de gestation, induisait des pertes de sang au niveau vaginal et la perte du fœtus (**Wang 1993**). Des mélanges à différentes concentrations d' α -chaconine et d' α -solanine avec des rapports situés entre 3:1 et 1:20 ont été utilisés *in vitro*, pour tester la tératogénicité des GA sur l'embryon de la grenouille (Test Xenopus). Tous ces mélanges ont été responsables soit de mortalité, soit de malformation. Une action synergique a également été constatée; il n'y aurait pas de lien entre la synergie et le rapport de concentration α -chaconine/ α -solanine (**Moser and Rayburn 2007**). D'autres tests *in vitro* sur l'embryon de la grenouille (Test Xenopus) ont montré que l' α -chaconine était tératogène et plus embryotoxique que l' α -solanine (**Friedman, Rayburn, and Bantle 1991**). Des auteurs ont également observé des anomalies crâniennes dans certaines études de tératogénicité chez le hamster à des concentrations de 165-200 mg de GA par kg de poids corporel par jour ((**Baker, Keeler, and Gaffield 1989**)). Concernant la lyse membranaire, les expériences réalisées *in vitro* sur la peau d'une grenouille ont montré que les GA induisent spécifiquement des effets perturbateurs des membranes au niveau de cellules renfermant le cholestérol (suite à la formation d'un complexe GA-stérol au niveau de la membrane). L' α -chaconine diminue

sélectivement la communication intercellulaire se faisant au niveau des trous de jonction (Keukens et al. 1995; Keukens et al. 1992). *In vitro*, l' α -solanine et l' α -chaconine dépolarisent le potentiel membranaire Na^+/K^+ des embryons de la grenouille (Blankemeyer, Atherton, and Friedman 1995); l' α -solanine et surtout l' α -chaconine modifient le transport actif des ions sodium au niveau de l'épithélium (Blankemeyer, Atherton, and Friedman 1995). Des études dans le même sens ont été réalisées sur des hamsters nourris avec des extraits alcaloïdiques de germes de pomme de terre. Au bout de quelques jours, les hamsters présentaient de sévères nécroses au niveau des muqueuses gastrique et intestinale principalement au niveau de l'estomac, du duodénum et du jéjunum (D. Baker, Keeler, and Gaffield 1987; Keeler, Baker, and Gaffield 1990).

3-2-2-3-Etude sur l'homme

Chez l'homme, l'ingestion de GA à des doses supérieures à 2 mg/kg de poids corporel peut conduire à une intoxication sévère pouvant conduire à la mort. L' α -solanine et l' α -chaconine (GA majoritaire de la pomme de terre) sont aussi efficaces l'un que l'autre dans l'inhibition du neurotransmetteur acétylcholinestérase, ils ont aussi une action hémolytique et provoquent la lyse des érythrocytes humains (Ginzberg et al. 2012; Bushway, Savage, and Ferguson 1987; Dibucaine 1996; Benilova et al. 2006; McGehee et al. 2000; Roddick, Weissenberg, and Leonard 2001). Quelques décès attribués à l'exposition aux GA issus de la pomme de terre ont été signalés dans la littérature. Ces intoxications dans la plupart des cas ont fait suite à une consommation de pommes de terre verdies, en germination ou en décomposition contenant de fortes concentrations de solanine ou de chaconine. Déjà en 1924, selon le site (Phys.org 2013) la revue Science a rapporté un cas mortel d'empoisonnement par des pommes de terre; James Matheney un agriculteur a récolté ses pommes de terre. Il a amassé environ 40 kg de tubercules qui sont ensuite devenues vertes après avoir été exposées au soleil. Deux jours après avoir mangé ces pommes de terre, la plupart des membres de la famille (sa femme, deux filles et quatre fils) ont développé des symptômes d'empoisonnement. Seul le concerné lui-même, qui n'avait pas touché aux pommes de terre, et un bébé nourri au sein n'ont pas été intoxiqués. Sa femme âgée de 45 ans est morte un mois plus tard, suivie par sa fille de 16 ans. Les autres membres de la famille ont survécu. McMilan et Thompson en 1979 ont fait état de 78 écoliers qui sont tombés malade après avoir consommé des pommes de terre. Les pommes de terre crues restant ont été analysées et

contenaient environ 330 mg de GA/kg de pomme de terre. Dix-sept garçons ont dû être hospitalisés. Les symptômes les plus courants étaient des nausées, des vomissements, de la diarrhée, des douleurs abdominales, de la fièvre, et l'étourdissement (**McMillan and Thompson 1979**). Le taux de cholinestérase dosé dans le plasma était extrêmement faible. Hellenas et al ont menés des expériences sur des volontaires en 1992; les sujets ont reçu des quantités de pommes de terre contenant des GA à un taux de 200 mg/kg de pommes de terre, avec les proportions respectives de 118 mg/kg de l' α -chaconine et 82 mg/kg de l' α -solanine. Cette quantité correspondant à 1,0 mg/kg de poids corporel pour chaque sujet. Six des volontaires ont eu une sensation de brûlure de la bouche, des nausées sévères, avec un cas de diarrhée, 1 à 2 h après avoir mangé les pommes de terre. Les expériences repris avec sept volontaires ont donné des résultats similaires. Les symptômes ont commencé après 30 min et ont duré 4 h de temps. La demi-vie biologique de l' α -solanine a été estimée à environ 10 h et celle du l' α -chaconine à 19 h. Les concentrations plasmatiques des GA dosées allaient de 3 à 11 ng/ml pour l' α -solanine et de 6 à 21 ng/ml pour l' α -chaconine. Une faible concentration de solanidine (inférieure à 4 ng/ml) a été détectée. Les auteurs suggèrent que l'apparition rapide et de courte durée des symptômes peuvent être dues à des effets locaux sur l'intestin (**Hellenäs et al. 1992**). En 1984, dans le Canadian Diseases Weekly Report, Anon mentionne le cas d'un empoisonnement collectif concernant 60 écoliers et enseignants sur un total de 109 cas. Ces personnes ont présenté des signes d'intoxication peu de temps après avoir consommé des pommes de terre riches en GA (**Anon 1984**). D'autres incidents d'intoxication collectifs ont été également signalés. Par exemple, le cas des enfants d'une école du sud-est londonien qui ont été hospitalisés après une intoxication aux GA. Tous souffraient de troubles digestifs; les douleurs sont apparus 7 à 19 h après l'ingestion, suivie de vomissements et de diarrhée non sanglante prolongé (allant de 1 à 6 jours). La fièvre dépassait les 38,5°C. Douze enfants étaient dans un état confusionnel ou délirant, 4 ont eu des hallucinations, 7 ont eu des céphalées. La plupart étaient agités avec des moments de somnolence. Les plus atteints avaient une respiration très rapide (38-48/min) et une pression systolique faible (60 mm) ou non mesurable. Huit enfants ont été perfusés. Les symptômes ont durés 6 à 11 jours. Après leur sortie de l'hôpital, certains se sont plaints de troubles visuels (**McMillan and Thompson 1979**). Les pommes de terre (épluchées) consommées contenaient 25-30 mg/ de GA par 100 g de pomme de terre. Une récente étude menée sur des volontaires humains a démontré que la consommation quotidienne de produits de pommes de terre peut causer une accumulation de GA (α -solanine et α -chaconine) (**Mensinga et al. 2005**). Ses études ont été menées sur des sujets qui ont reçus de la pomme de terre sous forme de purée contenant des doses de GA

allant de 0,30, à 0.70 mg/kg de poids corporel. Quatre heures après l'ingestion, un sujet a commencé à manifester des signes d'intoxication alors qu'il n'avait reçu que 1,25 mg de GA/kg de poids corporel largement en dessous du seuil de toxicité. Les auteurs ont conclu à une possible accumulation des GA dans l'organisme. Morris et Lee (1984) estime que 2-5 mg/kg de poids corporel serait toxique, tandis qu'une dose d'environ 3-6 mg/kg de poids corporel serait mortelle (**Morris and Lee 1984**). A l'heure actuelle, la limite maximale de GA totaux pouvant être ingérée, préconisée par les différentes agences de sécurité alimentaire, FAO/OMS est fixée à environ 10-200 mg de GA totaux/kg de matière fraîche. Certains auteurs pensent que de nombreuses intoxications mineures aux GA de la pomme de terre ne sont pas différenciées d'une gastro-entérite passagère et restent de ce fait inconnues.

3-2-2-4-Structure des GA

Différents GA sont produits dans toutes les parties de la pomme de terre, des racines aux tubercules (**figure 12**). Cependant, les principaux GA retrouvés dans la pomme de terre sont l' α -solanine et l' α -chaconine qui représentent 95% des GA totaux. Le GA prédominant est l' α -chaconine. Ces deux GA issus de la métabolisation du cholestérol présentent des structures chimiques proches. Ils sont constitués de trois entités structurales. Une fraction osidique soluble, constituée d'un trisaccharides, liée en C-3 à une fraction non polaire la solanidine composée d'un stéroïde lipophile associé à un hétérocycle azoté (**Friedman and McDonald 1997**). La chaîne latérale oligosaccharidique hydrophile, liée à la solanidine est composé d'un β -chacotriose ramifié ((α -L-rhap(1-2)[α -L-rhapGlc(1-2)] β -D-glucopyranyl) dans le cas de l' α -chaconine tandis que l' α -Solanine est constituée d'une β -solatriose ramifié ((α -L-rhap(1-2)[β -D-Glc(1-3)] β -D-galactopyranosyl).

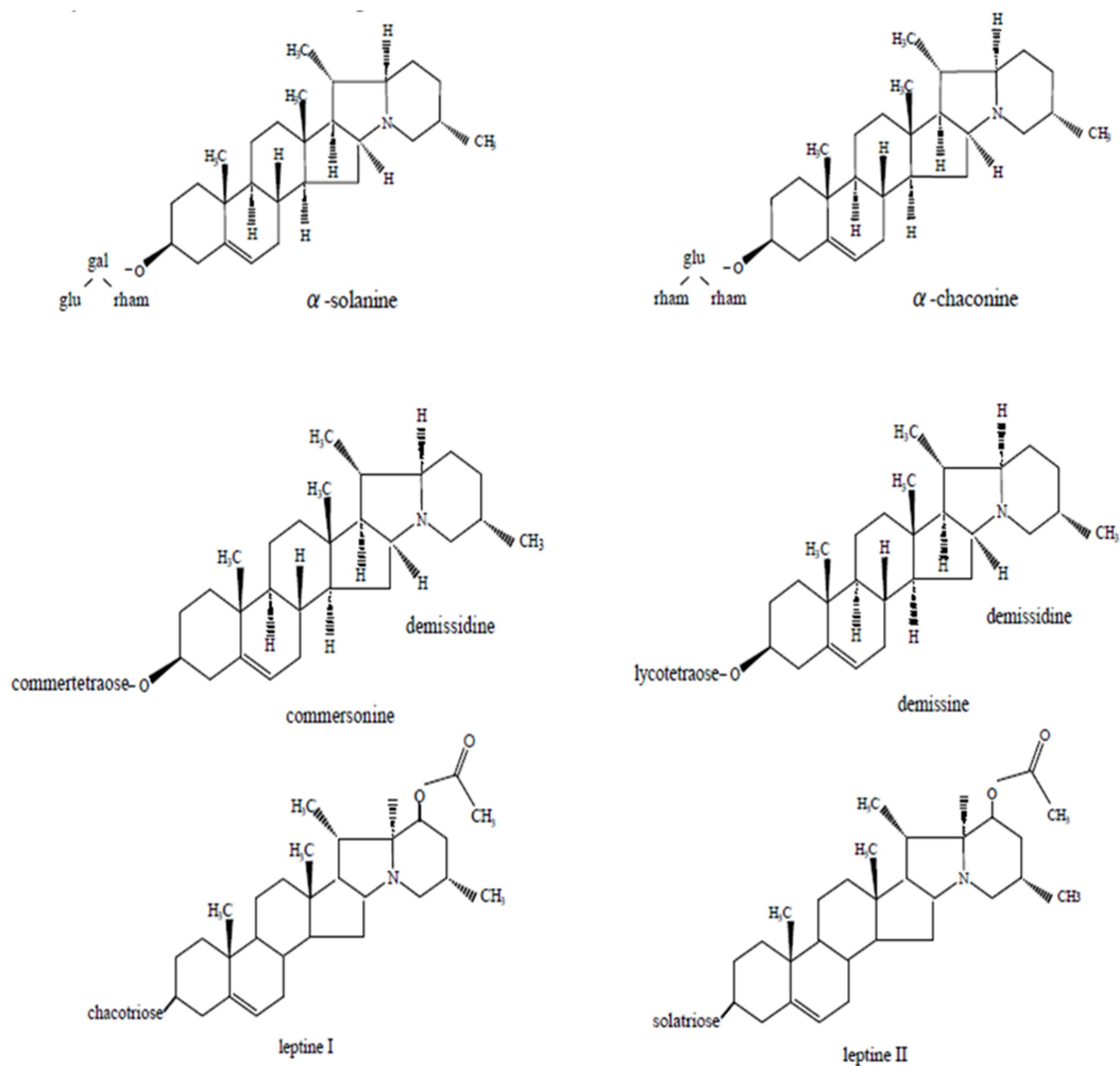


Figure 14: Glycoalcaloïdes de la pomme de terre *Solanum tuberosum*

3-2-2-5-La biosynthèse des GA de la pomme de terre

La synthèse des GA commence pendant la germination. Elle emprunte la voie générale de la biosynthèse des stéroïdes. Récemment, **Petersson et al. (2013)** ont montré que le cholestérol est le précurseur dans la biosynthèse des GA. A partir de l'acétyl-coenzyme A, la biosynthèse passe par la voie des sesquiterpènes jusqu'au cholestérol (**figure 15 et 16**). La solanidine formée par la suite est un hétérocycle azoté dont l'azote pourrait provenir de la L-arginine, la glycine ou l'alanine (**figure 16**) (**Aliferis and Jabaji 2012**).

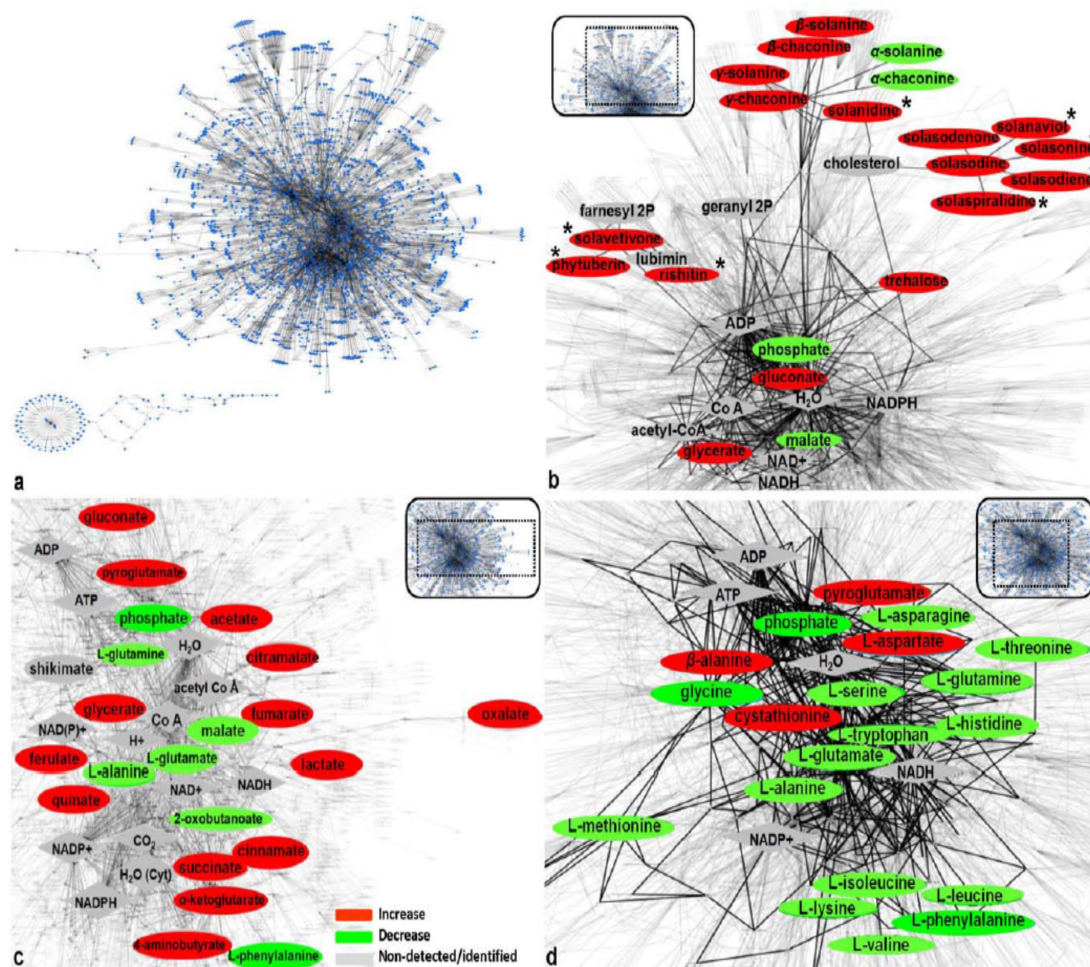


Figure 15: Différentes voies et métabolites impliqués dans la biosynthèse des GA de la pomme de terre *Solanum tuberosum* (Aliferis and Jabaji 2012)

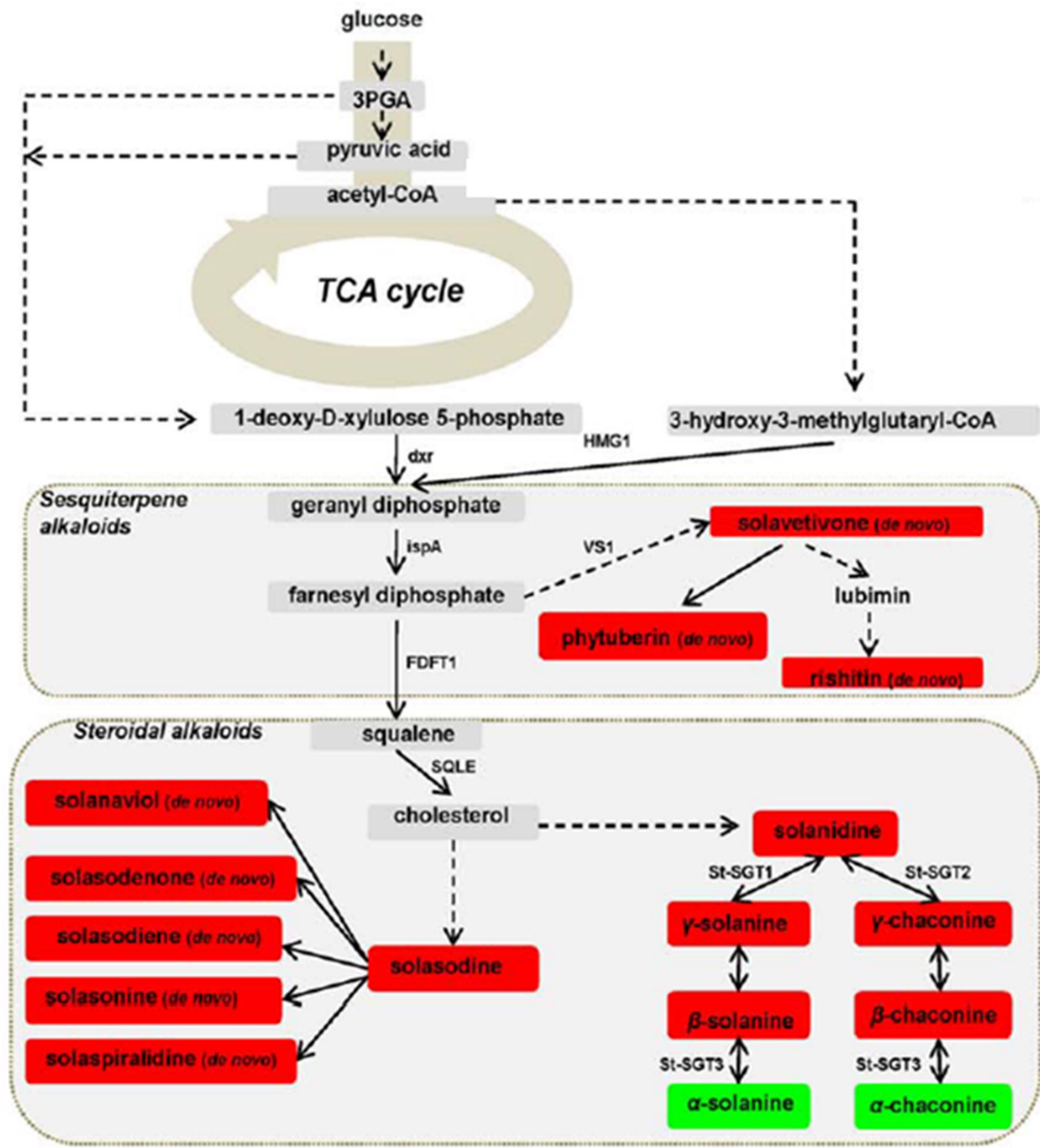


Figure 16: Biosynthèse des glycoalcaloïdes Aliferis and Jabaji 2012)

La solanidine est ensuite glycosylée par l'UDP-galactose:solanidine galactosyltransferase (SGT1) pour conduire à la formation de γ -solanine (3) ou par l'UDP-glucose:solanidine glucosyltransferase (SGT2) pour libérer la γ -chaconine (4) (McCue et al. 2006). La biosynthèse de la chaconine se termine par l'ajout du rhamnose catalysé par l'enzyme UDP-rhamnose: β -steroidal glycoalkaloid rhamnosyltransferase aux deux molécules. Après la synthèse, les glycoalcaloïdes s'accumulent dans la phase soluble du cytoplasme et / ou dans les vacuoles (McCue et al. 2007).

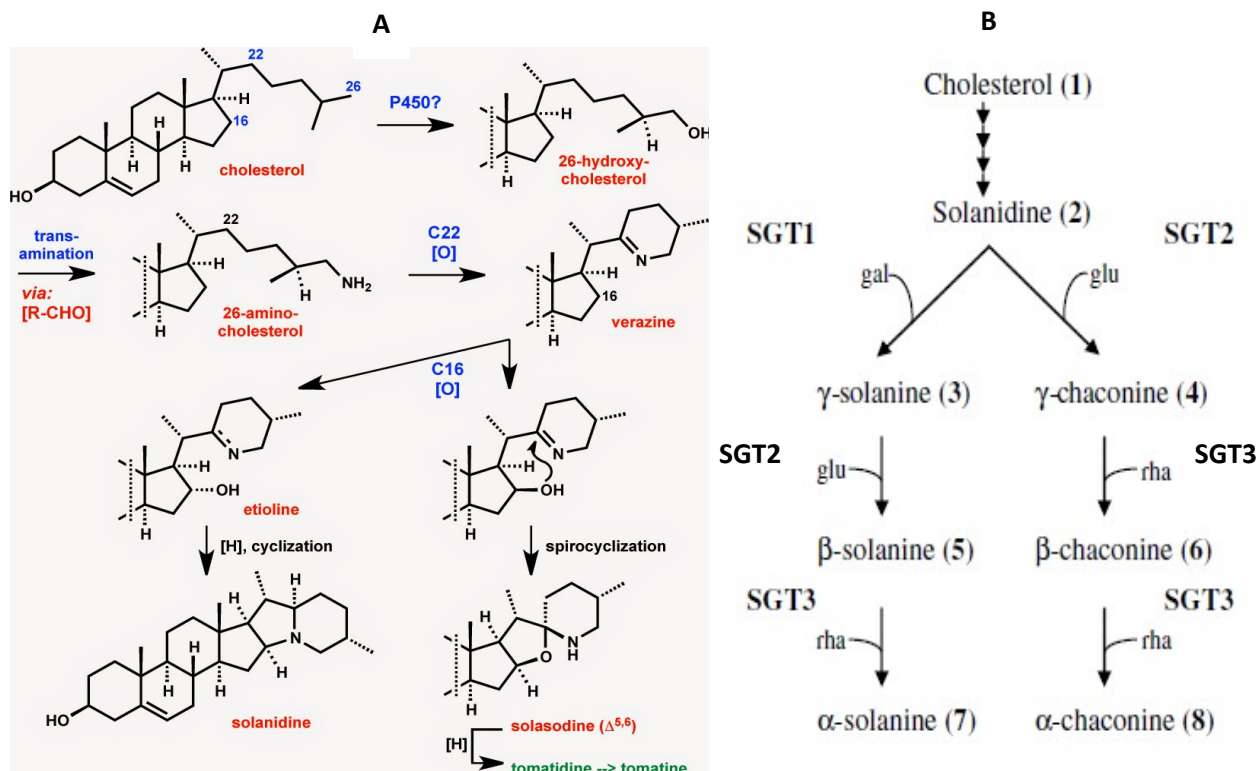


Figure 17: Etapes intervenant dans la synthèse des GA (A) Biosynthèse de la solanidine à partir du cholestérol (B) Glycosylation de la solanidine: SGT1–UDP-galactose:solanidine galactosyltransférase, SGT2–UDP-glucose:solanidine glucosyltransférase, et SGT3–UDP-rhamnose; β -steroidal glycoalkaloid rhamnosyltransferase

IV-Résumé des travaux antérieurs

4-1-Résumé des travaux antérieurs effectués sur l'extraction et l'hydrolyse des GA de la pomme de terre

La plupart des travaux antérieurs dans la littérature se sont concentrés principalement sur la mise au point des méthodes d'extraction, l'étude de la toxicité des GA et sur l'évaluation de la teneur de ces composés dans les pommes de terre destinées à la consommation. A l'issue de ces travaux antérieurs une méthode standard d'extraction et d'analyse des GA de pommes de terre a été rapportée par l'Association des chimistes analytiques officiels (AOAC) (AOAC 2000). Dans ce procédé, l'extraction est réalisée à l'aide d'un mélange d'acide acétique-eau-acide bisulfurique (100: 5: 0,5 v / v / p). En utilisant cette méthode, **Sotelo and Serrano**

(2000) ont analysés la teneur en GA dans la chair et la peau de 12 différentes variétés de pomme de terre mexicaines fraîchement récoltées. La même méthode a ensuite été employée par **Eltayeb, Al-sinanp and Khan (2003)** et **Knuthsen et al. (2009)** pour analyser les teneurs en GA des pommes respectivement dans 18 variétés de pommes de terre cultivées en Oman et dans de nombreuses variétés de pommes de terre Danois. Si la plupart de ces études ont été effectuées sur la chair et la peau des pommes de terre fraîchement récoltées destinées à la consommation des populations, aucune étude n'a été effectuée à ce jour sur les pommes en décomposition. Aussi dans la présente étude l'analyse des GA sera effectuée principalement sur les pommes de terre en décomposition. Les GA font partie de la famille de composés glycosides issus de la condensation d'un ose avec un composé non-glucidique appelé la génine ou encore fraction aglycone synthétisée au cours du métabolisme secondaire de la pomme de terre. La glycosylation affecte leurs propriétés biologiques et leur confère des pouvoirs toxiques (**Rayburn, James, Bantle, and Friedman 1994**). Cependant, la chaîne latérale oligosaccharidique reliée à la solanidine est sensible à une hydrolyse acide ou enzymatique. Ainsi, l'hydrolyse des GA par des procédés chimiques ou enzymatiques a été développée dans la littérature (**Attoumbré, Giordanengo, and Baltora-Rosset 2013; Filadelfi and Zitnak 1983; Jensen et al. 2009; Nikolic and Stankovic 2005; Nikolic and Stankovic 2003; Oda et al. 2002**). Il ressort selon l'analyse comparative menée par **Nada, Nikolic, and Mihajlo (2006)** que ces deux méthodes présentent des avantages et inconvénients. L'hydrolyse chimique des GA de pomme de terre nécessite l'utilisation d'une forte concentration d'acide et d'une température assez élevée (10% d'acide chlorhydrique pendant 2 h à 75°C). Le plus souvent, dans ces conditions extrêmes la réaction est favorisée du côté de la déshydratation de la solanidine en un composé secondaire indésirable la solanthrene ce qui n'est probablement pas l'objectif visé tel que démontré par **Attoumbré, Giordanengo, and Baltora-Rosset (2013)**. Le défi consiste donc à créer des conditions qui pourraient entraîner l'hydrolyse totale des GA tout en empêchant la formation de la solanthrene; ce qui paraît pratiquement impossible du point de vue chimique. Malgré les inconvénients de l'hydrolyse chimique, cette méthode est souvent préférée à l'hydrolyse enzymatique qui prend plus de temps (72 à 96 h) et qui reste souvent partielle. Cependant, cette méthode reste le moyen le plus économique et le plus simple pour obtenir la solanidine. Selon les expériences menées jusque-là, il ressort que l'obtention de la solanidine à partir de l'hydrolyse des GA en tenant compte de ces deux contraintes (moins de temps et la prévention de la formation de la solanthrene) est très difficile et nécessite de nombreuses expériences (**Nada, Nikolic, and Mihajlo 2006**). En tenant compte des expériences menées dans la

littérature, et afin d'améliorer l'obtention de la solanidine dans de meilleures conditions, nous essayerons de développer une méthode combinant la méthode chimique et enzymatique afin d'hydrolyser la chaîne latérale oligosaccharidique reliée à la solanidine pour produire la solanidine qui est un précurseur important pour la synthèse des hormones telles que la progestérone, la testostérone la cortisone et certains composés pharmacologiquement actif (Vronen, Koval, and Groot 2003; Vronen 2003).

4-2-Résumé des travaux antérieurs effectués sur la β -glycosidase de la blatte *Periplaneta americana*

Due, Kouadio, and Kouame (2008) ont effectués une caractérisation partielle et la distribution des activités osidasiques de l'extrait brut enzymatique de la blatte *Periplaneta americana*. Lors de ces travaux, ces auteurs ont mis en évidence la présence d'une β -glycosidase possédant une activité spécifique de 0,51 UE un pH optimum compris entre 4,6 et 5 et une température optimale comprise entre 50 et 60°C. Dans la présente étude, la purification et la caractérisation biochimique de cette protéine seront effectuées dans un premier temps, puis la construction d'une banque de cDNA sera effectuée en vue du repérage et la surexpression du gène codant pour cette protéine. Au cours de la réalisation de ces travaux de thèse (**Tamaki et al. (2014)** ont également effectués une caractérisation moléculaire des enzymes digestives majeurs et le séquençage de l'ARNm extrait à partir de l'intestin moyen de cette blatte. L'analyse du transcriptome effectué a permis d'isoler la séquence du gène codant pour la β -glycosidase. Cette séquence a été déposée dans la base de données Pubmed sous le No d'accèsion GenBank: KJ576835. Dans la présente étude, le clonage et la surexpression de cette protéine à partir d'un gène synthétique sera effectuée en parallèle.

CHAPITRE II-MATERIEL ET METHODES

Chapitre II-Matériel et méthodes

I-Matériel

1-1-Matériel biologique

1-1-1-Matériel animal

La blatte *Periplaneta americana* a été récoltée dans les maisons et dans les égouts de la commune d'Adjamé (Abidjan, Côte d'Ivoire).

1-1-2-Matériel végétal

Trois types de pomme de terre ont été utilisés dans cette étude: Les pommes de terre verdies, les pommes de terre en décomposition et les pommes de terre en germination. Ces produits ont été achetés en l'état sur les marchés d'Abidjan.

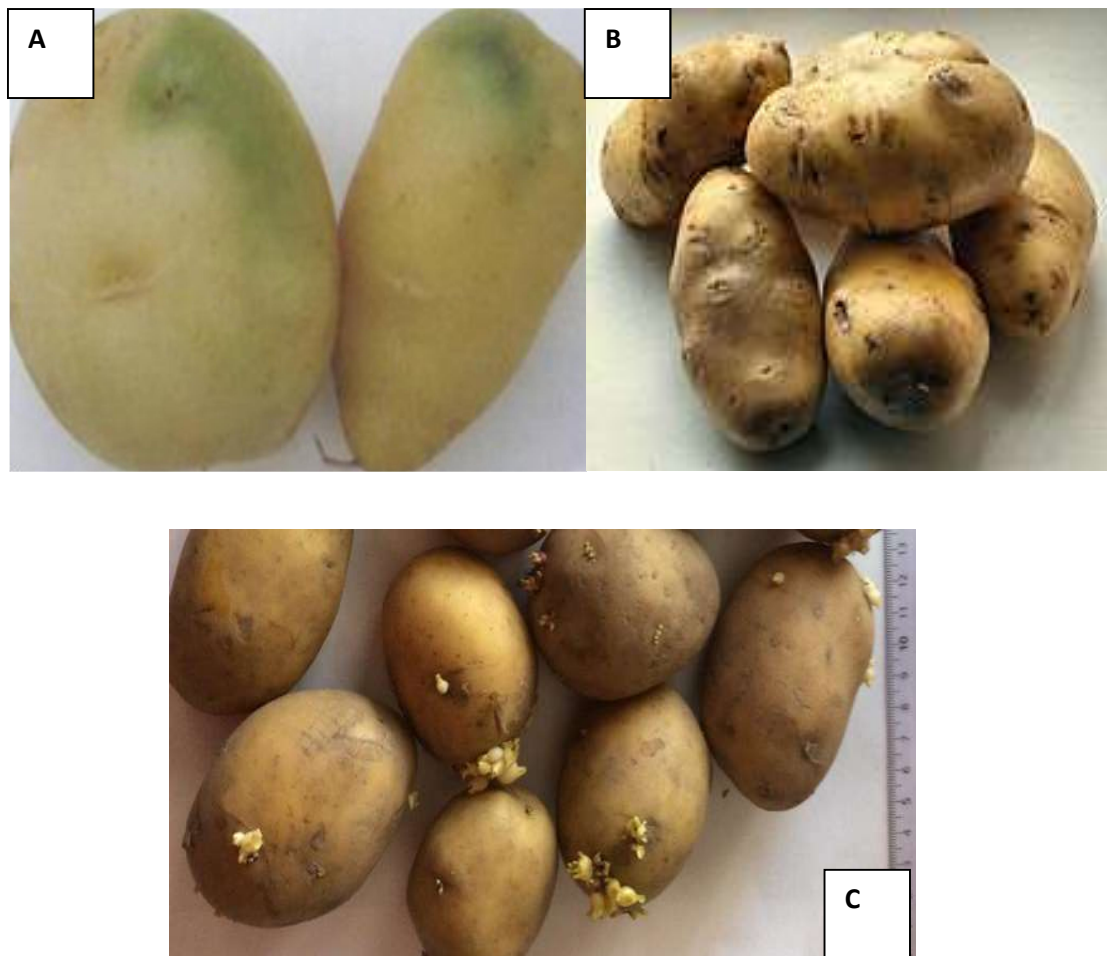


Figure 18: Photographie des différents types de pommes de terre utilisés dans cette étude (A) pommes de terre verdies (B) pommes de terre en décomposition (C) pommes de terre en germination

1-2-Plasmides, vecteurs et souches

1-2-1-Souches bactériennes

***E. coli* XL1 Blue**

Cette souche a été utilisée pour propager les phages λ Triplex2 ainsi que pour l'amplification de la banque. Elle est déficiente pour l'activité de restriction (hsdR-) mais comporte un système de méthylation actif (hsdM+). Les sites potentiels de restriction du phage par le système cre-lox sont méthylés pendant l'amplification de manière à ce que les recombinants puissent être utilisés pour infecter des souches d'*E.coli* présentant l'activité cre-lox recombinase.

Génotype : *endA1*, *gyrA96*, *hsdR17*, *lac*⁻, *recA1*, *relA1*, *supE44* *thi*-1, F'[F' *lacI*^qZ Δ M15, *proAB*, Tn10,TetR)].

***E. coli* BM25.8**

Cette souche disposant de l'activité *Cre*-recombinase a été utilisée pour l'excision et la recircularisation du plasmide pTriplex2 à partir du phage λ Triplex2 par le biais du système Cre-Lox.

Génotype : *SupE44*, *thi* Δ (*lac-proAB*) [*F'* *traD36*, *proAB*⁺, *lac*^qZ Δ M15] λ *imm434* (*kan*^R) P1 (*cam*^R) *hsdR* (*rK12*⁻*mK12*⁻).

***E.coli* BL21(DE3)**

Cette souche contient le lysogène DE3 comprenant le gène codant pour l'ARN polymérase T7 sous le contrôle du promoteur *lacUV5*. L'expression de l'ARN polymérase T7 est induite par l'IPTG. Elle a été utilisée pour l'expression de la protéine recombinante.

Génotype : F- *ompT* *hsdSB* (*rB*-, *mB*-) *gal dcm* (DE3).

***E. coli* C41(DE3)**

Souche dérivée de la souche BL21(DE3): hdsS gal (λ cIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gène1) plus deux mutations non caractérisées. Elle a été également utilisée pour l'expression de la protéine recombinante.

E. coli DH5 α

Cette souche est recombinaise-déficiente. Elle a été utilisée pour la croissance des plasmides.

Génotype : deoR, endA1, gyrA96, hsdR17(rk-mk+), recA1, relA1, supE44, thi-1,

Δ (lacZYA-argFV169), Φ 80lacZ Δ M15, F-

E. coli TOP10

Cette souche de bactérie a été utilisée pour la transformation des produits de la ligation des produits PCR dans le vecteur pet 28a.

Génotype : [F- mcrA -(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ_M15_lacX74 recA1 araD139 -(ara leu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG]

1-2-2-Souche de levure

***Yarrowia lipolytica* JMY1212**

Cette souche de la levure *Yarrowia lipolytica* contient une zone Zéta et un gène LEU2 reconstitué au locus leu2- Leu+, Ura- MatA ,ura 3-302, leu 2-270-LEU2 -zeta, xpr 2-322, lip2 :LEU2, Δ lip2 Δ lip7 Δ lip8 (**Bordes 2008**). Elle a été utilisée pour l'expression de la protéine d'intérêt.

1-2-3-Vecteurs

λ TriplEx2

Ce vecteur a été utilisé lors de la construction de la banque d'ADNc. Il permet la création de banque à forte concentration et la sélection des recombinants et régule l'expression du gène d'intérêt. De plus, la transformation de ce phagemide en plasmide est facilitée par le système d'excision/recircularisation Cre-lox (**Figure 19**).

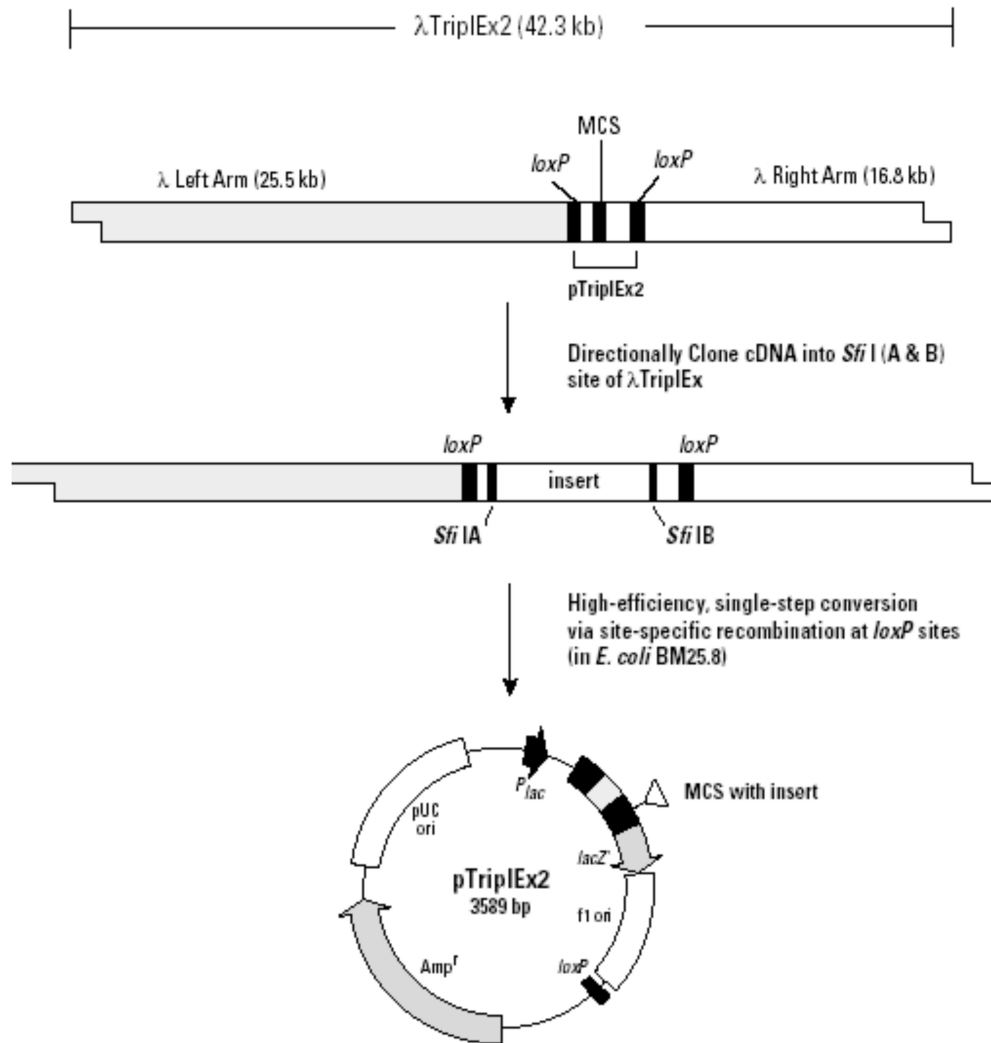


Figure 19: Excision du plasmide pTriplEx2 à partir du vecteur phagique λTriplEx2 (Clontech)

pTriplex2

Ce plasmide (**figure 20**), excisé du phagemide λTriplex2, est composé d'un promoteur et d'un opérateur lac d'*E.coli* permettant l'expression des inserts dans les souches d'*E.coli* exprimant le répresseur lacIq. La région non traduite UTR 5' du gène ompA d'*E.coli* permet la stabilisation des mRNA pour améliorer l'expression des gènes insérés. Le plasmide pTriplEx2 comprend une cassette de traduction dans 3 cadres de lecture faite des signaux d'initiation de la traduction des gènes ompA et lacZ d'*E. coli*, suivis des sites de terminaison de la transcription/traduction. En aval de cette cassette, le polylinker est placé au sein du peptide lac Z α permettant encore une fois un criblage blanc/bleu dans une souche appropriée. Le

gène de résistance à l'ampicilline et l'origine pUC de réplication permettent respectivement la sélection et la propagation du pTriplEx2 dans *E. coli*.

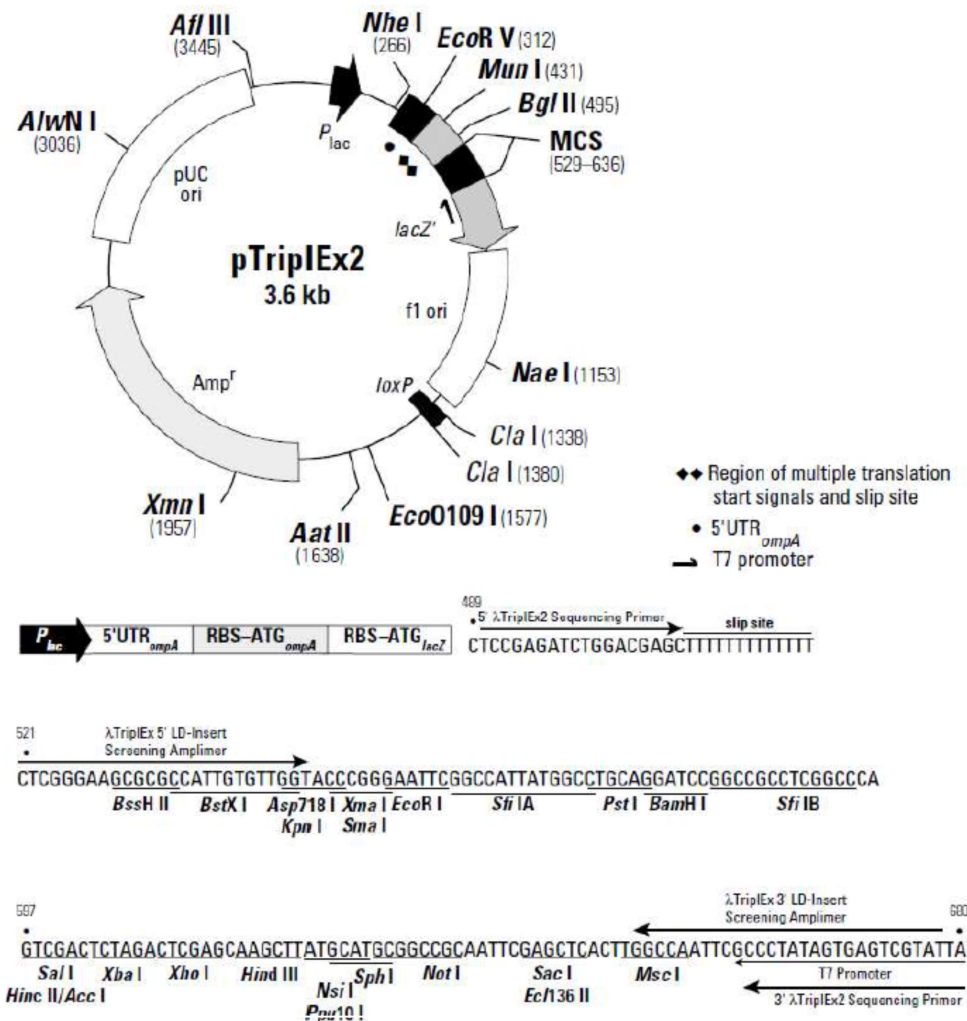


Figure 20: Carte physique du pTriplEx2 (Clontech)

pET-28a

Le plasmide d'expression pET-28a est équipé d'un promoteur T7 contrôlant l'expression du gène d'intérêt et nécessitant la présence de l'ARN polymérase T7 (dérive du bactériophage T7). Cette polymérase est transcrite via le génome de bactéries hôtes spécifiques (*E. coli* 134 BL21(DE3)) sous le contrôle d'un promoteur lac inductible par l'IPTG (**Figure 21**). L'addition d'IPTG dans le milieu de culture, entraîne l'expression d'ARN polymérase T7 via le génome de la bactérie, qui consécutivement aboutit à l'expression du gène cible. Le plasmide pET est flanqué, aux extrémités N et C terminales du gène d'intérêt, de deux séquences His-Tag permettant la purification de la protéine synthétisée sur colonne

chromatographique d'affinité. Un gène conférant la résistance à la kanamycine permet de sélectionner les bactéries transformées. Ce plasmide a été utilisé pour l'expression du gène d'intérêt dans les différentes souches *E.coli* compatibles.

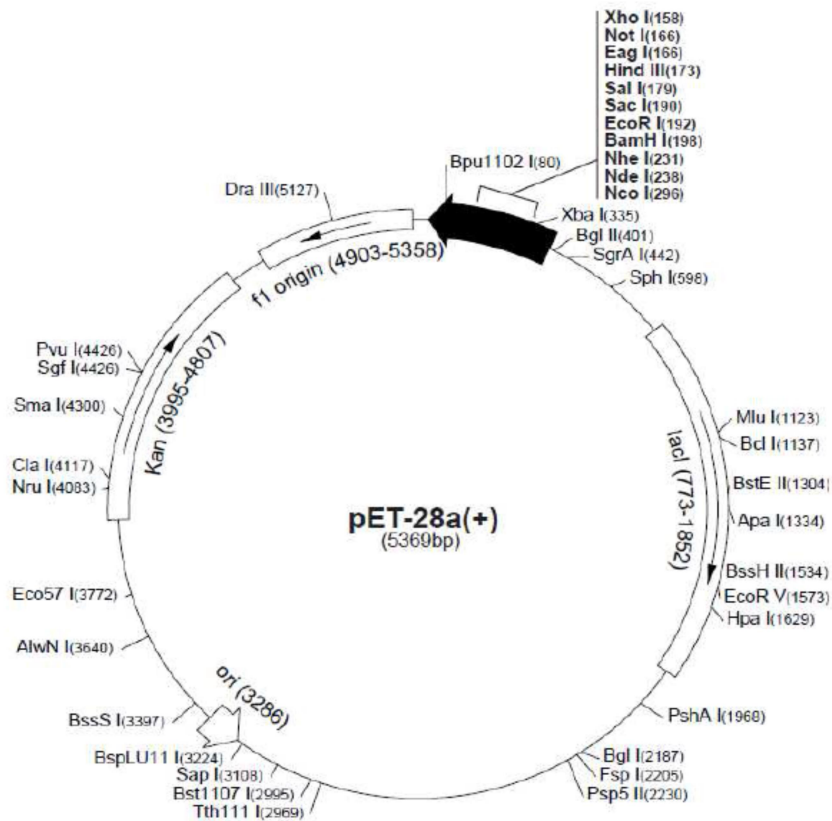


Figure 21: Carte physique du plasmide pET-28a (Novagen)

JMP60

Le vecteur navette JMP60 est un vecteur navette entre *E. coli* et la levure *Yarrowia lipolytica*. Il contient, l'origine de réplication Col E1 d'*E. coli*, et le gène de résistance à la kanamycine. C'est un vecteur de type intégratif, comportant les séquences zéta, et le marqueur d'auxotrophie URA3d1 sous contrôle du promoteur hp4d. Ce vecteur a été utilisé pour l'expression de la protéine d'intérêt dans la levure *Yarrowia lipolytica*.

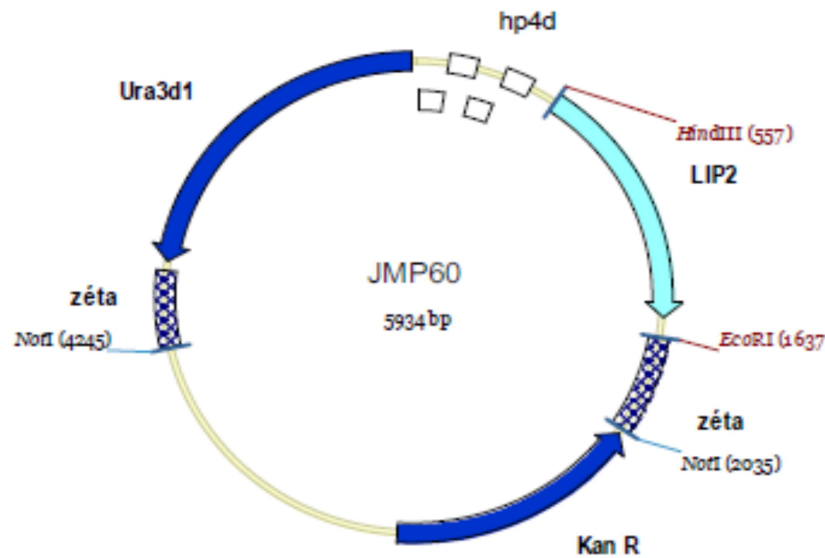


Figure 22: Carte de restriction du plasmide JMP60

1-3-Tampons et milieux de culture

1-3-1-Solutions et tampons

Tampon SM

Ce tampon a été utilisé pour la conservation et la dilution des stocks de bactériophages. Pour un litre: 5,8 g de NaCl, 2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 ml de Tris-Cl (pH 7,5 1M), 5 ml d'une solution de gélatine 2%. La solution a été complétée à 1 litre avec de l'eau distillée puis autoclavée et conservée à 4°C.

Maltose

Le maltose a été utilisé pour induire le gène bactérien λ qui code pour le récepteur des bactériophages λ . On l'ajoute au milieu de culture des bactéries qui sont utilisées pour étaler les bactériophages λ TriplEx2. La solution stock à 20g/100ml de maltose a été stérilisée par filtration à 0,22 μM . Pour 100 ml de milieu de culture, 1 ml de solution de maltose a été utilisée.

MgSO₄

Le sulfate de magnésium permet une adsorption optimale des phages sur les bactéries. On l'ajoute au milieu de culture des bactéries utilisées pour étaler les bactériophages. Pour une solution de concentration 1 M, 24,65 g de MgSO₄.7H₂O ont été dissous dans 100 ml d'eau distillée puis stérilisés par filtration à 0,2 µM.

IPTG

L'IPTG (Isopropyl β-D-thiogalactopyranoside) a été utilisé pour l'induction des bactéries. Il a été préparé à 100 mM dans l'eau puis filtré à 0,2 µM.

Substrat pour le criblage

5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-β-D-glucopyranoside (X-glu): ce substrat a été utilisé pour le criblage de la banque. Il a été préparé à 5mM dans le DMSO (Dimethylsulfoxyde). 5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside préparé dans le DMF (diméthylformamide): ce substrat a été utilisé pour le criblage bleu/blanc de la banque.

Antibiotiques

Les antibiotiques ont été utilisés dans la préparation des milieux de culture pour sélectionner les bactéries transformées lors des clonages.

Kanamycine stock solution (25 mg/ml dans l'eau; 500X);

Tetracycline stock solution (15 mg/ml dans l'eau; 1,000X);

Chloramphénicol stock solution (34 mg/ml dans de l'éthanol à 100%; 1,000X).

Ampiciline (100 mg/ml dans l'eau 1000X)

1-3-2-Milieus de culture

1-3-2-1-Milieus de culture pour E.coli

LB liquide

Ce milieu a été préparé comme suit :

- 10 g/l de Bactériotryptone.
- 5 g/l d'extrait de levure.
- 5 g/l de NaCl.

Le milieu a été ensuite autoclavé 20 min à 121°C puis conservé à température ambiante. Pour la sélection des transformants, 40 µg/ml de kanamycine ou ampicilline (100 µg/ml) ont été rajoutés.

LB solide

A 1 l du milieu LB, ont été ajouté de l'agar à 15 g/l avant l'autoclavage. Ce milieu a été ensuite coulé dans des boîtes de Pétri avant de se solidifier par refroidissement. Les boîtes ont été conservées à 4 °C jusqu'à utilisation.

Milieu riche SOC

Ce milieu, composé de: tryptone (20 g/l), extrait de levure (5 g/l), NaCl (5 g/l), KCl (2,5 mM), MgCl₂ (10 mM), MgSO₄ (10 mM), glucose (20 mM), a été utilisé pour la régénération des bactéries compétentes après transformation.

Milieus pour l'étalement de la banque

LB/ MgSO₄

A 1 l du milieu LB, ont été ajouté 10 ml de MgSO₄ 1M (10 mM concentration final) avant autoclavage afin de permettre une meilleure adhérence des phages sur la paroi bactérienne.

LB /MgSO₄/ Maltose

A 1 l du précédent milieu autoclavé puis refroidit à 50°C, ont été ajouté 10 ml de la solution stock de maltose à 20% (concentration final 0,2%).

LB/ MgSO₄ solide

Ce milieu est composé de LB solide classique additionné de MgSO₄ à 10 mM. Il a été utilisé lors de l'étalement de la banque.

Gélose molle (LB/MgSO₄ soft top agar)

Ce milieu, composé de LB liquide additionné de 7,2 g d'agar pour 1l de milieu LB/ MgSO₄, a été utilisé pour l'étalement de la banque. Cette gélose a la particularité d'être liquide au-delà de 45 °C et solide en dessous de 40 °C.

1-3-2-2-Milieus de culture pour *Yarrowia lipolytica*

Milieu riche YPD (préculture)

Ce milieu, composé de 10 g/l de Bactopeptone; 10 g/l d'extrait de levure et 10 g/l de glucose, a été utilisé pour les précultures de *Yarrowia lipolytica*.

Milieu YNBcasa (Milieux de sélection des transformants)

Ce milieu, composé de 1,7 g/l de YNB (Yeast Nitrogen Base sans acides aminés ni sulfate d'ammonium stérilisé par filtration); Glucose 10 g/l; NH₄Cl 5 g/l; Tampon phosphate Na-K 50 mM pH 6,8 et Casamino acids 2 g/l (stérilisé par filtration), permet de cribler les souches Ura⁺. Il a été utilisé pour sélectionner les transformants de la souche JMY1212 de *Yarrowia lipolytica*.

Milieus YT₂D₁ (milieu riche de croissance et de production)

Le milieu de type YT₂, est un milieu contenant à la base, de l'extrait de levure (10 g/l), de la Tryptone (20 g/l) et du tampon phosphate Na-K pH=6,8 50 mM. Pour obtenir le milieu YT₂D₁, 1 ml du glucose (à partir d'une solution mère à 500 g/l) a été rajouté.

II-Méthode

2-1-Techniques de biologie moléculaire

2-1-1-Construction d'une banque d'ADNc

La construction de la banque d'ADNc a été effectuée avec le kit « SMART cDNA library construction » de Clontech (Palo Alto, USA). Ce kit est basé sur une méthode qui amplifie

sélectivement les ADNc complets. Il autorise un criblage blanc/bleu pour estimer le pourcentage de clones recombinants et permet une excision simple du phagémide pTriplEx2 à partir du phage par le système cre-lox en transfectant le lysat phagique dans la souche BM25.8 d'*E.coli*.

2-1-1-Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux ont été extraits à l'aide du kit « RNeasy Mini » (Qiagen, France), en utilisant le protocole « Animal tissues ». Deux à trois blattes entières, ont été broyées dans un mortier en porcelaine sous vapeur d'azote liquide, puis environ 30 à 50 mg ont été pesés et traités avec le réactif de lyse QIAzol (contenant de la guanidine permettant la dénaturation des protéines) fourni dans le kit. Le mélange a été ensuite homogénéisé à l'aide du TissueLyser II. Après l'ajout successif de 100 µl de chloroforme, 100 µl de l'ADNg eliminator, puis de 700 µl d'éthanol absolu (précipitation des acides nucléiques), les lysats sont passés au travers d'une colonne à filtre de silice retenant les ARN totaux. Les échantillons ont été ensuite soumis à différentes étapes de purification (700 µl de tampon RW1 puis 2 fois 500 µl de tampon RPE) sur colonne. Un traitement à la Dnase a été quand même effectué malgré l'ajout de l'ADNg eliminator afin d'éliminer toute trace de l'ADN génomique. Pour ce faire, les ARNs totaux extraits ont été traités directement sur la colonne avant l'élution définitive à la DNase I, RNase-Free (Qiagen) à raison de 1U/µg d'ARN. La réaction a été incubée à 37°C pendant 30 min puis le tampon RDD a été rajouté. Par la suite, la réaction a été à nouveau incubée pendant 10 min à 65°C afin d'inactiver la DNase. Les ARN totaux ont été finalement élués par l'addition de deux volumes de 30 µl d'eau ultra pure dépourvue de RNase (fournie dans le kit).

2-1-1-2-Purification des ARNm

La plupart des ARNm eucaryotes possèdent une queue poly(A) en 3' d'environ une centaine de nucléotides. Cette structure particulière est mise à profit pour les purifier par une chromatographie d'affinité. La purification de l'ARN poly(A) se fait par passage sur une colonne oligo (dT) fixé à des billes de silice. Les ARNm ont été purifiés à l'aide du kit commercial (Oligotex mRNA purification kit, Qiagen). Les ARN totaux ont été d'abord dénaturés 3 min à 70°C, puis incubés 10 min à température ambiante avec des billes de silice

recouvertes d'un oligonucléotide poly-dT qui s'hybride avec la queue poly-A des ARNm. Après une centrifugation 2 min à 14000 g, le surnageant a été éliminé et le culot contenant les billes et les ARNm fixés sur les queues poly-dT a été remis en suspension dans un tampon OW2. Cette solution, a été placée sur une colonne qui retient les billes puis le tampon a été par la suite éliminé par centrifugation. Après un second lavage dans le tampon OW2, les ARNm fixés aux billes ont été deshybridés des queues poly-dT des billes dans une solution de tampon OEB à 70°C, puis élués par une centrifugation 1 min à 14000 g.

2-1-1-3-Contrôle de qualité des acides nucléiques

Dans un premier temps, la concentration et la pureté des acides nucléiques ont été mesurées au NanoDrop® ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). Ainsi, trois mesures de densité optique (DO) sont effectuées automatiquement à différentes longueurs d'onde: 230, 260 et 280 nm, permettant de calculer les rapports de DO 260/280 et 260/230. Le rapport des densités optiques 260/280 ($<1,8$) indique une faible contamination protéique, et le rapport 280/230 (<2) reflète une faible contamination par des résidus organiques tels que le phénol. Dans un deuxième temps, l'intégrité des acides nucléiques des échantillons retenus à la suite de l'analyse au Nanodrop a été également analysé. Ce contrôle de qualité a été effectué à la fois par électrophorèse capillaire avec le Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Massy, France) puis par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8% TAE.

2-1-1-4-Synthèse des ADNc simple brin

La synthèse des ADNc a été réalisée à partir de 3 μ l (0,3 μ g) d'ARNm en utilisant la Reverse Transcriptase et les amorces CDS III/Smart IV fournies dans le kit SMART cDNA Construction (Clontech). Dans un premier temps, l'ARN a été dénaturé en incubant le mélange ARN/amorces pendant 2 min à 72°C, puis le mélange a été placé directement dans la glace afin d'éviter la formation de structures secondaires. La synthèse du premier brin d'ADN a été initiée, par l'ajout des produits suivants au mélange contenant déjà l'ARNm et les amorces: 2 μ l de 5X First Strand Buffer, 1 μ l de DTT (20 mM), 1 μ l de dNTP Mix (10 mM), 1 μ l de l'enzyme reverse transcriptase. Le mélange a été ensuite incubé pendant 1 heure à 42°C. La réaction a été arrêtée sur la glace. Ce brin synthétisé correspond théoriquement à un ADN complémentaire (ADNc) complet puisque la reverse transcriptase n'ajoute les bases

cytosine que lorsqu'elle atteint l'extrémité 5' de l'ARNm; en plus, l'oligo (dT) ne s'hybride que sur la queue poly(A). Cette méthode d'amplification sélective permet donc la confection de banques d'ADNc riches en ADNc complets (full length).

2-1-1-5-Amplification des ADNc par LD-PCR

La PCR a été réalisée à partir de 2 µl d'ADNc simple brin synthétisés à l'étape précédente. Les ADNc ont été amplifiés à l'aide des amorces utilisées lors de la synthèse de l'ADNc simple brin.

Le mélange réactionnel de la PCR a été composé comme suit:

2 µl d'ADNc simple brin

80µl eau ultra pure

10 µl de 10X Advantage 2 PCR Buffer

2 µl de 50X dNTP Mix

2 µl de 5' PCR Primer (10 µM)

2 µl de CDS III/3' Primer (10 µM)

et enfin 2 µl de 50X Advantage 2 Polymerase Mix

La PCR a été réalisée avec le programme suivant : 1 min de dénaturation à 95°C, suivie de 20 cycles composés d'une étape de dénaturation (95°C pendant 15 s) et d'une longue étape d'hybridation/élongation (68°C pendant 6 min). A la fin de la réaction, le produit de PCR a été vérifié sur gel d'agarose 0,8 % TAE.

2-1-1-6-Digestion par la protéinase K et purification de l'ADN

Un traitement par la protéinase K est nécessaire pour inactiver l'ADN polymérase. La digestion a donc été réalisée avec 50 µl du mélange de PCR (2-3µg) et 2 µl de protéinase K (20 µg/µl). Après une brève centrifugation, le mélange a été incubé pendant 20 min à 45°C. Après la digestion, le mélange a été purifié avec 100 µl d'un mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1). Les différentes phases ont été séparées par une centrifugation de 5 min à 14000 rpm. A l'issue de la centrifugation, la phase supérieure (aqueuse) contenant l'ADN a été reprise dans un nouveau microtube. Cent microlitre de

chloroforme/alcool isoamylique (24/1) ont été rajouté afin d'éliminer toute trace de phénol. La phase supérieure aqueuse a été ensuite précipitée par ajout de 10 µl d'acétate de sodium (3 M, pH 4,8), 1,3 µl de glycogène (20 µg.µl⁻¹) et 260 µl d'éthanol 95% (température ambiante). Après une centrifugation à 14000 rpm pendant 20 min, le culot a été resuspendu dans 79 µl d'eau après un lavage à l'éthanol. Pendant toute la durée de purification, le tube a été maintenu à température ambiante afin d'éviter la co-précipitation des impuretés.

2-1-1-7-Digestion par Sfi I

Afin de liguer les ADNc dans le vecteur phagique TriplEx2, une digestion a été réalisée avec l'enzyme de restriction Sfi I. Le choix de cette enzyme est astucieux car son site de restriction particulier (GGCCNNNNGGCC, où les 5 nucléotides centraux sont indifférents) permet, en n'utilisant qu'une seule enzyme de restriction, un clonage directionnel des ADNc dans le phage λ. En effet, les amorces utilisées pour la PCR contiennent les sites de restriction de cette enzyme; le « SMART III Oligo3 » contient le site Sfi I A (GGCCATTATGGCC) : à l'extrémité 5' et le CDS III/3' Primer contient le site Sfi I B à l'extrémité 3' (GGCCGCCTCGGCC). Tous les ADNc présentent donc des extensions apportées par les amorces de la PCR qui constituent leurs extrémités.



La digestion a été réalisée avec la totalité de l'ADN (79 µl) purifiée après la digestion par la protéinase K. En présence de: 10 µl de 10X Sfi Buffer, 1 µl de BSA 100X et 10 µl de Sfi I (20 U/µl). Après homogénéisation, le mélange a été incubé pendant 2 h à 50°C puis 2 µl de tampon de charge contenant 1% de xylène cyanol ont été ajoutés afin de faciliter le fractionnement par la suite.

2-1-1-8-Fractionnement des ADNc sur colonne Chroma 400

Le fractionnement des ADNc est nécessaire afin d'éliminer les ADNc de petite taille ainsi que les oligonucléotides libres pour qu'ils n'entrent pas en compétition avec les ADNc pendant la ligation dans le vecteur. En effet, Les oligonucléotides « CDS II/3' Primer » et « Smart II Oligo » ont été ajoutés en excès pour initier les réactions de retrotranscription et de PCR. Ils

ont également été digérés par l'endonucléase SfiI et entrent donc en compétition avec les ADNc lors de la ligation. C'est pourquoi, l'ADN est fractionné selon sa taille sur une colonne juste avant l'insertion dans le vecteur. Le fractionnement a été réalisé comme suit: Dans un premier temps, la colonne a été équilibrée puis paramétrée de sorte à avoir un débit d'écoulement sans pression extérieure d'une goutte chaque 40 à 60 seconde et un volume de 40 µl par goutte. Ensuite, l'ADN provenant de l'étape précédente a été appliqué délicatement sur la matrice de la colonne. Après absorption complète de l'échantillon dans la matrice, le tube qui contenait le produit de la digestion a été lavé avec 100 µl du tampon, puis appliqué sur la colonne. Lorsque tout le liquide fut absorbé, 600 µl du tampon d'élution ont été ajoutés et l'éluat a été récolté dans 16 tubes collecteurs numérotés à raison d'une goutte par tube. A la fin, une électrophorèse sur gel d'agarose a été réalisée en déposant 3 µl de chaque fraction afin de vérifier le profil. Les 3 à 4 fractions contenant les ADNc ont été poolées puis précipitées avec 1/10 vol. d'acétate de sodium (3M, pH 4,8), 1,3 µl de glycogène (20 mg/ml) et 2,5 vol. d'éthanol porté à -20°C. Le tube a été incubé toute la nuit à -20°C, puis le lendemain, le surnageant a été retiré et le culot lavé à l'éthanol après une centrifugation à 14 000 rpm pendant 20 min. A la fin, le culot séché à l'air pendant 10 min a été resuspendu dans 7 µl d'eau.

2-1-1-9-Ligation dans le vecteur TriplEx2

Après la digestion et la purification, les ADNc correspondant à la bonne taille ont été ligués dans le vecteur TriplEx2 possédant les deux extrémités Sfi I A et Sfi I B. Afin de déterminer le ratio optimal, trois ligations avec des quantités d'insert différentes (0,5; 1 et 1,5 µl) ont été réalisées dans un premier temps, ensuite le ratio qui a donné le meilleur titre a été retenu pour la suite des travaux. Les réactions ont été réalisées comme suit :

	L1	L2	L3
Eau ultra pure stérile	2 µl	1,5 µl	1 µl
Tampon de ligation 10X	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
ATP, 10mM	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
Ligase d'ADN T4	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
ADNc	0,5 µl	1 µl	1,5 µl
Vecteur	1 µl	1 µl	1 µl
Volume total	5 µl	5 µl	5 µl

Le mélange a été homogénéisé et incubé toute la nuit à 16°C. Cette étape de ligation aboutit à la formation d'une banque d'ADN de phages recombinants, chacun portant un ADNc différent.

2-1-1-10-Encapsidation des vecteurs recombinants

Les vecteurs recombinants ont été mis en présence d'extraits d'encapsidation contenant les protéines virales, afin de permettre l'autoassemblage de la capsid autour des vecteurs. L'encapsidation a été effectuée à l'aide du kit «MaxPlax ». Avant la réaction d'encapsidation, la DNA ligase a été inactivée par un traitement de 65°C pendant 15 min (l'ADN ligase actif pouvant diminuer l'efficacité de la réaction d'encapsidation). Les aliquots contenant le mélange d'encapsidation ont été maintenus sur la glace puis les tubes ont été réchauffés à la main jusqu'à un début de décongélation ensuite la moitié (25 µl) de chaque tube a été transféré dans un second tube de 1,5 ml placé également sur la glace. Ensuite, 5 µl (environ 0,2 µg d'ADN de phage recombinant) de chaque produit de ligation ont été immédiatement ajoutés à l'aliquot. L'homogénéisation a été réalisée en veillant à ne pas créer de bulles d'air. Une brève centrifugation a été effectuée à la fin pour ramener tout le contenu au fond du tube. La réaction a été incubée à 30°C pendant 90 min. A la fin de cette incubation, 25 µl supplémentaires de l'extrait d'encapsidation dégelé ont été rajoutés à chaque tube puis les réactions ont été incubées pour un temps supplémentaire de 90 min à 30° C. Dans chaque tube ont été ensuite ajoutés 500 µl de tampon SM et 20 µl de chloroforme. Après une bonne homogénéisation, les tubes ont été soumis à une centrifugation, et les surnageants ont été transférés dans de nouveaux tubes. Les virus ainsi formés ont été stockés à 4°C jusqu'au titrage et l'amplification de la banque. Une réaction de contrôle positif a été réalisée en

parallèle avec l'ADN ligué fourni dans le kit. Ce contrôle positif a été étalé avec la souche bactérienne hôte de contrôle (LE392MP) inclus également dans le kit.

2-1-1-11-Préparation des cellules XL1-Blue compétentes pour l'étalement de la banque

Dans un premier temps, un "pétrimètre" a été préparé à partir de la souche commerciale stockée dans le glycérol sur une boîte LB/Tetracycline. Après une incubation d'une nuit à 37°C, un ré-étalement a été réalisé sur une boîte LB/MgSO₄/Tetracycline à partir d'une colonie isolée de la première boîte. Cette nouvelle boîte appelée « work plate » a été incubée une nuit à 37°C puis conservée à 4°C pendant deux semaines. Le "pétrimètre" qui contient l'antibiotique approprié a été renouvelé toutes les deux semaines afin de toujours disposer de colonies fraîches. La veille de l'amplification, 15 ml d'un bouillon de LB/MgSO₄/maltose (Le MgSO₄ et le maltose favorisent l'adsorption des phages sur les membranes des bactéries) ont été inoculés avec une seule colonie de la « work plate » et cultivée sous agitation à 140 rpm à 37°C pendant une nuit ou jusqu'à ce que la densité optique à 600 nm atteigne 2. Le lendemain, les cellules ont été centrifugées et resuspendues dans 7,5 ml de MgSO₄ 10 mM stérile. Les bactéries rendues ainsi compétentes sont alors prêtes pour les expériences de titrage ou d'amplification. Diverses dilutions de la banque de phages ont été préparées afin d'obtenir un nombre de plages de lyse pour les différents pétris variant de 0 à 500 ufp (unités formant plage) par Petri, zéro étant le contrôle négatif. Ces dilutions ont été réalisées dans le tampon de dilution lambda 1X.

2-1-1-12-Titrage de la banque

La banque a été titrée par la méthode des plages de lyse ce qui a permis de vérifier sa qualité. Pour ce faire, une série de dilutions dans du tampon SM a été réalisée pour chacune des 3 banques (1; 1/5; 1/10; 1/20). Deux cent microlitres de bactéries compétentes XL1-Blue ont été infectées avec 1 µl de chaque dilution de bactériophages. Les tubes ont été incubés dans un bain-marie pendant 15 min à 37°C sans agitation pour permettre la transfection des bactéries par les phages. Dans chaque tube ont été ensuite ajoutés 2 ml de LB/ MgSO₄ soft top agar maintenu au préalable à 45°C. Le mélange a été réalisé rapidement avec soin par inversion des tubes puis l'étalement a été ensuite réalisé sur des boîtes de Pétri LB/MgSO₄ (90 mm de diamètre) préalablement préchauffées à 37°C pendant 1 h. Les boîtes ainsi coulées ont été

incubées à 37°C pendant une nuit ou jusqu'à ce que les plages de lyse apparaissent bien définies, sans se toucher. Les plages de lyse ont été alors comptées et le titre déterminé. Le titre de la banque a été exprimé en ufp/ml (unités formant plage/ml) et doit normalement s'élever au-dessus de 1×10^6 pour être intéressant. $\text{Ufp/ml} = (\text{nb de plages de lyse} \times \text{facteur de dilution})/\text{ml de phages déposés}$.

2-1-1-13-Détermination du pourcentage de clones recombinant (Screening bleu/blanc)

Ce test permet de déterminer l'efficacité de la ligation qui est estimée par le rapport du nombre de plages de lyse blanches avec celui des plages de lyse bleues. Dans λ TriplEx2, comme dans tous les autres vecteurs d'expression λ , le site de clonage est intégré dans la séquence codante pour l' α polypeptide de la β -galactosidase (lacZ'). Cela rend possible l'utilisation de lacZ α complémentaire afin d'identifier facilement un phage contenant l'insert par transduction par une souche hôte appropriée (telle que *E. coli* XL1-Blue) sur un milieu contenant de l'IPTG et X-gal. En effet, cette enzyme transforme le X-galactose (X-gal) incolore en un produit bleu insoluble qui s'accumule dans les cellules. Si un fragment d'ADN est inséré dans le gène lacZ, celui-ci ne sera plus fonctionnel et la conversion du X-gal ne sera plus possible. Les colonies resteront blanches. En absence d'insert, le gène lacZ sera fonctionnel et la colonie bactérienne deviendra bleue. Cette sélection bleu/blanc est un moyen très pratique de sélectionner les colonies qui contiennent les phages avec insert. La procédure est la même que pour le titrage de la banque sauf l'ajout cette fois de 50 μ l X-Gal et 50 μ l IPTG dans chaque boîte avant l'étalement sur les boîtes de Petri LB/MgSO₄.

2-1-1-14-Amplification de la banque

Après le titrage, la banque effectuée avec 0,5 μ l d'insert, ayant donné un titre avoisinant 10^7 clones par ml, a été amplifiée. Les phages ont été étalés à une concentration de $6 \cdot 10^4$ clones par boîte. Dans notre cas pour obtenir cette concentration, la banque a été diluée au 1/20ème puis la répartition a été faite pour 20 boîtes LB/MgSO₄ de diamètre 150 mm. Cinq cent microlitres de bactéries XL1-blue compétentes ont été infectées avec la quantité adéquate de phages dans des falcons de 50 ml. Après une incubation de 15 min, 4,5 ml de soft top agar ont été ajoutés au milieu puis l'étalement a été réalisé sur de grands Pétri (150 mm) LB/MgSO₄ préchauffés à 37°C. Après une nuit d'incubation à 37°C, les plages de lyses sont confluentes

et 12 ml de tampon SM ont été rajoutés dans chaque boîte. Les phages ont migré toute une nuit à 4°C dans le tampon SM. Le lendemain, les boîtes ont été placées pendant 1h sous agitation douce (50 rpm) à 37°C puis le tampon de chaque boîte a été prélevé en conditions stériles et transféré dans un bécher de 250 ml auquel ont été additionné 5% de chloroforme. Le pool de la banque ainsi obtenu a été homogénéisé puis reparti dans des falcons de 50 ml. Chaque tube a été "vortexé" pendant 20 s puis centrifugé 10 min à 5000 g. Les phases aqueuses ont été ensuite récupérées et "poolées" dans un falcon stérile. Une partie de cette banque amplifiée a été conservée à 4°C et l'autre partie "aliquotée" et stockée à -80% après ajout de 7% de DMSO.

2-1-1-15-Contrôle de la taille moyenne des inserts par PCR

Des plages de lyse, aléatoirement choisies, ont été récupérées avec des cônes stériles dans 200 µl de tampon SM. Le tout a été incubé à 4°C pendant plusieurs jours afin que les phages migrent dans le tampon. Une PCR a été réalisée avec 5 µl de cette suspension de phages, en utilisant l'AccuTaq DNA polymerase et les amorces 5' PCR Primer et CDS III/3' Primer. Les produits de la PCR ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose.

2-1-1-16-Criblage de la banque d'ADNc

2-1-1-16-1-Criblage primaire

Le criblage primaire de la banque a été effectué avec le substrat 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucopyranoside (X-glu) préparé dans du DMSO et de l'IPTG pour l'induction. Dans un premier temps, la banque a été diluée au 1/20ème de sorte à avoir une concentration d'environ 10⁴ clones par boîte puis les bactéries XL1-blue compétentes ont été infectées avec la quantité adéquate de phages dans des falcons de 15 ml ensuite 100 µl du substrat X-glu 5mM et 50 µl d'IPTG ont été ajoutés au milieu. Le mélange a été coulé sur des Qtray LB/MgSO₄ après ajout de 20 ml d'agar mou. Les boîtes ont été laissées reposer 10 min puis l'incubation a été réalisée à 37°C jusqu'à l'apparition de clones positifs, en général après 48h.

2-1-1-17-2-Criblage secondaire

La banque étant étalée à une concentration de 10^4 clones par boîte, les plages de lyses ne sont pas distinctes. Par conséquent, une zone positive risque de contenir plusieurs clones de phages. Il est donc nécessaire de procéder au criblage secondaire des clones positifs isolés du criblage primaire. Pour ce faire, les clones positifs issus du premier criblage ont été récupérés à l'aide d'un cône dans des eppendorfs distincts puis élués toute une nuit dans 100 μ l du tampon SM. Le lendemain, le criblage a été réalisé comme dans le premier cas en infectant cette fois 500 μ l de bactéries XL1-blue compétentes avec 10 μ l de l'éluât de la veille. L'étalement a été effectué sur des Q-tray LB/MgSO₄.

2-1-1-18-Conversion des phages en plasmides par le système cre-lox

La conversion du λ TriplEx2 en pTriplEx2 se fait grâce au système enzymatique cre recombinase/loxP, par lequel le phage recombinant est excisé au niveau de sites loxP placés de part et d'autre de l'insert, le fragment résultant étant circularisé pour former un plasmide. Ce mécanisme bactérien naturel de défense contre les phages est présent dans la souche bactérienne BM25-8 d'*E.coli*, qui exprime la CRE recombinase à 31°C. La manipulation a été réalisée comme suit; des clones positifs isolés du criblage secondaire ont été élués puis utilisés pour infecter 200 μ l d'une culture fraîche de la souche BM 25.8 dans un tube de 15 ml, le mélange a été incubé pendant 30 min à 31°C sans agitation puis 400 μ l de milieu LB ont été ajoutés. Le tube a été incubé à nouveau sous agitation pendant 1 h à 31°C. Dix microlitre du mélange ont été étalés sur des boîtes LB/Ampicilline. Après une nuit d'incubation à 37°C, plusieurs clones ont été mis en culture pour des minipreps. L'ADNc d'une dizaine de clones a été séquencé par la société GATC (Allemagne). Les résultats ont été analysés avec le logiciel BioEdit.

2-1-2-Sous clonage du gène codant pour la β -glycosidase et production de la protéine recombinante

Après le séquençage des clones positifs issus du criblage de la banque, la séquence du gène codant pour la β -glycosidase stockée dans la base de données Pubmed en avril 2014 par **Tamaki et al. 2014** a pu être récupérée. Des amorces ont été synthétisées à partir de cette séquence pour le sous clonage. Afin de produire le gène codant pour la β -glycosidase, nous avons testé plusieurs systèmes de production; d'abord chez *E.coli* ; chez la levure *Yarrowia lipolytica* et enfin en cellules d'insectes notamment chez *Baculovirus*. Pour ce faire, plusieurs

stratégies de clonage ont été élaborées en tenant compte de la présence d'un signal peptide dans la séquence du gène.

2-1-2-1-Essai de production chez E.coli

Le gène codant pour la β -glycosidase a été sous cloné dans le vecteur Pet 28a pour la production chez *E.coli*; deux stratégies de clonage ont été utilisées; une construction prenant en compte la séquence totale du gène en incluant le peptide signal (PS) et une autre construction sans le peptide signal. Les sites de restriction des enzymes BamHI et HindIII ont été utilisés dans les deux cas avec un tag en N-terminal. Les amorces suivantes ont été synthétisées:

-Amorce forward avec PS_site bamHI:

oligof1: AAAGGATCC ATGATGGAGTCTCACATGCT

-Amorce forward sans PS_site bamHI :

oligof2: AAAGGATCC GCT CCT GAG GAC AAG GT

-Amorce reverse (addition site hindIII):

oligor1: AAAAAGCTT TCATTCCTCTCGAAATCGTT

2-1-2-1-1-Amplification du fragment d'ADNc par PCR

La PCR a été réalisée à partir de 3 μ l de la banque en utilisant les amorces synthétisées.

Le mélange réactionnel de la PCR a été composé de:

3 μ l de la banque amplifiée

82 μ l eau ultra pure

10 μ l de 10X Advantage 2 PCR Buffer

2 μ l de 50X dNTP Mix

1 μ l de l'oligo forward (10 μ M)

1 μ l de l'oligo reverse (10 μ M)

Et enfin 2 μ l de 50X Advantage 2 Polymerase Mix

La PCR a été réalisée avec le programme suivant : 1 min de dénaturation à 95°C, suivie de 20 cycles composés d'une étape de dénaturation (95°C 15s) et d'une longue étape d'hybridation/élongation (55°C pendant 6 min). A la fin de la réaction, les produits de PCR ont été analysés sur gel d'agarose 0,8% TAE.

2-1-2-1-2-Purification des produits de PCR

Après l'étape d'amplification par PCR les produits obtenus doivent être purifiés pour éliminer le tampon, les dNTP non incorporés et les amorces. La purification a été réalisée à l'aide du kit GenElute™ PCR Clean-Up de chez Sigma. La purification se fait à l'aide d'une colonne munie d'une membrane de silice chargée positivement et optimisée pour lier l'ADN dans des solutions de fortes salinités et le libérer dans des solutions de faible salinités telle que l'eau. Ainsi, la première étape consiste à fixer l'ADN sur la membrane. Ensuite s'en suivent plusieurs lavages à des salinités de plus en plus faibles afin d'éliminer les molécules chargées négativement. Enfin l'ADN lié à la membrane est élué dans 30 µl d'eau ultra pure.

2-1-2-1-3-Double digestion du vecteur et de l'insert par les enzymes de restriction

Les produits PCR purifiés et le vecteur dephosphorylé ont été digérés séparément par les deux enzymes de restriction BamHI et HindIII. La réaction de digestion a été réalisée dans un volume final de 50 µl contenant: 5µl de tampon d'activité 10 X compatible avec les deux enzymes, 1 µl (10 U) d'enzyme de restriction et 1 µg d'ADN. La digestion a été incubée 1 h à 37°C, puis immédiatement placée dans la glace. Les enzymes ont été inactivées par un traitement à 65°C pendant 15 min. Les produits de digestion issus des produits de PCR ont été purifiés directement à l'aide du kit GenElute™ PCR Clean-Up de chez Sigma. Le "digestat" du vecteur a été migré sur gel d'agarose 0,8% TAE.

2-1-2-1-4-Extraction d'ADN à partir du gel d'agarose

Avant la migration, pour la visualisation des fragments, du Syber safe (Invitrogen) a été inséré directement dans le gel d'agarose afin de permettre une révélation des fragments directement sous un transilluminateur en lumière bleue (Safe imager Invitrogen) et non sous UV pour éviter d'endommager l'ADN. Les bandes de gel contenant le vecteur linéarisé ont été découpées à l'aide d'une lame de scalpel, puis placées dans un tube de 1,5 ml. L'ADN a été extrait puis purifié à l'aide du kit d'extraction GenElute™ PCR Clean-Up (Sigma).

2-1-2-1-5-Déphosphorylation du vecteur

La déphosphorylation du vecteur a été effectuée à l'aide de la phosphatase alcaline (CIP, Biolabs) dans un volume final de 50 μ l. Le mélange réactionnel a été composé comme suit :

ADN purifié 1 à 10 μ g

Tampon CutSmart (10X) 5 μ l

CIP 1 unit

H₂O μ l à 50 μ l

La réaction a été incubée à 37°C pendant 1 h puis l'enzyme a été inactivée à 70°C pendant 5 min.

2-1-2-1-6-Ligation

Les ADNc et le vecteur digérés ont été ligués avec la T4 DNA ligase pendant toute une nuit à 16°. La réaction a été généralement réalisée dans 20 μ l contenant: 2 μ l de tampon d'activité 5X, 1 μ l de T4 DNA ligase et un rapport insert/vecteur de 3/1 puis le volume final a été complété à 20 μ l avec de l'eau.

2-1-2-1-7-Préparation des cellules compétentes d'*E. coli* TOP10/ *E.coli* Dh5 α

Une préculture d'*E. coli* a été effectuée par ensemencement de 10 ml de milieu LB avec une seule colonie. Après une nuit sous agitation à 37°C, 1 ml de cette préculture a été utilisé pour ensemencer 100 ml de milieu LB. Cette culture a été incubée à 37 °C sous agitation pendant 3 à 5 h jusqu'à obtenir une DO à 600 nm entre 0,4 et 0,6. Cette DO correspond pour une culture *E.coli* au début de phase exponentielle de croissance, moment où la majorité des bactéries sont compétentes. La culture a été ensuite placée dans la glace pendant 15 min afin d'arrêter la croissance de la culture, puis les bactéries ont été sédimentées par centrifugation à 3500 g pendant 15 min. Pour éviter que les bactéries ne se lysent, les centrifugations ont été réalisées à 4°C et sans frein. Le culot a été resuspendu dans 20 ml d'une solution de CaCl₂ 100mM froid afin de déstabiliser les membranes des bactéries et ainsi potentialiser leur niveau de compétence. Après 15 min de repos dans cette solution, les bactéries ont été à nouveau sédimentées par centrifugation à 3500 g pendant 15 min à 4°C. Enfin, le culot a été

resuspendu dans 5,5ml de CaCl_2 à 7,5 mM contenant du glycérol à 15% puis congelé dans de l'azote liquide et stocké à - 80 °C sous forme d'aliqots de 100 μl .

2-1-2-1-8-Transformation des produits de la ligation

La T4 DNA ligase a été inactivée par un traitement à 65°C pendant 15min, puis la transformation a été réalisée avec 2 μl du produit de chaque ligation. Cette étape consiste à mélanger 50 μl de souches bactériennes chimiocompétentes avec 2 μl (environ 50 ng de plasmide) du produit de chaque ligation séparément. Le mélange a été laissé 30 min dans la glace puis transféré dans un bain d'eau à 42°C pour une durée de 45 secondes puis remis immédiatement dans la glace pendant 2 à 3 min. Très rapidement 200 μl de milieu SOC ont été ajoutés au mélange. Ce milieu contenant du glucose permet aux cellules très fragiles à ce stade de reprendre une activité normale. Le mélange a été incubé pendant 1h à 37°C. La sélection des bactéries transformées a été faite sur boîte LB contenant l'antibiotique de sélection dans notre cas la Kanamycine pour le vecteur pet 28a. Enfin les boîtes ont été incubées à 37°C pendant une nuit.

2-1-2-1-9-Extraction d'ADN plasmidique

Une amplification plasmidique a été réalisée en cultivant quelques colonies bactériennes de chaque construction ayant poussée sur le milieu de sélection et contenant donc un plasmide recombinant. Les bactéries ont été mises en préculture pendant toute une nuit à 37°C sous agitation dans 5 ml de milieu LB/Kana. Le lendemain, les bactéries ont été sédimentées par centrifugation à 5000 g pendant 3 min puis l'extraction de l'ADN plasmidique a été effectuée suivant le protocole décrit dans le kit miniprep de Qiagen. Afin de vérifier la présence de l'insert, une PCR et une double digestion ont été réalisées. L'ADN de quelques plasmides contenant l'insert a été séquencé.

2-1-2-1-10-Essai de production de la β -glycosidase chez *E.coli*

Plusieurs souches d' *E.coli* ont été testées pour la production, BL21DE3; JM109DE3; Rosetta DE3; TunerDE3; C41DE3; BL21star. Le protocole suivant a été utilisé pour les cinq

premières souches. Après une transformation de l'ADN plasmidique recombinant dans ces différentes souches *E.coli*, une préculture a été réalisée dans 10 ml de LB contenant 50µg/ml de Kanamycine. Le lendemain, cette préculture a été utilisée pour ensemercer au centième 100 ml de LB/Kana. Cette culture a été incubée à 37°C sous agitation (200 rpm) jusqu'à obtenir une absorbance à 600 nm autour de 0,6. L'expression de la protéine recombinante a été alors induite par addition d'IPTG (1 mM final) à froid puis l'incubation a été réalisée toute la nuit sous agitation 140 rpm à 16°C. Le lendemain, les bactéries ont été centrifugées à 8000 rpm pendant 20 min et le culot bactérien a été repris dans un volume adéquat (1/50 du milieu de culture) du Talon1X (Tris HCL 20 mM pH 8; NaCl 300 mM. Pour la dernière souche BL21star, le milieu auto-inductible ZYM 5052 composé de tryptone (1%), extrait de levure (0,5%), Na₂HPO₄ (25 mM), K₂HPO₄ (25 mM), NH₄Cl (50 mM), Na₂SO₄ (5 mM), MgSO₄ (1 mM), glycérol (0,5%), lactose (0,2%), glucose (0,05%) et enfin de métaux 1000X a été utilisé. Ce milieu, est utilisé pour la production en grande quantité des protéines recombinantes à partir de plasmides de type pET. Pour ce faire, 200 ml de ce milieu, additionné de l'antibiotique ont été inoculés avec 1ml d'une préculture, réalisée directement à partir de 200 µl du mix de la transformation et 30 ml de LB/Kana. La culture a été réalisée à 16°C, 150 rpm pendant 24 h. Le lendemain, les bactéries ont été centrifugées à 6500 rpm pendant 15 min à 8°C puis le culot a été repris dans le tampon d'activité de l'enzyme. Les cellules issues de la transformation de ces différentes souches, ont été ensuite lysées par sonication. L'extrait, a été par la suite clarifié par centrifugation pendant 30 min à 11000 rpm. Le surnageant récupéré constitue la fraction native. Le culot a été repris dans de l'urée à 8M puis centrifugé à nouveau. Ce surnageant constitue la fraction dénaturante. Les différentes fractions ont été analysées par SDS-PAGE.

2-1-2-2-Essai de production chez la levure *Yarrowia lipolytica*

2-1-2-2-1-Amplification du fragment d'ADNc par PCR

Après avoir essayé plusieurs conditions infructueuses, afin de pouvoir surexprimer le gène d'intérêt chez la bactérie *E.coli*, nous avons testé la production chez la levure *Yarrowia lipolytica*. Le gène a été sous cloné dans le vecteur JMP160; trois stratégies de clonage ont été élaborées cette fois. Une construction prenant en compte la séquence totale du gène en incluant le peptide signal (PS); une autre construction sans le peptide signal (la séquence

mature) puis une dernière construction avec la séquence mature comprenant la cassette Prepro. Les sites de restriction des enzymes BamHI/AvrII ont été utilisés pour les deux premières constructions puis le couple d'enzymes SacII/AvrII pour la dernière. Les couples d'amorces suivant ont été utilisés

1) Séquence totale avec signal peptide beta Glu→BamHI /AvrII

(Site BamHI) AAAGGATCC CACA ATGATGGAGTCTCACATGCT

(Site AvrII) AAACCTAGG GATTCCTCTCGAAATCGTTCCG

2) Séquence mature Beta glu→ BamHI/AvrII

(Site BamHI) AAAGGATCC CACA ATGGCTCCTGAGGACAAGGT

(Site AvrII) AAACCTAGG GATTCCTCTCGAAATCGTTCCG

3) BGlu_PréproYL_SacII_d

(Site SacII) AAAACCGCGG TTCTCCAGAAGCGAGCTCCTGAGGACAAGGT

(Site AvrII) AAACCTAGG GATTCCTCTCGAAATCGTTCCG

Les étapes du clonage de la PCR jusqu'à l'extraction de l'ADN plasmidique ont été effectuées pour les trois constructions comme dans le premier cas (chez *E.coli*). L'ADN plasmidique extrait à partir des minipreps a été utilisé après vérification de la présence des inserts (par PCR, digestion et séquençage) pour la transformation dans la souche JMY1212 de *Yarrowia lipolytica*.

2-1-2-2-2-Préparation des cellules compétentes de *Yarrowia lipolytica* JMY1212

A partir d'une boîte fraîchement repiquée de la souche JMY1212 de *Yarrowia lipolytica*, une préculture de 5 ml a été effectuée en milieu YPD/citrate (45 ml YPD 5 ml tampon citrate) pendant environ 7 h de temps. Les cellules ont été comptées sur cellule de Thoma puis deux erlenmeyers contenant chacun 20 ml du même milieu ont étéensemencés: un à 5.10^5 cellules/ml (100 μ l) et l'autre à 10^5 cellules par ml (10 μ l). Les erlenmeyers ont été incubés toute la nuit à 28°C sous agitation. Le lendemain matin, les cellules ont été à nouveau comptées sur cellule de Thoma puis la culture se situant entre 8.10^7 et $1,5.10^8$ cellules/ml (celleensemencée à 5.10^5 est généralement dans la gamme) a été utilisée pour la suite. Vingt ml de ces cellules ont été centrifugées à 3000 rpm pendant 5 min puis lavées avec 20 ml du tampon TE (Tris 50 mM-EDTA 5mM pH 8). Le culot a été repris dans 20 ml d'acétate de lithium LiAc puis incubé sans agitation pendant 1 h à 28°C dans ce tampon. A la fin, les cellules ont été centrifugées à 2000 rpm à 4°C pendant 2 min puis le culot a été repris dans 2

ml de LiAc de sorte à avoir 5.10^8 cellules/ml. Les cellules ne sont conservées que pendant 24h.

2-1-2-2-3-Transformation des produits de la ligation

Avant la transformation, les clones ont été digérés au niveau de la plateforme Zéta par l'enzyme de restriction NotI afin d'éliminer le plasmide. La transformation a été effectuée par la suite comme suit :

Dans un tube stérile de 5 ml, ont été mélangé successivement

- a. 5 μ l d'ADN entraîneur (ADN de saumon soniqué à 5 mg/ml dans du tampon TE).
- b. 1 à 10 μ l d'ADN à transformer (1 μ g)
- c. 100 μ l de cellules compétentes fraîchement préparées

Le mélange a été incubé 15 minutes à 28°C au bain-marie sans agitation, puis 700 μ L de PEG 4000 (40% dans LiAc 0,1 M pH 6,0) ont été ajoutés. Le mélange a été agité à 200 rpm à 28°C pendant 1 h puis un choc thermique a été réalisé 10 minutes à 39°C. Après ajout de 1,2 ml de LiAc, les cellules ont été étalées sur le milieu de sélection (LB/kana).

2-1-2-2-4-Essai de Production

Après la transformation des ADN plasmidiques recombinants dans la souche compétente JMY1212 de *Yarrowia lipolytica*, 3 clones de chaque construction ont été cultivés dans des erlenmeyers bafflés contenant 10 ml de milieu YT₂D1. Les cultures ont été effectuées pendant 48 h sous agitation à 28°C avec un prélèvement après 24h. Une centrifugation (5 min à 5000 rpm) a permis de récupérer le surnageant de culture qui constitue la fraction active. Le culot constituant donc la fraction insoluble a été également récupéré. Des tests d'activité ont été effectués sur les deux fractions afin de vérifier la production de la protéine.

2-1-2-5-Production en cellules d'insectes

Parmi les systèmes d'expression eucaryote, le système baculovirus-cellules d'insectes est un des plus performants pour la production de protéines complexes. Ce système est basé sur l'utilisation du baculovirus comme vecteur pour l'expression en cellules d'insectes de gènes hétérologues sous contrôle de promoteurs viraux comme la polyédrine et la protéine P10.

L'expression des protéines eucaryotes recombinantes dans les cellules d'insectes est devenue un axe de recherche majeur pour la caractérisation structurale et fonctionnelle des protéines souvent mal repliées dans les cellules d'*E.coli*. Dans le système d'expression baculovirus les modifications post-traductionnelles sont conservées, la protéine adopte généralement un bon repliement et des niveaux d'expression relativement hauts peuvent être atteints. Cette expression en cellules d'insectes a été effectuée par la société Proteogenix (France). La procédure suivante a été suivie: tout d'abord nous avons effectué un alignement de séquence afin de comparer la séquence provenant de notre banque d'ADNc et la séquence stockée dans la banque de donnée NCBI (No d'accèsion GenBank: KJ576835). Après analyse, une petite différence au niveau des acides aminés a été observée. Un acide glutamique a été observé en lieu et place de l'acide aspartique dans notre séquence (**figure 21**). Afin d'analyser les propriétés des deux protéines nous avons produit en parallèle, le gène codant pour la β -glycosidase issu de notre banque de cDNA et l'ADNc codant pour la β -glycosidase de la blatte *Periplaneta americana* dont la séquence a été stockée dans la banque de donnée NCBI. Le gène a été synthétisé chimiquement à partir de la séquence optimisée. Cette séquence optimisée a été utilisée comme matrice pour la PCR afin d'amplifier la séquence codant pour l'ADNc [23-505] sans le peptide signal. Le gène issu de la banque de cDNA a été sous-cloné dans le vecteur ZMP62 (stratégie de clonage BamHI/HindIII nom de la construction: pATXBac1-BetaGluc1-6His) (**figure 22**). Le gène synthétique a été sous-cloné dans le vecteur pATXBac1 (stratégie de clonage BamHI/ XhoI nom de la construction pATXBac1-BetaGluc2) (**figure 23**). Une séquence codante pour une 6His-Tag a été ajoutée en position 3'/C-terminal dans les deux cas.

```

EMBOSS_001      1 MMESHMLLFLFSLATGLFGLAVHGAPEDKVPDSLKDYAFFPDGFLFGTATSS
EMBOSS_001      1 -----MGAPEDKVPDSLKDYAFFPDGFLFGTATSS
EMBOSS_001      51 YQVEGAWLEDGKSLNIWDTLTHNKSNIISDRSNGDVACDSYHKYKEDVQL
EMBOSS_001      30 YQVEGAWLEDGKSLNIWDTLTHNKSNIISDRSNGDVACDSYHKYKEDVQL
EMBOSS_001     101 LKELGVNFYRFSVSWSRILPTGHINVVNQAGIDYNNLINELLANGIQPM
EMBOSS_001      80 LKELGVNFYRFSVSWSRILPTGHINVVNQAGIDYNNLINELLANGIQPM
EMBOSS_001     151 VTMYHWDLPQTLQDLGGWPNQVMAQYFEDYARVLFTNYGDRVKYWITFNE
EMBOSS_001     130 VTMYHWDLPQTLQDLGGWPNQVMAQYFEDYARVLFTNYGDRVKYWITFNE
EMBOSS_001     201 PSVFTAGYESVAFHAPNVGATGFGQYLATHTVLKAHARAYHLYDNEFRAA
EMBOSS_001     180 PSVFTAGYESVAFHAPNVGATGFGQYLATHTVLKAHARAYHLYDNEFRAA

```

```

EMBOSS_001      251  QQGKIGMAFNINWCEPRNITEDIAACNRMQEFNLGMYAHPVFSPEGDFP
EMBOSS_001      230  QQGKIGMAFNINWCEPRDNITEDIAACNRMQEFNLGMYAHPVFSPEGDFP
EMBOSS_001      301  TVVKERVAMNSEAEGFTQSRLPSLTQEEIEYIKGTADFFGLNHYTTFYGS
EMBOSS_001      280  TVVKERVAMNSEAEGFTQSRLPSLTQEEIEYIKGTADFFGLNHYTTFYGS
EMBOSS_001      351  PLTYTGEPFTFTKDVGILMMPDFSWPGSASIWLHVVPWGFRKQLNRIAEIY
EMBOSS_001      330  PLTYTGEPFTFTKDVGILMMPDFSWPGSASIWLHVVPWGFRKQLNRIAEIY
EMBOSS_001      401  NNPPVIITENGFS DHGELNDTGRINYLT SYLTEMLNAIHEDGCNVVGYTA
EMBOSS_001      380  NNPPVIITENGFS DHGELNDTGRINYLT SYLTEMLNAIHEDGCNVVGYTA
EMBOSS_001      451  WSLIDNFEWNNGYTQRFGLYHVD FEDPNRARTIKESAKVYAEIIATKQIP
EMBOSS_001      430  WSLIDNFEWNNGYTQRFGLYHVD FEDPNRARTIKESAKVYAEIIATKQIP
EMBOSS_001      501  ERFREESLGSHHHHHH      517
EMBOSS_001      480  ERFREEL---EHHHHHH      493

```

Figure 23: Alignement de séquence entre la séquence issu de notre banque d'ADNc et la séquence stockée dans la banque de donnée NCBI

Les séquences et les constructions des deux protéines produites en parallèle sont présentées ci-dessous.

a)-Séquence issus de la banque d'ADNc BetaGluc1

pATXBac1-BetaGluc1-6His: 517AA-58,76 kDa

```

MMESHMLLFLFSLATGLFGAVHGAPEDKVPDSLKDYAFPDGFLFGTATSSYQVEGAWLEDGKSLNIWDTLTHNKSNIISD
RSGNDVACDSYHKYKEDVQLLKELGVNFYRFSVSWSRILPTGHINVVNQAGIDYNNLINELLANGIQPMVTMYHWDLPQ
TLQDLGGWPNQVMAQYFEDYARVLFNTYGDVRVYKWIITFNEPSVFTAGYESVAFHAPNVGATGFGQYLATHTVLKAHARAY
HLYDNEFRAAQQGKIGMAFNINWCEPRDNITEDIAACNRMQEFNLGMYAHPVFSPEGDFPTVVKERVAMNSEAEGFTQSR
LPSLTQEEIEYIKGTADFFGLNHYTTFYGSPLTYTGEPFTFTKDVGILMMPDFSWPGSASIWLHVVPWGFRKQLNRIAEIY
NNPPVIITENGFS DHGELNDTGRINYLT SYLTEMLNAIHEDGCNVVGYTAWSLIDNFEWNNGYTQRFGLYHVD FEDPNRA
RTIKESAKVYAEIIATKQIPERFREESLGSHHHHHH
Features:SLP [1 : 23]; 6His-tag with linker [507 : 517]

```

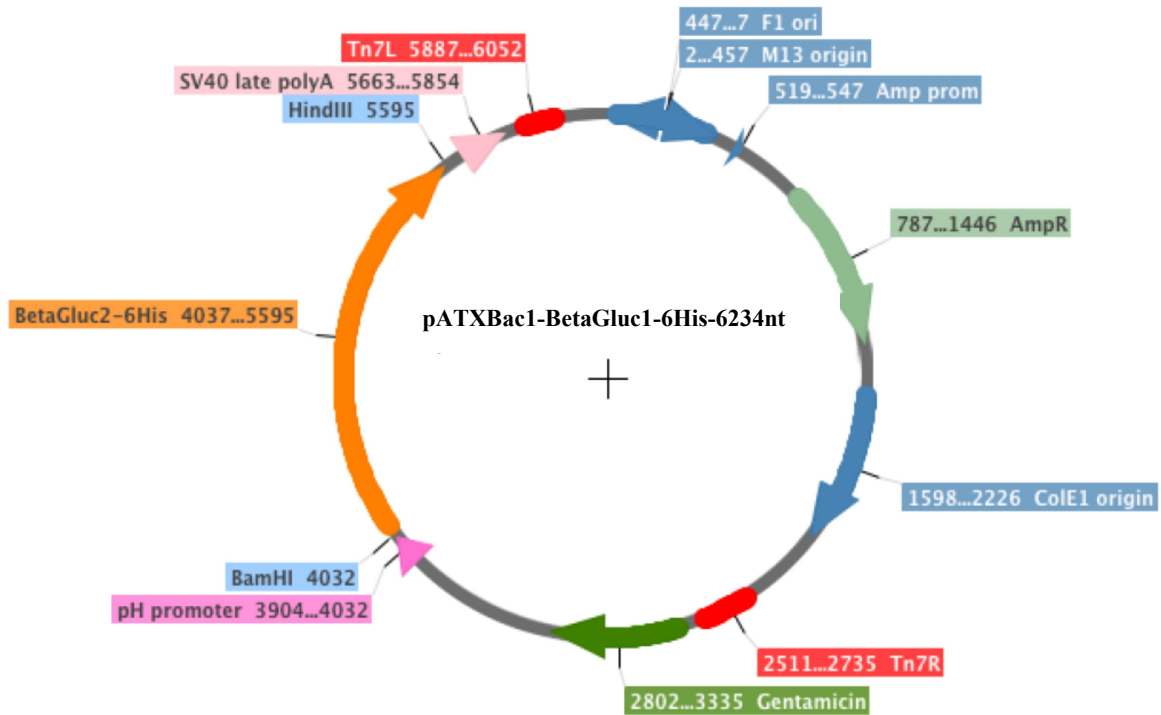


Figure 24: Construction pATXbac1-BetaGluc 1

b) Gène synthétique réalisé à partir de la séquence stockée dans NCBI BetaGluc 2

>BetaGluc 2[23-505] cDNA (1449 bp)

>BetaGluc[23-505] cDNA (1449bp)

```
GCCCCAGAAGATAAGGTGCCGATAGCCTGAAGGACTACGCCTTCCAGACGGATTCTGTTCGGAACCGCCACCAGCAG
CTACCAAGTGGAAGGAGCTTGGCTGGAGGACGGAAAGAGCCTGAACATTTGGGACACCCTGACCCACAACAAGAGCAACC
TGATCAGCGACCGCAGCAACGGAGACGTGGCTTGCGACAGCTACCACAAGTACAAGGAGGACGTGCAGCTGCTGAAGGAG
CTGGGCGTGAACTTCTACCGCTTCTCCGTCAGTTGGAGCCGCATTCTGCCAACCGGACACATTAACGTGGTGAACCAGGC
CGGCATCGACTACTACAACAACCTGATCAACGAGCTGCTGGCCAACGGAATTCAGCCCATGGTGACCATGTACCATTGGG
ACCTGCCCCAGACCCTGCAAGATTTGGGCGGTTGGCCCAACCAGGTGATGGCCAGTACTTCGAGGACTACGCCCAGTG
CTGTTACCAACTACGGCGATCGCGTGAAGTATTGGATCACCTTCAACGAGCCCTCGGTGTTTACCGCCGGATACGAGAG
CGTGGCTTTTACGCCCCAAACGTGGGCGCTACAGGATTCGGACAGTACCTGGCCACCCACACAGTGTGAAGGCTCACG
CCCGCGCTATCATCTGTACGACAACGAGTTTCGCGCCGCCCAACAGGGAAAGATCGGCATGGCCTTCAACATCAATTGG
TGCGAGCCCCGCGACAACATCACCGAGGATATCGCCGCTTGCAACCGCATGCAGGAGTTCAACCTGGGCATGTACGCCCA
CCCAGTGTTCAGCCCAGAGGGCGATTTCCTCAACCGTGGTGAAGGAGCGAGTGGCCATGAACAGCGAGGCCGAGGGATTTA
CCCAGAGTCGTCTGCCAAGCCTGACCCAGGAGGAGATCGAGTACATCAAGGGCACCGCCGATTCTTCGGCCTGAACCAC
TACACCACCTTCTACGGCAGCCCACTGACCTACACCGGAGAGCCAACCTTCACCAAGGACGTGGGCATCCTGATGATGCC
GGACTTCAGTTGGCCAGGCAGCGCCAGCATTTGGTTGCACGTGGTGGCCCTGGGGATTTTCGCAAGCAGCTGAACCGCATCG
CCGAGATCTACAACAACCCCCCGTGATCATCACCGAGAACGGATTTCAGCGACCACGGAGAGCTGAACGACACCGGCCGC
ATCAACTACCTGACCAGTACCTGACCAGATGCTGAACGCCATCCACGAGGACGGTTGCAACGTGGTGGGATATACCGC
CTGGTCCCTGATCGACAACCTTCGAGTGAACAACGGATACACCCAGCGCTTCGGCCTGTATCAGTGGATTTCGAGGACC
CCAACCGAGCCCGTACCATCAAGGAGAGCGCCAAGGTGTACGCCGAGATCATCGCCACCAAGCAGATCCCCGAGCGTTTT
CGCGAGGAG
```

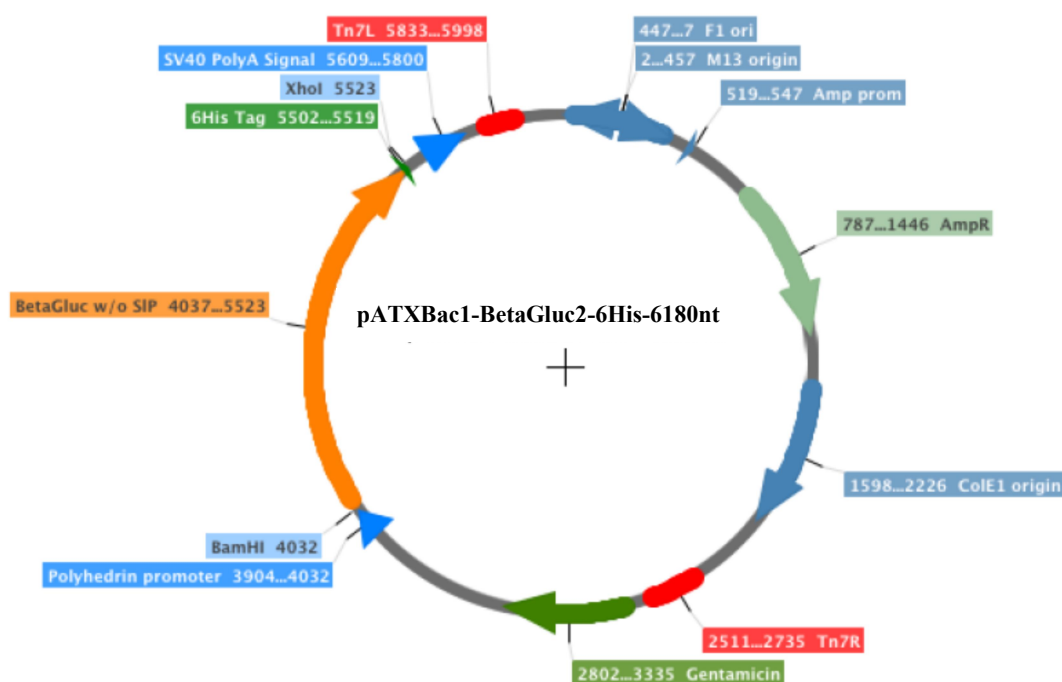


Figure 23: Construction pATXBac1-BetaGluc 2

Les constructions pATXBac1-BetaGluc 1-2 ont été transformées dans la souche DH10Bac d'*E. coli* afin de produire les bacmides recombinants. Les bacmides recombinants ainsi obtenus ont été purifiés puis transfectés dans les cellules Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) pour produire le virus P1 stock. Les cellules obtenues lors de la génération du stock P1 ont été analysées en SDS-PAGE et par Western blot afin de vérifier l'expression des protéines. L'amplification et la surexpression du virus recombinant ont été effectuées par infection des cellules Sf9 et Hi5 avec le Stock P1 le nouveau stock de virus obtenu constitue le stock P2. Le virus P2 Stock ainsi obtenu dans les deux cellules d'insectes (Sf9 et Hi5) a été utilisé pour les tests d'expression. La production a été effectuée dans 100 ml de culture de cellules Hi5 infectée par le stock P2 dans les conditions optimales. Les extraits brut enzymatique obtenu ont été concentrés puis purifiés en conditions natives sur colonne IMAC. Les protéines purifiées ont été analysées en SDS-PAGE.

2-2-Techniques de Biochimie

2-2-1-Purification et caractérisation de la β -glycosidase native de la blatte

Periplaneta americana

2-2-1-1-Préparation de l'extrait brut enzymatique

Environ trente (30) g de blattes entières *Periplaneta americana* ont été lavées à l'eau distillée puis essorées sur papier filtre et broyées dans 60 ml de NaCl 0,9 % (p/v) à l'aide d'un mortier en porcelaine. Le broyât obtenu a été centrifugé à 11000 rpm pendant 15 min à 4°C. Le surnageant obtenu a constitué l'extrait brut enzymatique.

2-2-1-2-Dosage des activités pNP-glycosidasiques

Le dosage de l'activité enzymatique a été réalisé dans le milieu réactionnel suivant:

- 125 µl de tampon acétate 100 mM pH 5,0 ;
- 50 µl de solution enzymatique ;
- 75 µl de pNP-glycoside 5 mM.

Ce milieu réactionnel a été incubé à 37°C pendant 15 min. La réaction a été arrêtée par ajout de 1 ml de carbonate de sodium (2%, p/v). L'activité enzymatique se manifeste par l'apparition d'une coloration jaune caractéristique du pnitrophénol (pNP) libéré en milieu alcalin par l'hydrolyse du pNP-glycoside. La quantité de pNP libéré a été déterminée au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 410 nm contre un témoin ne contenant pas de solution enzymatique. Ces conditions constituent les conditions standard de dosage dans cette étude. L'activité enzymatique se définit comme étant la quantité d'enzyme capable de libérer un micromole (µmol) de produit par min dans le milieu réactionnel dans les conditions sus-décrites. L'activité spécifique est le nombre d'activité enzymatique par mg de protéine.

2-2-1-3-Dosage des activités oligo et polysaccharidasique

Certains oligosaccharides sous l'action des enzymes fournissent du glucose. La quantité de glucose libéré peut être dosée selon la méthode de **Kunst et al. 1984** utilisant le réactif glucose oxydase-péroxydase.

a-Préparation du réactif glucose oxydase-péroxydase

Ce réactif a été constitué d'un mélange de deux solutions A et B préparées extemporanément. La solution A a été obtenue par dissolution d'un comprimé d'*o*-dianisidine dans 1ml d'eau. La solution B a été constituée d'une capsule de l'enzyme glucose oxydase dissoute dans 39 ml

d'eau. Le réactif a été préparé en ajoutant 400µl de la solution d'*o*-dianisidine au 39 ml de l'enzyme glucose oxydase.

b-Technique de dosage

Pour le dosage de l'activité oligo et polysaccharidasique, l'essai standard a été constitué de 5 mM d'oligosaccharide ou de polysaccharidasique et 50 µl de solution enzymatique dans un volume final de 250 µl de tampon citrate-phosphate 100 mM pH 4.6. Le mélange réactionnel a été incubé à 37°C pendant 15 min pour les oligosaccharides et pendant 1h pour les polysaccharides. La réaction enzymatique a été arrêtée par chauffage du milieu réactionnel pendant 5 min au bain-marie bouillant. Puis 200 µl du réactif glucose oxydase-peroxydase ont été ajoutés au milieu réactionnel pour doser la quantité de glucose libéré. Le nouveau mélange, bien homogénéisé, a été incubé pendant 15 min à 37°C. L'intensité de la coloration a été mesurée au spectrophotomètre à 490 nm contre un témoin ne contenant pas d'enzyme. Une courbe d'étalonnage de glucose obtenue dans les mêmes conditions a permis de convertir les densités optiques en micromoles de glucose libéré. L'activité enzymatique se définit comme étant la quantité d'enzyme catalysant l'hydrolyse d'une micromole de substrat par min dans les conditions standard. L'activité spécifique a été exprimée en unité enzymatique par mg de protéine (UE/mg).

2-2-1-4-Dosage des protéines

Les teneurs en protéine des différents échantillons enzymatiques ont été déterminées selon la méthode de **Lowry et al. 1951**.

Les réactifs utilisés pour le dosage des protéines ont été les suivants :

- solution A: réactif de Folin-Ciocalteus dilué de moitié dans la soude 0,1 N;
- solution B: carbonate de sodium (2%, p/v) préparé dans la soude 0,1 N;
- solution C1: sulfate de cuivre (0,5%, p/v) préparé dans de l'eau distillée;
- solution C2: tartrate double de sodium et de potassium (1%, p/v) préparé dans de l'eau distillée ;
- solution D: préparée extemporanément à partir de 100 µl de solution C1, 100 µl de solution C2 et de 10 ml de solution B.

Deux cent (200) µl de préparation protéique ont été dilués dans 2 ml de solution D. Ensuite, deux cent (200) µl de solution A ont été ajoutés à ce mélange. Le milieu réactionnel a été

agité et laissé reposer pendant 30 min à l'obscurité pour permettre le développement de la coloration. La densité optique de l'essai a été mesurée à 660 nm contre un témoin ne contenant pas de solution protéique. La densité optique obtenue a été ensuite convertie en mg de protéine grâce à une droite d'étalonnage établie dans les mêmes conditions. Le sérum albumine bovine a été utilisé comme protéine de référence.

2-2-1-5-Technique de purification de la protéine native

La purification de la β -glycosidase de la blatte *Periplaneta americana* après plusieurs essais a été effectuée en trois étapes comportant une chromatographie échangeuse d'anions, une chromatographie d'exclusion moléculaire et une chromatographie d'interaction hydrophobe.

2-2-1-5-1-Purification par chromatographie d'échange d'anions sur colonne Q sepharose Fast Flow

La première étape a été une purification par chromatographie d'échange d'ions, à l'aide du système Aktä Purifier et du logiciel Unicorn (Amersham Pharmacia). La phase stationnaire utilisée (Q sépharose fast flow) est chargée positivement et pourra fixer toutes les molécules de charge opposée. La résine a été équilibrée dans du tampon acétate 100 mM pH 5 avec un débit de 5 ml/min. A ce pH, l'enzyme est chargée négativement et se fixe sur la résine lors du dépôt. La résine a été alors lavée avec ce même tampon et toutes les protéines et molécules non chargées ou chargées positivement ont été éluées. Ensuite, Les molécules fixées sur la résine ont été progressivement éluées avec un gradient en NaCl de 0 à 2 M (0M; 0,1M; 0,3M; 0,5M; 0,1M; 1M; 2M) préparé dans le tampon acétate de sodium 100 mM pH 5 avec un débit constant de 5 ml/min. Des fractions de 3 ml ont été collectées et les plus actives éluées vers 0,3 M de NaCl ont été ensuite rassemblées pour la suite de la purification.

2-2-1-5-2-Chromatographie d'exclusion moléculaire sur le gel Sephacryl S-100 HR

Cette chromatographie encore appelée gel filtration, perméation de gel ou tamisage moléculaire permet de séparer les molécules en fonction de leur taille, leur masse moléculaire et de leur comportement hydrodynamique. La colonne a été montée sur le système Aktä Purifier piloté par le logiciel Unicorn (Amersham Pharmacia). Cette colonne permet de

fractionner les protéines globulaires qui ont un poids moléculaire compris entre 1000 et 100 000 Da. Le gel a été équilibré avec du tampon acétate 100 mM pH 5,0. Après injection de 500 μ l de l'extrait concentré, les protéines ont été éluées avec ce même tampon. Le débit de la chromatographie a été de 1 ml/min. Des fractions de 1 ml ont été collectées.

2-2-1-5-3-Chromatographie d'interaction hydrophobe sur gel Phényl-Sepharose CL-4B

La chromatographie d'interaction hydrophobe permet de séparer les molécules en fonction de leur hydrophobie et de leur caractère amphiphile. Les fractions les plus actives (10 ml) issues de la chromatographie précédente ont été saturées avec du sulfate d'ammonium (1,7 M) puis déposées sur la colonne Phenyl-Sepharose (Amersham Pharmacia) préalablement équilibrée avec du tampon acétate 100 mM pH 5,0 contenant du sulfate d'ammonium 1,7 M. Des fractions de 1 ml ont été recueillies. Après le lavage du gel avec ce même tampon, les protéines retenues ont été éluées par application d'un gradient en palier décroissant de sulfate d'ammonium (1,7M; 1M; 0,5M; 0,3M; 0,2M; 0,15M; 0,1M; 0 M) préparé dans le même tampon acétate 100 mM pH 5,0. Les fractions les plus actives ont été rassemblées puis fractionnées et concentrées sur millipore.

2-2-1-5-4-Electrophorèse en SDS-page

Les échantillons protéiques ont été dénaturés par un traitement de 5 min à 95°C dans un tampon Tris-HCl 0,5 M pH (6,8) contenant du SDS (2%, p/v), du β -mercaptoéthanol (5%, v/v), du glycérol (20%, v/v) et du bleu de bromophénol (0,5%, p/v) (10 μ l de l'échantillon +10 μ l de tampon de charge) le tout a été déposé sur gel puis migré à 200V pendant 30 min. Les tailles apparentes des protéines sont estimées par rapport à un marqueur de poids moléculaire (Bio-Rad).

2-2-1-6-Etude des caractéristiques physico-chimiques des protéines

2-2-1-6-1-Détermination du poids moléculaire de la protéine native par filtration sur gel de Sephacryl S-200 HR

La détermination du poids moléculaire de la protéine enzymatique native purifiée a été réalisée par filtration sur gel de Sephacryl S-200 HR (0,6 cm x 32 cm). Le gel a été équilibré avec du tampon acétate 100 mM (pH 5). Les volumes mort et total de la colonne ont été déterminés respectivement par le bleu de dextrane et le p-nitrophénol. Les marqueurs de poids moléculaires utilisés pour étalonner la colonne sont l' α -amylase de la patate douce (206 kDa), le sérum albumine bovine (66,2 kDa), l'amyloglucosidase du champignon *Aspergillus niger* (63 kDa), l'ovalbumine (45 kDa) et la cellulase du champignon *Aspergillus niger* (26 kDa) (BIO-RAD).

2-2-1-6-2-Influence du pH sur l'activité β -glucosidasique

2-2-1-6-2-1-pH optimum d'hydrolyse

Le pH optimum d'hydrolyse a été déterminé dans les tampons acétate 100 mM (pH 3,6 à 5,6), phosphate 100 mM (pH 5,6 à 8,0) et citrate phosphate 100 mM (pH 2,6 à 7). Les activités enzymatiques correspondantes ont été déterminées dans les conditions standard.

2-2-1-6-2-2-Stabilité au pH

La stabilité au pH a été étudiée en mesurant les activités résiduelles des protéines préincubées à 37 °C pendant 1 heure à différents pH (3,6 à 8) aux concentrations de 100 mM. Les activités résiduelles ont été déterminées dans les conditions standard.

2-2-1-6-3-Influence de la température sur l'activité β -glucosidasique

2-2-1-6-3-1-Température optimale d'hydrolyse

L'effet de la température sur l'activité catalytique des protéines a été étudié dans le tampon citrate phosphate 100 mM pH 4,6 à des températures allant de 30 à 80°C. Les activités résiduelles ont été dosées dans les conditions standard.

2-2-1-6-3-2-Etude de la stabilité thermique ou thermostabilité

2-2-1-6-3-2-1-Inactivation thermique

- milieu réactionnel

L'étude de l'inactivation thermique a été réalisée à 37 et 55°C pour la partie activation puis de 60 à 80°C pour la partie inactivation en ce qui concerne la protéine native. Pour les protéines recombinantes, l'inactivation thermique a été réalisée à 37 et 50°C pour la partie activation puis de 55 à 70°C pour la partie inactivation. Chaque 5 min, une aliquote (112,5 µl) a été prélevée et refroidie à la température ambiante pendant 10 min. Elle a été utilisée pour le déclenchement de la réaction dans les conditions standard. Les activités déterminées ont été ensuite exprimées en pourcentage d'activité relative par rapport à l'activité maximale.

-Analyses cinétique et thermodynamique

L'influence de la température sur la vitesse de la réaction de l'enzyme est donnée par l'équation d'Arrhenius 1889:

$$\ln [A_t/A_0] = -kt \quad \text{(Equation 1)}$$

Où A_t est l'activité résiduelle de l'enzyme au temps t , A_0 est l'activité initiale de l'enzyme et k la constante de la vitesse de la réaction (min^{-1}). Les valeurs de k sont obtenues à partir de la droite de régression de $\ln [A_t / A_0]$ en fonction du temps, où k est la pente.

Le temps de réduction décimale (D) représente le temps nécessaire (à une température donnée) pour réduire l'activité enzymatique de 10% de sa valeur initiale. Il a été déterminé selon l'équation de Stumbo 1973:

$$D = 2,303/k \quad \text{(Equation 2)}$$

Le temps de demi-vie de l'enzyme ($t_{1/2}$) a été calculé selon l'équation proposée par (Ünal 2007).

$$t_{1/2} = 0,693/k \quad \text{(Equation 3)}$$

Z (°C) est l'élévation de température nécessaire pour réduire la valeur de D de 90% :

$$\log [D_1/D_2] = [T_2-T_1]/ZT \quad \text{(Equation 4)}$$

Où T1 et T2 représentent les basses et fortes températures (°C ou °K), D1 et D2 sont respectivement les temps de réduction décimale (D) aux faibles et fortes températures en minute. La valeur de Z a été estimée à partir de la représentation graphique de log D en fonction de la température (T).

La relation entre la température et la constante de vitesse au cours de la dénaturation thermique est donnée par l'équation d'Arrhenius 1889:

$$k = Ae(-Ea/RT) \quad \text{(Equation 5)}$$

L'équation 5 peut s'écrire encore de la manière suivante:

$$\ln k = \ln A - Ea/R \times T \quad \text{(Equation 6)}$$

Où k est la constante de vitesse, A est la constante d'Arrhenius, Ea est l'énergie d'activation (énergie nécessaire pour l'inactivation de l'enzyme), R est la constante des gaz parfaits (8,31 Jmol⁻¹K⁻¹) et T est la température absolue en Kelvin. La représentation graphique de lnk en fonction de la température absolue a permis d'observer une droite linéaire. La pente de cette droite a permis de calculer l'énergie d'activation et l'ordonnée à l'origine correspond à ln A **Dogan et al. 2002, 2000**

Le coefficient de température (Q10), a été calculé selon l'équation de **Stevanato et al. 1995**:

$$Q10 = k(T2)/k(T1) \quad \text{(Equation 7)}$$

Où k(T2) et k(T1) sont les constantes de vitesse respectives aux températures T2 (T1 +10°C) et T1. Les valeurs de l'énergie d'activation (Ea) et de la constante d'Arrhenius (A) ont permis de déterminer les différents paramètres thermodynamiques (**Marin et al. 2003**). Ce sont: les variations d'enthalpie ΔH#, d'entropie ΔS# et de l'énergie libre ΔG# qui ont été données par les équations de **Galani et Owusu 1997**:

$$\Delta H\# = Ea - RT \quad \text{(Equation 8)}$$

$$\Delta S\# = R ((\ln A - \ln (KB/ hP) - \ln T)) \quad \text{(Equation 9)}$$

$$\Delta G\# = \Delta H\# - T \Delta S\# \quad \text{(Equation 10)}$$

KB est la constante de Boltzmann (1,38 x 10⁻²³ J/K), hP la constante de Planck (6,626 x 10⁻³⁴ J.s), et T la température absolue.

2-2-1-6-3-2-Dénaturation thermique

Elle a été suivie en mesurant dans les conditions standard de dosage, les activités résiduelles des protéines après 15 min de préincubation des enzymes purifiées à des températures comprises entre 30 et 80°C dans le tampon citrate phosphate 100 mM pH 4,6.

2-2-1-6-3-3-Influence de quelques agents chimiques

Pour déterminer l'influence des agents chimiques sur l'activité β -glucosidasique des protéines, le milieu réactionnel suivant a été réalisé:

- 125 μ l d'agent chimique préparé à 1 mM et 5 mM dans le tampon citrate phosphate 100 mM pH 4,6 ;
- 50 μ l de protéine purifiée.

Il a été préincubé pendant 20 min à 37°C puis, 75 μ l de pNP- β -D-glucopyranoside (5 mM) ont été ajoutés. L'incubation a été faite à la même température pendant 15 min puis la réaction a été arrêtée par ajout de 1 ml de carbonate de sodium 2% (p/v) au milieu réactionnel. Des témoins sans enzyme sont préparés dans les mêmes conditions. L'activité résiduelle est exprimée en pourcentage de celle obtenue en absence d'agent chimique.

2-2-1-6-3-4-Effet des solvants organiques

De nombreux substrats synthétiques et naturels, avant leur éventuelle dégradation par les enzymes, requièrent parfois pour leur solubilisation, un environnement plus ou moins organique qui n'est souvent pas favorable à l'action de ces biocatalyseurs. L'influence des solvants organiques sur l'activité des protéines purifiées a été menée à 37°C dans le tampon citrate phosphate 100 mM pH 4,6 en présence de concentrations variables de solvant organique. Les activités dosées dans ces milieux de concentrations croissantes en solvant organique ont été ensuite comparées à celle obtenue en milieu strictement aqueux.

2-2-1-6-3-5-Etude de la spécificité de substrat

L'étude de la spécificité de substrat des protéines purifiées a été réalisée sur une large gamme de substrats (Cellodextrines ; disaccharides ; polymères; alkyl glucosides ; glycosides synthétique) dans les conditions standard.

2-2-1-6-3-6-Détermination de KM et Vmax

Les paramètres cinétiques (KM et Vmax) sont déterminés selon la méthode de **Lineweaver et Burk 1934** en utilisant les substrats les mieux hydrolysés aux concentrations comprises entre 0,5 et 5 mM.

2-3-Techniques analytiques

2-3-1-Analyse protéomique de la protéine native

2-3-1-1-Préparation de l'échantillon

L'enzyme purifiée a été concentrée sur millipore puis migrée sur un gel en SDS-PAGE. Une fois séparées sur le gel d'électrophorèse, les bandes d'intérêts ont été excisées du gel et placées dans un microtube contenant de l'eau distillée puis envoyées sur la plateforme protéomique de Rouen pour le microséquençage.

2-3-1-2-Les étapes de lavages

Les bandes ont été lavées 3 fois avec 100 µl d'eau distillée puis 2 fois avec 100 µl d'un mélange 50/50 v/v ACN/NH₄HCO₃ 25 mM pendant 10 min. Les bandes ont été ensuite déshydratées par 50 µl d'acétonitrile (ACN) pendant 10 min.

2-3-1-3-Réduction-alkylation

La réaction de réduction a été réalisée afin de réduire les ponts disulfures formés par des cystéines qui pourraient empêcher l'hydrolyse enzymatique et ainsi le séquençage peptidique de la protéine. La réaction d'alkylation qui suit, empêche la reformation des ponts disulfures

réduits précédemment. La réduction a été réalisée par l'ajout de dithiothreitol (DTT) sur les morceaux de gel à une concentration final de 5 mM et une incubation à 50°C pendant 1h. La réduction a été ensuite initiée par ajout d'iodoactémide à une concentration final de 55 mM. Après 1h de réaction d'alkylation à 24°C, la solution a été éliminée. Les morceaux de gels ont été lavés pour éliminer l'excès de DTT et d'iodoacétamide et ont été ensuite déshydratés pour recevoir la trypsine.

2-3-1-4-Digestion tryptique

Les protéines ont été digérées à l'aide d'une solution de trypsine à 6,66 ng/μl dans de l'ammonium bicarbonate (NH₄HCO₃) 25 mM. Le volume ajouté est fonction de la taille des spots (10-25μl). La réaction de digestion dans le gel a été effectuée à 37°C durant la nuit.

2-3-1-5-Extraction des peptides

L'étape d'extraction doit permettre la diffusion passive des peptides du gel vers la solution d'extraction. Cette étape est primordiale pour avoir un signal le plus intense possible lors de l'analyse par MS. Une double extraction des peptides a été effectuée; d'abord pendant 2 fois 30 min à température ambiante avec une solution eau/ACN/acide formique (35%/60%/5%) et une autre extraction avec une solution ACN/acide Formique (95%/5%).

2-3-1-6-Analyse protéomique par spectrométrie de masse Q-TOF

L'analyse a été effectuée avec un spectromètre de masse ESI-QUAD-TOF (6520 Accurate-mass Q-TOF de chez Agilent équipé de l'interface HPLC-chip cube). Les données de fragmentation ont été traitées avec le logiciel Mass Hunter (version B.03.01, Agilent Technologies) afin de sélectionner les composés (peptides), d'extraire la « peak list » et de les convertir en fichier mzdata.xml. L'identification a été réalisée par l'intermédiaire du moteur de recherche MASCOT Daemon (version 2.1.3; Matrix Science, London, UK) par interrogation de la base de données entière.

2-3-1-7-Séquençage de *novo*

Cette approche est une solution alternative pour l'étude de protéines issues d'organismes non séquencés. Le séquençage de "novo" consiste à reconstituer la séquence peptidique d'un ion fragmenté à partir de son spectre MS/MS. A partir de chaque spectre MS/MS, une séquence en acides aminés, partielle ou complète, sera déduite et pourra être comparée aux banques de données protéiques par homologie de séquence et non plus par homologie de masse. La séquence déterminée est alors soumise à une recherche par alignement de séquence afin de déterminer la spécificité du peptide vis-à-vis d'une protéine. Le séquençage de "novo" a été effectué avec le logiciel PEAKS version 6.0 (BSI : Bioinformatics Solutions Inc.).

2-3-1-8-Séquençage N-terminal par la dégradation d'Edman

Cette technique permet de déterminer la séquence N-terminale des protéines ou la séquence totale de peptides. La fonction amine de l'acide aminé en position N-terminale de la chaîne peptidique est d'abord traitée à pH alcalin par le phénylisothiocyanate (PITC), appelé aussi réactif d'Edman. Le dérivé phénylthiocarbamyle (PTC) de la protéine ou du peptide ainsi obtenu est traité par un acide anhydre qui permet le clivage de la liaison peptidique du premier acide aminé en position N-terminale. L'acide aminé clivé (résidu ATZ (anilinothiozolinone)) est converti en dérivé PTH (Phénylthiohydantoin) puis injecté dans une colonne HPLC. Les acides aminés sont identifiés en fonction de leur temps de rétention comparé à un chromatogramme obtenu à partir de standards-PTH. Le microséquençage a été effectué à l'aide d'un séquenceur Procise 494 (Applied Biosystems) et les acides aminés identifiés par HPLC C18 phase inverse.

2-3-2-Analyse des glycoalcaloïdes (GA) de la pomme de terre *Solanum tuberosum*

Un certain nombre de méthodes d'analyse ont été développées pour l'identification et la quantification des glycoalcaloïdes. Cependant, l'analyse par HPLC reste la méthode la plus courante car en plus de la quantification cette méthode permet l'identification des glycoalcaloïdes.

2-3-2-1-Extraction des glycoalcaloïdes (GA)

2-3-2-1-1-Préparation des échantillons

Les trois lots de pommes de terre ont été lavés essorés puis épluchés et découpés en fine tranches. Les échantillons ont été ensuite congelés à -80°C puis lyophilisés pendant 3 jours. Les échantillons séchés ont été ensuite broyés dans un mixeur. Les différentes poudres obtenues ont été conservées à -20°C jusqu'à l'analyse.

2-3-2-1-2-Préparation des tampons et des solvants

Solution d'extraction: à un litre d'eau distillée ont été ajouté 50 ml d'acide acétique. Ensuite, 5g de sodium bisulfite (NaHSO_3) ont été rajoutés sous agitation jusqu'à la dissolution complète.

Préparation des standards: Les étalons l' α -solanine, l' α -chaconine et la solanidine (pureté environ 99% par HPLC; ChromaDex - LGC Standards France) ont été préparés dans une gamme de 50 $\mu\text{g/ml}$ à 1000 $\mu\text{g/ml}$ à partir d'une solution mère de concentration de 2mg/ml dans du méthanol 100%.

Solution d'extraction en phase solide SPE: Cent cinquante millilitre d'acétonitrile (ACN) ont été mélangés avec 850 ml d'eau distillée pour la purification sur la colonne C18 Sep-Pak

Potassium monohydrogene phosphate (0,1 M): 17,4 g de K_2HPO_4 anhydre ont été dissous dans de l'eau distillée et transférés dans une fiole jaugée d'un litre puis complété à un litre avec de l'eau distillée.

Potassium dihydrogeno phosphate (0,1 M): 13,6g de KH_2PO_4 anhydre ont été dissous dans de l'eau distillée et transférés dans une fiole jaugée d'un litre puis complétés à un litre avec de l'eau distillée.

Tampon potassium phosphate (0,1 M, pH 7,6): 100 ml de la solution K_2HPO_4 ont été placées dans un bêcher avec un agitateur magnétique puis la solution de KH_2PO_4 a été ajoutée jusqu'à pH 7,6. Ensuite le tampon a été filtré à 0,45 μm .

Phase mobile: La phase mobile a été préparée en ajoutant à 100 ml du tampon phosphate 0,1 M, pH 7.6, 300 ml d'eau distillée. La solution a ensuite été mélangée avec 600 ml d'acétonitrile et passée à travers un filtre de 0,45 μm .

2-3-2-1-3-Extraction des glycoalcaloïdes (GA)

La poudre obtenue à partir des trois types de pommes de terre a été dissoute dans 80 ml de la solution d'extraction (eau: acide acétique: NaHSO₃, 100:5:0,5, v/v/v). Le mélange a été homogénéisé pendant 15 min à grande vitesse. Ensuite, la solution a été centrifugée à 10000 rpm pendant 30 min. Le surnageant a été recueilli puis filtré et conservé à 4° C.

2-3-2-1-4-Purification sur colonne SPE

L'extraction en phase solide (SPE) est une méthode de pré-concentration d'échantillon. Les composés cibles contenus dans l'échantillon sont piégés sur une cartouche contenant un adsorbant. Ils sont ensuite élués par un solvant approprié, reconcentrés avant d'être injectés dans l'appareil chromatographique. Les extraits ont été purifiés en SPE avec des colonnes C18 Sep-Pak Plus cartridge (Waters Assoc., Milford, MA, USA) conditionnées auparavant dans 5 ml d'acétonitrile. Pour la purification, 10 ml de l'extrait ont été passés à travers la colonne, ensuite les glycoalcaloïdes ont été élués avec 4 ml de la phase mobile après un lavage de la colonne avec 4 ml de la solution d'extraction en phase solide SPE (H₂O/ACN, 85:15 (v/v) afin d'éliminer les impuretés. Le volume final a été ajusté à 5 ml avec la phase mobile. Les extraits purifiés ont été conservés dans des Vials à 4°C jusqu'à l'analyse.

2-3-2-2-Analyse HPLC

L'analyse des différents échantillons a été effectuée sur la chaîne HPLC (Ultimate 3000, Dionex), la colonne utilisée est de type Venusil C18 column (5 µm particle size 100 Å, 150 x 4,6 mm). La température de la colonne a été maintenue constante à 30°C puis l'injection a été effectuée avec 20 µl de chaque échantillon. L'élution a été ensuite effectuée en isocratique avec 60% d'acétonitrile dans un tampon phosphate 0,01 M, pH 7,6. Le débit d'écoulement de 1ml/min a été maintenu constant. Chaque échantillon a été analysé pendant 20 min puis la quantification a été réalisée avec une détection UV à 202 ; 205 ; 210 nm en utilisant les étalons de l'α-solanine; l'α-chaconine et la solanidine. Les temps de rétention ont été de 6,75 et 7,2 min respectivement pour l'α-solanine et l'α-chaconine et de 35 min pour la solanidine. Les échantillons contenant une quantité importante de GA ont été utilisés pour la suite.

2-3-2-3-Hydrolyse chimio-enzymatique des composés

a)-Hydrolyse partielle

Après l'analyse en HPLC des différents extraits, les échantillons contenant des teneurs élevées en GA et les étalons de l' α -solanine et l' α -chaconine à 1 mg/ml ont été partiellement hydrolysés avec 1% de HCL à 75°C pendant 45 min.

b)-Hydrolyse enzymatique

Les hydrolysats obtenus ont été utilisés comme substrat pour la protéine native et la protéine recombinante la réaction a été effectuée comme suit :

-125 μ l de tampon citrate-phosphate 100 mM pH 4,6

-100 μ l de composé partiellement hydrolysé

-50 μ l de solution enzymatique

Le mélange réactionnel a été incubé à 37°C pendant 30 min à 6h. Un témoin sans enzyme a été réalisé dans les mêmes conditions. La réaction enzymatique a été arrêtée par chauffage du milieu réactionnel pendant 5 min au bain-marie bouillant puis les produits d'hydrolyse ont été analysés par HPLC-ESI/MS.

2-3-2-4-Analyse HPLC-ESI/MS

Les produits d'hydrolyse et les extraits ont été analysés en HPLC (Ultimate 3000, Dionex) couplé avec un spectromètre de masse (MSQ PLUS, Thermo Scientific) en ionisation électrospray (ESI) positif avec un temps de balayage de 0,10 secondes sur une plage m/z 100-1,500 et l'azote (N₂) comme gaz de séchage. La colonne Venusil C18 column (5 μ m particle size 100A, 150 x 4.6 mm) a été utilisée. La température de la sonde a été fixée à 450°C avec une tension de la sonde à 60 V. L'élution a été effectuée dans un mélange d'acétonitrile/eau contenant 0,1% de TFA (trifluoroacetic acid) dans les proportions 35:75. Le débit d'écoulement de 1ml/min a été maintenue constant. Le logiciel Chromeléon a été utilisé pour l'acquisition et l'analyse des données.

**CHAPITRE III : CARACTERISATION
BIOCHIMIQUE DE LA β -GLYCOSIDASE
NATIVE DE LA BLATTE *PERIPLANETA
AMERICANA***

Chapitre III : Caractérisation biochimique de la β -glycosidase native de la blatte *Periplaneta americana*

1-Introduction

Comme nous l'avons vu dans la revue bibliographique, les β -glucosidases (glucohydrolases β -D-glucopyranoside, EC 3.2.1.21) constituent un groupe majeur parmi les glycoside hydrolases. Elles catalysent l'hydrolyse des liaisons glycosidiques entre un glucose terminal et un aglycone ou un glycone, avec libération de D-glucose. Ces enzymes sont retrouvées dans tous les domaines du vivant incluant les bactéries, les archéobactéries, les eucaryotes et les virus. Elles sont impliquées dans de nombreuses voies métaboliques impliquant la conversion de la biomasse, la dégradation des glycolipides, la défense chimique, les interactions entre hôte et parasite, la modification de certains métabolites secondaires, la libération des composés responsables de la flaveur dans les jus de fruits et les vins (**Bhatia, Mishra, and Bisaria 2002; Sarry and Günata 2004**), la lignification, et la détoxification des aliments etc... (**Palmeri and Spagna 2007; Daroit, Aline, Plinho 2008; Pentzold et al. 2015; Ruan et al. 2009; Poreddy et al. 2015; Heidel-Fischer and Vogel 2015**). Les β -glucosidases utilisées dans les processus industriels sont surtout d'origine microbienne (**Bayer et al. 1998**) et ont été largement étudiées (**Cao et al. 2015; Wallecha and Mishra 2003; Bhatia, Mishra, and Bisaria 2002; Sang et al. 2005; Zhao et al. 2013; Dashtban and Qin 2012; Mattéotti et al. 2011**). En revanche, peu de β -glucosidases d'insectes ont été étudiées à ce jour, bien que les insectes soient très impliqués dans la dégradation de la biomasse par leur système digestif qui peut être considéré comme un bioréacteur naturel très performant. En effet, auparavant, ces activités ont été attribuées à la flore intestinale symbiotique jusqu'à la caractérisation de la première cellulase endogène de *Reticulitermes speratus* (**Watanabe et al. 1998**). Depuis lors, diverses études ont rapportés la caractérisation de plusieurs cellulases endogènes majoritairement contenues dans le tractus digestif de ces insectes, qui appartiennent à différents ordres et familles. C'est le cas de *Abracris flavolineata* (**Marana, Terra, and Ferreira 1995**); *Spodoptera frugiperda* (**Marana and Terra 2000**); *Tenebrio molitor* (**Genta et al. 2009**); *virgifera virgifera* (**Guzik et al. 2015**); de la larve de *Rynchophorus palmarum* (**Yapi et al. 2009**) et de différentes espèces de termites (*Blattodea: Termitidae*) (**Bujang, Harrison, and Su 2014**) etc.. Aujourd'hui, ces enzymes sont devenues un outil indispensable dans les industries agroalimentaires, textiles et pharmaceutiques. C'est pourquoi, malgré les avancées considérables de la biologie moléculaire pour améliorer les

performances catalytiques des enzymes naturelles existant afin de les adapter aux procédés industriels, la recherche d'enzymes aux propriétés plus performantes est encore nécessaire. L'objectif de cette première partie était donc de rechercher de nouvelles sources enzymatiques à activité originale capables de valoriser les molécules alimentaires et non alimentaires des ressources agricoles. La source enzymatique retenue dans ce travail est la blatte *Periplaneta americana*. En effet, les travaux de **Due, Kouadio, and Kouame (2008)** ont montré que cette blatte était une excellente source de glycosidases avec une importante activité β -glucosidasique. Ainsi, il s'agira au cours de cette première étape, de purifier l'enzyme responsable de cette activité de déterminer ces propriétés physico-chimiques puis d'entreprendre le séquençage interne de cette protéine.

2-Résultats

2-1-Isolement et purification de la β -glycoside hydrolase de la blatte *Periplaneta americana*

La purification de la β -glycosidase a tout d'abord été réalisée à partir du surnageant d'un broyat brut de blattes entières de l'espèce *Periplaneta americana*, repris dans de l'eau physiologique et centrifugé. La préparation obtenue montre une activité totale de 413,9 UI correspondant à une activité spécifique de 4 UI / mg de protéine. L'activité pour tous les essais a été déterminée avec le substrat pnp β -D-glucopyranoside comme indiqué dans le matériel et méthode. Cette préparation a été ensuite déposée sur une colonne échangeuse d'anions DEAE- Sepharose CL-6BL. Comme le montre le chromatogramme de la **figure 25**, seule la fraction protéique éluée par une solution de NaCl de concentrations comprises entre 0,1 et 0,3 M présente une activité β -glucosidasique (**figure 25**). A ce stade, la préparation enzymatique isolée (fractions 49 à 61) possède une activité spécifique de 15 UI / mg de protéine. Le rendement obtenu est de 69 % et le facteur de purification de 3,7 (**Tableau I**). Une chromatographie d'exclusion a ensuite été réalisée. Pour cela, la préparation (fractions 49 à 61) a été déposée sur un gel Sephacryl S-100-HR. Le profil d'élution (**figure 26**) montre un seul pic d'activité β -glucosidasique. Les fractions les plus actives (numéro 107 à 119) ont été rassemblées pour la dernière étape. La préparation obtenue à ce stade présente une activité spécifique de 85 UI/mg de protéine, ce qui correspond à un rendement de 13% et un facteur de purification de 21 (**Tableau I**). La dernière étape de purification a consisté en une chromatographie d'interaction hydrophobe sur gel Phenyl-Sepharose. L'enzyme retenue par le gel Phenyl-Sepharose et a été éluée par une solution de sulfate d'ammonium à la concentration de 0,1 M (**figure 27**). Les fractions les plus actives (numéro 99 à 103) ont été rassemblées. Cette préparation présente une activité spécifique de 212 UI/ mg de protéine. Le rendement final cumulé est de 1,5 % et le facteur de purification atteint 52 (**Tableau I**).

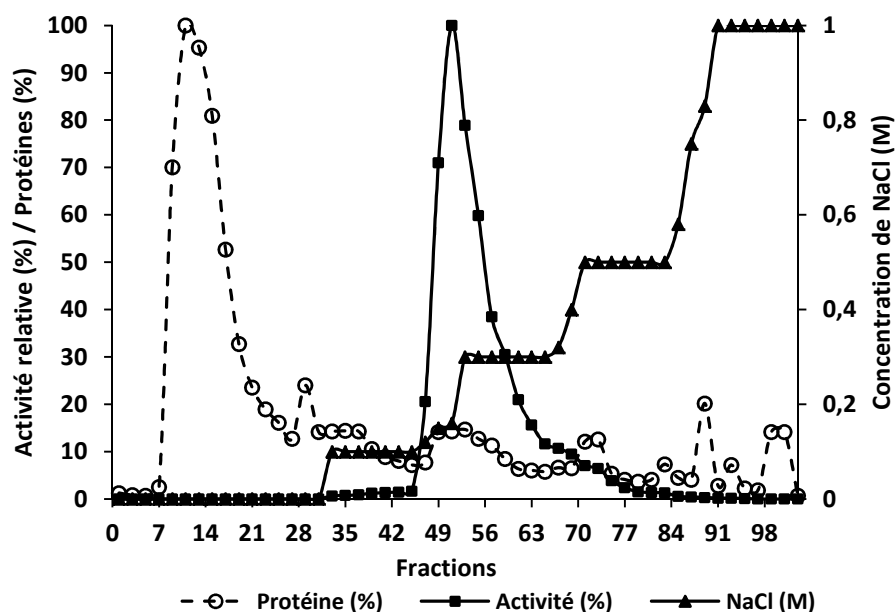


Figure 25: Profil de la chromatographie d'échange d'anions sur le gel DEAE-Sephacrose de la β -glycosidase de la blatte *Periplaneta americana*

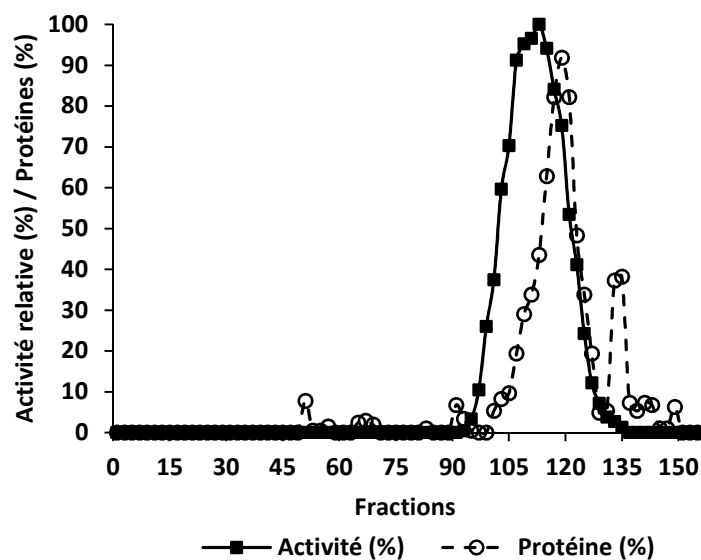


Figure 26: Profil de la chromatographie d'exclusion moléculaire sur le gel Sephacryl S-100 HR de la β -glycosidase de la blatte *Periplaneta americana*

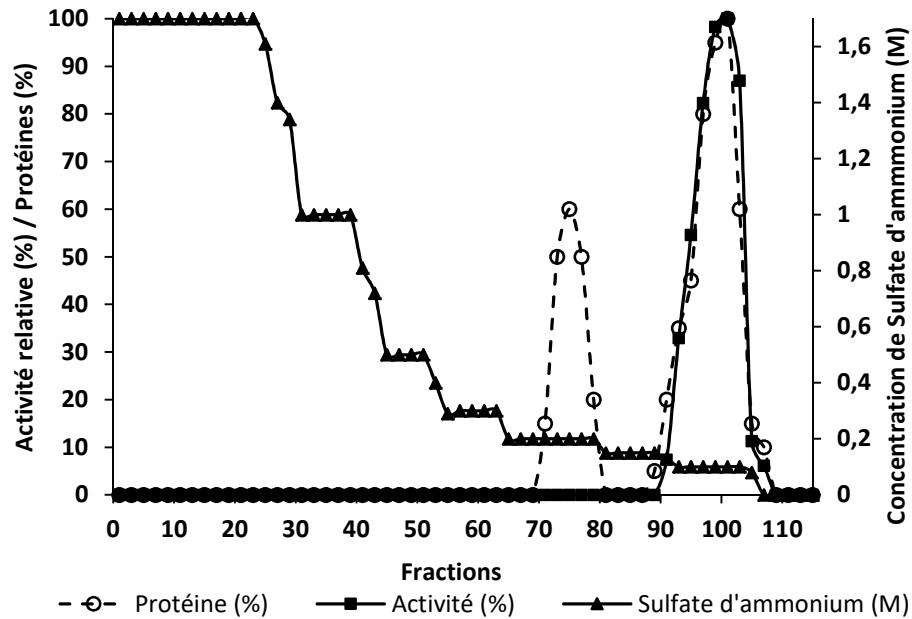


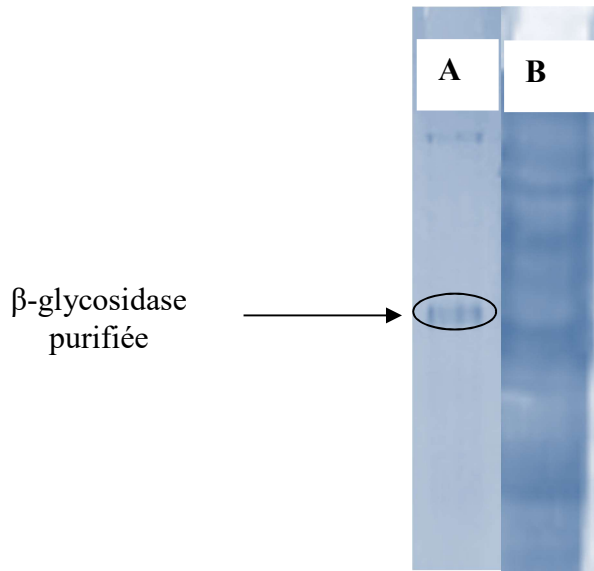
Figure 27: Profil chromatographique d'interaction hydrophobe sur gel Phényl-Sephrose de la β -glycosidase de la blatte *Periplaneta americana*

Tableau I : Bilan global de la purification de la β -glycosidase de la blatte *Periplaneta americana*

Etape de purification	Activité totale (UI)	Protéine totale (mg)	Activité spécifique (UI/mg de protéine)	Facteur de purification	Rendement (%)
Extrait brut enzymatique	413,9±4,6	102±2,36	4±0,02	1	100
DEAE-Sephrose	287,9	19	15	3	69,5
Exclusion moléculaire Sephacryl S-100 HR	55	0,6	85	21	13
Phényl-Sephrose CL-6B	6	0,03	212	52	1,5

UI : unité internationale

Pour vérifier la pureté de l'enzyme, la préparation a été analysée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). Une seule bande protéique est observée sur le gel (**figure 28**).



**Figure 28: β -glycosidase purifiée de la blatte *Periplaneta americana*
A: β -glycosidase purifiée B: Extrait brut enzymatique**

2-2-Caractéristiques physico-chimiques de la β -glycosidase de la blatte *Periplaneta americana*

2-2-1-Poids moléculaire de la β -glycosidase

Le poids moléculaire apparent de la β -glycosidase purifiée a été estimé à 46,5 KDa en filtration sur gel (**figure 29**)

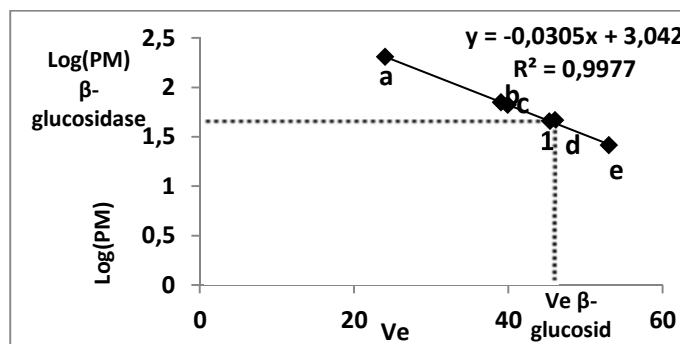


Figure 29: Poids moléculaire de la β -glycosidase de la blatte *Periplaneta americana* déterminé à partir du volume d'élution (V_e) par filtration sur gel Sephacryl S-200 HR Marqueurs utilisés: a: β -amylase de la patate douce (206000 Da), b: sérum albumine bovine (66200 Da), c: amyloglucosidase d'*Aspergillus niger* (63000 Da) d: ovalbumine (45000 Da), e: cellulase d'*Aspergillus niger* (26000 Da). 1: β glucosidase purifiée (46500 Da).

2-2-2-pH optimum et stabilité au pH

Le pH optimum d'hydrolyse a été déterminé dans les tampons acétate 100 mM (pH 3,6 à 5,6) phosphate 100 mM (pH 5,6 à 8,0) et citrate phosphate (2,6 à 8). L'activité enzymatique a été déterminée dans les conditions standard. La β -glycosidase purifiée de la blatte *Periplaneta americana* à son pH optimum d'hydrolyse à 3,6 (**figure 30**) avec une zone de stabilité comprise entre 3 et 4 (**figure 31**).

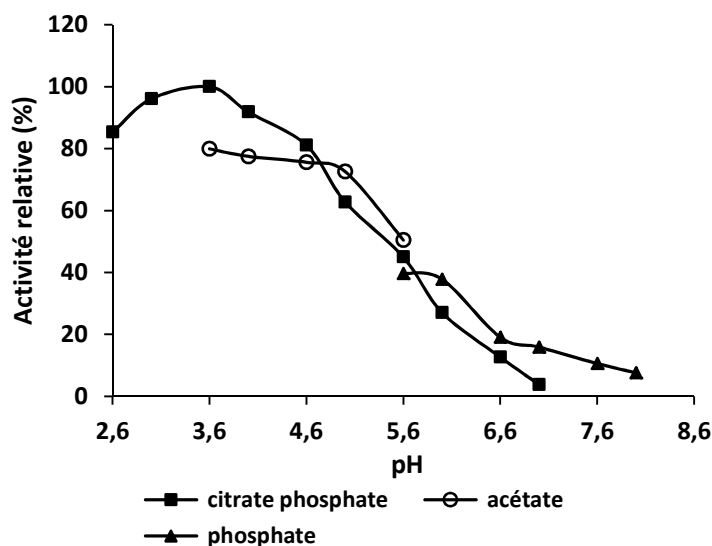


Figure 30: pH optimum de la β -glycosidase de la blatte *Periplaneta americana*

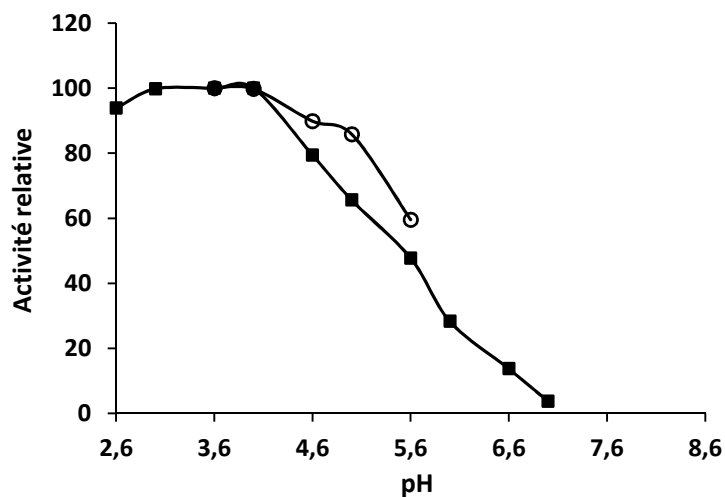


Figure 31: Stabilité au pH de la β -glycosidase de la blatte *Periplaneta americana*

2-2-3-Influence de la température sur l'activité de la β -glycosidase

2-2-3-1-Température optimale d'hydrolyse

La température optimale de la réaction d'hydrolyse catalysée par glucosidase est de 55°C (figure 32)

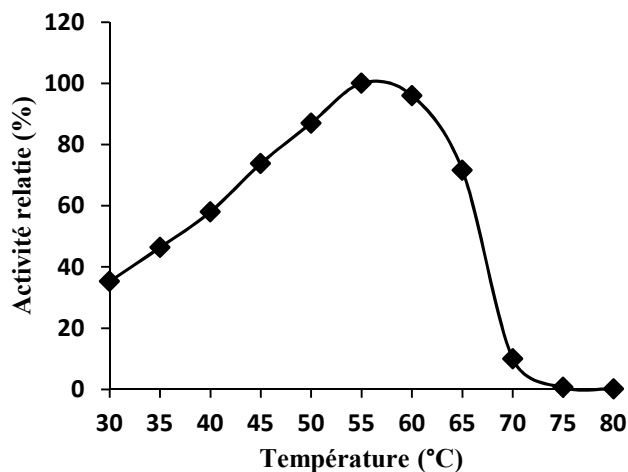


Figure 32: Température optimale d'hydrolyse de la β -glycosidase de la blatte *Periplaneta americana*

2-2-3-2-Dénaturation thermique

L'étude de la dénaturation thermique montre que la β -glycosidase purifiée conserve son activité catalytique jusqu'à 55°C. Au-delà de cette température, on note une chute rapide de l'activité catalytique traduisant la dénaturation de l'enzyme (figure 33).

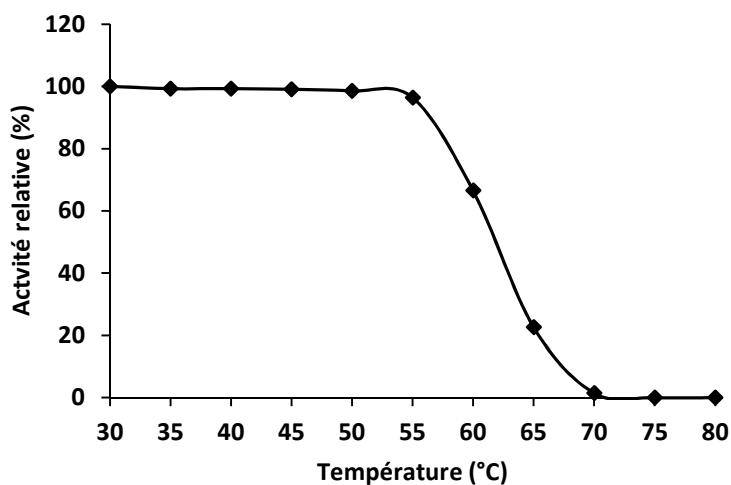


Figure 33: Dénaturation thermique de la β -glycosidase de la blatte *Periplaneta americana*

2-2-3-3-Inactivation thermique

A 37°C, la β -glycosidase purifiée de la blatte *Periplaneta americana* conserve 100% de son activité catalytique après 3h 30 min de préincubation dans le tampon citrate phosphate 100 mM pH 3,6. Après 2h 30 min de préincubation à la température optimale (55°C), l'activité initiale est réduite de moitié (50 %) dans le même tampon (figure 34).

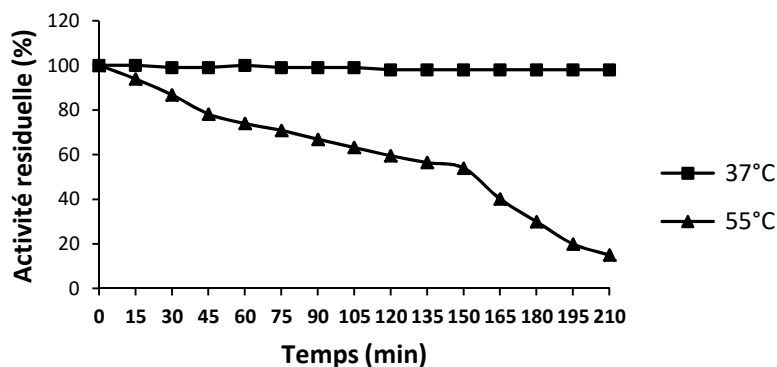


Figure 34: Inactivation thermique à 37 et 55 °C de la β -glycosidase purifiée

2-2-4-Influence des agents chimiques sur l'activité de la β -glycosidase de la blatte *Periplaneta americana*

Les ions Na^+ , K^+ , Ca^{2+} et l'EDTA exercent un léger effet activateur sur la β -glycosidase de la blatte *Periplaneta americana* à la concentration de 1 mM tandis que les ions Ba^{2+} , le Zn^{2+} et le PCMB provoque une chute d'activité comprise entre 20 et 50 % indicatrice d'un effet inhibiteur (Figure 35). Les ions Mg^{2+} n'ont pas d'effets particuliers.

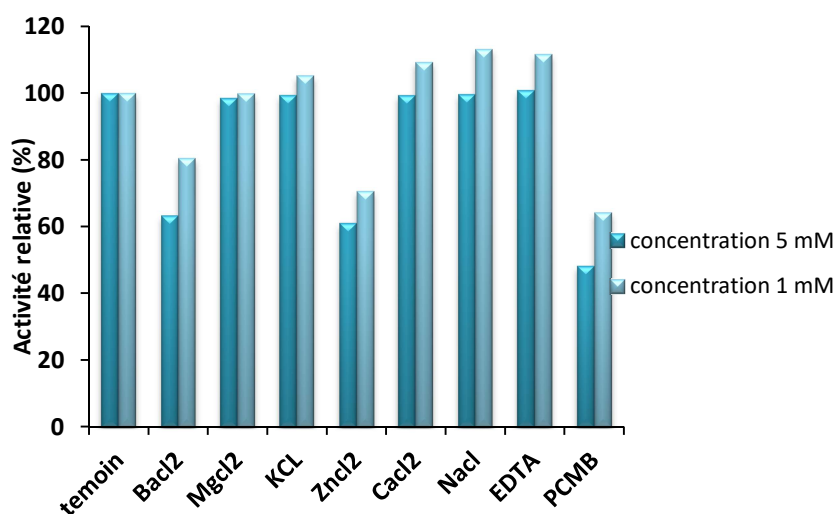


Figure 35: Influence des agents chimiques sur l'activité catalytique de la β -glycosidase de la blatte *Periplaneta americana*

2-2-5-Spécificité de substrat

La β -glycosidase purifiée de la blatte *Periplaneta americana* hydrolyse le *p*NP- β -D-glucopyranoside, le N-acétyl- β -D-glucopyranoside, le N-acétyl- β -D-galactopyranoside, le *p*NP- β -D-galactopyranoside, le saccharose et le cellobiose (**Tableau II**).

Tableau II: Spécificité d'hydrolyse des substrats naturels et synthétiques de la β -glycosidase de la blatte *Periplaneta americana*

Substrat	Concentration	Activité relative (%)
<i>p</i> NP- β -D-glucopyranoside	5 mM	100
Cellobiose	5 mM	90
Saccharose	0,5 % (p/v)	42,50
laminarine	0,5% (p/v)	0
Carboxyméthylcellulose	0,5 % (p/v)	0
Inuline	0,5 % (p/v)	0
Mannane	0,5 % (p/v)	0
<i>p</i> NP-N-acétyl- β -D-glucopyranoside	5 mM	115
<i>p</i> NP-N-acétyl- β -D-galactopyranoside	5 mM	97,34
<i>p</i> NP- β -D-galacturonide	5 mM	0
<i>p</i> NP- β -D-galactopyranoside	5 mM	10,20

2-3-Séquençage de la β -glycosidase par la spectrométrie de masse LC-MS/MS

2-3-1-Optimisation du protocole de purification pour le séquençage

Pour réaliser le séquençage de la protéine, nous avons optimisé le protocole de purification. Trois étapes chromatographiques ont été effectuées comme dans le premier cas. Une chromatographie d'échange d'ions sur le gel le gel Q Sepharose, suivie cette fois de la chromatographie d'interaction hydrophobe sur le gel Phenyl-Sepharose puis en dernière étape la chromatographie d'exclusion sur le gel superdex 75. A la fin, les préparations obtenues ont été concentrées sur millipore puis migrées sur gel d'électrophorèse en SDS-PAGE. Ce protocole bien que ne permettant d'obtenir une purification partielle, a toutefois permis

d'améliorer l'activité spécifique qui est passé de 212 UI/ mg de protéine à 317,9 UI/ mg. Une bonne quantité de protéine a pu aussi être obtenue afin d'effectuer le séquençage. La masse molaire de la protéine est estimée à 50 kDa (**figure 36, 37**).

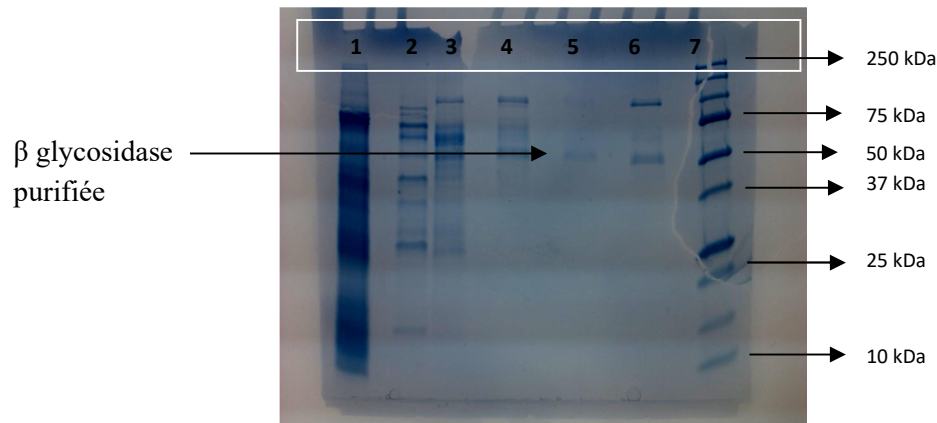


Figure 36: Electrophorèse en SDS-PAGE des différentes fractions obtenues au cours de la purification optimisée 1-Extrait brut; 2;3-Etape échange ions; 4; 6-Etape phenyl sepharose; 5-Etape exclusion moléculaire 7-Marqueur de taille

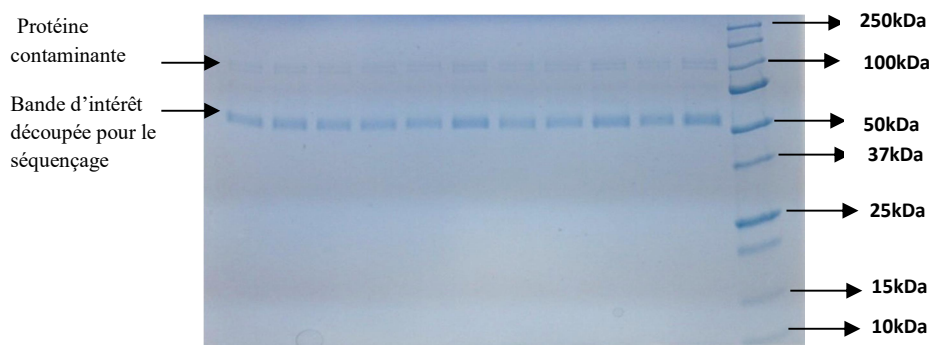


Figure 37: Séparation sur le gel d'électrophorèse après concentration de l'extrait purifié sur millipore en vue du séquençage de la protéine

2-3-2-séquençage de la protéine

Pour avoir accès à la séquence de la protéine native purifiée et caractérisée précédemment, la protéine a été s qu nc e. Le séquençage N-terminal de la protéine n'ayant pas permis d'obtenir une séquence bien définie, le séquençage de la protéine par digestion trypsique et analyse LC/MS des peptides produits a été entrepris. Le séquençage a généré des peptides qui présentent une identité de séquence avec des peptides de  -glucosidases stockés dans les banques de données avec des scores autour de 50 indiquant que la protéine purifiée est bien une à-D-glucoside hydrolase (**Tableau III**). Par la suite, le séquençage de "novo" réalisé a

permis d'avoir les 1000 premiers peptides de la séquence de la protéine classés par ordre de confiance (**Annexe 1**). Les peptides ayant un score de confiance jusqu'à 60% sont présentés dans l'annexe 1. Comme cela a été précisé dans l'étude bibliographique, une équipe brésilienne a isolé, en parallèle à nos travaux, un gène codant pour une β -glucosidase. Les peptides identifiés au cours de notre séquençage peptidique présente une parfaite identité de séquence avec cette protéine. Cependant comme la séquence n'était pas disponible au moment de nos travaux (No d'accension GenBank: KJ576835), nous avons poursuivi notre étude sans tenir compte de cette séquence pour le clonage codant la β -glucosidase que nous séquencée.

Tableau III: Séquençage interne de la β -glycosidase par digestion trypsique et analyse des peptides par spectrométrie de masse LC-MS/MS

Peptides	Score	Protéins matching the same set of peptides
KSTMQELNSRL	50	Beta-glucosidase.- Fervidobacterium sp. YNP.
RSGGGGGGGLGSGGSIRS	50	Putative beta-glucosidase.- Arabidopsis thaliana
RFSSSSGYGGGSSRV	50	Beta-glucosidase 1 (EC 3.2.1.21) -Arabidopsis thaliana
KEDIQLMKN	50	Beta-glucosidase BH3918- Bacillus halodurans
RYKEDIQLMKN	50	Beta-glucosidase.-Brassica-nigra (Black mustard).
KDSADVAEYLLKV	50	Glycoside hydrolase, family 1-Medicago truncatula
RLGEHNINVLEGDEQFINAAK	47	Beta-glucosidase A (BglA).- Desulfotalea psychrophila.
RVLLDTRF	37	Beta-glucosidase/6-phospho- β -glucosidase/
RVLIDTRA	37	β -galactosidase.-Thermoanaerobacter tengcongensis.
RSFSGCIRY	37	β -hexosaminidase β -chain precursor (EC 3.2.1.52)
RSFSWSRL	37	N-acetyl-beta-glucosaminidase
KEDVQIMKN	37	Beta-N-acetylhexosaminidase
RYKEDVQIMKN	37	Hexosaminidase B).- Felis silvestris
KAKPSLAKRL		

Discussion

La purification à homogénéité électrophorétique de la β -glycosidase de la blatte *Periplaneta americana* a nécessité l'utilisation de trois étapes chromatographiques. Ce sont dans l'ordre, les chromatographies d'échanges d'anions, d'exclusion moléculaire et d'interaction hydrophobe. Le faible rendement (1,54) obtenu à la fin de la purification pourrait s'expliquer par une perte importante de la quantité d'enzyme due à des interactions entre les protéines et les différents gels utilisés (Queiroz, Tomaz and Cabral 2001). L'activité spécifique obtenue (212,33 UI/mg) est largement supérieure à celle de la β -glucosidase de la larve du coléoptère *Tenebrio molitor* (53,25 UI/mg) (Ferreira et al. 2001) et de la β -glucosidase de la larve de *Rhynchophorus palmarum* (25,10 UI/mg) (Yapi et al. 2009). La détermination du poids moléculaire de la β -glucosidase en SDS-PAGE et en filtration sur gel a permis d'obtenir des valeurs approximatives de 49 et 46,5 KDa respectivement. Ces valeurs, relativement similaires, permettent d'affirmer que la β -glycosidase purifiée est une protéine monomérique. Genta, Terra, and Ferreira (2003) ont, après purification, mis en évidence l'aspect monomérique des deux cellulases de cette même espèce de blatte. Ces résultats pourraient mettre en évidence une caractéristique commune aux enzymes cellulolytiques de cette blatte. Le pH optimum d'hydrolyse de la β -glycosidase purifiée de la blatte *Periplaneta americana* est de 3,6. Cette enzyme est donc acidophile. La valeur de pH obtenu est largement inférieure à celle des pH optimums d'hydrolyse des glycosidases qui vont généralement de 4,5 à 6,0 (Cairns and Esen 2010). Cependant, elle est identique à celle de la β -glucosidase de *Lactobacillus brevis* dont le pH optimum est de 3,6 (Michlmayr et al. 2010). Ce caractère acidophile fait de la β -glycosidase purifiée un outil adapté pour des applications nécessitant l'usage d'enzymes actives en milieu acide notamment en industrie agroalimentaire où elle pourrait être utilisée dans les processus d'hydrolyse des précurseurs d'arômes, présents dans les vins et les jus de fruit (Palmeri and Spagna 2007; Maicas and Mateo 2005; Daenen et al. 2008). Elle pourrait aussi être utilisée en industrie de l'énergie pour la fabrication de biocarburant, obtenu à partir de la fermentation en milieu acide du glucose, résultant de l'hydrolyse de la cellulose; et sur le plan pharmaceutique pour la production de molécules pharmacologiquement actives (Shaik et al. 2013; Georgetti et al. 2009). La zone de stabilité au pH de la β -glycosidase de la blatte *Periplaneta americana* est comprise entre 3,0 et 4,0. Elle est moins large que celle de la β -glucosidase de l'abeille *Apis mellifera* (4,0 à 9,0) (Pontoh and Low 2002). Cependant elle est proche de celle de la β -glucosidase A du termite *Macrotermes bellicosus* (pH 5,6-6,6) (Binate et al. 2008). La β -glucosidase présente une

activité maximale à 55°C montrant ainsi que cette enzyme est mésophile comme la plupart des β -glucosidases connues dans littérature. L'étude de l'inactivation thermique révèle que la β -glycosidase de la blatte *Periplaneta americana* est sensible à une exposition prolongée à 55°C. En effet, à cette température, l'enzyme perd environ 50% de son activité catalytique après 150 min de préincubation tandis que l'activité semble totalement conservée après ce même temps à 37°C. Ce résultat montre la thermostabilité relative de cette β -glycosidase à 37°C. Il serait de ce fait, souhaitable de l'utiliser à cette température lors des réactions d'hydrolyse prolongées ou de transferts de glycosyle. L'étude de l'effet des ions chlorés indique que les ions Na^+ , K^+ et le Ca^{2+} augmentent l'activité de la β -glycosidase de la blatte *Periplaneta americana* tandis que le Ba^{2+} et le Zn^{2+} l'inhibent. **Park et al. (2001)** ont aussi noté que l'activité β -glucosidase de *Fusobacterium K-60* est inhibée par l'ion Ba^{2+} . Malheureusement, l'effet négatif de la présence d'ions métalliques sur l'activité de la β -glucosidase semble être un désavantage pour son application dans les procédés industriels. L'ion Ca^{2+} qui est légèrement activateur de la β -glycosidase de la blatte *Periplaneta americana* peut être conseillé dans les opérations de purification et de dosage de l'activité de ce biocatalyseur. En effet, des auteurs tels que **Tanaka and Hoshino (2002)**, ont montré que le Ca^{2+} joue un rôle important dans la thermostabilité des glycosidases. L'EDTA active la β -glycosidase de la blatte *Periplaneta americana* tandis que le pCMB l'inhibe. L'effet activateur de l'EDTA qui est un agent chélateur d'ion métallique a aussi été rapporté chez la β -glucosidase des semis du seigle *Secale cereale L.* (**Sue, Ishihara, and Iwamura 2000**). Cet effet activateur pourrait s'expliquer par le fait que l'EDTA favoriserait un réarrangement de certains groupements au niveau du site actif entraînant ainsi une meilleure fixation du substrat. L'effet inhibiteur du pCMB pourrait s'expliquer par la présence de groupement(s) sulfhydryle(s) dans le site actif de l'enzyme. En effet le pCMB réagit avec les groupement(s) sulfhydryle(s) des protéines entraînant ainsi une inhibition. L'étude de l'hydrolyse de différents glycosides a permis de tester leur capacité à servir de substrat. Ainsi, la β -glucosidase hydrolyse le pNP- β -D-glucopyranoside, le N-acétyl- β -D-glucopyranoside, le N-acétyl- β -D-galactopyranoside, le pNP- β -D-galactopyranoside, le saccharose et le cellobiose. Ce comportement enzymatique montre que cette β -glycosidase est spécifique de l'anomerie beta (β). Cependant, elle ne reconnaît pas de façon spécifique un seul résidu glycosyle. Elle hydrolyse à la fois des glycosyl β -glycosides et des aryl β -glycosides. Il s'agirait donc en effet d'une exo- β -D-glycosidase. Cette enzyme, appartient de ce fait à la 1^{ère} classe des β -glucosidases selon la classification de **Terra and Ferreira (1994)** basée sur la spécificité de substrat. Ce résultat indique que le rôle de cette β -glycosidase dans le tractus digestif de cette

blatte n'est pas uniquement d'intervenir dans la digestion du matériel cellulosique, mais aussi des toxines glycosides ingérées par cet insecte comme l'ont montré **Pontoh and Low (2002)** avec la β -glucosidase de l'abeille domestique *Apis mellifera*. Ces auteurs ont en effet montré que cette β -glucosidase n'avait pas d'action sur le cellobiose mais hydrolysait uniquement les aryl ou alkyl β -glycosides rencontrées dans les toxines glycosides ingérées par cette abeille. Ce comportement semble refléter la plupart des β -glucosidases de la famille GH1 qui possèdent une affinité envers plusieurs substrats. De plus, en se basant sur la multiplicité d'actions de ces β -glucosidases sur les substrats cellulolytiques, indiqués par **Sarry (2001)**, la β -glycosidase purifiée de la blatte *Periplaneta americana* pourrait être utilisée dans plusieurs réactions importantes, notamment les réactions de libération des composés aromatiques, des terpènes et antioxydants, des composés phénoliques des fruits et résidus végétaux, ainsi que pour l'hydrolyse des précurseurs d'arômes, présents dans les vins les moûts et les jus de fruit comme l'ont montré d'autres auteurs avec des β -glucosidases de diverses sources (**Sarry and Günata 2004; Gallifuoco, Alfani, and Cantarella 1999; Belancic and Gunata 2003; Palmeri and Spagna 2007; Daroit, Aline, Plinho 2008**). Après la purification et la caractérisation, le séquençage de la protéine a été entrepris. Le séquençage peptidique par la dégradation d'Edman n'ayant pas permis d'obtenir une séquence N-terminal bien définie, la protéine a été digérée par une endoprotéase, puis soumise à une fragmentation par LC-MS/MS. Les résultats obtenus par cette dernière méthode ont permis le séquençage de "novo" de cette protéine. Les différents peptides obtenus ont été comparés dans la base de données des protéines. Au moment de l'étude cela a permis de confirmer que l'enzyme était bien une β -glucosidase présentant des homologies avec des β -glucosidases présentes dans les bases de données des protéines. Ces séquences ont ensuite été utilisées pour isoler le gène entier codant pour l'enzyme que nous avons caractérisée.

Conclusion partielle

Au terme de notre étude, il ressort qu'une β -glycosidase a été purifiée à partir de l'extrait brut enzymatique de la blatte *Periplaneta americana* en utilisant les chromatographies d'échanges d'anions, d'exclusion moléculaire et d'interaction hydrophobe. Cette enzyme est acidophile (pH optimum 3,6), mésophile (T° optimale 55°C) et monomérique avec un poids moléculaire d'environ 49 et 46,5 kDa déterminés respectivement en SDS-PAGE et en gel filtration. Son activité hydrolytique est favorisée en présence de l'ion K^+ , Ca^{2+} , Na^+ et l'EDTA. Cependant, elle est inhibée par le Ba^{2+} , le Zn^{2+} et le PCMB. L'étude de la spécificité de substrat a montré que cette β -glycosidase n'est pas spécifique du résidu glycosyle et de la partie aglycone du substrat. Il s'agit donc d'une exo- β -D-glycosidase. Cette enzyme de par ses caractéristiques est un outil prometteur dans le cadre cette étude. Afin de mieux étudier ses propriétés fonctionnelles pour faciliter son utilisation ultérieure dans divers domaines, nous avons décidé dans la suite de ce travail, d'effectuer le clonage du gène codant pour la β -glycosidase, la surexpression de la protéine recombinante puis par la suite son application dans l'hydrolyse des glycoalcaloïdes de la pomme de terre.

**CHAPITRE IV: CONSTRUCTION D'UNE BANQUE
D'ADNC, CLONAGE DU GENE CODANT POUR LA β -
GLYCOSIDASE DE LA BLATTE *PERIPLANETA*
AMERICANA PRODUCTION ET CARACTERISATION
BIOCHIMIQUE DE LA PROTEINE RECOMBINANTE**

Chapitre IV: Construction d'une banque d'ADNc, clonage du gène codant pour la β -glycosidase de la blatte *Periplaneta americana* production et caractérisation biochimique de la protéine recombinante

1-Introduction

Les enzymes sont actuellement très largement utilisées dans de nombreux secteurs de l'industrie. L'industrie textile utilise des cellulases et des amylases. Celle des détergents utilise entre autres des protéases. Les industries alimentaires (industrie laitière, brasseries, jus de fruits, huiles, arômes, etc.) sont également des utilisateurs importants d'enzymes, de même que l'industrie de la pâte à papier, la pharmacie, la cosmétique et la chimie fine. L'intérêt économique lié à la recherche de nouvelles sources d'enzymes pouvant présenter des caractéristiques nouvelles est de plus en plus important. En effet, dans de nombreux secteurs industriels, l'utilisation des biocatalyseurs est en forte croissance. Cependant à ce jour, les propriétés intrinsèques des enzymes présentes sur le marché limitent leur utilisation à certains procédés de production industrielle. Les enzymes ne sont en effet actives que dans des plages de température ou de pH très réduites. Elles sont inactivées à haute température, en présence de solvants ou de concentrations salines inappropriées. Le défi aujourd'hui consiste donc à découvrir des enzymes qui répondent très exactement aux contraintes techniques et économiques des procédés de biocatalyse industriels modernes: enzymes plus stables (résistantes à la température, aux PH, aux solvants...), plus actives (gain de temps, rendement), ou catalysant des réactions que les enzymes actuelles ne savent pas réaliser. Disposer de nouveaux biocatalyseurs mieux adaptés aux applications et capables de fonctionner tant dans des conditions extrêmes que sur les substrats les plus étranges est devenu une arme décisive pour mettre sur le marché des produits plus compétitifs. C'est dans cet ordre d'idée que nous avons entrepris la caractérisation des enzymes de la blatte *Periplaneta americana*, cet insecte omnivore vivant dans des environnements considérés par l'homme comme extrêmes (caves, égouts, sous-sols, chaufferie....) et pouvant de ce fait posséder une artillerie enzymatique très performante. En effet, les travaux réalisés lors de la première partie nous ont permis de mettre en évidence la présence d'une β -glycosidase acidophile (pH optimum 3,6 avec plus de 80% de son activité à pH 2,6) à spécificité large qui interviendrait non seulement dans la digestion du matériel cellulosique, mais aussi des toxines glycosides ingérées par la blatte. Cette enzyme de par ses caractéristiques pourrait être un outil de choix dans plusieurs réactions importantes, notamment sur le plan industriel. Il s'agira

donc dans cette deuxième partie d'entreprendre le clonage du gène codant pour cette protéine et la production de la protéine recombinante, afin de mieux étudier ses propriétés fonctionnelles et pour faciliter son application ultérieure dans divers domaines. Le génome de la blatte n'étant pas totalement séquencé, nous avons décidé d'aborder ce chapitre par la construction d'une banque d'ADNc. Par la suite, le séquençage de l'ARN de cette blatte entrepris par **Tamaki et al. en avril 2014** et la mise à disposition de la séquence du gène codant pour la β -glycosidase dans la banque de donnée NCBI nous a permis d'effectuer en parallèle la production de la protéine du gène dont ils ont pu obtenir la séquence, et la production du gène codant pour la β -glycosidase isolé à partir de notre banque d'ADNc.

2-Résultats

2-1-Construction d’une banque d’ADNc à partir de l’ARNt de la blatte
Periplaneta americana

2-1-1-Extraction d’ARN total

L’ARN total a été extrait à partir de la blatte entière. Afin de vérifier l’intégrité des acides nucléiques, une fraction a été analysée sur gel d’agarose 0,8 % TAE et une autre fraction par électrophorèse capillaire (**figure 38**). L’ARN total se répartit sur une grande fourchette de tailles et les deux bandes correspondant aux ARN ribosomaux (18 S et 28 S) se distinguent nettement. Deux autres bandes d’intensité plus faible qui correspondent aux ARN ribosomaux (16 et 23S) sont également observées. Le RIN (RNA Integrity Number) qui est très proche de 10 (9,8) montre que les ARN sont d’excellente qualité.

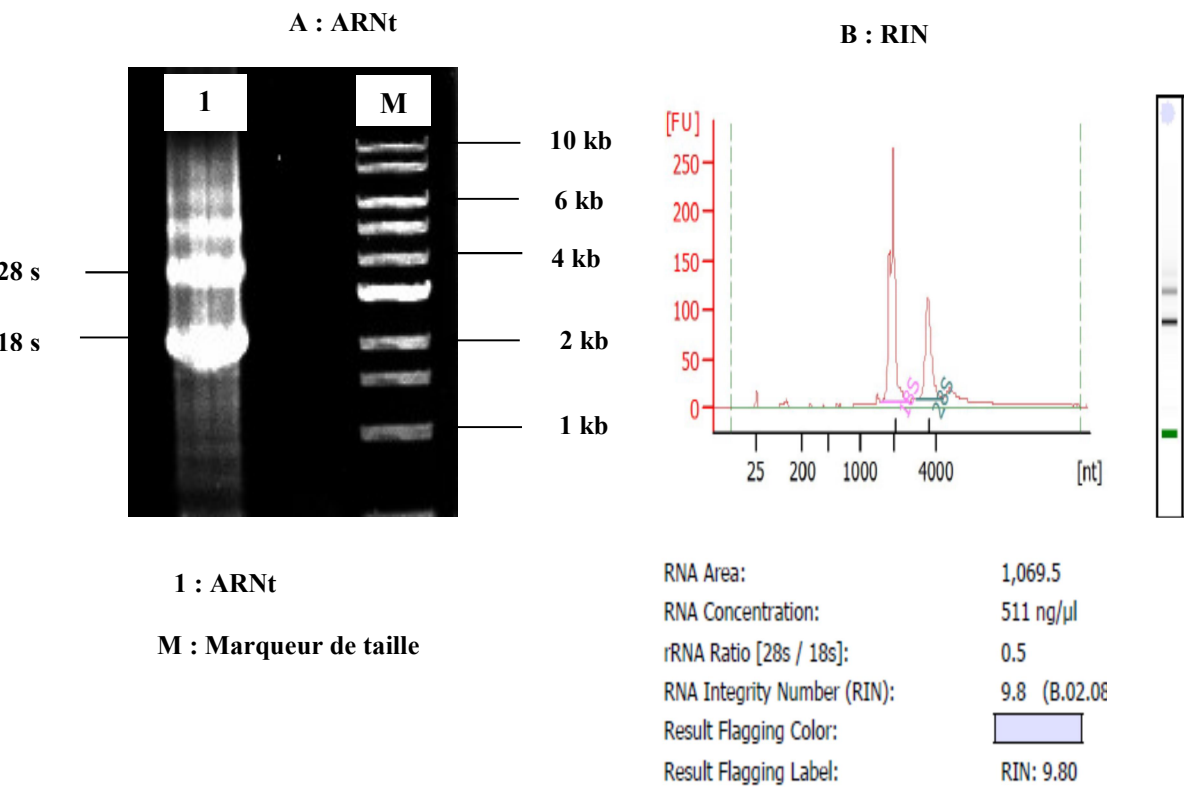
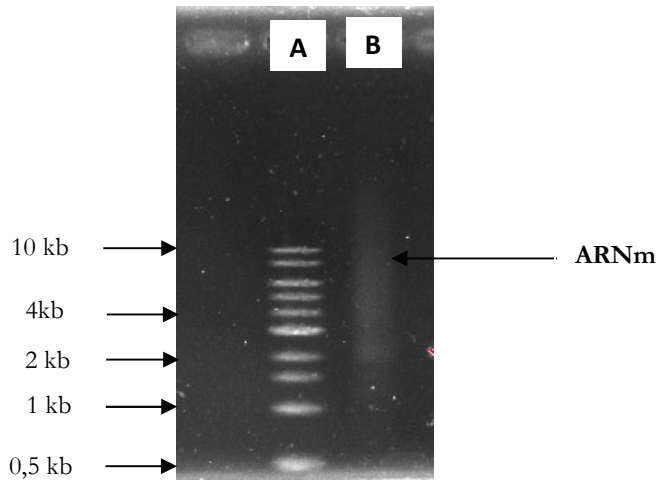


Figure 38:Électrophorèse d’ARN total extrait de la blatte *Periplaneta americana*

2-1-2-Extraction de l'ARNm à partir de l'ARN total

On observe un smear correspondant à l'ARNm



A: marqueur de taille 1 Kb ; B : ARNm

Figure 39: ARNm extrait à partir de l'ARNt

2-1-3-Synthèse du 1^{er} brin ADNc et amplification par LD-PCR

La synthèse du 1^{er} brin d'ADNc a été réalisée à partir de 3 μ l (0,3 μ g) de l'ARNm. L'amplification par la suite a été réalisée par LD-PCR (Long-Distance PCR). Cette méthode d'amplification sélective permet la confection de banques d'ADNc riches en ADNc complets (full length) puisque la reverse transcriptase n'ajoute les bases cytosine que lorsqu'elle atteint l'extrémité 5' de l'ARN et que l'oligo (dT) ne s'hybride que sur la queue poly(A). Une fraction des ADNc obtenus a été analysée par électrophorèse sur gel d'agarose (**figure 40**). L'amplification donne une traînée avec une bande majeure d'environ 1500 pb bien visible.

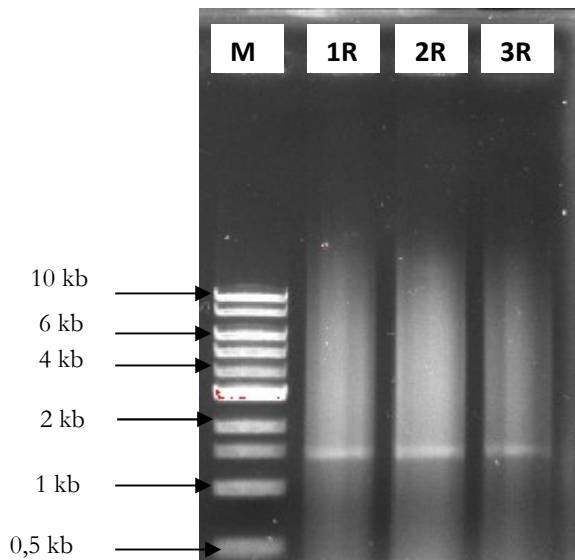


Figure 40: Électrophorèse sur gel d'agarose des produits de la RT-PCR avec 20 cycles de l'ARNm M : marqueur de taille 1Kb 1-3R RT-PCR

2-1-4-Fractionnement des ADNc

Après digestion par la protéinase K, puis par l'enzyme de restriction *Sfi*I, les ADNc ont été fractionnés selon leur taille sur une colonne Chroma Spin™. Cette étape permet d'éliminer les fragments d'ADN de petite taille (≥ 500 pb) et de grande taille ≤ 3000 pb mais aussi d'éliminer les divers oligonucléotides et enzymes résiduels avant l'étape de ligation. Trois microlitres de chacune des 16 fractions récupérées ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose (**figure 41**). Les résultats de l'électrophorèse montrent que les fractions 6, 7, 8, et 10 contiennent les ADNc de la taille comprise 1000 et 2000 bp susceptibles de contenir le gène de la β -glycosidase estimée à environ 1500 bp. Ces fractions sont regroupées et précipitées une nuit, avant la ligation dans le vecteur phagique.

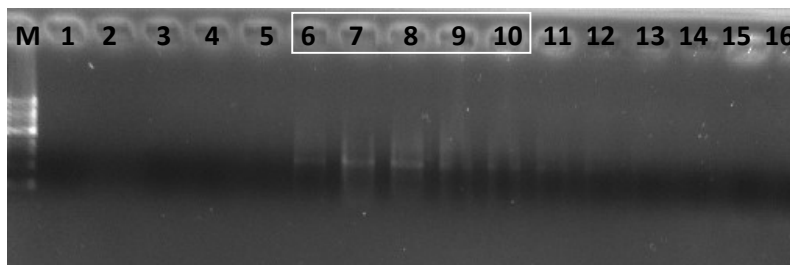


Figure 41: Électrophorèse sur gel d'agarose des différentes fractions après fractionnement des ADNc sur colonne M: Marqueur de taille 1-16: Fractions collectées

2-1-5-Titrage de la banque non amplifiée

Le **Tableau IV** présente les résultats du titrage de la banque réalisée avec le ratio 0,5/1 ADNc/Vecteur (v/v). Le comptage n'a été effectué que pour les dilutions de phages conduisant à un nombre de plages de lyse autour de 500 par boîte de 15 cm de diamètre. Le titre indiqué est la moyenne obtenue à partir de deux valeurs de dilutions différentes. Le titre obtenu est satisfaisant car une banque contenant au moins 10^6 clones indépendants est considérée comme représentative de la diversité des ARNm. L'ajout d'IPTG et de X-Gal au milieu de culture gélosé permet d'obtenir des plages de lyse bleues pour les phages n'ayant pas intégré d'ADNc, et des plages blanches pour les phages ayant intégré un ADNc (**figure 42**). L'efficacité de la ligation a été évaluée par le pourcentage de colonies blanches par rapport au nombre total de colonies. L'efficacité de la ligation est supérieure à 99%.

Tableau IV: Titrage de la banque non amplifiée

Ratio de ligation	volume étalé	nombre de	Pfu/ml	dilution	efficacité
ADNc/Vecteur (v/v)	(μ l)	plage de lyse			de la ligation
0,5/1	1	604	$1,2 \cdot 10^7$	10^4	>99%

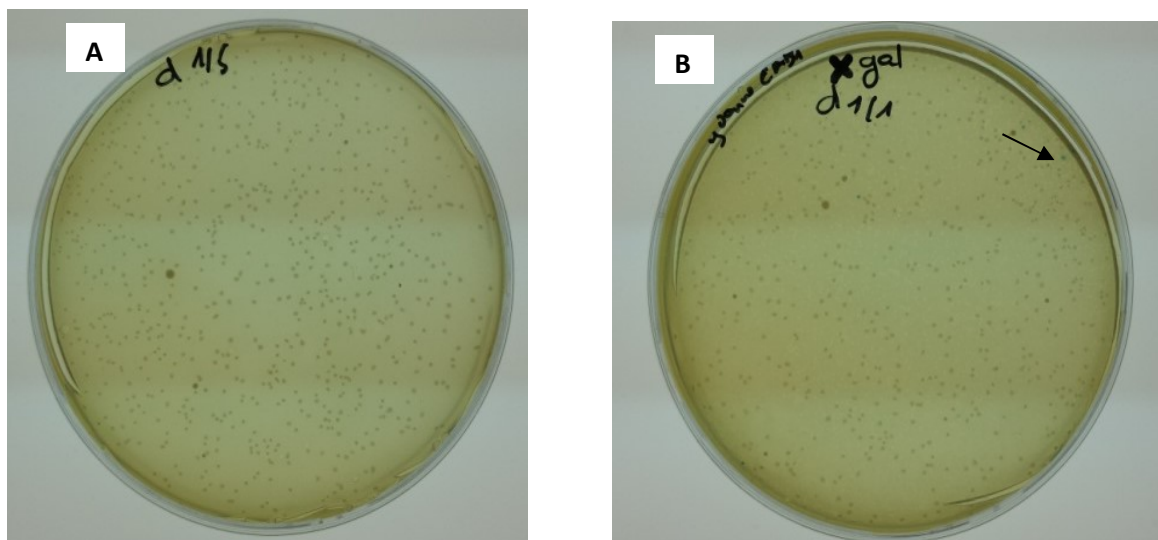


Figure 42: Titrage de la banque non-amplifiée (A) Plages de lyse obtenues avec la dilution 1/5 **(B)** screening bleu/blanc de la banque non amplifiée. La flèche indique les plages bleues.

2-1-6-Titrage de la banque amplifiée

L'amplification de la banque consiste à multiplier les phages sur un substrat bactérien, de façon à obtenir un grand nombre de copies de chacun des clones. Le processus d'amplification a l'avantage de permettre de stocker un grand nombre d'aliqots de la banque et de l'utiliser pendant plusieurs années. En contrepartie, cette technique a tendance à multiplier plus vite les ADNc correspondant à des ARNm fortement représentés dans les tissus, et les ARNm rares peuvent être perdus lors de l'amplification. Pour limiter ce phénomène, il importe d'amplifier un nombre suffisant de bactériophages afin que l'échantillonnage de départ soit le plus représentatif des ARNm réellement présents. Les 2/3 de la banque ont été amplifiés (330 μ l) sur 24 boîtes et les 1/3 restants (170 μ l) ont été conservés en cas de problème. Le volume de la banque amplifiée est d'environ 240 ml. Sa conservation est assurée à 4°C dans du tampon SM (tampon de conservation des phages) saturé en chloroforme. Les résultats du titrage de la banque amplifiée sont consignés dans le **Tableau VI**.

Tableau VI: Titrage de la banque non amplifiée

Ratio de ligation ADNc/Vecteur (v/v)	volume étalé (μ l)	nombre de plage de lyse	Pfu/ml	dilution	efficacité de la ligation
0,5/1	20	2020	$1,10^9$	10^4	>99%

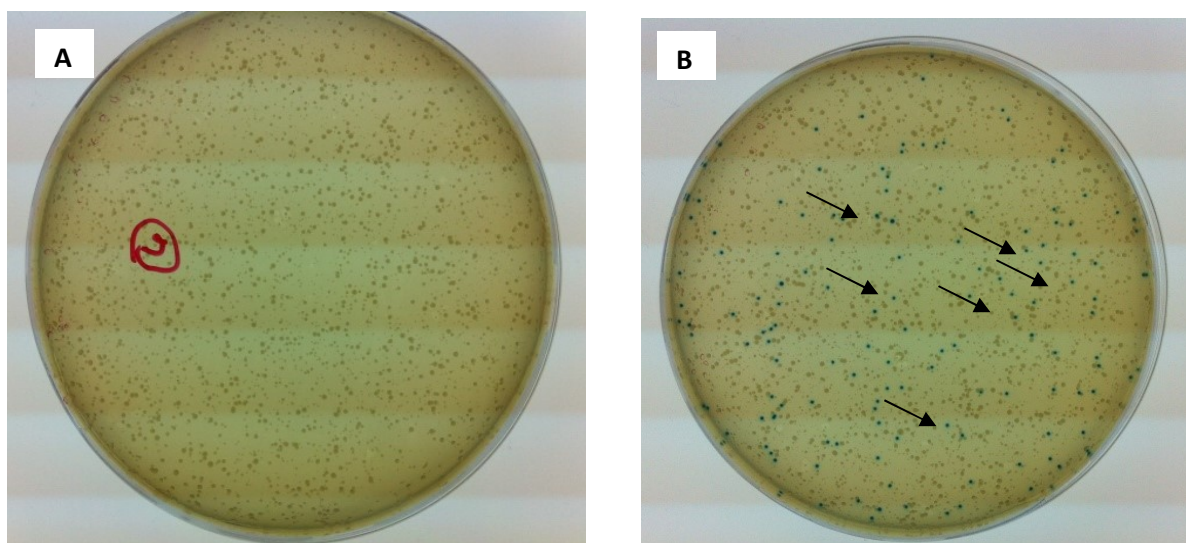


Figure 43: Titrage de la banque amplifiée. (A) Plages de lyse obtenues avec la dilution 1/5 **(B)** screening bleu/blanc de la banque amplifiée. Les flèches indiquent les plages bleues ne contenant pas d'insert.

2-1-7-Criblage de la banque d'ADNc

Le criblage de la banque a été effectué avec le substrat 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucopyranoside (X-glu) sur des Qtray LB/MgSO₄. La banque a été diluée au 1/20^{ème} de sorte à avoir une concentration d'environ 10⁴ clones par boîte. Après 48 h, un clone positif a été obtenu (**figure 44 A**). La banque étant étalée à une concentration de 10⁴ clones par boîte, les plages de lyse ne sont pas distinctes. Par conséquent, une zone positive risque de contenir plusieurs clones de phages. Un criblage secondaire a donc été effectué à partir des clones positifs isolés du criblage primaire. Après 72 h, des clones bleus ont été observés sur toute la boîte (**figure 44 B**). En effet, lorsque la β -glucosidase agit sur le substrat X-glu (5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucopyranoside), le 5-bromo-4-chloro-3-indole qui est de couleur bleue, est libéré dans le milieu. L'apparition des clones bleus montre bien que le gène responsable de l'activité de la β -glucosidase est exprimé dans la banque de cDNA.

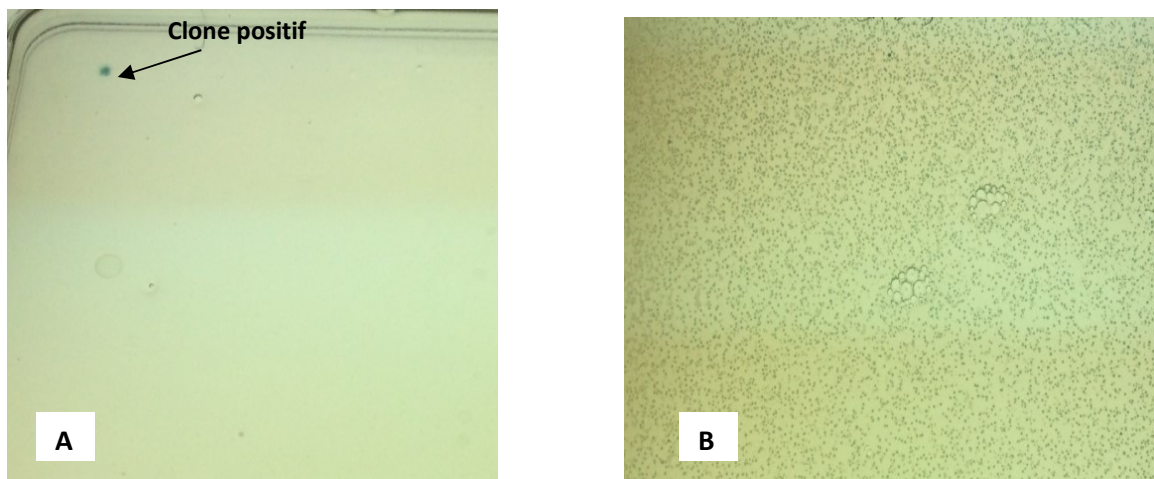


Figure 44: Criblage de la banque d'ADNc (A) criblage primaire (B) criblage secondaire

2-1-8-Excision des plasmides

Les phages correspondant aux plages de lyse positives ont été excisés de l'ADN phagique grâce au système cre-lox. Plusieurs clones ont été mis en culture pour des minipreps. Les ADNc d'une dizaine de clones positifs ont été séquencés puis analysés avec le logiciel BioEdit. Un alignement de séquence a été effectué avec les peptides issus du microséquençage interne de la β -glycosidase purifiée au précédent chapitre. Les peptides

retrouvés sans ambiguïté dans la séquence du gène codant pour la β -glycosidase sont soulignés (figure 45).

```

Atgatggaggtctcacatgctgttgtttctggtttcccttgctactgggctctttgggtgct
  M M E S H M L L F L F S L A T G L F G A
Gttcacggagct cctgaggacaaggtaccagattccttaaaggattatgcctttccagat
  V H G A P E D K V P D S L K D Y A F P D
ggttttctattcgggtaccgcaacatcttctaccaggttgaaggagcatggctcgaagat
  G F L F G T A T S S Y Q V E G A W L E D
ggaaagagcttaaacaatctgggatacactcacgcacaacaagtccaacctgatttccgac
  G K S L N I W D T L T H N K S N L I S D
cgttccaacggagatggttgctgtgattcttaccacaaatacaaagaagacgttcagcta
  R S N G D V A C D S Y H K Y K E D V Q L
ctgaaagagctaggagtgaacttctaccgtttctctgtgtcgtggtcacgaatccttctct
  L K E L G V N F Y R F S V S W S R I L P
acaggacatataaacgttgtgaatcaggctggaattgattattataacaatctcatcaat
  T G H I N V V N Q A G I D Y Y N N L I N
gaactgttggctaacggaattcagccgatggttacgatgtaccactgggacttaccacag
  E L L A N G I Q P M V T M Y H W D L P Q
acccttcaggacctcggaggttggccaaatcagggttatggcacaatacttcgaggactat
  T L Q D L G G W P N Q V M A Q Y F E D Y
gcccggttctgtttactaactacggagataggggtgaagtactggatcacattcaatgag
  A R V L F T N Y G D R V K Y W I T F N E
ccgagtgtcttcacagcagggtatgaaagcgtagctttccacgcccccaatgtcggagct
  P S V F T A G Y E S V A F H A P N V G A
accggatttggacaatacctgggtactcatactgtgtcgaaggcgcatgctcgagcttac
  T G F G Q Y L A T H T V L K A H A R A Y
catctctacgataacgaattcagagctgcacagcaaggaaaaataggttggctttcaat
  H L Y D N E F R A A Q Q G K I G M A F N
atcaattggtgcgaaccaagagacaacataacagaggatatcgccgcctgcaaccggatg
  I N W C E P R D N I T E D I A A C N R M
caagagtttaacctgggcatgtacgcacatcctgtattcagtcacagagggtgattttcca
  Q E F N L G M Y A H P V F S P E G D F P
actgtagtaaaggaaaggggttgcctatgaacagcggaggcagaaggatttacacagtcgaaga
  T V V K E R V A M N S E A E G F T Q S R
ctcccatctttaacacaggaggaaattgaatatataaaaggaacggcagatttcttcggg
  L P S L T Q E E I E Y I K G T A D F F G
ctgaaccactatactacgttttatggatctccactaacatacactggtgaaccaacattc
  L N H Y T T F Y G S P L T Y T G E P T F
acgaaagatgtgggcatttttaatgatgcctgacttcagctggccgggctctgcatctatc
  T K D V G I L M M P D F S W P G S A S I
tggcttcacgtagtgccttggggattccgaaagcaactgaatagaatagcggaaatctac
  W L H V V P W G F R K Q L N R I A E I Y
aataaccctccagtcatcatcacagaaaacggattttctgaccacgggtgaactgaatgac
  N N P P V I I T E N G F S D H G E L N D
acaggccgtatcaactatcttacgagttacttgactgaaatgctgaacgccatacacgaa
  T G R I N Y L T S Y L T E M L N A I H E
gatggctgcaacggttgttgggtacacagcgtggagtcttatagacaacttcgagtggaaac
  D G C N V V G Y T A W S L I D N F E W N
aatggttacacacaaagattcggcctgtaccacgtcgactttgaggacccgaaccgagca
  N G Y T Q R F G L Y H V D F E D P N R A
cgaactatcaaagaatcagccaaagtgtacgccgaaatcatcgcaacaaaacaaatcccg
  R T I K E S A K V Y A E I I A T K Q I P
gaacgatttcgagaggaatga
  E R F R E E -
    
```

Figure 45: Séquence nucléotidique et en acides aminés correspondant au gène de la β -glycosidase isolé à partir de la banque de ADNc: les peptides issus du microséquençage de la β -glycosidase purifiée retrouvés sans ambiguïté dans la séquence du gène sont soulignés. La flèche indique le point de clivage du peptide signal.

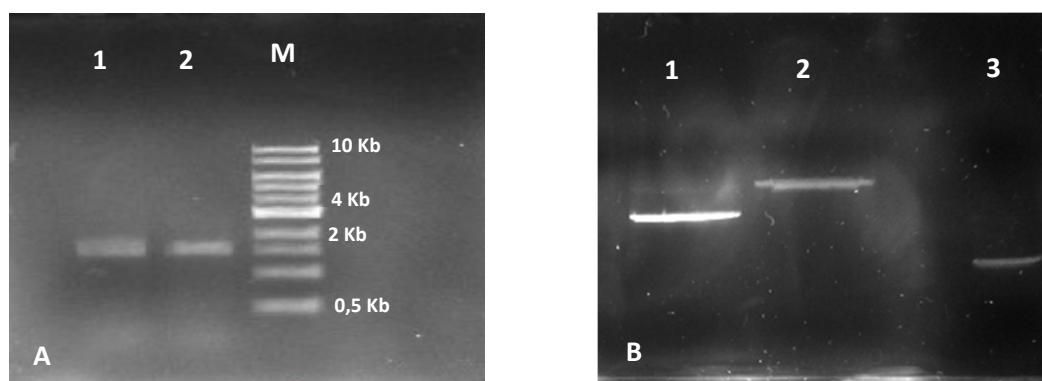
2-2-Sous-clonage de l'ADNc codant pour la β -glycosidase de la blatte *Periplaneta americana*, puis essai de production de la protéine recombinante

2-2-1-Chez *E.coli*

Après le séquençage des amorces ont été synthétisées pour le sous clonage du gène. Plusieurs stratégies de clonage ont été élaborées en tenant compte de la présence d'un signal peptide dans la séquence du gène. Dans un premier temps, pour la production chez *E.coli*, le gène a été sous-cloné dans le vecteur Pet 28a. Deux stratégies de clonage ont été utilisées, une construction prenant en compte la séquence totale du gène en incluant le peptide signal (PS) et une autre construction sans le peptide signal (séquence mature). Les sites de restriction des enzymes BamHI et HindIII ont été utilisés dans les deux cas avec un tag en N-terminal.

2-2-1-1-PCR réalisée à partir de la banque d'ADNc

Afin d'isoler le gène codant pour la β -glycosidase à partir de la banque d'ADNc une PCR a été réalisée à partir de 3 μ l de la banque amplifiée. Une bande correspondant à la taille attendue (1500 bp) a été observée à partir des deux constructions (**Figure 46 A**). La figure 42 B présente la double digestion du vecteur et des ADNc.



2-2-1-2-Essai de production de la protéine recombinante dans différentes souches d'*E.coli*

Les constructions ont été transformées dans différentes souches d'*E.coli* afin de produire la protéine recombinante. Les différentes cultures ont été analysées en SDS-PAGE. Comme le montre la figure ci-dessous aucune bande correspondant au gène de la β -glycosidase n'a pu être observée dans le surnageant de culture par conséquent aucune des souches d'*E. coli* testées n'a permis la surexpression du gène. Les différents tests d'activité réalisés sur les surnageants de culture et les culots lysés n'ont pas permis de mettre en évidence la production de la protéine par la bactérie *E. coli*.

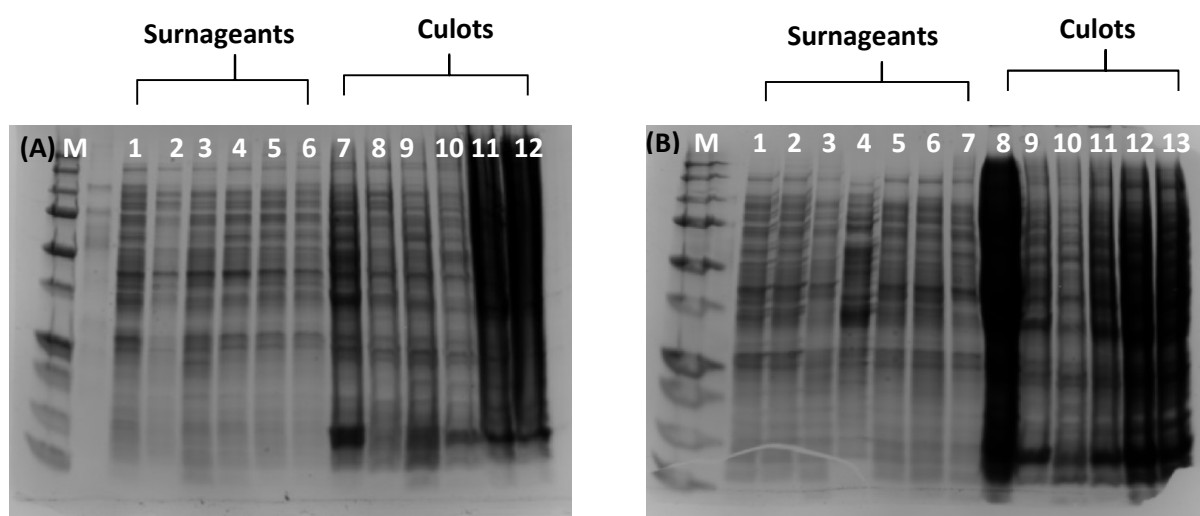


Figure 47: Essai de production de la protéine recombinante dans différentes souches d'*E.coli* (A) M: Marqueur 1: C41DE3 2: Rosetta DE3 3: JM109DE3 4: XLBlue 5: TunerDE3 6: BL21DE3 7: C41DE3 8: Rosetta DE3 9: JM109DE3 10: XLBlue 11: TunerDE3 12: BL21DE3 (B) 1: BL21 Star 2: C41DE3 3: JM109DE3 4: BL21DE3 5: TunerDE3 6: Rosetta DE3 7: XLBlue 8: BL21 Star 9: C41DE3 10: JM109DE3 11: BL21DE3 12: TunerDE3 13: Rosetta DE3

2-2-2-Chez *Yarrowia lipolytica*

Après avoir essayé plusieurs conditions infructueuses, afin de pouvoir surexprimer le gène d'intérêt chez la bactérie *E.coli*, la production chez la levure *Yarrowia lipolytica* a été testée. Le gène a été sous cloné dans le vecteur JMP160; trois stratégies de clonage ont été élaborées cette fois. Une construction prenant en compte la séquence totale du gène en incluant le peptide signal (PS); une autre construction sans le peptide signal (la séquence mature MAT) puis une dernière construction avec la séquence mature comprenant la cassette Prepro. Les sites de restriction des enzymes BamHI/AvrII ont été utilisés pour les deux premières

constructions puis le couple d'enzymes SacII/AvrII pour la dernière. Un tag HIS a été rajouté en C-terminale.

2-2-2-1-PCR réalisée à partir de la banque d'ADNc

Une PCR a été réalisée à nouveau à partir de 3µl de la banque amplifiée. Une bande correspondant à la taille attendue (1500 pb) a été observée à partir des trois constructions (Figure 48).

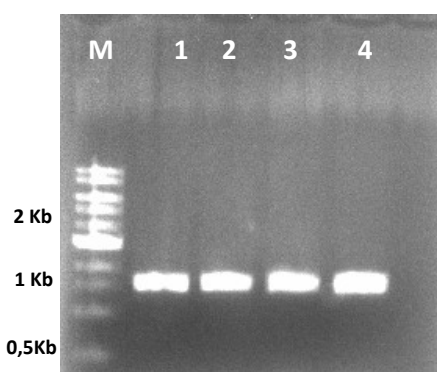


Figure 48: PCR à partir de la banque d'ADNc M: Marqueur de taille 1 Kb; 1: Construction incluant le signal peptide (PS) 2; 4: Construction avec la séquence mature (Mat) 3: Construction avec la séquence comprenant la cassette Prepro

2-2-2-2-Vérification de la présence des inserts

Après la ligation et la transformation, une PCR et une double digestion ont été effectuées sur les clones afin de vérifier la présence de l'insert (Figure 49 et 50).

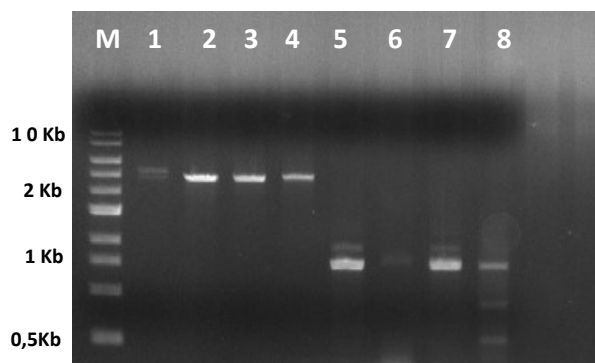


Figure 49: Vecteur et inserts purifiés après la double digestion: M: Marqueur de taille 1 Kb; 1-4: Vecteur JMP160 linéarisé; 5-6: Construction incluant le signal peptide (PS) 7: Construction avec la séquence mature (Mat) 8: Construction avec la séquence comprenant la cassette Prepro

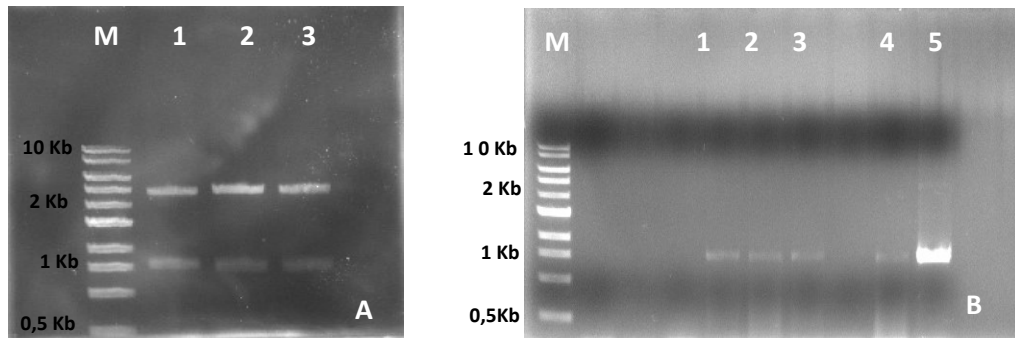


Figure 50: Vérification de la présence des inserts (A) Vérification par double digestion après la ligation **M**: Marqueur de taille 1 Kb; **1**: Construction incluant le signal peptide (PS) **2**: Construction avec la séquence mature (Mat) **3**: Construction avec la séquence comprenant la cassette Prepro **3**. **(B)** Vérification de la présence de l'insert dans le génome de *Yarrowia lipolytica* après la transformation **M**: Marqueur de taille 1 Kb; **1**: Construction incluant le signal peptide (PS) **2**: Construction avec la séquence mature (Mat) **3**: Construction avec la séquence comprenant la cassette Prepro **3**.

Conclusion partielle

Les différents tests d'activité réalisés sur les surnageants et les culots de culture n'ont pas permis de mettre en évidence la production de la protéine par la levure *Yarrowia lipolytica* malgré la présence du gène dans le génome de cette dernière.

2-2-3-Production en cellules d'insectes

Comme décrit dans le chapitre matériel et méthodes, nous avons effectué un alignement de séquence afin de comparer la séquence provenant de notre banque d'ADNc et la séquence stockée dans la banque de donnée NCBI (No d'accension GenBank: KJ576835). Après analyse, une petite différence au niveau des acides aminés a été observée. Un acide glutamique a été observé en lieu et place de l'acide aspartique dans notre séquence (**chapitre 2 figure 23 page 92**). Afin d'analyser les propriétés des deux protéines nous avons produit en parallèle, le gène codant pour la β -glycosidase issus notre banque de cDNA (**BetaGluc1**) et l'ADNc codant pour la β -glycosidase de la blatte *Periplaneta americana* dont la séquence a été stockée dans la banque de donnée NCBI (**BetaGluc2**). L'ADNc codant pour la β -glycosidase de la blatte *Periplaneta americana* dont la séquence a été stockée dans la banque de donnée NCBI a été synthétisé chimiquement à partir de la séquence optimisée. Cette séquence optimisée a été utilisée comme matrice pour la PCR afin d'amplifier la séquence [23-505] sans le peptide signal.

2-2-3-1-Production du gène codant pour la β -glycosidase issus de la banque de d'ADNc (BetaGluc1)

2-2-3-1-1-Génération du stock de virus P1

La construction pATXBac1-BetaGluc1-6His a été transformée dans la souche DH10Bac d'*E. coli* afin de produire les bacmides recombinants. Les bacmides recombinants obtenus ont été purifiés puis transfectés dans les cellules Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) pour produire le virus P1 stock. Les cellules obtenues lors de la génération du stock P1 ont été analysées en SDS-PAGE et par Western blot afin de vérifier l'expression de la protéine.

2-2-3-1-2-Analyse de l'expression de la BetaGluc 1 pendant la génération du stock P1

La flèche montre une bande de 55 kDa correspondant au gène d'intérêt dans le milieu de culture et dans la fraction native

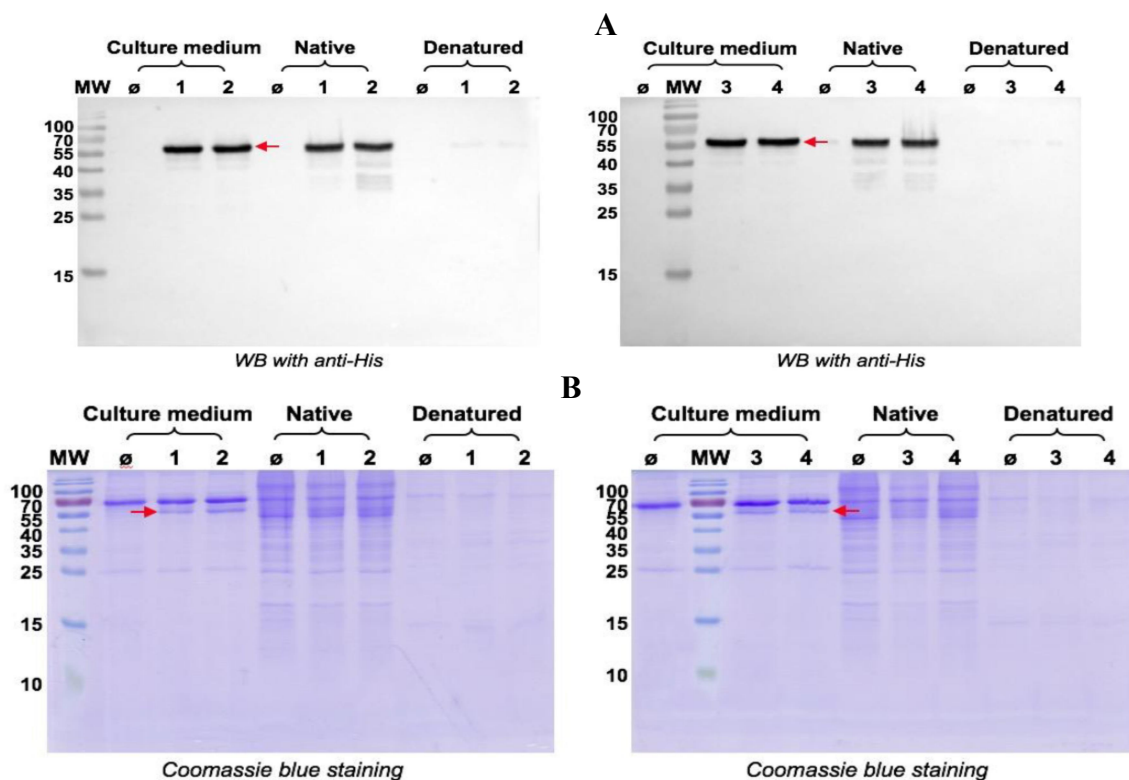


Figure 51: Analyse de l'expression de la BetaGluc 2 pendant la génération du stock P1 (A) électrophorèse en SDS-PAGE coloration au bleu de Coomassie, $\emptyset$ control culture (non infecté) 1, 2, 3 et 4 culture infectées avec des clones de bacmid différents **(B)** Western blot avec les anticorps anti-His. La protéine "native" a été obtenue après une sonication des cellules dans le tampon PBS pH7,5. Le culot constituant la fraction dénaturée a été resuspendu dans le tampon PBS pH7,5 contenant l'urée 8 M.

2-2-3-1-3-Amplification et surexpression des virus Recombinants

L'amplification et la surexpression du virus recombinant ont été effectuées par infection des cellules Sf9 et Hi5 avec le Stock P1. Le virus P2 Stock ainsi obtenu dans les deux cellules d'insectes (Sf9 et Hi5) a été utilisé pour les tests d'expression. La production a été effectuée dans 100 ml de culture de cellules Hi5 infectée par le stock P2 dans les conditions optimales. La flèche montre une bande de 55 kDa correspondant au gène d'intérêt dans le milieu de culture.

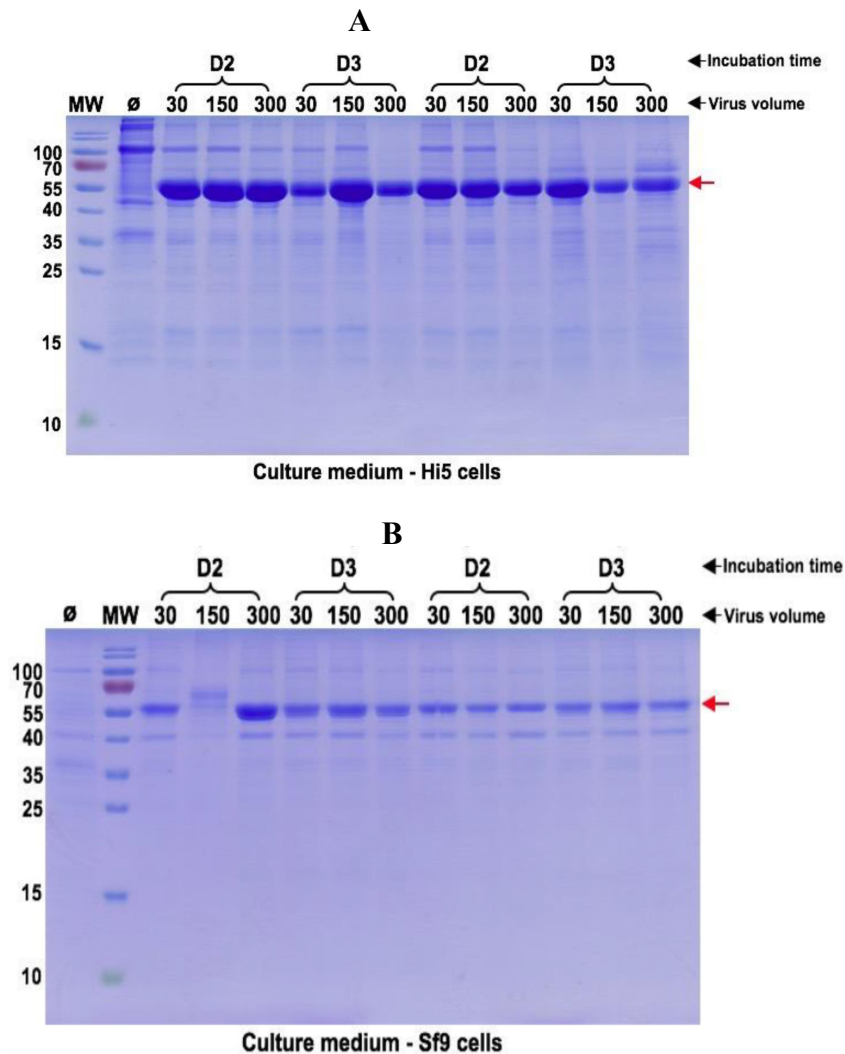


Figure 52: Analyse de l'expression de la BetaGluc1 pendant la génération du stock P2 (A) Dans les cellules Hi5 (B) Dans les cellules Sf9; Ø control culture. Analyse de la culture des échantillons après 2 jours (D2) et 3 jours (D3) d'infection avec 30 à 300 µl du stock de virus P2

2-2-3-1-4-Test de Purification

L'électrophorèse en SDS-PAGE, montre une bande de 55 kDa correspondant au gène d'intérêt.

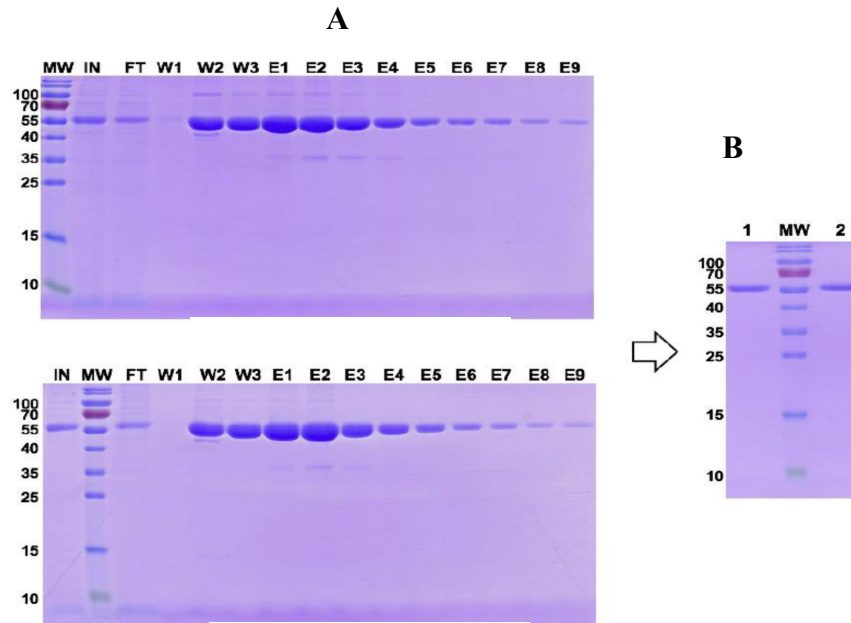


Figure 53: Test de purification (A). Profil de purification, FT: Fraction non retenues, W1-W3: Étapes de lavage, E1-E9: Fractions éluées **(B)** Protéines purifiées 1; 2- BetaGluc1

Conclusion partielle : La protéine a pu être produite avec des rendements allant de 5 à 30 mg/l et une pureté $\geq 95\%$.

2-2-3-2-Production du gène codant pour la β -glycosidase à partir du gène synthétique (BetaGluc 2)

2-2-3-2-1-Clonage du gène dans le vecteur pATXBac1 puis génération du stock de virus P1

La construction pATXbac1-BetaGluc2 a été transformée dans la souche DH10Bac d'*E. coli* afin de produire les bacmides recombinants. Les bacmides recombinants obtenus ont été purifiés puis transfectés dans les cellules Sf9 pour produire le virus P1 stock. Les cellules obtenues lors de la génération du stock P1 ont été analysées en SDS-PAGE et par Western blot afin de vérifier l'expression de la protéine (**figure 47**).

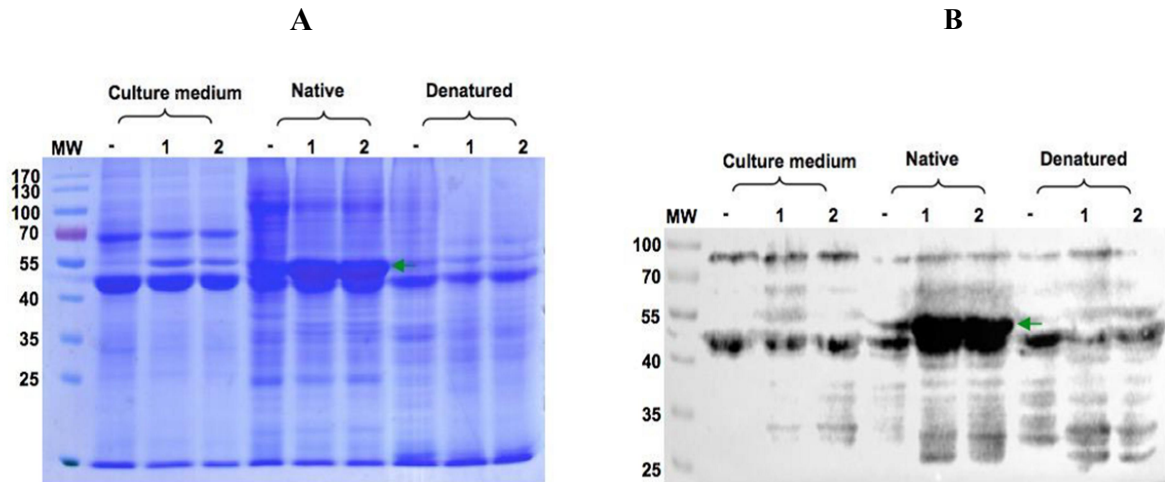


Figure 54: Analyse de l'expression de la BetaGluc 2 pendant la génération du stock P1 (A) électrophorèse en SDS-PAGE coloration au bleu de Coomassie (B) Western blot avec les anticorps anti-His ; 1 et 2 control culture (non infecté). La protéine "native" a été obtenue après une sonication des cellules dans le tampon PBS pH7,5. Le culot constituant la fraction dénaturée a été resuspendu dans le tampon PBS pH7,5

2-2-3-2-2-Amplification et surexpression du virus recombinant

L'amplification et la surexpression du virus recombinant ont été effectuées par infection des cellules Sf9 et Hi5 avec le Stock P1. Le virus P2 Stock ainsi obtenu dans les deux cellules d'insectes (Sf9 et Hi5) a été utilisé pour les tests d'expression. La production a été finalement effectuée dans 100 ml de culture de cellules Hi5 infectée par le stock P2. L'électrophorèse en SDS-PAGE montre une bande majeure de 55 kDa correspondant au gène d'intérêt dans la fraction native.

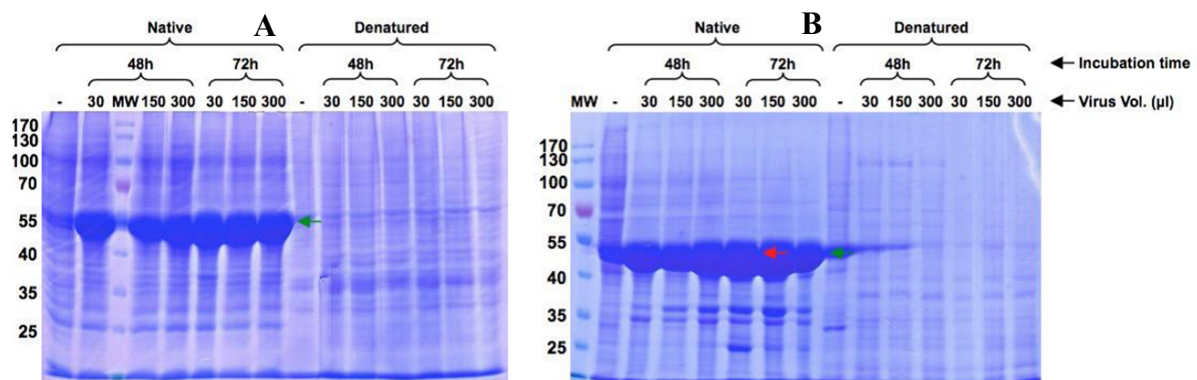


Figure 55: Analyse de l'expression de la BetaGluc pendant la génération du stock P2 (A) dans les cellules Sf9 (B) dans les cellules Hi5 --". Control négatif.

Conclusion partielle: La surexpression de la BetaGluc à partir du gène synthétique a été réalisée avec succès. L'enzyme a pu être surexprimée à un niveau très élevé sous forme native. Les conditions optimales pour l'expression retenues sont: infection avec 30 µl de P2 pendant 72 h dans les cellules Hi5.

2-2-3-1-3-Test de Purification

Cent millilitre de culture de cellules Hi5 ont été infectées par le virus P2 stock dans les conditions optimales décrites plus haut. L'extrait brut enzymatique obtenu a été concentré puis purifié en conditions natives sur colonne IMAC. La protéine purifiée a été analysée en SDS-PAGE.

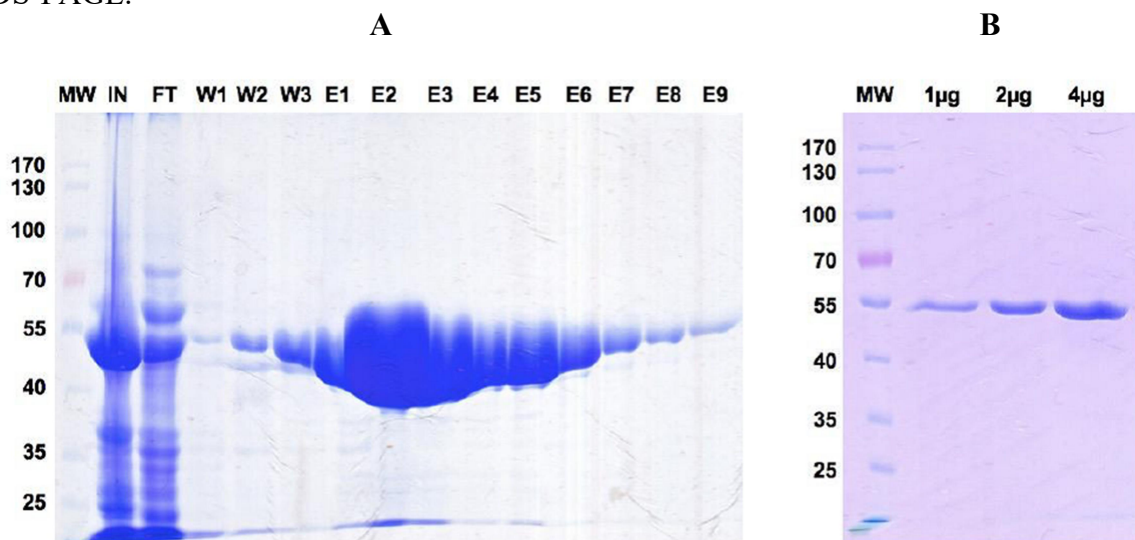


Figure 56: Purification de la BetaGluc2 (A). Profil de purification, FT: Fraction non retenues, W1-W3: Étapes de lavage, E1-E9: Fractions éluées **(B)** BetaGluc purifiée

Conclusion partielle : La BetaGluc2 a pu être produite et purifiée dans des conditions natives avec une pureté $\geq 95\%$, le rendement de production / purification est d'environ 300 mg/l.

2-3-Characterisation des différentes protéines recombinantes produites

2-3-1-Effet du pH

2-3-1-1-pH optimum

L'étude de l'influence du pH a été réalisée dans le but d'apprécier le comportement de ces enzymes dans différents milieux d'incubation d'une part et d'autre part de définir les meilleures conditions d'hydrolyse en milieu tamponné. Les protéines recombinantes produites présentent un maximum d'activité à pH 4,6 (**Figure 53**) comparé à la protéine native qui a un pH optimum de 3,6 avec plus de 80% de son activité à pH 2,6 et une zone de stabilité entre 3 et 4.

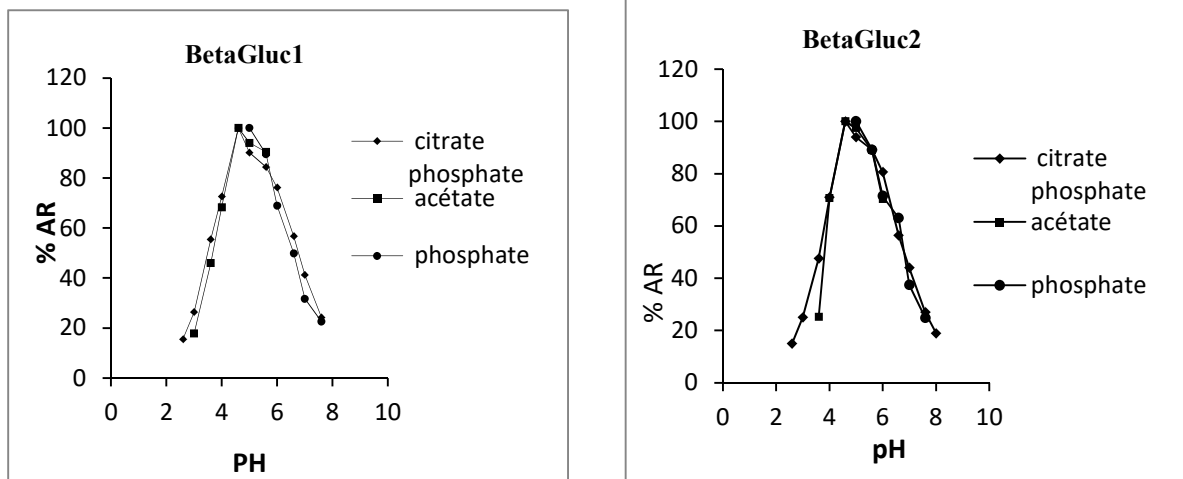


Figure 57: Influence du pH sur l'activité des protéines recombinantes

2-3-1-2-Stabilité au pH

Les résultats montrent que les deux protéines présentent la même zone de stabilité au pH après une heure de préincubation dans le tampon citrate phosphate et acétate 100 mM. Cette zone de stabilité se situe entre pH 4,0 et 5,6 (**Figure 54**).

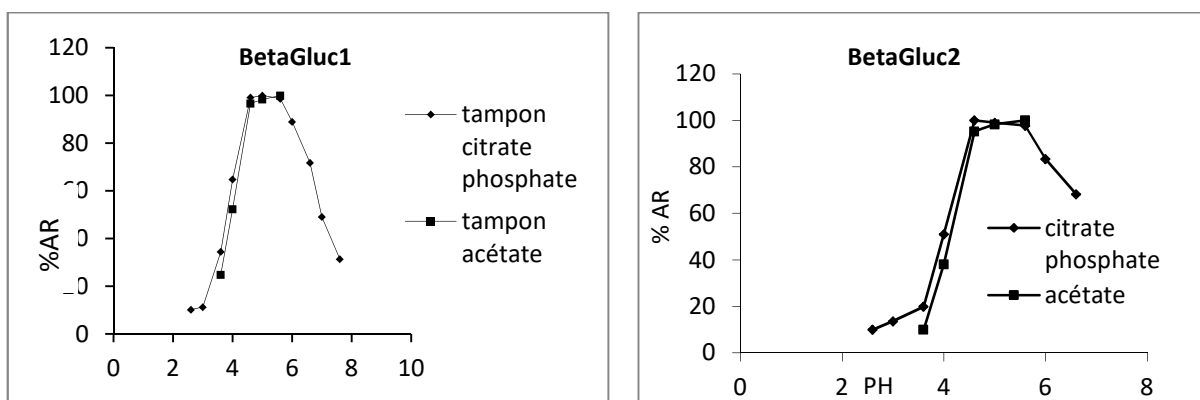


Figure 58: Stabilité au pH des protéines recombinantes

2-3-2-Effet de la température

2-3-2-1-Température optimale d'activité

L'influence de la température sur les activités catalytiques des deux protéines est présentée à la **figure 59**. Les températures optimales d'hydrolyse sont de 50°C pour la BetaGluc2 et de 55°C pour la BetaGluc1 tout comme la protéine native.

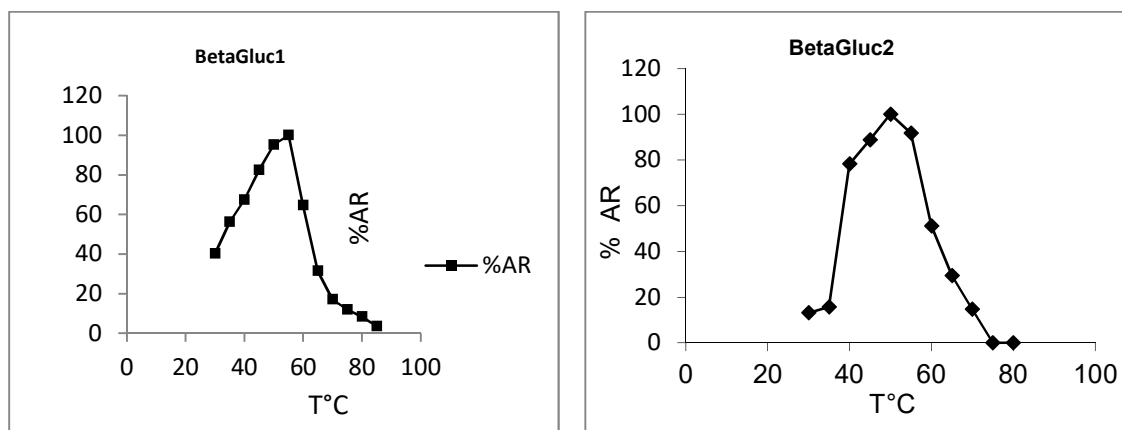


Figure 59: Influence de la température sur l'activité des protéines recombinantes

2-3-2-2-Denaturation thermique

Les protéines sont stables aux températures inférieures à 45°C où elles conservent 100 % d'activité dans les conditions expérimentales. Au-delà de cette température, on observe une baisse notable de l'activité catalytique des enzymes, traduisant leur dénaturation par la chaleur (**figure 60**). Ces protéines sont moins thermostables par rapport à la native qui conserve son activité jusqu'à 55°C.

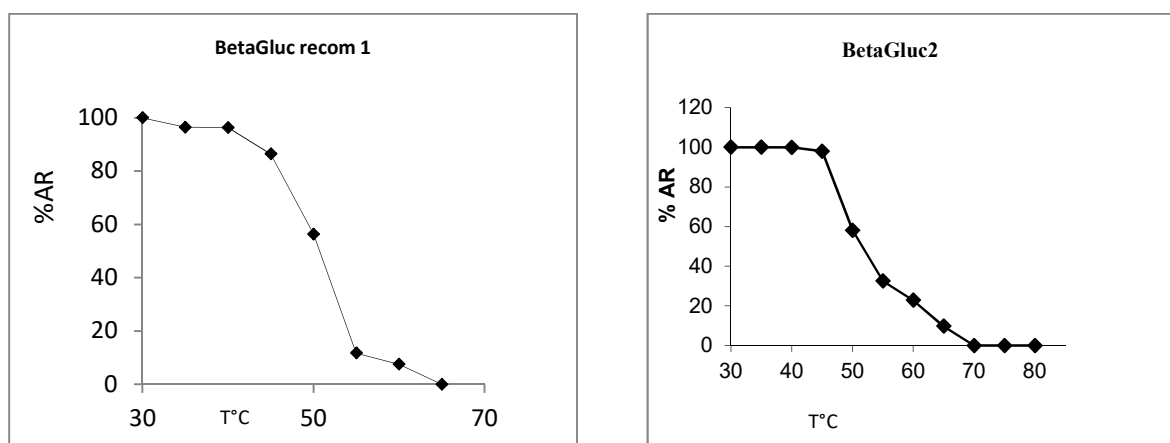


Figure 60: Etude de la Dénaturation thermique des protéines

2-3-2-3- Inactivation thermique

Les résultats de l'étude de l'inactivation thermique des protéines sont indiqués à la **figure 61**. A 37°C, les protéines conservent la quasi-totalité de leur activité (100 % d'activité) pendant au moins 2 h de préincubation. Cependant elles sont très instables à leur température optimale d'activité.

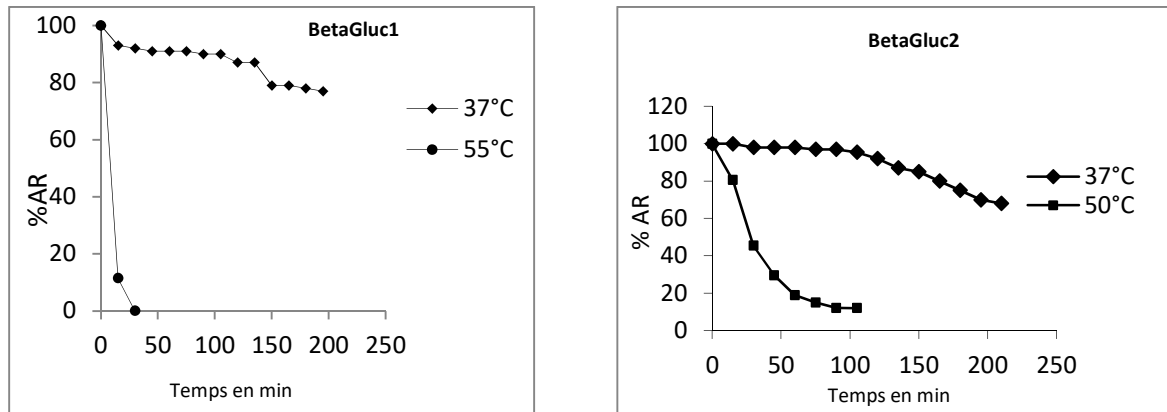


Figure 61: Etude de l'inactivation thermique des protéines

2-3-3-Effet de quelques effecteurs

L'étude de l'influence des cations mono et divalents testé dans nos conditions expérimentales montre que les ions métalliques réagissent différemment sur les protéines. Certains sont activateurs ou inhibiteurs et d'autres sans effet notable. Les résultats obtenus sont consignés à la **figure 62**. Les ions K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Cu^{2+} et l'EDTA activent la protéine native, la BetaGluc2 est activé par l'ion K^+ tandis que la BetaGluc1 sont activé par l'ion Na^+ . Toutefois toutes les protéines sont fortement inhibées par l'ion Fe^{2+} .

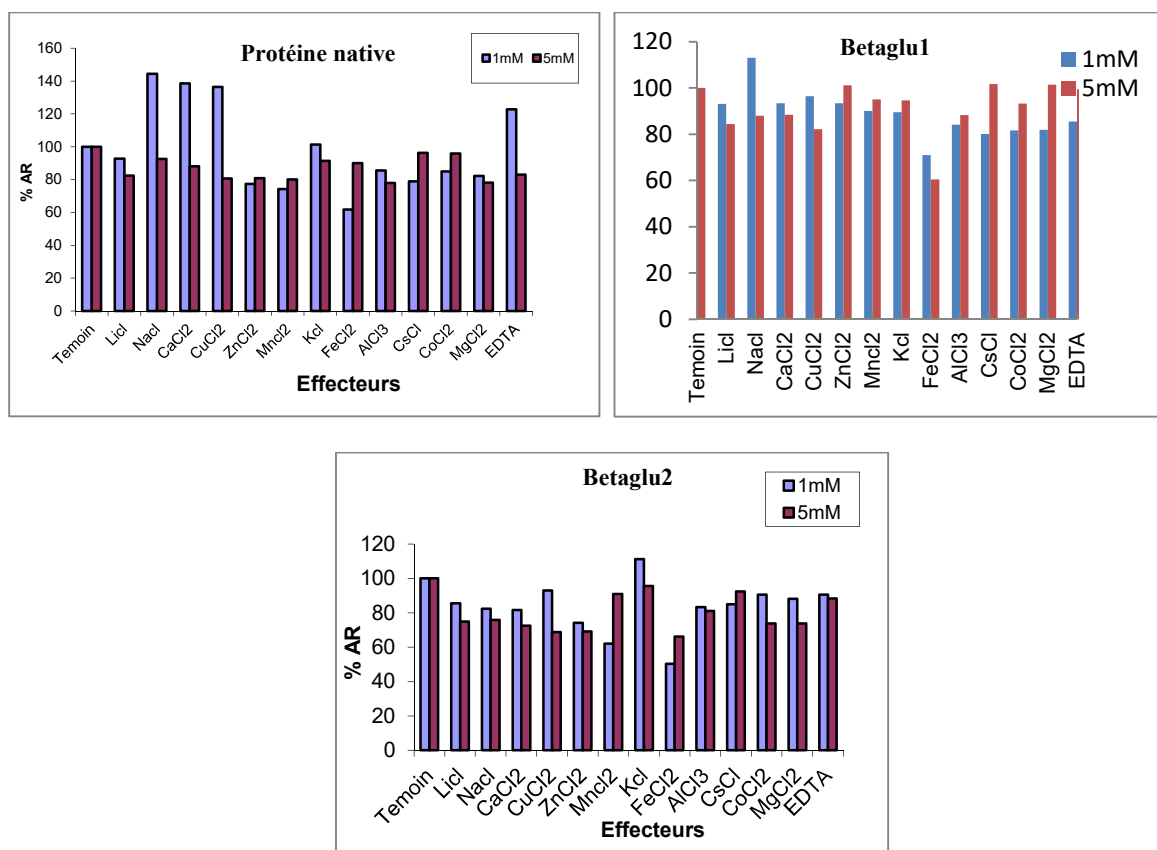


Figure 62: Effet de quelques effecteurs sur l'activité des protéines

2-3-4-Effet des solvants organiques

L'un des avantages majeurs de l'utilisation des solvants organiques dans les réactions enzymatiques est d'améliorer considérablement la solubilisation de certains substrats naturels ou synthétiques insolubles en milieu aqueux, afin de mieux apprécier la capacité d'hydrolyse de certaines enzymes. Ainsi, l'effet de plusieurs solvants organiques à différentes concentrations dans le milieu réactionnel a été examiné sur l'activité de la protéine native et des différentes protéines recombinantes produites. Les résultats de cette étude sont présentés à la **figure 63**. Pour des concentrations en solvant organique inférieures à 20 % (v/v) dans le milieu réactionnel concernant tous les solvants testés, les enzymes conservent la quasi-totalité de leur activité initiale. Les protéines recombinantes produites sont toutes activées par le méthanol et l'éthanol pour des concentrations jusqu'à 50% de méthanol et jusqu'à 40% d'éthanol tandis que la protéine native est inactivée par ces solvants aux mêmes concentrations.

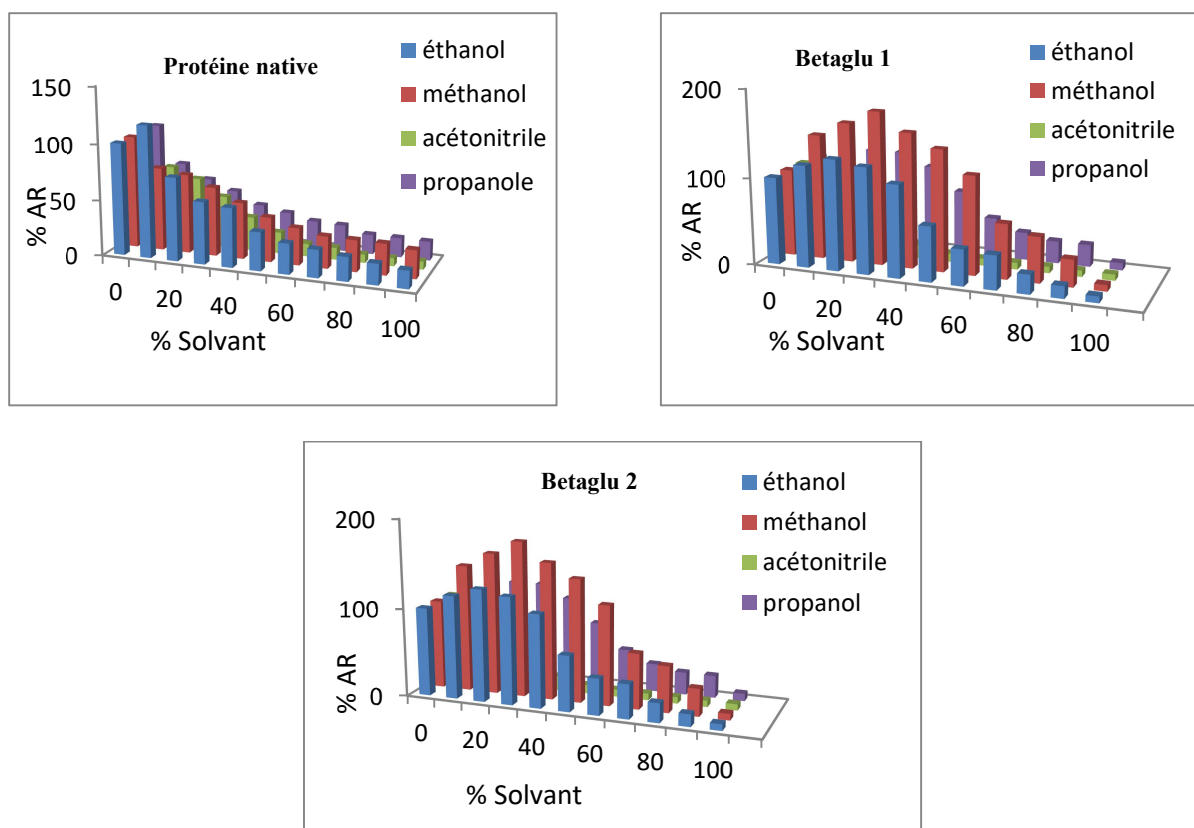


Figure 63: Effet de quelques solvants organiques sur l'activité des protéines

2-3-5-Etude de la spécificité de substrat

L'activité de la protéine native et protéines recombinantes a été testée sur un grand nombre de substrats naturels et synthétiques. Les résultats de cette étude consignés dans le **Tableau V** montrent qu'aussi bien la protéine native que les différentes protéines recombinantes produites hydrolysent une large gamme de substrats (le cellobiose et les cellodextrines, les disaccharides, les alkyl glucosides et quelques glycosides synthétiques). Les substrats les plus hydrolysés étant le pNP-à-D-glucopyranoside, le pNP-à-D-fucopyranoside le cellobiose et la laminaribiose

Tableau V: Etude de la spécificité de substrat

Substrats	Liaisons	Activité spécifique (µmole/min/mg)		
		Protéine native	Betaglu2	Betaglu1
Cellodextrines				
Cellobiose	Glcβ(1-4)Glc	41,8	64,5	4,4
Cellotriose	Glcβ(1-4)3n	68,02	82,7	10,9
Cellotetraose	Glcβ(1-4)4n	44,4	112,9	11,5
Cellopentaose	Glcβ(1-4)5n	42,5	93,7	8,1
Cellohexaose	Glcβ(1-4)6n	45,2	63,5	4,9
Disaccharides				
Laminaribiose	Glcβ(1-3)Glc	53,1	714,7	41,2
Gentiobiose	Glcβ(1-6)Glc	15,6	182,5	3,3
Saccharose	Glcα(1-2)Fru	2,65	20,4	1,2
Lactose	Galβ(1-4)Glc	8,5	24,7	1,02
Alkyl glucosides				
Methyl β-D-galactopyranoside		1,9	32,2	1,4
Octyl β-D-glucopyranoside		9,1	345,4	22,2
Methyl β-D-glucopyranoside		2,3	35,8	1,9
Polymères				
Lichenan	Polymère de Glc	ND	ND	ND
Curdlan	Polymère de Glc	ND	ND	ND
β glucan	Polymère de Glc	D	D	D
Glycosides synthétique				
pNP-β-D-glucopyranoside		317,9	284,8	14,4
pNP-β-D-fucopyranoside		451,9	332,1	15,1
pNP-β-D-galactopyranoside		256,5	88,7	6,7
pNP-2-acetamido 2-deoxy-β-D-glucopyranoside		191,7	ND	4,1
pNP-N-acétyl-β-D-glucosaminide		177,23	ND	ND
2-chloro-pNP-β-D-cellobioside		114,6	66,5	4,2
pNP-N-acétyl-β-D-galactosaminide		139,2	ND	ND
pNP-β-D-xylopyranoside		101,2	51,1	3,4
pNP-2-acetamido 2-deoxy-3-o-β D-galactopyranosyl-β-D-glucopyranoside		ND	ND	ND
pNP-β-D-lactopyranoside		ND	ND	ND
pNP-2-acetamido-3-o-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl-2-deoxy-α-D-galactopyranoside		ND	ND	ND
pNP-β-L-arabinopyranoside		ND	ND	ND
pNP-β-L-fucopyranoside		ND	ND	ND
pNP-β-D-cellobioside		ND	ND	ND
pNP-β-D-galactofuranoside		ND	ND	ND

ND : non dégradé

2-3-6-Paramètres cinétiques K_M et V_{max} des protéines

Les valeurs de la constante de Michaelis-Menten (K_M) et de la vitesse maximale (V_{max}) ont été déterminées par la méthode de Lineweaver et Burk, sur les substrats les mieux hydrolysés. Les valeurs de K_M , V_{max} et l'efficacité catalytique donnée par le rapport V_{max}/K_M des différentes protéines sont résumés dans le **Tableau VIII**. De l'analyse de ce tableau, il ressort que toutes les protéines possèdent une affinité plus grande pour le substrat pNP- β -D-glucopyranoside par rapport au pNP- β -D-fucopyranoside. Par contre seule la protéine native présente comparativement aux protéines recombinantes, une plus grande affinité pour le cellobiose par rapport au laminaribiose.

Tableau VI: Détermination des paramètres cinétiques K_M , V_{max} et V_{max}/K_M des protéines

	substrats	K_M	V_{max}	V_{max}/K_M
Protéine native	pNP- β -D-glucopyranoside	4,5	2500	555,5
	pNP- β -D-fucopyranoside	2,2	1111,1	500
	cellobiose	1,5	78,7	49,2
	laminaribiose	0,4	58,1	131,5
Betaglu2	pNP- β -D-glucopyranoside	6,8	1666,6	243,9
	pNP- β -D-fucopyranoside	2,3	588,2	250
	cellobiose	0,6	55,5	92,5
	laminaribiose	1,3	909,09	666,6
Betaglu1	pNP- β -D-glucopyranoside	3,2	53,4	16,3
	pNP- β -D-fucopyranoside	1,7	119,04	68,1
	cellobiose	0,4	3,9	8,03
	laminaribiose	4,3	102,04	23,6

Les constantes de Michaelis (K_M) et les vitesses maximales (V_{max}) sont exprimées respectivement en mg/ml et en μ mol de sucres et de paranitrophenol libérés par min et par mg de protéine (UI/mg de protéine).

Discussion

Le génome de la blatte *Periplaneta americana* n'étant pas séquencé en début des travaux de ce mémoire, il a été nécessaire d'entreprendre la construction d'une banque d'ADNc pour le repérage et la surexpression du gène codant pour la β -glycosidase de cette blatte. La banque construite contenant au moins 10^9 clones indépendants est considérée comme représentative de la diversité des ARNm. Un premier criblage de cette banque a donc été effectué avec le substrat 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucopyranoside (X-glu) afin de détecter la présence du gène codant pour la β -glycosidase. Ce criblage réalisé sur environ 50 000 clones a permis de récupérer un seul clone positif au bout de 48 h. La banque étant étalée à une concentration de 10^4 clones par boîte, les plages de lyses ne sont pas distinctes, par conséquent, une zone positive risquant de contenir plusieurs clones de phages, un criblage secondaire a donc été effectué à partir des clones positifs isolés du criblage primaire. Après 72 h, des clones positifs (de coloration bleus) ont été observés sur toute la boîte. Une dizaine de clones bien isolés ont été séquencés après excision des phagemides en plasmides par le système Cre-lox. Les séquences ont été soumises au programme BLAST, pour déterminer le pourcentage d'identité avec d'autres protéines dans les bases de données de la NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Bien qu'ayant fait un criblage secondaire, il s'avère que sur la dizaine de séquences, il n'y a que deux qui correspondent avec des pourcentages d'identité 80 à 90% à un gène codant pour la β -glycosidase de la blatte *Periplaneta americana*. Les autres séquences codant pour des gènes totalement différents de ce que nous attendions. En Avril **2014**, **Tamaki et al.** ont séquencé l'ARN de la blatte *Periplaneta americana* les séquences codantes pour les protéines dont celle de la β -glycosidase ont été stockées dans la banque de donnée NCBI. En se basant sur l'alignement des séquences protéiques entre les séquences issus du criblage de la banque et celle stockée dans la banque de données, il apparaît clairement que la β -glycosidase, issue de la banque d'ADNc correspond au gène stocké dans la banque de données à un acide aminé près. Après l'identification du gène, nous avons entrepris la production de la protéine. L'analyse de la séquence ayant mis en évidence la présence d'un signal peptide, plusieurs stratégies de clonage ont été élaborées. Une construction avec la séquence mature sans le signal peptide et une autre incluant le peptide signal. Pour des raisons liées à sa facilité d'utilisation, et à sa capacité à produire des quantités de protéines à des coûts raisonnables, la bactérie *E.coli* est le système le plus communément utilisé pour la fabrication de protéines recombinantes. C'est pourquoi dans ce travail, dans un premier temps, la première approche a été d'essayer la

production dans cet hôte bactérien. Ainsi plusieurs souches de cette bactérie ont été testées avec les différentes constructions. Toutes ces tentatives se sont avérées infructueuses. En effet, cette bactérie présente des limitations importantes notamment lorsqu'il s'agit de protéines d'origine eucaryote comme dans notre cas; ces protéines recombinantes de type eucaryote ont la plupart du temps besoin d'être maturées, de subir des modifications post-traductionnelles, souvent impossible dans un tel système. De plus, les bactéries ne sont pas capables de réaliser le plus souvent la glycosylation parfois nécessaire à l'activité de certaines protéines, ni de former correctement les ponts disulfures surtout s'ils sont présents en grande quantité dans les protéines. Pour pallier ces inconvénients, de nouveaux systèmes d'expression ont été développés chez des organismes alternatifs. Parmi ceux-ci, la levure *Yarrowia lipolytica* semble des plus prometteuse. En effet, cette levure possède les avantages de la bactérie *E. coli* en terme de facilité d'utilisation (culture rapide et facile à mettre en œuvre, milieu simple et peu coûteux), d'efficacité de transformation, de plus de nombreux outils génétiques sont disponibles pour l'expression de protéines recombinantes. Par ailleurs, elle présente l'avantage des eucaryotes en termes de modifications post-traductionnelles et de glycosylation notamment. Toutes ces caractéristiques font de cette levure un modèle intéressant pour le développement de nouveaux procédés optimisés de production de protéines recombinantes. Une étude approfondie de son génome et de sa physiologie dans notre laboratoire (**Bordes 2008**) a permis le développement de systèmes d'expression simples et efficaces. Ainsi en s'appuyant sur ces méthodes, le gène de la β -glycosidase a été inséré dans la souche "Zeta" de la levure *Yarrowia lipolytica* dans cette deuxième approche, trois stratégies de clonage ont été élaborées; une construction prenant en compte la séquence totale du gène en incluant le peptide signal; une autre construction sans le peptide signal (la séquence mature) puis une dernière construction avec la séquence mature comprenant la cassette Prepro. Malheureusement, aucune de ces constructions n'a permis d'aboutir à des résultats satisfaisants. La levure *Yarrowia lipolytica* n'étant certainement pas capable de produire la protéine. Parmi les systèmes d'expression eucaryote, le système baculovirus-cellules d'insectes est un des plus performants pour la production de protéines complexes. Ce système est basé sur l'utilisation du baculovirus comme vecteur pour l'expression en cellules d'insectes de gènes hétérologues sous contrôle de promoteurs viraux comme la polyédrine et la protéine P10. L'expression des protéines eucaryotes recombinantes dans les cellules d'insectes est devenue un axe de recherche majeur pour la caractérisation structurale et fonctionnelle des protéines souvent mal repliées dans les cellules d'*E.coli*. Dans le système d'expression baculovirus les modifications post-traductionnelles sont conservées, la protéine

adopte généralement un bon repliement et des niveaux d'expression relativement hauts peuvent être atteints. Cette dernière approche nous a finalement permis de surexprimer le gène codant pour la  -glycosidase de la blatte *Periplaneta americana* avec de très bons rendements de production. Dans un premier temps, l'ADNc codant pour la  -glycosidase de la blatte *Periplaneta americana* dont la séquence a été stockée dans la banque de donnée NCBI (No d'accession GenBank: KJ576835) a été synthétisé chimiquement à partir de la séquence optimisée, puis la production a été entrepris en parallèle avec le gène provenant de la banque d'ADNc  labor e. La caractérisation des deux protéines recombinantes obtenues a été effectuée afin de comparer leurs caractéristiques biochimiques avec celles de la protéine native. L'étude du pH montre que les deux protéines recombinantes produites présentent un maximum d'activité à pH 4,6 avec une zone de stabilité au pH se situant entre pH 4,0 et 5,6. L'étude de l'influence de la température montre que la température optimale d'hydrolyse est de 55 C pour la BetaGluc1, et de 50 C pour la BetaGluc recom2. Aussi, les protéines sont toutes les deux stables aux températures inférieures à 45 C où elles conservent 100 % d'activité dans les conditions expérimentales puis au-delà de cette température, on observe une baisse notable de l'activité catalytique des enzymes, traduisant leur dénaturation par la chaleur. Les résultats de l'étude de l'inactivation thermique montrent que les deux protéines conservent la quasi-totalité de leur activité (100% d'activité) pendant au moins 2 h de préincubation   37 C. Cependant elles sont très instables à leur température optimale d'activité. En se basant sur l'étude de la thermostabilité et la résistance au pH acide on peut déduire que les protéines recombinantes produites ont des caractéristiques légèrement différentes de celle de la protéine native qui à son pH optimum à 3,6 avec plus de 80% de son activité à pH 2,6; une température optimale à 55 C avec une activité conservée à plus de 50% pendant 2 h à cette température. En effet, l'un des principaux objectifs visés en multipliant les approches de production était d'aboutir à une protéine recombinante dont les caractéristiques seraient très proches de la protéine native. Cependant les modifications post-traductionnelles par l'hôte, dans la structure d'une protéine, peuvent avoir pour conséquence une modification des propriétés de cette protéine aboutissant à des caractéristiques biochimiques souvent différentes de la protéine native. L'activité d'une enzyme peut être modifiée par la présence d'ions métalliques. Ceux-ci jouent un rôle important dans les phénomènes de régulation et leurs effets renseignent sur les mécanismes d'action des enzymes. L'étude de l'influence des cations mono et divalents testé montre que les ions métalliques réagissent différemment sur les protéines. Les ions K⁺, Na⁺, Ca²⁺, Cu²⁺ et l'EDTA activent la protéine native, la BetaGluc2 est activé par l'ion K⁺ tandis que la BetaGluc1 est activée par l'ion Na⁺. Les ions

activateurs peuvent être conseillés dans les préparations de tampon. Cependant, l'ion Fe^{2+} qui inhibe fortement les protéines est à éviter dans un milieu réactionnel où se trouve la β -glycosidase de la blatte *Periplaneta americana*. La solubilisation de certains substrats naturels ou synthétiques insolubles en milieu aqueux nécessite l'utilisation des solvants organiques. Ainsi leur présence dans les réactions enzymatiques est souvent incontournable. Afin d'apprécier la capacité d'hydrolyse de la β -glycosidase native de la blatte *Periplaneta americana* et des protéines recombinantes en présence de ces solvants, leur effet sur l'activité de ces protéines à différentes concentrations dans le milieu réactionnel a été examiné. Les résultats de cette étude montrent que pour des concentrations en solvant organique inférieures à 20% (v/v) dans le milieu réactionnel concernant tous les solvants testés, les enzymes conservent la quasi-totalité de leur activité initiale. Les protéines recombinantes produites sont toutes activées par le méthanol et l'éthanol pour des concentrations jusqu'à 50% de méthanol et jusqu'à 40% (v/v) d'éthanol tandis que la protéine native est inactivée par ces solvants aux mêmes concentrations. Parmi les solvants organiques étudiés, l'acétonitrile a un pouvoir inhibiteur plus élevé sur l'activité des protéines que l'ensemble des autres solvants testés. En effet, les enzymes en solution aqueuse possèdent à la fois des domaines hydrophiles en contact avec l'eau et des domaines hydrophobes localisés à l'intérieur de la molécule. Lors de l'ajout d'un solvant organique, les domaines hydrophobes ne sont plus contraints vers l'intérieur, ce qui peut entraîner la dénaturation de la protéine par dépliement de sa structure. En règle générale, cet effet s'accroît lorsque la concentration en solvant organique du milieu réactionnel augmente. Ce phénomène jouerait probablement un rôle majeur dans l'inhibition plus ou moins prononcée de la protéine native en présence de ces solvants. L'étude de la spécificité de substrat de la protéine native et des deux protéines recombinantes testée sur un grand nombre de substrats naturels et synthétiques montre qu'aussi bien la protéine native que les différentes protéines recombinantes produites hydrolysent une large gamme de substrats: le cellobiose et les cellodextrines, les disaccharides (laminaribiose, gentiobiose, saccharose, lactose), les alkyl glycosides (Méthyl β -D-galactopyranoside, Octyl β -D-glucopyranoside, Méthyl β -D-glucopyranoside) aussi, en plus du pNP- β -D-glucopyranoside, les protéines possèdent toutes des activités très élevées pour le pNP- β -D-fucopyranoside, pNP- β -D-galactopyranoside, et le pNP- β -D-xylopyranoside. Les résultats obtenus permettent de confirmer que la β -glycosidase de la blatte *Periplaneta americana* est une exo- β -D-glycosidase qui appartient bien à la 1^{ère} classe des β -glucosidases selon la classification de Terra and Ferreira (1994) basée sur la spécificité de substrat. Elle hydrolyse à la fois des glycosyl β -glycosides et des aryl β -glycosides. Ce mode d'action de l'enzyme se rencontre

chez d'autres β -D-glycosidases de la famille des GH1 décrites dans la littérature (**Guo et al. 2014; Chamoli et al. 2016; Akram et al. 2016**). Les paramètres cinétiques, la constante de Michaelis-Menten (KM) et la vitesse maximale (Vmax) ont été déterminés sur les substrats les mieux hydrolysés. De l'analyse de ces résultats, il ressort que toutes les protéines possèdent une affinité plus grande pour le substrat pNP- β -D-glucopyranoside par rapport au pNP- β -D-fucopyranoside. Par contre seule la protéine native présente comparativement aux protéines recombinantes, une plus grande affinité pour le cellobiose par rapport au laminaribiose.

Conclusion partielle

Au terme de cette partie de cette étude, nous avons pu isoler le gène codant pour la β -glycosidase de la blatte *Periplaneta americana* à partir d'une librairie génomique d'ADNc. Après plusieurs tentatives infructueuses en vue de la production de cette protéine dans la bactérie *E.coli* et dans la levure *Yarrowia L.*, la production a pu être réalisée avec succès dans les cellules d'insectes Sf9. Cependant, des modifications post-traductionnelles souvent induites par l'hôte, les méthodes de purification, l'effet du TAG ont conduit à une protéine recombinante différente de la protéine native. La mutation D247E pourrait être à l'origine de la légère différence entre les deux isoformes (Beta-Gluc1 et Beta-Gluc2) recombinantes produites.

**CHAPITRE V : ÉTUDE CINÉTIQUE ET
THERMODYNAMIQUE DE LA β -GLYCOSIDASE
AU COURS DE L'INACTIVATION THERMIQUE**

Chapitre V : Étude cinétique et thermodynamique de la β -glycosidase au cours de l'inactivation thermique

1-Introduction

La température influence la vitesse des réactions enzymatiques en agissant sur la structure de l'enzyme, la stabilité du complexe enzyme-substrat et l'ionisation de certains sites liés à l'élévation de la température (**Raisonnier 2002**). Ainsi, la vitesse de la réaction enzymatique diminue et s'arrête rapidement au-delà d'une certaine zone de température. Les enzymes deviennent donc progressivement inactives au-delà de leur température optimale d'activité. Ce processus est habituellement réversible pour la plupart d'entre elles mais le résultat d'un chauffage prolongé est la perte irréversible d'activité catalytique de celles-ci. Cette situation est due à la destruction de diverses liaisons covalentes et non covalentes (**Criswell et al. 2003**). En effet, la stabilité des enzymes est un paramètre qui a fait l'objet de plusieurs travaux concernant les catalyseurs mésophiles et thermophiles dans la perspective d'améliorer leur thermostabilité (**Sant'Anna, Cladera-Olivera, and Brandelli 2012**). Ces différents travaux ont révélé que les interactions telles que les liaisons hydrogènes (**Macedo-Ribeiro et al. 1996**), les ponts disulfures (**Hopfner et al. 1999**), les liaisons électrostatiques (**Uchima et al. 2012**) et les interactions hydrophobes (**Elcock 1998**) sont importantes pour la stabilité thermique des enzymes. Ainsi, la stabilité d'une protéine, définie comme sa capacité à conserver sa structure tridimensionnelle dans des conditions extrêmes (température, pH ou pression) est alors considérée comme une propriété intrinsèque (**Elferink et al. 1995**). Aujourd'hui avec l'essor des biotechnologies, la stabilité thermique des protéines est devenue un sujet d'intérêt. Ainsi, pour améliorer la thermostabilité des protéines, plusieurs techniques sont utilisées en biologie moléculaire: (1) la mutagenèse aléatoire suivie de la sélection des acides aminés; (2) la comparaison de la séquence des acides aminés avec une autre protéine présentant une plus grande thermostabilité, puis la mutagenèse dirigée vers les acides aminés sélectionnés; (3) l'introduction de possibles acides aminés stabilisateurs, basée sur la structure tridimensionnelle de la protéine. Ces travaux ont révélé que le remplacement de certains acides aminés tout en gardant la même structure montre que la confection par mutagenèse dirigée d'enzymes très thermostables est beaucoup difficile que prévu, car le véritable problème de cette technique, réside dans le fait de repérer les acides aminés cibles. Aussi, les mutations appliquées doivent viser l'augmentation des interactions ponts hydrogène, l'apparition de nouveaux ponts disulfures, l'augmentation de la stabilité des hélices α , les

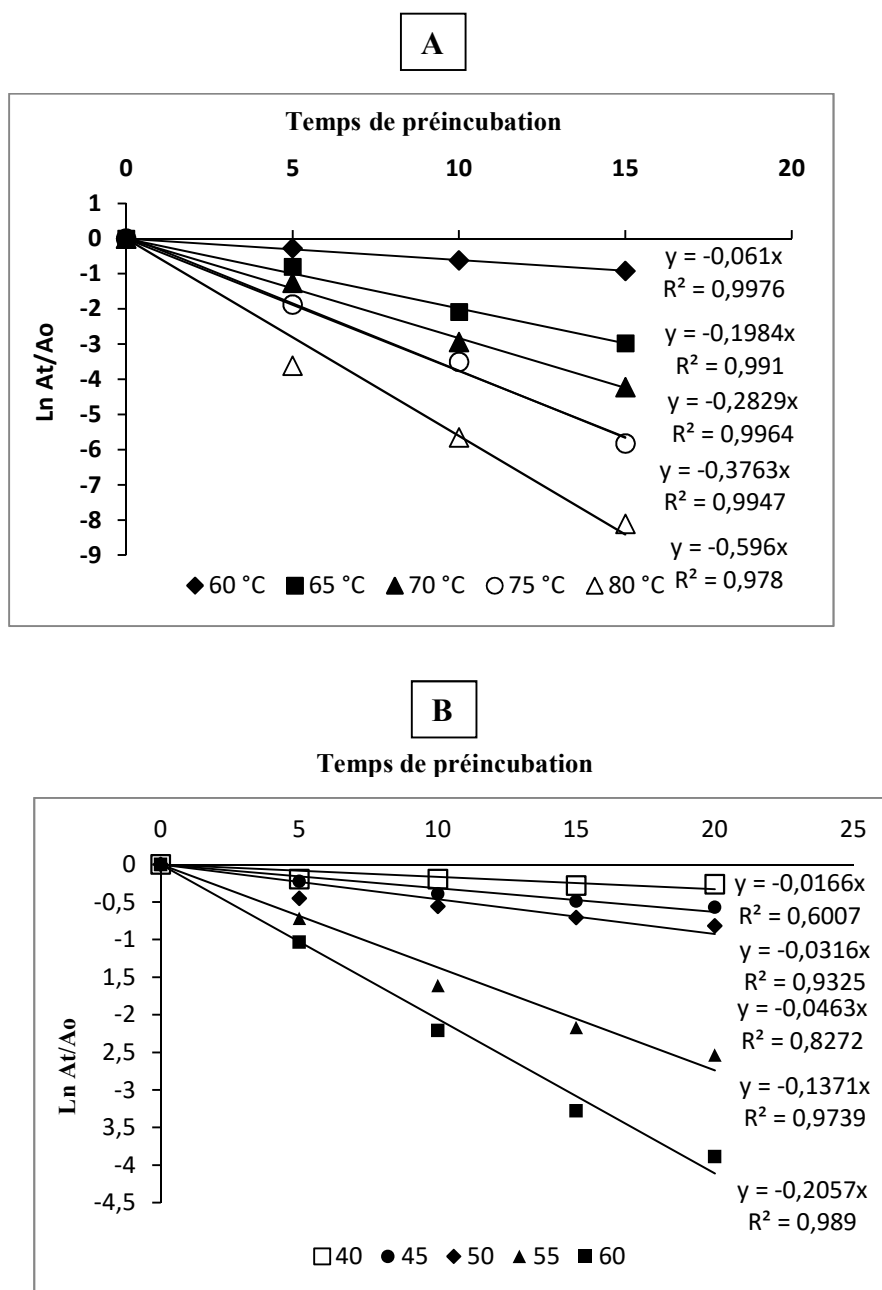
feuilletés ou coudes β , ainsi que les boucles flexibles présentes dans l'enzyme. Cependant, aucune base universelle formelle expliquant entièrement la stabilité d'une enzyme n'a été identifiée parce qu'elle est fonction de l'origine de l'enzyme. Par ailleurs, des études plus approfondies ont révélé que la stabilité des protéines en termes d'interaction macromoléculaire est basée sur les propriétés thermodynamiques de ces dernières (**Hansen et al. 1999**). Il serait de ce fait intéressant avant toute mutation dirigée en vue d'augmenter la thermostabilité d'une protéine de s'intéresser à ses propriétés thermodynamiques. L'objectif de ce chapitre est donc d'évaluer l'influence du traitement thermique sur la β -glycosidase native de la blatte *Periplaneta americana* et les protéines produites en vue d'une exploitation adéquate de cette protéine dans les procédés biotechnologiques et industrielles se déroulant à des températures supérieures à sa température optimale d'activité.

2-Résultats

2-1-Paramètres cinétiques de la β -glycosidase native et des protéines recombinantes au cours de l'inactivation thermique

2-1-1-Cinétique d'inactivation thermique

Les représentations graphiques de $\ln A_t/A_0$ en fonction du temps de pré-incubation de la β -glycosidase native et des protéines recombinantes au cours de l'inactivation thermique ont donné des droites affines traduisant une cinétique de premier ordre monophasique (**Figure 64**).



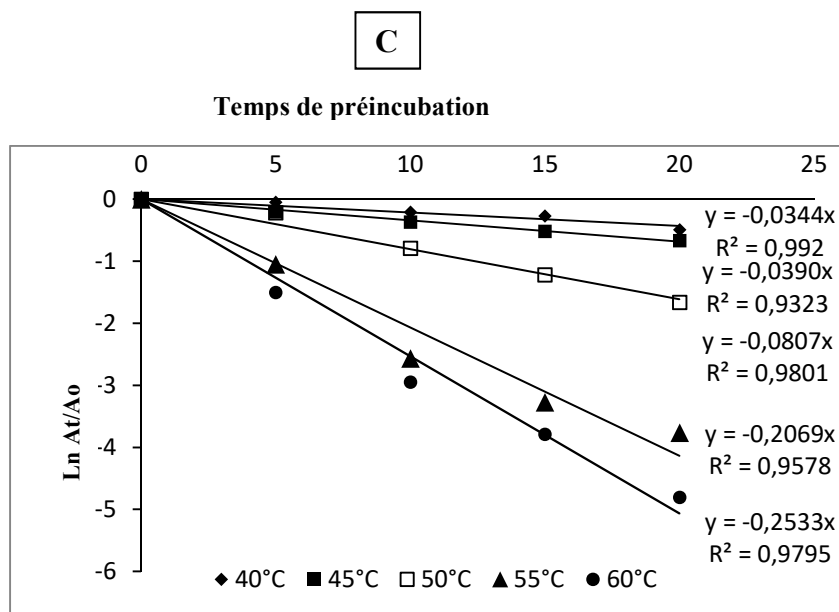


Figure 64: Courbe d'inactivation thermique de la β -glycosidase native (60 à 80°C) et des protéines recombinantes (40 à 60°C) A_0 et A_t sont respectivement les activités enzymatiques avant et après chauffage (A) BetaGluc native (B) BetaGluc 1 (C) BetaGluc 2

2-1-2-Constantes de vitesse k

Les constantes de vitesse de premier ordre (valeurs de k) de la réaction catalysée par la β -glycosidase native et les protéines recombinantes au cours de l'inactivation thermique sont présentées dans les **Tableaux VII A-B-C**. L'analyse des résultats de ces différents tableaux révèle que l'enzyme native est moins thermostable à des températures élevées comprises entre 65-80°C. Les temps demi-vie diminuent rapidement quand la température augmente entre 60 et 80°C (**Tableau VII-A**). Quant aux protéines recombinantes elles ne sont actives qu'à des températures moins élevées ; déjà à partir de 50°C elles perdent plus de la moitié de leur temps de demi-vie.

Tableau VII: Constantes de vitesse et demi-vies de la β -glycosidase native et des protéines recombinantes au cours de l'inactivation thermique (A) BetaGluc native (B) BetaGluc 1 (C) BetaGluc 2

A

Temperature (°C)	$t_{1/2}$ (min)	k (min ⁻¹)	
		Valeur	R ²
60	11,55	0,060	0,981
65	3,50	0,198	0,991
70	2,45	0,282	0,996
75	1,84	0,376	0,994
80	1,16	0,596	0,97

B

Temperature (°C)	$t_{1/2}$ (min)	k (min ⁻¹)	
		Valeur	R ²
40	41,74	0,016	0,600
45	21,93	0,031	0,932
50	14,96	0,046	0,827
55	5,05	0,13	0,973
60	3,36	0,205	0,989

C

Temperature (°C)	$t_{1/2}$ (min)	k (min ⁻¹)	
		Valeur	R ²
40	20,14	0,034	0,992
45	17,76	0,021	0,932
50	8,58	0,080	0,980
55	3,34	0,206	0,957
60	2,73	0,253	0,979

2-1-3-Valeurs des coefficients de température Q_{10} β -glycosidase native et des protéines recombinantes au cours de l'inactivation thermique

Les coefficients de température (Q_{10}) des différentes protéines sont consignés dans les **Tableaux VIII-A-B**. Les plus grandes valeurs ont été obtenues aux températures

d'inactivation comprises respectivement entre 60 et 70°C pour la protéine native et entre 50 et 60 °C pour les protéines recombinantes (**Tableau VIII**).

Tableau VIII: Coefficients de température (Q₁₀) au cours de l'inactivation thermique

A

Température (°C)	BetaGluc native	
Coefficients de temperature (Q ₁₀)	60-70	70-80
Coefficients de temperature (Q ₁₀)	4,70	2,11

B

Température (°C)	BetaGluc 1	BetaGluc 2
40-50	2,87	2,35
50-60	4,45	3,16

2-1-4-Valeurs de D, Z et Ea au cours de l'inactivation thermique

Les valeurs des temps de réduction décimales (D) diminuent de façon linéaire ($R^2 = 0,98$) pour toutes les protéines. Pour la β -glycosidase native elle passe de 38,38 à 3,86 min quand la température augmente de 60 à 80°C (**Tableau IX-A**). Quant aux protéines recombinantes elle passe de 66,94 à 9,09 min pour la BetaGluc2 ; de 138,73 à 11,19 min pour la BetaGluc 1 lorsque la température de chauffage augmente de 40 à 60 °C (**Tableau IX-B-C**). Les représentations de Log D en fonction des températures de chauffage décrivent des droites affines pour les quatre protéines. Les équations : $\text{Log D} = -0,0583T + 5,2079$ ($R^2 = 0,9862$) pour la β -glycosidase native; $\text{Log D} = -0,0568T + 4,43$ ($R^2 = 0,9779$) pour la BetaGluc1 et $\text{Log D} = -0,046T + 3,832$ ($R^2 = 0,9734$) pour la BetaGluc2 (**figure 65**) ont permis de déterminer les valeurs de constantes de résistance thermique Z. Ces valeurs sont respectivement d'environ 17 min pour la protéine native et la protéine recombinante 2 et de 20 min pour la recombinante 1 sous ses deux formes.

Tableau IX: Valeurs de D, Z et Ea au cours de l'inactivation thermique**A**

D, Z et Ea	Valeurs
D60 (min)	38,38
D65 (min)	11,63
D70 (min)	8,16
D75 (min)	6,12
D80(min)	3,86
Z (°C)	17,24
Ea (kJ/mol) (60-80°C)	88,794

B

D, Z et Ea	Valeurs
D40 (min)	138,73
D45 (min)	72,87
D50 (min)	49,74
D55 (min)	16,79
D60(min)	11,19
Z (°C)	17,60
Ea (kJ/mol) (40-60°C)	112,82

C

D, Z et Ea	Valeurs
D40 (min)	66,94
D45 (min)	59,02
D50 (min)	28,53
D55 (min)	11,13
D60(min)	9,09
Z (°C)	20,32
Ea (kJ/mol) (40-60°C)	97,02

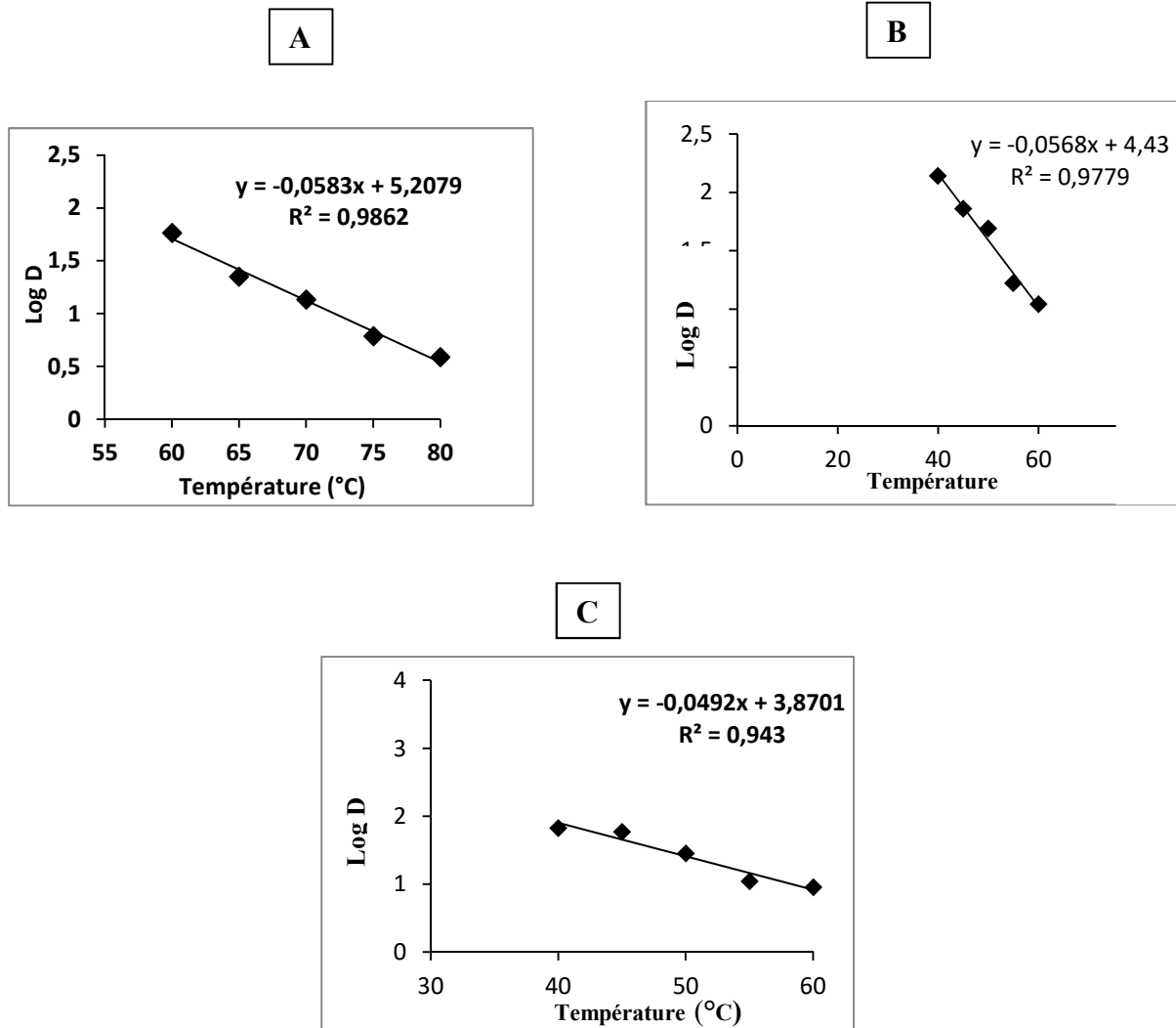


Figure 65: Influence de la température sur les valeurs de D au cours de l'inactivation

2-1-5-Ln k en fonction de l'inverse de la température d'inactivation

Les représentations graphiques Ln k en fonction des inverses des températures (en Kelvin) ont donné des droites affines de pentes négatives pour les quatre enzymes (**figure 66 A-B-C**). Ces courbes sont décrites selon des équations linéaires : $\ln k = -10,68(1/T) + 29,75$ ($R^2 = 0,983$) ; $\ln k = -13,572(1/T) + 39,202$ ($R^2 = 0,9751$) et $\ln k = -11,67(1/T) + 33,687$ ($R^2 = 0,9822$) ; respectivement pour la BetaGluc native (A), la BetaGluc1 (B), et la BetaGluc2 (C) où T représente la température absolue. Ces équations linéaires montrent que les réactions catalysées suivent la loi d'Arrhenius. Les pentes des droites de représentation ont permis de calculer les énergies d'activation respectives (pente = $-E_a/R$).

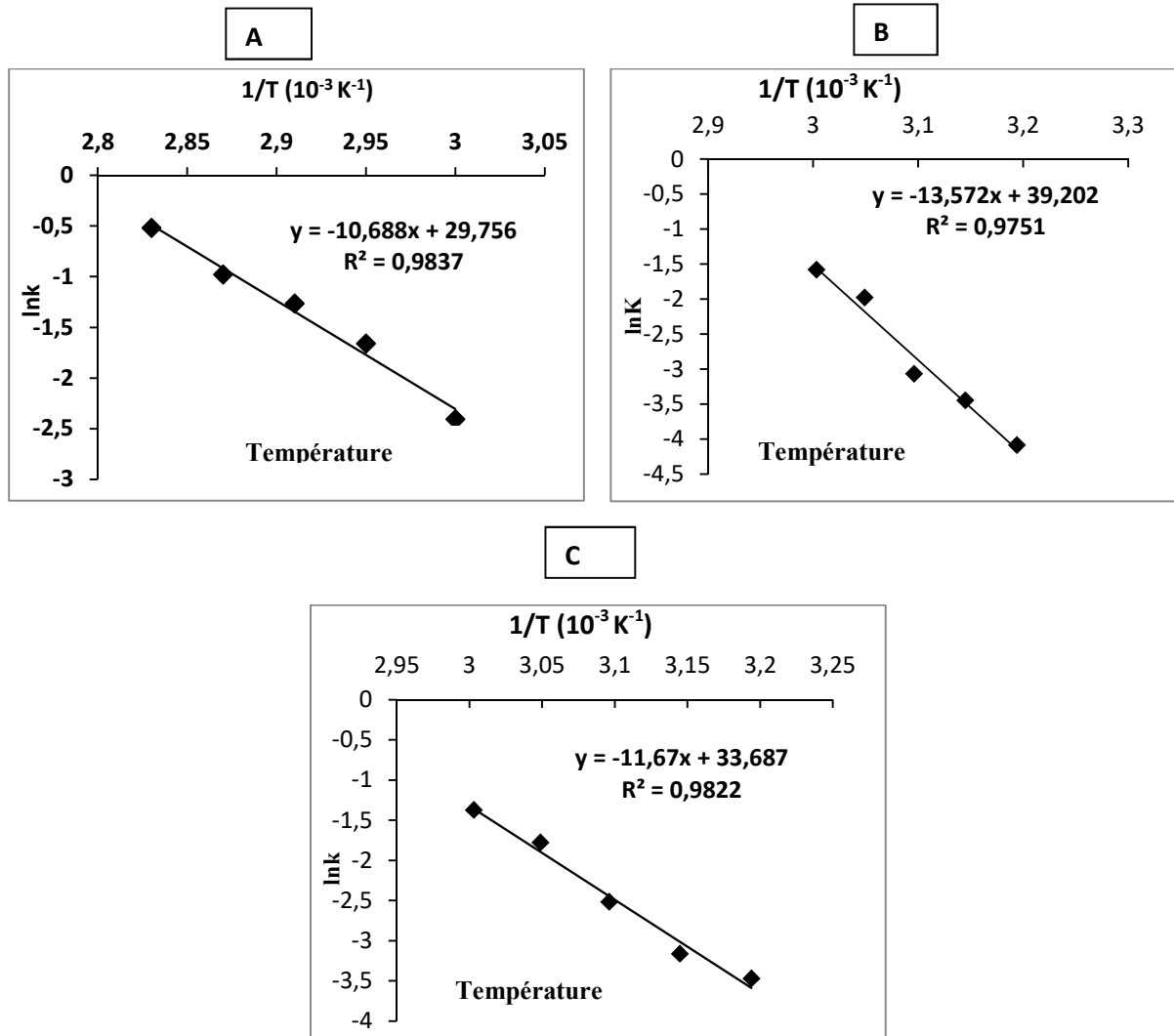


Figure 66: Influence de la température d'inactivation sur la constante de vitesse (k)

2-2-Analyse des paramètres thermodynamiques

Les valeurs des paramètres thermodynamiques au cours de l'inactivation thermique sont consignées dans les **Tableau X-A-B-C**. Les valeurs de l'enthalpie ($\Delta H^\#$), l'entropie ($\Delta S^\#$), et de l'énergie libre ($\Delta G^\#$) sont toutes positives et élevées aussi bien pour la protéine native que pour les quatre protéines recombinantes. Les moyennes de ces paramètres thermodynamiques aux températures comprises entre 60 et 80°C, sont respectivement de $85,942 \pm 0,083 \text{ kJ/mol}$, $1,271 \pm 0,24 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ et $85,507 \pm 0,012 \text{ kJ/mol}$ pour la protéine native (A), $110,13 \pm 0,6 \text{ kJ/mol}$, $80,33 \pm 0,05 \text{ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$; $84,18 \pm 0,07 \text{ /mol}$ pour la BetaGluc1 $89,33 \pm 0,04 \text{ kJ/mol}$ (B), et de $34,45 \pm 0,34 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$; $78,2 \pm 0,02 \text{ kJ/mol}$ pour la BetaGluc2 (C).

Tableau X: Paramètres thermodynamiques**A**

Température (°C)	Paramètres thermodynamiques		
	$\Delta H^\#$ (kJ/mol)	$\Delta S^\#$ (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	$\Delta G^\#$ (kJ/mol)
60	86,02	1,516	85,52
65	85,98	1,39	85,51
70	85,94	1,27	85,50
75	85,90	1,15	85,50
80	85,85	1,03	85,49
Moyenne	85,942±0,08	1,271±0,24	85,507±0,01

B

Température (°C)	Paramètres thermodynamiques		
	$\Delta H^\#$ (kJ/mol)	$\Delta S^\#$ (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	$\Delta G^\#$ (kJ/mol)
40	110,21	80,59	84,99
45	110,17	80,45	84,59
50	110,13	80,32	84,19
55	110,09	80,20	83,78
60	110,05	80,07	83,38
Moyenne	110,13±0,6	80,33±0,05	84,18±0,07

C

Température (°C)	Paramètres thermodynamiques		
	$\Delta H^\#$ (kJ/mol)	$\Delta S^\#$ (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	$\Delta G^\#$ (kJ/mol)
40	89,41	34,7	78,55
45	89,37	34,57	78,38
50	89,33	34,44	78,21
55	89,29	34,32	78,03
60	89,25	34,19	77,86
Moyenne	89,33±0,04	34,45±0,34	78,2±0,02

$\Delta H^\#$, $\Delta S^\#$ et $\Delta G^\#$ sont respectivement l'enthalpie, l'entropie et l'énergie libre du système.

Discussion

Les représentations graphiques de $\ln A_t/A_0$ en fonction du temps d'inactivation thermique aux différents intervalles de température comprises au-delà de la température optimale décrivent toutes une cinétique de premier ordre monophasique aussi bien pour la protéine native que pour chacune des deux enzymes recombinantes purifiées. La seule phase obtenue pour les représentations graphiques de chaque enzyme suggère que la β -glycosidase serait active sous une seule forme dans le milieu réactionnel. Ce résultat est en accord avec celui trouvé par **Huang, Krauss, and Cottaz (2005)** avec l'endo- β -glucanase du microorganisme *Sulfolobus solfataricus* cependant, il diffère de celui de **Violet and Meunier (1989)** avec l' α -amylase de *Bacillus licheniformis*. En effet, ces auteurs ont obtenu une représentation à deux phases, démontrant une cinétique de premier ordre biphasique due à une enzyme se présentant sous deux états fonctionnels successifs lors de la dénaturation. Les constantes de vitesse (k) qui croissent avec l'élévation de la température montrent que l'enzyme est sensible au changement de température elle n'est donc pas thermostable car selon **Marangoni (2002)**, une constante de vitesse plus élevée signifie que l'enzyme est moins thermostable. Cependant, la comparaison de ces résultats entre eux montre que la BetaGluc1 serait plus thermostable que la BetaGluc2 et se rapprocherait plus de la protéine native. Ce résultat est confirmé par la valeur de Z qui est d'environ 17 min pour la protéine native et la BetaGluc1 et de 20 min pour la BetaGluc2. Etant donné que Z représente une réduction décimale comme la valeur de D , alors les valeurs obtenues indiquent le nombre de degrés d'augmentation de la température requise pour une réduction décimale (réduction de 1 Log) dans la valeur de D . Ces résultats combinés à la diminution drastique du temps de demi-vie ($t_{1/2}$) des trois protéines permettent de dire que cette protéine est très sensible à la chaleur du milieu réactionnel, car en général, les faibles valeurs de Z reflètent une grande sensibilité à la chaleur (**Barrett et al. 1999**). Les coefficients de température (Q_{10}) obtenus dépassent la valeur de 2 au cours des différents traitements thermiques pour les trois protéines. Ce résultat indique que la vitesse d'inactivation augmente lorsque les températures s'élèvent de 10°C. Cela suggère qu'il y a un énorme effet thermodynamique sur la vitesse de réaction de cette enzyme. En effet, **Frankenberger and Tabatabai (1991)** ont révélé que les coefficients de température élevés indiquent un effet thermodynamique sur la vitesse des réactions enzymatique. Les valeurs de D (temps de réduction décimale) sont élevées et diminuent de façon linéaire ($R^2 = 0.98-0.99$) lorsque la température d'inactivation augmente chez les trois protéines. Etant donné que le temps de réduction de 90 % de l'activité enzymatique (D) caractérise la thermorésistance de l'enzyme dans des conditions physico-chimiques, cette diminution des valeurs de D avec

l'augmentation de la température indique que la β glycosidase de la blatte *Periplaneta americana* subit une inactivation aux températures élevées. Tous ces paramètres liés à la stabilité des enzymes montrent que la β -glycosidase de la blatte *Periplaneta americana* est une enzyme thermolabile; et de plus cette thermosensibilité est beaucoup plus élevée lorsqu'elle est produite sous forme recombinante, comme l'atteste les résultats obtenus avec les deux protéines produites. L'énergie d'activation (E_a) représente l'énergie nécessaire pour initier le processus d'inactivation thermique des enzymes. C'est un paramètre important de l'inactivation des enzymes (**Liu et al. 2008**). L'énergie d'activation (E_a) aussi bien de la β -glycosidase native que pour les protéines recombinantes avoisine les 100 kJ/mol. Cette valeur élevée montre qu'il faut apporter plus d'énergie à l'enzyme dans la zone des températures au-delà de sa température optimale d'activité pour qu'elle soit sous sa forme activée. Ces résultats suggèrent que le processus de l'inactivation implique la rupture simultanée d'une multitude de liaisons et que la barrière énergétique est plus grande qu'une réaction simple. D'où la nécessité d'un apport élevé d'énergie au complexe enzyme substrat pour initier l'inactivation probablement due à une éventuelle structure compacte de l'enzyme et aux groupements thiols (SH) ou ponts disulfures au niveau du site actif. En effet, **Adjogble et al. (2004)** ont révélé que la structure tridimensionnelle des protéines est orientée et stabilisée par deux types d'interactions non covalente à savoir les interactions électrostatiques et hydrophobiques. Cette stabilité des protéines dépendrait du complexe des facteurs environnementaux du milieu réactionnel (**Dewan, Chattopadhyay, and Kulkarni 1995; Tanaka and Hoshino 2002**). De plus, cette valeur montre que la β -glycosidase de *Periplaneta americana* est sensible au changement de température comme l'ont démontré certains auteurs (**Weemaes et al. 1998; Chutintrasri and Noomhorm 2006**) avec d'autres sources enzymatiques. Les paramètres thermodynamiques que sont l'enthalpie, l'entropie et l'énergie libre de Gibbs ont été déterminées. L'enthalpie (ΔH) est liée aux interactions électrostatiques et aux forces de Lifshitz-van der Waals entre les charges de la protéine et celles de la surface. La variation de l'entropie (ΔS) est provoquée par la réorganisation de la protéine dans l'interaction hydrophobique et au changement de conformation (**Quiquampoix 2000**). Par ailleurs, ces paramètres donnent des indications intéressantes sur le mécanisme chimique de la réaction de l'enzyme. Ainsi, l'estimation de ces paramètres est essentiel pour comprendre le mécanisme probable d'inactivation qui est très important dans les procédés thermiques (**Galani and Owusu 1997; Sant'Anna, Cladera-Olivera, and Brandelli 2012**). Les valeurs moyenne d'enthalpie ($\Delta H^\#$), de l'énergie libre ($\Delta G^\#$) et de l'entropie ($\Delta S^\#$) des trois protéines sont toutes positives et très élevées. Ces valeurs suggèrent qu'il faut une grande

quantité de chaleur à l'enzyme pour qu'elle change d'état par conséquent l'enzyme subit un changement considérable de conformation pour se retrouver sous sa forme activée au cours du traitement thermique. Ce résultat est confirmé par les valeurs positives d'entropies ($\Delta S^\ddagger = 1,27 \pm 0,24, 80,33 \pm 0,05 ; 34,45 \pm 0,34 \text{ J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$) traduisant un état de désordre structurale de l'enzyme pendant l'étape de transition suite à l'inactivation thermique, d'où l'augmentation de l'enthalpie ($\Delta H^\ddagger$). Aussi, Selon **Pelmont (1995)**, des variations d'entropie dans un sens ou dans l'autre sont souvent liées à des changements dans l'état d'hydratation de l'enzyme. **Mazza and LeMaguer (1978)** ont suggéré que l'entrée du substrat dans le site actif pourrait déplacer des molécules d'eau qui sont associées entre elles et se traduire par une valeur positive de l'entropie et dans le cas contraire à une valeur 'négative de l'entropie. En effet, l'entropie est un paramètre physique lié à la concentration des réactifs, à l'encombrement stérique et à l'orientation des groupements fonctionnels. Elle peut être interprétée comme la mesure du degré de désordre d'un système au niveau microscopique. Plus l'entropie du système est élevée, moins ses éléments sont ordonnés, liés entre eux, capables de produire des effets et plus grande est la part de l'énergie inutilisée pour l'obtention d'un travail d'où la valeur élevée de l'énergie libre ($\Delta G^\ddagger = 85,507 \pm 0,012 ; 84,18 \pm 0,07 ; 34,45 \pm 0,34; 18,47 \pm 0,21 \text{ kJ/mol}$) (**Bromberg, Marx, and Frishman 2008**). Tous ces paramètres suggèrent que la conformation moléculaire de cette enzyme n'est pas stable sa dénaturation thermique est irréversible ($\Delta S^\ddagger > 0$) et les réactions catalysées par cette enzyme sont endothermiques ($\Delta H^\ddagger > 0$) et non spontanées ($\Delta G^\ddagger > 0$). Ces résultats ne font que confirmer l'éventuelle utilisation du Ca^{2+} lors des traitements thermiques de cette enzyme afin d'accroître sa thermostabilité.

CHAPITRE VI: TENEUR EN GLYCOALCALOÏDES (α -CHACONINE ET α -SOLANINE) DE TROIS TYPES DE LA POMME DE TERRE *SOLANUM TUBEROSUM L.*) GÉNÉRALEMENT RETROUVÉES SUR LES MARCHES D'ABIDJAN (CÔTE D'IVOIRE) ET TRAITEMENT CHIMIO-ENZYMATIQUE POUR LA PRODUCTION DE LA SOLANIDINE

Chapitre IV: Teneur en glycoalcaloïdes (α -chaconine et α -solanine) de trois types de la pomme de terre *Solanum tuberosum* L. généralement retrouvées sur les marchés d'Abidjan (Côte d'Ivoire) et traitement chimio-enzymatique pour la production de la solanidine

1-Introduction

Comme nous l'avons développé dans la revue bibliographique, la pomme de terre contient des composés toxiques ; principalement l' α -chaconine et l' α -solanine. Compte tenu de la toxicité de ces composés, des seuils de sécurité ont été établis par le comité FAO/WHO (FAO/WHO 1999; Slanina 1990). La limite de sécurité a été fixée à 200 mg/kg de matière fraîche dose considérée comme non toxique pour l'homme. Cependant, la biosynthèse des GA peut être stimulée rapidement par des facteurs environnementaux tels que la lumière, les blessures mécaniques, la température de stockage et les différents traitements post-récolte faisant ainsi varier considérablement la teneur en GA dans les différents cultivars de pomme de terre (Dale et al. 1993; G. Percival 1999; G. Percival and Dixon 1996; Machado, Toledo, and Garcia 2007; Petersson et al. 2013). Certains pays comme la Côte d'Ivoire qui ne produisent pas beaucoup la pomme de terre sont contraints à l'importation. Or, compte tenu des conditions climatiques, de mauvaises conditions de stockage ainsi que de trop longs délais entre les opérations de commercialisation et de consommation, bon nombre de ces pommes de terre se retrouvent verdies, en germination ou en décomposition avec de fortes concentrations de solanine ou de chaconine. Ce sont donc ces tubercules toxiques contenant de fortes concentrations de GA qui se retrouvent souvent à la portée des consommateurs. Notons que ces composés ne sont pas détruits durant la cuisson et la friture car assez thermostable (points de fusion de l'ordre de 190 à 285°C) (Bushway and Ponnampalam 1981; Lachman et al. 2013; Tajner-Czopek et al. 2012; Rytel et al. 2015). Il est donc important de réaliser que de nombreuses intoxications aux GA de la pomme de terre sont sous-diagnostiquées dans la population de ces pays car ne sont pas différenciées d'une gastro-entérite passagère et restent de ce fait inconnues. Ainsi, il s'agira dans ce chapitre d'évaluer dans une première approche, la teneur en GA (α -chaconine et α -solanine) contenue dans trois types de la pomme de terre *Solanum tuberosum* L. (pomme de terre verdies, en germination ou en décomposition) généralement retrouvées sur les marchés d'Abidjan (Côte d'Ivoire). Puis dans une seconde approche, d'hydrolyser la chaîne latérale oligosaccharidique reliée à la solanidine par une méthode très simple combinant la méthode chimique et enzymatique afin de produire la solanidine qui est un précurseur important pour la synthèse des hormones telles que la

progestérone, la testostérone la cortisone et certains composés pharmacologiquement actif (Vronen, Koval, and Groot 2003; Vronen 2003).

2-Résultats

2-1-Identification et analyse des glycoalcaloïdes (α -solanine et α -chaconine) extraits à partir des trois types de pommes de terre utilisées dans cette étude

Les glycoalcaloïdes (GA) α -solanine et α -chaconine ont été identifiés dans les différents échantillons par comparaison des temps de rétention et la masse des échantillons avec ceux des étalons. Les temps de rétention de la solanine, la chaconine et la solanidine sont respectivement de 22,5; 23,8 min et 34 min (**figure 67**). Avec des masses en ion electrospray positif (m/z) de 868, 852 et 398 respectivement (**figure 68, 69 et 70**). La quantification a été effectuée à l'aide d'une courbe d'étalonnage établie en fonction de l'aire de chaque pic. Le **Tableau XI** montre le contenu en GA (α -solanine et α -chaconine) des trois types de pommes de terre. Les résultats issus de l'analyse de la variance (ANOVA 1) montrent une différence très hautement significative entre les échantillons pour les paramètres mesurés ($p < 0.05$). En effet, la plus haute teneur en solanine a été observée dans les pommes de terre verdies (1924 ± 118^a) suivis des pommes de terre décomposées (1361 ± 131^b). Quand à la teneur en chaconine l'analyse du tableau indique que la plus forte teneur a été observée chez les pommes de terre décomposées (3575 ± 100^a). Par ailleurs, la teneur en GA totale est plus élevée au niveau des pommes de terre verdies.

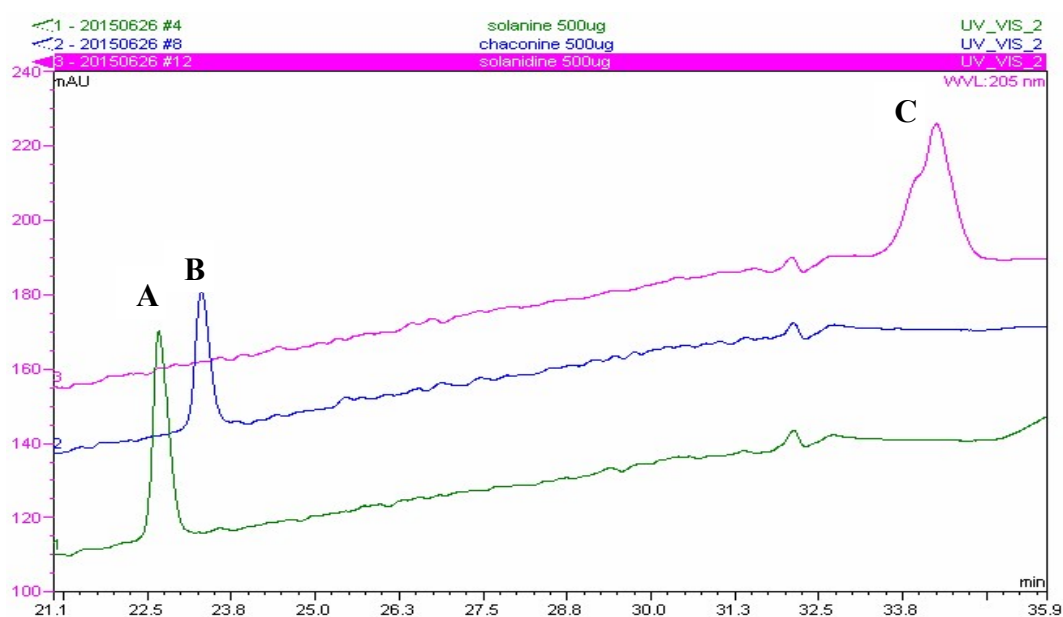


Figure 67: Chromatogramme HPLC des différents standards (A): α -solanine temps de rétention 22,5 min (B): α -chaconine temps de rétention 23,8 min (C) solanidine temps de rétention 34 min.

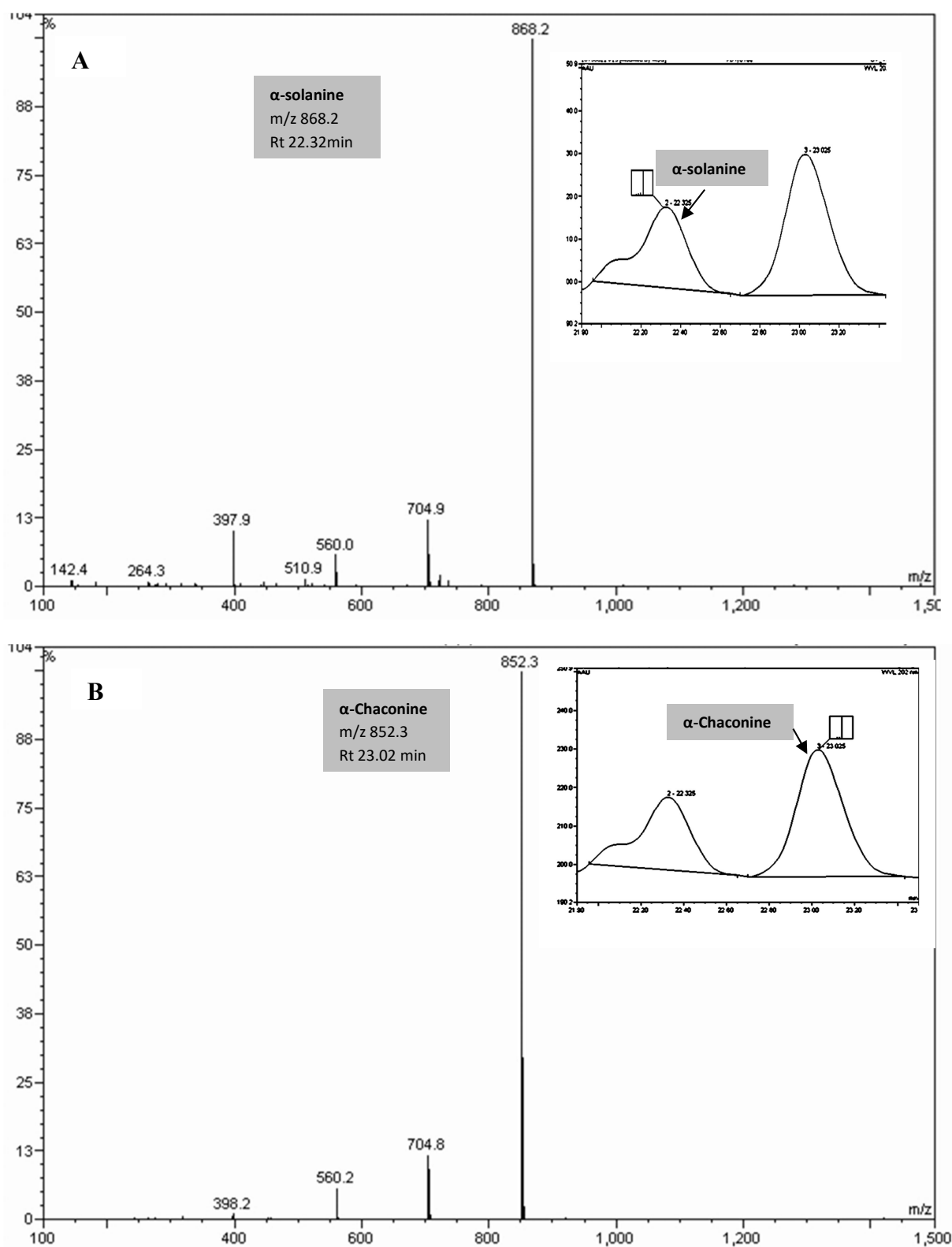


Figure 68: Chromatogramme HPLC et spectre de masse en ion electrospray positive des principaux GA de la pomme de terre en décomposition (A) Pic de l'α-solanine (B) Pic de l'α-chaconine

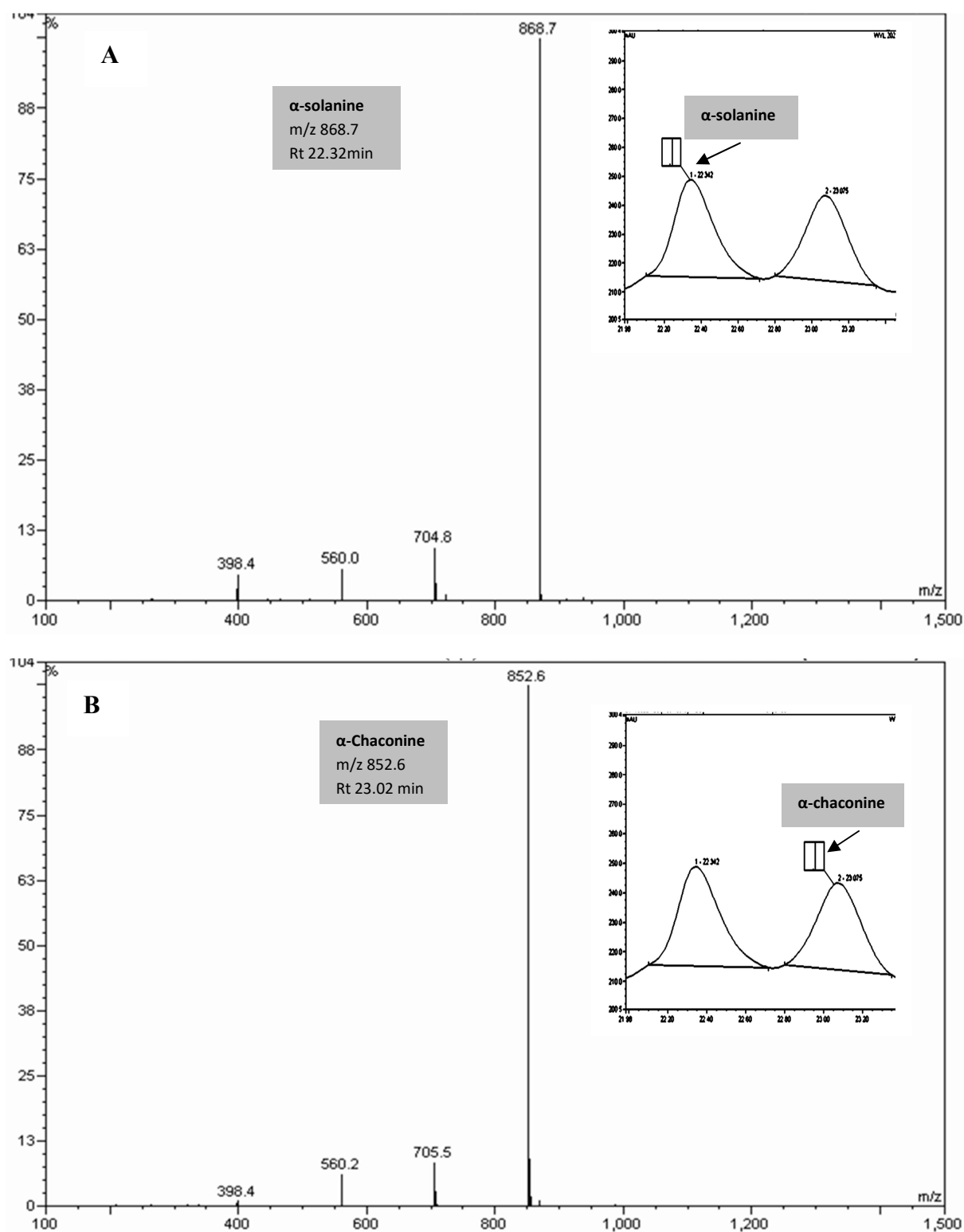


Figure 69: Chromatogramme HPLC et spectre de masse en ion electrospray positif des principaux GA de la pomme de terre verdie (A) Pic de l' α -solanine (B) Pic de l' α -chaconine

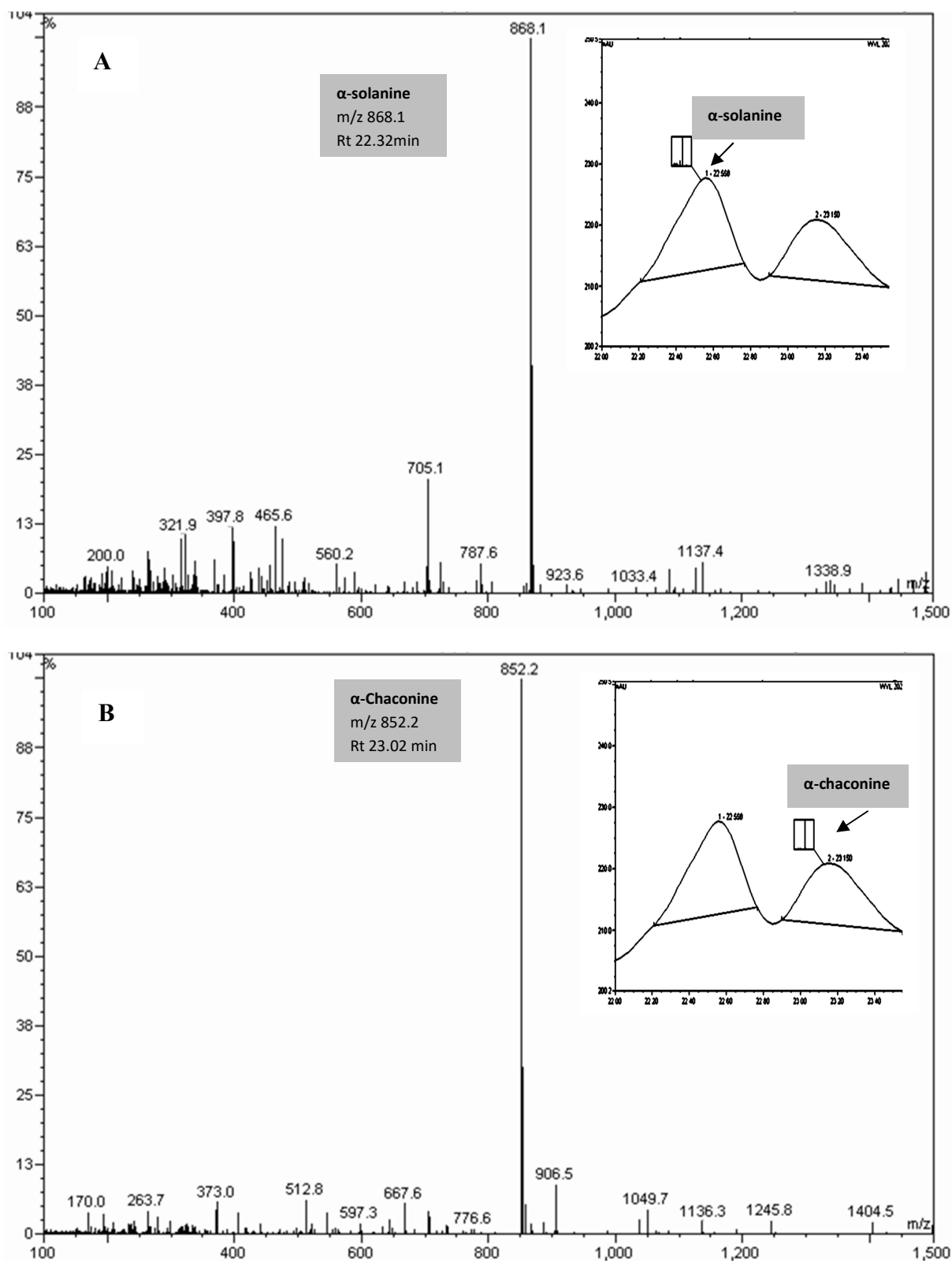


Figure 70: Chromatogramme HPLC et spectre de masse en ion electrospray positif des principaux GA de la pomme de terre en germination (A) Pic de l' α -solanine (B) Pic de l' α -chaconine

Tableau XI: Contenu en GA (α -solanine et α -chaconine) des trois types de pommes de terre (en mg/kg de matière sèche)

	Pommes de terre décomposées	Pommes de terre verdiées	Pommes de terre germées
α -solanine	1361 $\pm$ 131 ^b	1924 $\pm$ 118 ^a	1158 $\pm$ 54 ^c
α -chaconine	3575 $\pm$ 100 ^a	3139 $\pm$ 190 ^b	1420 $\pm$ 154 ^c
Ratio (chaconine/solanine)	73:26	61:39	57:43
Total GA	4788 $\pm$ 232^b	5063 $\pm$ 230^a	2578 $\pm$ 333^c

* Les moyennes suivies d'une même lettre sont statistiquement identiques au seuil de 5% (p<0.05) (test Lambda de wilk)

2-2-Identification et analyse des composés formés lors de l'hydrolyse acide partielle de l' α -solanine et de l' α -chaconine

Au cours d'une hydrolyse partielle, les deux triglycosides peuvent former chacun, deux diglycosides β 1; β 2-chaconine et solanine, un monoglycoside γ -chaconine et solanine et enfin l'aglycone commun la solanidine (**figure 71**).

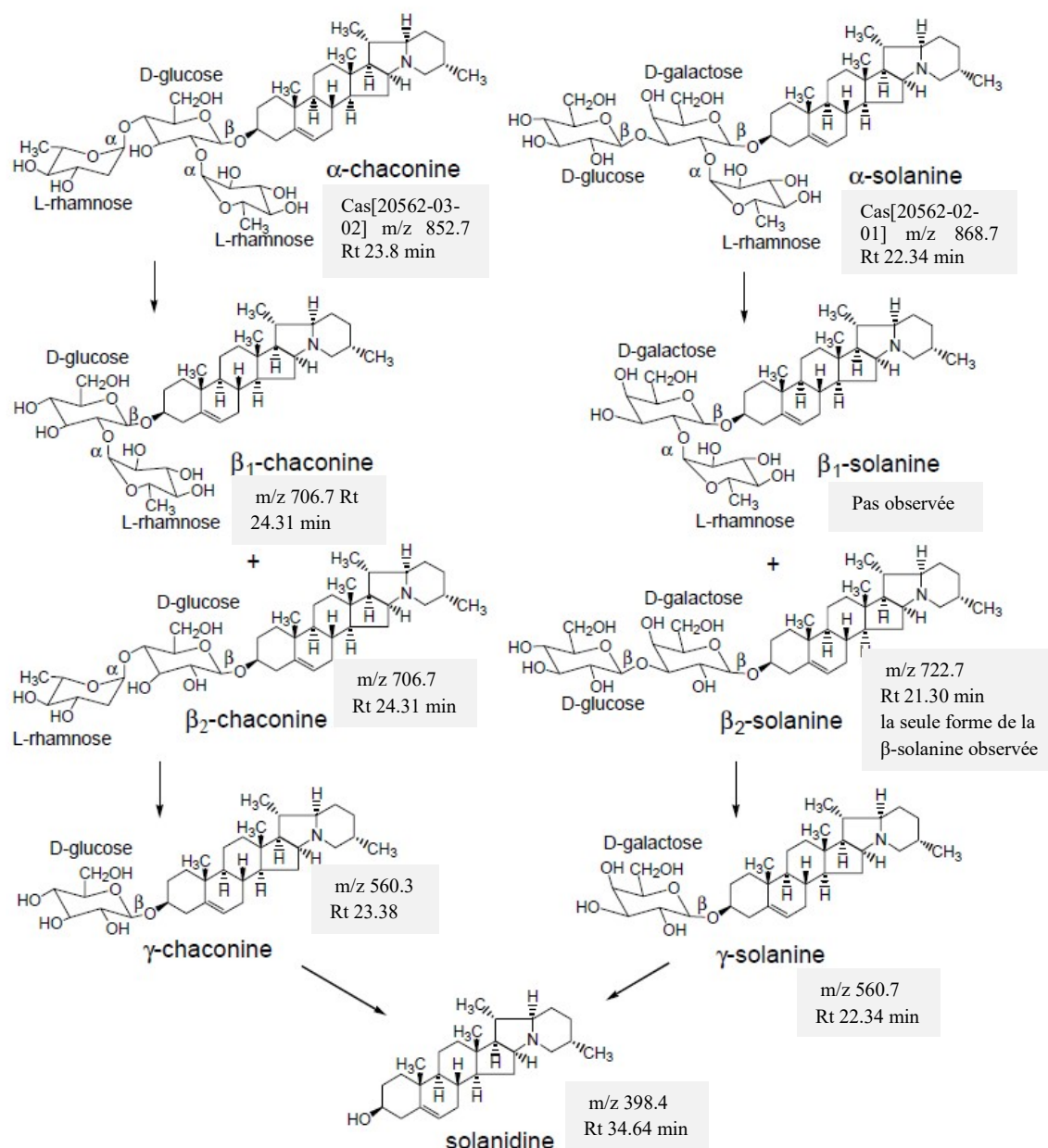
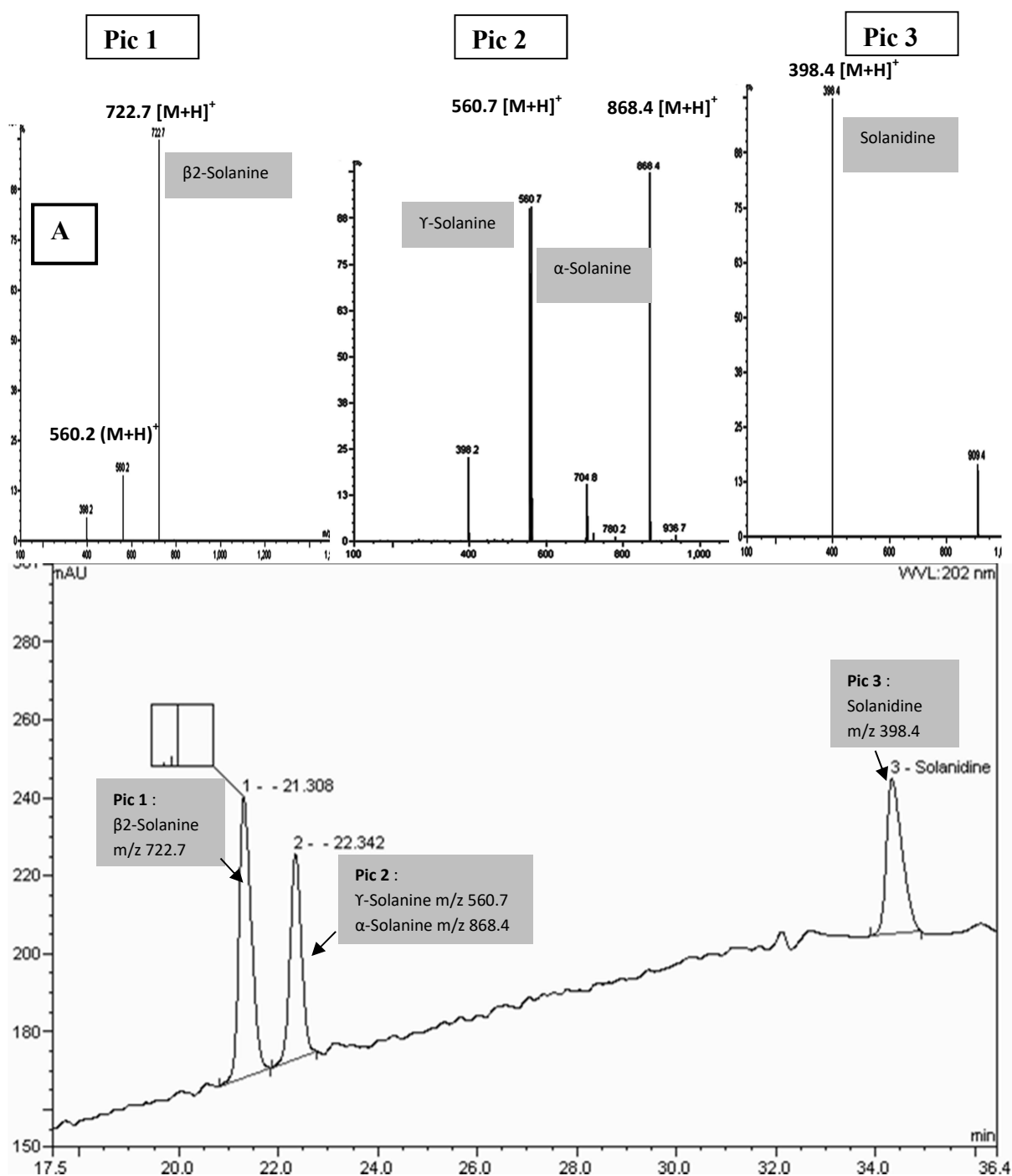


Figure 71: Produits intermédiaires obtenus lors de l'hydrolyse des chaînes latérales des α-trisaccharides chaconine et solanine jusqu'à l'aglycone la solanidine

L'hydrolyse partielle a été effectuée avec 1% d'acide chlorhydrique (HCl) à 70° C pendant 45 min. Tous les composés intermédiaires ont été observés sauf la β₁-solanine. Les principaux fragments (m/z) des composés obtenus sont présentés ci-après (**figure 72, 73**).



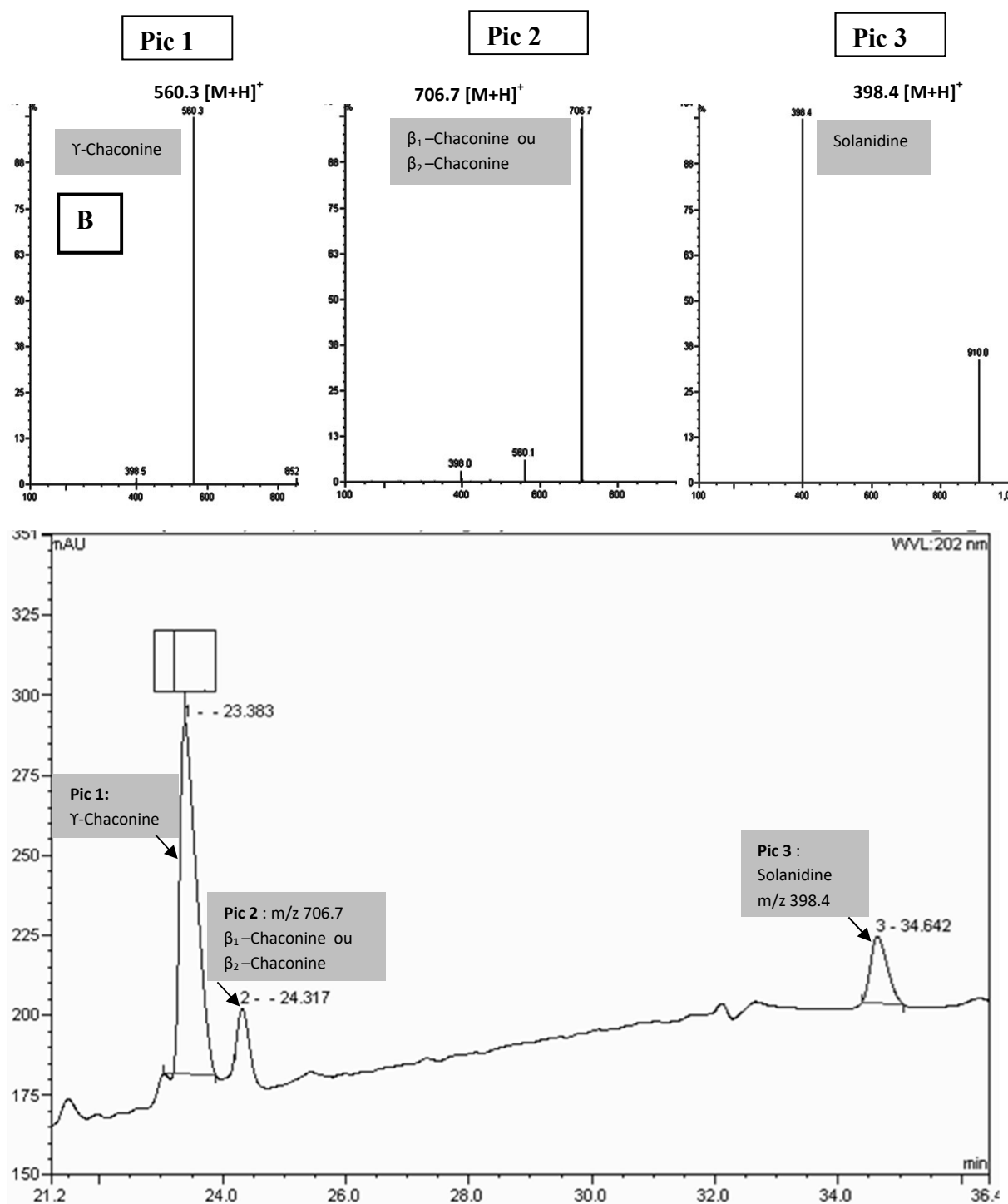


Figure 72: Chromatogramme HPLC et spectre de masse en ion electrospray positive des principaux composés formés lors de l'hydrolyse acide partielle des GA (A) Principaux composés formés lors de l'hydrolyse partielle de l' α -solanine (B) Principaux composés formés lors de l'hydrolyse partielle de l' α -chaconine. L'hydrolyse partielle de l' α -chaconine a donné quatre produits d'hydrolyse (la γ -chaconine pic 1; β_1 - β_2 -chaconine pic 2 et la solanidine pic 3); Cependant, l'hydrolyse partielle de la solanine n'a donné que trois produits d'hydrolyse (la β_2 -solanine pic 1, la γ -solanine pic 2 et la solanidine pic 3).

L'hydrolyse enzymatique a été réalisée à 37°C pendant 2 h. Les hydrolysats de l' α -chaconine et de l' α -solanine ont été utilisés comme substrat pour l'enzyme. Les résultats sont présentés ci-dessous (figures 73, 74).

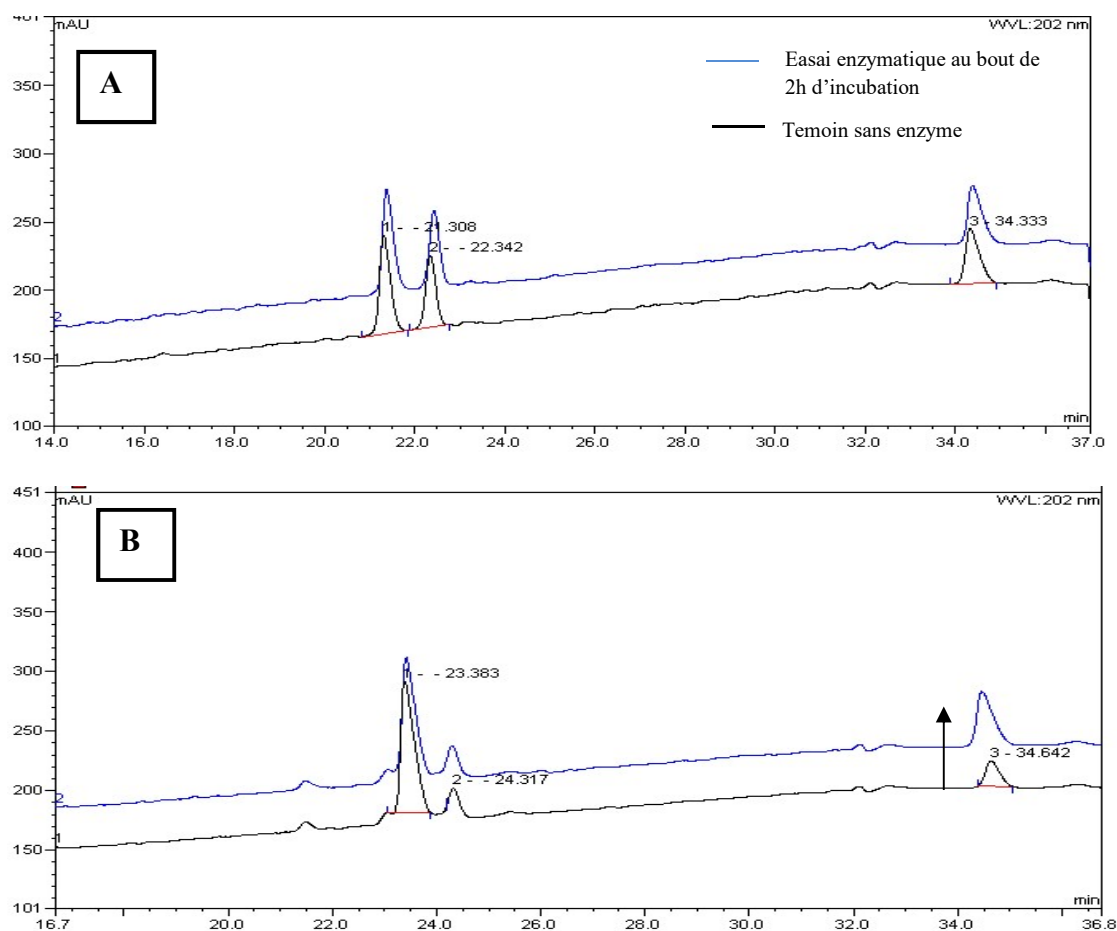


Figure 73: Chromatogramme HPLC de l'hydrolyse enzymatique des hydrolysats de l' α -chaconine et de l' α -solanine par la β -glycosidase acidophile de la blatte *Periplaneta americana* (A) Hydrolyse de l' α -solanine (B) Hydrolyse de l' α -chaconine. Le pic de la solanidine a augmenté dans l'hydrolysat de l' α -chaconine au bout de 2 h. Cependant, dans le même temps, aucune augmentation du pic de la solanidine n'a été observée dans l'hydrolysat de la solanine.

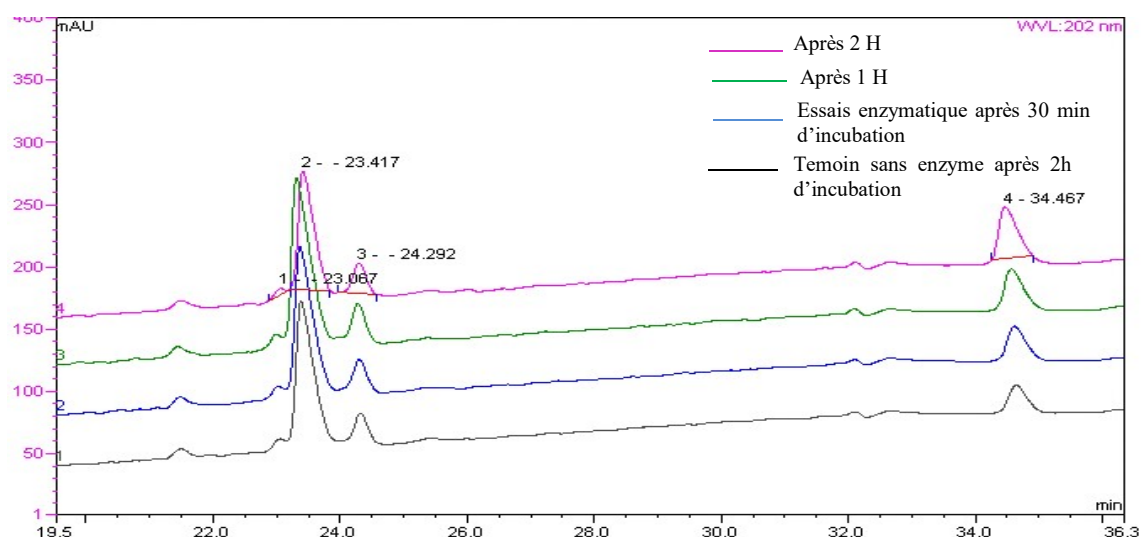


Figure 74: Chromatogramme HPLC de la cinétique d'hydrolyse enzymatique de hydrolysats de l' α -chaconine par la β -glycosidase. Au cours de la cinétique d'hydrolyse, le pic correspondant à la solanidine augmente progressivement jusqu'à atteindre un maximum au bout de 2 h. La concentration de solanidine est passée de 173,3 à 278,75 $\mu\text{g/ml}$. La cinétique a été prolongée jusqu'à 4 h mais aucune augmentation du pic de la solanidine n'a été observée certainement due à l'inactivation de l'enzyme vu la présence de solvants dans le milieu réactionnel.

2-3-Hydrolyse totale de la γ -chaconine par la β -glycosidase acidophile de la blatte *Periplaneta americana*

Au vu des résultats obtenus lors de la cinétique d'hydrolyse, les analyses ont été reprises afin d'obtenir l'hydrolyse complète de la γ -chaconine. Pour ce faire, une hydrolyse acide partielle a été effectuée comme dans le premier cas, puis l'hydrolyse enzymatique a été effectuée par la suite pendant 6 h de temps en rajoutant 50 μl d'enzyme chaque 3 h afin de prévenir l'inactivation de l'enzyme. Les résultats sont présentés ci-dessous (**figure 75 à 77**).

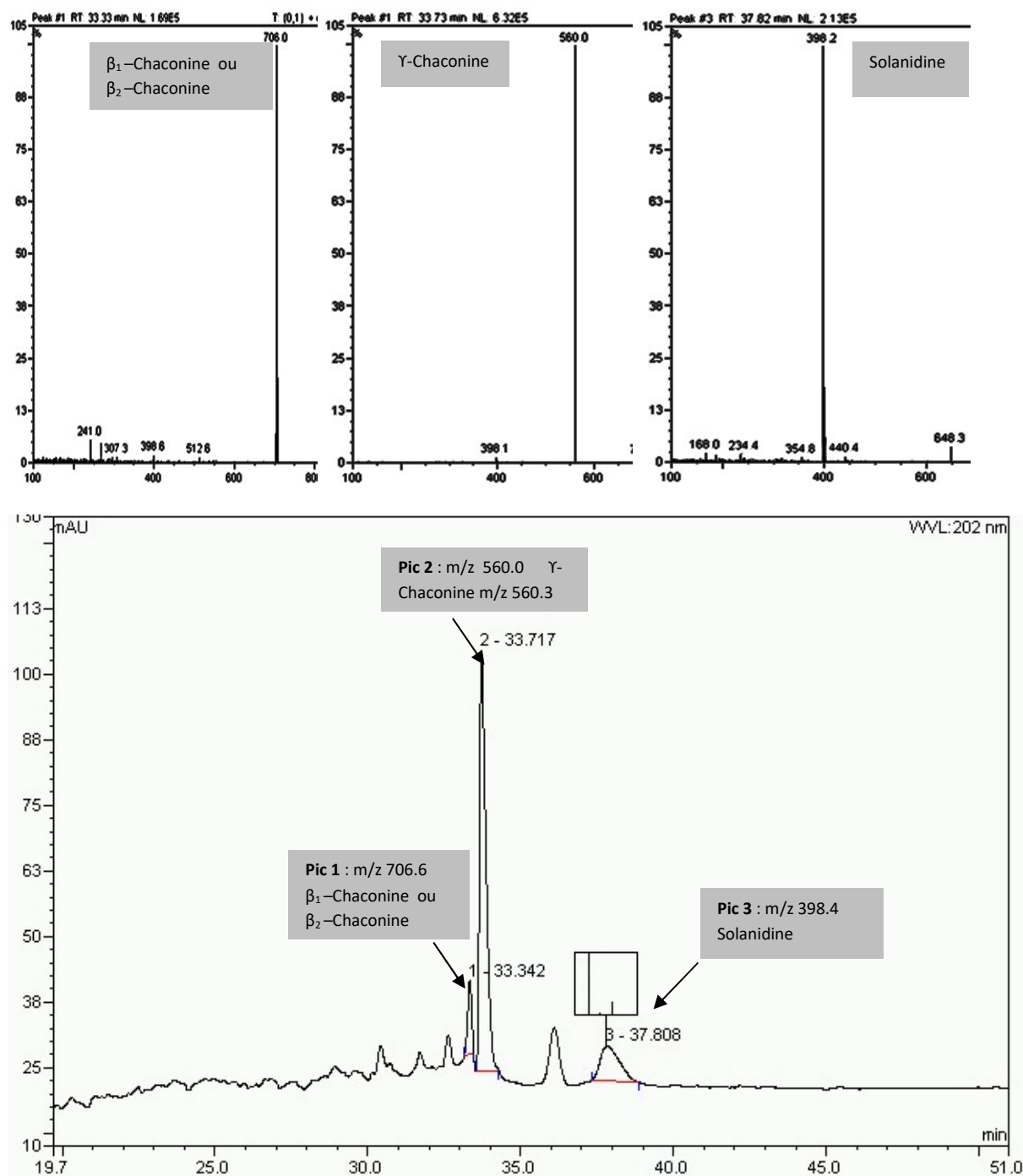


Figure 75: Chromatogramme HPLC des principaux composés formés lors de l'hydrolyse acide partielle de l' α -chaconine. L'hydrolyse acide partielle a donné cette fois cinq produits (β_1 - β_2 -chaconine pic 1; γ -chaconine pic 2; la solanidine pic 3 et un pic inconnu entre la γ -chaconine et la solanidine).

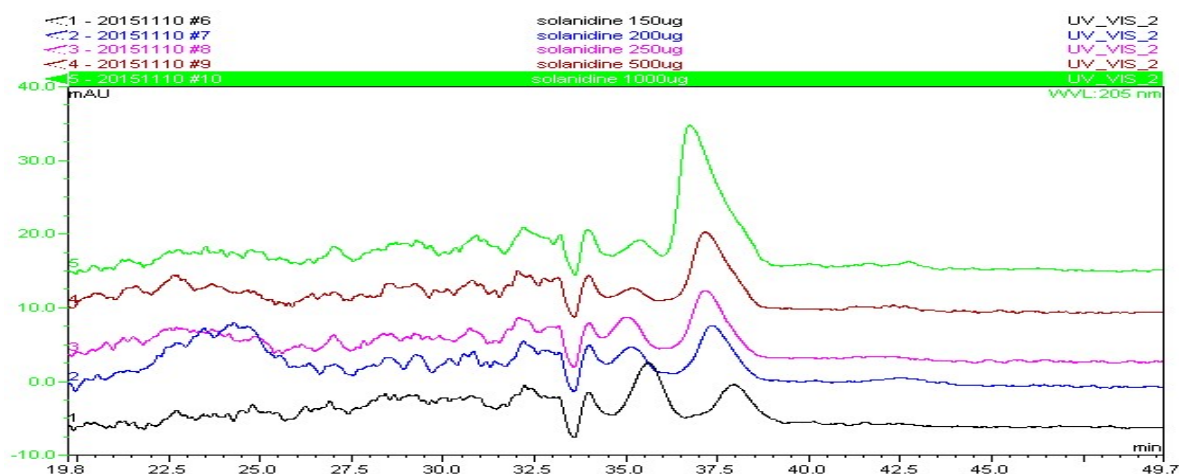


Figure 76: Chromatogramme HPLC de la solanidine (temps de retention 37,5 min).

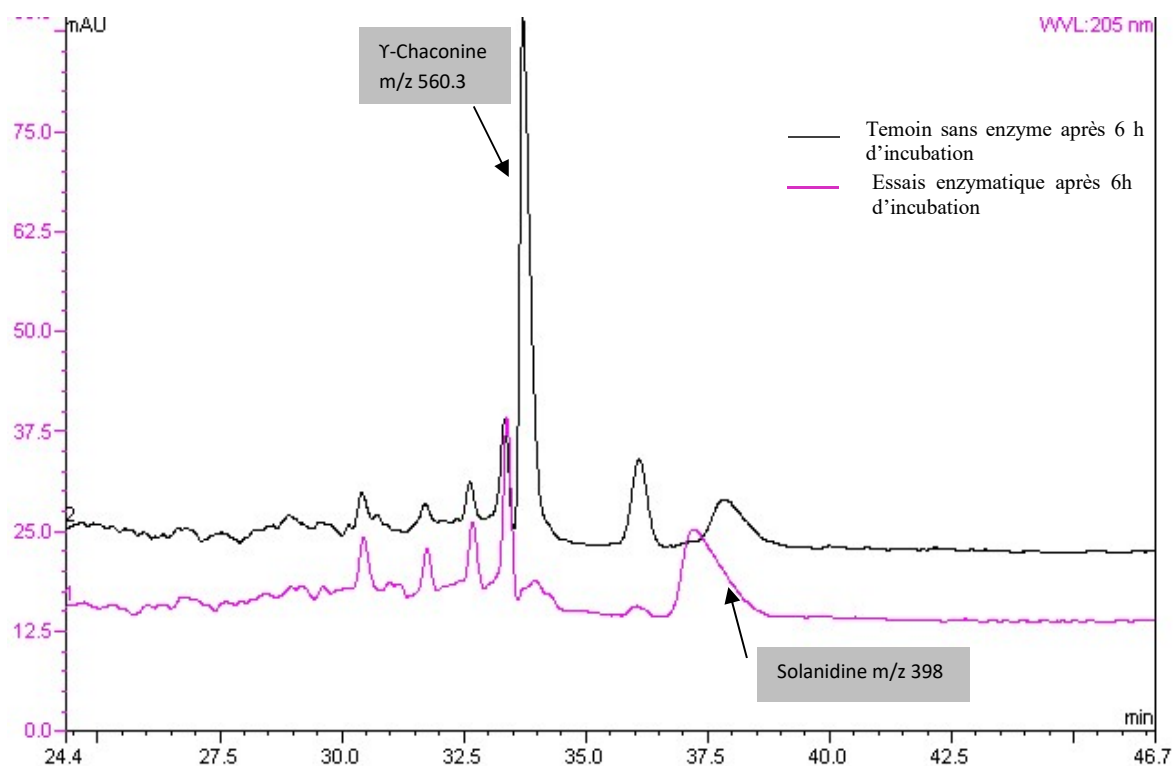


Figure 77: Hydrolyse totale de la Y-chaconine par la β -glycosidase acidophile de la blatte *Periplaneta americana*. Les pics correspondant respectivement à la Y-chaconine et au composé inconnu ont complètement disparu après 6 h d'incubation, tandis que le pic correspondant à la solanidine a considérablement augmenté dans l'essai enzymatique. La concentration de solanidine est passée de 116,12 $\mu\text{g/ml}$ dans le témoin à 269,47 $\mu\text{g/ml}$ dans l'essai

Discussion

L'objectif de ce chapitre était dans un premier temps d'évaluer le contenu en GA des différents types de pomme de terre généralement retrouvées sur les marchés d'Abidjan. L'analyse effectuée montre que le contenu en GA des différents échantillons dépasse largement la limite recommandée par le comité **FAO/WHO (1999)** qui est de 200 mg/kg de matière fraîche ou 1000 mg/kg de matière sèche. La pomme de verdie contient le taux maximal (5321 ± 487 mg/kg de matière sèche), suivie par la pomme de terre en décomposition (4872 ± 316 mg/kg de matière sèche) et la pomme de terre en germination qui contient la teneur minimale (2581 ± 333 mg/kg de matière sèche). Ces résultats indiquent que le traitement post-récolte et le trop long délai entre les opérations de commercialisation et de consommation affectent les teneurs en GA des pommes terre dans ces pays tropicaux. En effet, dans ces pays, l'entreposage en atmosphère contrôlée de la plupart des produits frais n'est pas possible, en raison de son coût, du manque d'infrastructures et de personnel qualifié. Les produits se retrouvent dans la plupart du temps sur des étalages en plein air souvent à des températures extrêmement élevées. Par ailleurs, de nombreuses études menées ont montré que la biosynthèse des GA peut être rapidement stimulé par des facteurs environnementaux tels que la lumière, les blessures mécaniques, la température de stockage (**Dale et al. 1993; G. Percival 1999; G. Percival and Dixon 1996; Machado, Toledo, and Garcia 2007; Petersson et al. 2013**), faisant ainsi varier considérablement la teneur en GA dans les différents cultivars de pomme de terre. Des études menées par **Coria et al. (1998)** ont montré que la concentration des GA totaux augmentait de 74% après un stockage pendant quatre heures à 35°C par rapport à un stockage à 22°C dans le même temps. En outre, il est généralement connu de tous que la pomme de terre verdie est impropre à la consommation en raison d'un taux élevé de GA. Malheureusement ce sont ces pommes de terre "bon marché" qui se retrouvent souvent à la portée des consommateurs de ces pays, où la majorité de la population vit en dessous du seuil de pauvreté. Aussi, les analyses effectuées au cours de ces travaux montrent que l' α -chaconine représente plus de 60% des GA totaux dans les trois types de pommes de terre. Des résultats similaires ont été obtenus par **Eltayeb, Al-sinanp, and Khan (2003)** et **Sotelo and Serrano (2000)**. **Eltayeb, Al-sinanp, and Khan (2003)** ont analysés 18 variétés de pommes de terre cultivées en Oman et ont obtenu des ratios élevés d' α -chaconine par rapport à l' α -solanine (60:40 à 79:21 α -chaconine: α -solanine). D'autre part, **Sotelo and Serrano (2000)** ont analysé 12 variétés différentes de pommes de terre au Mexique et ont également obtenu de grandes quantités d' α -chaconine (41-220 mg/100 g de

matière fraîche) par rapport à l' α -solanine (6,70 à 161,69 mg/100 g, de matière fraîche) avec un ratio moyen de α -chaconine: α -solanine (60:40). Aussi, **Mäder, Rawel, and Kroh (2009)** ont rapporté une teneur plus élevée d' α -chaconine (669 mg/100 g de matière sèche) par rapport à l' α -solanine (224 mg/100 g, matière sèche) dans la pelure de pomme de terre. Le pourcentage élevé de l' α -chaconine peut être due à son activité anti-pathogène plus élevé (**Friedman and McDonald 1997**). Par contre, ce composé présente généralement une forte activité de lyse membranaire contrairement à la solanine souvent totalement dépourvu d'une telle activité. Ce qui rend la chaconine plus toxique que la solanine (**Roddick, Weissenberg, and Leonard 2001; Keukens et al. 1992; Keukens et al. 1995**). Au vue de ces analyses, ces trois types de pomme de terre représentent donc un réel danger pour le consommateur. Rappelons que chez l'homme, l'ingestion de ces composés à des doses supérieures à 2 mg/kg de poids corporel peut conduire à une intoxication sévère pouvant entraîner à la mort. De nombreux cas d'intoxication pourraient de ce fait survenir au sein de ces populations à la suite de la consommation de ces pommes de terre contenant de fortes concentrations de GA mais seraient sous-diagnostiqués parce que les symptômes sont similaires à ceux d'autres affections gastro-intestinales. En outre, l'activité biologique des GA est liée à la fraction glucidique constituant le trisaccharide. Cette liaison n'étant pas détruite au cours des différents traitements thermiques liés aux pratiques culinaires, les GA pourraient s'accumuler dans l'organisme qui n'arriverait pas non plus à les éliminer comme l'on démontré **Mensinga et al. (2005)**. Les pommes de terre qui contiennent des quantités assez importantes de GA et de ce fait impropre à la consommation pourraient être utilisées pour la synthèse de la solanidine qui est un précurseur très important pour la synthèse d'hormones et de certains composés pharmacologiquement actifs. La deuxième approche de ces travaux a donc consisté à hydrolyser ces composés pour libérer la solanidine. Lors d'une hydrolyse acide ou enzymatique des GA, la chaîne latérale glucidique est partiellement ou totalement éliminée. Les résidus d'hydrate de carbone diffèrent significativement dans leur sensibilité à l'hydrolyse acide. Ainsi dans cette étude, l'hydrolyse acide partielle de l' α -chaconine a donné quatre produits d'hydrolyse; la β 1-chaconine, β 2-chaconine, la γ -chaconine et la solanidine. La β 1 et β 2-chaconine ayant la même masse moléculaire, ces composés ne peuvent donc pas être dissociés en masse et sont de ce fait juste parfois mentionnés β -chaconine. En revanche, l'hydrolyse acide partielle de l' α -solanine n'a permis d'observer que trois produits d'hydrolyse sur les quatre; la β 2-solanine, la γ -solanine et la solanidine. De faibles quantités d'autres produits d'hydrolyse inconnus ont été observées mais, la β 1-solanine n'a pas été détectée. En effet, les résultats publiés par **Friedman and McDonald (1995)** donnent une

explication à cette anomalie. Selon ces auteurs, la liaison entre le rhamnose et le galactose du solatriose est très faible et peut être facilement rompue contrairement à la liaison entre le glucose et le galactose. L'existence de la β 1-solanine (2-rhamnosidogalactoside) est donc improbable contrairement à la β 2-solanine (3-glucogalactoside). L'hydrolyse acide partielle réalisée dans cette étude a été effectuée avec 1% d'acide chlorhydrique à 70°C pendant 45 min. Dans ces conditions, nous avons observé des pics chromatographiques de la solanidine semblables à ceux généralement observés dans la littérature. En vue d'améliorer l'hydrolyse de ces composés et obtenir une meilleure concentration de solanidine, le plus souvent dans la littérature, les conditions sont optimisées en augmentant le temps et la concentration de réactifs (10% d'acide chlorhydrique pendant 2 h à 75°C) (**Attoumbré, Giordanengo, and Baltora-Rosset 2013; Nikolic and Stankovic 2003**). Généralement, dans ces conditions extrêmes la réaction est favorisée du côté de la déshydratation de la solanidine en un composé secondaire indésirable la solanthrene ce qui n'est probablement pas l'objectif visé tel que démontré par **Attoumbré, Giordanengo, and Baltora-Rosset (2013)**. Dans la présente étude, afin d'améliorer la production de la solanidine dans de meilleures conditions, l'hydrolyse acide partielle des GA a été suivie par une hydrolyse enzymatique. Les produits d'hydrolyse acide partielle de la solanine et la chaconine ont été utilisés comme substrat pour la β -glycosidase purifiée de la blatte *Periplaneta americana*. La réaction enzymatique a été réalisée à 37°C pendant 2 h. L'analyse des composés formés lors de cette hydrolyse montre que le pic correspondant à la solanidine a significativement augmenté dans l'hydrolysats de la chaconine. Cependant dans le même temps, aucune augmentation du pic de la solanidine n'a été observée dans l'hydrolysats de la solanine. Ces résultats montrent que la β -glycosidase purifiée est capable d'hydrolyser la liaison β -1,3 entre le glucose et la solanidine de la γ -chaconine mais ne présente aucune activité sur la liaison β -1,3 entre le galactose et la solanidine de la γ -solanine. Pour confirmer les résultats de cette expérience, une cinétique d'hydrolyse a été suivie de 30 min à 120 min. Au cours de la cinétique, le pic correspondant à la solanidine augmente progressivement jusqu'à atteindre son maximum au bout de 2 h de temps. La réaction a été poursuivie pendant 4 h, mais aucune augmentation du pic n'a été observée. Ce résultat pourrait être dû à l'inactivation de l'enzyme vu la présence de solvants et l'acidité du milieu dont le pH est autour de 2. En effet, cette enzyme acidophile qui conserve plus de 80% de son activité à pH 2,6 n'est cependant pas très stable à ce pH. Afin d'obtenir donc une hydrolyse totale de la γ -chaconine, l'expérience a été reprise comme dans le premier cas, en augmentant la quantité d'enzyme et le temps d'hydrolyse. L'hydrolyse acide partielle de l' α -

chaconine réalisée cette fois a donné cinq produits d'hydrolyse; la β 1- β 2-chaconine; la γ -chaconine; la solanidine et un pic inconnu entre la γ -chaconine et la solanidine. Cette hydrolyse acide partielle a été suivie par l'hydrolyse enzymatique. En tenant compte des résultats de la cinétique d'hydrolyse, l'hydrolyse enzymatique a été effectuée cette fois pendant 6 h en rajoutant 50 μ l d'enzyme chaque 3 h de temps, afin de prévenir l'inactivation de l'enzyme. Au bout des 6 h de réaction, le pic de la γ -chaconine et le pic inconnu ont complètement disparu dans l'essai enzymatique, dans le même temps le pic correspondant à la solanidine a considérablement augmenté. Ces résultats confirment que la β -glycosidase acidophile *Periplaneta americana* est capable d'hydrolyser la liaison β -1,3 entre le glucose et la solanidine de la γ -chaconine.

Conclusion partielle

Dans la présente étude, la concentration en GA de trois types de pommes de terre généralement retrouvées sur les marchés d'Abidjan (Côte-d'Ivoire) a été analysée. Le contenu en GA des différents échantillons dépasse largement la limite recommandée par le comité **FAO/WHO (1999)**. Les conditions climatiques de ce pays, les trop longs délais entre les opérations de commercialisation et de consommation et les différents traitements post-récolte seraient à l'origine de ces concentrations élevées comme l'ont montré ces résultats. En outre, nous avons montré que la β -glycosidase l'acidophile de la blatte *Periplaneta americana* est capable d'hydrolyser la liaison β -1,3 entre le glucose et la solanidine de la γ -chaconine par une méthode très simple afin de détoxifier ces composés et produire la solanidine, un précurseur important pour la synthèse d'hormones et certains composés pharmacologiquement actifs.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Les objectifs de cette thèse étaient dans un premier temps d'évaluer la teneur en GA dans les pommes de terre décomposées puis de développer des voies biotechnologiques pour la valorisation de ces molécules. Ainsi, dans la présente étude, les principaux GA de trois types de pommes de terre généralement retrouvées sur les marchés d'Abidjan (Côte d'Ivoire) ont été extraits, identifiés puis quantifiés. Il ressort de ces analyses, que le contenu en GA des différents échantillons dépasse 2 à 5 fois la limite recommandée. Ces fortes teneurs en GA seraient dues non seulement aux conditions climatiques de ce pays mais aussi aux différents traitements post-récolte et les trop longs délais entre les opérations de commercialisation et de consommation. Ces pommes de terres contenant de fortes concentrations de GA devant de ce faite être proscrit de l'alimentation humaine et animale entraine inévitablement une augmentation de la quantité de coproduits. La gestion de ces déchets représentant un enjeu à la fois environnemental et économique, développer des procédés de recyclage pour accroître la valeur ajoutée de ces produits s'avérerait être un défi majeur. Pour y parvenir, nous avons d'abord identifié puis isolé une β -glycosidase à partir d'un broyat de la blatte entière. La caractérisation biochimique de cette enzyme a montré que cette protéine possède des propriétés biochimiques intéressantes ; un pH optimum de 3,6 avec plus de 80% de son activité à pH 2,6 et une large spécificité de substrat. Cette enzyme de par ses caractéristiques s'avérerait être un outil important dans le cadre de ce projet. Ainsi, nous avons effectué une analyse plus poussée pour sa caractérisation complète. Nous avons pu isoler le gène codant pour la β -glycosidase de la blatte *Periplaneta americana* à partir d'une librairie génomique d'ADNc. Après plusieurs tentatives infructueuses en vue de la production de cette protéine dans la bactérie *E.coli* et dans la levure *Yarrowia L.*, la production a pu être réalisée avec succès dans les cellules d'insectes Sf9. Au terme de la caractérisation de la protéine native en parallèle avec la protéine recombinante, il ressort que, des modifications post-traductionnelles souvent induite par l'hôte, les méthodes de purification, l'effet du TAG ont conduit à une protéine recombinante différente de la protéine native. Cependant, la caractérisation poussée de cette enzyme (β -D-glucopyranoside glucohydrolases, E.C. 3.2.1.21) a confirmée que cette protéine appartient bien à la famille 1 des glycosides hydrolases (GH1). Elle est monomérique avec un poids moléculaire de 55 kDa. L'étude de l'hydrolyse de différents glycosides a montré que cette enzyme est spécifique de l'anomerie beta (β). Cependant, elle ne reconnaît pas de façon spécifique un seul résidu glycosyle. Elle hydrolyse à la fois des glycosyl β -

glycosides et des aryl β -glycosides. Il s'agit donc d'une α - β -D-glycosidase. Son activité hydrolytique est favorisée en présence des ions K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Cu^{2+} et l'EDTA. L'étude des paramètres cinétiques a montré que la dénaturation thermique de cette enzyme suit une cinétique premier ordre monophasique. Les paramètres thermodynamiques suggèrent que la conformation tridimensionnelle de cette enzyme n'est pas stable, sa dénaturation thermique est irréversible ($\Delta S^\ddagger > 0$) et les réactions catalysées par cette enzyme sont endothermiques ($\Delta H^\ddagger > 0$) et non spontanées ($\Delta G^\ddagger > 0$). Par la suite, nous avons développé dans ces travaux une méthode chimio-enzymatique, comprenant un traitement acide partiel suivie d'une hydrolyse enzymatique par la β -glycosidase de la blatte *Periplaneta americana*, afin de détoxifier les toxines glycosides de la pomme de terre et produire des molécules réutilisables (la solanidine) par l'homme. Cette approche nous a permis de produire la solanidine à partir de la γ -chaconine tout en évitant la formation de la solanthrène. Cependant aucune activité n'a été observée sur la γ -solanine.

Les résultats obtenus au cours de ce travail permettent d'envisager plusieurs perspectives de recherche :

Concernant la β -glycosidase de la blatte *Periplaneta americana*

- Une étude immuno-histochimique permettra de situer la localisation subcellulaire de cette enzyme au niveau du tube digestif de la blatte *Periplaneta americana* afin de mieux cerner son mécanisme d'action
- Les légères différences observées dans les propriétés biochimiques et dans l'hydrolyse des GA de la pomme de terre de la protéine recombinante par rapport à la protéine native probablement dues aux modifications post-traductionnelles par l'hôte, pourrait être résolues en optimisant les conditions de production et en envisageant la surexpression dans d'autres hôtes tel que *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* etc.
- L'enzyme possède un bon potentiel dans l'hydrolyse des glycosides naturels voir en industrie. Aussi, pour améliorer et faciliter son utilisation dans ces réactions une immobilisation de cette enzyme serait souhaitable
- Une ingénierie pour élargir la spécificité de substrat de l'enzyme pourrait être réalisée en vue d'obtenir l'hydrolyse des dérivés de la solanine

Concernant le procédé chimio-enzymatique développé dans ces travaux,

- Une optimisation du couplage hydrolyse acide partielle/hydrolyse enzymatique pourrait être envisagée
- Le criblage d'autres GH1 ou β -galactosidases pourrait être effectué afin de concevoir des cocktails enzymatiques plus efficaces pouvant conduire à l'hydrolyse de la solanine et d'autres GA.
- Une étude plus poussée en optimisant les conditions d'utilisation de la β -glycosidase pour l'hydrolyse des GA pourrait-être envisagée en vue de l'extension de cette hydrolyse aux GA provenant d'autres espèces alimentaires de la famille des Solanaceae telle que l'aubergine, la tomate, les poivrons et les piments etc.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Marangoni Alejandro. 2002. "Enzyme Kinetics: A Modern Approach." In *John Wiley and Sons, N.Y.*, 248.
- Adjogble Koku, Corinne Mercier, Jean-Francois Dubremetz, Christian Hucke, Colin MacKenzie, Marie-France Cesbron-Delauw, Walter Däubener. 2004. "GRA9, a New Toxoplasma Gondii Dense Granule Protein Associated with the Intravacuolar Network of Tubular Membranes." *International Journal for Parasitology* 34(11) 1255–1264
- Ajisaka, Katsumi, Hiroko Nishida, and Hiroshi Fujimoto. 1987. "Use of an Activated Carbon Column for the Synthesis of Disaccharides by Use of a Reversed Hydrolysis Activity of β -Galactosidase." *Biotechnology Letters* 9 (6): 387–92.
- Akram, Fatima, Ikram ul Haq, Mahmood Ali Khan, Zahid Hussain, Hamid Mukhtar, and Kaleem Iqbal. 2016. "Cloning with Kinetic and Thermodynamic Insight of a Novel Hyperthermostable β -Glucosidase from Thermotoga Naphthophila RKU-10T with Excellent Glucose Tolerance." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* (124). 92–104. doi:10.1016/j.molcatb.2015.12.005.
- Al-Ani, Issam, Stefan Zimmermann, Jürgen Reichling, and Michael Wink. 2015. "Pharmacological Synergism of Bee Venom and Melittin with Antibiotics and Plant Secondary Metabolites against Multi-Drug Resistant Microbial Pathogens." *Phytomedicine : International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology* 22 (2): 245–55. doi:10.1016/j.phymed.2014.11.019.
- Aliferis, Konstantinos, and Suha Jabaji. 2012. "FT-ICR/MS and GC-EI/MS Metabolomics Networking Unravels Global Potato Sprout's Responses to Rhizoctonia Solani Infection." *PLoS ONE* 7 (8): 1–13. doi:10.1371/journal.pone.0042576.
- Andre, Christelle M, Marc Ghislain, Pierre Bertin, Mouhssin Oufir, María del Rosario Herrera, Lucien Hoffmann, Jean-François Hausman, Yvan Larondelle, and Danièle Evers. 2007. "Andean Potato Cultivars (Solanum Tuberosum L.) as a Source of Antioxidant and Mineral Micronutrients." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (2). American Chemical Society: 366–78. doi:10.1021/jf062740i.
- Anon. 1984. "Solanine Food Poisoning Associated with a School Lunch Program - Alberta." *Canada Diseases Weekly Report, Health and Welfare Canada* (71): 10–18.
- AOAC. 2000. "Glycoalkaloids (α -Solanine and Chaconine) in Potato Tubers." *Official Method* 997 (13): 1–4.
- Arruda L.K., Ferriani P.L.V., Vailes L.D., Pomés A., Chapman M.D. 2001. "Cockroach Allergens: Environmental Distribution and Relationship to Disease." *Curr. Allergy Asthma Rep.* (1): 466–73.
- Attoumbré, Jacques, Philippe Giordanengo, and Sylvie Baltora-Rosset. 2013. "Solanidine Isolation from Solanum Tuberosum by Centrifugal Partition Chromatography." *Journal of Separation Science* 36 (14): 2379–85. doi:10.1002/jssc.201300188.
- Bak, Søren, Hanne Linde Nielsen, and Barbara Ann Halkier. 1998. "The Presence of CYP79

- Homologues in Glucosinolate-Producing Plants Shows Evolutionary Conservation of the Enzymes in the Conversion of Amino Acid to Aldoxime in the Biosynthesis of Cyanogenic Glucosides and Glucosinolates.” *Plant Molecular Biology* 38 (5). Kluwer Academic Publishers: 725–34. doi:10.1023/A:1006064202774.
- Baker J.E., Woo S.M. 1992. “ β -Glucosidases in the Rice Weevil, *Sitophilus Oryzae*: Purification, Properties, and Activity Levels in Wheat and Legume-Feeding Strains.” *Insect Biochem. Mol. Biol.* (22): 495–504.
- Baker, D, R Keeler, and W Gaffield. 1987. “Lesions of Potato Sprout and Extracted Potato Sprout Alkaloid Toxicity in Syrian Hamsters.” *Journal of Toxicology. Clinical Toxicology* 25 (3): 199–208. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3612898>.
- Baker, Dale C, Richard F Keeler, and William Gaffield. 1989. “Pathology in hamsters administered *Solanum* plant species that contain steroidal alkaloids” *Toxicon* (27): 1331–37.
- Barleben, Leif, Santosh Panjikar, Martin Ruppert, Juergen Koepke, and Joachim Stöckigt. 2007. “Molecular Architecture of Strictosidine Glucosidase: The Gateway to the Biosynthesis of the Monoterpenoid Indole Alkaloid Family.” *The Plant Cell* 19 (9): 2886–97. doi:10.1105/tpc.106.045682.
- Barrett N.E., Gryison A.S. & Lewis M.J. 1999. “Contribution of the Lactoperoxidase System to the Keeping Quality of Pasteurized Milk.” *Journal of Dairy Research* (66): 73–80.
- Bártová, Veronika, and Jan Bárta. 2009. “Chemical Composition and Nutritional Value of Protein Concentrates Isolated from Potato (*Solanum Tuberosum* L.) Fruit Juice by Precipitation with Ethanol or Ferric Chloride.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (19). American Chemical Society: 9028–34. doi:10.1021/jf900897b.
- Bayer, Edward a., Henri Chanzy, Raphael Lamed, and Yuval Shoham. 1998. “Cellulose, Cellulases and Cellulosomes.” *Current Opinion in Structural Biology* 8 (5): 548–57. doi:10.1016/S0959-440X(98)80143-7.
- Belancic, A, and Z Gunata. 2003. “ β -Glucosidase from the Grape Native Yeast *Debaryomyces Vanrijae*: Purification, Characterization, and Its Effect on Monoterpene Content of a Muscat Grape Juice.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(5):1453-9.. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf025777l>.
- Bell W. J., Gorton R. E., Tourtellot M. K., Breed M. D. 1979. “Comparaison of Male Agonistic Behavior in Five Species of Cockroaches.” *Insectes Sc.* 26: 252–63.
- Benilova, Iryna V., Valentina N. Arkhypova, Sergey V. Dzyadevych, Nicole Jaffrezic-Renault, Claude Martelet, and Alexey P. Soldatkin. 2006. “Kinetics of Human and Horse Sera Cholinesterases Inhibition with Solanaceous Glycoalkaloids: Study by Potentiometric Biosensor.” *Pesticide Biochemistry and Physiology* 86 (3): 203–10. doi:10.1016/j.pestbp.2006.04.002.
- Bhatia, Yukti, Saroj Mishra, and V S Bisaria. 2002. “Microbial β -Glucosidases : Cloning , Properties , and Applications” *Genetics and Molecular Biology* 22 (4): 375–407.
- Binate, Siaka, Denis N Dri, Marie Toka, and Lucien Patrice Kouame. 2008. “Purification and Characterisation of Two Beta-Glucosidases from Termite Workers *Macrotermes*

- Bellicosus (Termitidae : Macrotermitinae)” *Journal of Applied Biosciences* 10: 461–70.
- Blankemeyer, James T., Randall Atherton, and Mendel Friedman. 1995. “Effect of Potato Glycoalkaloids .alpha.-Chaconine and .alpha.-Solanine on Sodium Active Transport in Frog Skin.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43 (3). American Chemical Society: 636–39. doi:10.1021/jf00051a015.
- Bordes, Florence. 2008. “Ingenierie du systeme d’expression yarrowia lipolytica pour l’evolution dirigee et l’etude structurale de la lipase lip2 de yarrowia lipolytica.” Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse (INSA Toulouse) thèse de Doctorat 350p.
- Bourgaud, F., A. Gravot, S. Milesi, and E. Gontier. 2001. “Production of Plant Secondary Metabolites: A Historical Perspective.” *Plant Science* 161 (5): 839–51. doi:10.1016/S0168-9452(01)00490-3.
- Bromberg, A, S Marx, and G Frishman. 2008. “Kinetic Study of the Thermal Inactivation of Cholinesterase Enzymes Immobilized in Solid Matrices.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Proteins and Proteomics* 1784 (6) 961–966 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570963908000769>.
- Bujang, Nurmastini Sufina, Nigel . Harrison, and Nan-Yao Su. 2014. “Molecular Cloning of Five β -Glucosidases From Four Species of Higher Termites (Blattodea: Termitidae).” *Annals of the Entomological Society of America* 107 (1): 251–56. doi:10.1603/AN13012.
- Burmeister, W P, S Cottaz, H Driguez, R Iori, S Palmieri, and B Henrissat. 1997. “The Crystal Structures of Sinapis Alba Myrosinase and a Covalent Glycosyl-Enzyme Intermediate Provide Insights into the Substrate Recognition and Active-Site Machinery of an S-Glycosidase.” *Structure (London, England : 1993)* 5 (5): 663–75. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9195886>.
- Bushway, Rodney J, Sharon Savage, and Bruce S Ferguson. 1987. “Inhibition of Acetylcholinesterase by Solanaceous Glycoalkaloids and Alkaloids. Short communication ”
- Bushway, Rodney J., and Rathy Ponnampalam. 1981. “.alpha.-Chaconine and .alpha.-Solanine Content of Potato Products and Their Stability during Several Modes of Cooking.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 29 (4). American Chemical Society: 814–17. doi:10.1021/jf00106a033.
- Stumbo C.R.,. 1973. “Thermobacteriology in Food Processing (2nd Ed).” *New York: Academic Press*. 336p.
- Cairns, James R Ketudat, and Asim Esen. 2010. “ β -Glucosidases.” *Cellular and Molecular Life Sciences* 67 (20): 3389–3405. doi:10.1007/s00018-010-0399-2.
- Cairns, James R. Ketudat, Bancha Mahong, Supaporn Baiya, and Jong-Seong Jeon. 2015. “ β -Glucosidases: Multitasking, Moonlighting or Simply Misunderstood” *Plant Science* 241. Elsevier Ireland Ltd: 246–59. doi:10.1016/j.plantsci.2015.10.014.
- Cantarel, Brandi L, Pedro M Coutinho, Corinne Rancurel, Thomas Bernard, Vincent Lombard, and Bernard Henrissat. 2009. “The Carbohydrate-Active EnZymes Database (CAZy): An Expert Resource for Glycogenomics.” *Nucleic Acids Research* 37 (Database issue): D233–38. doi:10.1093/nar/gkn663.

- Cao, Pinghua, Lei Wang, Yaoyue Wang, Ning Zhou, and Yulin Chen. 2015. "Alkali-Tolerant β -Glucosidase Produced by Newly Isolated *Aspergillus Fumigatus* WL002 from Rotten Wood." *International Biodeterioration & Biodegradation* 105: 276–82. doi:10.1016/j.ibiod.2015.09.010.
- "CAZy - GH." 2015. Accessed August 20. <http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>.
- Chamoli, Shivangi, Piyush Kumar, Naveen Kumar Navani, and Ashok Kumar Verma. 2016. "Secretory Expression, Characterization and Docking Study of Glucose-Tolerant β -Glucosidase from *B. Subtilis*." *International Journal of Biological Macromolecules* 85. Elsevier B.V.: 425–33. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.01.001.
- Chuenchor, Watchalee, Salila Pengthaisong, Robert C Robinson, Jirundon Yuvaniyama, Jisnuson Svasti, and James R Ketudat Cairns. 2011. "The Structural Basis of Oligosaccharide Binding by Rice BGLuI Beta-Glucosidase." *Journal of Structural Biology* 173 (1): 169–79. doi:10.1016/j.jsb.2010.09.021.
- Chutintrasri, Benjar, and Athapol Noomhorm. 2006. "Thermal Inactivation of Polyphenoloxidase in Pineapple Puree." *LWT - Food Science and Technology* 39 (5): 492–95. doi:10.1016/j.lwt.2005.04.006.
- Cokelaere M, Daenens P, Decuypere E, Flo G, Kühn E, Van Boven M, Vermaut S. 1998. "Reproductive Performance of Rats Treated with Defatted Jojoba Meal or Simmondsin before or during Gestation." *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 36 (1): 13–19. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9487360>.
- Coria, Norma A., Jorge I. Sarquís, Ignacio Peñalosa, and Martha Urzúa. 1998. "Heat-Induced Damage in Potato (*Solanum Tuberosum*) Tubers: Membrane Stability, Tissue Viability, and Accumulation of Glycoalkaloids." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46 (11). American Chemical Society: 4524–28. doi:10.1021/jf980151+.
- Coutinho, Pedro M, Emeline Deleury, Gideon J Davies, and Bernard Henrissat. 2003. "An Evolving Hierarchical Family Classification for Glycosyltransferases." *Journal of Molecular Biology* 328 (2): 307–17. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12691742>.
- Coxon, David T. 1981. "The Glycoalkaloid Content of Potato Berries." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 32 (4): 412–14. doi:10.1002/jsfa.2740320416.
- Crawford L., and Kocan R. M.. 1993. "Steroidal Alkaloid Toxicity to Fish Embryos." *Toxicology Letters* 66 (2): 175–81. doi:10.1016/0378-4274(93)90092-C.
- Crawford, L., and B. Myhr. 1995. "A Preliminary Assessment of the Toxic and Mutagenic Potential of Steroidal Alkaloids in Transgenic Mice." *Food and Chemical Toxicology* 33 (3): 191–94. doi:10.1016/0278-6915(94)00135-B.
- Criswell, Angela R, Euiyoung Bae, Boguslaw Stec, Jordan Konisky, and George N Phillips. 2003. "Structures of Thermophilic and Mesophilic Adenylate Kinases from the Genus *Methanococcus*." *Journal of Molecular Biology* 330 (5): 1087–99. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12860130>.
- Crout D. H. and Vic G. 1998. "Glycosidases and Glycosyl Transferases in Glycoside and Oligosaccharide Synthesis." *Current Opinion in Chemical Biology* 2 (1): 98–111.

doi:10.1016/S1367-5931(98)80041-0.

- Czjzek, M, M Cicek, V Zamboni, D R Bevan, B Henrissat, and A Esen. 2000. "The Mechanism of Substrate (Aglycone) Specificity in Beta -Glucosidases Is Revealed by Crystal Structures of Mutant Maize Beta -Glucosidase-DIMBOA, -DIMBOAGlc, and -Dhurrin Complexes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (25): 13555–60. doi:10.1073/pnas.97.25.13555.
- Koshland D.E. 1953. "Stereochemistry Band the Mechanism of Enzymatic Reactions." *Biol. Rev.* 90: 1171–1202.
- Daenen, Luk, Femke Sterckx, Freddy R Delvaux, Hubert Verachtert, and Guy Derdelinckx. 2008. "Evaluation of the Glycoside Hydrolase Activity of a *Brettanomyces* Strain on Glycosides from Sour Cherry (*Prunus Cerasus* L.) Used in the Production of Special Fruit Beers." *FEMS Yeast Research* 8 (7): 1103–14. doi:10.1111/j.1567-1364.2008.00421.x.
- Dale M. F. B., Griffiths D. W., Bain H., and Todd D. 1993. "Glycoalkaloid Increase in *Solanum Tuberosum* on Exposure to Light." *Annals of Applied Biology* 123: 411–18. *Annals of Applied Biology* 123 (2): 411–18. doi:10.1111/j.1744-7348.1993.tb04103.x.
- Dao, Lan, and Mendel Friedman. 1994. "Chlorophyll, Chlorogenic Acid, Glycoalkaloid, and Protease Inhibitor Content of Fresh and Green Potatoes." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42 (3). American Chemical Society: 633–39. doi:10.1021/jf00039a006.
- Daroit D.J., Aline S., Plinho F. H., Adriano B. (2008). 2008. "Purification and Characterization of an Extracellular β -Glucosidase from *Monascus Purpureus*." *J. Microbiol. Biotech.* 18 (5): 933–41.
- Dashtban, Mehdi, and Wensheng Qin. 2012. "Overexpression of an Exotic Thermotolerant β -Glucosidase in *Trichoderma Reesei* and Its Significant Increase in Cellulolytic Activity and Saccharification of Barley Straw." *Microbial Cell Factories* 11 (1). Microbial Cell Factories: 63. doi:10.1186/1475-2859-11-63.
- Davies, Anthony M. C., and Philip J. Blincow. 1984. "Glycoalkaloid Content of Potatoes and Potato Products Sold in the UK." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 35 (5): 553–57. doi:10.1002/jsfa.2740350512.
- Davies, Gideon, and Bernard Henrissat. 1995. "Structures and Mechanisms of Glycosyl Hydrolases." *Structure (London, England: 1993)* 3 (9). Elsevier: 853–59. doi:10.1016/S0969-2126(01)00220-9.
- Dewan, A, P Chattopadhyay, and P K Kulkarni. 1995. "N-Acetyltransferase Activity--a Susceptibility Factor in Human Bladder Carcinogenesis." *Indian Journal of Cancer* 32 (1): 15–19. <http://europepmc.org/abstract/med/7558106>.
- Dibucaine, M. 1996. "Inhibition of Human Plasma and Serum Butyrylcholinesterase" *Fundamental and applied toxicology* (33), 272-281.
- Dignum Mark J.W., Josef Kerlerb, and Rob Verpoorte. 2002. "Vanilla Curing under Laboratory Conditions." *Food Chemistry* 79 (2): 165–71. doi:10.1016/S0308-8146(02)00125-5.
- Dogan M., Alkan M., Onganer Y. 2000. "Adsorption of Methlene Blue from Aqueous

- Solution onto Perlite.” *Water, Air, and Soil Pollution*. 120: 229–48.
- Doğan, M., O. Arslan, and S. Doğan. 2002. “Substrate Specificity, Heat Inactivation and Inhibition of Polyphenol Oxidase from Different Aubergine Cultivars.” *International Journal of Food Science and Technology* 37 (4): 415–23. doi:10.1046/j.1365-2621.2002.00580.x.
- Due Ea, Kouadio Jp, and Kouame Lp. 2008. “Caractérisation Partielle et Distribution Des Activités Osidasiques de L’extrait Brut Enzymatique de La Blatte *Periplaneta Americana*.” *International Journal of Biological and Chemical Sciences* 2 (2): 128–38. doi:10.4314/ijbcs.v2i2.39737.
- Ekelöf J., Guamán V., Jensen E. S., and Persson P. 2014. “Inter-Row Subsoiling and Irrigation Increase Starch Potato Yield, Phosphorus Use Efficiency and Quality Parameters.” *Potato Research* 58 (1): 15–27. doi:10.1007/s11540-014-9261-5.
- Elcock A H. 1998. “The Stability of Salt Bridges at High Temperatures: Implications for Hyperthermophilic Proteins.” *Journal of Molecular Biology* 284 (2): 489–502. doi:10.1006/jmbi.1998.2159.
- Elferink M. G., Bosma T., Lolkema J. S., Gleiszner M., Driessen J., and Konings W. N. 1995. “Thermostability of Respiratory Terminal Oxidases in the Lipid Environment.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1230 (1-2): 31–37. doi:10.1016/0005-2728(95)00028-H.
- Eltayeb, Elsadig A, Sana Salem Al-sinanp, and I A Khan. 2003. “Determination of the Glycoalkaloids -Solanine and S-Chaco- Nine Levels in 18 Varieties of Potato (*Solanum Tuberosum* L .) Grown in Oman.” *Potato Research* 46: 57–66.
- FAO/WHO. 1999. “FAO/WHO.” *Summary of Evaluations Performed by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)*.
- “FAOSTAT.” 2015. Accessed August 16. <http://faostat3.fao.org/home/E>.
- Ferreira Alexandre .H.P, Marana Sandro R., Terra Walter R., Clelia Ferreira 2001. “Purification, Molecular Cloning, and Properties of a β -Glycosidase Isolated from Midgut Lumen of *Tenebrio Molitor* (Coleoptera) Larvae.” *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31 (11): 1065–76. doi:10.1016/S0965-1748(01)00054-6.
- Ferreira C, and Terra W. R. 1983. “Physical and Kinetic Properties of a Plasma-Membrane-Bound Beta-D-Glucosidase (Cellobiase) from Midgut Cells of an Insect (*Rhynchosciara Americana* Larva).” *The Biochemical Journal* 213 (1): 43–51. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1152088&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Filadelfi, Mary Ann, and Zitnak A. 1983. “A Simple TLC Standard for Identification of Potato Glycoalkaloids.” *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal* 16 (2). Elsevier: 151–53. doi:10.1016/S0315-5463(83)72076-6.
- Fox E.G.P., Bressan S.N. 2006. “Biological Aspects of *Evania Appendigaster* (L.) (Hymenoptera: Evaniidae), under Different Densities of Oothecae of *Periplaneta Americana* (L.) (Blattodea: Blattidae).” *Biol. Control*. 36: 183–88.
- Frankenberger M.A. and Tabatabai W.T. 1991. “L-Glutaminase Activity of Soils.” *Soil Biology and Biochemistry*, no. 23: 869–74.

- Friedman M, Rayburn J. R., and Bantle J. A. 1991. "Developmental Toxicology of Potato Alkaloids in the Frog Embryo Teratogenesis Assay--Xenopus (FETAX)." *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 29 (8): 537–47. doi:10.1016/0278-6915(91)90046-A.
- Friedman M., and McDonald G. M. 1997. "Potato Glycoalkaloids: Chemistry, Analysis, Safety, and Plant Physiology." *Critical Reviews in Plant Sciences* 16 (1): 55–132. doi:10.1080/713608144.
- Friedman Mendel, and McDonald Gary M. 1995. "Acid-Catalyzed Partial Hydrolysis of Carbohydrate Groups of the Potato Glycoalkaloid .alpha.-Chaconine in Alcoholic Solutions." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43 (6). American Chemical Society: 1501–6. doi:10.1021/jf00054a016.
- Galani D, Owusu A.R.K. 1997. "The Comparative Heat Stability of Bovine β -Lactoglobulin in Buffer and Complex Media." *J. Sci. Food Agric.* 74: 89–98.
- Gallifuoco A., Alfani F., Cantarella M., Spagna G., Pifferi P.G. 1999. "Immobilized β -Glucosidase for the Winemaking Industry: Study of Biocatalyst Operational Stability in Laboratory-Scale Continuous Reactors." *Process Biochemistry* 35, Issues (1–2) 179–185 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032959299000497>.
- Genta, Fernando A., Ivan Bragatto, Walter R. Terra, and Clélia Ferreira. 2009. "Purification, Characterization and Sequencing of the Major β -1,3-Glucanase from the Midgut of Tenebrio Molitor Larvae." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39 (12): 861–74. doi:10.1016/j.ibmb.2009.10.003.
- Genta, Fernando a., Walter R. Terra, and Clélia Ferreira. 2003. "Action Pattern, Specificity, Lytic Activities, and Physiological Role of Five Digestive β -Glucanases Isolated from Periplaneta Americana." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33 (11): 1085–97. doi:10.1016/S0965-1748(03)00121-8.
- Georgetti S R, Vicentini F. T. M. C., Yokoyama C. Y., Borin M. F., Spadaro A. C. C., and Fonseca M. J. V. 2009. "Enhanced in Vitro and in Vivo Antioxidant Activity and Mobilization of Free Phenolic Compounds of Soybean Flour Fermented with Different Beta-Glucosidase-Producing Fungi." *Journal of Applied Microbiology* 106 (2): 459–66. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03978.x.
- Ginzberg Idit, Muddarangappa Thippeswamy, Edna Fogelman, Ufuk Demirel, Alice M. Mweetwa, James Tokuhisa, and Richard E. Veilleux. 2012. "Induction of Potato Steroidal Glycoalkaloid Biosynthetic Pathway by Overexpression of cDNA Encoding Primary Metabolism HMG-CoA Reductase and Squalene Synthase." *Planta* 235 (6): 1341–53. doi:10.1007/s00425-011-1578-6.
- Giroux, M, and a N Dayegamiye E T R Royer. 2007. "Effet des apports d'automne et de Printemps de Fumiers et de Boues Mixtes de Papetières Sur Le Rendement , La Qualité de la Pomme de Terre et l'efficacité de l'azote." *Agrosolution* 18 (1).
- Grandcolas. 1996. "The Phylogeny of Cockroach Families: A Cladistic Appraisal of Morphoanatomical Data." *Can. J. Zool* 74: 508–27.
- Guo W., Ogawa K., Yamauchi K., Watanabe N., Usui T., Luo S., Sakata K. 1996. "Isolation and Characterization of a β -Primeverosidase Concerned with Alcoholic Aroma

- Formation in Tea Leaves.” *Biosci. Biotech. Biochem.* 6: 1810–14.
- Guo, Yu, Changqing Liu, Taofeng Lu, Dan Liu, Chunyu Bai, Xiangchen Li, Yuehui Ma, and Weijun Guan. 2014. “Generation and Analysis of a Large-Scale Expressed Sequence Tags from a Full-Length Enriched cDNA Library of Siberian Tiger (*Panthera Tigris Altaica*).” *Gene* 541 (2): 75–81. doi:10.1016/j.gene.2014.03.023.
- Gus-Mayer Sabine, Harald Brunner, Hansjörg A. W. Schneider-Poetsch, Wolfhart Rüdiger. “Avenacosidase from oat: purification, sequence analysis and biochemical characterization of a new member of the BGA family of β -glucosidases.” *Plant Molecular Biology* 26 (3): 909–21. doi:10.1007/BF00028858.
- Guzik, Joanna, Mirosław Nakonieczny, Monika Tarnawska, Paweł K. Bereś, Sławomir Drzewiecki, and Paweł Migula. 2015. “The Glycolytic Enzymes Activity in the Midgut of *Diabrotica Virgifera Virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae) Adult and Their Seasonal Changes.” *Journal of Insect Science* 15 (1). The Oxford University Press: 56. doi:10.1093/jisesa/iev036.
- Hansen Thomas, Claus Urbanke, Veli-Matti Leppänen, Adrian Goldman, Klaus Brandenburg, Günter Schäfer 1999. “The Extreme Thermostable Pyrophosphatase from *Sulfolobus Acidocaldarius*: Enzymatic and Comparative Biophysical Characterization.” *Archives of Biochemistry and Biophysics* 363 (1): 135–47. doi:10.1006/abbi.1998.1072.
- Heidel-Fischer, Hanna M., and Heiko Vogel. 2015. “Molecular Mechanisms of Insect Adaptation to Plant Secondary Compounds.” *Current Opinion in Insect Science* 8 (February): 8–14. doi:10.1016/j.cois.2015.02.004.
- Hellenäs, K E, a Nyman, P Slanina, L Lööf, and J Gabrielsson. 1992. “Determination of Potato Glycoalkaloids and Their Aglycone in Blood Serum by High-Performance Liquid Chromatography. Application to Pharmacokinetic Studies in Humans.” *Journal of Chromatography* 573 (1): 69–78.
- Henrissat B. 1991. “A Classification of Glycosyl Hydrolases Based on Amino Acid Sequence Similarities.” *The Biochemical Journal* (280) 309–16.
- Henrissat B., and Bairoch A. 1993. “New Families in the Classification of Glycosyl Hydrolases Based on Amino Acid Sequence Similarities.” *The Biochemical Journal* (293) 781–88.
- Henrissat B., and Bairoch A. 1996. “Updating the Sequence-Based Classification of Glycosyl Hydrolases.” *The Biochemical Journal* (316) 695–96.
- Henrissat B., and G Davies. 1997. “Structural and Sequence-Based Classification of Glycoside Hydrolases.” *Current Opinion in Structural Biology* 7 (5): 637–44. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9345621>.
- Henrissat B. 2000. “Glycoside Hydrolases and Glycosyltransferases. Families, Modules, and Implications for Genomics.” *Plant physiology* 124 (4): 1515–19. doi:10.1104/pp.124.4.1515.
- Hepburn, H. A., and S. Matthews. 1985. “Factors Influencing the Production of Stem Cuttings by Glasshouse-Grown Potato Plants.” *Potato Research* 28 (4): 451–60. doi:10.1007/BF02357523.

- Hopfner K.P., Eichinger A., Engh R. A., Laue F., Ankenbauer W., Huber R., and Angerer B. 1999. "Crystal Structure of a Thermostable Type B DNA Polymerase from *Thermococcus Gorgonarius*." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (7): 3600–3605. doi:10.1073/pnas.96.7.3600.
- Huang Y., Krauss G., and Cottaz S. 2005. "A Highly Acid-Stable and Thermostable Endo- β -Glucanase from the Thermoacidophilic Archaeon *Sulfolobus Solfataricus*." *Biochemical Journal*, 385 (2) 581–588; DOI: 10.1042/BJ20041388
- Hussey, G., and Stacey N. J. 1984. "Factors Affecting the Formation of In Vitro Tubers of Potato (*Solanum Tuberosum* L.)." *Annals of Botany*. 53 (4): 565–78. <http://aob.oxfordjournals.org/content/53/4/565.short>.
- Woodward J.,. 1982. "Fungal and Other Beta-D-Glucosidases Their Properties and Applications." *Enzyme Microb. Techno.* 4: 73–79.
- Queiroz J.A, Tomaz C.T, Cabral J.M.S. 2001. "Hydrophobic Interaction Chromatography of Proteins." *Journal of Biotechnology* 87: 143–59. doi:10.1016/j.chroma.2005.04.002.
- Jadhav S. J., Sharma R. P., and Salunkhe D. K. 1981. "Naturally Occurring Toxic Alkaloids in Foods." *Critical Reviews in Toxicology* 9 (1): 21–104. doi:10.3109/10408448109059562.
- Jenkins, John, Leila Lo Leggio, Gillian Harris, and Richard Pickersgill. 1995. " β -Glucosidase, β -Galactosidase, Family A Cellulases, Family F Xylanases and Two Barley Glycanases Form a Superfamily of Enzymes Wit 8-Fold β/α Architecture and with Two Conserved Glutamates near the Carboxy-Terminal Ends of β -Strands Four and Seven." *FEBS Letters* 362 (3). Elsevier: 281–85. doi:10.1016/0014-5793(95)00252-5.
- Jensen Pia H., Ole S. Jacobsen, Trine Henriksen, Bjarne W. Strobel, and Hans Christian B Hansen. 2009. "Degradation of the Potato Glycoalkaloids - α -Solanine and α -Chaconine in Groundwater." *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 82 (6): 668–72. doi:10.1007/s00128-009-9698-4.
- Hansen Patrik Raymond Jones, Birger Lindberg Moller and Peter Bordier Hoj. 1999. "The UDP-Glucose:p-Hydroxymandelonitrile-O-Glucosyltransferase That Catalyzes the Last Step in Synthesis of the Cyanogenic Glucoside Dhurrin in Sorghum Bicolor: Isolation, cloning, heterologous expression, and substrate specificity." *Journal of Biological Chemistry* 274 (50): 35483–91. doi:10.1074/jbc.274.50.35483.
- Keeler, R F, D C Baker, and W Gaffield. 1990. "Spirosolane-Containing Solanum Species and Induction of Congenital Craniofacial Malformations." *Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology* 28 (8): 873–84. doi:10.1016/0041-0101(90)90017-2.
- Keukens E. A., Truus de Vrije, Fabrie C H, Demel R. A., Jongen W. M., and Ben de Kruijff. 1992. "Dual Specificity of Sterol-Mediated Glycoalkaloid Induced Membrane Disruption." *Biochimica et Biophysica Acta* 1110 (2): 127–36. doi:10.1016/0005-2736(92)90349-Q.
- Keukens E A, Truus de Vrije, van den Boom C., Pieter de Waard, Plasman H. H., Thiel F., Chupin V., Jongen W. M., and Ben de Kruijff. 1995. "Molecular Basis of Glycoalkaloid Induced Membrane Disruption." *Biochimica et Biophysica Acta* 1240 (2): 216–28.

- doi:10.1016/0005-2736(95)00186-7.
- Knuthsen Pia, Udo Jensen, Bjorn Schmidt, and Ib Krog Larsen. 2009. "Glycoalkaloids in Potatoes: Content of Glycoalkaloids in Potatoes for Consumption." *Journal of Food Composition and Analysis* 22 (6): 577–81. doi:10.1016/j.jfca.2008.10.003.
- Kunst A, Draeger B, Ziegenhorn J. 1984. "Colorimetric Methods with Glucose Oxidase and Peroxidase. In: Bergmeyer HU, Ed. Methods of Enzymatic Analysis." *Weinheim: Verlag Chemie*. 6: 178–85.
- Kuo, Chung Io, Chi Hsein Chao and Mei Kuang Lu. 2012. "Effects of Auxins on the Production of Steroidal Alkaloids in Rapidly Proliferating Tissue and Cell Cultures of *Solanum Lyratum*." *Phytochemical Analysis* 23 (4): 400–404. doi:10.1002/pca.1371.
- Fourage L., 2000. "Caractérisation Biochimique et Structurale D'une Beta-Glycosidase de *Thermus Thermophilus* Surexprimée Chez *E. Coli*. Thèse Université Nantes 187p."
- Lachman, Jaromír, Karel Hamouz, Janette Musilová, Kateřina Hejtmánková, Zora Kotíková, Kateřina Pazderů, Jaroslava Domkářová, Vladimír Pivec, and Jiří Cimr. 2013. "Effect of Peeling and Three Cooking Methods on the Content of Selected Phytochemicals in Potato Tubers with Various Colour of Flesh." *Food Chemistry* 138 (2-3): 1189–97. doi:10.1016/j.foodchem.2012.11.114.
- Langkilde, Soren, Malene Schroder, Thomas Frank, Louise V T Shepherd, Sean Conner, Howard V. Davies, Otto Meyer, et al. 2012. "Compositional and Toxicological Analysis of a GM Potato Line with Reduced α -Solanine Content - A 90-Day Feeding Study in the Syrian Golden Hamster." *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 64 (1): 177–85. doi:10.1016/j.yrtph.2012.06.018.
- Leese J.H., Semenza G. 1973. "On the Identity between the Small Intestinal Phlorizin Hydrolase and Glycosylceramidase." *J. Biol. Chem.* 248: 8170–73.
- Levinson, H. Z. 1976. "The Defensive Role of Alkaloids in Insects and Plants." *Experientia* 32 (4): 408–11. doi:10.1007/BF01920763.
- Lineweaver H, Burk D. 1934. "The Determination of Enzyme Dissociation Constants." *J. Am. Chem. Soc.* 56: 658–66.
- Liu Xuan, Yanxiang Gao, Xiaoting Peng, Bin Yang, Honggao Xu, and Jian Zhao. 2008. "Inactivation of Peroxidase and Polyphenol Oxidase in Red Beet (*Beta Vulgaris* L.) Extract with High Pressure Carbon Dioxide." *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 9 (1): 24–31. doi:10.1016/j.ifset.2007.04.010.
- Lo Nathan, Gaku Tokuda, Hirofumi Watanabe, Harley Rose, Michael Slaytor, S Figure, Panesthia Eg, et al. 2000. "Evidence from Multiple Gene Sequences Indicates That Termites Evolved from Wood-Feeding Cockroaches." *Current Biol.* 10: 801–4.
- Lowry O, Roserbrouh NJ, Farr AL., Randall R.J. 1951. "Protein Measurement with FOLIN Phenol Reagent. J. Biochem." *J. Biochem.* 193: 265–75.
- Gautier M., Forasté J. Y. 1982. "Etude Comparée Des Relations Interindividuelles Chez Les Mâles de Deux Espèces de Blattes, *Blaberus Craniifer* Burm., et *Eublaberus Distanti* Kirby. Phénomène de Dominance et Plasticité de L'organisation Sociale." *Biol. Behav* 7: 69–87.

- Roth M. L. 2003. "Systematics and Phylogeny of Cockroaches (Dictyoptera: Blattaria). *Orient. Insec.*" 37: 1–186.
- Goris M.A. 1924. "Chimie Végétale Sur La Composition Chimique Des Fruits Verts de Vanille et Le Mode de Formation Du Parfum de Vanille." *Acad. Sci.* 179: 70–72.
- Hui Ma, Zhi-Gang Liu, Ying Bao, Pi-Xin Ran, and Nan-Shan Zhong. 2009. "Morphology and Three-Dimensional Reconstruction of the Digestive System of *Periplaneta americana*." *Journal of Medical Entomology* 46 (1). The Oxford University Press: 165–68. doi:10.1603/033.046.0120.
- Maag Daniel, Matthias Erb, Tobias G Köllner, and Jonathan Gershenzon. 2015. "Defensive Weapons and Defense Signals in Plants: Some Metabolites Serve Both Roles." *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 37 (2): 167–74. doi:10.1002/bies.201400124.
- Macedo-Ribeiro S., Darimont B., Sterner R., and Huber R. 1996. "Small Structural Changes Account for the High Thermostability of 1[4Fe-4S] Ferredoxin from the Hyperthermophilic Bacterium *Thermotoga Maritima*." *Structure (London, England: 1993)* 4 (11): 1291–1301. doi:10.1016/S0969-2126(96)00137-2.
- Machado, Rita M.D., Maria Cecília F. Toledo, and Lucila C. Garcia. 2007. "Effect of Light and Temperature on the Formation of Glycoalkaloids in Potato Tubers." *Food Control* 18 (5): 503–8. doi:10.1016/j.foodcont.2005.12.008.
- Mäder, Jens, Harshadrai Rawel, and Lothar W. Kroh. 2009. "Composition of Phenolic Compounds and Glycoalkaloids α -Solanine and α -Chaconine during Commercial Potato Processing." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (14): 6292–97. doi:10.1021/jf901066k.
- Maicas, Sergi, and José Juan Mateo. 2005. "Hydrolysis of Terpenyl Glycosides in Grape Juice and Other Fruit Juices: A Review." *Applied Microbiology and Biotechnology* 67 (3): 322–35. doi:10.1007/s00253-004-1806-0.
- Marana S.R., Terra W.R., Ferreira C. 2000. "Purification and Properties of a Beta-Glucosidase Purified from Midgut Cells of *Spodoptera Frugiperda* (Lepidoptera) Larvae." *Insec. Biochem. Mol. Biol.* 30: 1139–46.
- Marana, Sandro R., Walter R. Terra, and Clélia Ferreira. 1995. "Midgut β -D-Glucosidases from *Abracris Flavolineata* (Orthoptera: Acrididae). Physical Properties, Substrate Specificities and Function." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 25 (7): 835–43. doi:10.1016/0965-1748(95)00020-V.
- Marin E, Sanchez L., Perez M.D., Puyol P., Calvo M. 2003. "Effect of Heat Treatment on Bovine Lactoperoxidase Activity in Skim Milk: Kinetic and Thermodynamic Analysis." *J. Food Sci.* 68: 89–93.
- Mattéotti, Christel, Philippe Thonart, Frédéric Francis, Eric Haubruge, Jacqueline Destain, Catherine Brasseur, Julien Bauwens, Edwin De Pauw, Daniel Portetelle, and Micheline Vandenbol. 2011. "New Glucosidase Activities Identified by Functional Screening of a Genomic DNA Library from the Gut Microbiota of the Termite *Reticulitermes Santonensis*." *Microbiological Research* 166 (8): 629–42. doi:10.1016/j.micres.2011.01.001.

- Mazza G, and LeMaguer M. 1978. "Water Sorption Properties of Yellow Globe Onion (*Allium Cepa* L.)." *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal* 11, (4), 189–193 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0315546378732694>.
- McCarter, John D. and G. Stephen Withers. 1994. "Mechanisms of Enzymatic Glycoside Hydrolysis." *Current Opinion in Structural Biology* 4 (6): 885–92. doi:10.1016/0959-440X(94)90271-2.
- McCue, Kent F., Paul V. Allen, Louise V T Shepherd, Alison Blake, M. Malendia Maccree, David R. Rockhold, Richard G. Novy, Derek Stewart, Howard V. Davies, and William R. Belknap. 2007. "Potato Glycoesterol Rhamnosyltransferase, the Terminal Step in Triose Side-Chain Biosynthesis." *Phytochemistry* 68 (3): 327–34. doi:10.1016/j.phytochem.2006.10.025.
- McCue, Kent F., Paul V. Allen, Louise V T Shepherd, Alison Blake, Jonathan Whitworth, M. Malendia Maccree, David R. Rockhold, Derek Stewart, Howard V. Davies, and William R. Belknap. 2006. "The Primary in Vivo Steroidal Alkaloid Glucosyltransferase from Potato." *Phytochemistry* 67 (15): 1590–97. doi:10.1016/j.phytochem.2005.09.037.
- McGehee D S, Krasowski M D, Fung D L, Wilson B, Gronert G A, and Moss J. 2000. "Cholinesterase Inhibition by Potato Glycoalkaloids Slows Mivacurium Metabolism." *Anesthesiology* 93 (2): 510–19. doi:10.1097/00000542-200008000-00031.
- McMillan M, and Thompson J C. 1979. "An Outbreak of Suspected Solanine Poisoning in Schoolboys: Examinations of Criteria of Solanine Poisoning." *The Quarterly Journal of Medicine* 48 (190): 227–43. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/504549>.
- McMillan, Mary, and Thompson J. C. 1979. "An Outbreak of Suspected Solanine Poisoning in Schoolboys: Examination of criteria of solanine poisoning." *The Quarterly Journal of Medicine* 48 (190): 227–43. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/504549>.
- Mensinga Tjeert T., Adrienne J. A. M Sips, Cathy J M Rompelberg, Klaas Van Twillert, Jan Meulenbelt, Hester J. Van Den Top, and Hans P. Van Egmond. 2005. "Potato Glycoalkaloids and Adverse Effects in Humans: An Ascending Dose Study." *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 41 (1): 66–72. doi:10.1016/j.yrtph.2004.09.004.
- Michlmayr H, Schumann C, Barreira Braz da Silva N M, Kulbe K D, and del Hierro A M. 2010. "Isolation and Basic Characterization of a Beta-Glucosidase from a Strain of *Lactobacillus Brevis* Isolated from a Malolactic Starter Culture." *Journal of Applied Microbiology* 108 (2): 550–59. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04461.x.
- Mizutani, Masaharu, Hidemitsu Nakanishi, Jun-ichi Ema, Seung-Jin Ma, Etsuko Noguchi, Misa Inohara-Ochiai, Masako Fukuchi-Mizutani, Masahiro Nakao, and Kanzo Sakata. 2002. "Cloning of Beta-Primeverosidase from Tea Leaves, a Key Enzyme in Tea Aroma Formation." *Plant Physiology* 130 (4): 2164–76. doi:10.1104/pp.102.011023.
- Mkpong O E, Yan H, Chism G, and Sayre R T. 1990. "Purification, Characterization, and Localization of Linamarase in Cassava." *Plant Physiology* 93 (1): 176–81. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1062485&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Clifford M.N., Ashihara H., Crozier A. 2008. *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*.

<https://books.google.com/books?hl=fr&lr=&id=mvJmDW7CVTMC&pgis=1>.

- Morris S.C., and Lee T.H. 1984. "The Toxicity and Teratogenicity of Solanaceae Glycoalkaloids, Particularly Those of the Potato (*Solanum Tuberosum*): A Review." *Food Technology in Australia* 36: 118–24.
- Morris, D. A. 1966. "Intersprout Competition in the Potato I. Effects of Tuber Size, Sprout Number and Temperature on Sprout Growth during Storage." *European Potato Journal* 9 (2): 69–85. doi:10.1007/BF02365879.
- Moser Bernice, and James Rayburn. 2007. "Evaluation of Developmental Toxicity of Interaction between Caffeine and Pseudoephedrine Using Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus (Fetax)." *Bios* 78 (1): 1–9. doi:10.1893/0005-3155(2007)78[01:RAEODT]2.0.CO;2.
- Murniece, Irisa, Daina Karklina, Ruta Galoburda, Dace Santare, Ilze Skrabule, and Helena S. Costa. 2011. "Nutritional Composition of Freshly Harvested and Stored Latvian Potato (*Solanum Tuberosum* L.) Varieties Depending on Traditional Cooking Methods." *Journal of Food Composition and Analysis* 24 (4-5): 699–710. doi:10.1016/j.jfca.2010.09.005.
- Nada C., Nikolic Mihajlo Z., Stankovic Milorad D. cakic. 2006. "Acid and Enzymatic Hydrolysis of *Solanum Tuberosum* L. Glycoalkaloids -Comparaison." *CI And CEQ* 12 (4): 241–43. doi:10.1073/pnas.0703993104.
- Nema, Prabhat K, Nidhi Ramayya, Eric Duncan, and Keshavan Niranjan. 2008. "Potato Glycoalkaloids: Formation and Strategies for Mitigation." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88 (11): 1869–81. doi:10.1002/jsfa.3302.
- Newman, David J, and Gordon M Cragg. 2012. "Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010." *Journal of Natural Products* 75 (3): 311–35. doi:10.1021/np200906s.
- Nikolic, Nada C, and Mihajlo Z Stankovic. 2003. "Solanidine Hydrolytic Extraction and Separation from the Potato (*Solanum Tuberosum* L.) Vines by Using Solid-Liquid-Liquid Systems." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (7). American Chemical Society: 1845–49. doi:10.1021/jf020426s.
- Nikolic, Nada C., and Mihajlo Z. Stankovic. 2005. "Hydrolysis of Glycoalkaloids from *Solanum Tuberosum* L. Haulm by Enzymes Present in Plant Material and by Enzyme Preparation." *Potato Research* 48 (1-2): 25–33. doi:10.1007/BF02733679.
- Oda Yuji, Katsuichi Saito, Akiko Ohara-Takada, and Motoyuki Mori. 2002. "Hydrolysis of the Potato Glycoalkaloid Alpha-Chaconine by Filamentous Fungi." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 94 (4): 321–25.
- Ojala J. C., Stark J. C., and Kleinkopf G. E. 1990. "Influence of Irrigation and Nitrogen Management on Potato Yield and Quality." *American Potato Journal* 67 (1): 29–43. doi:10.1007/BF02986910.
- Opassiri Rodjana, Busarakum Pomthong, Takashi Akiyama, Massalin Nakphaichit, Tassanee Onkoksoong, Mariena Ketudat Cairns, and James R Ketudat Cairns. 2007. "A Stress-Induced Rice (*Oryza Sativa* L.) Beta-Glucosidase Represents a New Subfamily of

- Glycosyl Hydrolase Family 5 Containing a Fascin-like Domain.” *The Biochemical Journal* 408 (2): 241–49. doi:10.1042/BJ20070734.
- Oraby, Hesham, André Lachance, and Yves Desjardins. 2015. “A Low Nutrient Solution Temperature and the Application of Stress Treatments Increase Potato Mini-Tubers Production in an Aeroponic System.” *American Journal of Potato Research* 92 (3): 387–97. doi:10.1007/s12230-015-9444-x.
- Grandcolas P. 1991. “Les Blattes de Guyane Française: Structure Du Peuplement et Étude Écoéthologique Des Zetoborinae, Rennes: Thèse, Université de Rennes I 295p.”
- Grandcolas P. 1998. “Domestic and Non-Domestic Cockroaches: Facts versus Received Ideas.” *Rev. Fr. Allergol.* 38: 833–38.
- Grandcolas P. 1999. “The Origin of Diversity in Cockroaches: A Phylogenetic Perspective of Sociality, Reproduction, Communication, and Ecology Zaragoza.” *Boletin de La S.E.A.* 26: 397–420.
- Palmeri, Rosa, and Giovanni Spagna. 2007. “ β -Glucosidase in Cellular and Acellular Form for Winemaking Application.” *Enzyme and Microbial Technology* 40 (3): 382–89. doi:10.1016/j.enzmictec.2006.07.007.
- Panchaud, Philippe, Cyril Ollivier, Philippe Renaud, and Sarunas Zigmantas. 2004. “Radical Carboazidation: Expedient Assembly of the Core Structure of Various Alkaloid Families.” *The Journal of Organic Chemistry* 69 (8). American Chemical Society: 2755–59. doi:10.1021/jo035843y.
- Papathanasiou, Fokion, Samuel H Mitchell, and Barbara M R Harvey. 1999. “Variation in Glycoalkaloid Concentration of Potato Tubers Harvested from Mature Plants.” *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79 (1): 32–36. doi:10.1002/(SICI)1097-0010(199901)79:1<32::AID-JSFA162>3.0.CO;2-J.
- Park, Sun-Young, Eun-Ah BAE, Jong Hwan Sung, Seung-Kwon Lee, and Dong-Hyun Kim. 2001. “Purification and Characterization of Ginsenoside R b1 -Metabolizing β -Glucosidase from *Fusobacterium* K-60, a Human Intestinal Anaerobic Bacterium.” *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 65 (5). Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry: 1163–69. doi:10.1271/bbb.65.1163.
- Pelmont J. 1995. *Enzymes, Catalyseurs Du Monde Vivant*. Ed. Grenoble Sciences, Paris. 1033p
- Pentzold Stefan, Mika Zagrobelny, Nanna Bjarnholt, Juergen Kroymann, Heiko Vogel, Carl Erik Olsen, Birger Lindberg Moller, and Soren Bak. 2015. “Metabolism, Excretion and Avoidance of Cyanogenic Glucosides in Insects with Different Feeding Specialisations.” *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 66 119–28. doi:10.1016/j.ibmb.2015.10.004.
- Percival Glynn. 1999. “Light-Induced Glycoalkaloid Accumulation of Potato Tubers (*Solanum Tuberosum* L.)” *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79 (10): 1305–10. doi:10.1002/(SICI)1097-0010(19990715)79:10<1305::AID-JSFA368>3.0.CO;2-R.
- Percival Glynn C., and Lynn Baird. 2000. “Influence of Storage upon Light-Induced Chlorogenic Acid Accumulation in Potato Tubers (*Solanum Tuberosum* L.).” *Journal of*

- Agricultural and Food Chemistry* 48 (6). American Chemical Society: 2476–82. doi:10.1021/jf9909095.
- Percival Glynn and Geoffrey Dixon R. 1996. “Glycoalkaloid Concentrations in Aerial Tubers of Potato *Solanum Tuberosum* L.” *Journal of the Science of Food and Agriculture* 70 (4): 439–48. doi:10.1002/(SICI)1097-0010(199604)70:4<439::AID-JSFA519>3.3.CO;2-8.
- Percival Glynn, Geoffrey Dixon R. and Alastair Sword. 1996. “Glycoalkaloid Concentration of Potato Tubers Following Exposure to Daylight.” *Journal of the Science of Food and Agriculture* 71 (1): 59–63. doi:10.1002/(SICI)1097-0010(199605)71:1<59::AID-JSFA548>3.0.CO;2-1.
- Petersson, Erik V., Nurun Nahar, Paul Dahlin, Anders Broberg, Rikard Tröger, Paresh C. Dutta, Lisbeth Jonsson, and Folke Sitbon. 2013. “Conversion of Exogenous Cholesterol into Glycoalkaloids in Potato Shoots, Using Two Methods for Sterol Solubilisation.” *PLoS ONE* 8 (12): 1–11. doi:10.1371/journal.pone.0082955.
- Phillips B. J., Hughes J. A., Phillips J. C., Walters D. G., Anderson D., and Tahourdin C. S M. 1996. “A Study of the Toxic Hazard That Might Be Associated with the Consumption of Green Potato Tops.” *Food and Chemical Toxicology* 34 (5): 439–48. doi:10.1016/0278-6915(96)87354-6.
- Phys.org. 2013. “The Pathway to Potato Poisons.” <http://phys.org/news/2013-07-pathway-potato-poisons.html>.
- Pontoh J., and Low N.H. 2002. “Purification and Characterization of β -Glucosidase from Honey Bees (*Apis Mellifera*).” *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32, (6) 679–690. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0965174801001473>.
- Poreddy Spoorthi, Sirsha Mitra, Matthias Schöttner, Jima Chandran, Bernd Schneider, Ian T. Baldwin, Pavan Kumar, and Sagar S. Pandit. 2015. “Detoxification of Hostplant’s Chemical Defence rather than Its Anti-Predator Co-Option Drives β -Glucosidase-Mediated Lepidopteran Counteradaptation.” *Nature Communications* 6: 8525. doi:10.1038/ncomms9525.
- Tünde Pusztahelyi, Imre J. Holb and István Pócsi. 2015. “Secondary Metabolites in Fungus-Plant Interactions.” *Frontiers in Plant Science* 6: 573. doi:10.3389/fpls.2015.00573.
- Quiquampoix, H. 2000. Mechanisms of Protein Adsorption on Surfaces and Consequences for Extracellular Enzyme Activity in Soil. *Soil Biochemistry*.171p.
- Raisonnier. 2002. *Cours: Enzymologie Élémentaire, Faculté de Medecine Université Pierre et Marie CURIE, Paris VI*. 152p.
- Ramos I.B., Miranda K., Souza D.W., Machado E.A. 2006. “Calcium-Regulated Fusion of Yolk Granules during Early Embryogenesis of *Periplaneta Americana*.” *Mol. Reprod. Dev.*, 1247–54.
- Rayburn, James R., John A. Bantle, and Mendel Friedman. 1994. “Role of Carbohydrate Side Chains of Potato Glycoalkaloids in Developmental Toxicity.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42 (7). American Chemical Society: 1511–15. doi:10.1021/jf00043a022.

- Roberts, Margaret F. 2013. *Alkaloids: Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications*. 482p.
- Roddick James G., Martin Weissenberg, and Anna L. Leonard. 2001. "Membrane Disruption and Enzyme Inhibition by Naturally-Occurring and Modified Chacotriose-Containing Solanum Steroidal Glycoalkaloids." *Phytochemistry* 56 (6): 603–10. doi:10.1016/S0031-9422(00)00420-9.
- Ruan Chang Chun, Hao Zhang, Lian Xue Zhang, Zhi Liu, Guang Zhi Sun, Jun Lei, Yu Xia Qin, Yi Nan Zheng, Xiang Li, and Hong Yu Pan. 2009. "Biotransformation of Ginsenoside Rf to Rh1 by Recombinant β -Glucosidase." *Molecules* 14 (6): 2043–48. doi:10.3390/molecules14062043.
- Rytel, Elżbieta, Agnieszka Tajner-Czopek, Agnieszka Kita, Joanna Miedzianka, and Monika Bronkowska. 2015. "The Influence of Washing and Selection Processes on the Contents of Glycoalkaloid and Other Toxic Compounds during Industrial Chip Production." *International Journal of Food Science & Technology* 50 (8): 1737–42. doi:10.1111/ijfs.12840.
- Arrhenius S. 1889. "Ubre Die Reaktionsgeschwindigkeit Bei Der Inversion von Rohrzucker Durch Sauren. Zeitschrift Fur Physik." *Chimie* 4: 226–48.
- Saino, Hiromichi, Tetsuya Shimizu, Jun Hiratake, Toru Nakatsu, Hiroaki Kato, Kanzo Sakata, and Masaharu Mizutani. 2014. "Crystal Structures of β -Primeverosidase in Complex with Disaccharide Amidine Inhibitors." *The Journal of Biological Chemistry* 289 (24): 16826–34. doi:10.1074/jbc.M114.553271.
- Sanford L. L., Deahl K. L., Sinden S. L., and Ladd T. L. 1992. "Glycoalkaloid Contents in Tubers from Solanum Tuberosum Populations Selected for Potato Leafhopper Resistance." *American Potato Journal* 69 (11): 693–703. doi:10.1007/BF02853813.
- Sang Kee Kang, Keun Cho Kwang, Kun Ahn Jong, Ha Kang Seung, Ho Lee Seung, Gu Lee Hong, and Yun Jaie Choi. 2005. "Cloning, Expression, and Enzyme Characterization of Thermostable β -Glycosidase from Thermus Flavus AT-62." *Enzyme and Microbial Technology* 37 (6): 655–62. doi:10.1016/j.enzmictec.2004.07.026.
- Sant'Anna, Voltaire, Florencia Cladera-Olivera, and Adriano Brandelli. 2012. "Kinetic and Thermodynamic Study of Thermal Inactivation of the Antimicrobial Peptide P34 in Milk." *Food Chemistry* 130 (1): 84–89. doi:10.1016/j.foodchem.2011.07.001.
- Santos C.D., Terra WR. 1986. "Midgut Alpha-Glucosidase and Beta-Fructosidase from Erinnyis Ello Larvae and Imagoes. Physical and Kinetic Properties." *Insect Biochem.* 16: 819–24.
- Sarquís J. I., Coria N. A., Aguilar I. and Rivera A. 2000. "Glycoalkaloid Content in Solanum Species and Hybrids from a Breeding Program for Resistance to Late Blight (Phytophthora Infestans)." *American Journal of Potato Research* 77 (5): 295–302. doi:10.1007/BF02853950.
- Sarry J.E. 2001. "Etude Biochimique et Moléculaire de β -D-Glucoside Hydrolases de La Baie de Raisin (Vitis Vinifera L.). Thèse de Doctorat, Université de Montpellier II, France. 225p."

- Sarry J.E., and Günata Z. 2004. "Plant and Microbial Glycoside Hydrolases: Volatile Release from Glycosidic Aroma Precursors." *Food Chemistry* 87(4): 509–521. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814604000251>.
- Schieber, Andreas, and Marleny Saldaña. 2009. "Potato Peels : A Source of Nutritionally and Pharmacologically Interesting Compounds A Review." *Food* 3 (2): 23–29. [http://www.globalsciencebooks.info/JournalsSup/images/0906/FOOD_3\(SI2\)23-29o.pdf](http://www.globalsciencebooks.info/JournalsSup/images/0906/FOOD_3(SI2)23-29o.pdf).
- Shaik Noor M., Anurag Misra, Somesh Singh, Amol B. Fatangare, Suryanarayanarao Ramakumar, Shuban K. Rawal, and Bashir M. Khan. 2013. "Functional Characterization, Homology Modeling and Docking Studies of β -Glucosidase Responsible for Bioactivation of Cyanogenic Hydroxynitrile Glucosides from *Leucaena Leucocephala* (Subabul)." *Molecular Biology Reports* 40 (2): 1351–63. doi:10.1007/s11033-012-2179-6.
- sibbesen OG., Koch B., Halkier B.A., Moller B.L. 1994. "Isolation of the Heme-Thiolate Enzyme Cytochrome P-450(Tyr), Which Catalyzes the Committed Step in the Biosynthesis of the Cyanogenic Glucoside Dhurrin in *Sorghum-Bicolor* (L)." *Moench. Proc. Natl. Ac USA* 91: 9740–44.
- Sinden S. L., Sanford L. L., and Webb R. E.. 1984. "Genetic and Environmental Control of Potato Glycoalkaloids." *American Potato Journal* 61 (3): 141–56. doi:10.1007/BF02854035.
- Sinnott, Michael L. 1990. "Catalytic Mechanism of Enzymic Glycosyl Transfer." *Chemical Reviews* 90 (7). American Chemical Society: 1171–1202. doi:10.1021/cr00105a006.
- Slanina P. 1990. "Solanine (Glycoalkaloids) in Potatoes: Toxicological Evaluation." *Food and Chemical Toxicology* 28 (11): 759–61. doi:10.1016/0278-6915(90)90074-W.
- Sotelo Angela, and Beatriz Serrano. 2000. "High-Performance Liquid Chromatographic Determination of the Glycoalkaloids α -Solanine and α -Chaconine in 12 Commercial Varieties of Mexican Potato." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (6). American Chemical Society: 2472–75. doi:10.1021/jf990755t.
- Stevanato R., Vianello F., Rigo A. 1995. "Thermodynamic Analysis of the Oxidative Deamination of Polyamines by Bovine Serum Amine Oxidase." *Arch. Biochem. Biophys.* 324: 374–78.
- Sue M, Ishihara A, and Iwamura H. 2000. "Purification and Characterization of a β -Glucosidase from Rye (*Secale Cereale* L.) Seedlings." *Plant Science* 155 (1), 67–74 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168945200002041>.
- Tajner-Czopek A., Jarych-Szyszk M., and Lisińska G. 2008. "Changes in Glycoalkaloids Content of Potatoes Destined for Consumption." *Food Chemistry* 106 (2): 706–11. doi:10.1016/j.foodchem.2007.06.034.
- Tajner-Czopek A., Rytel E., Kita A., Pęksa A., and Hamouz K. 2012. "The Influence of Thermal Process of Coloured Potatoes on the Content of Glycoalkaloids in the Potato Products." *Food Chemistry* 133 (4): 1117–22. doi:10.1016/j.foodchem.2011.10.015.
- Tamaki Fábio K, André C Pimentel, Alcides B Dias, Christiane Cardoso, Alberto F Ribeiro, Clélia Ferreira, and Walter R Terra. 2014. "Physiology of Digestion and the Molecular

- Characterization of the Major Digestive Enzymes from *Periplaneta Americana*.” *Journal of Insect Physiology* 70C. Elsevier Ltd: 22–35. doi:10.1016/j.jinsphys.2014.08.007.
- Tanaka A., and Hoshino E. 2002. “Calcium-Binding Parameter of *Bacillus Amyloliquefaciens* α -Amylase Determined by Inactivation Kinetics.” *Biochem. J.* 364, 635–639
- Terra Walter R., and Clélia Ferreira. 1994. “Insect Digestive Enzymes: Properties, Compartmentalization and Function.” *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 109 (1): 1–62. doi:10.1016/0305-0491(94)90141-4.
- Tingey Ward M. 1984. “Glycoalkaloids as Pest Resistance Factors.” *American Potato Journal* 61 (3): 157–67. doi:10.1007/BF02854036.
- Uchima, Cristiane Akemi, Gaku Tokuda, Hirofumi Watanabe, Katsuhiko Kitamoto, and Manabu Arioka. 2012. “Heterologous Expression in *Pichia Pastoris* and Characterization of an Endogenous Thermostable and High-Glucose-Tolerant β -Glucosidase from the Termite *Nasutitermes Takasagoensis*.” *Applied and Environmental Microbiology* 78 (12): 4288–93. doi:10.1128/AEM.07718-11.
- Ünal M. Ümit. 2007. “Properties of Polyphenol Oxidase from Anamur Banana (*Musa Cavendishii*)” *Food Chemistry* 100 (3): 909–13. doi:10.1016/j.foodchem.2005.10.048.
- VanEtten H. D., Mansfield J. W., Bailey J. A., and Farmer E. E. 1994. “Two Classes of Plant Antibiotics: Phytoalexins versus ‘Phytoanticipins.’” *The Plant Cell* 6 (9): 1191–92. doi:10.1105/tpc.6.9.1191.
- Violet M, and Meunier J.C. 1989. “Kinetic Study of the Irreversible Thermal Denaturation of *Bacillus Licheniformis* α -Amylase.” *Biochemical Journal.* 263, 665-670 <http://www.biochemj.org/content/263/3/665.abstract>.
- Vronen Patrick J.E. 2003. “Potato Glycoalkaloids as Starting Material for the Synthesis of Steroid Hormones. Thesis 120 p.”
- Vronen Patrick J.E., Nadeshda Koval, and Aede de Groot. 2003. “The Synthesis of 16-Dehydropregnenolone Acetate (DPA) from Potato Glycoalkaloids.” *Arkivoc* 2004 (2). Michigan Publishing, University of Michigan Library: 24. doi:10.3998/ark.5550190.0005.203.
- Wall B.J., Oschman J.L., Schmidt B.A. 1975. “Morphology and Function of Malpighian Tubules and Associated Structures in the Cockroach, *Periplaneta Americana*.” *J. Morphol.* 146: 256–306.
- Wallecha Anu, and Saroj Mishra. 2003. “Purification and Characterization of Two Beta-Glucosidases from a Thermo-Tolerant Yeast *Pichia Etchellsii*.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1649 (1): 74–84. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12818193>.
- Watanabe H., Noda H, Tokuda G, and Lo N. 1998. “A Cellulase Gene of Termite Origin.” *Nature* 394 (6691): 330–31. doi:10.1038/28527.
- Weemaes, Carla A., Linda R. Ludikhuyze, Ilse Van den Broeck, and Marc E. Hendrickx. 1998. “Effect of pH on Pressure and Thermal Inactivation of Avocado Polyphenol Oxidase: A Kinetic Study.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46 (7). American Chemical Society: 2785–92. doi:10.1021/jf970902s.

- Wileyto E.P., Boush G.M., Gawin L.M. 1984. "Function of Cockroach (*Orthoptera: Blattidae*) Aggregation Behavior." *Environ. Entomo.* 13: 1557–60.
- Wink M. 1988. "Plant Breeding: Importance of Plant Secondary Metabolites for Protection against Pathogens and Herbivores." *Theoretical and Applied Genetics* 75 (2): 225–33. doi:10.1007/BF00303957.
- Withers S. G. and Aebersold R. 1995. "Approaches to Labeling and Identification of Active Site Residues in Glycosidases." *Protein Science : A Publication of the Protein Society* 4 (3): 361–72. doi:10.1002/pro.5560040302.
- Wang X.G. 1993. "Teratogenic Effect of Potato Glycoalkaloids." *Chin J Obstet Gynecol* 28: 73–75, 121–22.
- Yapi Assoi Yapi, Désiré, Dago Gnakri, Sebastien Lamine Niamke, and Lucien Patrice Kouame. 2009. "Purification and Biochemical Characterization of a Specific Beta-Glucosidase from the Digestive Fluid of Larvae of the Palm Weevil, *Rhynchophorus Palmarum*." *Journal of Insect Science (Online)* 9: 4. doi:10.1673/031.009.0401.
- Vivian L. Y. Yip, and Stephen G Withers. 2004. "Nature's Many Mechanisms for the Degradation of Oligosaccharides." *Organic & Biomolecular Chemistry* 2 (19). The Royal Society of Chemistry: 2707–13. doi:10.1039/B408880H.
- Zhao, Zongpei, Priyadharsini Ramachandran, Tae Su Kim, Zhilei Chen, Marimuthu Jeya, and Jung Kul Lee. 2013. "Characterization of an Acid-Tolerant β -1,4-Glucosidase from *Fusarium Oxysporum* and Its Potential as an Animal Feed Additive." *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (23): 10003–11. doi:10.1007/s00253-013-4767-3.

ANNEXES

Peptides issus du séquençage de "novo" de la β -glycosidase avec un score de confiance autour de 60

Scan	PEPTIDE	ALC (%)	SCAN	PEPTIDE	ALC(%)	SCAN	PEPTIDE	ALC(%)
1973	LPTFTQEELEYLR	75	1792	FSLSMGVR	69	1153	GFDSHGELNDSGR	65
1144	LLPNGHGR	75	1273	VRPSSNSCK	69	1708	VMLLMGVCK	65
2490	VDYLTSYLTGVNCK	75	1966	LPTFTKMCHEYLR	69	1576	NVTGLYDDEFER	65
1120	LTEMLK	75	2159	VDYLTSYLTEMLK	69	1195	FECYGCVDR	65
1727	FSFSSSDR	75	2107	CQVTQQLYVPGK	69	1833	FGYYYVDNCCRLTHK	65
1208	LLPNHDR	75	1526	LEELYLQR	69	2279	LDYLTSYLGTLMSR	65
1938	LLMSTVGYR	75	1640	FSFSNSDK	69	1302	KGGHITLLK	65
1006	RRGPGQTCR	74	1231	FTMCGLGK	68	1469	EWQDVYR	65
1141	TLVETGPK	74	1602	MSFSSVMK	68	1790	FGSSYYVDFDRFFGK	64
1328	EMQSDFYR	74	1295	LHTLLK	68	1638	HSVVRQK	64
1552	HPHLYDDEFER	73	2021	YVVPWTMK	68	1056	CTPPHYK	64
1827	LGSPFDDSGNPMSPYK	73	1283	LTGTTGGK	68	1821	LGSPFDDSGNPVLCYK	64
2483	CLSPVVVGFSR	73	2823	DSGLDSFLDVR	68	1681	VMLSMVGTR	64
1188	VKVGGEK	73	2196	LDYLTSYLTEMTR	68	1224	YQEDLLFQK	64
1272	GLNDQLTYCVK	73	1164	LLPYLHHK	68	1546	SFHLVDDEFER	64
2494	VDYLTSYLTEMLK	73	1082	GTNLDPK	68	1228	VHVSSPRETKK	64
2492	EGLYVVQYVPR	73	1073	SRPYK	68	1560	YHLTNDDSHR	64
1284	LKVHVMK	73	1662	MYLVVHR	67	1240	LQMOTK	64
2154	VDYLTSYLTEMLK	73	1699	FLTSLGDEDSVVK	67	1289	LRCLHLK	64
2164	PMMLTSYLTGKCK	73	2387	TLYLTCFLTELMKK	67	2382	PQCQGTLPPELMR	64
1048	QQFTTSR	72	1834	VLFTNMGPR	67	1772	FGFYVDMDDRMFGK	64
1236	CMGVDVYR	72	1268	CPGTLFLK	67	1465	YSLLVDCYCK	64
2063	YKDDLQLLKEGWVYR	72	1811	PLFGDEGDCLTLVK	67	1696	VFTNGYEDDPPNPSLGSGVCR	64
1042	PCGFFQR	72	1963	MGEMNVDGGVYLVR	67	1535	MRVTCLK	64
1097	DSDGVDVYR	72	2214	LYVVP SGVMR	67	2388	QTYSELDDVR	64
1520	MSFCVTTK	72	1112	YVDPHR	67	2482	KGNYVVDDETGLK	64
2186	MPYLTSYLTGKCK	72	1642	SFHLVDGPGSCK	67	2064	MGMYYVDFDDEPR	64
1993	GFTFTQEELEYLR	72	1784	FSFSNYR	67	1321	KLVHVMK	64
2174	LVFSSVSCNK	71	1518	ENDLLLFVVK	67	1114	ETGVKCSSK	64
1556	MVLNTEFR	71	1550	QTFTPTPGR	67	1267	PPSFYK	64
1999	FGTFTQEELEYLR	71	1045	LGKNSPCEGYTR	66	1036	EVGVTK	64

Annexes

1200	PMGVDVYR	71	1109	SDDGVDVYR	66	1012	QQFTSDK	63
1863	VLFTDFGDKLR	71	1211	TLESGPNSGVMK	66	1793	FSFSMTGK	63
1404	VYEELLR	71	1076	QLVNGSTPSK	66	2561	STGLGRVLHQCR	63
1271	TWGGEPCK	70	1434	SFSVSDK	66	1235	PTDSLVR	63
1422	YKEDQLMK	70	2287	MPYLTSYLTQCGKK	66	1285	LSLSSDK	63
1819	QCDVYSVVDVR	70	1470	VVTVLSPR	66	1453	EGSLKKCTR	63
2057	YQDDLKLLKEWQDVYR	70	1406	SFSVSDK	66	1237	QNDQLSSK	63
1582	HPHLYDDEFK	70	2507	TDGLYVVEDTGLK	66	1345	ESSGVDEFK	63
1243	TVLSPR	70	1140	QTLVHGPDPR	66	2075	MGMYYVDYDVPER	63
1988	GFTFTQEELEYLR	70	1102	VDVYR	66	1825	FGYYYVDFDDEVHNR	63
1512	VYPCLLTK	69	1060	DLGVTK	65	1720	VLYTCVNSK	63
1747	LFTNDGFR	69	1260	YQEDLQLSSK	65	1261	YKEDGYGPKK	63
1244	LSPGVDVYR	69	1631	VMSYEFFNK	65	2051	TMCSLTSYLTVLK	63
1514	VVPSLCPR	69	1982	LPTFTQNCPGHNR	65	1949	MGYLGSLMGEYRNSGHYK	63