

N° d'ordre : 823

50376
1991
266



67243

50376
1991
266

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE FLANDRES-ARTOIS

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

par

Michèle GOSSELIN-DEBEIRE

**MECANISMES D'ACTION D'ENDOXYLANASES THERMOPHILES
BACTERIENNES SUR LES XYLANES ISOLES ET INTEGRES
DANS LA PAROI VEGETALE.**

Présentée le 5 décembre 1991 devant la commission d'examen :

Président : VERBERT A., Professeur à L'Université de Lille
Rapporteurs : BOUQUELET S., Professeur à l'IUT de Biologie
JOSELEAU J.P., Professeur à l'Université de Grenoble
Examineurs : BRILLOUET J.M., Directeur de recherche de l'INRA
DEBEIRE P., Chargé de recherche de l'INRA

Ce travail a été réalisé sous la Direction de Monsieur Philippe Debeire à la station de Technologie Alimentaire de l'INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE de Villeneuve d'Ascq.

A Monsieur le Professeur A. VERBERT,

Je voudrais vous exprimer ma plus profonde reconnaissance car vous avez été le catalyseur qui m'a donné l'envie d'aborder les métiers de la recherche. En effet, j'ai toujours apprécié votre enthousiasme scientifique, notamment par la qualité de l'enseignement que vous m'avez dispensé. Je vous exprime également ma reconnaissance pour m'avoir aiguillée vers une équipe de Recherche dont les compétences m'ont été très précieuses. Vous m'avez fait l'honneur de présider le jury de cette thèse, je vous prie de croire en l'expression de ma sincère gratitude.

A Monsieur le Professeur S. BOUQUELET,

Vous m'avez fait l'honneur d'accepter de me faire profiter de votre compétence dans le domaine de l'enzymologie en jugeant ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère gratitude.

A Monsieur le Professeur J.P. JOSELEAU,

Votre haute compétence dans le domaine des polysaccharides végétaux rend très précieuse votre participation à ce jury en tant que rapporteur. Pour l'intérêt que vous témoignez à mes travaux, croyez en ma plus profonde reconnaissance.

A Monsieur J.M. BRILLOUET, Directeur de recherche de l'INRA,

Votre haute compétence dans le domaine des glucides font que je suis très honorée de votre participation à ce jury. Je vous prie de croire en l'expression de ma sincère gratitude.

A Monsieur Philippe DEBEIRE,

Tu as su me transmettre ta passion pour la recherche et le travail de qualité. Je te remercie sincèrement de la confiance que tu m'as témoignée au cours de ces dernières années.

A Michèle LOONIS

Je voudrais t'exprimer toute ma reconnaissance pour les précieux conseils et l'efficacité de ton aide que tu as apportés dans la réalisation de ce travail.

A Jean-Pierre TOUZEL

Je te remercie pour ton amitié et le soutien moral et scientifique que tu m'as apportés tout au long de cette thèse.

Je remercie tout particulièrement Bruno Brodel, Françoise Fontaine, Jean-Paul Lepoutre, Patrice Pellerin, Eric Samain pour l'ambiance chaleureuse qui a régné tout au long de ma thèse et qui a permis de nombreux échanges scientifiques.

Je remercie Madame C. Alonso et Messieurs Y. Leroy, J.C. Michalski et G. Strecker (laboratoire de Chimie Biologique, UST Lille Flandres Artois) et Monsieur J. Solo-Kwan (E.P.P.V., UST Lille Flandres Artois) pour leur aide précieuse dans la détermination des structures primaires des oligosaccharides. Mes remerciements s'adressent également à Mademoiselle P. Maes et Monsieur A. Tartar (Institut Pasteur de Lille) pour les déterminations des séquences N-terminales des xylanases.

Je remercie Jean-Pierre Tissier pour les analyses en microscopie électronique des xylanes de rafles de maïs.

A Jean-François Migdal, qui a réalisé toutes les photographies présentées dans ce mémoire et Jean Jacquemont pour leur patience et leur aide lorsque j'ai été confrontée à des problèmes technologiques.

Je remercie la Région Nord Pas-de-Calais qui en cofinancant une bourse m'a permis de réaliser ce travail.

ABBREVIATIONS

Abs	: Absorbance
Ara	: Arabinose
ATFA	: Acide trifluoroacétique
CCM	: Chromatographie sur couche mince
CMC	: Carboxyméthylcellulose
CPG	: Chromatographie en phase gazeuse
DMSO	: Diméthylsulfoxyde
DO	: Densité optique
DP	: Degré de polymérisation
DSM	: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
FAB-MS	: Fast atom bombardment - mass spectrometry
Gal	: Galactose
Glc	: Glucose
GlcA	: Acide glucuronique
G ₆ PDH	: Glucose-6-phosphate dehydrogénase
HK	: Hexokinase
HPLC	: Chromatographie liquide haute performance
KDO	: Acide 3-deoxy-mannoctulosonique
LCC	: Lignin Carbohydrate Complex
PAGE	: Polyacrylamide gel electrophoresis
PTH	: Phényl-thiohydantoïne
pI	: Point isoélectrique
Rha	: Rhamnose
RMN	: Résonance magnétique nucléaire
SAB	: Sérum albumine bovine
SDH	: Sorbitol dehydrogénase
SDS	: Sodium dodécyl sulfate
SR	: Sucres réducteurs
ST	: Sucres totaux
TCA	: Acide trichloroacétique
X ou Xyl	: Xylose
X ₂	: Xylobiose
X ₃	: Xylotriose
X ₄	: Xylotétraose

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
GENERALITES	5

CHAPITRE I

LES XYLANES ET LEURS PARTENAIRES DANS LA PAROI VEGETALE.

A - LES XYLANES ISOLES.	6
I - STRUCTURES PRIMAIRES DES XYLANES.	7
a - <u>Nature de leurs substituants.</u>	7
b - <u>Variabilité structurale des xylanes selon leurs origines végétales.</u>	7
II - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES XYLANES.	18
a - <u>Degré de polymérisation des xylanes.</u>	18
b - <u>La solubilité</u>	19
 B - LES DIFFERENTS PARTENAIRES DES XYLANES DANS LA PAROI	
VEGETALE.	20
I - LES β - GLUCANES.	20
a - <u>La cellulose.</u>	20
b - <u>Les β-(1,3)-(1,4)-glucanes.</u>	23
c - <u>La callose.</u>	24
d - <u>Les xyloglucanes</u>	24
II - LES MANNANES	25
III - LES PECTINES	26
IV - LES LIGNINES	30

V - LES INTERACTIONS LIGNINES-POLYSACCHARIDES	
PARIETAUX	34
a - <u>Les complexes covalents lignine-hémicelluloses.</u>	34
b - <u>Nature des liaisons covalentes engagées entre les lignines et les polysaccharides pariétaux.</u>	35
C - LES XYLANES <i>IN SITU</i>	35
I - ASSOCIATION COVALENTE DES XYLANES AVEC LES LIGNINES.	35
II - AUTRES INTERACTIONS COVALENTES DES XYLANES <i>IN SITU</i>	38
a - <u>Avec les pectines.</u>	38
b - <u>Les complexes de type protéoglycane.</u>	41
c - <u>Complexes xylane-glucane.</u>	43
III - ASSOCIATIONS DES XYLANES PAR DES LIAISONS NON COVALENTES.	43
a - <u>Les liaisons ioniques.</u>	43
b - <u>La liaison hydrogène.</u>	43

CHAPITRE II

LES XYLANASES

A - INTRODUCTION.	45
B - LE COMPLEXE XYLANOLYTIQUE	46
I - LES EXOGLYCOSIDASES.	46
a - <u>Les β-xylosidases.</u>	46
b - <u>Les α-arabinofuranosidases [E.C. 3.2.1.55]</u>	48

c - <u>Les α-glucuronidases.</u>	49
II - LES ESTERASES.	50
a - <u>Les acétyl estérases [EC 3.1.1.6.]</u>	50
b - <u>Les feruloyl estérases.</u>	51
III - LES ENDO-B-1,4-XYLANASES.	51
a - <u>Classification.</u>	52
b - <u>Modes d'actions</u>	59
c - <u>Multiplicité.</u>	65
IV - LES FERAXANASES	67
C - ROLES BIOLOGIQUES	68
I - ROLE DES XYLANASES DANS LA BIODEGRADATION	68
II - ROLE DES XYLANASES CHEZ LES HERBIVORES RUMINANTS ...	68
III - DEGRADATION DU XYLANE PAR LES AGENTS	
PHYTOPATHOGENES	70
IV - ROLE PHYSIOLOGIQUE DES XYLANASES AU NIVEAU DU	
METABOLISME DES POLYSACCHARIDES DE RESERVE	
DE LA GRAINE EN GERMINATION	70
V - AUTRES ORIGINES DES XYLANASES.	71
D - APPLICATIONS BIOTECHNOLOGIQUES	71
I - POSITIONNEMENT DU PROBLEME.	72
a - <u>Fabrication des pâtes chimiques et blanchiment</u>	72
II - LE BIOTRAITEMENT DES PATES A PAPIER: LE BLANCHIMENT	
ENZYMATIQUE.	73
a - <u>Utilisation des lignines-peroxydases.</u>	73

b - <u>Utilisation des xylanases.</u>	73
c - <u>Production de xylanases dépourvues d'activité cellulasique.</u>	75

TRAVAUX PERSONNELS

MATERIELS ET METHODES	76
------------------------------------	----

A - PRODUCTION DES XYLANASES.	77
--	----

I - MICROORGANISMES UTILISES	77
------------------------------------	----

II - PRODUCTION DES XYLANASES.	77
-------------------------------------	----

a - <u>Conditions de culture de <i>Clostridium thermolacticum</i></u>	77
---	----

b - <u>Conditions de culture de <i>Bacillus</i> XE et du mutant D3.</u>	78
---	----

c - <u>Préparation des extraits acellulaires.</u>	78
---	----

B- PURIFICATION DES ENDOXYLANASES	78
--	----

I - METHODES ANALYTIQUES	78
--------------------------------	----

a - <u>Mesures des activités enzymatiques.</u>	78
--	----

b - <u>Dosage des protéines.</u>	80
--	----

c - <u>Electrophorèse en milieu non dénaturant.</u>	80
---	----

d - <u>Electrophorèse en milieu dénaturant.</u>	80
---	----

e - <u>Techniques de zymogrammes.</u>	81
---	----

f - <u>Isoélectrofocalisation et courbe de titration.</u>	81
---	----

g - <u>Détermination de la composition en acides-aminés des xylanases.</u>	82
--	----

h - <u>Détermination de la séquence N-terminale des xylanases.</u>	82
--	----

i - <u>Techniques immunologiques.</u>	82
---	----

II - PURIFICATIONS DES ENDOXYLANASES DE <i>CLOSTRIDIUM</i> <i>THERMOLACTICUM</i> PAR DES METHODES CHROMATOGRAPHIQUES ET ELECTROPHORETIQUES.	82
a - <u>Préparation d'un extrait enrichi en xylanases par</u> <u>chromatographie d'échange d'ions.</u>	83
b - <u>Chromatographie d'interactions hydrophobes.</u>	83
c - <u>Chromatographie de gel filtration</u>	83
d - <u>Electrophorèse préparative.</u>	84
III - PURIFICATION DE L'ENDOXYLANASE DE <i>BACILLUS</i> XE et de <i>BACILLUS</i> D3.	84
a - <u>Chromatographie sur Sépharose-O "fast-flow".</u>	84
b - <u>Chromatographie sur phényl-Sépharose.</u>	84
C - LES SUBSTRATS.	84
I - LES SUBSTRATS UTILISES.	84
a - <u>Le xylane de mélèze.</u>	84
b - <u>Le xylane de bouleau.</u>	85
c - <u>Le xylane d'avoine.</u>	85
d - <u>Les rafles de maïs.</u>	86
II - METHODES ANALYTIQUES UTILISEES POUR L'ETUDE DES SUBSTRATS ET DE LEURS PRODUITS D'HYDROLYSE.	87
a - <u>Dosage des sucres réducteurs.</u>	87
b - <u>Dosage des sucres totaux.</u>	87
c - <u>Dosage des acides uroniques.</u>	87
d - <u>Dosage du glucose libre par couplage enzymatique.</u>	88
e - <u>Détermination du degré de polymérisation des chaînes de xylane.</u>	88

f - <u>Détermination de la composition en oses neutres par chromatographie en phase gazeuse.</u>	89
D - ETUDES DES CINETIQUES D'HYDROLYSE DES XYLANES PAR LES XYLANASES PURIFIEES.	92
I - ETUDE DES CINETIQUES EN PHASE HOMOGENE: HYDROLYSE DU XYLANE DE MELEZE.	92
II - CINETIQUE EN PHASE HETEROGENE SUR RAFLES DE MAIS.	93
E - TRANSPOSITION A L'ECHELLE DU PILOTE DE L'EXTRACTION DES XYLANES DE RAFLES DE MAIS ET DE LEUR HYDROLYSE ENZYMATIQUE.	93
I - EXTRACTION DES XYLANES DE RAFLES DE MAIS A L'ECHELLE DU PILOTE.	93
a - <u>Extraction.</u>	93
b - <u>Caractérisation du xylane de rafles de maïs extrait à l'échelle du pilote.</u>	93
c - <u>Caractérisation d'un composé micromoléculaire associé au xylane de la fraction soluble.</u>	94
II - HYDROLYSE ENZYMATIQUE EN BATCH A L'ECHELLE DU PILOTE.	95
III - EXTRACTION, SEPARATION, ET CARACTERISATION DES XYLO-OLIGOSACCHARIDES.....	96
a - <u>Extraction.</u>	96
b - <u>Séparation et caractérisation des oligosaccharides.</u>	96

RESULTATS	98
------------------------	-----------

CHAPITRE I

PURIFICATION ET PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES DES ENDOXYLANASES DE *CLOSTRIDIUM THERMOLACTICUM* ET DE *BACILLUS XE*

A - PREPURIFICATIONS ET PURIFICATIONS DES ENDOXYLANASES PRODUITES EN CONTINU PAR <i>CLOSTRIDIUM THERMOLACTICUM</i>.	99
I - PREPURIFICATION DES ENDOXYLANASES DE <i>CLOSTRIDIUM THERMOLACTICUM</i>.	99
II - PURIFICATION DES XYLANASES DE <i>CLOSTRIDIUM THERMOLACTICUM</i>.	101
a - <u>Chromatographie d'interactions hydrophobes</u>.	101
b - <u>Chromatographies de gel-filtration</u>	103
c - <u>Purification des xylanases par électrophorèses préparatives</u>.	109
III - ETUDE DES PROPRIETES DES ENDOXYLANASES DE <i>CLOSTRIDIUM THERMOLACTICUM</i>.	110
a - <u>Masse moléculaire et pHi</u>.	112
b - <u>Température et pH optimum, stabilité vis à vis du pH et de la température</u>	112
c - <u>Km et Vm</u>.	112
d - <u>Composition en acides-aminés</u>.	113
e - <u>Identité des séquences N-terminales des 3 xylanases</u>.	113

f - <u>Identité antigénique des trois xylanases.</u>	113
B - PURIFICATION ET PROPRIETES DE L'ENDOXYLANASE DU	
BACILLUS XE ET DU MUTANT D₃	115
I - PURIFICATION DE L'ENDOXYLANASE EXCRETEE PAR LE	
BACILLUS XE.	115
II - PURIFICATION DE L'ENDOXYLANASE EXCRETEE PAR LE	
MUTANT D ₃	115
III - ETUDES DES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES ET	
CATALYTIQUES DE L'ENDOXYLANASE DE BACILLUS XE.	117
a - <u>Masse moléculaire et pHi.</u>	117
b - <u>Propriétés catalytiques.</u>	117
IV - DISCUSSION.	121

CHAPITRE II

ETUDES DES SUBSTRATS

A - ETUDES DES RAFLES DE MAIS ET DE SES XYLANES.	122
I - INTRODUCTION	122
II - ANALYSES DES SUBSTRATS DE LA REACTION ENZYMATIQUE.	122
a - <u>Caractérisation des rafles de maïs.</u>	122
b - <u>Extraction et analyses des xylanes de rafles de maïs.</u>	123
c - <u>Caractérisation d'un composé micromoléculaire associé au xylane.</u>	126

CHAPITRE III
PRODUCTION DE XYLO-OLIGOSACCHARIDES A L'ECHELLE DU
PILOTE PAR HYDROLYSE ENZYMATIQUE DE XYLANES DE RAFLES DE
MAIS

A - INTRODUCTION	132
B - PREPURIFICATION DES XYLANASES <i>CLOSTRIDIUM</i> <i>THERMOLACTICUM</i>.	133
C - PROPRIETES DE LA FRACTION PREPURIFIEE.	133
D - PRODUCTION D'OLIGOSACCHARIDES A PARTIR DE XYLANE DE RAFLES DE MAIS	135
E - PREPARATION ET SEPARATION DES OLIGOSACCHARIDES.	135
I - PREPARATION DES XYLO-OLIGOSACCHARIDES.	135
II - ANALYSE DES OLIGOSACCHARIDES NEUTRES ET ACIDES.	136
III - PURIFICATION SUR COLONNE DE DOWEX AG 50W-X4 ET CARACTERISATION DES OLIGOSACCHARIDES.	138
IV - PURIFICATION DES ARABINO-XYLO-OLIGOSACCHARIDES PRESENTS DANS DES FAMILLES D'OLIGOSACCHARIDES DE DP DEFINIS.	138
a - <u>Chromatographies préparatives sur papier</u>.	141
b - <u>Analyse des différentes fractions oligosaccharidiques</u>.	141

c - <u>Discussion</u>	141
F - DISCUSSION.	143

CHAPITRE IV

ETUDES DES MODES D'ACTION DES XYLANASES DE *CLOSTRIDIUM THERMOLACTICUM* ET DE *BACILLUS XE*: NOTION D'ISOXYLANASES.

A - ETUDE DE L'HYDROLYSE DE GLUCURONOXYLANES PAR LES XYLANASES DE 65 ET 55 kDA.	145
I - HYDROLYSE DU XYLANE DE MELEZE.	145
II - DETERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DES XYL _n GlcA.	145
B - ETUDE DE L'HYDROLYSE DES ARABINO-GLUCURONOXYLANES	149
I - HYDROLYSE DU XYLANE D'AVOINE.	149
C - DISCUSSION	152
D - ETUDE DES XYLANASES EN CATALYSE HETEROGENE.	154
I - INTRODUCTION	154
II - ETUDE DES CINETIQUES D'HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES XYLANES INTEGRES PAR LA PREPARATION ENZYMATIQUE PREPURIFIEE.	156
a - <u>Conditions opératoires</u>	157

b - <u>Influence de la concentration enzymatique sur les cinétiques d'hydrolyse.</u>	157
c - <u>Détermination de l'adsorption des xylanases.</u>	160
d - <u>Analyse des xylo-oligosaccharides.</u>	165
III - ETUDE COMPARATIVE DES CINETIQUES D'HYDROLYSE DE XYLANES INTEGRES, REALISEES EN PRESENCE DE FRACTIONS ENZYMATIQUES PURIFIEES.	166
a - <u>Definition des conditions opératoires.</u>	166
b - <u>Comparaison de l'hydrolyse des xylanes intégrés des rafles de maïs et des pâtes à papier par la préparation enzymatique (39 + 55 + 65 kDa) non purifiée et par la xylanase de 39 kDa purifiée.</u>	169
c - <u>Hydrolyse des xylanes intégrés des rafles de maïs par les xylanases de masses moléculaires de 65, 55, et 39 kDa purifiées jusqu'à homogénéité.</u>	170
d - <u>Hydrolyse des xylanes intégrés de rafles de maïs par la xylanase de <i>Bacillus</i> de 22 kDa.</u>	177
 CONCLUSIONS GENERALES	180
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	184
 BREVETS CONCERNANT LA PRODUCTION ET L'UTILISATION DE XYLO-OLIGOSACCHARIDES.	

INTRODUCTION

Les xylanes sont des polymères de D-xylose liés par des liaisons β -1,4, substitués le plus souvent, par des résidus d'acide D-glucuronique (et de son dérivé 4-O-méthyl éther) et par des résidus de L-arabinose. Ils peuvent également être substitués par les acides acétique, *p*-coumarique et férulique. Le degré de substitution de la chaîne de xylane ainsi que la nature des substituants dépend de l'origine végétale du xylane. Ces polysaccharides sont intégrés dans les parois végétales et forment en association avec la lignine, la cellulose, et les autres hémicelluloses, le complexe lignocellulosique. Les xylanes sont dégradés dans la nature par la combinaison d'endoenzymes, les endo- β -1,4-xylanases et d'exoglycosidases comme les β -xylosidases, les α -arabinosidases et les α -glucuronidases, produites par une très grande variété de champignons, de levures et de bactéries. D'autres enzymes comme les acétyl-estérases et plus récemment les feraxanases, joueraient un rôle primordial dans la dégradation des xylanes intégrés dans la paroi végétale.

Les xylanes sont les composants majeurs de la paroi végétale, et les mécanismes de leur hydrolyse par les xylanases revêt une importance capitale pour les déterminations de la structure primaire de xylanes isolés ou de l'organisation de la paroi végétale. D'autre part, il existe une multiplicité d'endo- β -1,4-xylanases possédant des structures et des propriétés physico-chimiques différentes. Cette hétérogénéité, mal comprise actuellement, peut correspondre à des fonctions spécifiques des xylanases en fonction des diversités structurales des xylanes intégrés dans la paroi végétale.

Ce mémoire rapporte l'essentiel des travaux que nous avons réalisés à la Station de Technologie Alimentaire de l'INRA de Villeneuve d'Ascq, sur l'étude des mécanismes d'action des xylanases thermophiles bactériennes. En particulier, notre recherche visait à mieux comprendre les mécanismes d'hydrolyse de xylanes *in situ* dans la paroi végétale par les xylanases provenant d'une même souche ou de souches différentes.

Par ailleurs, nous décrivons également les travaux que nous avons réalisés et qui s'intègrent dans le programme de recherche mené dans notre laboratoire visant à la conversion enzymatique de xylanes de la biomasse en produits utilisables en agro-alimentaire (xylo-oligosaccharides, monosaccharides) par dépolymérisation enzymatique des xylanes de la biomasse.

Avant de décrire les résultats de nos recherches, nous rappellerons l'état actuel de nos connaissances sur les structures des xylanes et sur leur intégration dans les parois végétales ainsi que sur les enzymes responsables de leur dégradation.

Nos travaux ont fait l'objet:

I. Du brevet suivant:

Xylanase, souche de *Bacillus* productrices de xylanase et leurs utilisations.

Inventeur: E. SAMAIN, P. DEBEIRE, M. DEBEIRE-GOSSELIN et J.P. TOUZEL

Brevet N° 91 01 91, dépôt: 1 Février 1991.

II. Des publications suivantes:

P. PELLERIN, M. GOSSELIN, J.P. LEPOUTRE, E. SAMAIN and P. DEBEIRE (1991)

Enzymic production of oligosaccharides from corncob xylan.

Enzyme Microb. Technol., 13, 617-621.

M. DEBEIRE-GOSSELIN, J.P. TOUZEL and P. DEBEIRE,

Isoxylanases from the thermophile *Clostridium thermolacticum*.

Sous presse dans: *Proceedings, International Symposium on Xylans and Xylanases*, édité par J. Visser, Elsevier, 1992. (ISBN 0444894772).

M. DEBEIRE-GOSSELIN, M. LOONIS, E. SAMAIN, and P. DEBEIRE,

Purification and properties of a 22 kDa endoxylanase excreted by a new strain of thermophilic *Bacillus*.

Sous presse dans: *Proceedings, International Symposium on Xylans and Xylanases*, édité par J. Visser, Elsevier, 1992. (ISBN 0444894772).

M. DEBEIRE-GOSSELIN and P. DEBEIRE.

Bioconversion of lignocellulosic materials by isoxylanases from *Clostridium thermolacticum*.

Soumis pour publication à **Biochem. Biophys. Res. Comm.**

Publication rattachée à notre travail mais ne faisant pas partie de cette thèse:

A. BAZUS, L. RIGAL, T. FONTAINE, B. FOURNET, M. GOSSELIN and P. DEBEIRE, (1992)

Enzymatic studies of the distribution pattern of 4-O-methyl-glucuronic acid residues in glucuronoxylan from sunflowers hulls.

Biosci. Biotech. Biochem., 56 (3), 508-509.

III. Des communications suivantes:

M. DEBEIRE-GOSSELIN, J.P. TOUZEL and P. DEBEIRE,

Isoxylanases from the thermophilic *Clostridium thermolacticum*.

M. DEBEIRE-GOSSELIN, M. LOONIS, E. SAMAIN, and P. DEBEIRE,

Purification and properties of an 22 kDa endoxylanase excreted by a new strain of thermophilic *Bacillus*.

International Symposium on xylan and xylanases, Wageningen, (Décembre 91)

GENERALITES

CHAPITRE I

LES XYLANES ET LEURS PARTENAIRES DANS LA PAROI VEGETALE.

Comme la cellulose, les xylanes sont très répandus dans la nature. On les trouve en proportion variable dans tous les tissus lignifiés des plantes. Les xylanes font partie des hémicelluloses et ont été caractérisés sous forme isolée, ou *in situ* en association avec les autres composants lignocellulosiques de la paroi végétale. La paroi végétale, le plus grand réservoir de carbone fixé dans la nature, est constituée de cellulose (homopolymère de résidus d'anhydroglucose liés en β -1,4), d'hémicelluloses, de pectines (polymères d'acides uroniques) et de lignines (polymères de nature polyphénolique).

Les hémicelluloses sont des homo- ou hétéropolymères formés par l'enchaînement linéaire ou ramifié d'hexoses, de pentoses, d'acides hexuroniques et de désoxyhexoses. La chaîne principale comporte généralement un ou deux types de monosaccharides et selon la nature du squelette, on distingue cinq groupes majeurs d'hémicelluloses dont les principaux sont représentés par les xylanes et les mannanes.

A - LES XYLANES ISOLEES.

La structure des xylanes a surtout été étudiée à partir de préparations de xylanes préalablement isolées du matériel lignocellulosique.

Tous les xylanes issus des parois végétales ont en commun un polymère linéaire constitué de résidus de D-xylopyranose liés en β -1,4. L'homoxylane constitué exclusivement de résidus xylosyl a été isolé de l'alfa et des feuilles de tabac. On le retrouve rarement dans la nature, les xylanes étant le plus souvent substitués. Il existe également des xylanes constitués de résidus de D-xylopyranose liés en β -1,3. La seule exception est le xylane de *Rhodimentia palmata*, dont la structure est quelque peu différente. En plus des liaisons entre le C-1 et le C-4, existent des liaisons entre le C-1 et le C-3 des résidus de xylose de la chaîne principale formée de 17 unités.

La nature, la distribution et la proportion relative des substituants du xylane varie en fonction de l'origine végétale et également en fonction de l'origine cytologique en raison de la multiplicité des types cellulaires en présence dans une même plante. Mais la variabilité structurale des xylanes ou la perte de cette dernière peut également être le résultat des méthodes qui ont conduit à leurs isollements (Joseleau, 1980).

I - STRUCTURES PRIMAIRES DES XYLANES.

a - Nature de leurs substituants. (voir revue générale de Joseleau, 1980)

Les β -1,4 xylanes sont le plus souvent substitués. Les résidus de β -D-xylopyranose de la chaîne principale ne présentent le plus fréquemment que des substituants simples, liés:

- sur leurs O-2 ou leurs O-3 par un résidu d' α -L-arabinofuranose (dans de très rares cas par une unité L-arabinopyranose), qui définit les arabinoxylanes.

- sur leurs O-2 par une unité d'acide α -D-glucuronique, (ou son ether méthylique, l'acide 4-O-méthylglucuronique) qui définit les glucuronoxylanes.

Les xylanes substitués à la fois par des résidus d'arabinose et d'acide glucuronique sont appelés arabino-glucuronoxylanes.

Certains xylanes natifs *in situ* portent des groupements acétyl substituant de façon irrégulière les hydroxyl des carbones 2 et 3 des résidus D-xylosyl. Les xylanes isolés sont déacétylés en raison des conditions d'extraction, ces liaisons étant très labiles en milieu alcalin, et cette caractéristique structurale est donc perdue pour la majeure partie des xylanes isolés.

b - Variabilité structurale des xylanes selon leurs origines végétales.

Les xylanes représentent 30 p.100 du matériel pariétal des plantes annuelles, 20 à 25 % des bois de feuillus et 7 à 12 % des bois de conifères (Towle and Whistler, 1973).

1 - Les xylanes des bois de feuillus et de conifères.

Il existe 2 classes distinctes de bois auxquelles on attribue improprement les termes "softwood" (bois tendre) et "hardwood" (bois dur). Cette terminologie d'origine américaine présente dans la littérature, est impropre puisque les "softwood" correspondent en réalité aux bois de conifères (Gymnospermes) et les "hardwood" correspondent aux bois de feuillus (Angiospermes).

Le groupe des conifères est représenté par approximativement 40 genres avec 600 espèces. On les retrouve essentiellement dans les régions tempérées du Nord, bien qu'il existe quelques représentants dans les régions tropicales. Il existe par contre plusieurs milliers de genres de "hardwood" représentés par quelques 100.000 espèces. Le bois des Angiospermes (zones tempérées), contient moins de lignine et de glucomannanes, et plus de xylane que le bois des Gymnospermes. Par contre, le bois des Angiospermes tropicaux contient cependant souvent autant de lignine et un faible taux de xylane, semblable aux teneurs rencontrées dans les bois de conifères (Wise et Rittenhouse, 1951).

a - Les principales caractéristiques structurales des xylanes de bois.

En règle générale, les bois de conifères, contiennent peu de xylanes et ces derniers sont essentiellement des arabino-4-O-méthyl-glucuronoxylanes. Ils diffèrent des xylanes des bois de feuillus par l'absence de groupements acétyl substituant les unités de xylose sur les C-2 et C-3 et par la présence de motifs d'arabinofuranose liés en α -1,3 à la chaîne principale (voir Fig. 1, p. 10).

La structure typique de tous les xylanes de bois de feuillus consiste en un squelette de résidus D-xylopyranosyl liés en β -1,4 auxquels sont rattachés des résidus d'acide α -4-O-méthyl-D-glucuronique. Les premières recherches permettant d'établir la structure complète d'un xylane de bois, ont été réalisées sur le hêtre d'Europe par Aspinall *et al.*, 1954. Ils ont montré que le 4-O-méthylglucuronoxylane était constitué d'une chaîne linéaire composée au moins de 70 résidus de D-xylopyranose liés en β -1,4 portant toutes les 10 unités, 1 résidu terminal d'acide 4-O-méthyl- α -D-glucuronique attaché sur le O-2 du xylose.

Les études structurales réalisées ultérieurement sur des xylanes d'espèces différentes d'Angiospermes provenant de zones tempérées, ont montré clairement que

le bois de ces arbres contenait un O-acetyl-(4-O-méthylglucurono)-xylane constituant l'hémicellulose caractéristique de ce bois (Timell *et al.*, 1964).

En règle générale, les proportions relatives entre les unités monosaccharidiques des xylanes de résineux sont 8: 1,6: 1 (xylose: l'acide 4-O-méthyl-glcA et l'arabinose) (Zinbo et Timell, 1967). Les rapports molaires moyens du xylose, de l'acide 4-O-méthyl-GlcA et de l'acide acétique dans les xylanes de feuillus sont 10: 1: 7 (Bouveng, 1961).

b - Les glucuronoxylanes.

L'acide glucuronique (ou son dérivé 4-O-CH₃) est très répandu dans la nature. Il représente 15 à 20 % des xylanes de bois de conifères et 8 à 15 % des xylanes de bois de feuillus (Aspinall et Kay, 1958). Comparativement aux xylo-oligosaccharides neutres, les acides aldobiuroniques (GlcA α -1,2 Xyl) sont caractérisés par leur grande stabilité vis à vis de l'hydrolyse acide et ont pu être isolés dès 1959, par hydrolyse acide (Whistler et Richards, 1959). La plupart des xylanes de feuillus renferment un acide glucuronique pour 10 résidus xylosyl. Cependant des études ultérieures réalisées sur le bouleau gris (*Betula populifolia*) et le caroubier noir (*Robinia pseudoacacia*) (Timell, 1964) indiquaient la présence pour ces espèces d'un xylane comportant une proportion de groupements acides inférieure à la normale, avec en moyenne 14 résidus xylose pour un résidu d'acide glucuronique. Les xylanes de bois de conifères renferment en moyenne un acide glucuronique pour 6 résidus xylosyl.

c - Les arabinoxylanes.

La substitution des xylanes de bois de conifères, qui sont également substitués par des restes d'acide 4-O-méthyl-D-glucuronique (12 à 20 % environ), par le motif d' α -L-arabinofuranose varie entre 5 et 10 % (Monties, 1980) et se situe le plus fréquemment sur le C-3 du xylose plutôt que sur le C-2 (Wong *et al.*, 1988). La détermination de ces liaisons a été rendue difficile en raison de la fragilité de ces liaisons vis à vis de l'hydrolyse acide. Les 4-O-méthyl-glucuronoxylanes de bois de feuillus sont apparemment dépourvus d'arabinose (Timell, 1964). De très faibles

proportions, en général inférieures à 0,5 p.100 sont présentes dans tous les bois de feuillus mais dérivent probablement d'autres polysaccharides comme les substances pectiques ou les arabinogalactanes.

d - Les xylandes acétylés.

Les 4-O-méthyl-glucuronoxylanes des bois de feuillus contiennent entre 8 et 17 % de groupements O-acétyl, correspondant en moyenne à 3,5-7 groupements ester pour 10 résidus xylosyl (Aspinall, 1970).

Certaines conditions permettent d'extraire le xylane sous sa forme native c'est à dire sous la forme de O-acétyl-(4-O-méthylglucurono)xylane, et notamment en évitant la migration des groupements O-acétyl vers les groupements hydroxyl adjacents non substitués (Joseleau, 1980). Dans ces conditions, on a montré que le point de branchement du groupement acétyl était localisé sur le C-2 et le C-3 du xylose (le plus souvent sur ce dernier), et une double acétylation du D-xylose (sur le C-2 et le C-3) a également été mise en évidence (Bouveng, 1961). D'autre part, le xylane de bois de bouleau contient plus d'une mole d'acétyl pour 2 moles de D-xylose (Bouveng, 1961), qui confère à ce xylane une meilleure solubilité dans l'eau.

e - La distribution des substituants.

L'état physique des hémicelluloses dans la paroi cellulaire ainsi que leur résistance à la dégradation enzymatique dépend étroitement de la position et de la distribution de ces substituants (Joseleau, 1980). La distribution des groupements 4-O-méthyl-D-glucuronique le long des macromolécules de xylane n'est pas bien connue. Sur la base de la structure des glucurono-xylo-oligosaccharides produits par hydrolyse enzymatique du xylane de bouleau, Timell, (1964), a établi que les chaînes latérales ne sont pas distribuées en bloc (Fig. 2, a, p. 10). Les acides uroniques apparaissent soit à intervalles régulier, soit sont répartis au hasard le long de la macromolécule de xylane (Fig. 2, b et c, p. 10).

Comtat et Joseleau, (1981), ont établi que la distribution des substituants arabinosyl et glucuronosyl d'un arabino-glucuronoxylane de Sequoia apparaissait de

manière irrégulière le long de la macromolécule de xylane. De plus, dans certaines régions, ces substituants se situaient sur des résidus xylosyl adjacents pour former des "blocs".

2 - Les xylanes des Graminées

Classiquement on divise le groupe des Angiospermes en deux classes : les monocotylédones et les dicotylédones. Ces deux classes représentent plutôt des types d'organisation que des unités systématiques naturelles et les monocotylédones représenteraient les formes les plus évoluées de certaines lignées de dicotylédones. Les monocotylédones au port rarement arborescent sont représentées essentiellement par les Graminées c'est à dire les céréales et les plantes herbacées. Les 7500 espèces connues appartenant à la famille des Graminées couvrent 1/5 de la surface terrestre. Les xylanes ont été isolés des tissus endospermiques et non endospermiques d'un grand nombre de plantes herbacées économiquement intéressantes. Les xylanes de froment ont été étudiés indépendamment par plusieurs groupes en Europe et d'Amérique du Nord et les caractéristiques structurales des xylanes de maïs sont intensément étudiés aux USA. Néanmoins les xylanes des autres plantes herbacées ont été moins étudiées mais en général présentaient des caractéristiques structurales similaires aux xylanes de froment.

a - Les xylanes endospermiques et non endospermiques des graminées.

On regroupe sous le terme "hémicellulose non endospermique", les hémicelluloses constitutives des tissus et organes de l'appareil végétatif de la plante (tels la tige, les feuilles, les rafles, les coques) à l'exception des tissus racinaires. Les hémicelluloses associées aux substances de réserve des graines de céréales sont appelées hémicelluloses endospermiques et excluent par conséquent les enveloppes protectrices des graines (Wilkie, 1979).

Les xylanes de céréales et des plantes herbacées sont des hétéroxylanes et présentent communément des unités de L-arabinose liées en général aux résidus de D-xylose de la chaîne principale en O-3, mais aussi dans de nombreux cas des unités d'acide D-glucuronique et/ou d'acide 4-O-méthyl-D-glucuronique présents en plus faibles quantités liés en O-2 au D-xylose de la chaîne principale (Aspinall, 1959).

Comparativement aux xylanes de bois, qui sont des polymères linéaires peu substitués, contenant uniquement des chaînes latérales de nature monosaccharidique, les xylanes de Graminées, sont hautement substitués (Wilkie, 1979):

- soit par des unités de résidus de L-arabinofuranosyl le plus fréquemment dans le cas des xylanes endospermiques des graines de certaines monocotylédones
- soit par des chaînes latérales de nature oligosaccharidique dans le cas des xylanes non endospermiques.

b - *Les principales caractéristiques structurales des chaînes latérales des xylanes endospermiques et non endospermiques des Graminées: (voir Tableau I, p. 14).*

- Les xylanes endospermiques

Les xylanes des graines de certaines monocotylédones sont proches de véritables arabinoxylanes en ce qu'elles ne sont substituées que par des restes de L-arabinofuranose dont la proportion par rapport au xylose varie fortement d'une espèce à l'autre. La plupart des résidus xylosyl de la chaîne principale des xylanes endospermiques sont substitués en O-3 ou doublement substitués en O-2 et en O-3 par les groupements L-arabinosyl (la structure générale de ces arabinoxylanes est représentée dans la Fig. 3, p. 16). On n'a pas de preuves similaires d'une double substitution des xylanes non endospermiques.

Les polysaccharides majeurs constitutifs des parois cellulaires de l'endosperme des graines de froment sont représentés par 2 types structuraux: les β -glucanes linéaires comportant des liaisons (1 \rightarrow 3) et (1 \rightarrow 4) essentiellement dans l'orge et l'avoine et les arabinoxylanes prédominants qui représentent 2-3 % du poids total des farines (Mc Cleary, 1986). De tels arabinoxylanes ont été isolés des "fractions gomme" des farines et graines de céréales plus particulièrement dans le froment et le seigle sous forme de 2 fractions: l'une soluble dans l'eau (Montgomery *et al.*, 1955, a) et l'autre insoluble associée à la fraction "gomme", (Montgomery *et al.*, 1955, b). On trouve les mêmes structures dans les deux polymères. Un mélange de polysaccharides solubles et insolubles dans l'eau sont également trouvés dans d'autres céréales (Preece et Hobkirk, 1954) mais la structure détaillée n'est pas encore bien établie.

La distribution des substituants arabinosyl terminaux a été étudiée avec plus de succès pour les xylanes endospermiques. Un xylane endospermique de froment

TABLEAU I

Les xylanes de graminées.(D'après Aspinall, 1959)

Source	Mode of linkage of L-arabinofuranose end-groups ^a	Mode of linkage of D-glucuronic acid end-groups ^b	Other structural features
Esparto grass	none present	none present	β -D-Xylp-(1 → 2)-L-Ara branched xylan chain ...4-D-Gp-1... 3 . . . some branched xylan chains β -D-Xylp-(1 → 2)-L-Araf branched xylan chain ...2-L-Araf-1...
Esparto grass	(1 → 3)-D-Xylp	none present	
Wheat straw	(1 → 3)-D-Xylp	(1 → 3)-D-Xylp (Me)	
Wheat straw	(1 → 3)-D-Xylp	(1 → 2)-D-Xylp	
Wheat straw	(1 → 3)-D-Xylp	none present	
Wheat straw	none present	(1 → 2)-D-Xylp	
Wheat straw	(1 → 3)-D-Xylp	(1 → 2)-D-Xylp (Me)	
Oat straw	(1 → 3)-D-Xylp	(1 → 2)-D-Xylp (Me)	
Cocksfoot grass	(1 → 3)-D-Xylp	(1 → 2)-D-Xylp (Me)	
Wheat leaf	(1 → 3)-D-Xylp	(?) (1 → 3)-D-Xylp	
Barley husks	(1 → 3)-D-Xylp	(1 → 2)-D-Xylp (Me)	
Corn (maize) cobs	(1 → 3)-D-Xylp	not known	
Corn (maize) cobs	(1 → 3)-D-Xylp	(1 → 2)-D-Xylp (Me)	β -D-Xylp-(1 → 2)-L-Araf
Corn (maize) cobs	(1 → 3)-D-Xylp	(1 → 4)-D-Xylp none present	...4-D-Gp-1... 3 . . .
Maize fiber	(1 → 3)-D-Xylp	not known	α -D-Xylp-(1 → 3)-L-Ara L-Galp-(1 → 4)-D-Xylp-(1 → 2)-L-Ara
Maize hulls	not known	(1 → 2)-D-Xylp	α -D-Xylp-(1 → 3)-L-Ara β -D-Galp-(1 → 4)-D-Xylp β -D-Galp-(1 → 5)-L-Araf ...3-L-Araf-1...
Wheat bran	(1 → 3)-D-Xylp	(1 → 2)-D-Xylp	
Wheat flour	(1 → 3)-D-Xylp-(2 ← 1) (1 → 3)-D-Xylp	none present	
Barley flour	(1 → 3)-D-Xylp-(2 ← 1) (1 → 3)-D-Xylp (1 → 2)-D-Xylp	none present	
Rye flour	(1 → 3)-D-Xylp-(2 ← 1) (1 → 3)-D-Xylp	none present	

^a D-Xylp = D-Xylopyranose, L-Araf = L-arabinofuranose, D-Gp = D-glucopyranose, and Galp = galactopyranose residues
^b (Me) indicates that D-glucuronic acid residues are present, wholly or in part, as the 4-methyl ether.

présente en moyenne 40 % de résidus xylosyl non substitués, 36 % de résidus comportant un seul substituant arabinosyl, et 24 % de résidus xylosyl doublement substitués (Ewald et Perlin, 1959; Medcalf et Gilles, 1968). A partir des résultats obtenus par dégradation de Smith de xylanes endospermiques de froment, on a pu établir que les groupements arabinosyl étaient distribués au hasard et principalement situés sur des résidus xylosyl isolé avec une fréquence de substitution décroissante sur 2, 3 ou 4 résidus xylosyl adjacents (Wilkie, 1979).

- Les xylanes non endospermiques (voir la revue générale d'Aspinall, 1959).

Les différents xylanes des tissus non endospermiques présents en tant que polysaccharides structuraux des tissus lignifiés portent des chaînes latérales neutres plus complexes comportant des résidus d'arabinose, de galactose, de xylose. On a également pu mettre en évidence des chaînes de xylanes branchées. La figure 4 (p. 16) illustre les exemples de chaînes latérales caractérisées dans différents arabinoxylanes. Les différentes caractéristiques structurales des xylanes de chaumes de céréales et de plantes herbacées sont en général comparables, on a pu cependant observer des variations dans les proportions de L-arabinofuranose et d'acide D-glucuronique. Le plus fréquemment, mis à part dans le cas des chaumes de froment où l'on a pu observer des caractéristiques structurales variables notamment par la présence de chaînes de xylane branchées, de résidus de glucose faisant partie intégrante de la chaîne de xylane et par la présence de chaînes latérales plus complexes, les chaînes latérales sont simples et constituées de résidus arabinosyl terminaux. La figure 5 (p. 16) illustre les caractéristiques principales des xylanes de ce type. On a également pu mettre en évidence des résidus d'acide 4-O-méthyl-glucuronique habituellement liés en O-2 aux restes xylosyl de la chaîne principale, liés également en O-3 (Bishop, 1953). Les enveloppes de grains d'orge présentent des xylanes de même type mis à part qu'ils contiennent en plus, des chaînes latérales constituées d'unités de 2-O-β-D-xylopyranosyl-L-arabinofuranose (Fig. 6, p. 17).

Les xylanes non endospermiques du maïs, des enveloppes protectrices des grains de blé et d'orge présentent des caractéristiques structurales inhabituelles, plus complexes que les xylanes de froment et des autres plantes herbacées. Ces xylanes contiennent des résidus de L-arabinofuranose non terminaux liés sur l'O-3 des résidus xylosyl et constituent le plus souvent la charnière entre les autres sucres de la chaîne

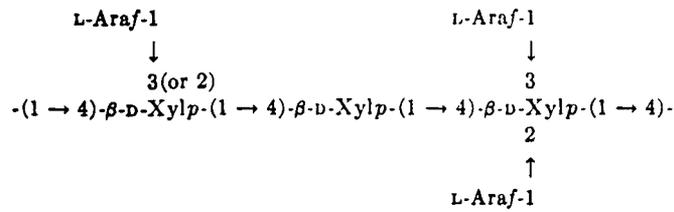


Fig. 3: Structure générale des arabinoxyanes endospermiques des Graminées. (D'après Aspinal, 1959)

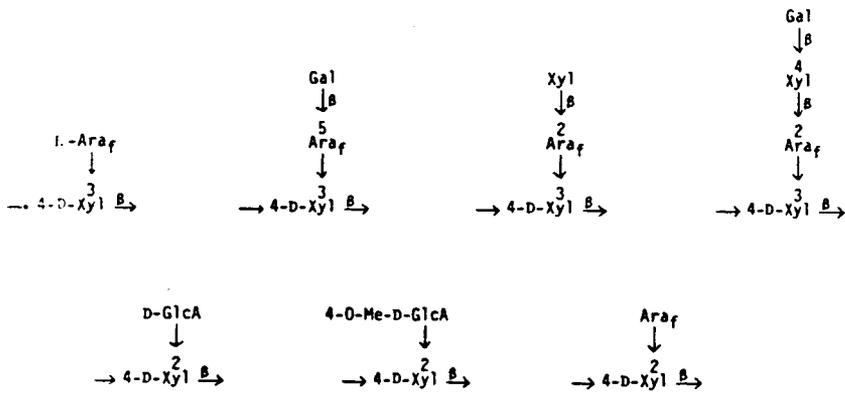


Fig. 4: Principales chaînes latérales substituant les résidus de β -1,4-D-xylopyranose de la chaîne principale des arabinoxyanes. (D'après Mc Neil *et al.*, 1984)

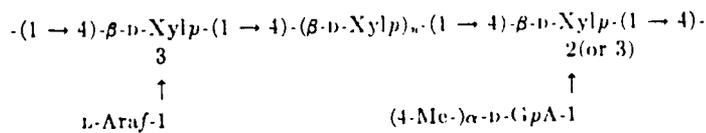


Fig. 5: Principales caractéristiques structurales des xyanes de chaumes de céréales et de plantes herbacées. (D'après Aspinal, 1959)

latérale complexe et la chaîne principale.

Les xylanes de rafles de maïs présentent des caractéristiques structurales très variables. Dans certains cas ce sont des arabinoxylanes renfermant dans la chaîne principale, en faibles proportions, des résidus de D-glucose liés en 1, 3 et 4. D'autres xylanes de rafles présentent des caractéristiques structurales très proches de celles des xylanes des enveloppes protectrices des grains d'orge et comportent également de l'acide glucuronique et son 4-O-méthyl-éther.

La structure des arabino-xylo-oligosaccharides isolés d'un hydrolysate de rafles de maïs, a été déterminé (Kusakabe, 1983). On a pu mettre en évidence 2 types de chaînes latérales (Fig.7, p. 17):

- l'une présente sous la forme d'une simple sous unité de résidu de L-arabinofuranose lié en α -1,3 sur la chaîne principale.

- l'autre présente sous la forme d'unités de 2-O- β -D-xylopyranosyl-L-arabinofuranose en position 3 sur le xylose de la chaîne principale.

Les xylanes de fibres de maïs sont extrêmement complexes et ont la particularité de renfermer du D- et L- galactose. Des conditions douces d'hydrolyse ont permis d'isoler les di- et trisaccharides suivants (TABLEAU I, p. 14):

- l'O- α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-L-arabinose

- l'O- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 5)-L-arabinose

- Les O-D ou O-L-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-O-D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-L-arabinose.

Ces composés sont probablement libérés des xylanes grâce à la labilité des liaisons arabinofuranosiques vis à vis de l'hydrolyse acide. En ce qui concerne les résidus d'acide glucuronique, ils sont liés en O-2 au D-xylose de la chaîne principale.

II - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES XYLANES.

a - Degré de polymérisation des xylanes.

Les xylanes sont des polysaccharides de faible DP, comparé à la cellulose. Le DP des xylanes de feuillus (150-200) est supérieur au DP des xylanes de résineux (70-130) (Zinbo et Timell; 1965, 1967).

b - La solubilité (consulter la revue générale de Wilkie, 1979).

On attribue la solubilité bien connue des arabinoxyanes endospermiques aux groupements arabinosyl. En effet, sous l'action d'une α -L-arabinofuranosidase, il a été possible d'insolubiliser des arabinoxyanes initialement solubles dans l'eau. La solubilité n'est pas due à un effet d'hydratation. En effet, le fort degré d'hydratation des arabinoxyanes, déterminé par spectrométrie RMN (Kuntz *et al.*, 1969), aurait laissé supposer que cette propriété influait sur la solubilité des arabinoxyanes si l'on n'avait pas montré que la suppression des substituants arabinosyl ne modifiait pas leur degré d'hydratation. On a pu en conclure que la présence des substituants arabinosyl évitent des phénomènes d'aggrégation intermoléculaires à l'origine de l'insolubilité des xylanes peu ou pas substitués, empêchant ainsi les associations entre les régions non substituées.

Le degré de substitution du xylane par des résidus arabinofuranosyl détermine considérablement le degré de solubilité du xylane et sa capacité à se lier à la cellulose. Les xylanes hautement substitués sont plus solubles dans l'eau et se lient moins à la cellulose, alors que les molécules moins fréquemment substituées par des chaînes latérales sont moins solubles dans l'eau et se lient plus fortement à la cellulose (Mc Neil, 1975).

Par solubilité des xylanes endospermiques, on sous-entend également la facilité par laquelle on peut les extraire à l'eau de l'endosperme comparativement aux tissus non endospermiques où des conditions plus drastiques sont requises. On peut attribuer ces différences d'extractabilité par l'existence *in situ* d'interactions entre les xylanes faisant intervenir soient des acides féruliques (pouvant également être présents dans les tissus endospermiques) estérifiant les hémicelluloses, soient des acides uroniques pouvant parfois être présents dans les tissus endospermiques. Des arabinoxyanes endospermiques insolubles ont pu être solubilisés dans l'eau après traitement préalable dans des solutions alcalines. On peut par conséquent supposer que des liaisons esters créées entre d'éventuels acides uroniques (parfois présents dans les tissus endospermiques) et d'autres sucres ont été saponifiées. Cela expliquerait pourquoi certains arabinoxyanes sont insolubles.

Parallèlement les hémicelluloses totales des tissus non endospermiques renferment des résidus d'arabinose et d'acide uronique en quantités équimoléculaires et laissent soupçonner qu'il existe une relation structurale directe entre ces deux

groupements.

Deux hypothèses concernant leurs interactions ont été émises (Wilkie, 1979):

- à l'état natif les chaînes de xylane seraient appariées par l'intermédiaire de ces deux groupements par estérification. Des conditions d'extraction alcalines conduiraient (par saponification des liaisons esters) à la séparation des molécules qui individuellement ne renfermeraient plus les groupements arabinosyl et glucuronosyl en proportion équimoléculaire.

- il existerait un arrangement intramoléculaire ordonné et séquentiel de paires de substituants d'acide uronique et d'arabinose pas nécessairement distribués entre des résidus xylosyl contigus. Dans ce cas, il doit exister des interactions inter- et intramoléculaires entre les acides glucuroniques et les arabinoses expliquant ces différences d'extractabilité, devant notamment dépendre de la présence ou non d'acides glucuroniques dans l'endosperme.

B - LES DIFFERENTS PARTENAIRES DES XYLANES DANS LA PAROI VEGETALE.

I - LES β - GLUCANES (Hayashi, 1989).

4 types de β -glucanes sont rencontrés dans les parois des plantes supérieures. Ce sont des glucanes au liaisons mixtes (uniquement chez les monocotylédones), les β -1,3-glucanes, la cellulose et les xyloglucanes.

a - La cellulose.

Toutes les cellules des plantes supérieures sont enveloppées dans une paroi cellulosique dont le rôle premier est structural. Elle représente notamment l'élément constitutif majeur du bois. Elle est particulièrement abondante dans les parois secondaires et représente environ 20 à 30 % du poids sec des parois primaires de nombreuses cellules végétales (Mc Neil *et al.*, 1984). La plus abondante source de cellulose pure est le coton qui en renferme environ 90 %.

Traditionnellement on prépare la cellulose à partir du résidu insoluble récupéré après l'extraction par des agents chélatants ou alcalins des autres polysaccharides pariétaux. La cellulose de ce résidu est classiquement solubilisée par des complexes

inorganiques tels que le cadoxène (Brett, 1981) et plus récemment par une nouvelle classe de solvants organiques les amines-oxydes (Chanzy *et al.*, 1982), (par exemple le N-méthylmorpholine-N-oxyde), qui ne provoquent qu'une faible dégradation de la macromolécule. Cependant ces préparations sont contaminées par l'extensine (Monro *et al.*, 1976) qui est une glycoprotéine insoluble riche en hydroxyproline que l'on rencontre fréquemment dans les parois primaires des Angiospermes (Mc Neil, 1984).

La cellulose est un polymère non ramifié de β -1,4-D-glucose. On ne peut toutefois exclure complètement qu'en très faible pourcentage certains sucres du type galactose ou xylose soient incorporés dans la chaîne et ne proviennent pas de polysaccharides contaminants (Hughes et Street, 1974; Mc Neil *et al.*, 1984; Barnoud, 1980). A ce propos, on a pu observer une augmentation de la proportion de D-galactose incorporée dans la cellulose issue de cellules de racines cultivées *in vitro* en présence de D-galactose. Un effet phytotoxique résultant de l'incorporation du D-galactose, s'est traduit par la terminaison précoce ou prématurée des chaînes de cellulose.

Des données de diffractions de rayons X ont permis d'établir que la liaison glycosidique qui lie les motifs β -D-glucopyrannosyl n'est pas plane. L'unité de base de la cellulose est le cellobiose, formée de deux résidus orientés l'un par rapport à l'autre selon une rotation de 180° autour de l'axe de la molécule. En conséquence de cette configuration, des liaisons hydrogène intramoléculaires peuvent s'établir entre l'O-5 et l'O-3 de 2 maillons successifs et stabilisent la structure en ruban de la molécule (Fig. 8, p. 22). Les chaînes de β -1,4-glucanes s'aggrègent pour former des microfibrilles de 10 à 30 nm de diamètre, par des liaisons intermoléculaires. Toutes les celluloses sont structurées sur la base de la fibrille élémentaire, les microfibrilles n'étant que des multiples de l'unité structurale de diamètre de l'ordre de 2-4 nm. A l'état natif, la cellulose des parois secondaires présente un degré de cristallinité élevé où les microfibrilles sont ordonnées de façon parallèle, alors que dans les parois primaires, on a pu établir par diffraction aux rayons X qu'elle présentait une forme amorphe désorganisée ou de degré de cristallinité est plus faible que dans les parois secondaires.

La cellulose est un polymère dont les masses moléculaires sont faiblement dispersées. Toutefois il a été difficile de mesurer le degré de polymérisation de la cellulose native en raison des risques de dégradation occasionnés par les méthodes d'isolement. Le degré de polymérisation de la cellulose des parois secondaires est élevé,

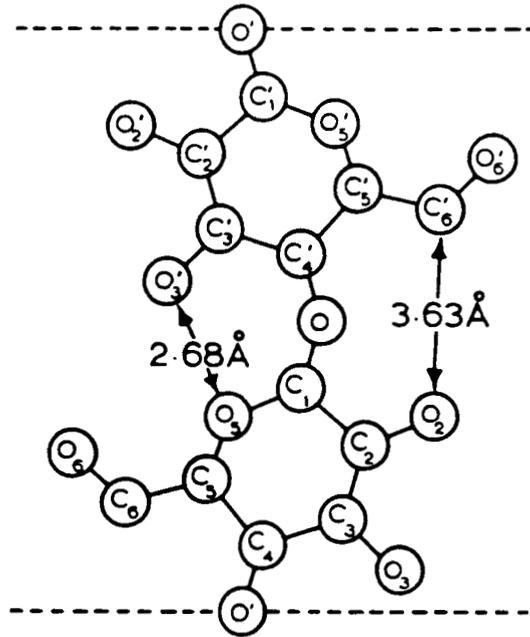


Fig. 8: Structure spatiale d'une unité cellobiose selon Carlstrom (1957).
(D'après Barnoud, 1980)

La combinaison des angles de torsion autour de C₁-O et O-C₄ facilite la liaison hydrogène O₅-O₃. Il en résulte une dimension de répétition de l'unité cellobiose qui est de l'ordre de 10,3 Å. Les deux liaisons hydrogène intramoléculaires stabilisent la forme en ruban de la chaîne.

il est de l'ordre de 14000, alors que dans les parois primaires le DP est plus faible et polydisperse. Il a été établi que la distribution des DP dans les parois primaires était biphasique. La plupart des DP sont de l'ordre de 2500-4500 ou inférieurs à 500.

La paroi primaire végétale a une structure biphasique, où les microfibrilles de celluloses sont dispersées dans une matrice amorphe fortement hydratée composée de substances pectiques, d'hémicelluloses et de protéines.

Le rôle des fibrilles est de transformer la matrice hémicellulosique et pectique de nature plastique en un système élastique présentant une résistance élevée à la traction. D'autre part il est possible que l'orientation des microfibrilles nouvellement déposées puisse influencer sur la morphologie de la cellule en croissance mais aussi sur la morphologie de la plante.

b - Les β -(1,3)-(1,4)-glucanes.

Les β -glucanes mixtes sont spécifiques des parois de monocotylédones et plus particulièrement des Graminées. Ils constituent le polysaccharide majeur des parois endospermiques de l'orge où il représente 2,5 à 5,5 % du poids total de la graine et environ 75 % (w/w) des polysaccharides pariétaux de l'endosperme (Mc Cleary, 1986). L'étude des structures fines des β -glucanes ont principalement été réalisées sur les parois de coléoptiles d'avoine (Yamamoto et Nevins, 1978) et les tissus de l'endosperme de l'orge (Woodward et Fincher, 1983).

Les β -glucanes sont constitués de résidus D-glucopyranosyl liés en β -1,3 et en β -1,4 distribués pour la plupart des espèces, de manière séquentielle typique ou au hasard dans le cas du maïs (Hayashi, 1989). Ils forment des chaînes linéaires dans lesquelles généralement, 2 ou 3 résidus glucosyl contigus sont liés par des liaisons 1,4 et forment une succession de blocs reliés entre eux par des liaisons glucosyl isolés, liés en β -1,3. L'existence de résidus glucosyl contigus liés en β -1,3 n'a pu être établie. Si ces liaisons 1,3 consécutives existent, elles ne représenteraient à peine 0,2 % du polysaccharide. En revanche, la proportion de résidus glucosyl liés en 1,3 représentent 30 % du polysaccharide (Mc Neil, 1984).

Les β -glucanes affectent de manière significative l'industrie de la brasserie (Mc

Cleary, 1986). En effet, ils forment des solutions aqueuses de viscosité élevée entraînant des difficultés de filtration du moût et de la bière, et diminuent également les propriétés organoleptiques de la bière par l'apparition de troubles et de précipités.

c - La callose.

La callose est un β -1,3 glucane linéaire constitué de résidus β -D-glucosyl liés en 1,3. Le terme callose sous-entend également les β -1,3 glucanes dont le DP est suffisamment élevé pour rendre le polymère insoluble. Le β -1,3-glucane est généralement considéré comme un polysaccharide synthétisé en réponse à diverses agressions. Dans ce cas le dépôt de callose s'effectue rapidement et de façon localisée en obturant par exemple des connections tels que des plasmodesmes unissant le protoplaste aux cellules voisines, dans le but par exemple de soustraire les cellules aux invasions fongiques (Kauss, 1989). Elle est synthétisée massivement dans les tissus blessés. Elle peut également être synthétisée dans des systèmes non perturbés comme par exemple lors de l'élongation des tubes polliniques (Kauss, 1985 et 1987; Fincher et Stone, 1981; Eschrich, 1956).

d - Les xyloglucanes (voir la revue générale de Mc Neil *et al.*, 1984)

Les xyloglucanes sont localisés à l'interface des fibres de cellulose et des autres polysaccharides au niveau de la paroi primaire, majoritairement dans les parois de dicotylédones où ils représentent 20 % du poids sec et minoritairement dans les parois de monocotylédones où ils ne représentent que 2 % du poids sec (Darvill *et al.*, 1980).

Comme pour la cellulose, le squelette de base est un β -1,4 glucane. Certains résidus glucosyl sont substitués par des résidus xylosyl liés en α -1,6 (Fig. 9, p. 27). Toutefois les résidus glucosyl des xyloglucanes de monocotylédones sont moins fréquemment substitués par des résidus xylosyl que les xyloglucanes des dicotylédones (Kato *et al.*, 1981).

Les chaînes latérales peuvent être plus longues et comporter en plus un résidu galactopyranosyl lié en β -1,2 sur le xylose chez les dicotylédones et les monocotylédones et également un résidu fucosyl lié en α -1,2 au résidu galactosyl uniquement chez les dicotylédones (Shibuya et Misaki, 1978). On a également pu mettre en évidence des groupements O-acétyl substituants des xyloglucanes isolés à partir de

polysaccharides extracellulaires de sycomore.

En raison des relations moléculaires des xyloglucanes avec la cellulose, ces hémicelluloses jouent un rôle important au niveau structural ainsi que dans la physiologie des cellules végétales en phase d'élongation (en effet des fragments de xyloglucanes inhibent la croissance de tissus de pois en phase d'élongation) (York *et al.*, 1984).

Des solutions très alcalines sont nécessaires pour extraire ces hémicelluloses *in situ* ou *in vitro* associées à de la cellulose purifiée. La plupart des xyloglucanes sont fortement associés à la cellulose par des liaisons de type hydrogène. Cette association entre xyloglucanes et cellulose *in situ* doit probablement limiter les associations des microfibrilles en fibres, libérant ainsi des sites de liaisons covalentes avec les fibres de cellulose.

II - LES MANNANES

Les mannanes sont des polymères souvent ramifiés et caractérisés par la présence de résidus de D-mannose liés en β -1,4. On distingue 4 types de mannanes.

1 - Les "homomannanes", polymères linéaires formés de résidus de D-mannose liés en β -1,4.

2 - Les galactomannanes, polymères linéaires de D-mannose liés en β -1,4 et substitués sur le O-6 des résidus mannosyl, par des résidus d' α -D-galactose. Ces composés sont des polymères pariétaux de réserve de certaines graines (guar, caroube). Les résidus de galactose sont distribués irrégulièrement sur la chaîne principale (Mc Cleary, 1988).

3 - Les glucomannanes, sont des copolymères formés de résidus de D-mannose et de D-glucose liés en β -1,4. Ce sont les hémicelluloses majeures de bois de Gymnospermes (Joseleau, 1980).

4 - Les galactoglucomannanes sont des copolymères ramifiés dont la structure provient de la substitution de la chaîne de glucomannane par des résidus de D-galactose liés en α -1,6.

III - LES PECTINES

Les pectines sont des polysaccharides constitués principalement d'acides galacturoniques. Leur localisation est limitée à la lamelle moyenne et à la paroi primaire de la plupart des plantes supérieures.

Au niveau de la lamelle moyenne, elles forment un ciment conditionnant la cohésion intercellulaire, elles assurent aux cellules un environnement hydrophile polyanionique et comme les pectines des parois primaires, participent à la rigidité des tissus. Elles sont peu abondantes dans les tissus de bois dans lesquels l'eau et les substances pectiques associées ont largement été remplacées par la lignine de nature fortement hydrophobe.

En raison des diverses interconnexions générées par les polymères pectiques, on ne peut les extraire que partiellement des parois après un traitement approprié. Cependant ils peuvent être extraits en quantité appréciable des parois primaires des dicotylédones (Voragen *et al.*, 1983; Dey et Brinson, 1984) et de certaines monocotylédones (Ishii, 1982), par l'eau, les tampons, les agents chélatants, les acides et les bases dilués. L'efficacité de solubilisation par des agents chélatants dépend de leur capacité à complexer les cations divalents Ca^{2+} , maintenus dans les parois par association aux pectines.

Les homogalacturonanes sont des polymères comportant presque uniquement des résidus d'acide galacturonique. Ils sont difficiles à isoler car très peu solubles. Ainsi leur isolement nécessite des conditions plus drastiques entraînant des modifications structurales. De telles molécules sont présentes dans les parois primaires et sont liées par des liaisons covalentes à d'autres polymères pariétaux (Mc Neil, 1984). Les propriétés physiques de ces homogalacturonanes ont été bien étudiées: ils forment des gels insolubles et rigides en présence de calcium ce qui laisse supposer qu'ils jouent un rôle important dans la structure des parois végétales.

Les rhamnogalacturonanes sont les principaux représentants des pectines. Ils sont caractérisés par un squelette rhamnogalacturonane formé d'une chaîne de résidus d'acide D-galacturonique liés entre eux par des liaisons α -1,4 où s'insèrent des résidus rhamnosyl substitués en 2 par l'acide α -galacturonique (Fig. 10, p. 27).

Les résidus d'acide galacturonique sont en partie présents sous forme de méthyl ester et les fonctions carboxyliques restantes sont souvent neutralisées par des ions K^+ , Na^+ , ou Ca^+ . Les résidus d'acide galacturonique peuvent également être acétylés en O-2 ou en

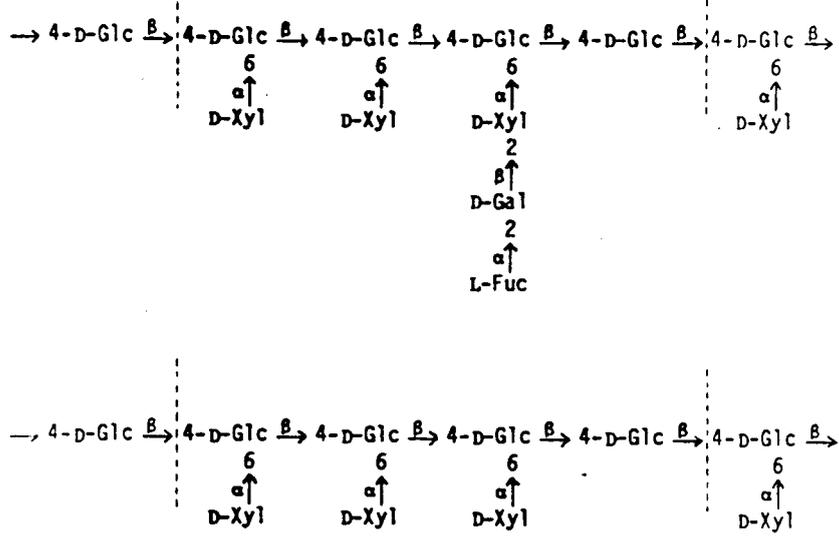


Fig. 9: Représentation des structures d'un nona- et hepta-saccharide isolés des produits d'hydrolyse enzymatique de xyloglucane par une endo-β-1,4-gluconase. (D'après Mc Neil *et al.*, 1984)

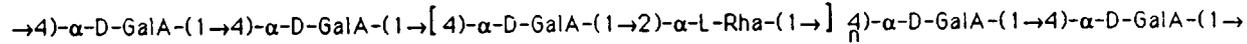


Fig. 10: Structure du squelette rhamnogalacturonique des pectines.

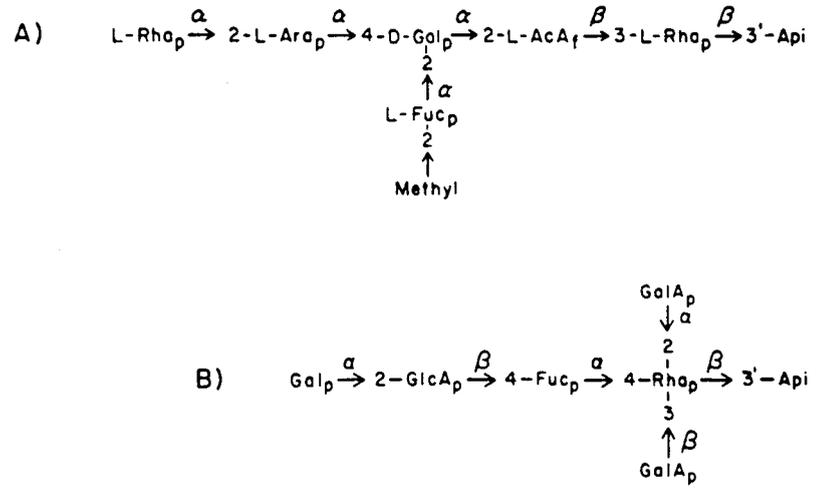


Fig. 11: Structures de 2 heptasaccharides isolés du rhamnogalacturonane II. (D'après Mc Neil *et al.*, 1984)

O-3, mais les degrés d'acétylation sont en général inférieurs à 10 (Mc Comb et Mc Cready, 1957).

Les chaînes latérales sont typiquement constituées de D-galactose et de L-arabinofuranose formant des arabinanes et des (arabino)-galactanes de type I ou II, branchées au niveau des résidus rhamnosyl le plus fréquemment sur l'O-4 et plus accessoirement sur l'O-3 (les rhamnogalacturonanes II). Des chaînes plus courtes peuvent aussi substituer les acides galacturoniques (Mc Neil, 1984).

Les ramifications peuvent également comporter des quantités mineures de D-xylose et de D-glucose et moins fréquemment encore des résidus de D-mannose, L-fucose, d'acide D-glucuronique ainsi que des oses rares tels que le 2-O-méthyl-D-xylose, le 2-O-méthyl-L-fucose, le D-apiose, l'acide 3-deoxy-mannoctulosonique (KDO), et le 3-C-carboxy-5-deoxy-L-xylosyl (Mc Neil, 1984). Ces oses rares sont majoritaires dans les rhamnogalacturonanes II qui sont notamment plus riches en résidus rhamnose, intercalés par des liaisons α -1,2 mais également par des liaisons α -1,3, entre les radicaux α -4-D-galacturonopyranosyl (Fig. 11, p. 27). Les rhamnogalacturonanes II ont été mis en évidence dans les milieux de culture de suspensions cellulaires de sycomore (MC Neil, 1984).

In situ, les substitutions et les chaînes latérales ne sont pas réparties de façon homogène; elles forment selon Jarvis (1984) des blocs le long du réseau pectique. Les pectines apparaissent ainsi formées de la juxtaposition de régions comprenant uniquement des acides galacturoniques et des régions riches en rhamnose et en chaînes latérales.

Rees et Wight (1971) ont suggéré que la présence des résidus rhamnosyl dans le squelette de la chaîne principale conduisait à des irrégularités de structure conférant ainsi à la chaîne une certaine flexibilité. Ajouté à ceci, l'estérification des résidus d'acide galacturonique et l'acétylation occasionnelle de ses groupements hydroxyl ainsi que la présence des substituants sur la chaîne principale conduit à des pectines dont la structure est illustrée figure 12, (p. 29).

Expérimentalement, on a pu identifier des oligosaccharides issus d'hydrolyses acides partielles de matériel pectique de sources variables (Aspinall *et al.*, 1967 a et b; Toman *et al.*, 1976) qui présentaient des enchaînements répétitifs du dimère $\rightarrow 4$ GalA 1 \rightarrow 2 Rha 1 \rightarrow ainsi que des résidus de rhamnose adjacents.

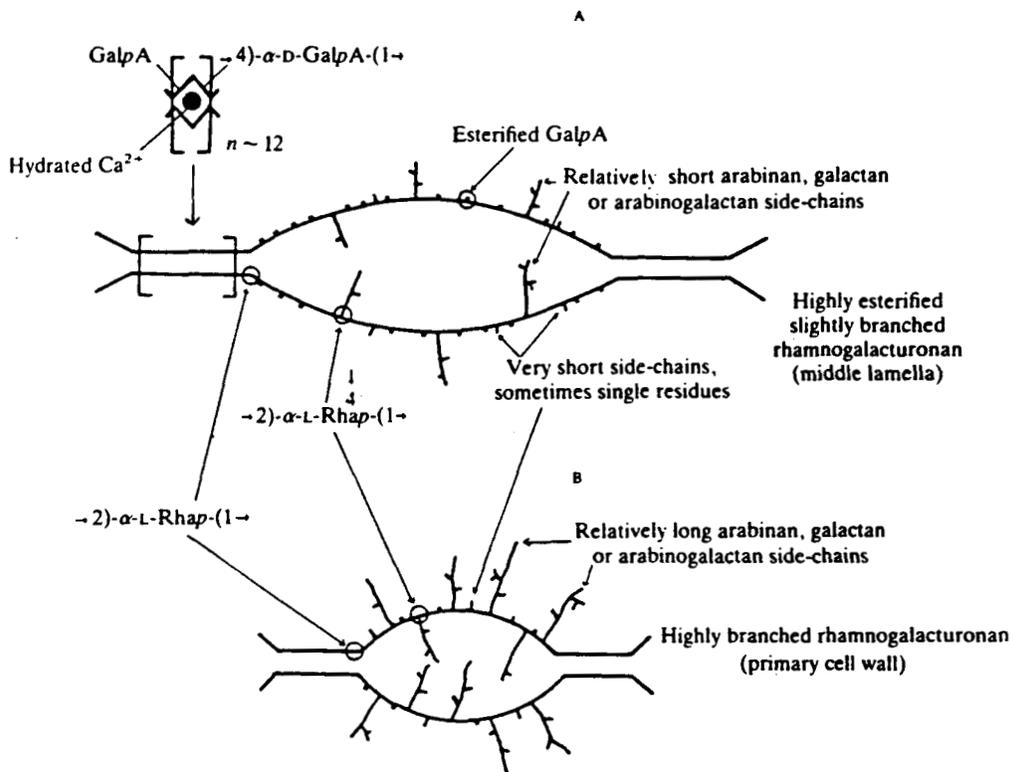


Fig. 12: Représentation des principales caractéristiques structurales des pectines de la lamelle moyenne (A) et de la paroi primaire (B). (D'après Selvendran, 1985)

Les pectines de la lamelle moyenne sont caractérisées par un degré de méthylation élevé, sont faiblement branchées et présentent de courtes ramifications, tandis que les pectines de la paroi primaire sont fortement branchées, présentent des chaînes latérales longues et des régions homogalacturoniques plus courtes.

Les régions polygalacturoniques seraient constituées d'au moins 25 unités (Kohn, 1975) galactosyluroniques adjacentes, à l'origine de l'agencement caractéristique en "dimères d'egg-box" (Fig. 12, p. 29).

L'alignement de 2 chaînes pectiques adjacentes conduirait à la formation de zones de jonctions interchaînes avec le calcium assurant le pontage ionique entre 2 carboxyl voisins appartenant à 2 chaînes différentes. Ce pontage peut également être renforcé par des liaisons de coordinance engagées avec certains atomes d'oxygène portés par les monosaccharides voisins.

Etant donné que la plupart des tissus parenchymateux peuvent être dissociés par l'utilisation d'agents chélatants, Selvendran (1985) suggère que la cohésion cellulaire assurée par la lamelle moyenne dépendrait de ces interactions ioniques plutôt que de liaisons covalentes.

IV - LES LIGNINES

Les lignines constituent après la cellulose, le matériel organique le plus abondant du règne végétal (Freudenberg, 1968; Adler, 1977). Ce sont des polymères aromatiques complexes largement répandus dans les tissus de bois des plantes vasculaires (ou Trachéophytes), dans lesquelles ils représentent 1/4 à 1/3 de ces tissus (Chen, 1988). La teneur en lignines des bois de conifères varie en général entre 24 et 33 % (Brauns F.E. et D.A., 1960) alors que dans les bois d'Angiospermes des régions tempérées la teneur oscille entre 19 et 28 % (Sarkanen et Hergert, 1971).

La lignine se dépose par incrustation dans les bois secondarisés. La lignification des différentes couches de parois ne se fait pas de façon uniforme et a lieu nettement après le dépôt des polysaccharides. Elle débute dans la paroi primaire, progresse ensuite dans la lamelle moyenne comblant les espaces entre les cellules, puis se poursuit successivement dans les couches S1, S2, S3 (Monties, 1980).

D'un point de vue physico-chimique, les lignines sont intimement associées aux fibres de cellulose et dans une certaine mesure liées par des liaisons covalentes aux hémicelluloses pariétales.

En général, les lignines sont synthétisées *in vivo* par la copolymérisation oxydative de 3 alcools hydroxycinnamiques (ou phénylpropénoïques): l'alcool coumarylique, l'alcool coniferylique, l'alcool sinapylique (Fig. 13, p. 32), qui dérivent respectivement des précurseurs: coumaryl (ou 4-hydroxyphénylpropane), guaiacyl (ou

3-methoxy-4-hydroxyphénylpropane) et syringyl (3,5-dimethoxy-4-hydroxyphénylpropane) (Crawford, R.L. et D.L., 1981). Les lignines varient selon les familles de végétaux et se distinguent par les proportions relatives de ces composants phénoliques incorporés au polymère et par la teneur en acides aromatiques pouvant estérifier la lignine. En particulier, les lignines de Gymnospermes (bois tendres) sont composées principalement d'alcools coniféryliques alors que les Angiospermes (bois durs) sont constitués majoritairement d'alcools coniféryliques et sinapyliques en proportion égale avec très peu d'alcool coumarylique. Les lignines de Graminées renferment les trois alcools (Chen, 1988) ainsi que l'acide *p*-coumarique (ou acide parahydroxycinnamique) estérifié au groupement hydroxyl en γ des chaînes latérales de lignine (Shimada *et al.*, 1971).

Contrairement à la plupart des biopolymères présentant des structures de base liées par un seul type de liaison intermonomérique, les unités phénylpropénoïques sont reliées entre elles par plusieurs types de liaisons ether et carbone-carbone (Fig. 14, p. 32). La principale est la liaison arylglycerol- β -aryl ether (1) (40 à 50 % des liaisons) qui lie la chaîne propylique à une unité phénylpropénoïque adjacente. Elle est suivie de la liaison phénylcoumarane (2) (14 %), diarylpropane (3) (15 %), résinol (4) (13 %), biphényl (5) (25 %), et diphényl ether (6) (5 %)

L'hétérogénéité de la lignine (Fig. 15, p. 33) est le résultat de sa synthèse par un processus radicalaire couplant au hasard les trois alcools hydroxycinnamiques. Les radicaux phénoxy- sont produits dans la cellule en voie de lignification par oxydation radicalaire (Fig. 16 et 17 p. 33) des alcools par la peroxydase EC 1.11.1.17 (Kirk et Obst, 1988). En raison de la conjugaison de leur double liaison en α , β avec le noyau phénolique, il en résulte la formation du radical stabilisé par résonance dont les principales formes mésomères sont représentées dans la figure 14 (p. 32). Le couplage fait intervenir presque toutes ces formes mésomères et conduit à plus de 12 liaisons C-C et C-O-C pour chacun des alcools.

Certains types de liaisons intermonomériques dominant et en conséquence influent sur les réactivités biochimiques de la lignine.

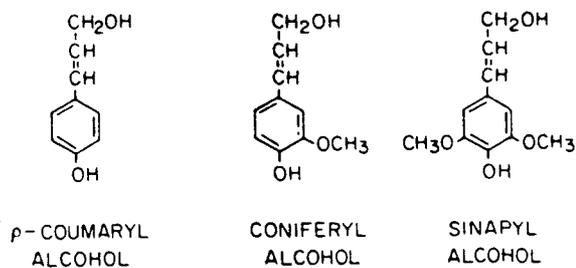


Fig. 13: Structure des alcools hydroxycinnamiques.
(D'après Crawford *et al.*, 1988)

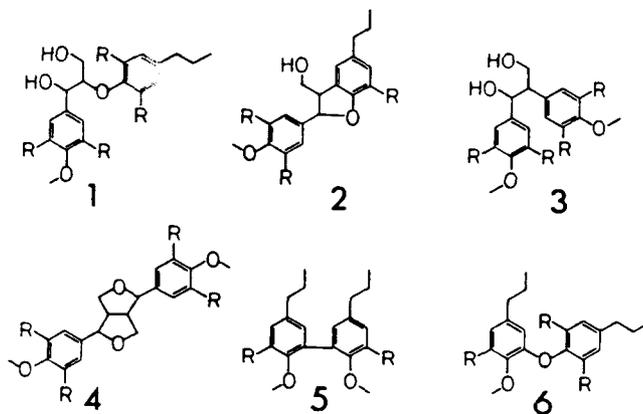


Fig. 14: Principales liaisons intermonomériques reliant les unités phénylpropénoïques de la lignine.
(D'après Tanahashi *et al.*, 1988)

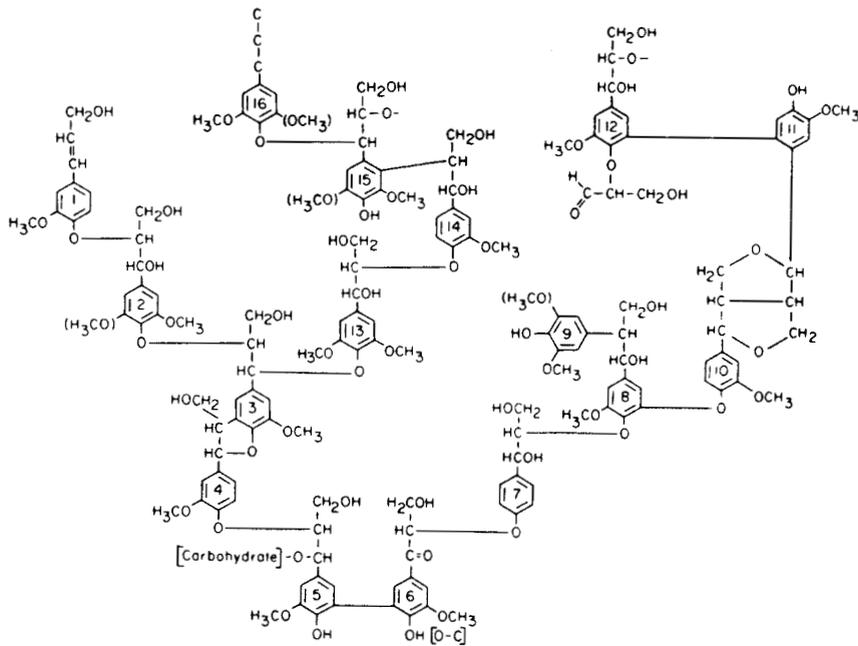


Fig. 15: Formule développée de la lignine.
(D'après Adler, 1977)
Cette structure illustre les principales liaisons intermonomériques.

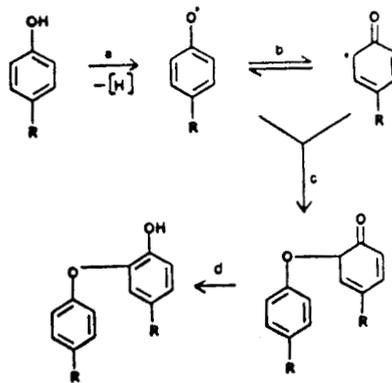


Fig. 16: Réaction de couplage par oxydation radicalaire illustrée par la conversion de la tyrosine en iso-dityrosine. [-R = -CH₂-CH(NH₂)-COOH]
(D'après Fry, 1989)
a- Formation du radical libre par oxydation.
b- Mésomérisation.
c- Couplage des radicaux libres.
d- Réarrangement de la structure instable initialement formée.

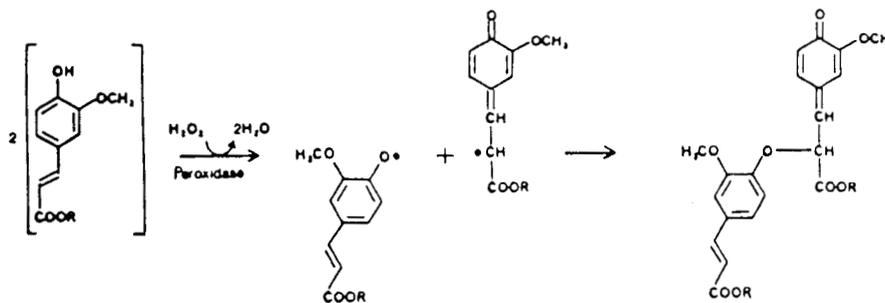


Fig. 17: Mode de condensation des radicaux mésomères phénoxy- en dimères semi-stables de méthylène quinones (dimères d'esters féruliques) par oxydation radicalaire par la peroxydase d'acides féruliques.
(D'après Fry, 1989)

V - LES INTERACTIONS LIGNINES-POLYSACCHARIDES PARIÉTAUX

Mise à part la cellulose, les principaux constituants pariétaux de nature polysaccharidique sont solubles dans l'eau, polyhydroxylés, hydratés et la plupart d'entre eux sont chargés. *In situ*, par l'intermédiaire d'associations de nature physique et chimique, ces polymères s'organisent en une structure rigide et insoluble pour former la paroi, résistante d'un point de vue chimique et biologique.

C'est en particulier la lignification des parois végétales, qui affecte considérablement la dégradabilité *in situ* des polysaccharides pariétaux notamment en réduisant l'accessibilité aux agents chimiques et enzymatiques.

Une meilleure connaissance de la structure et des fonctions de la paroi végétale doit par conséquent obligatoirement passer par l'étude des interconnexions existant entre les lignines et les polysaccharides des parois végétales. Le progrès des connaissances dans ce domaine devrait notamment impliquer de nombreuses retombées pour différentes applications biotechnologiques comme par exemple dans le traitement des pâtes à papier par voie enzymatique.

Les travaux dans ce domaine sont orientés vers la mise au point de traitements ou de prétraitements biologiques du bois ("biopulping") et de la pâte (blanchiment enzymatique) capables de remplacer en tout ou en partie les procédés chimiques ou mécaniques existants très polluants ou très coûteux.

a - Les complexes covalents lignine-hémicelluloses.

Les polysaccharides des parois des plantes ligneuses forment avec la lignine des complexes désignés "Lignine-carbohydrate-complex", (L.C.C.). L'étude de ces polymères a été limitée en raison de leur composition chimique complexe et hétérogène et également en raison de la difficulté de les isoler sous forme native sans introduire de modifications structurales sévères. A partir des résultats de nombreuses études, il a été établi que ces polysaccharides étaient principalement des hémicelluloses, associées à la lignine par l'intermédiaire de liaisons covalentes.

Chez les Graminées, les acides phénoliques tels que les acides *p*-hydroxycinnamiques et féruliques font également partie des constituants des complexes "L.C.C." et on pense qu'ils sont liés par des liaisons covalentes respectivement à la lignine et aux polysaccharides.

D'autre part, compte-tenu des variations des caractéristiques structurales selon les familles de végétaux, on peut s'attendre à rencontrer également des variations au niveau des types de liaisons engagées entre les lignines et les hémicelluloses, parmi ces groupes de végétaux.

b - Nature des liaisons covalentes engagées entre les lignines et les polysaccharides pariétaux.

Les polysaccharides pariétaux seraient couplés à des méthylène-quinones. Ces molécules très réactives sont formées par oxydation radicalaire des dérivés phénoliques hydroxycinnamiques, produites en tant que métabolites intermédiaires au cours de la biosynthèse des lignines et formeraient en présence des polymères pariétaux des liaisons benzyl éther et benzyl ester, (Fig. 18, p. 36)(Azuma, 1989).

Freudenberg (1968) a montré que les méthylènes quinones, monomères ou oligomères sont susceptibles de réagir en présence d'eau pour former des alcools benzyliques, mais aussi en présence d'alcools pour former des ether benzyliques, mais surtout en présence d'acides carboxyliques pour former des esters benzyliques. Ceci implique que l'établissement de ces liaisons suivrait la lignification des parois végétales et serait limitée pendant la période de croissance cellulaire.

Cependant sur la base de modèles expérimentaux (Hemmingson *et al.*, 1978 et 1979; Leary *et al.*, 1983 a, b) visant à démontrer la nature des liaisons covalentes possibles, la formation de ces liaisons se poursuivrait également après la lignification des parois.

C - LES XYLANES IN SITU

I - ASSOCIATION COVALENTE DES XYLANES AVEC LES LIGNINES.

Parmi les polymères pariétaux, les xylanes constituent les principales hémicelluloses associées à la lignine dans les parois secondaires (Wong *et al.*, 1988). Ce sont en effet les composants majeurs de nombreux complexes "L.C.C." extraits du bois (Joseleau et Gancet, 1981), des parois de graminées (Ford, 1986; Tanner et Morrison, 1983) liés aux résidus phénoliques par l'intermédiaire de leurs résidus arabinosyl (Chesson *et al.*, 1983; Eriksson *et al.*, 1980) et glucuronosyl (Das *et al.*, 1984; Eriksson *et*

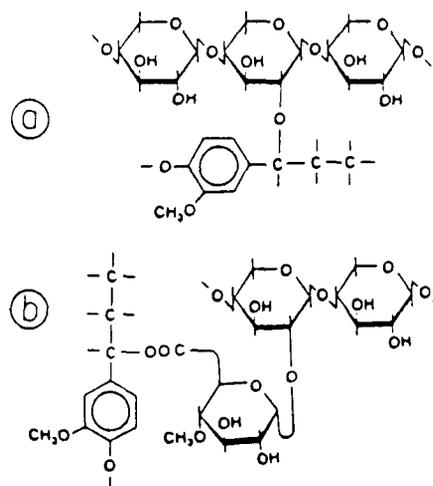


Fig. 18: Types de liaisons proposées entre la lignine et les polysaccharides pariétaux.
 (D'après Azuma, 1989)
 a- Liaison benzyl éther.
 b- Liaison benzyl ester.

al., 1980)).

Dans les fibres d'*Hibiscus cannabinus* notamment, tous les substituants glucuronosyl du D-xylane seraient liés à la lignine par l'intermédiaire de liaisons esters (Das *et al.*, 1984). Au cours de la croissance cellulaire les polysaccharides pariétaux peuvent porter des chaînes latérales de nature phénolique (Markwalder et Neukom, 1976; Hartley et Jones, 1977).

Les arabinoxylanes pariétaux de Graminées sont les principaux polysaccharides portant des chaînes latérales de nature phénolique. Chez les Graminées matures, la proportion d'acides *p*-coumariques et féruliques peut atteindre 5 à 10 % des composants phénoliques de la paroi et une proportion de ces unités acides est estérifiée par l'intermédiaire des groupements carboxyliques aux arabinoxylanes (Higuchi *et al.*, 1967).

Il semble qu'ils soient férulés au niveau des substituants arabinosyl en position 5 (Kato et Nevins, 1985; Gubler *et al.*, 1985; Ahluwalia et Fry, 1986; Hartley, 1987). Dans une variété de plante herbacée, l'herbe Pangola *Digitaria decumbens*, les acides coumariques estérifient le C-1 du xylane (Ford, 1986).

L'analyse des esters d'oligosaccharides de faible masse moléculaire, isolés après traitement des parois par des polysaccharides hydrolases a permis de déterminer l'existence des liaisons esters entre les acides phénoliques et les polysaccharides pariétaux. En effet, Fry (1982), a isolé 2 disaccharides férulés de D-galactose et de L-arabinose des parois issues de culture de cellules de dicotylédones (d'épinards) en suspension. Un trisaccharide férulé, O-[5-O-(trans-feruloyl)- α -L-arabinofuranosyl]-(1 \rightarrow 3)-O- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-xylopyranose a été isolé des tissus de plusieurs espèces de Graminées (Azuma, 1989).

Un trisaccharide présentant la même structure mis à part qu'il était estérifié par un acide coumarique a été isolé de chaume d'orge (Mueller *et al.*, 1986)

Un autre ester comportant le tetrasaccharide O- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-O-[5-O-trans-feruloyl)- α -L-arabino-furanosyl-(1 \rightarrow 3)]-O- β -D xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-xylopyranose, a été isolé et provient d'un hydrolysats enzymatique de complexe "L.C.C." de canne à sucre (Kato *et al.*, 1987).

D'autre part les acides féruliques forment également des liaisons ether avec la lignine (Scalbert *et al.*, 1985-1986).

La plupart des acides *p*-coumariques des parois de bambou et des plantes herbacées sont estérifiées sur la lignine en position γ des chaînes latérales (Shimada *et al.*, 1971; Nakamura et Higuchi, 1976).

L'intérêt porté à de tels composés découle du fait que ces dérivés phénoliques sont susceptibles de se dimériser *in vivo* par un processus d'oxydation radicalaire. Par conséquent, tous les polysaccharides et particulièrement les arabinoxylanes qui étaient attachés aux dérivés phénoliques, se voient indirectement liés par un pont diférule. De telles réactions de dimérisation ont pu être reproduites *in vitro* (Hartley *et al.*, 1990), à partir des groupements *p*-coumaroyl et feruloyl d'arabinoxylanes sous l'influence d'un traitement photochimique (voir Fig. 19, p. 39).

Un tel mécanisme de pontage doit se produire au niveau des groupements *p*-coumaroyl et feruloyl adjacents liés aux arabinoxylanes, occasionnant ainsi une augmentation de la rigidité de la paroi et une diminution de la biodégradabilité des polysaccharides pariétaux. De telles réactions de dimérisation doivent avoir lieu au niveau des parois de Graminées et ainsi jouer un rôle crucial dans l'élaboration des parois au cours de la croissance cellulaire. Ainsi une accélération du processus de couplage par l'intermédiaire des dérivés phénoliques conduirait à la formation d'une paroi aux propriétés altérées plus particulièrement avec une extensibilité diminuée, suivie d'une diminution de la vitesse de croissance (Fry, 1983; 1986), une digestibilité diminuée et une résistance accrue aux maladies (Ride, 1975). Au contraire une inhibition des réactions de couplage au sein de la paroi conduirait à une meilleure extensibilité et digestibilité des parois. Un modèle de pontage entre les polysaccharides, les lignines et les acides phénoliques est illustré dans la figure 20 (p. 40).

II - AUTRES INTERACTIONS COVALENTES DES XYLANES IN SITU.

a - Avec les pectines.

Sur la base des travaux de différents auteurs (Aspinall, 1980; Darvill *et al.*, 1980 a; Knee et Bartley, 1981; Stephen *et al.*, 1983), Selvendran (1985) a tiré les conclusions suivantes concernant les interactions des hémicelluloses avec les substances pectiques:

- Une partie des résidus galacturoniques des régions "flexibles" des pectines serait liée à des groupements hydroxyl des résidus monosaccharidiques des hémicelluloses et

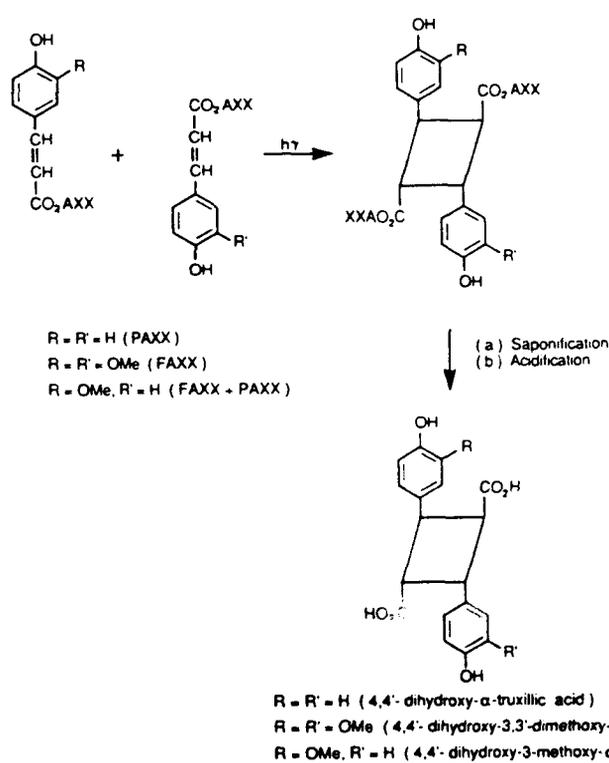
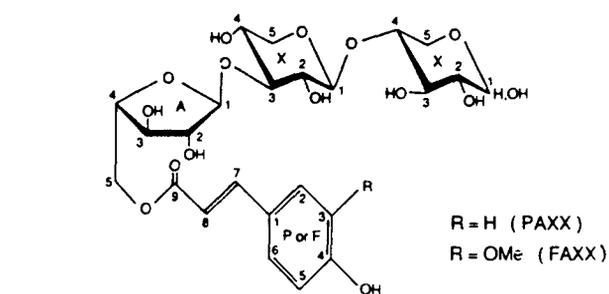


Fig. 19: Réaction de dimérisation reproduite *in vitro* à partir des groupements *p*-coumaroyl et feruloyl d'arabinoxylanes sous l'influence d'un traitement photochimique. (D'après Hartley, 1990)

Les *O*-[5-*O*-(*E*)-*p*-coumaroyl]- α -L-arabinofuranosyl-(1 \rightarrow 3-*O*- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4-D-xylopyranose (PAXX) et (FAXX) ont été isolés des parois de *Cynodon dactylon* après un traitement préalable par des polysaccharide-hydrolases. Les esters ont été exposés à la lumière plusieurs jours. Après saponification, 3 dimères majeurs d'acides *p*-coumariques et feruliques ont été formés.

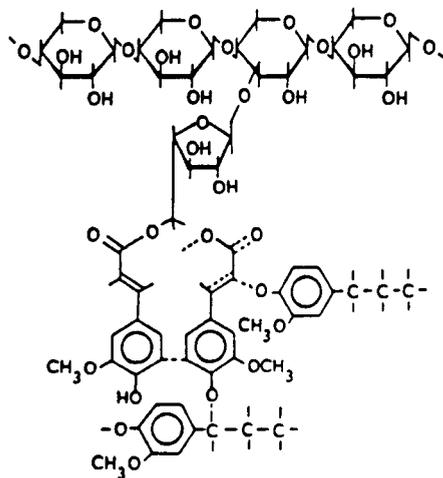


Fig. 20: Modèle de pontage entre les polysaccharides pariétaux, les lignines et les acides phénoliques.
(D'après Azuma, 1989)

même aux groupements hydroxyl des composés polyphénoliques (formant eux-même des complexes avec les hémicelluloses), le tout formant un complexe "supramacromoléculaire".

- On peut également concevoir qu'une partie des groupements hydroxyl des résidus monosaccharidiques appartenant aux chaînes latérales neutres des pectines soient engagées dans des liaisons esters

* avec des résidus d'acides uroniques de complexes hémicellulosiques eux-mêmes sous forme de (L.C.C.)

* avec des dérivés d'acide hydroxycinnamique, en particulier l'acide férulique.

Chez certaines dicotylédones, le groupement acide férulique serait lié aux résidus d'arabinose en O-3 et aux résidus de galactopyranose en O-6. Ces 2 résidus appartiennent aux chaînes latérales neutres des polysaccharides pectiques et sont situés en position non terminale (Fry, 1982).

b - Les complexes de type protéoglycane.

D'autres complexes du type polysaccharide-proteine et polysaccharide-proteine-polyphénol dont la partie polysaccharidique est représentée par les substances pectiques, les xyloglucanes, les arabinoxylanes, les β -glucanes, (ou par la combinaison de ces derniers), ont été mis en évidence dans les tissus de certaines dicotylédones.

Notre but n'étant pas d'établir une liste exhaustive de toutes les interactions possibles, nous nous limiterons à les résumer sous forme d'un Tableau (Tableau II, p. 42, d'après Selvendran, 1985).

Certaines protéines de ces complexes pourraient être des enzymes pariétales ayant été immobilisées par des liaisons phénoliques et glycosidiques et localisées au niveau de sites spécifiques de la paroi. Ces protéines associées à ces complexes se distinguent des glycoprotéines pariétales riches en hydroxyproline et qui ont un rôle structural (Lamport et Catt, 1981).

TABLEAU II

Les complexes hémicellulosiques de type polysaccharide-protéine et polysaccharide-protéine-polyphénol mis en évidence dans les tissus de certaines dicotylédones. (D'après Selvendran, 1985).

	Polymer type*	Main glycosidic linkages †	Types of complexes ‡
Apples	Hemi. comp. (H13)	(1→4)Xylp, (1→2,4)Xylp, T-Xylp, (1→5)Araf, T-Araf	Arabinoxylan-pectic arabinan-protein
	Hemi. comp. (H16)	(1→4,6)Glc p, (1→4)Glc p, T-Xylp, (1→2)Xylp, T-Galp	Xyloglucan-pectic arabinan
	Hemi. comp. (H17)	(1→4)Xylp, T-Araf, (1→5)Araf, (1→2,3,5)Araf, (1→2)Galp	Arabinoxylan-pectic arabinan-xyloglucan
	Xyloglucan (H9)	(1→4,6)Glc p, (1→4)Glc p, T-Xylp, (1→2)Xylp, T-Galp	Xyloglucan
Immature cabbage	Hemi. comp. (A2)	(1→4,6)Glc p, (1→4)Xylp, (1→4)Glc p, T-Araf, (1→5)Araf	Xyloglucan-arabinoxylan-pectic arabinan-protein
	Hemi. comp. (B)	(1→4)Xylp, (1→2,4)Xylp, T-Araf, (1→2)Xylp, (1→5)Araf	Arabinoxylan-pectic arabinan-xyloglucan-protein
Immature carrots	Hemi. comp. (KB2)	(1→4)Galp, T-Araf, (1→2,3,5)Araf, (1→5)Araf, (1→3,5)Araf	Pectic arabinogalactan 1-polyphenol
	Hemi. comp. (4KA1)	(1→4)Galp, (1→4)Xylp, T-Araf, (1→5)Araf, (1→3,5)Araf	Pectic arabinogalactan 1-xylan-polyphenol
Runner beans	Hemi. comp. (D1H1)	(1→4)Galp, (1→4)Glc p, (1→4,6)Glc p, (1→4)Xylp, (1→2)Araf	Pectic arabinogalactan 1-xylan-protein-polyphenol
	Hemi. comp. (D2H1)	(1→4)Xylp, (1→2,4)Xylp, T-Xylp, (1→4)Galp, T-Araf	(Arabino?)xylan-pectic arabinogalactan I-protein-polyphenol
	Hemi. comp. (D4H1)	(1→4)Xylp, (1→2,4)Xylp, (1→3,6)Galp, (1→4)Galp, (1→4,6)Glc p	(Arabino?)xylan-pectic arabinogalactans I and II-xyloglucan-protein-polyphenol

Reference: O'Neill & Selvendran (1985a).
 * For the relative amounts of the complexes see Tables 9 and 10.
 † Only the first five major glycosidic linkages are listed.
 ‡ The carbohydrate moieties of the complexes are listed in decreasing order.

c - Complexes xylane-glucane.

Des complexes phénoliques constitués de résidus d'acide férulique et de galacto-arabinoxylanes (caractéristiques des xylanes de Graminées, Wilkie, 1979) associés à des β -(1,3)(1,4)-D-glucanes ont été isolés des parois de *Lolium perenne*, (Tanner et Morrison, 1983). Ces β -glucanes, de nature non cellulosique, ont également été isolés du bambou et des tissus matures d'autres espèces de plantes herbacées, associés à un xylane acide (Wilkie et Woo, 1977).

III - ASSOCIATIONS DES XYLANES PAR DES LIAISONS NON COVALENTES.

a - Les liaisons ioniques.

Des liaisons ioniques pourraient intervenir entre les groupements COO^- des acides glucuroniques des xylanes et les groupements $-\text{NH}_3^+$ de la lysine entièrement chargée au pH biologique, ainsi que le groupement imidazol de l'histidine (entièrement chargée aux pH inférieurs à 6) de l'extensine (Fry, 1989).

b - La liaison hydrogène.

Malgré la faible énergie de cette liaison (3-6 kCal/mole) comparativement aux énergies de liaisons covalentes qui sont de l'ordre de 80-110 kCal/mole, ce type d'interaction au niveau de la paroi est loin d'être négligeable en raison de la présence de nombreux groupements -OH et -O- portés par les polymères pariétaux et susceptibles *in situ* d'interagir pour former de nombreuses liaisons hydrogène.

C'est en partie la présence des chaînes latérales et des groupements acétyl au niveau des hémicelluloses qui empêche les associations des chaînes glucidiques en microfibrille comme pour la cellulose. Cependant elles ont la possibilité de former des liaisons hydrogène à la surface des microfibrilles de cellulose (Fry, 1989).

Au niveau de la paroi primaire, les xyloglucanes sont étroitement liés à la cellulose par des liaisons hydrogène (Hayashi, 1989). Les associations du xylane aux polymères pariétaux peuvent aussi être de nature non covalente.

Le xylane a tendance à s'adsorber à la cellulose (Mc Neil, 1984) et à s'aggréger à d'autres composants hémicellulosiques par les interactions hydrogène. On a pu

notamment observer que dans des fibres préalablement délignifiées, l'accessibilité de la cellulose à l'hydrolyse par des cellulases était augmentée lorsqu'on débarrassait sélectivement par voie enzymatique ces fibres des xylanes (Sinner *et al.*, 1976 a) et des mannanes (Sinner *et al.*, 1979). Par contre une préhydrolyse sélective de la cellulose et des mannanes, n'améliore pas l'accessibilité du xylane aux xylanases.

On suppose par conséquent que le xylane pourrait intervenir dans la cohésion des fibres, étant donnée que son élimination sélective entraîne une meilleure accessibilité des autres polysaccharides par les enzymes, par augmentation notamment de la porosité des fibres (Grethlein, 1985; Wong *et al.*, 1988)

CHAPITRE II

LES XYLANASES

A - INTRODUCTION.

Le terme de complexe xylanasiqne regroupe les enzymes qui hydrolysent les β -1,4 xylanes substitués ou non. Il existe également des β -1,3 xylanases capables d'hydrolyser les liaisons β -1,3-D-xylopyranosyl de certains xylanes d'algues marines, mais ces enzymes ne feront pas l'objet de notre étude.

Le complexe xylanasiqne proprement dit peut être classé, selon Reilly (1981), de la manière suivante:

1 - Les endo- β -1,4-xylanases (E.C. 3.2.1.8), qui sont des endo-glycosidases, hydrolysent la chaîne principale formée par des résidus de xylose pour conduire à la formation de xylo-oligosaccharides (et de xylose pour certaines d'entre elles). Ce type d'enzyme ne peut pas hydrolyser le xylobiose.

2 - Les exo- β -1,4-xylanases hydrolysent de manière récurrente les chaînes de xylane, à partir de l'extrémité non réductrice, pour libérer du xylobiose. L'existence réelle de cette classe de xylanase est actuellement controversée (P. Debeire, communication personnelle).

3 - Les β -xylosidases (E.C. 3.2.1.37), qui sont des exo-glycosidases, qui libèrent des résidus de xylose à partir de l'extrémité non réductrice des xylanes ou des xylo-oligosaccharides.

En raison de la très grande hétérogénéité structurale des xylanes, il convient d'ajouter au système xylanolytique les exo-glycosidases "débranchantes", α -arabinosidases et α -glucuronidases sans omettre les enzymes qui jouent un rôle capital dans la dégradation des xylanes *in situ*, comme les acétyl-estérases et les féraxanases.

Dans ce chapitre nous essaierons de dégager les différents aspects des rôles des xylanases afin de mieux comprendre les fonctions des multiples endo- β -1,4-xylanases produites par les microorganismes et même dans certains cas par un même microorganisme. Nous passerons en revue leurs rôles physiologiques, que ce soit dans la plante, dans les relations plante-pathogène ou dans les phénomènes de biodégradation de la biomasse végétale. D'autre part, bien que peu de recherches aient été consacrées à la détermination des mécanismes enzymatiques réels impliquant les xylanases dans la dégradation des xylanes *in situ*, nous essaierons d'apporter les dernières hypothèses dans ce domaine.

B - LE COMPLEXE XYLANOLYTIQUE (voir Fig. 21, p. 47)

I - LES EXOGLYCOSIDASES.

a - Les β -xylosidases.

La distinction établie entre les xylanases et les β -xylosidases dans les systèmes xylanolytiques est bien reconnue (Reilly, 1981). Cependant elles présentent un large éventail de spécificités d'actions vraisemblablement attribuables à des fonctions spécifiques particulières qui ont été développées par les microorganismes en réponse à l'hétérogénéité des xylanes. On peut rappeler à ce propos que la plupart des auteurs utilisent le substrat artificiel *p*-nitrophényl- β -D-xylopyranoside pour doser l'activité β -xylosidasique.

1 - Répartition dans la nature.

La plupart des systèmes hémicellulolytiques microbiens contiennent des β -xylosidases qui ont été caractérisées dans de nombreuses espèces fongiques et aussi

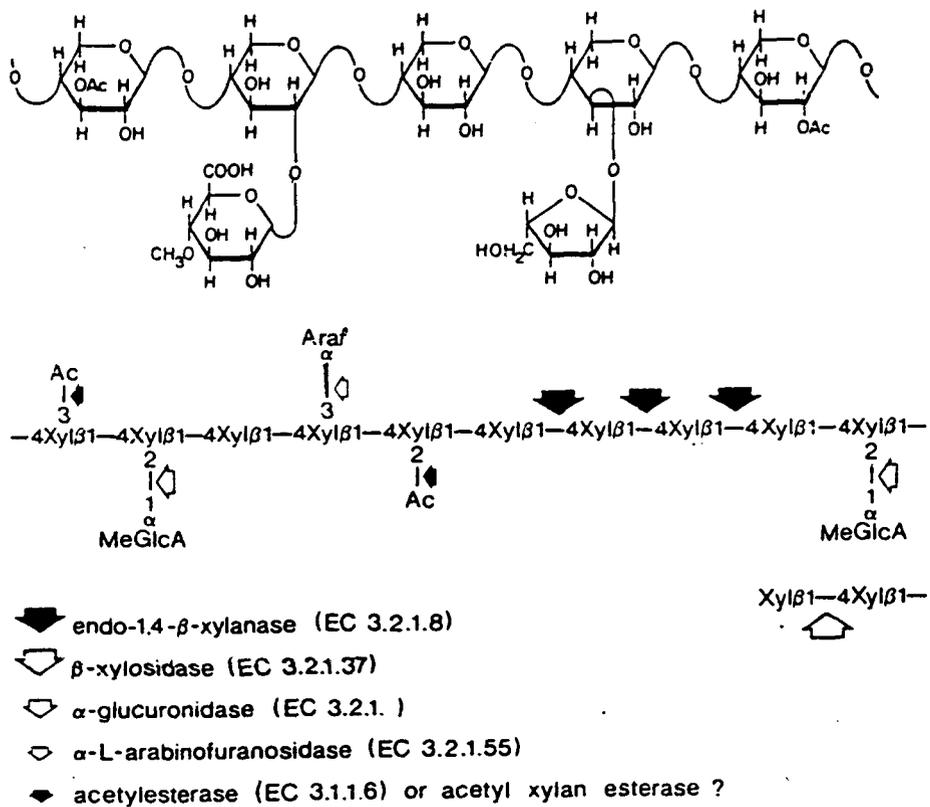


Fig. 21: Représentation hypothétique d'une molécule de xylane et des sites de coupures par les enzymes appartenant au système xylanolytique.
 (D'après Biely, 1985)
 Le fragment constitué de 5 unités de D-xylose est représenté dans la partie supérieure de la figure.
 Ac = groupement acétyl
 Araf = L-arabinofuranose
 MeGlcA = acide 4-O-méthyl-D-glucuronique
 Xyl = D-xylose

chez quelques bactéries. Leur productivité en β -xylosidase demeure toutefois très faible (de l'ordre de quelques UI/ml de milieu de culture) comparée à la productivité en endoxylanases. Elles ont été décrites chez les espèces fongiques comme *Aspergillus niger* (Claeyssens *et al.*, 1971; Rodionova *et al.*, 1983), *Aspergillus fumigatus* (Kitpreechavanich *et al.*, 1986), *Trichoderma viride* (Matsuo et Yasui, 1984 a), *Trichoderma reesei* (Poutanen *et al.*, 1988), *Emericella nidulans* (Matsuo et Yasui, 1984 b), *Chaetomium trilaterale* (Uziee *et al.*, 1985) et chez les bactéries comme *Bacillus pumilus* (Kerstens-Hilderson *et al.*, 1969), *Bacillus coagulans* (Esteban *et al.*, 1983) et plus récemment *Clostridium acetobutylicum* (Lee et Forsberg, 1987 a).

2 - Mécanismes d'action.

Dans les systèmes xylanolytiques, les β -xylosidases libèrent du xylose à partir des extrémités terminales non réductrices de courtes chaînes xylo-oligosaccharidiques produites sous l'action d'endoxylanases. Elles jouent par conséquent un rôle primordial dans la diminution de l'inhibition de l'activité endoxylanasique par les produits de la réaction notamment par le xylobiose (Reilly, 1981).

Parmi les xylo-oligomères, le xylobiose est souvent le meilleur des substrats et le rendement d'hydrolyse décroît avec l'augmentation du DP de la chaîne xylo-oligosaccharidique (Van Doorslaer *et al.*, 1985; Matsuo et Yasui, 1984 b; Rodionova *et al.*, 1983). La plupart des β -xylosidases n'ont pas d'activité envers le xylane (Bachmann et Mc Carty, 1989).

b - Les α -arabinofuranosidases [E.C. 3.2.1.55]

1 - Répartition dans la nature.

Les arabinofuranosidases ont été caractérisées chez les espèces fongiques (Fielding et Byrde, 1969; Baker *et al.*, 1979), les levures (Uesaka *et al.*, 1978) et les bactéries (Weinstein et Albersheim, 1979; Greve *et al.*, 1984).

2 - Mécanismes d'action.

Elles sont en général très actives sur le *p*-nitrophényl- α -L-arabinofuranoside et hydrolysent avec une activité moindre les arabinanes et les arabinoxyanes. Komae *et al.*, 1982 ont purifié une α -L-arabinofuranosidase de l'actinomycète *Streptomyces purpurascens*, agissant exclusivement sur le *p*-nitrophényl- α -L-arabinofuranoside et sur les α -L-arabino-oligosaccharides.

L' α -arabinosidase d'*Aspergillus niger* (Tagawa et Kaji, 1969) est capable de libérer le L-arabinose d'un L-arabino-D-xylane de blé. La réaction est suivie de la formation d'un précipité amorphe, constitué essentiellement de D-xylane avec des traces d'arabinose.

c - Les α glucuronidases.

1 - Répartition dans la nature.

Les α -glucuronidases sont produites par de nombreuses espèces de champignons et de bactéries (Poutanen *et al.*, 1990). Quelques une seulement, ont été purifiées jusqu'à homogénéité et caractérisées. Il s'agit de l' α -glucuronidase produite par *Agaricus bulgaricus* (Puls *et al.*, 1987), par *Trichoderma reesei* (Poutanen, 1988 b) et par *Thermoascus aurantiacus* (Khandke, 1989).

2 - Mode d'action.

Les α -D-glucuronidases hydrolysent les liaisons α -1,2 entre le xylose et l'acide glucuronique ou son 4-O-méthyl ether. La présence d'oligosaccharides acides dans les hydrolysats de xylane produits par des préparations d'enzyme hémicellulolytiques indique l'absence ou l'inactivité de cette enzyme envers ce substrat (Poutanen *et al.*, 1987; Sinner et Dietrichs, 1976 b). L'acide 4-O-méthyl-glucuronique a été détecté pour la première fois dans des hydrolysats enzymatiques de glucuronoxylane par Sinner *et al.*, (1972). L' α -glucuronidase associée à la β -xylosidase augmente la teneur en xylose produit au cours de l'hydrolyse enzymatique d'un xylane de bois de feuillus (Puls *et al.*, 1976).

L' α -glucuronidase d'*Agaricus bisporus* est inactive en présence de xylane polymérique, par contre elle est très active envers les

4-O-méthyl-glucurono-xylo-oligosaccharides substitués (jusqu'aux DP 5) et plus particulièrement envers le 4-O-méthyl-glucuronoxylobiose (Korte, 1990).

L' α -glucuronidase de *Thermoascus aurantiacus* hydrolyse les 4-O-méthyl-glucurono-xylooligomères substitués du X₁ au X₇ à des vitesses d'hydrolyse comparables à la vitesse d'hydrolyse du xylane (Khandke, 1989).

II - LES ESTERASES (voir la revue générale, Poutanen *et al.*, 1990).

Contrairement aux enzymes hydrolysant les liaisons glycosidiques des xylanes, les estérases ont été découvertes récemment. Ces enzymes libèrent les acides estérifiés au xylane. Il s'agit des acétyl xylane estérases qui éliminent les groupements O-acétyl liés aux C-2 et C-3 des résidus de xylose de la chaîne de xylane ou de xylo-oligomères, et des féruloyl estérases qui libèrent l'acide férulique des arabinoxylanes de monocotylédones.

La découverte tardive de ces enzymes est en partie liée à l'absence de substrat spécifique de ces enzymes. En effet, l'extraction alcaline des xylanes occasionne la saponification des groupements ester et l'emploi de techniques d'isolement plus douces, telles que le traitement du matériel végétal en milieu acide ou le traitement thermomécanique en phase aqueuse, offre l'avantage de conserver les groupements acétyl intacts. Ces méthodes présentent toutefois l'inconvénient d'hydrolyser partiellement le xylane en de plus petits fragments (Khan *et al.*, 1990; Puls *et al.*, 1985). Le choix du substrat pour les études de déacétylation des xylanes par les estérases est par conséquent primordial. Le polymère de xylane acétylé peut être isolé du matériel délignifié, par extraction au diméthyl sulfoxyde (Hägglund *et al.*, 1956).

a - Les acétyl estérases [EC 3.1.1.6.]

Les acétyl estérases constituent un groupe d'enzymes largement réparti dans la nature. Elles sont produites par les animaux, les plantes et les microorganismes (Krisch, 1971). Elles ont été mises en évidence par Biely *et al.*, (1985 a), au niveau de systèmes cellulolytiques et hémicellulolytiques fongiques: *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*, *Schizophyllum commune* et *Aureobasidium pullulans*.

Jusqu'à présent, seules les acétyl xylan estérases de *T. reesei*, ont pu être purifiées

et caractérisées (Poutanen et Puls, 1988 a). L'une, libère très peu d'acide acétique à partir de xylo-oligomères acétylés mais par contre est très active en présence d'acétyl xylobiose. L'autre, est présente sous forme de multiples isoenzymes et révèle une importante activité envers des fragments de xylane acétylé et envers l'acétyl-4-O-méthyl-glucuronoxylane (Poutanen *et al.*, 1991).

Par ailleurs, la déacétylation enzymatique de xylane de bois de hêtre entraîne la précipitation du polymère, occasionnée par des phénomènes d'aggrégation moléculaire comme dans le cas des arabinoxylanes après traitement par l' α -arabinosidase.

b - Les feruloyl estérases.

L'activité feruloyl estérase a été mise en évidence chez *Streptomyces olivochromogenes* (Mac Kenzie, 1987) et au niveau de systèmes hémicellulolytiques fongiques (Poutanen *et al.*, 1990). Récemment, une féruloyl estérase produite par *Aspergillus Oryzae* a été purifiée (Tenkanen *et al.*, 1991). Elle présente une large spécificité d'action et libère les acides férulique, *p*-coumarique et acétique d'arabinoxylane de chaume de blé extrait par "steam-explosion".

III - LES ENDO-B-1,4-XYLANASES.

Les endo- β -1,4-xylanases (endoxylanases) sont largement réparties dans le monde vivant. Elles sont produites par des bactéries d'environnements marin et terrestre anaérobies ou aérobies, par des champignons saprophytes, phytopathogènes et des mycorrhizes, par des levures, des protozoaires du rumen. On les rencontre également chez les insectes, les crustacés, les graines en germination et dans certaines plantes. Cette large répartition correspond évidemment à des fonctions biologiques différentes que nous étudierons dans le paragraphe C, p. 68. Parallèlement, il n'existe pas une endoxylanase mais des endoxylanases possédant des structures, des propriétés physico-chimiques et catalytiques différentes en fonction de leurs origines et de leurs rôles physiologiques et surtout, du type de substrat qu'elles auront à hydrolyser.

a - Classification.

Les différentes classifications concernant les xylanases ont fait longtemps appel à leurs propriétés physico-chimiques et catalytiques et ont évoluées récemment, en fonction des développements de la Biologie Moléculaire, pour aboutir à la notion de "familles d'enzymes" possédant des identités structurales.

1 - En fonction des propriétés catalytiques et physico-chimiques.

Les propriétés catalytiques des xylanases produites par un microorganisme seront voisines des conditions de culture du microorganisme (température, pH) et on peut classer les xylanases par exemple, selon leurs optima de température ou de pH, mais cette classification ne présente pas d'intérêt particulier au regard des xylanases puisqu'elle est évidemment valable pour toutes les enzymes. D'autre part, Wong *et al.* (1988) ont montré qu'il était possible de distinguer deux grands types de xylanases quelques soient leurs origines, en fonction de leurs masses moléculaires et de leurs pHi. Les deux catégories de xylanases sont les suivantes:

a - celles possédant des masses moléculaires élevées et conjointement des pHi acides.

b - celles possédant des masses moléculaires faibles et conjointement des pHi basiques.

Le Tableau III (p. 53) donne les caractéristiques de xylanases produites par différentes souches de *Bacillus*, de *Streptomyces*, de *Clostridium*, d'*Aspergillus* et de *Trichoderma*. Ce caractère est nettement plus vérifiable pour les bactéries que pour les champignons où il existe plusieurs infirmations de cette hypothèse.

2 - En fonction des produits d'hydrolyse.

Les produits majeurs de fin d'hydrolyse du xylane par les endoxylanases sont composés de xylo-oligosaccharides substitués ou non (il s'agit essentiellement du xylobiose (X₂) et du xylotriose (X₃) pour les oligosaccharides non substitués). Mais on a également constaté dans certains cas, *Aspergillus niger*, (John *et al.*, 1979); *Aspergillus*

TABLEAU III

Principales caractéristiques des xylanases produites par les souches de *Bacillus*, de *Streptomyces*, de *Clostridium*, d'*Aspergillus* et de *Trichoderma*. (D'après WONG, 1988).

Characterized xylanases from *Aspergillus* spp.

Species	Strain	Enzyme	MW (10 ³) ^a	pI	Optimum		Cleavage ^b		
					pH	Temp (°C)	Arabinose	X ₃	
<i>Aspergillus</i> sp.	Amano ^c		[21.9]	6.7	5.0	60	Y		
<i>A. niger</i>		I			4.5-5	45-50	Y	N	
		II			5.5-6	45-55	N	Y	
		I				5.5		N	Y
		II				5.0		Y	[Y]
		III				3.5		[Y]	[Y]
	14		33.0, [24.0], {24.7}	4.2	4.0	50	Y	Y	
	11	IIA	[31.0]		4.0	50	Y		
		IIB/IIC	[31.0]		4.0	50	Y		
		IID	[31.0]		6-6.5	50	Y		
		IA	[50.0]		5.5-6	65-80	Y		
	Rhozyme ^c	IB	[50.0]		4-4.5	65-80	Y		
		7II	[14.0], (13.5)	9.0	5.5	45	N	N	
		7I	[12.0], (13.5)	8.6	6.0	45	N	N	
		4/6III	[20.8]	6.7	4.5-5.5	50-60	N	Y	
		9-13B	[11.0], (16.5)	4.5	4.9	45	N	N	
15	8	28.0	3.6	5.0	40	N	N		
		[13-16], {14-16}	4.0	4.0-4.5			Y		

^a MW estimates were by SDS-PAGE. [], Gel filtration; { }, ultracentrifugation; (), high-performance liquid chromatography.

^b Ability to cleave arabinosyl substituents and xylotriase (X₃). Y, Yes; N, no; [Y], activity is relatively lower.

^c Brand name of crude enzyme.

Characterized xylanases from *Trichoderma* spp.

Species	Strain	Enzyme	MW (10 ³) ^a	pI	Optimum		Cleavage ^b	
					pH	Temp (°C)	Arabinose	X ₃
<i>T. harzianum</i>	E58	A	20.0, [8-11.5]	9.4	5.0	50	N	N
		B	22.0	8.5	4.5-5	45-50	N	Y
		C	29.0, [25.0]	9.5	5.0	60-65	N	Y
		D ^c		5.5				
		E ^c		5.0				
<i>T. koningii</i>	IMI 73022	2	17.7	7.3	4.5-5.5	50	N	N
		1	29.0	7.2	4.5-6	60	Y	Y
<i>T. lignorum</i>			20.0		6.5		N	
			21.0		3.5		N	
<i>T. pseudokoningii</i>	C-3		15.0, [6.0], {20-22}	9.6	5.0			
<i>T. reesei</i>	QM9414	3	[[8.5]]	10.3			Y	
		4	[[11.7]]	8.6			Y	
		2	[[40.7]]	8.5			Y	
		1	[[14.4]]	6.6			Y	
<i>T. viride</i>	Meicellase Onozuka	A			3.5	50		
		D-1	[16.0] 53.0, [53.0] [17.8]	9.2	4.8	59	Y	

^a MW estimates were by SDS-PAGE. [], Gel filtration; { }, ultracentrifugation; [[]], method not specified.

^b Ability to cleave arabinosyl substituents and xylotriase (X₃). Y, yes; N, no.

^c Enzyme had not been purified.

TABLEAU III (suite)

Characterized xylanases from *Sireptomycetes* spp.

Species	Strain	Enzyme	MW (10 ³) ^a	pI	Optimum		Cleavage ^b	
					pH	Temp (°C)	Arabinose	X ₃
<i>Sireptomycetes</i> sp.	E-86		{40.5}	7.3	5.5-6	55-60		Y
	KT-23		44.0, {42.0}	6.9	5.5	55		Y
	3137	X-II-B	25.0, {25.7}	10.3	5-6	60-65		Y
		X-II-A	25.0	10.1	5-6	60-65		Y
		X-1	50.0 {50.0}	7.1	5.5-6.5	60-65		Y
<i>S. exfoliatus</i>	MC ₁	Ib			5.5	50		
		Id			7.0	55		
		II			5.5	55		
<i>S. flavogriseus</i>	CD-45	X ₂	{[24.0]}		5.5			
		X ₁	{[42.0]}		5-7.5			
<i>S. lividans</i>	1326		43.0	5.2	6.0	60		
<i>S. xylophagus</i>					6.2	55-60	N	

^a MW estimates were by SDS-PAGE. [], Gel filtration: { }, ultracentrifugation: [[]]. method not specified.

^b Ability to cleave arabinosyl substituents and xylotriase (X₃). Y, Yes; N, no.

Characterized xylanases from *Bacillus* spp.

Species	Strain	Enzyme	MW (10 ³) ^a	pI	Optimum		Cleavage ^c	
					pH	Temp (°C)	Arabinose	X ₃
<i>Bacillus</i> sp.	C-59-2			6.3	6-8	60		
	11-1S		56.0		4.0	80	N	
	C-125	N	16.0		6-7	70		N
		A	43.0		6-10	70		N
	W1	I	21.5	8.5	6.0	65		Y
		II	49.5, {48.5}	3.6	7-9	70		Y
	W2	I	22.5	8.3	6.0	65		Y
		II	50.0, {51.0}	3.7	7-9.5	70		Y
<i>B. circulans</i>	WL-12	B ^c	{15.0}	9.1	5.5-7			
		A ^c	{85.0}	4.5	5.5-7			
<i>B. coagulans</i>	26	— ^c	{22.0}, {26.0}	10.0	6.0	37		
<i>B. pumilus</i>	IPO		24.0, {20.0}		6.5	45-50		Y
<i>B. subtilis</i>	PAP115		32.0		5.0	50		
	Novo Ban ^d		{9.5}		5.5	50		N

^a MW estimates were by SDS-PAGE. [], Gel filtration: { }, ultracentrifugation.

^b Ability to cleave arabinosyl substituents and xylotriase (X₃). Y, Yes; N, no.

^c Enzyme had not been purified.

^d Brand name of crude enzyme.

Characterized xylanases from *Clostridium* spp.

Species	Strain	Enzyme	MW (10 ³) ^a	pI	Optimum		Cleavage ^c	
					pH	Temp (°C)	Arabinose	X ₃
<i>C. acetobutylicum</i>	ATCC 824	B	29.0, {29.5}	8.5	5.5-6	60		Y
		A	65.0, {63.0}	4.4	5.0	50		N
	P262	— ^c	28.0	10.0	6.0	37-43		
<i>C. stercorarium</i>		A	44.0	4.5	6.5	75	N	
		C	62.0	4.4	6.0	75	N	
		B	72.0	4.4	6-7	75	N	

^a MW estimates were by SDS-PAGE. [], Gel filtration.

^b Ability to cleave arabinosyl substituents and xylotriase (X₃). Y, Yes; N, No.

^c Produced by *E. coli* carrying a gene from *C. acetobutylicum* P262.

niger STR 14 (Gorbacheva et Rodionova, 1977b), *Gliocladium virens* (Takahashi et Kutsumi, 1979), *Talaromyces byssochlamydoides*, (Yoshioka *et al.*, 1981b), *Robillarda sp.* (Koyama, 1990) de même que chez les levures: *Cryptococcus albidus* (Biely, 1980) et *Trichosporon cutaneum* (Stüttgen et Sahm, 1982), la présence de xylose dans les produits d'hydrolyse du xylane par certaines endoxylanases. Des endoxylanases d'origine bactérienne et productrices de xylose ont également été mises en évidence chez *Bacillus* No C-11 (Ikura et Horikoshi, 1977). La présence de xylose n'était pas due à l'action de β -xylosidases contaminantes et permettait de classer les endoxylanases en productrices et non productrices de xylose. Kanda *et al.*, (1985) ont montré que pour une endoxylanase de *Irpex lacteus*, le xylose dérivait des xylo-oligomères issus de l'hydrolyse du xylane et non pas du xylane lui-même, car il n'apparaissait qu'à partir de temps d'incubation longs. Le xylose pourrait être formé par des mécanismes de transglycosylation (*Trichoderma viride*, Beldman *et al.*, 1988; Debeire *et al.*, 1990; *Bacillus pumilus*, Panbangred *et al.*, 1983). Il est donc difficile de classer rigoureusement les xylanases de cette manière sans connaître exactement leurs mécanismes d'action.

Très peu d'auteurs ont étudié les structures des xylo-oligosaccharides substitués par de l'arabinose ou de l'acide glucuronique, produits par l'action de xylanases à partir de xylanes. Néanmoins, il serait possible de classer les endoxylanases en fonction du fait que les substituants des xylanes ont une action positive ou négative sur l'hydrolyse enzymatique. Certaines xylanases hydrolysent préférentiellement les xylanes substitués (Dekker et Richards, 1975; Frederick *et al.*, 1985) tandis que la majeure partie des endoxylanases ne peuvent dégrader des xylo-oligosaccharides substitués.

La plupart des endoxylanases hydrolysent les xylo-oligosaccharides de DP élevés avec une vitesse d'hydrolyse supérieure à la vitesse d'hydrolyse des xylo-oligosaccharides de DP faibles. Il existe cependant des endoxylanases hydrolysant préférentiellement de courts xylo-oligosaccharides par rapport aux xylo-oligosaccharides de DP supérieurs. La xylanase purifiée d'*Aspergillus niger* (Takenishi et Tsujisaka, 1985), est responsable de l'hydrolyse du xylotrirose avec toutefois une activité sur les xylo-oligosaccharides supérieurs.

Le Tableau III (p. 53) rassemble quelques microorganismes produisant des xylanases qui hydrolysent les xylotrioses.

3 - En fonction de la spécificité enzymatique.

Une autre classification beaucoup plus intéressante repose sur la spécificité des xylanases. Des xylanases possédant une activité arabinosidasique ont été décrites (Takenishi et Tsujisaka, 1985; Dekker, 1985; Dekker et Richards, 1976; Toda *et al.*, 1971), alors que des xylanases présentant une activité glucuronidasique n'ont encore jusqu'à présent jamais été mises en évidence. En étudiant les modes d'action de 3 endoxylanases produites par *Aspergillus niger*, Takenishi et Tsujisaka, (1985) ont montré qu'elles agissaient en synergie avec une endoxylanase exprimant une activité arabinosidasique en coupant la liaison α -1,3-arabinofuranosidique d'arabino-xylo-oligosaccharides. Le Tableau III (p. 53) rassemble quelques microorganismes, produisant des xylanases qui libèrent les résidus arabinosyl des xylo-oligosaccharides substitués.

Certaines endo- β -1,4-glycanases présentent des spécificités croisées vis à vis de divers polysaccharides du matériel lignocellulosique. En particulier, certaines endoxylanases et endoglucanases ont une large spécificité envers des substrats variables (les xylanes, la carboxymethylcellulose, la cellulose cristalline, le lichenan: polymère de glucose dont la chaîne est constituée d'une alternance de liaisons β -1,4; β -1,3), ou une activité secondaire non négligeable.

Sachant que la production d'endoxylanases par les microorganismes est rarement dissociée de la production de cellulases, l'existence de ces activités mixtes a longtemps été mise en doute et a souvent été attribuée à des problèmes de contaminations résultant d'une purification incomplète des enzymes.

Cependant il serait impropre de considérer certaines enzymes comme de vraies endoxylanases, si leur activité xylanolytique ne constitue qu'une fonction hydrolytique secondaire par rapport à une activité cellulasique majeure.

Actuellement il est possible d'opposer les endoxylanases et les endoglucanases portant des caractéristiques hydrolytiques mixtes, aux endoxylanases vraies totalement dépourvues d'activité cellulasique, depuis l'obtention de ces enzymes par clonage.

Le xylane serait par conséquent hydrolysé par les endoglucanases possédant une activité endoxylanasiq, par les endoxylanases possédant une activité cellulasique, par les endoxylanases vraies totalement dépourvues d'activité cellulasique.

a - Les endoglucanases possédant une activité endoxylanasiq

Des préparations cellulasiqes purifiées, hydrolysant à la fois la cellulose et le xylane ont été produites par exemple par la souche thermophile de *Bacillus sp* (Uchino et Nakane, 1981), ou *Irpex lacteus* (Kanda et al., 1976). Il a également été démontré que la CMC et le xylane pouvaient parfois entrer en compétition pour le même site actif d'une cellulase (Wong et al., 1988). L'hypothèse souvent émise à ce propos est la suivante: la structure chimique des résidus xylosyl du xylane diffèrent peu des résidus glucosyl de la cellulose avec l'atome d'H remplaçant le CH₂OH du C5 du glucose.

b - certaines endoxylanases possédant une activité cellulasiq

Les endoxylanases qui hydrolysent la cellulose cristalline en plus du xylane ont été caractérisées parmi les espèces fongiqes suivantes; *Aspergillus niger* (John et al., 1979), *Trichoderma reesei* QM 9419 (Biely, 1985 b).

L'exemple des 2 xylanases de *Clostridium acetobutylicum* (Lee et al., 1987 b) illustre parfaitement bien leur non spécificité. Les xylanases A et B de cette bactérie ont été purifiées jusqu'à homogénéité. La xylanase A est capable d'hydrolyser en plus du xylane, la carboxyméthylcellulose avec une activité spécifique supérieure à celle du xylane, la (acid-swollen) cellulose et le lichenan. Néanmoins, elle n'hydrolyse pas la laminarine (un polymère du glucose dont les résidus sont liés par des liaisons β -1,3), ce qui indique qu'elle hydrolyse uniquement les liaisons β -1,4. La xylanase B hydrolyse le lichenan avec une activité spécifique proche de celle du xylane (Tableau IV, p. 58).

D'après ces exemples on peut cependant s'interroger sur les critères sur lesquelles se sont basés les auteurs pour affirmer que ces enzymes et plus particulièrement la xylanase A, sont des xylanases plutôt que des glucanases (la xylanase A ne présente pas une activité nettement préférentielle sur le xylane, comparativement à l'activité sur la CMC).

c - les endoxylanases vraies totalement dépourvues d'activité cellulasiq

La majeure partie des endoxylanases ne possèdent pas d'activité cellulasiq. Dans les cas où une xylanase purifiée présente une activité cellulasiq, seul le clonage de l'enzyme pourra apporter la preuve de la double fonctionnalité de la xylanase.

TABLEAU IV

Activité des endoxylanases de *Clostridium acetobutylicum* envers différents substrats.
(D'après LEE *et al*, 1987).

Substrate (major linkage)	Xylanase A activity (U · mg of protein ⁻¹)	Xylanase B activity (U · mg of protein ⁻¹)
Larchwood xylan (β1-4)	5.38	6.76
Oat spelt xylan (β1-4)	4.67	3.96
Carboxymethyl cellulose (β1-4)	6.76	0.20
Methyl cellulose (β1-4)	0.90	<0.01
Acid-swollen cellulose (β1-4)	3.40	<0.01
Lichenan (β1-4; β1-3)	1.33	5.21
Laminarin (β1-3)	0.05	<0.01
Mannan (β1-2)	<0.01	ND ^a
Polygalacturonic acid (α1-4)	0.03	<0.01
Arabinogalactan (β1-3; β1-6)	<0.01	<0.01
<i>p</i> -Nitrophenyl-β-D-xyloside	0.01	<0.01
<i>p</i> -Nitrophenyl-α-L-arabinofuranoside	<0.01	0.01

^a ND, Not determined.

4 - Structures primaires, secondaires et tertiaires des xylanases.

Une douzaine de xylanases (voir la revue générale de Gilkes *et al.*, 1991) ont été clonées et leurs séquences peptidiques ont été déterminées à partir des données des séquences de DNA. D'après une classification basée sur la détermination de leurs structures secondaires le long de la chaîne protéique et les comparaisons d'analogie entre les différentes enzymes, Henrissat *et al.*, (1989), Gilkes *et al.*, (1991) ont proposé de classer les cellulases et les xylanases en 9 familles. En ce qui concerne les xylanases, elles se regroupent en 3 familles (famille F, G et H), et diffèrent notablement, d'un point de vue de leurs structures secondaires (ordonnées le long de la chaîne protéique) des cellulases. En particulier, les xylanases de faibles masses moléculaires (\cong 20 kDa) présentent de fortes analogies de structure et sont rassemblées au sein d'une même famille (6). La cristallisation des xylanases et les données issues des expériences de diffraction des rayons X, conduiront à une meilleure compréhension des relations Structure-Fonction de ces enzymes. Deux xylanases ont été actuellement cristallisées mais ces résultats ne sont que préliminaires (Moriyama *et al.*, 1987; Rose *et al.*, 1987).

b - Modes d'actions

1 - La présence des substituants du xylane est importante étant donné qu'ils limitent l'hydrolyse enzymatique.

Certaines endoxylanases purifiées (Brillouet, 1987; Takenishi et Tsujisaka, 1975) sont capables d'hydrolyser les Xyl₃ alors que les Xyl₂GlcA et Xyl₃GlcA ou AraXyl₃ ne sont pas hydrolysés. Ceci indique que les substituants protègent les liaisons xylosidiques de ces xylanases. D'autre part, les substituants acides des Xyl_nGlcA libérés sont le plus souvent liés aux résidus xylosyl situés en position terminale non réductrice (Brillouet, 1987; Kubackova *et al.*, 1979; Comtat et Joseleau, 1981) indiquant que les liaisons xylosidiques situées immédiatement à gauche des points de branchement sont hydrolysées.

2 - Multi-attaque

L'étude des propriétés cinétiques d'une endoxylanase purifiée chez *Clostridium thermolacticum* (Debeire *et al.*, 1990), ont révélé que cette endoxylanase était capable d'agir par multi-attaque sur les chaînes de xylane. Le K_m exprimé par cette enzyme vis à vis du X_5 est du même ordre que sur xylane de mélèze, par contre la vitesse d'hydrolyse sur le xylane comparée à celle obtenue sur X_5 , est 5 fois supérieure. Ces résultats reflètent probablement la capacité de cette enzyme à hydrolyser par attaque multiple une chaîne polysaccharidique, en se fixant dans un premier temps sur la chaîne, l'enzyme se glissant sur cette dernière après chaque hydrolyse.

3 - Etude de la xylanase de 39 kDa de *Clostridium thermolacticum* (Debeire *et al.*, 1990).

a - Nombre de sous-sites.

Les vitesses relatives d'hydrolyse obtenues sur des xylo-oligosaccharides neutres (Xyl_{4-7}), montrent qu'une chaîne comportant au minimum cinq résidus xylosyl permet d'obtenir une vitesse d'hydrolyse significative: le Xyl_3 n'est pas hydrolysé, le Xyl_4 est hydrolysé 20 fois plus lentement que le Xyl_5 , et la vitesse initiale de ce dernier est identique à celle obtenue sur Xyl_6 . Ces résultats suggèrent par conséquent que cette endoxylanase présente 5 sous-sites de fixation.

b - Détermination de la position du site catalytique (voir Fig. 22 et 23, p. 61, 63).

Les produits de fin d'hydrolyse renfermaient 58 % de xylo-oligosaccharides neutres comportant autant de Xyl_2 que de Xyl_3 , et 42 % de xylo-oligosaccharides acides comportant 1,6 % de Xyl_3GlcA , 18,1 % de Xyl_4GlcA , 15,1% de Xyl_5GlcA et 7,2 % d'un mélange de Xyl_6GlcA et de $Xyl_n(Glc)_2$. Leur structure primaire a été déterminée à partir des résultats issus des expériences de méthylation et des analyses de spectrométrie de 1H -RMN et ^{13}C -RMN. Le xylose était présent sous forme de traces.

La présence de xylo-oligosaccharides substitués Xyl_nGlcA comportant au moins 3 résidus xylosyl, libérés en quantité non négligeable sous l'action de cette endoxylanase sur le glucuronoxylane de mélèze, montrait qu'elle était capable d'hydrolyser la chaîne

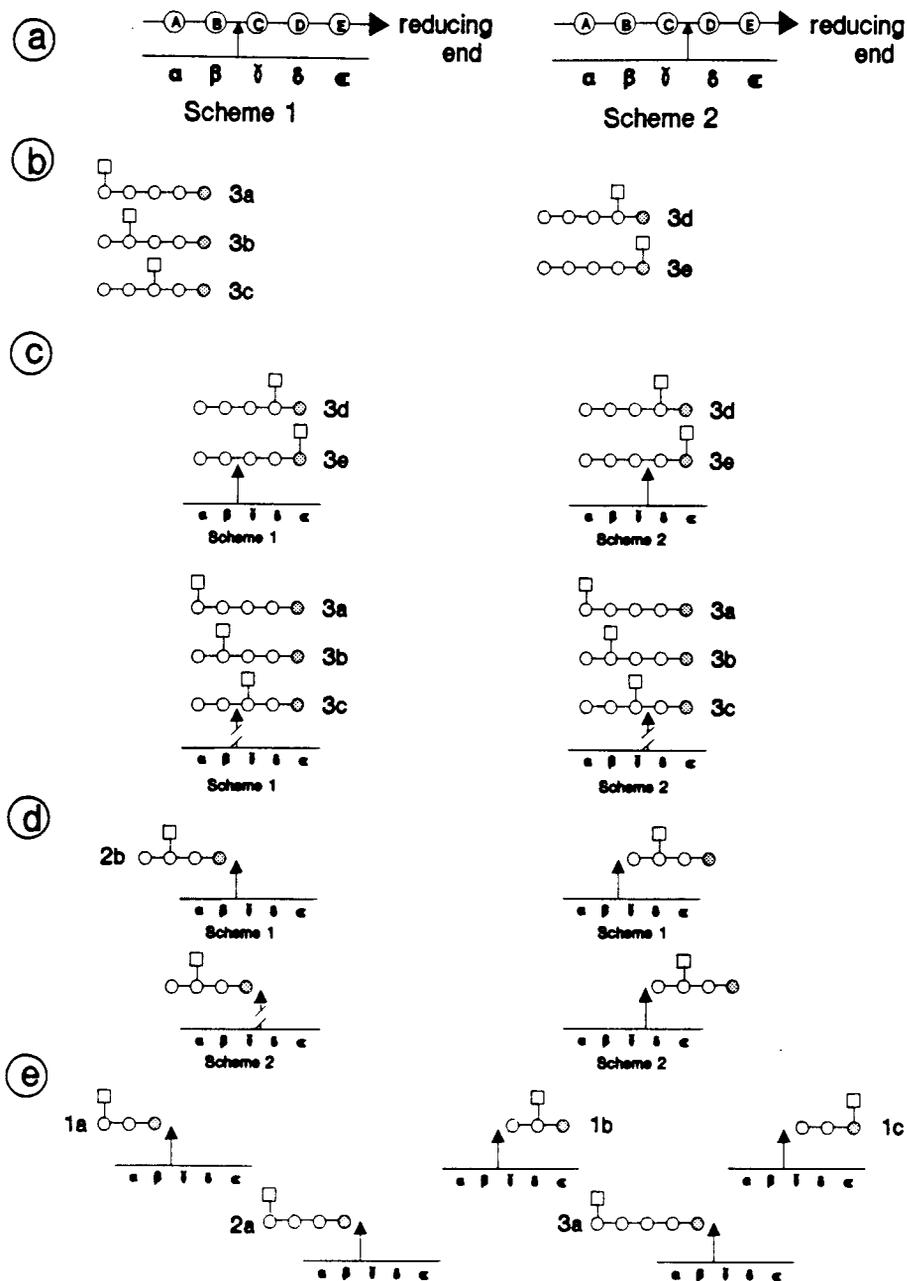


Fig. 22: Détermination de la position du site catalytique de la xylanase de *Clostridium thermolacticum* de masse moléculaire de 39 kDa.

(D'après Debeire *et al.*, 1990)

(a) Les schémas 1 et 2 représentent les 2 positions possibles des sites de coupure entre les résidus de xylose se situant entre B et C, ou entre C et D.

(b) Représentation schématique des structures primaires: des Xyl_3GlcA libérés (composés 3 a-c) et non libérés (3 d et e), par hydrolyse à long terme de xylane de mélèze par la xylanase I (39 kDa).

(c) Représentation schématique d'après les schémas 1 et 2 du complexe [E-S] en fonction des acides Xyl_nGlcA produits ou non.

(d) Si le site de coupure est localisé entre C et D (schéma 2), cela signifie que A-C ne sont pas substitués. Ceci n'est pas en accord avec la production de 2b ou 3c (avec un acide 4-O-méthylglucuronique substituant le 3^{ème} xylose à partir de l'extrémité terminale réductrice) [voir Figure 23].

(e) Ce schéma montre comment les Xyl_3GlcA (1 a-c), Xyl_4GlcA (2a) et Xyl_5GlcA (3a) peuvent résulter de l'hydrolyse au niveau du site de coupure indiqué par la flèche.

α , β , γ , δ et ϵ sont les sous-sites de liaison de la xylanase I; A-E représentent les 5 résidus xylosyl voisins; (○) = xylose non-réducteur; (◉) = xylose réducteur; (□) = 4-O-méthylGlcA; (→) = hydrolysé; (↘) = non hydrolysé.

de xylane même si elle ne comportait pas une séquence de 5 résidus xylosyl adjacents non substitués.

Les 5 sous-sites de fixation de l'enzyme étaient nommés α , β , γ , δ et ϵ avec ce dernier orienté vers l'extrémité terminale réductrice du substrat, et les 5 noyaux pyranosyl adjacents par A-B-C-D-E (Mc Cleary et Matheson, 1983) (Fig. 22, p. 61). Étant donné la présence de xylose à l'état de trace au niveau des produits de fin d'hydrolyse, le site catalytique de l'enzyme pourrait se positionner entre B et C ou entre C et D, mais sur la base des structures primaires des Xyl_nGlcA (Fig. 23, p. 63), l'hydrolyse aurait lieu entre B et C. La présence d'acide uronique lié au résidu xylosyl situé en position terminale réductrice ou au groupement xylosyl adjacent au niveau des fractions Xyl_4GlcA et Xyl_5GlcA n'avait pas été mise en évidence. La figure 22 (p. 61) montre les différentes possibilités pour la production ou non production de glucurono-xylo-oligosaccharides par la xylanase, à partir de glucuronoxylane. La présence, parmi les produits d'hydrolyse acides, d'oligosaccharides majeurs dont les substituants sont internes à la chaîne (Fig. 23; 2b et 3c, p. 63), était en faveur d'un site catalytique situé entre B et C, et par conséquent signifiait que les sous-sites δ et ϵ se liaient à des résidus xylosyl substitués et que les sous-sites α , β et γ ne pouvaient se lier à des résidus xylosyl substitués. La présence des produits mineurs 1a-c, 2a et 3a de la figure 23 (p. 63), d'après ce modèle avec un site de coupure situé entre B et C, devraient uniquement provenir de l'hydrolyse de l'une des deux extrémités et par conséquent ces composés pourraient être issus de l'hydrolyse des extrémités terminales réductrices et non réductrices des chaînes de xylane.

4 - Activité préférentielle sur xylane soluble ou insoluble.

Certaines xylanases sont capables d'hydrolyser le xylane insoluble. Le clonage des gènes des xylanases A et B produites par *Streptomyces lividans* par complémentation fonctionnelle dans les mutants "xylanase et cellulase négatifs" de la même souche 10-164 (Mondou *et al.*, 1986; Vats-Mehta *et al.*, 1990) a permis d'établir que chacune codait pour une enzyme spécifique. La xylanase A hydrolysait de courtes chaînes xylo-oligosaccharidiques solubles dans l'eau, mais présentait par contre peu ou pas d'activité hydrolytique envers des fragments plus longs et insolubles. En revanche, la xylanase B agissait sur les 2 types de substrats, mais préférentiellement sur les longues chaînes de xylane insoluble (Kluepfel *et al.*, 1990).

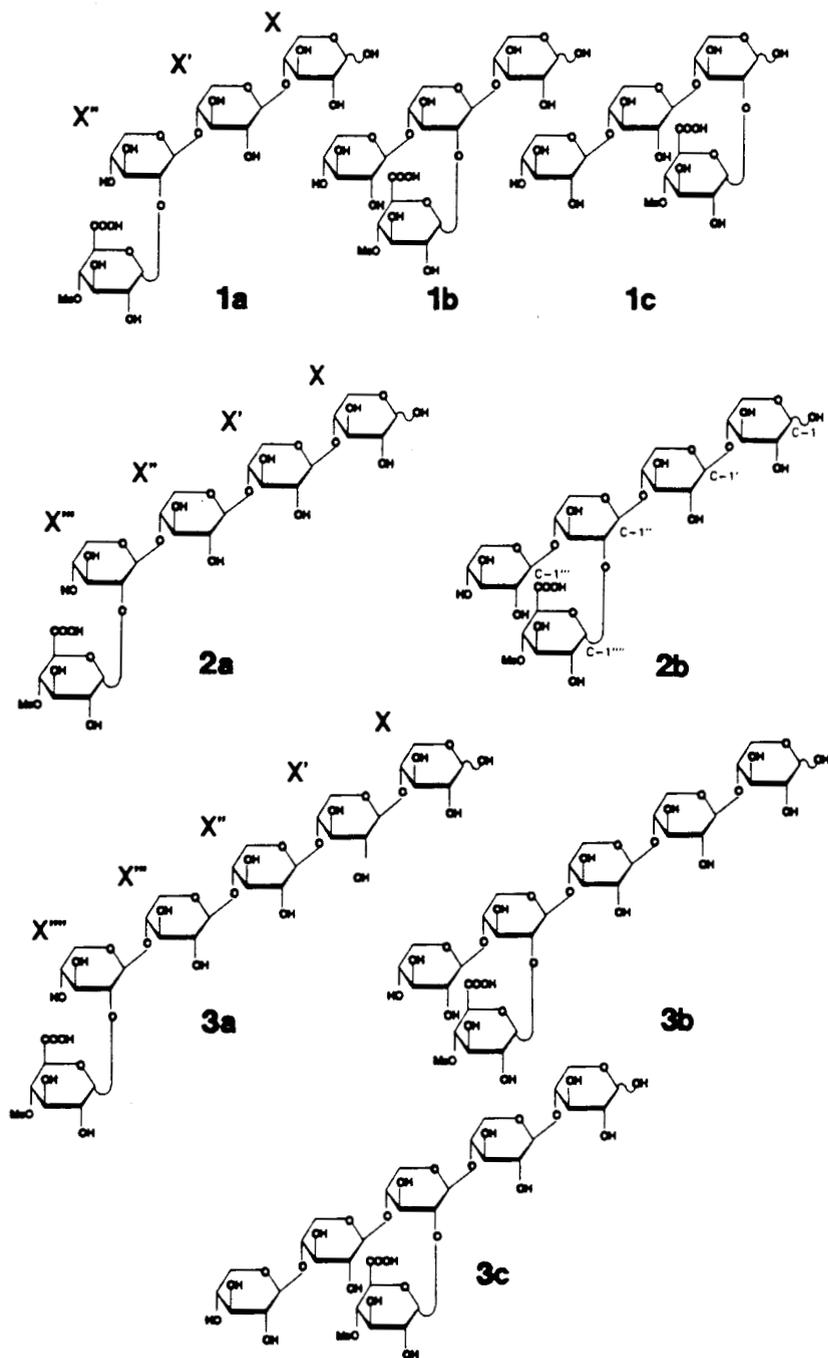


Fig. 23: Structures primaires proposées des Xyl₃-GlcA obtenus par hydrolyse à long terme de xylane de mélèze par la xylanase I produite par *Clostridium thermolacticum*.
 C-1 correspond au carbone anomérique du xylose en position terminale réductrice, et C-1' au carbone anomérique du xylose adjacent au xylose en position terminale réductrice, etc..
 X correspond au xylose réducteur, et X' correspond au xylose adjacent au xylose situé en position terminale réductrice.

Par ailleurs, (Shei *et al.*, 1984) ont suggéré que la capacité des xylanases à hydrolyser les xylanes insolubles (xylane de mélèze Sigma) pouvait être liée à l'affinité que présentent certaines endoxylanases pour les points de branchements, sachant que le xylane insoluble est moins substitué. En effet, une endoxylanase produite par *Aspergillus niger* (Frederick *et al.*, 1985), présentait une activité hydrolytique envers les fractions solubles et insolubles de xylane, avec une activité moindre sur cette dernière, et semblait nécessiter la présence de points de branchements puisque, après avoir enlevé au préalable les substituants du xylane insoluble, on constatait une perte de l'activité de l'enzyme envers cette fraction. Cette endoxylanase semblait donc nécessiter la présence de points de branchement pour réaliser l'hydrolyse et l'activité sur le xylane insoluble était plus faible puisque ce dernier était moins substitué que le xylane soluble.

Shei *et al.*, (1984) ont également pu établir que l'hydrolyse moindre des xylanases vis à vis des xylanes insolubles était liée à l'hydratation de la molécule de xylane, sachant que les xylanes insolubles sont moins hydratés car moins substitués. En effet, 2 autres endoxylanases ont pu être isolées à partir de la même souche. L'une (Frederick *et al.*, 1981), ne présentait pas d'affinité pour les points de branchement, ni pour des xylanes insolubles préalablement désubstitués, ou des xylanes insolubles non traités. L'autre (Shei *et al.*, 1985) n'hydrolysait pas le xylane au niveau des points de branchement, et hydrolysait préférentiellement les xylo-oligosaccharides linéaires. Elle présentait une faible activité envers les xylanes insolubles, qu'ils soient désubstitués ou non.

Par conséquent, le problème résidait dans le fait qu'une enzyme ne présentant aucune affinité pour des points de branchement, ne présentait pas ou peu d'affinité envers du xylane insoluble. Salyers *et al.*, (1982) avaient montré antérieurement qu'un autoclavage convertissait le xylane insoluble de mélèze, en xylane soluble. Ce dernier était alors hydrolysé de la même manière que le xylane de mélèze initialement soluble. Il apparait donc que le défaut d'hydratation des xylanes insolubles puisse représenter un obstacle pour certaines enzymes plus qu'à d'autres.

5 - Dégradation des xylanes intégrés

Le rôle des xylanases bactériennes et fongiques consiste en la dégradation des xylanes, *in situ* dans la paroi végétale. Les produits issus de la dégradation des xylanes constituent une source de carbone et d'énergie pour les microorganismes, et cette

hydrolyse peut s'effectuer conjointement avec la dégradation des autres composés lignocellulosiques de la biomasse, par d'autres enzymes produites par les mêmes ou par d'autres microorganismes.

Classiquement, la majeure partie des études enzymologiques réalisées sur les xylanases, a été réalisée à partir de xylanes isolés, ce qui n'est évidemment pas extrapolable à ce qui se passe réellement dans la nature.

Les problèmes rencontrés reposent sur:

- Les facteurs limitant la dégradation des xylanes intégrés, qui sont de nature variable et peuvent être liés à des problèmes d'inaccessibilité du substrat par les xylanases pour des raisons d'ordre physiques.
- L'hydrolyse limitée du xylane en raison de sa nature branchée et en particulier, sur l'influence des liaisons lignines-xylanes sur l'hydrolyse du xylane.

c - Multiplicité.

Il s'avère que les liaisons xylosidiques du matériel lignocellulosique ne sont pas toutes équivalentes et accessibles de manière égale à tous les enzymes xylanolytiques. L'accessibilité à certaines liaisons peut également changer au cours de l'hydrolyse. La production d'un système d'enzymes xylanolytiques munies individuellement d'une fonction spécifique, est l'une des stratégies employées par les microorganismes pour accomplir une hydrolyse maximale du xylane. La multiplicité des xylanases a pu être constatée dans de nombreux microorganismes (Dekker, 1985). A l'exception des levures qui produisent le plus souvent un seul type de xylanases, les bactéries comme par exemple *Clostridium stercorarium* (Bérenger *et al.*, 1985) ou *Streptomyces exfoliatus* (Sreenath et Joseph, 1982) et les champignons *Aspergillus niger* (Biely *et al.*, 1986) produisent souvent au moins 3 types de xylanases différentes.

Fréquemment dans ces systèmes xylanolytiques, on a détecté à l'aide de techniques de zymogrammes, de nombreuses activités xylanasiques mineures, ajoutées aux xylanases majeures.

Leur fonction *in situ* n'est pas bien établie pour plusieurs raisons:

1 - Tout d'abord leur réelle présence en quantité mineure est discutable et pourrait éventuellement provenir des procédures de purification qui sont susceptibles de favoriser l'isolement d'une famille d'enzymes par rapport à d'autres.

2 - Si ces activités xylanasiques existent réellement en quantités mineures, elles

jouent probablement un rôle dans l'hydrolyse *in situ* de liaisons particulières peu fréquentes. Cette hypothèse reste à être vérifiée étant donné que les substrats modèles utilisés ne reproduisent jamais la structure du substrat *in situ* et ne permettent donc pas toujours de distinguer les différentes classes d'enzymes.

Par ailleurs, il est encore difficile d'établir sur quelles bases se forment ces systèmes xylanolytiques étant donné que de nombreux facteurs tels des phénomènes de régulation, de modifications post-traductionnelles et les spécificités croisées de ces enzymes, sont susceptibles d'être à l'origine de cette multiplicité.

- *Les xylanases multiples peuvent être le produit d'un seul gène:*

Il a déjà été montré dans le cas des cellulases que les modifications post-traductionnelles (glycosylation, protéolyse) pouvaient être à l'origine de leur multiplicité (Nakayama *et al.*, 1979). De nombreuses xylanases sont des glycoprotéines et contiennent des chaînes glycaniques dans les proportions de 1 à 36.6 % (Dekker et Richards, 1976; Yoshioka *et al.*, 1981; Khandke, 1986; Kluepfel *et al.*, 1990), et quelques unes d'entre elles sont apparemment synthétisées en tant que précurseur avec des séquences peptidiques signal (Fukasaki *et al.*, 1984; Hamamoto *et al.*, 1987; Morosoli, 1985; Paice *et al.*, 1986). L'expression du gène de la xylanase de *Aeromonas* sp. souche 212 clonée dans *E.Coli* produit une xylanase de 135 kDa, qui dans la même espèce fongique non clonée produit une xylanase de 145 kDa aux propriétés hydrolytiques, immunologiques, et physicochimiques identiques. A partir de ces résultats, les 2 enzymes apparaissent par conséquent comme les produits du même gène (Kudo *et al.*, 1985).

- *Les xylanases multiples d'un système xylanolytique peuvent également être les produits de gènes distincts.*

Des études comparatives basées sur la composition en acides-aminés de xylanases produites par un même microorganisme et visant également à déterminer par l'index de Cornish-Bowden leurs différences de composition en acides-aminés, ont apporté les preuves de l'existence dans les systèmes xylanolytiques de xylanases issues de gènes distincts. Aucune des 3 xylanases isolées à partir de *Trichoderma harzianum* E 58 (Wong *et al.*, 1986), n'est directement reliée à l'autre par une identité précurseur /

produit. D'autre part les xylanases de *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 (Lee *et al.*, 1987 b), se distinguent d'un point de vue immunologique.

Wong *et al.*, (1988), suggèrent que si individuellement des xylanases sont pourvues de fonctions distinctes (en particulier parce qu'elles sont issues de gènes différents) et ce afin de contribuer à la dégradation maximale du xylane, alors ces fonctions xylanolytiques distinctes pourraient être conservées parmi les systèmes xylanolytiques de microorganismes différents, au cours des processus d'évolution. En sa faveur, on a pu constater des formes de conservation entre des familles d'endoxylanases appartenant à des systèmes xylanolytiques différents. Il s'agit des xylanases produites par les espèces suivantes; *Aspergillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Streptomyces* et *Trichoderma* (voir Tableau III, p. 53), dont la multiplicité a été la plus étudiée. Il apparaît qu'il existe parmi ces xylanases, la conservation de la relation entre leurs masses moléculaires et leurs pI, regroupant ainsi les xylanases possédant des masses moléculaires élevées et conjointement des pI acides, et celles possédant des masses moléculaires faibles et conjointement des pI basiques. Cette dichotomie semble être conservée parmi les espèces de *Clostridia*, *Bacillus* et *Streptomyces* bien que pour cette dernière espèce, les xylanases de masses moléculaires élevées présentent des pI proches de la neutralité. Cette dichotomie est toutefois moins nette chez *Aspergillus* et *Trichoderma*, qui présentent essentiellement des xylanases de faible masse moléculaire et des pI basiques.

Par conséquent, si les xylanases multiples appartenant à la même catégorie (MW élevé/ pI acide ou MW faible/ pI basique), sont les produits de gènes distincts, il est possible qu'elles présentent des fonctions relativement similaires ou qu'elles dérivent d'un gène commun.

IV - LES FERAXANASES

Les feraxanases sont des xylanohydrolases particulières purifiées chez *Bacillus subtilis* (Nishitani et Nevins, 1988). Elles sont capables de dégrader des glucurono-arabinoxylanes férulés (les feraxanes), envers lesquels elles présentent une importante activité spécifique. Cependant, l'étude de leur mode d'action ainsi que la nature des chaînes latérales impliquées au niveau de la reconnaissance Enzyme-Substrat, ont montré que leur activité dépendait étroitement de caractéristiques structurales liées aux substituants de la chaîne principale. Actuellement on dispose de

plus amples informations concernant la spécificité de ces enzymes envers les glucuronoxylanes (Nishitani et Nevins, 1991 a): ces enzymes reconnaissent les substituants GlcA répartis le long de la chaîne principale, liés en α -1,2 aux résidus xylosyl, et hydrolysent les liaisons β -1,4 de résidus xylosyl non substitués, adjacents aux résidus xylosyl, substitués par les acides glucuroniques (Fig. 24, p. 69). Une unité constituée au minimum de la séquence [-(GlcA)-Xyl-Xyl] est nécessaire pour la reconnaissance. Elles n'hydrolysent jamais les β -1,4-xylanes non substitués et ne libèrent jamais de xylo-homo-oligomères, ce qui montre que leur activité nécessite la présence de chaînes latérales spécifiques. Par contre, la présence ou la délétion au niveau des glucurono-arabinoxylanes des substituants arabinosyl, n'a pas d'influence sur l'hydrolyse du substrat, contrairement à la plupart des endoxylanases pour lesquelles l'hydrolyse est modifiée. Les féraxanases devraient par conséquent constituer une nouvelle catégorie de xylanohydrolases (Nishitani and Nevins, 1991 a).

C - ROLES BIOLOGIQUES

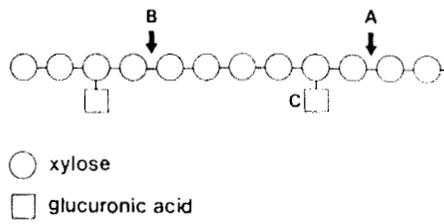
I - ROLE DES XYLANASES DANS LA BIODEGRADATION

La fonction principale des xylanases dans la biodégradation est de fournir aux microorganismes une source d'énergie directement métabolisable (Dekker et Richards, 1976). Les xylanases sont associées à la biodégradation de la couche végétale du sol en voie de décomposition, en fournissant aux microorganismes par lesquelles elles sont produites, des substrats carbonés directement assimilables.

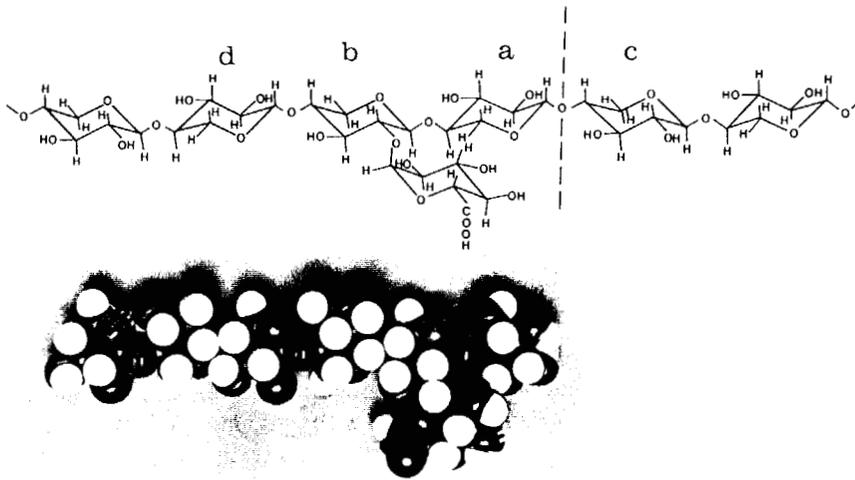
Les xylanases et d'autres carbohydrases participent également à la dégradation du bois et des écorces. *Aspergillus fumigatus* qui produit une xylanase extracellulaire sur certains substrats, est la moisissure la plus fréquemment rencontrée dans les écorces et les sciures de bois.

II - ROLE DES XYLANASES CHEZ LES HERBIVORES RUMINANTS

Les hémicelluloses constituent 40% du matériel végétal ingéré par les ruminants et sont dégradées par les xylanases produites par la flore microbienne du rumen (Woodward, 1984). Williams et Withers (1981) ont isolé des souches hémicellulolytiques du rumen d'ovins appartenant au genre *Eubacterium*, *Ruminococcus* ou *Bacteroides*. IL a



1



2

Fig. 24: Mode d'action proposé de la glucuronoxylane xylanohydrolase (féraxanase) envers un glucuronoxylane.
 (D'après Nishitina et Nevins, 1991; 1 et 2)
 (1) Les flèches indiquent les sites de coupure. L'enzyme reconnaît les substituants GlcA en C, et hydrolyse les liaisons β -1,4 entre les résidus xylosyl en A.
 (2) Position du site de coupure par la glucuronoxylanase (en pointillés). a: résidu xylosyl non substitué, b: résidu xylosyl substitué par un acide glucuronique, c et d: résidus xylosyl éventuellement substitués par l'arabinose.
 Le modèle moléculaire représente la région terminale réductrice du produit de la réaction.

été établi que les sites de dégradation du xylane dans le rumen étaient surtout extracellulaires (Morrison, 1976) mais pouvaient également avoir lieu à la surface des cellules bactériennes (Pettipher et Latham, 1979)

III - DEGRADATION DU XYLANE PAR LES AGENTS PHYTOPATHOGENES

On a pu mettre en évidence des xylanases ainsi que d'autres enzymes produites par des agents pathogènes fongiques responsables de la dégradation du matériel parietal du haricot et du maïs.

Colletrichum lindemuthianum est responsable de l'antracnose du haricot et *Helminthospora maydis* est responsable du charbon du maïs (Anderson, 1978)

Une xylanase est également impliquée dans le parasitisme de la moisissure *Colletotrichum lagenarium* qui infeste les fruits charnus (Doux-Gayat *et al.*, 1978). Il existe également des agents pathogènes de nature bactérienne impliquant les xylanases (Maino *et al.*, 1974). Bien que l'activité xylanasiq ue n'apparaisse pas comme étant une caractéristique spécifique des bactéries pathogènes des plantes, des études menées sur les espèces *Achromobacter* sp., *Pseudomonas acidovorano*, *P. apii*, *P. flectans* et *Erwinia gercina* ont montré qu'elles étaient capables de dégrader le xylane.

IV - ROLE PHYSIOLOGIQUE DES XYLANASES AU NIVEAU DU METABOLISME DES POLYSACCHARIDES DE RESERVE DE LA GRAINE EN GERMINATION

Dans les graines de céréales en germination, les cellules de la couche d'aleurone (constituée de 85 % d'arabinoxylane) sont responsables *in vivo* de la synthèse et sécrétion dans l'endosperme, d'enzymes extracellulaires responsables du métabolisme des polysaccharides de réserve (Dekker et Richards, 1976). On a notamment montré que la production du système xylanolytique dans les couches d'aleurone de l'orge était induite par l'acide gibbérellique (Dashek et Chrispeels, 1977)

V - AUTRES ORIGINES DES XYLANASES.

Les activités xylanasiques mises en évidence dans certains fruits (Yamaki et Kakiuchi, 1979), sont fortement augmentées au cours de la période de mûrissement et doivent de ce fait jouer un rôle important dans la dissociation cellulaire associée à la période de mûrissement.

La présence de xylanases au niveau du système digestif d'invertébrés (Dekkers et Richards, 1976) tels que les crustacés, les insectes et les gastéropodes herbivores, suggère qu'elles ont une fonction dans la digestion du matériel végétal ingéré (Alexander, 1979).

La plupart des bactéries et champignons (Dekker et Richards, 1976) produisent des xylanases extracellulaires. Cependant certains microorganismes comme par exemple les bactéries du rumen, les protozoaires, *Sprocytophaga myxococcoïdes* et *Aspergillus niger* produisent des xylanases intracellulaires.

D - APPLICATIONS BIOTECHNOLOGIQUES

Les applications biotechnologiques des xylanases concernent essentiellement les endoxylanases et s'adressent principalement aux industries de la boisson et de la panification. Dans ces cas, les endoxylanases sont utilisées comme auxiliaire de fabrication et leur utilisation est basée sur la dépolymérisation de xylanes contaminants, gênant soit les procédés de fabrication (filtration en brasserie) ou influant sur la qualité des produits finis (panification).

Les xylanases utilisées pour ces différentes applications sont d'origine fongique et commercialisées sous forme de mélange enzymatique. Par exemple, la préparation Novozym 280 commercialisée par Novo renferme un mélange de différentes hémicellulases.

Les applications industrielles les plus prometteuses des xylanases concernent:

- la biodégradation du matériel lignocellulosique par les xylanases, soit en association avec les cellulases dans le cas de la production de monosaccharides (facilement convertibles en produits chimiques ou en carburants), soit plus

spécifiquement pour la production de nouvelles molécules à plus forte valeur ajoutée (xylo-oligosaccharides et dérivés) utilisables en alimentation animale ou humaine (se référer aux références des brevets).

- et surtout le blanchiment enzymatique des pâtes papetières. Vu l'importance du marché (3 milliards de \$, si 1/3 d'économie en chlore, Biofutur, Juin 1991), que pourrait revêtir l'utilisation des xylanases dans ce domaine, et l'intérêt de l'utilisation d'un procédé biotechnologique en remplacement des procédés chimiques classiquement utilisés et qui sont à l'origine de pollutions très importantes, nous avons choisi délibérément de détailler ce type d'application.

I - POSITIONNEMENT DU PROBLEME.

a - Fabrication des pâtes chimiques et blanchiment (BIOFUTUR Juin 1991)

La transformation du bois en pâte par des traitement chimiques (sulfate, bisulfite) conduit à l'hydrolyse et à la dissolution des lignines. Le procédé sulfate (basique) présente toutefois l'avantage de préserver l'intégrité de la cellulose (partiellement hydrolysée en milieu acide) mais en présence de la lignine résiduelle conduit à la formation de quinones par oxydation des noyaux phénoliques, responsables de la coloration très brune de certains papiers et des cartons Kraft. L'utilisation du bisulfite entraîne l'élimination avec la lignine, d'une partie des hémicelluloses. Les pâtes écruées recueillies à l'issue de ces procédés contiennent encore une certaine quantité de lignine et le blanchiment des pâtes consiste en une délignification complémentaire par des agents oxydants. Le Cl_2 agit par substitution, addition, oxydation en formant des chlorolignines qui sont solubles et éliminées par extraction alcaline. Le dioxyde de chlore parachève l'oxydation, sans substitution, de la lignine persistante pour les pâtes au sulfate classiquement blanchies en cinq stades CEDED (C: chloration; E: extraction alcaline; D: traitement au dioxyde de chlore). La séquence C, E, H (H: hypochlorite de sodium) suffit pour les pâtes au bisulfite.

Actuellement on s'efforce de substituer le chlore qui engendre des dérivés organochlorés, par des traitements à l' O_2 , l' O_3 , l' H_2O_2 , qui sont plus coûteux mais moins polluants. Le blanchiment enzymatique apparait comme étant la solution la plus avantageuse.

II - LE BIOTRAITEMENT DES PÂTES A PAPIER: LE BLANCHIMENT ENZYMATIQUE.

a - Utilisation des lignines-peroxydases.

L'élimination des lignines résiduelles des pâtes écruées peut être réalisées par des microorganismes lignolytiques (Kirk and Yang, 1979). La lignine peroxydase est une enzyme extracellulaire impliquée dans la dégradation de la lignine et agit en présence de faibles concentrations en peroxyde (Kirk *et al.*, 1986). Aucune dégradation complète de la lignine macromoléculaire par cette enzyme n'a cependant été décrite. D'autre part des études *in vitro* ont révélé que l'enzyme induisait plus intensesment la polymérisation des substrats de lignine que leur dégradation (Haemmerli *et al.*, 1986).

b - Utilisation des xylanases.

Une autre approche basée sur l'hypothèse que les lignines résiduelles des pâtes écruées forment des complexes covalents avec les hémicelluloses (figure 25, p. 74, Paice *et al.*, 1988), consiste à utiliser des enzymes coupant spécifiquement ces liaisons sans altérer la qualité des pâtes par hydrolyse de la cellulose, et favoriseraient ainsi la délignification. Les arabinoxylanes sont les principales hémicelluloses rencontrées dans les bois de feuillus, et les liaisons covalentes entre les lignines et les arabinoxylanes sont réalisées par l'intermédiaire des résidus xylosyl ou arabinosyl (Eriksson et Lindgren, 1977; Joseleau et Gancet, 1981).

La destruction *in situ* du xylane par hydrolyse partielle pourrait laisser échapper des fragments de lignine et augmenter l'accessibilité des produits chimiques à la lignine résiduelle. A ce propos, on a pu montrer que l'hydrolyse spécifique des xylanes au niveau des parois des fibres, conduisait à la formation de micropores augmentant ainsi la surface spécifique des pâtes (Mora *et al.*, 1986).

L'élimination complète de tout le xylane n'est toutefois pas désirable étant donné qu'il contribue de manière significative à la résistance mécanique des fibres en augmentant les liaisons interfibres, et par conséquent améliore la qualité du papier (Roberts et El-Karim, 1983). L'élimination du xylane induit également une perte de rendement pondéral.

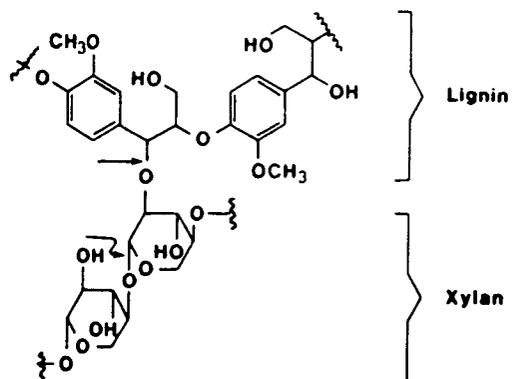


Fig. 25: Structure possible d'un complexe lignine-hémicellulose au niveau des pâtes papetières avant blanchiment.
(D'après Paice *et al.*, 1988)

c - Production de xylanases dépourvues d'activité cellulasique.

La stratégie actuellement employée pour obtenir des préparations xylanolytiques dépourvues de cellulases, est de cloner les gènes de la xylanase dans des organismes non cellulolytiques. Dans ces conditions, la quantité de xylanase produite est faible et les protéines exprimées sont le plus fréquemment intracellulaires (Wong *et al.*, 1988). Des résultats plus prometteurs pour la production de xylanases extracellulaires ont été obtenus en clonant les gènes de la xylanase issus des souches de *Aeromonas* sp. 212 (Kato *et al.*, 1986) et de *Bacillus* sp. C-125 chez *E.Coli* (Honda *et al.*, 1985). On a également pu mettre en évidence la production de xylanases par un mutant de *Streptomyces lividans*, cellulase et xylanase-négatif en clonant le gène de la xylanase issu de *S.lividans* (Mondou *et al.*, 1986).

TRAVAUX PERSONNELS

MATERIEL ET METHODES

A - PRODUCTION DES XYLANASES.

I - MICROORGANISMES UTILISES

C. thermolacticum souche TC 21 est une espèce anaérobie thermophile hémicellulolytique isolée au laboratoire et déposée à la D.S.M. (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen) sous le n° 2911 (Le Ruyet et *al.*, 1985).

Grâce à l'utilisation de procédés de fermentation en continu et en fed-batch permettant une alimentation contrôlée en substrat, les microbiologistes de notre laboratoire ont pu établir que la synthèse des xylanases chez *Clostridium thermolacticum* était soumise à une répression catabolique (Brodell et *al.*, 1990). La synthèse des xylanases est constitutive, peut être produite sur glucose ou sur d'autres sucres simples en absence de xylane. Les paramètres de fermentation ont été optimisés et ont permis de produire des xylanases en fermenteur de 200 l.

Les endoxylanases produites par cette souche avaient été partiellement caractérisées au laboratoire (Debeire et *al.*, 1990), mais il s'agissait d'enzymes produites par culture en batch. Le choix de cultiver cette bactérie en continu ou en fed-batch a permis d'augmenter 20 fois la productivité en enzymes.

Les meilleures productivités en xylanases décrites dans la littérature se retrouvent chez le genre *Bacillus*. Ces bactéries présentent en outre l'avantage d'être plus applicables en agro-alimentaire. Les microbiologistes de l'équipe ont isolé une nouvelle souche de *Bacillus*, la souche XE qui après optimisation des conditions de culture présentait la meilleure productivité en xylanase jamais décrite : 44 000 U.I./l/h de culture (la productivité de *Clostridium thermolacticum* était de 500 U.I./l/h). De plus un mutant hyperproducteur (mutant D3) a été isolé après action de la N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. Ce mutant permet d'obtenir des productivités de l'ordre de 77 000 UI/l/h de culture.

II - PRODUCTION DES XYLANASES.

a - Conditions de culture de *Clostridium thermolacticum*

La culture a été réalisée en fermenteur de 200 litres en fed-batch, sur glucose. La croissance de la souche TC 21 a d'abord été initiée en batch dans 140 litres de milieu de

culture. En fin de croissance exponentielle et afin de maintenir une concentration limitante en substrat, la culture a été alimentée en continu, par une solution de glucose à 40 g/l, soit 1 litre par heure. Cet apport a permis de maintenir les cellules dans un bon état physiologique et à cette concentration la synthèse d'enzyme n'était pas inhibée.

Le pH de croissance de la souche était de 7,4, la température de 63°C, et la souche a été cultivée pendant 40 heures.

b - Conditions de culture de *Bacillus* XE et du mutant D3.

La culture a été réalisée en fermenteur de 2 l, en fed-batch sur xylane (5 g x l-1) ou sur xylo-oligosaccharides (2 g x l-1). Le milieu d'alimentation a été ajouté en fin de croissance exponentielle et correspondait à une charge de 0,5 g x l-1 de sucres totaux. La température de fermentation a été fixée à 53°C et le pH à 7,8. Au bout de 9 h, la culture a été stoppée et centrifugée.

c - Préparation des extraits acellulaires.

Les cellules bactériennes ont été éliminées du milieu de culture de *Clostridium thermolacticum* par centrifugation en continu. Le surnageant a ensuite été concentré et dialysé par ultrafiltration sur cassette Pellicon, PTGC 10000 (Millipore), puis centrifugé à nouveau pour éliminer les cellules résiduelles en suspension.

Les cellules bactériennes de *Bacillus* ont été éliminées du surnageant de culture par centrifugation à 20 000 x g. Le surnageant a ensuite été dialysé et concentré en utilisant le module d'ultrafiltration Amicon TCF 10 (membrane 10.000).

Les surnageants ainsi obtenus constituaient les extraits enzymatiques bruts.

B- PURIFICATION DES ENDOXYLANASES

I - METHODES ANALYTIQUES

a - Mesures des activités enzymatiques.

1 - Activité xylanasiq

L'activité xylanasiqne a été déterminée à 60°C par le dosage des sucres réducteurs libérés lors de l'hydrolyse de xylane soluble de bouleau à 0,5 p 100 dans l'acétate de sodium 50 mM, pH 5,8. Une unité internationale (U.I.) d'activité xylanasiqne est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire à la libération d'une μ mole d'équivalent xylose par minute et à 60°C. Le dosage colorimétrique est réalisé soit:

- par dosage automatique sur une chaîne d'analyse Technicon (étalonnée avec du xylose), reliée à un enregistreur graphique.
- par la méthode classique du dosage des sucres réducteurs (voir p. 87).

2 - Activité carboxyméthylcellulasique

L'activité carboxyméthylcellulasique a été déterminée à 60°C par la mesure du taux de sucres réducteurs libérés par hydrolyse de la carboxyméthylcellulose (low viscosity, Sigma chemical) à 1 % dans l'acétate de sodium 50 mM, pH = 5,8. Une unité internationale (U.I.) d'activité carboxyméthylcellulasique est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire à la libération d'une μ mole d'équivalent glucose par min et à 60°C.

3 - Activité cellulasique (Avicel)

L'activité Avicelasique a été déterminée à 60°C, par la mesure des sucres totaux solubles, libérés à partir d'une suspension d'Avicel à 1 % dans le tampon acétate de sodium 50 mM, pH 5,8.

4 - Activité amylasique

L'activité amylasique a été déterminée à 60°C par la mesure du taux de sucres réducteurs libérés par hydrolyse d'amidon soluble (Merck) à 1 % dans l'acétate de sodium 50 mM, pH 5,8. Une unité internationale (U.I.) d'activité amylasique est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire à la libération d'une μ mole d'équivalent glucose par min et à 60°C. Le protocole expérimental est identique à celui décrit ci-dessus.

5 - Activités β -xylosidasique et β -glucosidasique

Les activités β -xylosidasique et β -glucosidasique ont été déterminées à 60°C, par libération de paranitrophénol à partir de solution de paranitrophényl- β -D-xyloside ou de paranitrophényl- β -D-glucoside : 50 μ l de solution enzymatique sont ajoutés à 250 μ l de tampon acétate de sodium 50 mM, pH 5,8 et 100 μ l de paranitrophényl-glucoside 10 mM. La réaction est arrêtée par ajout de 400 μ l de tampon glycolle NaOH 0,4 M, pH 10,8. La lecture est effectuée à 405 nm. Une unité internationale d'activité β -xylosidasique ou d'activité β -glucosidasique est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire à la libération d'une μ mole de paranitrophénol par min et à 60°C.

b - Dosage des protéines.

Le dosage des protéines solubles a été réalisé selon la méthode de Bradford (1976), ou de Lowry et *al.*, (1951). Dans certains cas, la teneur en protéines a été déterminée pondéralement.

c - Electrophorèse en milieu non dénaturant.

Elles ont été réalisées en gel de polyacrylamide selon le protocole de Laemmli, (1970). Le gel de séparation était constitué de polyacrylamide à 10% et l'électrophorèse était effectuée sous un ampérage constant de 20 mA.

d - Electrophorèse en milieu dénaturant.

Elles ont été réalisées en gel de polyacrylamide en présence de SDS 0,1% à une concentration en acrylamide de 12 %. Les échantillons étaient dénaturés à 100°C pendant 2 min dans le tampon de lyse (Tris-HCl 3M, pH 8,9; 5 % SDS; 5 % β -mercaptoéthanol; 20 % glycérol).

e - Techniques de zymogrammes (technique mise au point).

Nous avons mis au point des répliques du gel d'acrylamide après électrophorèse, parallèlement à la révélation des protéines au bleu de Coomassie, sur un gel constitué du substrat de l'enzyme, nous permettant ainsi de révéler spécifiquement l'activité xylanasiqque.

1 - Principe

On inclut dans un gel d'agar du xylane coloré au Remazol Brillant Blue (RBB). Le colorant est soluble et lié de façon covalente au polysaccharide. La haute sensibilité de cette méthode réside dans la solubilisation sélective par le solvant, du xylane RBB hydrolysé. Par conséquent, il apparaît sur le gel d'agar après réplique, des bandes translucides non colorées sur un fond bleu opaque nous permettant ainsi de localiser les bandes protéiques correspondant à l'enzyme sur le gel d'acrylamide après électrophorèse.

2 - Préparation des répliques d'agar

La préparation du xylane coloré au Remazol Brillant Blue (xylane RBB) a été réalisée selon le protocole de Biely *et al.*, (1985 c).

Pour 30 ml de gel : 150 mg de xylane RBB sont solubilisés dans 10 ml d'eau à 70°C puis mélangés à 20 ml d'une solution d'agar à 3 % (p/v) dans l'acétate de sodium 0,2 M, pH 4,5. On coule un gel de 0,75 mm d'épaisseur. Après incubation 5 minutes à 60°C, on révèle dans un solvant constitué de 2 volumes d'éthanol à 96 % et d'un volume de tampon acétate 0,05 M, pH 5,4.

f - Isoélectrofocalisation et courbe de titration.

Nous avons d'abord réalisé une électrofocalisation afin de déterminer le pHi des xylanases respectives puis une courbe de titration afin de déterminer le pH pour lequel nous pourrions obtenir la meilleure séparation des xylanases par chromatographie d'échange d'ions.

Nous avons utilisé les plaques de gel d'ampholines LKB (Ampholine PAG plate)

de pHi 3,5 à 9,5. Les protéines ont été révélées par coloration au Bleu de Coomassie après élimination des ampholines. La détermination du gradient de pH a été effectuée après élution de bandes de 0,5 cm dans le gel à l'aide d'une électrode pH.

g - Détermination de la composition en acides-aminés des xylanases.

Les compositions en acides-aminés¹ ont été déterminées après hydrolyse par l'HCl 5,6 N à 100 °C pendant 24 heures.

h - Détermination de la séquence N-terminale des xylanases.

Les xylanases (20-40 µg de protéines) ont été séquencées à l'aide d'un séquenceur en phase gazeuse de type Applied Biosystems 470 A. Les PTH d'acides-aminés ont été identifiés par HPLC (analyseur de PTH couplé à un appareil de type Applied Biosystems 120 A)².

i - Techniques immunologiques.

Des antisera dirigés contre une xylanase ont été préparés par inoculation sous-cutanée de 2 lapins (3 injections à 3 semaines d'intervalle). La première injection était composée de 500 µl d'enzyme purifiée (500 µg de protéines) et de 500 µl d'adjuvant de Freund. Les deux rappels ont été effectués avec 2 x 500 µg de protéines. Les immunodiffusions ont été réalisées d'après la technique d'Ouchterlony, 1958.

II - PURIFICATIONS DES ENDOXYLANASES DE CLOSTRIDIUM THERMOLACTICUM PAR DES METHODES CHROMATOGRAPHIQUES ET ELECTROPHORETIQUES.

Toutes les étapes de purification ont été réalisées à température ambiante.

1 hormis le tryptophane

2 Nous tenons à remercier Mademoiselle Pierrette Maes et Monsieur André Tartar (Institut Pasteur de Lille) pour ces analyses.

a - Préparation d'un extrait enrichi en xylanases par chromatographie d'échange d'ions.

Nous avons recherché un support chromatographique nous permettant, à débit élevé, de concentrer et de purifier suffisamment les enzymes. Après des essais sur différents supports, notre choix s'est porté sur le gel Sepharose-Q fast flow (Pharmacia). La colonne, de dimension 50 x 5 cm, était équilibrée dans du tampon Tris-HCl 10 mM, pH 8 (Tampon I). Les fractions retenues ont été éluées par un gradient continu en NaCl (2 litres) dans le tampon I. Le débit de la colonne était de 1,2 l/h et les protéines ont été détectées en continu sur détecteur Uvicord (LKB) à 280 nm. Cette prépurification constitue l'intermédiaire commun de 2 séries de purifications que nous avons réalisées en parallèle, et a servi à la fourniture d'enzymes pour la réalisation de la production de xylo-oligosaccharides à l'échelle du pilote.

b - Chromatographie d'interactions hydrophobes.

L'extrait à chromatographier était amené à la concentration 1M en NaCl. La fraction provenant de la chromatographie sur Sepharose-Q a été déposée sur une colonne de phényl-Sépharose CL 4B équilibrée dans le tampon I, NaCl 1M. Le volume de gel était de 190 ml. Après rinçage de la colonne par le tampon d'équilibrage, la chromatographie était ensuite développée par un gradient continu de NaCl dans le tampon I (1M --> 0M NaCl). Les protéines résiduelles ont été éluées par un gradient continu de 500 ml de Tris-HCl 10 mM, pH 8 de 0 à 25 % en éthylène glycol.

c - Chromatographie de gel-filtration

Les fractions provenant de la chromatographie d'interaction hydrophobe ont été déposées sur des supports réticulés du type Sephacryl S-200 Pharmacia, de qualité superfine ou Sephacryl S-200 de qualité HR, de dimension 2,6 x 100 cm, équilibrés respectivement dans le tampon I ou dans un tampon Tris-HCl 10 mM, pH 8, NaCl 0,1 M (tampon II).

d - Electrophorèse préparative.

Les électrophorèses préparatives ont été réalisées dans les conditions décrites précédemment p. 81, mis à part qu'elles ont également été effectuées en présence d'un gel de séparation constitué d'un gradient de polyacrylamide de 5 à 10 %.

Après avoir repéré au niveau du gel de polyacrylamide les activités xylanasiques à l'aide des techniques de zymogramme décrites p. 81, nous avons ensuite procédé à l'électro-élution des bandes du gel de polyacrylamide renfermant ces activités . Les protéines récupérées à l'issue de ces étapes, ont préalablement été précipitées dans le TCA à 30 % final avant de procéder à leur électrophorèse en gel de polyacrylamide en milieu dénaturant, afin de contrôler leur état de pureté.

III - PURIFICATION DE L'ENDOXYLANASE DE BACILLUS XE et de BACILLUS D3.

Toutes les étapes de purification ont été réalisées à température ambiante.

a - Chromatographie sur Sepharose-O fast-flow.

La colonne était de dimension 40 x 2,4 cm et les conditions de chromatographie sont identiques à celles utilisées pour *Clostridium thermolacticum*.

b - Chromatographie sur phényl-Sepharose.

Les conditions de chromatographie ont été décrites p. 83.

C- LES SUBSTRATS.

I - LES SUBSTRATS UTILISES.

a - Le xylane de mélèze.

1 - Purification du xylane de mélèze.

Le xylane soluble a été préparé à partir de xylane commercial de mélèze Sigma (St Louis, MO), lot 122F-032. Le xylane commercial n'est malheureusement plus disponible actuellement ce qui nous a conduit à préparer parallèlement du xylane de bouleau.

Le xylane de mélèze a été repurifié par précipitation au chlorure de Barium (Taiz et Honigman, 1976) avec un rendement de 79 %. Le xylane a été repris par une solution de NaOH à 10 %, additionnée de chlorure de Barium à 36 %. La solution a ensuite été centrifugée à 10 000 g pendant 20 min.. Le culot a été repris par de l'eau, neutralisé par de l'acide acétique, dialysé une nuit à 4°C contre de l'eau distillée, puis lyophilisé. Le surnageant après neutralisation par de l'acide acétique et précipitation du xylane soluble par 4 volumes d'éthanol, a été centrifugé. Le précipité a été repris par de l'eau, dialysé une nuit contre de l'eau distillée, puis lyophilisé.

2 - Caractérisation du xylane de mélèze.

Ce xylane est soluble dans l'eau et constitue une fraction homogène par gel-filtration sur une colonne d'Ultrogel AcA 54. La chaîne principale est constituée de 100 résidus xylosyl. Le DP a été déterminé par le dosage du xylitol par la sorbitol deshydrogénase (Sturgeon, 1980), après réduction des résidus de xylose situés en position terminale réductrice. Ce xylane renferme 1 acide glucuronique pour 15 résidus de xylose avec des quantités mineures de glucose (1,8 %) et de matériel non glucidique (4 %) (Debeire P. *et al.*, 1990).

b - Le xylane de bouleau.

L'extraction et la purification du xylane de bois de bouleau (4-O-méthyl-glucuronoxylane) ont été réalisés selon la méthode d'extraction alcaline décrite par Zinbo et Timell, (1965).

c - Le xylane d'avoine.

Le xylane d'avoine (xylane commercial Sigma, lot n° 14F-0421) a été utilisé tel quel sans purification supplémentaire (il renferme 97 % de glucides). C'est un arabino-glucuronoxylane (Xyl/Ara/Gal/GlcA; 1/ 0.1/ 0,02/ 0,03) (Brillouet, 1987).

d - Les rafles de maïs.

Les rafles de maïs de granulométrie définie, nous ont été fournies par la société Eurama (Pau).

1 - Caractérisation des rafles de maïs.

Le choix des rafles de maïs s'est porté sur la partie grits, de granulométrie supérieure ou égale à 100 mesh. Ces rafles ont été utilisées d'une part comme substrat de départ pour l'extraction des xylanes, et d'autre part comme substrat lignocellulosique pour l'étude de l'hydrolyse enzymatique des xylanases sur le substrat brut. Nous avons procédé à la détermination de la composition en glucides et en lignine des rafles (grits-100).

2 - Extraction des xylanes de rafles de maïs.

Nous avons repris le protocole d'extraction de Zinbo et Timell (1965) modifié par Lepoutre (1990). L'extraction a été réalisée à partir de 300 g de grits-100. L'échantillon a été réduit par 1 l de solution de NaBH₄ à 1 % en présence de KOH à 24 % (p/p) pendant 3 h à température ambiante et sous agitation. L'ensemble a été filtré et rincé par 1 l d'eau distillée. La précipitation du xylane a été réalisée par addition d'éthanol et d'acide acétique dans les proportions suivantes: 10 l d'éthanol à 95 %, 1 l d'acide acétique pour 2 l de filtrat. La précipitation a été réalisée à 4°C sous légère agitation. L'ensemble a été filtré et lavé par de l'éthanol. Le précipité a ensuite été repris par de l'eau distillée et dialysé plusieurs jours puis lyophilisé.

3 - Caractérisation du xylane de rafles de maïs par microscopie électronique.

Le xylane lyophilisé a été analysé en microscopie électronique (JEOL 35 CF). Il a subi au préalable une pulvérisation cathodique d'or sous vide. Le dépôt d'or ne dépassait pas 50 Å.

4 - Teneur en eau

Les échantillons de xylane ont été séchés à 100°C jusqu'à poids constant.

5 - Teneur en cendres

L'échantillon séché à 100°C a été calciné au four à 550°C. Le résidu correspondait à la fraction minérale.

II - METHODES ANALYTIQUES UTILISEES POUR L'ETUDE DES SUBSTRATS ET DE LEURS PRODUITS D'HYDROLYSE

a - Dosage des sucres réducteurs.

Les sucres réducteurs ont été dosés par la méthode au ferricyanure de potassium alcalin (Hoffmann, 1937) automatisée par Hill *et al.*, (1961). L'automatisation du dosage est réalisée sur une chaîne d'analyse à flux continu Technicon.

Les sucres réducteurs ont également été dosés selon la méthode de Kidby et Davidson, (1973) par la mesure de la réduction du ferricyanure.

b - Dosage des sucres totaux.

Les sucres totaux ont été dosés par la méthode au phénol sulfurique (Dubois *et al.*, 1956) avec le xylose ou le glucose comme étalons.

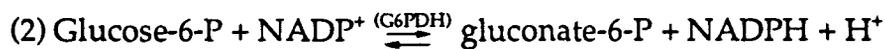
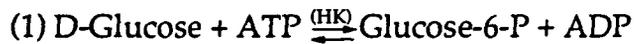
c - Dosage des acides uroniques.

Les acides uroniques ont été dosés selon la méthode de Blumenkrantz et Asboe-Hansen, (1973), avec l'acide glucuronique comme étalon.

d - Dosage du glucose libre par couplage enzymatique.

1 - Principe

Le dosage du glucose libre a été déterminé par la mesure au spectrophotomètre à 340 nm, de la réduction de NADP en présence d'hexokinase (HK), de glucose-6-phosphate deshydrogénase (G6PDH), selon le principe suivant:



2 - Milieu réactionnel

- Tampon triéthanolamine	42 mM pH = 7,6
- Glucose	0,22 mM
- MgCl ₂	6,7 mM
- ATP	2,7 mM
- NADP	0,73 mM
- HK	2,8 UI
- G6PDH	1,4 UI

Le volume réactionnel était de 1,5 ml et la réaction initiée par l'ajout de 10 µl de HK/G6PDH. L'incubation a été effectuée à température ambiante.

e - Détermination du degré de polymérisation des chaînes de xylane.

Nous avons utilisé la méthode enzymatique de Sturgeon, (1973).

Cette méthode consiste à déterminer le DP du xylane par la mesure du xylitol libéré, après réduction du xylane par le borohydrure de sodium, par hydrolyse par l'HCl 2N, pendant 2 h à 100 °C. Le xylitol est dosé via la mesure du NADH produit selon la réaction:



(SDH: Sorbitol deshydrogénase)

Le DP du xylane est ensuite déterminé selon la formule:

$$\text{DP} = (\text{Sucres totaux} / \text{xylitol}) + 1$$

f - Détermination de la composition en oses neutres par chromatographie en phase gazeuse.

1 - Hydrolyse acide du xylane

Deux techniques d'hydrolyse ont été étudiées : en ce qui concerne l'hydrolyse du xylane par l'acide trifluoroacétique, des cinétiques d'hydrolyse ont été réalisées sur les xylanes de rafles de maïs. Le meilleur rendement de libération des monosaccharides a été obtenu pour une concentration en ATFA 2N et un temps d'hydrolyse de 2 h. Des cinétiques d'hydrolyse ont également été réalisées en présence d'HCl 1N, 2N, 4N pour des temps d'hydrolyse de 1 h à 2 h. Dans tous les cas, la température d'hydrolyse était de 100°C.

Nous avons choisi de réaliser les hydrolyses en présence d'ATFA, 2N, pendant 1 h à 100°C. Nous avons également étudié l'influence de l'ATFA à différentes concentrations et pour des périodes d'incubation de 15 mn, 30 mn, 1 h, 1 h 30, 2 h sur les monosaccharides suivants: Rha, Ara, Glc, Xyl et Gal. Après hydrolyse acide, les monosaccharides ont été dérivés sous forme d'acétates d'alditol et ensuite séparés et quantifiés par chromatographie en phase gazeuse.

2 - Préparation des acétates d'alditol

Les monosaccharides libérés par hydrolyse acide ont pu être analysés après réduction et acétylation (Sawardeker *et al.*, 1965). Les monosaccharides ont été réduits par 2 ml de solution de borohydrure de sodium dans le DMSO (2 %, p/v) qui ont été ajoutés à 0,2 ml d'hydrolysats neutralisés, soit 1 mg de glucides. La solution a été agitée pendant 90 mn à 40°C. L'excès de borohydrure a été décomposé par 0,2 ml d'acide acétique glacial. Après refroidissement, les sucres réduits ont été acétylés par ajout de 4

ml d'anhydride acétique et 0,4 ml de 1-méthylimidazole (Hoebler *et al.*, 1989). Le mélange a été laissé à température ambiante pendant 10 mn. L'excès d'anhydride acétique a été décomposé par 20 ml d'eau. Après refroidissement, les acétates d'alditol ont été extraits par 8 ml de dichlorométhane. La phase inférieure a été lavée 3 fois avec de l'eau. Le dichlorométhane a été ensuite évaporé sous vide à 40°C et l'extrait sec a été repris par 1 ml de dichlorométhane et conservé à -20°C.

3 - Séparation chromatographique des acétates d'alditol.

La séparation a été réalisée sur une colonne capillaire Chrompack CPSIL 5 CB, 50 m x 0,32 mm montée dans un chromatographe Varian 3700 équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'un injecteur en mode split. Le gaz vecteur (He) avait un débit de 1 ml/min. La température de la colonne était maintenue à 160°C pendant 6 min puis augmentée de 3°C/min jusqu'à 210°C. La température de l'injecteur était de 230°C et celle du détecteur de 300°C. Le volume d'injection était de 1,5 µl avec un ratio au niveau de l'injecteur split de 200.

4 - Triméthylsilylation et analyse par CPG.

La préparation des dérivés méthyl-glycosides triméthylsilylés et leur analyse par CPG (colonne CP Sil 5 CB) ont été réalisés selon le protocole de Priem ³, (1990).

5 - Par chromatographie sur couche mince (CCM)

Les oligosaccharides produits par l'hydrolyse du xylane par les xylanases ont été analysés qualitativement par chromatographie sur plaque de gel de silice (Merck) (couche de silice de 0,2 mm).

³ Nous remercions Monsieur J. Solo-Kwan (E.P.P.V., USTL Flandres-Artois) qui a effectué ces analyses.

a - Dessalage des produits neutres d'hydrolyse et séparation des oligosaccharides neutres des oligosaccharides acides sur des colonnes de résines échangeuses d'ions.

Les échantillons ont été dessalés sur des colonnes de Dowex 50W-X8 (25-50 Mesh); forme H⁺, et de Dowex 1-X2 (200-400 Mesh); forme HCOO⁻, équilibrées dans l'eau. Les produits acides d'hydrolyse ont ensuite été élués de la résine anionique, par du tampon formiate d'ammonium 0,25 M, pH 8. Les oligosaccharides acides ont préalablement été dessalés par chromatographie de gel-filtration sur colonne de Bio-Gel P-2, avant d'être déposés sur les plaques de silicagel.

b - Séparation chromatographique par CCM

Les chromatographies s'effectuent sur plaque de gel de silice dans les solvants suivants: - n-butanol/acide acétique/eau (2:1:1). Les plaques ont été révélées après pulvérisation à l'orcinol sulfurique (200 mg d'orcinol dans 100 ml d'acide sulfurique à 20 %) et chauffage à 100°C pendant 10 min..

L'analyse par densitométrie (transmittance mode, Hoefer densitomètre GS 300) des plaques de CCM a permis d'estimer les proportions relatives de chaque famille d'oligosaccharides.

6 - Par chromatographie papier.

Les oligosaccharides neutres ont été séparés par chromatographie sur papier (Whatman 3) pendant 12 h, 24 h, ou 48 h dans le système solvant de Fischer et Nebel, (1955): Acétate d'éthyl/pyridine/acide acétique/eau (5:5:1:3)

L'emplacement des oses est révélé à l'aide du réactif à l'oxalate d'aniline :

- Solution d'aniline dans l'éthanol absolu à 2 % (v/v) 2 Vol.
- Solution aqueuse d'acide oxalique à 2,5 % (p/v) 3 Vol.

La pulvérisation est effectuée au recto et au verso des chromatogrammes. Le développement des colorations est réalisé à 105°C.

7 - Détermination de la structure des Xyl_nGlcA par CPG-MS.

Pour les études de méthylation, les acides aldouroniques ont été réduits au préalable par du borohydrure deutéré. Après une nuit d'incubation, le milieu réactionnel a été neutralisé par de la Dowex 50W-X8 (25-50 mesh, H⁺) et l'acide borique éliminé par évaporation en présence de méthanol. La méthylation des oligosaccharides réduits a été réalisée selon la méthode de Finne *et al.*, 1980. Les méthyl glycosides obtenu par méthanolyse des oligosaccharides perméthylés ont été peracétylés et identifiés par CPG couplée à la spectrométrie de masse, (Fournet *et al.*, 1981)⁴.

D - ETUDES DES CINETIQUES D'HYDROLYSE DES XYLANES PAR LES XYLANASES PURIFIEES.

I - ETUDE DES CINETIQUES EN PHASE HOMOGENE: HYDROLYSE DU XYLANE DE MELEZE.

Le xylane de mélèze a été dissous dans du tampon acétate de sodium 0,05 M (pH 5,8) et 20 ml de cette solution (0,5 % en xylane) ont été incubés à 60°C en présence de 7,2 UI d'enzyme purifiée. Des aliquots de 1 ml ont périodiquement été prélevés pour le dosage des sucres réducteurs. Les échantillons ont également été dessalés par passage successif sur des petites colonnes de 1ml de Dowex 50W-X8, forme H⁺, et de 2 ml de Dowex 1-X2, forme HCOO⁻, équilibrées dans l'eau, et les oligosaccharides neutres libérés au cours de l'hydrolyse, analysés par CCM. Au bout de 72 h d'incubation, 9,4 ml d'hydrolysats ont été dessalés dans les mêmes conditions sur des colonnes de 10 ml de Dowex 50W-X8 et de 20 ml de Dowex 1-X2. Les acides aldouroniques libérés au bout de 72 h d'incubation ont été élués de la colonne de Dowex 1-X2 par une solution de formiate d'ammonium 0,5 M à pH 8 puis dessalés sur une colonne de Bio-Gel P-2 de dimension de (50 x 1 cm) équilibrée dans l'eau. Les oligosaccharides neutres et acides ont été analysés par CCM. Après réduction par le borohydrure deutéré, perméthylation, méthanolyse, puis peracétylation des acides aldouroniques, ces derniers ont ensuite été identifiés par CPG-MS.

⁴ Nous tenons à remercier Madame C. Alonso et Monsieur J.C. Michalski (laboratoire de Chimie Biologique, UST Lille Flandres Artois) pour leurs analyses en CPG-MS.

II - CINÉTIQUE EN PHASE HÉTÉROGÈNE SUR RAFLES DE MAÏS.

Les cinétiques enzymatiques en phase hétérogène ont été réalisées en réacteur en verre de 50 ml, thermostaté à 60°C par un bain à circulation d'eau. L'homogénéisation du milieu réactionnel est réalisée par agitation magnétique. Le volume réactionnel était de 40 ml d'une solution à 10 g.l⁻¹ de rafles de maïs (Grits 100) dans le tampon acétate de sodium 50 mM, pH 5,8. Les sucres réducteurs libérés ont été dosés dans le surnageant par la méthode au ferricyanure (voir p. 87) automatisée sur une chaîne d'analyse automatique Technicon, ou en manuel, après ébullition et centrifugation des échantillons prélevés. Les sucres totaux ont été dosés dans le surnageant par la méthode au phénol sulfurique.

E - TRANSPOSITION A L'ECHELLE DU PILOTE DE L'EXTRACTION DES XYLANES DE RAFLES DE MAÏS ET DE LEUR HYDROLYSE ENZYMATIQUE.

I - EXTRACTION DES XYLANES DE RAFLES DE MAÏS A L'ECHELLE DU PILOTE.

a - Extraction.

L'extraction a été effectuée dans un fermenteur de 200 l Setric sous agitation pendant 4 h et à température ambiante. Dix kilogrammes de rafles de maïs Grits 100 (de granulométrie > à 100 mesh, voir p. 86) ont été ajoutées à 100 l d'une solution de KOH 2 M. L'ensemble a ensuite été centrifugé en continu à 15 000 x g (Centrifugeuse Sharples). Après élimination du culot, le surnageant a été neutralisé par addition d'acide acétique glacial conduisant ainsi à la formation d'un mélange de xylanes solubles et insolubles.

b - Caractérisation du xylane de rafles de maïs extrait à l'échelle du pilote.

Les pourcentages de xylanes solubles et insolubles ont été déterminés, après séparation des 2 phases solubles et insolubles par filtration à 60°C sur filtre Whatman GFF, par le dosage des sucres totaux au phénol sulfurique (voir p. 87). La composition en oses neutres a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse (voir p. 89).

c - Caractérisation d'un composé micromoléculaire associé au xylane de la fraction soluble.

Le dosage du glucose libre renfermé dans la fraction soluble du xylane a été réalisé par couplage enzymatique (voir p. 88). D'autre part un composé micromoléculaire associé au xylane de la fraction soluble a été isolé par chromatographie de gel-filtration.

1 - Préparation de l'échantillon

10 ml de xylane soluble de rafles de maïs issus de la préparation de xylane extraite à l'échelle du pilote, ont été dessalés par passage successif sur des colonnes de 30 ml de Dowex 50W-X8 et de 75 ml de Dowex 1-X2 équilibrées dans l'eau. La fraction non retenue a ensuite été concentrée à l'évaporateur rotatif puis resolubilisée dans un minimum d'eau. Le xylane non solubilisé a été éliminé par centrifugation.

2 - Chromatographie de gel-filtration sur S-200 HR

L'échantillon à chromatographier a été déposé sur un support réticulé de type Sephacryl S-200 Pharmacia de qualité HR, de dimension 2,6 x 100 cm, équilibré dans l'eau. Le fractionnement a été suivi en continu sur détecteur Uvicord (LKB) à 280 nm. Des fractions de 3 ml ont été collectées. Le débit de la colonne était de 30 ml/h. Les fractions correspondant au niveau du fractionnement, au composé micromoléculaire ont été rassemblées puis chromatographiées à nouveau sur une colonne de Bio-Gel P-2.

3 - Chromatographie de gel-filtration sur Bio-Gel P-2

L'extrait à chromatographier a été déposé sur une colonne de Bio-Gel P-2 équilibrée dans l'eau, dont le volume de gel était de 176 ml. Des fractions de 3 ml ont été collectées, et le débit de la colonne était de 21 ml/h. Le fractionnement a été suivi en continu à 280 nm et les échantillons ont été contrôlés parallèlement par le dosage des sucres neutres totaux. Les fractions correspondant au niveau du fractionnement au composé micromoléculaire ont été rassemblées puis analysées par

CCM. Le dosage des sucres neutres totaux a été réalisé par la méthode au phénol sulfurique (lectures à 492 nm et à 480 nm), avec respectivement le glucose et le xylose comme étalon.

4 - Identification du composé micromoléculaire.

a - Hydrolyse à l'ATFA.

Le composé micromoléculaire a été analysé par CCM, notamment après avoir subi au préalable une hydrolyse à l'ATFA 2N, 1h.

b - Spectrométrie de masse FAB-MS.

La FAB-MS⁵ a été effectuée sur le composé micromoléculaire purifié à l'aide d'un spectromètre de masse Kratos, modèle MS 50, en modes positif et négatif. Le bombardement des molécules a été assuré par un canon à Xénon (1 mA, 8 kV). En mode négatif, l'échantillon a été dissous par une matrice constituée d'un mélange de glycérol/triéthylamine, et d'un mélange de thioglycerol/acétate de sodium en mode positif.

II - HYDROLYSE ENZYMATIQUE EN BATCH A L'ECHELLE DU PILOTE.

L'hydrolyse de la suspension de xylane (135 l) maintenue à 60°C sous agitation, a été réalisée par addition des xylanases (100 000 UI) de *Clostridium thermolacticum*, partiellement purifiées (voir p. 83). Un autre ajout d'enzyme a été effectué au bout de 38 h d'incubation. Des échantillons ont régulièrement été prélevés pour le suivi de l'hydrolyse. La quantification des sucres réducteurs et des sucres totaux a été effectuée dans le surnageant de la suspension de xylane après élimination du matériel insoluble par centrifugation. Après 88 h d'incubation, la solution a été centrifugée à 15 000 x g pour éliminer tout matériel insoluble.

⁵ Nous remercions Monsieur Y. Leroy (Lab. Chimie Bio., UST Lille Flandres-Artois), pour l'analyse en FAB-MS.

III - EXTRACTION, SEPARATION, ET CARACTERISATION DES XYLO-OLIGOSACCHARIDES

a - Extraction.

12 kg de charbon actif (Acticarbon CXV, Ceca) ont été ajoutés au surnageant. Le charbon a ensuite été récupéré par filtration sur filtre Whatman No. 1 et rincé abondamment à l'eau distillée pour éliminer les sels.

Les oligosaccharides ont été élués successivement en plusieurs étapes par 1 x 100 l d'éthanol à 5 % (v/v) puis 15 % (v/v) et par 2 x 100 l d'éthanol à 30 % (v/v), (Whistler et Tu, 1952). Chaque fraction a été concentrée à l'évaporateur rotatif jusqu'à obtention d'un sirop, puis lyophilisée.

b - Séparation et caractérisation des oligosaccharides.

1 - Chromatographie sur colonne de AG 50W-X4

La séparation des familles d'oligosaccharides a été effectuée par chromatographie sur une colonne de dimension 3 cm x 25 cm de AG 50W-X4 (200-400 Mesh, BioRad) sous forme Ca^{2+} équilibrée dans l'eau et thermostatée à 70°C (Voloach *et al.*, 1984). Les oligosaccharides ont été suivis en continu par réfractométrie (réfractomètre Knauer) et le débit d'élution a été fixé à 60 ml x h⁻¹. Les différents oligosaccharides de la première fraction élue par la solution éthanolique à 30 %, ont été analysés par chromatographie sur couche mince et leur degré de polymérisation (DP) a été estimé par comparaison avec des xylo-oligosaccharides témoins (Debeire P. *et al.*, 1990). L'estimation de la proportion relative de chaque famille d'oligosaccharides a été effectuée par l'analyse des CCM par densitométrie (voir p. 91).

2 - Chromatographie de gel-filtration sur Bio-Gel P-2

Les différents oligosaccharides de la seconde fraction élue par la solution éthanolique à 30 % (3 g), ont grossièrement été séparés par une première chromatographie de gel-filtration sur une colonne de Bio-Gel P-2 de dimension 5 x 50 cm, équilibrée dans l'eau de manière à séparer les arabino-xylo-oligosaccharides des X₂

et des X₃. Les oligosaccharides ont été suivis en continu sur détecteur Uvicord (LKB) à 206 nm, et le fractionnement contrôlé par CCM. Les échantillons recueillis ont ensuite été rassemblés en 6 fractions. Ces dernières ont été concentrées à l'évaporateur rotatif, et trois d'entre elles ont successivement été rechromatographiées dans les mêmes conditions.

3 - Chromatographie papier préparative.

A l'issue des dernières étapes décrites ci-dessus, 3 fractions ont été choisies et les différentes familles d'oligosaccharides de ces fractions ont été séparées par chromatographie sur papier dans les conditions décrites p. 91, éluées, puis lyophilisées.

RESULTATS

CHAPITRE I

PURIFICATION ET PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES DES ENDOXYLANASES DE *CLOSTRIDIUM THERMOLACTICUM* ET DE *BACILLUS XE*.

A - PREPURIFICATIONS ET PURIFICATIONS DES ENDOXYLANASES PRODUITES EN CONTINU PAR *CLOSTRIDIUM THERMOLACTICUM*.

I - PREPURIFICATION DES ENDOXYLANASES DE *CLOSTRIDIUM THERMOLACTICUM*.



90 l de milieu de culture renfermant 12 UI/ml ont été concentrés à 5,5 l par ultrafiltration, dialysés, centrifugés. Ces étapes ont conduit à l'augmentation de l'activité spécifique de 42,3 à 72,8 UI/mg de protéines. Les activités β -xylosidasiques et β -glucosidasiques étaient inférieures à 0,02 UI/mg de protéines (soit 0,027 % comparées à l'activité xylanasiqne totale) et aucune activité protéasique n'a été détectée.

La prépurification a été réalisée par chromatographie d'échange d'ions sur colonne de Sépharose-Q "fast-flow" (voir le chapitre Matériels et Méthodes p. 83) à partir de 5,5 l de surnageant de culture concentré, dialysé et centrifugé. Le profil de cette chromatographie est donné dans la figure 26 (p. 100). L'activité xylanasiqne a été éluée par une force ionique correspondant à 0,4 M en NaCl. Les fractions renfermant l'activité xylanasiqne ont été rassemblées puis dialysées et concentrées à un volume final de 290 ml en utilisant le modèle d'ultrafiltration tangentielle Amicon (TCF 10); 97 % de l'activité initiale déposée a été retrouvée à l'issue de ces étapes et l'activité spécifique était de 290 UI/mg de protéines. Les activités β -xylosidasiques et β -glucosidasiques ont été réduites à moins de 3 mU/mg de protéines (soit moins de 0,001 % de l'activité xylanasiqne), alors que l'activité endoglucanase demeurait non négligeable et s'élevait encore à 6 UI/mg de protéines (soit 2 % comparé à l'activité xylanasiqne). Les caractéristiques de la fraction enzymatique au cours des différentes étapes de cette purification sont rassemblées dans le Tableau V (p. 100).

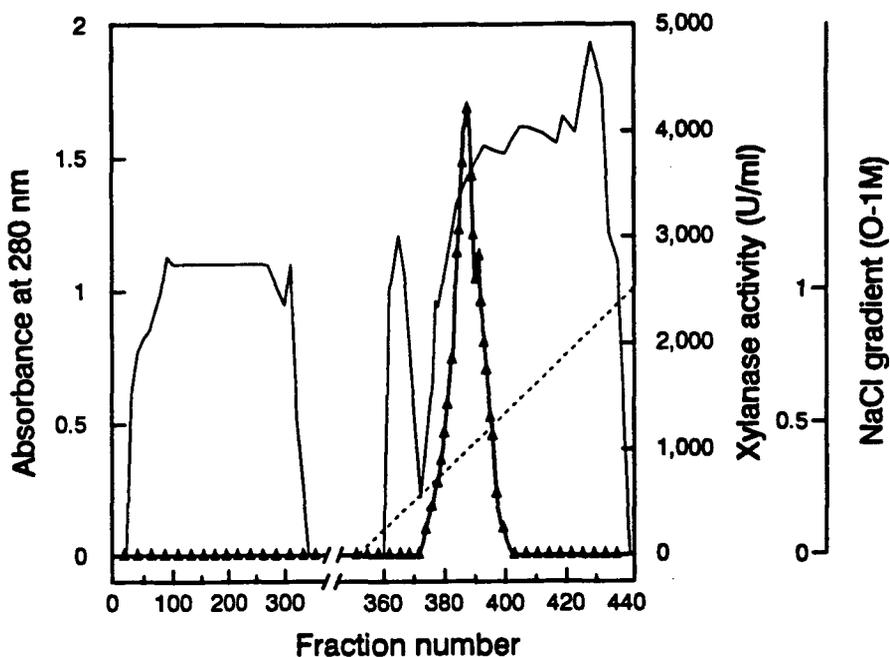


Fig. 26: Chromatographie d'échange d'ions sur colonne de Sépharose-Q "fast-flow" du surnageant de culture de *Clostridium thermolacticum*.
 (▲—▲) : activité endoxylanasique, (—) : absorbance à 280 nm, (—) : Force ionique.

TABLEAU V

Prépurification des endoxylanases du surnageant de culture de *Clostridium thermolacticum* par chromatographie d'échanges d'ions sur colonne de Sépharose Q "Fast Flow".

Etapes de purification	Vol (l)	Protéines totales (g)	Activité totale (k UI)	Activité spécifique (UI/mg)	Rendement (%)
Surnageant de culture	90	25,5	1 080	42,3	100
Dialyse/Concentration/Centrifugation	5,5	14,4	1 048	72,8	97
Chromatographie sur Q-Sépharose Fast Flow	0,290	3,5	1 015	290	94

A l'issue de cette prépurification, nous disposions par conséquent d'une fraction suffisamment enrichie en endoxylanases et dépourvue d'activités contaminantes mise à part une activité cellulasique résiduelle de l'ordre de 6 UI/mg de protéines. Nous verrons qu'elle n'aura que peu d'incidence sur l'hydrolyse du xylane de rafles de maïs étant donné la faible teneur en cellulose du xylane extrait des rafles de maïs (voir p. 132).

La difficulté du fractionnement résidait essentiellement dans la réalisation d'une prépurification en une seule étape, adaptée aux volumes décrits précédemment. Nous avons donc mis au point une méthode chromatographique, extrapolable à l'échelle industrielle, permettant de concentrer et de purifier nos enzymes. Cette méthodologie a pu être par la suite appliquée à la purification de la xylanase de *Bacillus XE*.

Dès à présent nos enzymes se trouvaient à un stade de pureté suffisant en vue de leur utilisation pour la production de xylo-oligosaccharides. La détermination de leurs stabilités ainsi que les principales caractéristiques catalytiques de cette préparation seront décrites p. 134.

II - PURIFICATION DES XYLANASES DE *CLOSTRIDIUM THERMOLACTICUM*.

Les 3 endoxylanases ont été purifiées jusqu'à homogénéité à partir de la préparation issue de la chromatographie sur Sépharose-Q "fast-flow".

Les caractéristiques des fractions enzymatiques au cours des étapes de purification sont résumées dans le Tableau VI (p. 102).

a - Chromatographie d'interactions hydrophobes.

30 ml de la fraction enzymatique prépurifiée et concentrée ont été utilisés pour identifier les enzymes et déposés sur une colonne de Phényl Sépharose CL 4B (les conditions chromatographiques sont décrites dans le chapitre Matériels et méthodes).

De fortes interactions hydrophobes ont été établies entre les protéines xylanasiques et le gel de phényl Sépharose. 85 % des protéines contaminantes ont été éliminées du gel lors du gradient 1 M à 0 M en NaCl. Par conséquent, l'élution de

TABLEAU VI

Purification des xylanases de *Clostridium thermolacticum*.

Etapas	Volume	Protéines		Activité xylanasique			Purif.	Rendt.
	ml	mg/ml	totales (mg)	UI/ml	totale (kUI)	spécifique UI/mg de protéines	X	%
Surnageant de culture	9656	0,283	2732	12	116	42	1	100
Surnageant de culture après conditionnement	566	2,66	1505	193,4	109	72,8	1,7	94
Chromatographie sur Sépharose-Q	29,6	13,6	402,6	4009	118	293	7	100
Chromatographie sur phényl Sépharose	30	1,7	51	2933	88	1725	4 1	81
Chromatographie de gel-filtration	53	0,42	22,3	1170	62	2786	66	70

l'activité xylanasiqne a été obtenue au cours d'un gradient en éthylène glycol de 0 à 25 %. L'activité spécifique de cette fraction était de 1 725 UI/mg de protéines pour un rendement de 81 %. La purification moyenne au cours de cette étape était de 6 fois.

b - Chromatographies de gel-filtration

Nous avons réalisé une première chromatographie de gel-filtration sur Sephacryl S-200 superfine à partir de 51 mg de la fraction provenant de la chromatographie d'interaction hydrophobe (Tableau VI, p. 102).

Le profil montrait la séparation en trois pics des protéines injectées, l'activité xylanasiqne étant retrouvée dans le 3ème pic. D'après la courbe étalon, les protéines éluées correspondraient à des masses moléculaires comprises entre 84 kDa et 140 kDa. L'activité spécifique de cette fraction était de 2 786 UI/mg de protéines. La purification moyenne au cours de cette étape était de 1,6 fois pour un rendement de 70 %. Par conséquent, les enzymes ont été purifiées 66 fois depuis le surnageant de culture. Le complexe enzymatique isolé au cours de cette gel-filtration dont la masse moléculaire ferait en moyenne 120 kDa, serait probablement constitué de plusieurs xylanases, associées entre elles vraisemblablement par des interactions de type hydrophobes. Une d'entre elles de masse moléculaire 39 kDa avait été décrite antérieurement au laboratoire (Debeire P. *et al.*, 1990).

En outre, après avoir réalisé un zymogramme à partir d'une électrophorèse en milieu non dénaturant de la fraction après gel-filtration, nous avons repéré l'activité enzymatique (sous forme de 3 bandes dont 1 majeure), correspondant à la bande majeure révélée par le bleu de Coomassie (voir Fig. 27, p. 104). En SDS PAGE, 3 bandes majeures ont été mises en évidence. Les masses moléculaires étaient de 65 kDa, 55 kDa, 39 kDa (Fig. 28, p. 105).

Nous avons ensuite réalisé une électrophorèse préparative et déposé 1 mg de protéines provenant de la fraction collectée après gel-filtration, puis procédé à l'éluion de la bande majeure renfermant l'activité xylanasiqne identifiée parallèlement par la technique de zymogramme, avec un rendement d'éluion de 70 %. En SDS PAGE, nous avons distingué 3 bandes de masses moléculaires 65 kDa, 55 kDa et 39 kDa (Fig. 29, p. 105). Il semble donc que les xylanases soient associées sous forme d'un complexe enzymatique et la gel-filtration ne constitue pas dans notre cas, une bonne méthode de séparation et de détermination de leur masse moléculaire.

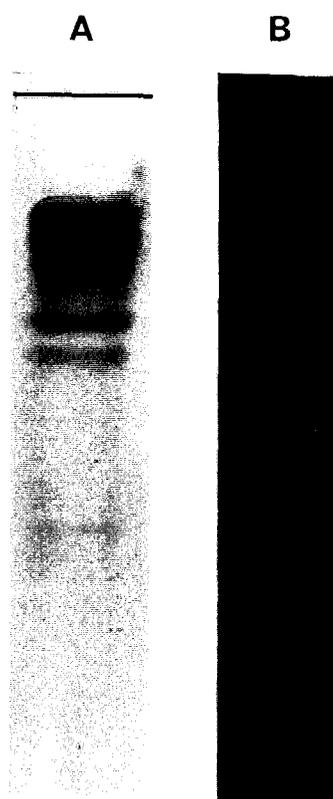


Fig. 27: Repérage des protéines enzymatiques au niveau d'une électrophorèse en milieu non dénaturant.
(A) Electrophorèse en milieu non dénaturant des xylanases purifiées par chromatographie de gel filtration sur S-200 HR.
(B) Les bandes protéiques correspondant à la xylanase sur le gel de polyacrylamide, sont détectées spécifiquement sur un gel d'agar, constitué de xylane coloré au R.B.B..

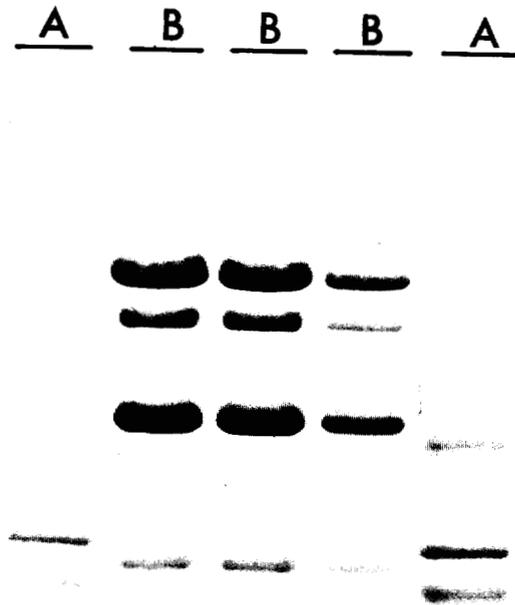


Fig. 28: Electrophorèse en milieu dénaturant des xylanases, après l'étape de purification par chromatographie de gel filtration sur S-200.
 (A) Témoins de masse moléculaire (à partir du haut): albumine, ovalbumine, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogénase, trypsinogène, inhibiteur de la trypsine, α -lactalbumine; (B) xylanases après l'étape de purification par chromatographie de gel-filtration sur S200.

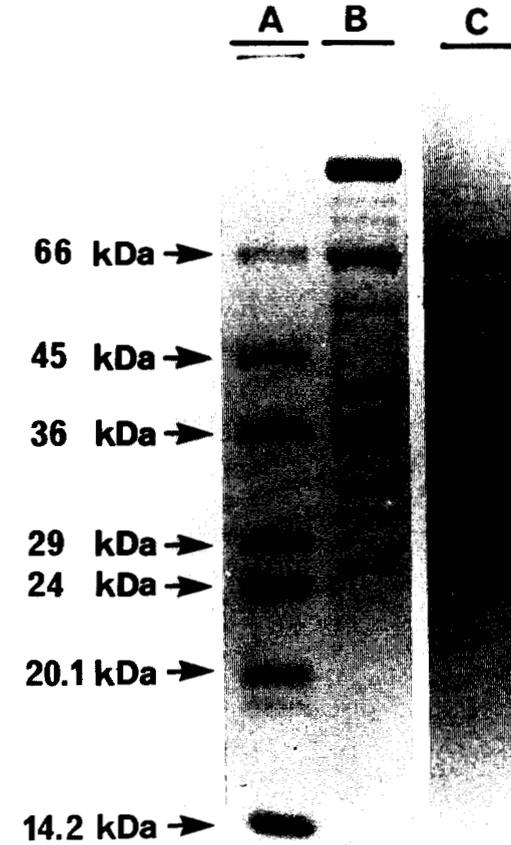


Fig. 29: SDS PAGE des xylanases avant et après purification. (A) Témoins de masse moléculaire (à partir du haut): albumine, ovalbumine, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogénase, trypsinogène, inhibiteur de la trypsine, α -lactalbumine; (B) xylanases après purification sur Q-Sépharose; (C) xylanases purifiées par électrophorèse préparative, en milieu non dénaturant (à partir du haut les masses moléculaires sont: 65, 55 et 39 kDa).

Nous avons cependant tenté de séparer les trois endoxylanases par chromatographie de gel-filtration sur S-200 H.R., en utilisant différents protocoles.

L'adjonction de NaCl 0,1 M conduisait à l'obtention d'un seul pic de xylanases possédant une masse moléculaire apparente de 18 kDa. Nous avons étudié successivement l'influence du SDS et du Triton X100 sur la séparation des xylanases par chromatographie de gel-filtration sur Sephacryl S-200 et vérifié que le S.D.S à 0,1 % et le Triton X-100 ne modifiaient pas les activités enzymatiques. L'objectif que nous nous étions fixé visait à "désaggréger" le complexe formé par les 3 endoxylanases. Dans ce but, trois chromatographies ont été effectuées parallèlement à partir de la fraction issue de la chromatographie sur phényl-Sepharose :

1 / en présence de tampon Tris HCl 10 mM pH = 8, additionné de SDS à 0,1 %; 2 / après traitement de l'enzyme par le Triton X 100, la chromatographie étant développée soit dans le tampon I additionné de Triton X 100 à la concentration finale de 0,1 % ou 3 / soit dans le tampon I seul.

D'après les profils, nous n'avons pas constaté d'amorce de séparation. De plus le volume d'élution du complexe enzymatique correspondait dans les trois cas toujours à une protéine native de 120 kD comme précédemment. Par conséquent, les fractions ayant subi un traitement préalable au Triton X 100, recueillies à l'issue des chromatographies, ont été rassemblées puis rechromatographiées en modifiant d'une part le pH et d'autre part la force ionique du tampon. Nous nous sommes placés à un pH proche des pHi des xylanases, en présence d'éthylène glycol à 20 %. Les pHi étaient de 4,9; 5 et 5,2 (voir p. 81 pour la méthodologie). Nous avons abouti dans ce cas à la séparation des 3 xylanases.

Le profil (voir Fig. 30, p. 107) montrait la séparation en 2 pics de protéines avec une ébauche d'épaulement au niveau du 1er pic. Ces observations ont suscité la réalisation d'une électrophorèse en milieu dénaturant des trois pics. Les échantillons choisis au niveau du fractionnement présentaient des volumes d'élution relatifs à des protéines natives de 96 kD, 64 kD et 39 kD correspondant respectivement en électrophorèse SDS PAGE aux xylanases de 65 kD, 55 kD et 39 kD (voir Fig. 31, p. 108). Leur degré de pureté était supérieure à 90 % .

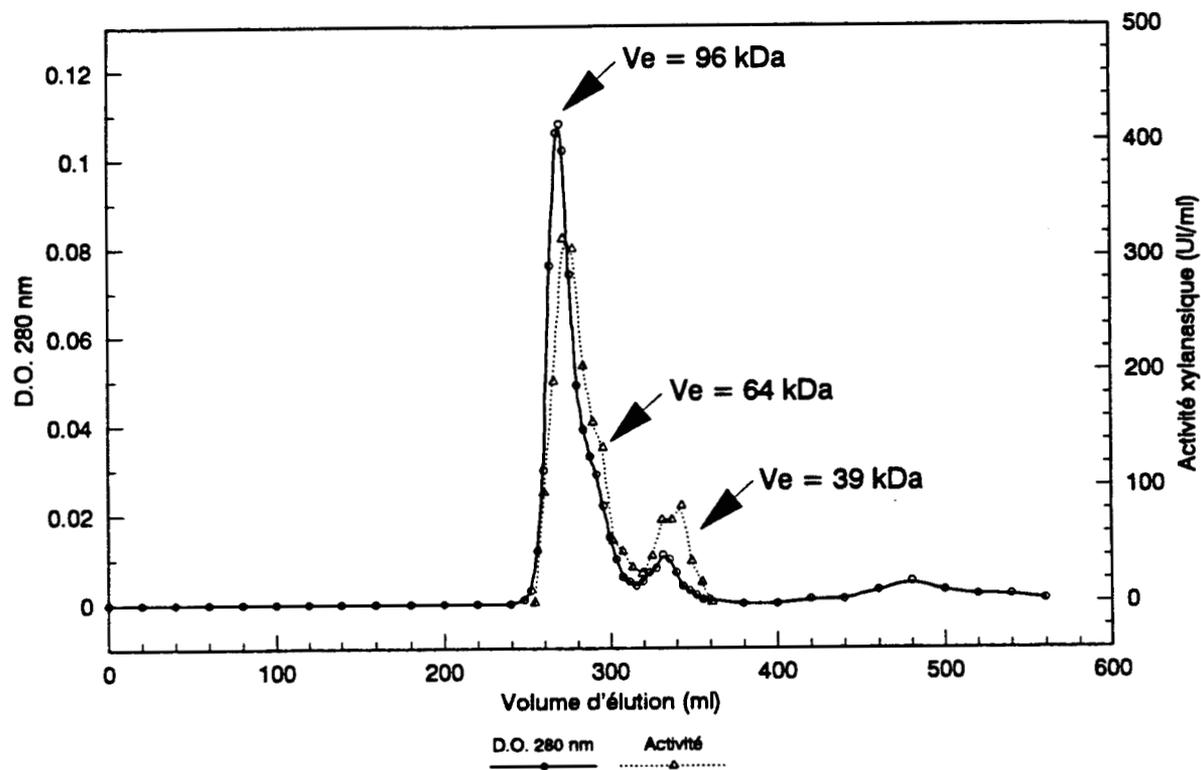


Fig. 30: Chromatographie de gel filtration des xylanases de *Clostridium thermolacticum* sur Sephacryl S-200.
 (Δ - - Δ) : activité endoxylanase, ($\text{---}\bigcirc\text{---}$) : absorbance à 280 nm

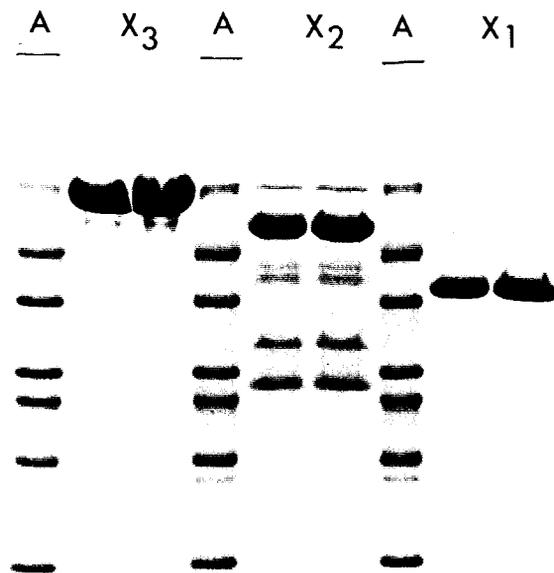


Fig. 31: SDS-PAGE des 3 endoxylanases purifiées jusqu'à homogénéité par chromatographie de gel filtration.
 (A) Témoins de masse moléculaire; X₃, endoxylanase de 65 kDa, X₂, endoxylanase de 55 kDa, X₁, endoxylanase de 39 kDa.

Nous disposions cependant de quantités insuffisantes de chaque enzyme purifiée nécessaires à leur caractérisation. Par conséquent nous avons entrepris à nouveau la purification des xylanases de 65 kDa, 55 kDa, 39 kDa afin d'en disposer de quantités suffisantes pour l'étude de leurs propriétés catalytiques, et de leur mode d'action, et de la détermination de leurs séquences peptidiques N-terminales.

c - Purification des xylanases par électrophorèses préparatives.

1 - Purification de l'endoxylyanase de masse moléculaire de 39 kDa.

Dans ce but, nous avons entamé une nouvelle série de purifications à partir de la fraction enzymatique recueillie à l'issue de la gel-filtration sur S200 superfine, et dont l'activité spécifique était de 2786 UI/mg de protéines.

Cette fraction a été concentrée à un volume final de 9,5 ml puis filtrée sur un filtre Millex de 0,22 μ m. Nous avons constaté après ce passage sur filtre non seulement une perte d'activité (4140 UI/ ml au lieu de 6527,4 UI/ml) mais aussi une perte notable en protéines (1,29 mg/ml au lieu de 2,3 mg/ml). L'activité spécifique de cette fraction est donc passée de 2786 UI/ mg de protéines à 3200 UI/mg de protéines. Nous avons observé en électrophorèse dénaturante, une seule bande majeure correspondant à une protéine de masse moléculaire de 39 kDa alors qu'avant filtration sur Millex apparaissaient également 2 autres bandes majeures correspondant à des protéines de 65 kDa et 55 kDa. Les protéines de 65, et 55 kDa ont été adsorbées sur le filtre de polysulfone.

Une électrophorèse préparative en conditions non-dénaturantes, dont le gel de séparation était formé d'un gradient de 5 à 10 % a été réalisée, et 660 μ g de protéines provenant de la fraction enzymatique décrite ci-dessus, ont été déposées. L'activité enzymatique était visualisée par la technique de zymogrammes sous forme de 2 bandes majeures et de plusieurs bandes mineures.

Après avoir découpé les 2 bandes majeures (Bande I, Bande II) correspondantes, au niveau du gel de polyacrylamide, nous avons procédé à leur élution avec un rendement de 80 %. L'analyse de ces fractions en SDS-PAGE a montré que les protéines de masse moléculaire de 39 kDa éluées de la bande I étaient purifiées jusqu'à

homogénéité, alors que les protéines éluées de la bande II renfermaient en plus de la protéine de 39 kDa, toutes les bandes contaminantes observées au niveau de l'électrophorèse dénaturante de la fraction enzymatique initiale (Fig. 32, p. 111).

Il est surprenant de noter que la xylanase de 39 kDa puisse apparaître sous forme native à la fois dissociée des bandes contaminantes et associée à d'autres protéines comme le montre le zymogramme (Fig. 33, p. 111).

Nous disposions donc de 5,8 ml de xylanase de 39 kDa à 195,6 UI/ml et 63,1 µg/ml soit une A.S. de 3100 UI/mg de protéines: soient 370 µg de protéines.

2 - Purifications des xylanases de masses moléculaires de 65 et 55 kDa.

Une deuxième chromatographie sur la colonne de Séphacryl S-200 HR a été effectuée dans les mêmes conditions que précédemment (voir p. 106) et à partir de 60 kUI (activité spécifique: 1725 UI/mg de protéines) issues de la chromatographie sur phényl-Sépharose. Le repérage des enzymes par SDS PAGE nous a permis de rassembler deux fractions, (Fraction I; 3219 UI/mg de protéines, Fraction B; 3400 UI/mg de protéines), enrichies respectivement en endoxylanases de 55 et 65 kDa (Fig. 34, p. 111). Pour la purification de ces dernières, nous avons choisi d'utiliser le protocole de purification de la xylanase de 39 kDa par électrophorèse préparative.

Nous disposions de 4,3 ml de xylanase de 65 kDa à 229 UI/ml et 84 µg/ml soit une A.S. de 2714 UI/mg de protéines: soient 360 µg de protéines.

Nous disposions également de 2,3 ml de la xylanase de 55 kDa purifiée à 90 % environ, à 304 UI/ml et 103 µg/ml de protéines: soit une activité spécifique de 2955 UI/mg de protéines: soient 239,9 µg de protéines.

III - ETUDE DES PROPRIETES DES ENDOXYLANASES DE *CLOSTRIDIUM THERMOLACTICUM*.

Certaines propriétés de la xylanase de 39 kDa avaient déjà été étudiées (Debeire P. *et al.*, 1990). Nous nous sommes servis de cette xylanase, comme témoin, pour nos différentes études.

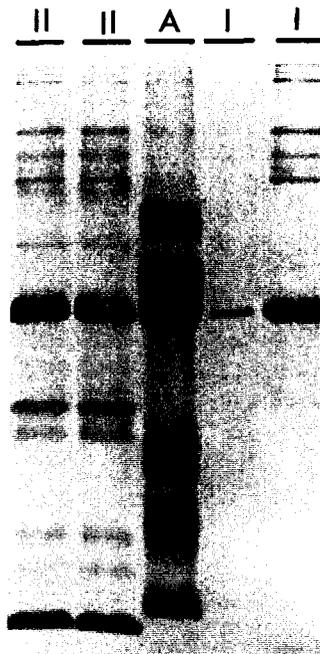


Fig. 32: Contrôle par SDS-PAGE de la xylanase de 39 kDa, purifiée par électrophorèse préparative. (I): Les protéines éluées du gel de polyacrylamide correspondant à la bande majeure I détectée sur le zymogramme, ont été déposées. (II): Les protéines éluées du gel de polyacrylamide correspondant à la bande majeure II détectée sur le zymogramme, ont été déposées. (A): Témoins de masse moléculaire.

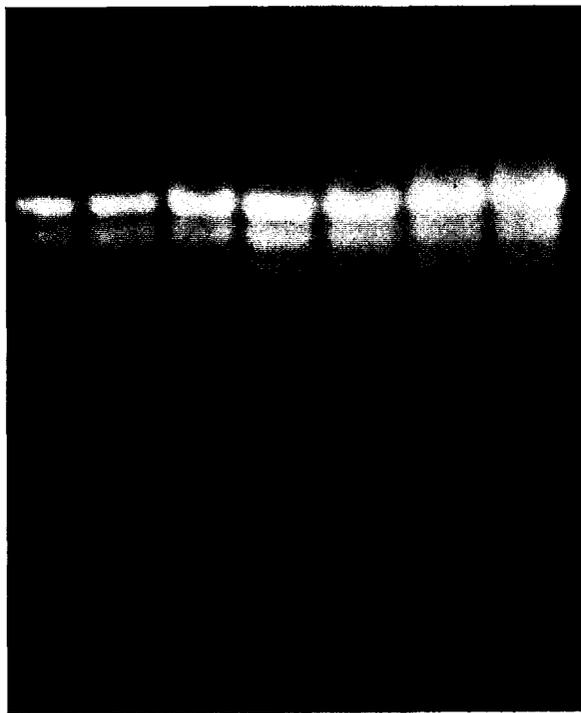


Fig. 33: Zymogramme de l'électrophorèse en milieu non dénaturant des xylanases, après l'étape de purification par chromatographie de gel-filtration sur S-200, suivie de la filtration sur un filtre Millex en polysulfone. Différentes concentrations de protéines ont été déposées : (de gauche à droite) 3, 5, 10, 25, 35, 45 et 60 μ g de protéines.

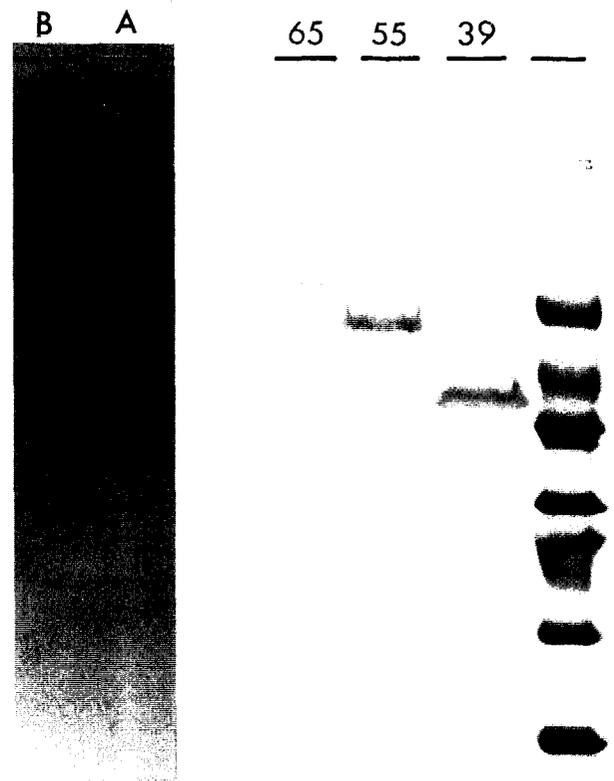


Fig 34 (a) SDS-PAGE des fractions A et B issues d'une chromatographie sur une colonne de Sephacryl S-200 HR et enrichies respectivement en xylanase de 55 et 65 kDa. (b) SDS-PAGE des xylanases de 39, 55 et 65 kDa purifiées par électrophorèse préparative.

a - Masse moléculaire et pHi.

Les masses moléculaires des enzymes, déterminées par SDS-PAGE étaient de 65 kDa, 55 kDa et 39 kDa. Leurs pHi déterminés par isoelectrofocalisation étaient respectivement de 4.65, de 4.55 et de 4.45. Cette dernière valeur est relativement différente de celle trouvée précédemment par Debeire P. *et al.*, (1990) qui était de 4,9.

b - Température et pH optimum, stabilité vis à vis du pH et de la température

Le maximum d'activité obtenu pour les xylanases de 65 kDa et 55 kDa était de 80°C comme pour la xylanase de 39 kDa, à un pH de 6,5 pour une incubation de 10 mn.

Les énergies d'activation des xylanases ont été déterminées. La portion du graphe de la représentation logarithmique d'Arrhénius est linéaire de 40 à 70°C. Les énergies d'activation calculées à partir de la pente de cette droite (Ln V en fonction de 1/T) étaient respectivement de 73,2 kJ/mole, 52,1 kJ/mole et 65 kJ/mole pour la 39 kDa.

Les trois enzymes présentaient un pH optimal d'activité à pH 6,5 et restaient stables pour des gammes de pH allant de 3 à 11 et pour des incubations réalisées à 4°C pendant 20 h dans les tampons appropriés.

Au delà de 70°C, les trois enzymes deviennent instables lorsqu'elles ont été soumises à 1 h de préincubation.

c - Km et Vm.

Les Km des endoxylanases de 65 et 55 kDa, obtenus avec du xylane soluble de bouleau étaient respectivement de 0,476 g/l et de 0,526 g/l comparativement au Km de la xylanase de 39 kDa qui était de 0,4 g/l.

Les Vm déterminées à 60°C étaient respectivement de 2951,6 UI/mg de protéines, de 3141,8 UI/mg de protéines comparativement à la Vm de la xylanase de 39 kDa qui était de 3301 UI/mg de protéines. Les protéines ont été déterminées sur la base du dosage de Bradford, (1976).

d - Composition en acides-aminés.

Les compositions en acides-aminés des trois xylanases sont très voisines (Tableau VII, p. 114). Ces xylanases possèdent un fort taux d'acides-aminés acides (approximativement 21 %). D'autre part, la détermination de la teneur en acides-aminés des xylanases nous a permis de définir plus précisément leurs activités spécifiques respectives. En effet, les dosages de protéines réalisés par la méthode de Bradford, (1976), n'étaient que peu satisfaisants (Debeire *et al.*, 1990). Les activités spécifiques déduites de la teneur en acides-aminés étaient les suivantes: 4030, 2790 et 2200 UI/mg de protéines, respectivement pour les xylanases de 39, 55 et 65 kDa. Ces valeurs ont un intérêt si on les compare entre elles. Ramenées en UI/nmole d'enzyme, elles sont de 157, 153 et 143 UI/nmole d'enzyme respectivement pour les xylanases de 39, 55 et 65 kDa. La valeur élevée de 4030 UI/mg de protéines comparée à celle décrite précédemment (2100 UI/mg de protéines) par Debeire *et al.*, (1990) est due au fait que nous ne pouvons calculer les pertes en protéines dues à l'échantillonnage, aux dialyses et à l'hydrolyse de la protéine.

e- Identité des séquences N-terminales des 3 xylanases.

Les séquences N-terminales (20 AA) des 3 xylanases étaient identiques (Fig. 35, p. 114) et prouvent l'origine commune de ces enzymes. Les différences de masses moléculaires sont certainement dues à des protéolyses spécifiques post-traductionnelles.

f- Identité antigénique des trois xylanases.

La figure 36 (p. 114) montre le résultat d'une double immunodiffusion sur agar. L'antiserum dirigé contre la xylanase de 65 kDa réagit avec les trois xylanases. De plus, les arcs de précipitation fusionnent, indiquant une identité antigénique entre ces trois enzymes.

TABLEAU VII

Composition centésimale en acides aminés des xylanases de *Clostridium thermolacticum*.

Composition centésimale en acides aminés des xylanases de <i>Clostridium thermolacticum</i>			
Acide aminé	39 kDa	55 kDa	65 kDa
Asp	11,5	12,1	12,5
Thr	8,0	9,6	8,7
Ser	9,3	10,2	9,4
Glu	11,5	9,6	9,6
Pro	4,1	4,4	4,7
Gly	16,0	13,3	15,0
Ala	4,5	5,2	6,3
Cys	ND	ND	ND
Val	5,6	6,4	6,5
Met	0,09	0,34	0,6
Ile	5,9	6,44	6,1
Leu	5,1	4,9	4,8
Tyr	5,4	6,1	4,9
Phe	3,4	3,6	3,8
His	0,9	0,81	0,6
Lys	3,8	2,8	2,8
Arg	4,7	4,2	3,7
Trp	ND	ND	ND

ND = non déterminé

N _t	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Gly-	Arg-	Ile-	Ile-	Tyr-	Asp-	Asn-	Glu-	Thr-	Gly-
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	Thr-	His-	Gly-	Gly-	Tyr-	Asp-	Tyr-	Glu-	Leu-	Asn-

Fig. 35: Séquence N-terminale commune des endoxylanases de masses moléculaires de 39, 55 et 65 kDa de *Clostridium thermolacticum*.

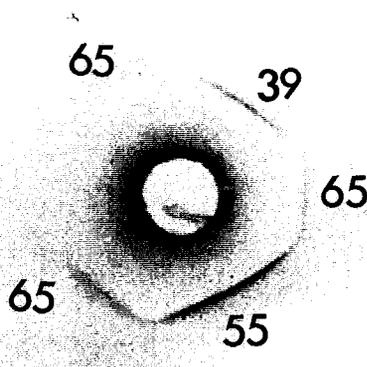


Fig. 36: Test d'Ouchterlony de double immuno-diffusion, montrant les réactivités croisées entre les xylanases de masses moléculaires de 39, 55 et 65 kDa produites par *Clostridium thermolacticum*.

B - PURIFICATION ET PROPRIETES DE L'ENDOXYLANASE DU *BACILLUS* XE ET DU MUTANT D₃

I - PURIFICATION DE L'ENDOXYLANASE EXCRETEE PAR LE *BACILLUS* XE.

Les purifications ont été réalisées à partir de 1,5 l de surnageant de culture, le Tableau VIII (p. 116) résume les différentes étapes de la purification. La figure 37 (p. 116) montre les résultats des suivis de purification en SDS-PAGE. Après concentration du surnageant de culture, la première étape de purification utilisait la chromatographie sur Q-Sépharose fast-flow. L'activité enzymatique n'était pas retenue par la colonne d'échange d'anions. Cette fraction non retenue a ensuite été déposée sur un gel de phényl-Sépharose, cette chromatographie a conduit à la purification de la xylanase, son élution a été réalisée par l'utilisation d'éthylène glycol à 25 p. 100. Ce type de purification reflète à la fois la très grande hydrophobicité de cette protéine et le peu de charges qu'elle possède à pH 8, son pHi étant de 7,8.

Bacillus XE excrète majoritairement une seule xylanase de masse moléculaire 22 kDa qui a été purifiée à un degré de pureté proche de 100 %. Cette enzyme constitue 50 % des protéines présentes dans le surnageant de culture, et la première étape de chromatographie sur Sépharose-Q nous permet de disposer d'une fraction déjà bien purifiée. *Bacillus* XE n'excrète pas de cellulases (non dosable) et peu de β -xylosidases dans le surnageant de culture. Une seule étape de prépurification suffit à éliminer l'activité β -xylosidasique.

II - PURIFICATION DE L'ENDOXYLANASE EXCRETEE PAR LE MUTANT D₃.

La méthodologie a été identique, et nous avons obtenu la même enzyme que pour le *Bacillus* XE. Ce résultat n'était pas surprenant mais il fallait néanmoins procéder à cette vérification.

TABLEAU VIII

Purification de la xylanase de *Bacillus* XE.

Etapes	Fractions	Volume (ml)	Protéines totales (mg)	Activité xylanasique totale (U.I.)	Activité spécifique (U.I./mg)	(%) Rendement
	Surnageant de culture	1.500	216	232.000	1071	100
I	Concentration	150	197	225.000	1142	97
II	Q Sépharose Fast Flow	250	142	204.250	1438	88
III	Phényl Sépharose	205	72	143.500	1993	62

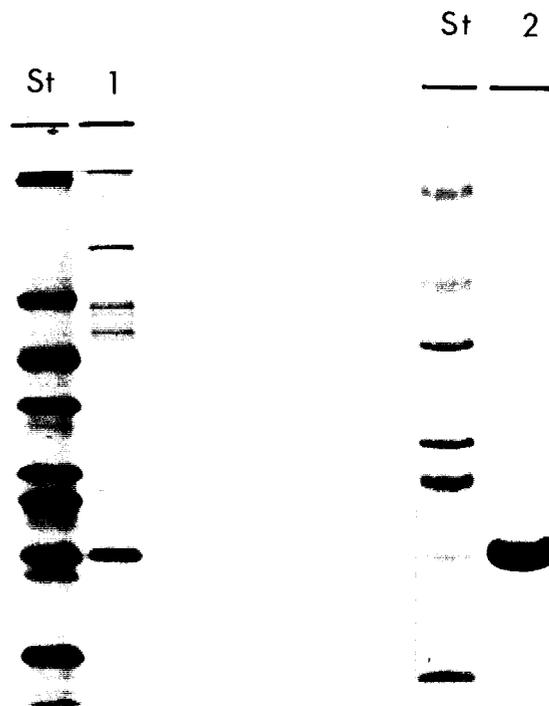


Fig. 37: Suivi de la purification de la xylanase de *Bacillus* XE par SDS PAGE.
 St: Témoins protéiques. 1: Surnageant de culture. 2: Xylanase purifiée après chromatographie sur Q-Sépharose et Phényl Sépharose.

III - ETUDES DES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES ET CATALYTIQUES DE L'ENDOXYLANASE DE *BACILLUS* XE.

a - Masse moléculaire et pHi.

La masse moléculaire de l'enzyme, déterminée par SDS-PAGE, était de 22 kDa (voir Fig. 37, p. 116). Il faut néanmoins noter que plusieurs tentatives visant à la détermination de la masse moléculaire de l'enzyme par chromatographie de gel-filtration ont échoué; la forte hydrophobicité de l'enzyme a conduit, quel que soit le type de gel et le tampon utilisés, à la rétention de l'enzyme sur le support. Par exemple, sur une colonne de Séphacryl S-200, l'enzyme n'a pu être éluée qu'après ajout d'éthylène glycol à 25 p. 100 à la phase mobile. Ceci révèle à nouveau le caractère hydrophobe de cette molécule. Son pHi était de 7,8, valeur relativement élevée pour ce type d'enzyme (hormis les xylanases alcalophiles produites par *Bacillus* W₁ et W₂ (pHi \cong 8,4) (Okazaki *et al*,1985).

b - Propriétés catalytiques.

1 - Température et pH optimum, stabilité vis à vis du pH et de la température

La xylanase de *Bacillus* XE présentait une activité optimale à 75°C pour des temps d'incubation ne dépassant pas 30 min. La figure 38 (p. 118) montre la stabilité de l'enzyme vis à vis de la température (l'enzyme a été soumise à 4 h de pré-incubation aux différentes températures). Le Tableau IX (p. 118) nous montre d'une part l'influence de la température à long terme sur la stabilité de l'enzyme et d'autre part l'influence de la dilution de l'enzyme sur sa stabilité. L'ajout de serum albumine bovine, "ballast protéique" utilisé habituellement en tant qu'agent protecteur, conduit dans ce cas à une dénaturation rapide de l'enzyme. La dilution de l'enzyme conduit à une plus forte dénaturation (une des hypothèses que nous pouvons formuler serait la suivante : présence de sites saturables et dénaturants sur la verrerie utilisée). D'autre part, la xylanase possède une large gamme de pH (4,8 à 7) pour laquelle l'enzyme demeure active (80 à 100 % de l'activité maximale et 50 % aux pH 4,2 et 9).

TABLEAU IX

Stabilité de la xylanase de *Bacillus* XE vis à vis de la température (60°C) et de la dilution enzymatique.

ACTIVITE DE L'ENZYME (UI/ml)	ACTIVITE RESIDUELLE (%)			
DILUTION DE L'ENZYME	t = 0	t = 5h	t = 24h	t = 48h
4000 UI/ml	100	100	100	62
40 UI/ml	100	72	57	45
40 UI/ml + SAB (0,1 %)	100	72	22	0

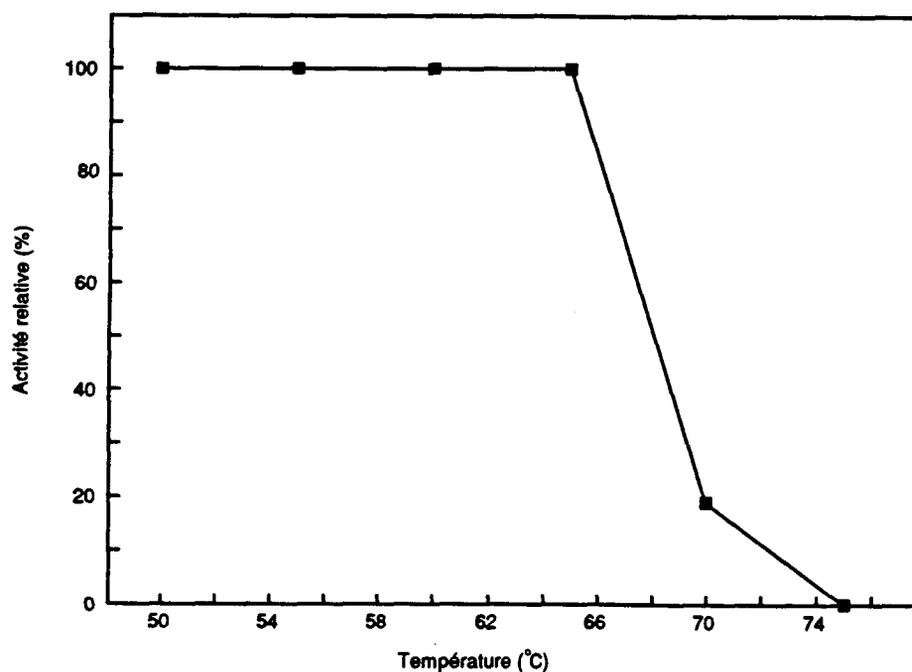


Fig. 38: Stabilité de la xylanase de 22 kDa de *Bacillus* en fonction de la température.

2 - Cinétiques d'hydrolyse de xylane de bouleau par l'endoxygénase de *Bacillus*.

La figure 39 (p. 120) montre le profil de la cinétique d'hydrolyse de xylane par la xylanase de *Bacillus*. La figure 40 (p. 120) représente la CCM analysant les oligosaccharides neutres issus de la dégradation enzymatique. Ces résultats montrent qu'il s'agit bien d'une endoxygénase : pour des temps courts de la réaction enzymatique (0 à 1h) des xylo-oligosaccharides de degré de polymérisation de 3 à 7 sont relargués, tandis que pour des temps plus longs on aboutit, aux xylobiose, xylotriose et xylo-tétraose, le xylotriose étant l'oligosaccharide neutre majeur. Les oligosaccharides acides issus de l'hydrolyse à long terme du xylane de bouleau par l'endoxygénase ont été identifiés par CCM. Il s'agit d'un mélange de Xyl3 GlcA, Xyl4 GlcA, Xyl5 GlcA et d'oligosaccharides de DP supérieurs. Le fait remarquable est que nous retrouvons la même famille d'acides aldouroniques libérés dans le cas de l'hydrolyse de glucuronoxylane de mélèze par l'endoxygénase de masse moléculaire de 39 kDa excrétée par *Clostridium thermolacticum* (Debeire *et al.*,1990; cette thèse).

3 - Action des inhibiteurs de la réaction enzymatique.

L'effet de différents inhibiteurs classiques des enzymes sur la xylanase de *Bacillus* XE a été étudié. Les seuls faits marquants concernent la non-inhibition par Ag⁺ de cette enzyme et sa non sensibilité vis à vis du SDS à 0,1 %.

4 - Détermination du Km et du Vm de l'endoxygénase de *Bacillus*.

Le Km de l'enzyme était de 0,06 % et la Vm de 2 100 U.I./mg de protéines à 60°C. Cette valeur a été déterminée après dialyse, lyophilisation et pesée de la xylanase. En effet, les résultats des dosages de protéines en utilisant les méthodes de Bradford ou de Lowry étaient aberrants. Le fait est à rapprocher des problèmes rencontrés pour le dosage des autres xylanases thermophiles, les xylanases de *Clostridium thermolacticum* (voir p. 113). Ces valeurs de Km et de Vm, sont sensiblement équivalentes à celles de la xylanase de masse moléculaire 39 kDa de *Clostridium thermolacticum*.

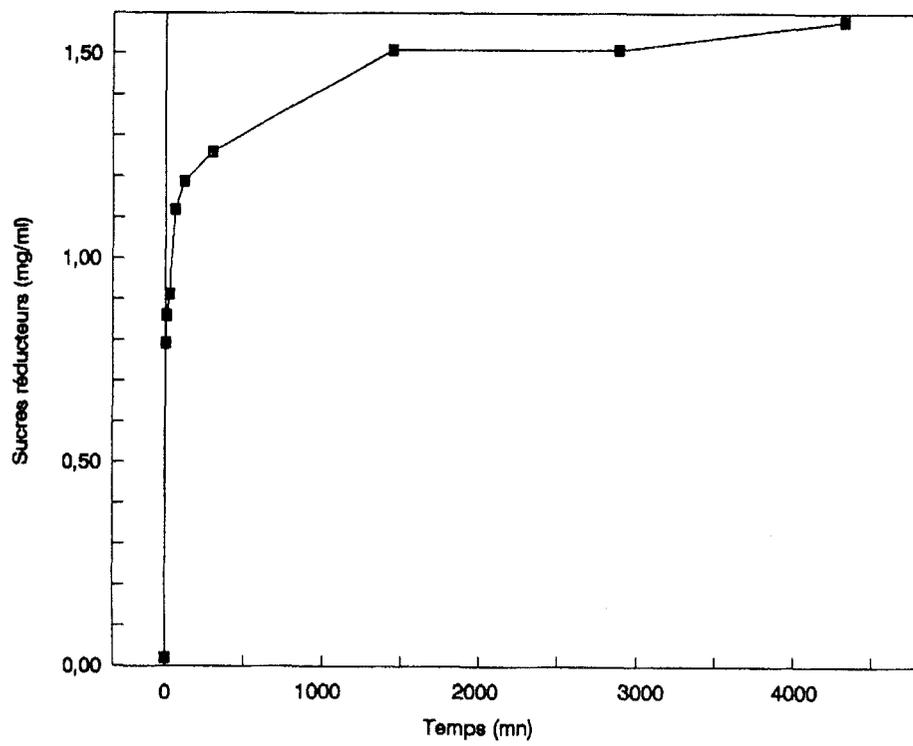


Fig. 39: Cinétique d'hydrolyse de xylane de bouleau par la xylanase purifiée de *Bacillus* XE.

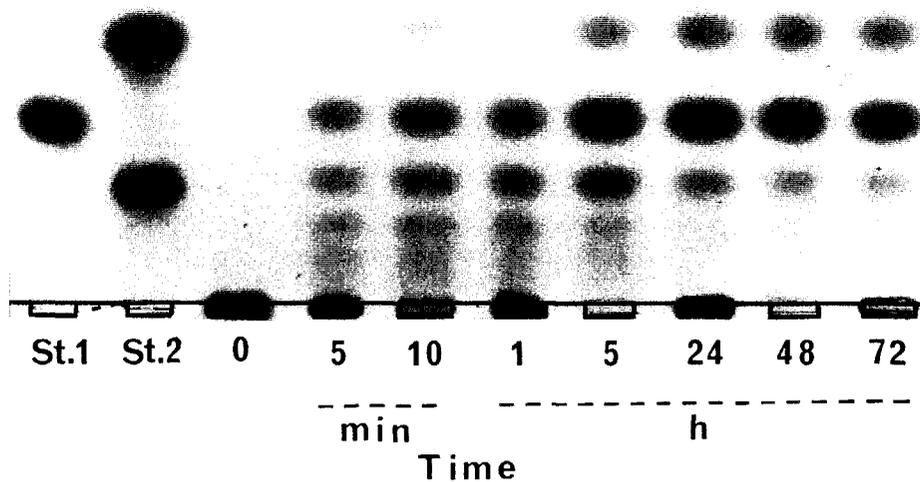


Fig. 40: Chromatographie sur couche mince des xylo-oligosaccharides libérés au cours de la cinétique d'hydrolyse. St.1: Xylose et Xylotriose témoins. St.2: Xylobiose et xylotétraose témoins.

IV - DISCUSSION.

Les quatre endoxylanases thermophiles que nous avons purifiées, possèdent des activités spécifiques très élevées par rapport à celles décrites dans la littérature. Leur thermostabilité est en partie responsable de ce phénomène mais les valeurs obtenues ne sont égalées que par les xylanases produites par *Aureobasidium pullulans* (Leathers, 1986), *Trichoderma harzianum*, *Aureobasidium pullulans* et *Schizophyllum commune* (Senior *et al.*, 1991), et *Clostridium stercorarium* (Berenger *et al.*, 1985). Les trois endoxylanases de *Clostridium thermolacticum* et celle de *Bacillus* possèdent des propriétés catalytiques et physico-chimiques très voisines (activités spécifiques, caractère hydrophobe des enzymes).

Les trois xylanases de *C. Thermolacticum* sont apparentées aux trois xylanases produites par une bactérie anaérobie voisine, *Clostridium stercorarium* (MM: 42,5; 63; et 75 kDa, Berenger *et al.*, 1985; Bronnenmeier, 1990). Les enzymes présentaient des propriétés physico-chimiques et catalytiques voisines et des réactions immunologiques croisées qui laisseraient supposer qu'elles pourraient dériver d'un seul gène. Pour la détermination de leurs séquences N-terminales, nous avons pu montrer que les trois xylanases de *C. thermolacticum* dérivait d'un même gène. La signification biologique d'un tel phénomène (1 gène: 3 enzymes) pourrait reposer sur le fait que ces enzymes agissent de façon complémentaire sur les substrats lignocellulosiques. Dans le chapitre de nos résultats, nous essaierons d'apporter une réponse à cette question.

La xylanase de 22 kDa de *Bacillus* fait partie de la famille des xylanases de faible masse moléculaire décrite par Gilkes *et al.*, 1991. Des résultats préliminaires concernant la détermination de la séquence N-terminale de la xylanase de *Bacillus*, indiquent qu'elle possède une homologie très importante (80 %) avec la xylanase de *Bacillus pumilus*. Cette dernière étant mésophile, la comparaison des séquences et des structures tertiaires de ces deux xylanases pourraient contribuer à une meilleure connaissance des relations structure-stabilité des protéines enzymatiques.

CHAPITRE II ETUDES DES SUBSTRATS

A - ETUDES DES RAFLES DE MAIS ET DE SES XYLANES.

I - INTRODUCTION

Le choix des rafles de maïs comme substrat a été décidé en fonction de son faible coût et du surplus agricole qu'il représente. D'autre part, ces rafles sont disponibles (Société Eurama, PAU) avec une granulométrie bien standardisée. L'utilisation d'autres substrats lignocellulosiques tels que les bagasses de canne à sucre, la paille etc., peut être facilement transposée. Lepoutre, (1990) avait étudié différents modes d'extraction des xylanes de rafles de maïs ainsi que leurs dégradabilités par les enzymes de *Clostridium thermolacticum* que nous avons prépurifiées. Le but était de mettre au point rapidement (études nutritionnelles sous-jacentes), une méthode de préparation de xylo-oligosaccharides, à l'échelle du kg, à partir de xylanes de rafles de maïs (voir chapitre suivant, p. 132).

II - ANALYSES DES SUBSTRATS DE LA REACTION ENZYMATIQUE.

a - Caractérisation des rafles de maïs.

Le Tableau X (p. 124) rassemble les résultats de l'analyse de la composition des rafles de maïs de granulométrie ≥ 100 mesh ; les rafles renferment 30 % de xylose, monosaccharide faisant l'objet de notre étude. Le Tableau XI (p. 124) indique la composition glucidique des eaux de rinçage des rafles de maïs dans lesquelles nous avons caractérisé essentiellement du glucose et du mannose. Ces monosaccharides représentent respectivement 59,3 % et 24,5 % des sucres totaux présents dans cette fraction soluble. Cette dernière constituait 1,42 % des rafles de maïs.

b - Extraction et analyses des xylanes de rafles de maïs.

La composition chimique des rafles est également donnée dans le Tableau XII (p. 124). Les hémicelluloses totales représentent 32,5 % du poids total des rafles et l'extraction alcaline à l'échelle du pilote a permis de les extraire avec un rendement supérieur à 60 %. A l'échelle du laboratoire, le xylane est obtenu après extraction par de la potasse à 24 % (p/v), filtration, et précipitation à l'éthanol (voir Matériels et Méthodes): le produit obtenu était pratiquement pur et renfermait 84,3 % d'hémicellulose. Par contre le xylane obtenu par extraction alcaline (échelle du pilote, consistant au traitement des rafles par une solution de KOH 2 M suivi d'une centrifugation et de la neutralisation du milieu par de l'acide acétique) (Voir Matériel et Méthodes), était moins pur. En effet, les lignines et le glucose représentaient respectivement 19,5 % et 12,1 % de la matière totale.

La proportion de xylane soluble dans les 2 types de préparations était identique et représentait 40 %. Les compositions en oses neutres des fractions solubles et insolubles de xylanes, issus de la préparation à l'échelle du pilote (Tableau XIII, p. 125) présentent respectivement des rapports Xyl/Ara de 4,7 et 11.

Notre étude visait à déterminer les paramètres régissant la cinétique d'hydrolyse de xylanes de rafles de maïs par nos endoxylanases prépurifiées. Nous avons donc déterminé la proportion de xylanes soluble et insoluble. La solubilité du xylane a été déterminée, en quantifiant après traitement à 60°C, le xylane dans les phases solubles et insolubles par dosage des sucres totaux et par analyse des monosaccharides en chromatographie en phase gazeuse. Trois extractions successives à 60°C du xylane de rafles de maïs nous ont permis de séparer du xylane insoluble respectivement, 16,4 % puis 7,8 % et enfin 3,9 % de xylane soluble. Le xylane insoluble récupéré à l'issue de ces 3 extractions a encore subi 2 lavages successifs afin de le débarrasser entièrement de la fraction soluble. Nous en avons déduit que le xylane de rafles de maïs, hormis les 7,6 % de non sucre qu'il renfermait constituait à 60°C, une fraction hétérogène à 70 % et homogène à 30 %. La composition en monosaccharides du xylane total, du xylane soluble provenant des trois extractions et du xylane insoluble est rassemblée dans le Tableau XIV (p. 125). Les monosaccharides libérés après hydrolyse acide en présence d'ATFA 2N ont été dérivés sous forme d'acétates d'alditol avant d'être analysés par chromatographie en phase gazeuse. Il apparaissait que les proportions des monosaccharides étaient différentes. Le xylane total renfermait 1 arabinose pour 14

TABLEAU X

Composition chimique des rafles de maïs.

Monosaccharides (en % de P.S.)		Polysaccharides (en % de P.S.)		Autres (en % de poids sec)	
Xyl	27,4	cellulose	31,5	eau	7,3
Glc	31,5			protéines	1,3
Ara	2,8			lignine	13,8
Gal	0,9	hemicellulose	32,5	cendres	1,1
Man	0,5				
GlcA	0,9				

TABLEAU XI

Composition glucidique des eaux de lavage des rafles de maïs.

MONOSACCHARIDES	en % des sucres totaux de la phase soluble
Glc	59,3
Man	24,5
Ara	7,6
Xyl	4,9
Gal	3,7

TABLEAU XII

Composition chimique des rafles de maïs et de leurs xylanes isolés.

Composition	Poids Total (%)		
	Rafles de maïs	xylane précipité à l'éthanol	xylane isolé à l'échelle du pilote
Arabinose	2.8	8	6.3
Xylose	27.4	71	56
Mannose	0.5	—	—
Galactose	0.9	1.4	1.5
Acide uronique	0.9	3.9	3.3
Hemicelluloses totales	32.5	84.3	67.1
Glucose	31.5	2.2	12.1
Lignines	13.8	6.0	19.5
Proteines	1.3	nd	nd
Cendres	1.1	1.5	nd
Eau	7.3	5.1	nd
Total	87.5	99.1	98.7

nd: non déterminé

TABLEAUX XIII

Composition en monosaccharides neutres des xylanes extraits des rafles de maïs à l'échelle du pilote. *La préparation brute de xylanes est constituée d'une suspension de xylanes soluble et insoluble (voir le Chapitre Matériels et Méthodes).*

Monosaccharide	Monosaccharides neutres (%)		
	Fraction brute	Soluble	Insoluble
Arabinose	8.3	13.2	7
Xylose	73.7	62.6	78.3
Galactose	2	4.5	1.2
Glucose	16	19.7	13.5

TABLEAU XIV

Composition en monosaccharides du xylane total, du xylane soluble provenant de trois extractions successives, et du xylane insoluble résiduel.

COMPOSITION EN MONOSACCHARIDES DU XYLANE DE RAFLES DE MAIS	XYLANE SOLUBLE (en % des sucres totaux)			XYLANE INSOLUBLE (en % des S.T.)	XYLANE TOTAL (en % des S.T.)
	S1	S2	S3		
XYLOSE	51,3	59	63	84,1	81
ARABINOSE	27,7	30	25	7,8	5,8
GALACTOSE	19,2	8,6	7,9	8,1	2
GLUCOSE	1,7	1,7	4,2	N.D.	11,2

xyloses ; le xylane homogène renfermait 1 arabinose pour 2 xyloses, le xylane hétérogène renfermait 1 arabinose pour 10 xyloses. Préalablement, nous avons étudié différentes conditions d'hydrolyse du xylane, et nous avons pu établir que le meilleur rendement de libération des monosaccharides avait été obtenu pour une concentration en ATFA 2 N et un temps d'hydrolyse de 2 h avec un rendement de 80 %. En ce qui concerne l'hydrolyse en présence d'HCl, le meilleur rendement de libération des monosaccharides avait été obtenu pour une concentration en HCl 1 N pendant 2 h (voir Tableau XV, p. 127).

Le dosage des acides uroniques a été réalisé sur le xylane total et nous avons déterminé qu'il était constitué de 3,9 % d'acides uroniques exprimés en pourcentage du poids sec. Nous avons également déterminé que le xylane de rafles de maïs renfermait 1,5 % de matières minérales exprimées en pourcentage de poids sec. Le dosage des sucres neutres totaux a été réalisé sur le xylane total et nous avons déterminé qu'il était constitué de 86,3 % de sucres neutres totaux exprimés en pourcentage du poids sec.

L'approche de la catalyse hétérogène nous avait conduit à analyser le substrat en microscopie électronique afin d'évaluer la taille des pores, paramètre conditionnant l'accessibilité de l'enzyme au substrat. Parallèlement, connaissant les masses moléculaires des 3 xylanases (voir p. 106), nous avons approximativement déterminé le volume hydrodynamique des 3 enzymes en considérant que ces protéines globulaires sont assimilables à des sphères. Nous en avons déduit que le rayon des protéines de 39 kDa, 55 kDa et 65 kDa était compris entre 22 et 27 Å. Par conséquent, si l'on considère que les pores du xylane sont de l'ordre de 500 Å à 1/2 µm (voir Fig. 41, p. 128), à condition que la préparation en microscopie électronique n'ait pas modifié la taille des pores, nous pouvons aisément affirmer que le substrat n'est pas uniquement accessible par l'enzyme à sa surface.

c - Caractérisation d'un composé micromoléculaire associé au xylane.

1 - Objectif

Au cours de ces expériences, l'objectif que nous nous étions fixé était d'expliquer l'importante teneur en glucose présente dans une préparation de xylane de rafles de maïs extraite à l'échelle du pilote (conditions décrites dans le chapitre Matériels et

TABLEAU XV

Rendements de libération des monosaccharides par hydrolyse acide.

MONOSACCHARIDES LIBERES (en % de poids sec)	ARA	XYL	GLC	GAL	RENDEMENTS D'HYDROLYSE (%)	RAPPORT XYL/ARA
HCL 1N; temps d'hydrolyse: 1 h	2,6	20,32	2,3	4,6	35	7,8
HCL 1N; temps d'hydrolyse: 2 h	5,5	52,21	5,4	6,7	82	9,5
HCL 2 N; temps d'hydrolyse: 2 h	3,7	51,25	6,1	3,5	77	14
HCL 4 N; temps d'hydrolyse: 4 h	2,6	12,6	4,6	3,2	28	4,8
A.T.F.A. temps d'hydrolyse: 2 h	3,9	55,4	7,6	1,38	80	14,2

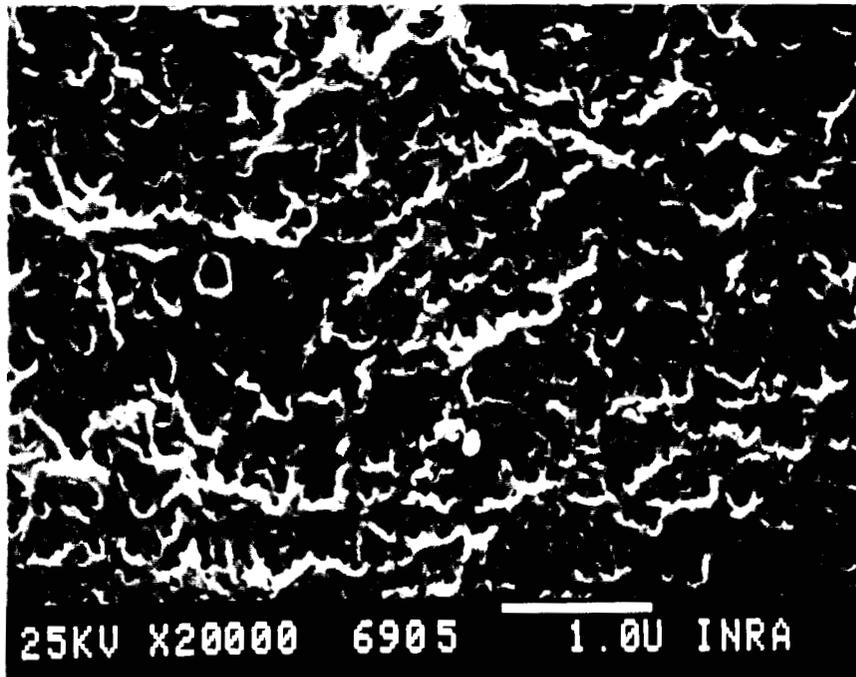


Fig. 41: Analyse par microscopie électronique à balayage des xylanes de rafles de maïs.

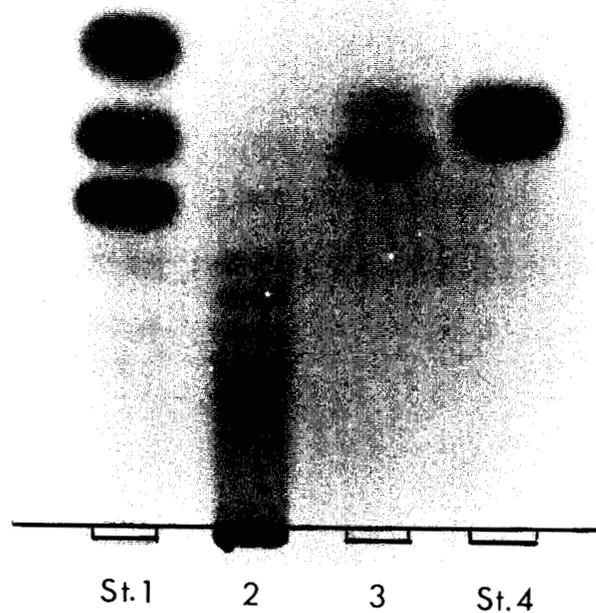


Fig. 42: Analyse par CCM du composé micromoléculaire glucidique purifié.
St.1: xylose, xylobiose et xylotriose témoins; 2: arabino-xylo-oligosaccharides; 3: composé micromoléculaire purifié; St. 4: glucose

Méthodes), comparé à une préparation de xylane réalisée par précipitation éthanolique. En effet, la composition en oses neutres des xylanes obtenus par extraction alcaline à l'échelle du pilote, (voir Tableau XIII, p. 125), avait montré que cette préparation renfermait 16 % de glucose comparée à la composition en monosaccharides neutres, alors que la préparation de xylane extraite par précipitation éthanolique ne renfermait que 2,9 % de glucose. Nous avons par conséquent tenté de doser le glucose libre dans le surnageant de la préparation d'extrait brut de xylane, par couplage enzymatique (voir le chapitre Matériels et Méthodes). Cependant, il ne nous a pas été possible de déterminer avec précision la teneur en glucose libre de cette préparation, car nous avons constaté que la réaction de couplage était inhibée par un composant présent dans cette préparation.

L'analyse par CCM des xylo-oligosaccharides libérés par la dégradation enzymatique à l'échelle du pilote de xylane de rafles de maïs révélait également la présence de 2 bandes orangées (révélation par l'orcinol-sulfurique), dont l'une (la bande mineure), pouvait correspondre au glucose. Compte tenu de la faible intensité de coloration de la bande mineure au niveau de la CCM, il était évident que, d'un point de vue quantitatif, les 16 % de glucose dosés dans l'extrait brut ne pouvaient provenir uniquement de la présence de glucose sous forme libre, mais également de glucose lié covalentiellement à un autre composé.

D'autre part, ces composés micromoléculaires présentaient un maximum d'absorption en UV à 270 nm, ce qui pouvait laisser supposer l'existence d'un composé glucidique associé à une molécule de type aromatique. Après purification de ces 2 composés micromoléculaires par gel-filtration, leur analyse par CCM, après hydrolyse préalable à l'ATFA (conditions décrites dans le chapitre Matériels et Méthodes), a montré que la bande majeure orangée détectée au niveau de la CCM était constituée également de glucose. En effet, l'analyse par CCM des composés micromoléculaires après hydrolyse à l'ATFA a montré que la bande mineure correspondant au glucose, présente avant hydrolyse à l'ATFA, s'intensifiait alors que la bande majeure présente avant hydrolyse avait disparu. Nous avons également noté la présence d'une autre bande migrant proche du front de migration de la CCM qui constituait probablement un produit de dégradation. Nous pouvions par conséquent affirmer que le composé majeur était constitué entre autre de glucose.

2 - Caractérisation du saccharose, composé micromoléculaire glucidique majeur associé au xylane.

Les composés micromoléculaires présents dans la fraction soluble d'une préparation à l'échelle du pilote de xylane de rafles de maïs (voir le Chapitre Matériels et Méthodes), ont été mis en évidence. Ces composés ont été purifiés puis identifiés.

Nous avons réalisé dans un premier temps une chromatographie de gel-filtration sur S-200 HR, à partir de 10 ml de xylane soluble issu du surnageant de la préparation d'extrait brut de xylane de rafles de maïs préalablement dessalé sur des colonnes de résines échangeuses d'ions (voir Matériels et Méthodes). Nous avons déposé l'équivalent de 60 mg de sucres neutres totaux. Le repérage des composés micromoléculaires au niveau du fractionnement a été effectué en réalisant un spectre d'absorption sur les fractions collectées. Les fractions qui présentaient un pic d'absorption à 270 nm ont été rassemblées. Par ailleurs, la courbe d'absorption de la coloration donnée par cette fraction avec le réactif au phénol sulfurique, montrait un maximum d'absorption à 486 nm. Nous avons pu d'ailleurs vérifier que cette valeur était caractéristique de la coloration donnée par le glucose avec le réactif au phénol sulfurique.

La fraction recueillie a été chromatographiée à nouveau par gel-filtration sur une colonne de Bio-Gel P-2 dans les conditions décrites dans le chapitre Matériels et Méthodes. Le repérage des composés micromoléculaires au niveau du fractionnement a été réalisé comme décrit précédemment. Il a été analysé par CCM (voir Fig. 42, p. 128). Le dosage du glucose libre a pu être effectué au niveau de la fraction purifiée sans être confronté à des problèmes d'inhibition.

L'analyse en FAB-MS du composé majeur a montré qu'il présentait une masse moléculaire identique à celle du saccharose. Ceci a pu être confirmé en analysant par CCM la migration du saccharose comparée à celle du composé purifié.

Sur la base de ces résultats, nous avons pu en déduire que le saccharose et le glucose libre représentaient 0,9 % des sucres neutres totaux présents dans l'extrait brut de xylane avec 0,7 % de saccharose et 0,2 % de glucose libre. Parallèlement, l'analyse des sucres neutres totaux présents dans les eaux de lavage des rafles de maïs (qui représentent 1,42 % des sucres totaux présents dans les rafles), ont montré que le glucose dosé par chromatographie en phase gazeuse, représentait 0,85 % des sucres totaux présents dans les rafles. Etant donné que la présence de saccharose ne présentait

aucun intérêt pour la suite des expériences, nous n'avons pas vérifié si les eaux de lavage des rafles renfermaient du saccharose et du glucose libre mais il est fort probable que ces derniers auraient pu être isolés à partir des eaux de lavage des rafles de maïs. D'autre part, l'origine de l'absorption à 270 nm n'a pu être établie.

Nous avons donc pu mettre en évidence que du saccharose était présent dans les rafles de maïs commerciales. Son origine reste néanmoins à déterminer, comme la nature du composé présentant un maximum d'absorption à 270 nm et co-éluant avec le saccharose.

CHAPITRE III

PRODUCTION DE XYLO-OLIGOSACCHARIDES A L'ECHELLE DU PILOTE PAR HYDROLYSE ENZYMATIQUE DE XYLANES DE RAFLES DE MAIS

A - INTRODUCTION

Les xylanes peuvent être convertis après extraction de la biomasse et hydrolyse en produits (oligosaccharides et monosaccharides) pouvant être utilisés dans les secteurs alimentaire, chimique ou pharmaceutique.

Les hémicelluloses présentent des propriétés de rétention d'eau qui constitue une caractéristique essentielle des pentosanes (Holloway et Greig, 1984). Ainsi, les xylo-oligosaccharides et arabino-xylo-oligosaccharides obtenus par dépolymérisation de ce matériel hémicellulosique pourraient être des additifs intéressants dans les produits alimentaires comme rétenteurs d'eau.

Ces oligosaccharides, ou leurs dérivés réduits, pourraient également être utilisés comme agents de charge peu caloriques (voir la liste des brevets, mais cette application nécessitait l'étude de leur dégradabilité par la flore du colon, *in vitro* et *in vivo*).

L'hydrolyse acide est associée à la formation de produits toxiques qui limitent ses applications. L'utilisation d'enzymes devraient permettre la faisabilité technique et économique de l'emploi de procédés biotechnologiques pour l'hydrolyse du xylane (Wong *et al.*, 1988; Woodward, 1984).

Les études nutritionnelles et physico-chimiques des xylo-oligosaccharides (réalisés à l'I.N.R.A de Nantes) nécessitaient leur préparation à l'échelle du pilote. La solution la plus simple et la plus rapide consistait à mettre en place un procédé pilote, en batch incluant :

1 - la prépurification d'endoxylanases de *Cl. thermolacticum* à l'échelle du million d'unités et l'étude de la stabilité thermique de ces enzymes, sur plusieurs jours à 60°C.

2 - la mise au point d'un procédé rapide de préparation de xylanes à partir de rafles de maïs à l'échelle de la dizaine de kg et l'étude de la production de xylo-oligosaccharides par hydrolyse enzymatique.

3 - la séparation des oligosaccharides produits et la détermination de leurs structures primaires.

Ce projet a pu être réalisé rapidement dans le cadre d'un travail d'équipe. Je me suis chargée du points 1., et en collaboration avec J.P. LEPOUTRE et P. PELLERIN des points 2 et 3.

B - PREPURIFICATION DES XYLANASES DE *CLOSTRIDIUM THERMOLACTICUM*.

Nous avons choisi d'utiliser une fraction enzymatique prépurifiée, à partir du surnageant cellulaire d'une fermentation de 200 l (90 l seulement ont été utilisés) de *Clostridium thermolacticum*, par chromatographie liquide à haut débit sur Q-Sepharose (voir p. 99). Les caractéristiques de la fraction enzymatique au cours des différentes étapes de purification sont rassemblées dans le Tableau V (Chapitre I, p. 100).

C - PROPRIETES DE LA FRACTION PREPURIFIEE.

Les principales caractéristiques des xylanases de la fraction prépurifiée sont rassemblées dans le Tableau XVI, (p. 134).

La fraction enzymatique prépurifiée présentait un optimum d'activité à pH 6 (dans le tampon acétate de Na 0,05 M) et à 75°C.

Après 2 jours d'incubation à 60°C, 80 % de l'activité était retrouvée. Dans le tampon acétate de sodium 1,5 M , à 60°C, la perte d'activité de l'enzyme n'était que de 40 % seulement et le pH optimum d'activité était de 7 (Lepoutre, 1990).

TABLEAU XVI

Principales caractéristiques des xylanases utilisées pour la production des xylo-oligosaccharides en réacteur de 200 litres.

Nombre de xylanases	3
Masses Moléculaires	39kDa-55kDa-65kDa
Température optimale	75°C
pH optimum	6
Activité xylanasique	290 UI/mg de protéines
Activité C.M.C.asique	6 UI/mg de protéines
Activités β -xylosidasique et β -glucosidasique	< 3 mUI/mg de protéines

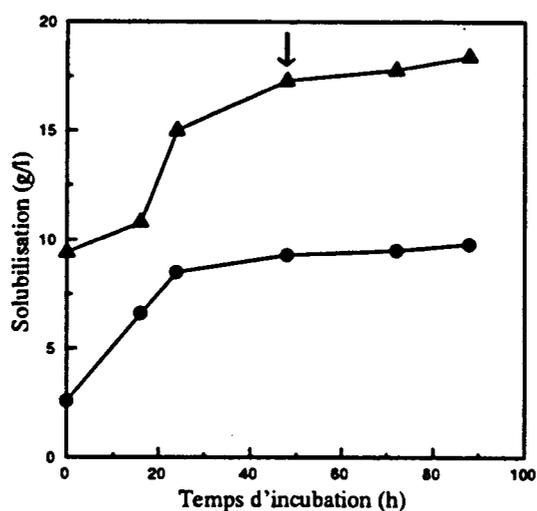


Fig. 43: Suivi de la production de xylo-oligosaccharides par hydrolyse enzymatique des xylanes de rafles de maïs, à l'échelle du pilote.

(●) Sucres réducteurs; (▲) Sucres totaux; (←) Ajout enzymatique.

D - PRODUCTION D'OLIGOSACCHARIDES A PARTIR DE XYLANE DE RAFLES DE MAIS

3,5 kg de xylane ont été préparés dans 135 l d'une solution 1,5 M en acétate de potassium, après traitement de 10 kg de rafles de maïs par 100 l de KOH 2 M, après centrifugation et neutralisation par de l'acide acétique.

L'hydrolyse a été initiée par l'ajout de la fraction enzymatique partiellement purifiée (100 000 UI). Le suivi de l'hydrolyse (dosage des sucres réducteurs et totaux) se traduisant par la solubilisation du xylane de rafles de maïs, est représenté figure 43 (p. 134). La concentration initiale en sucres totaux de la phase soluble correspond approximativement à la quantité théorique de xylane soluble (1,2 kg) présent dans la préparation réalisée à l'échelle du pilote.

L'analyse de la phase soluble montre que les 16 premières heures d'hydrolyse sont caractérisées par une nette augmentation en sucres réducteurs alors que la teneur en sucres totaux reste constante. Ces résultats indiquent que le xylane soluble est d'abord hydrolysé. Les teneurs en sucres totaux et réducteurs augmentent ensuite pour atteindre respectivement les maxima de 18,5 et 9,5 g/l. Il apparaît qu'un second ajout d'enzyme (100 000 UI) n'a pas d'effet sur les quantités de xylo-oligosaccharides libérés.

La quantité de sucres solubles totaux présents en fin de réaction (dosage réalisé par la méthode au phénol/acide sulfurique et décrit dans les Matériels et Méthodes) correspond à 80 % de la teneur initiale en sucres neutres totaux de la préparation pilote. L'analyse par CCM des oligosaccharides neutres présents dans les échantillons prélevés au cours de l'hydrolyse, indique que des xylo-oligosaccharides de DP 2-6 et des traces de xylose ont été libérés (Fig. 44, p. 137) avec une augmentation de la concentration en xylobiose et en xylotriose pour les périodes d'incubation prolongées.

E - PREPARATION ET SEPARATION DES OLIGOSACCHARIDES.

I - PREPARATION DES XYLO-OLIGOSACCHARIDES.

85 % des sucres solubles présents dans l'hydrolysate final ont été adsorbés sur charbon actif et fractionnés en réalisant des éluions successives par des solutions éthanoliques de concentrations croissantes (voir Chapitre Matériel et Méthodes). L'analyse par densitométrie des plaques de CCM a permis d'estimer les proportions

relatives de chaque famille d'oligosaccharides (Tableau XVII, p. 137). Les fractions éluées par des solutions éthanoliques à 5 % et à 15 %, renfermaient des oligosaccharides de DP2 et de DP3: les fractions éluées par des solutions éthanoliques à 30 % renfermaient des oligosaccharides de DP allant de 2 à 7 et de faibles quantités d'oligosaccharides de DP supérieurs.

Les oligosaccharides de DP2 et DP3 représentaient chacun 30 % des produits totaux. Nous avons donc pu préparer 1,7 kg de xylo-oligosaccharides.

II - ANALYSE DES OLIGOSACCHARIDES NEUTRES ET ACIDES.

Les oligosaccharides neutres et acides présents dans 100 ml d'hydrolysats final ont été séparés sur des colonnes de résines échangeuses d'ions comme décrit dans le chapitre Matériels et Méthodes et les DP des familles d'oligosaccharides neutres et acides ont été déterminés par CCM.

100 ml d'hydrolysats centrifugés ont été déposés sur 300 ml de résine cationique (forme H⁺) puis sur 400 ml de résine anionique (forme formiate). Après élution par le formiate d'ammonium des oligosaccharides acides et concentration à l'évaporateur rotatif, ces derniers ont été dessalés sur une colonne de Bio-Gel P-2 de dimension 3,5 x 50 cm.

Le dosage des sucres neutres totaux et des acides uroniques dans les fractions respectives ont montré que les acides uroniques représentaient 3,79 % des sucres totaux (acides et neutres) présents dans le surnageant issu de l'hydrolyse enzymatique à l'échelle du pilote.

L'analyse par CCM des sucres neutres libérés par la dégradation du xylane de rafles de maïs montre que des xylo-oligosaccharides de DP de 2 à 7 sont libérés avec une majorité de xylobiose et de xylotriose.

L'analyse par CCM des acides aldouroniques présents en fin d'hydrolyse dans le surnageant, montre des acides aldouroniques de DP élevés, et également en quantité non négligeable des acides aldouroniques de DP inférieurs; qui ont des comportements chromatographiques identiques aux oligosaccharides témoins Xyl₄GlcA et Xyl₅GlcA.

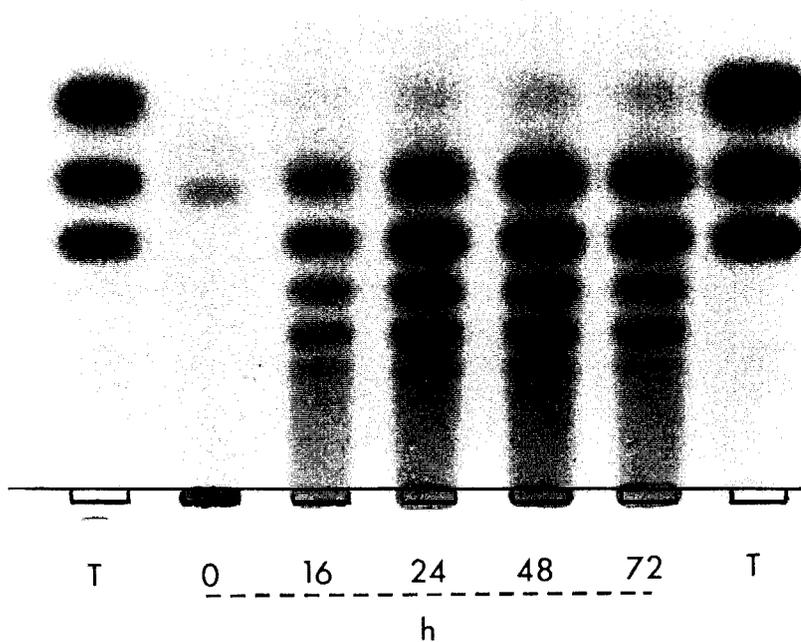


Fig. 44: CCM des xylo-oligosaccharides libérés à l'échelle du pilote, par hydrolyse enzymatique de xylane de rafles de maïs.
T: xylose, xylobiose et xylotriose.

TABLEAU XVII

Fractionnement des oligosaccharides adsorbés sur le charbon actif, par éluations successives.

Etape (% v/v ethanol)	Recupération (g)	Distribution des produits* en (%)						
		DP2	DP3	DP4	DP5	DP6	DP7	>DP7
5	140	74	26	--	--	--	--	--
15	355	40	48	12	--	--	--	--
30 (1 ^{ère} elution)	1060	18	29	11	10	14	7	11
30 (2 ^{nde} elution)	175	9	29	18	9	12	7	16
Total	1730	26	33	11	7	10	5	8

* Déterminée par l'analyse par densitométrie des plaques de CCM.

III - PURIFICATION SUR COLONNE DE DOWEX AG 50W-X4 ET CARACTERISATION DES OLIGOSACCHARIDES.

Les différents oligosaccharides, de la première fraction éluée par la solution éthanolique à 30 %, ont été purifiés. La purification a été réalisée par chromatographie sur colonne de AG 50W-X4. Les fractions correspondant aux pics ont été collectées, rassemblées, concentrées, et chromatographiées à nouveau dans les mêmes conditions. Les fractions obtenues à l'issue de ces étapes renfermaient chacune une famille d'oligosaccharides homogène en CCM.

Le Tableau XVIII (p. 139) donne la composition en monosaccharides et les rapports Xyl/Ara de chaque oligosaccharide purifié. Les oligosaccharides de DP2 et de DP3 étaient principalement constitués de xylose. L'analyse des rapports Xyl/Ara des oligosaccharides de DP supérieurs indiquait la présence d'un résidu arabinosyl dans chaque oligosaccharide.

Les quantités d'oligosaccharides purifiés par cette méthode étant insuffisantes, nous avons entrepris une autre série de purifications en vue de la détermination de leurs structures primaires.

IV - PURIFICATION DES ARABINO-XYLO-OLIGOSACCHARIDES PRESENTS DANS DES FAMILLES D'OLIGOSACCHARIDES DE DP DEFINIS.

L'objectif que nous nous étions fixés était de préparer des quantités suffisantes d'arabino-xylo-oligosaccharides provenant de l'hydrolyse enzymatique de xylanes de rafles de maïs, pour permettre leurs études structurales (RMN, FAB-MS). En effet, chaque famille d'arabino-xylo-oligosaccharides de DP définis étaient certainement composés d'isomères de position.

Dans un premier temps, nous avons procédé à des séparations chromatographiques sur une colonne de Bio-Gel P-2 (Fig. 45, p. 139), afin d'éliminer les xylobiose et xylotriose, et également afin de prépurifier les arabino-xylo-oligosaccharides selon leur DP (de 4 à 7). Ces derniers ont été estimés par CCM (Fig. 46, p. 140). Nous nous sommes attachés à purifier les fractions II, III et IV (Fig. 45, p. 139). Ces fractions ont été rechromatographiées sur une colonne de Bio-Gel P-2, analysées après séparation par CCM, de manière à repérer les oligosaccharides de DP 4,

TABLEAU XVIII

Composition centésimale en monosaccharides neutres des oligosaccharides purifiés.

Composition en monosaccharides en pourcentage des oligosaccharides neutres totaux					
Produit	Ara	Xyl	Gal	Glc	Xyl/Ara
DP2	0.7	97.4	0.1	1.8	139
DP3	0.4	95.3	0.5	3.8	238
DP4	19.9	75.4	1.2	3.5	3.8
DP5	17.8	80.1	0.5	1.6	4.5
DP6	16.2	81	1.3	1.5	5.0
DP7	14.3	80.9	2.2	2.6	5.7
DP >7	18.2	73.2	5.8	2.8	4.0

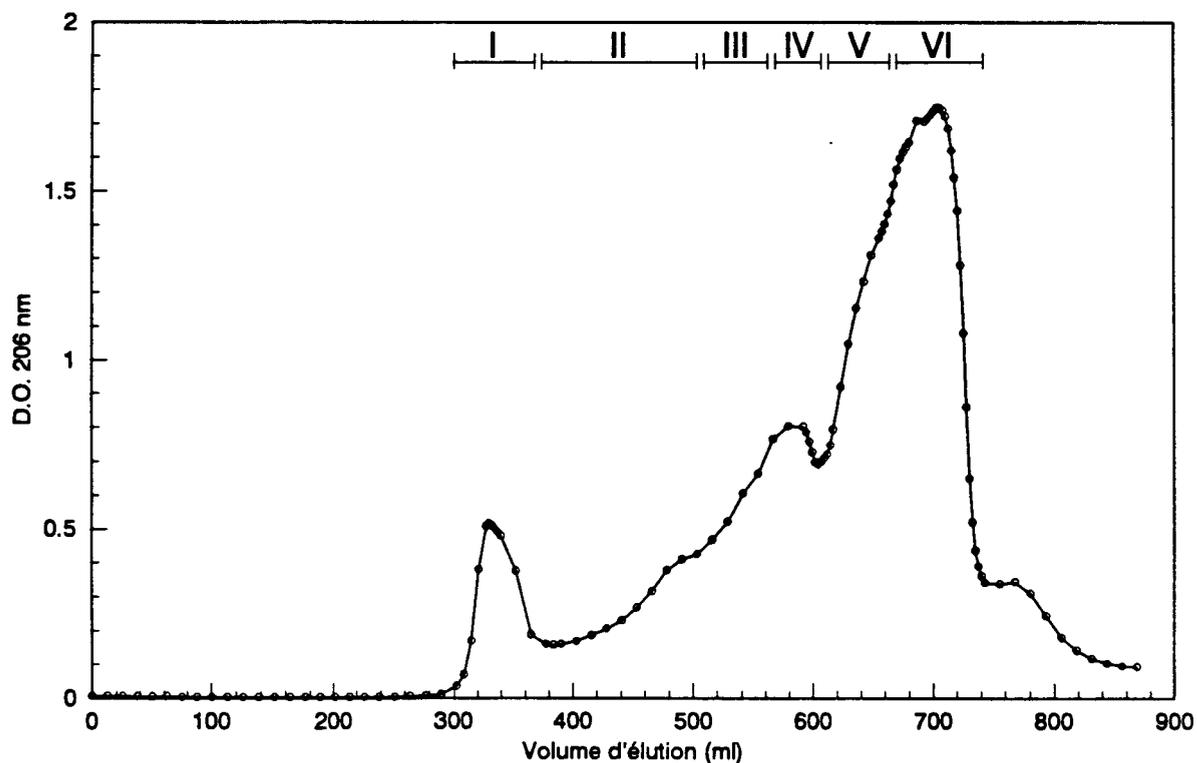


Fig. 45: Séparation par chromatographie de gel filtration sur Bio-Gel P-2 des xylo-oligosaccharides libérés par hydrolyse enzymatique à l'échelle du pilote, des xylandes de rafles de maïs

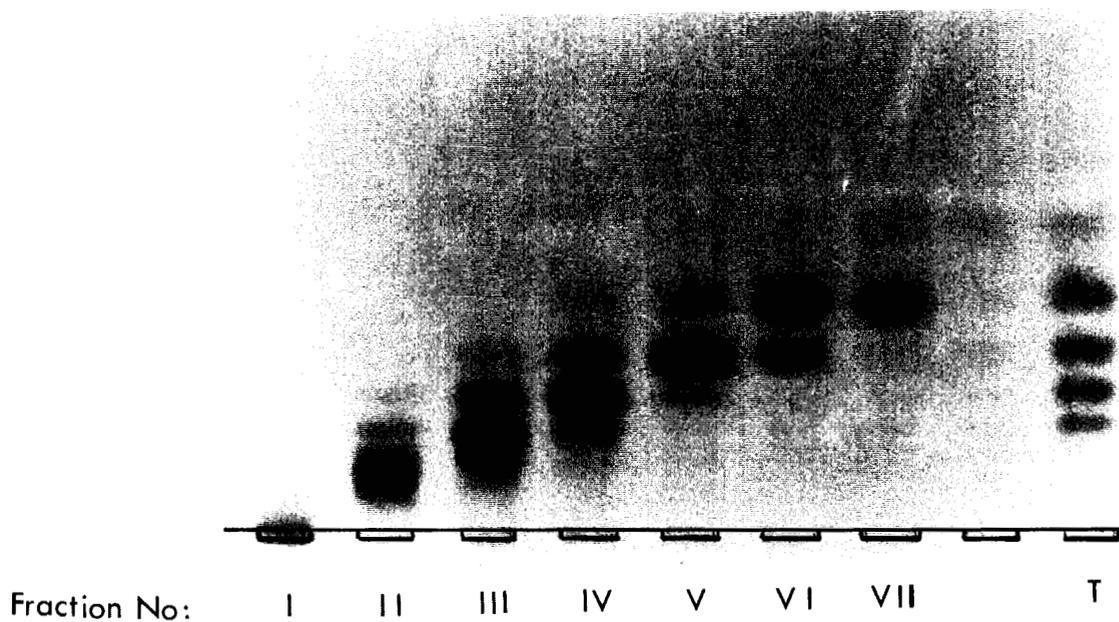


Fig. 46: Analyse par CCM des différentes fractions oligosaccharidiques séparées par chromatographie sur une colonne de Bio-Gel P-2.
T : xylo-oligosaccharides témoins, X₂, X₃, X₄ et X₅.

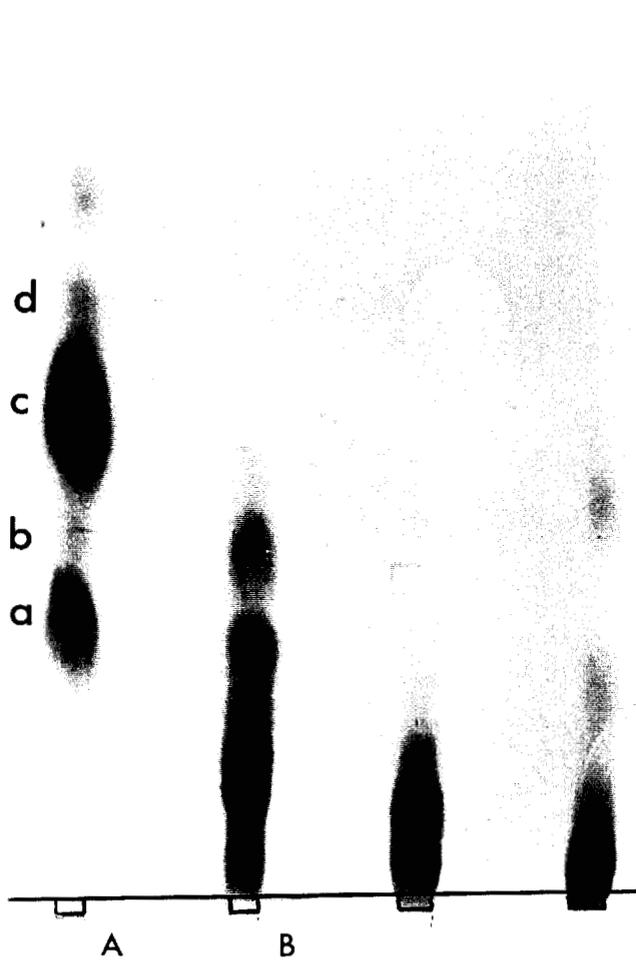


Fig. 47: Chromatographies papier (16 h) des xylo-oligosaccharides séparés par chromatographie sur Bio-Gel P-2.

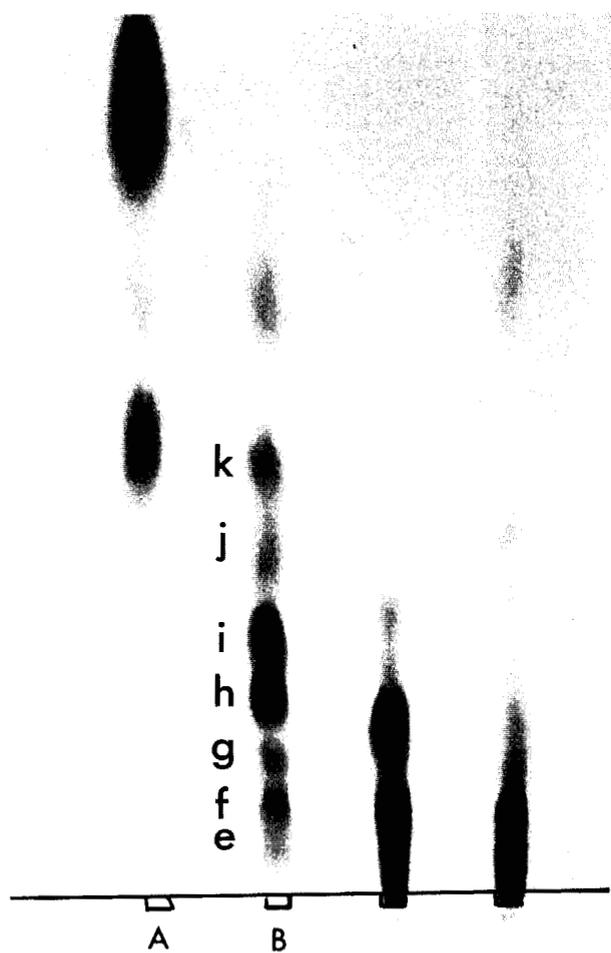


Fig. 48: Chromatographies papier (40 h) des xylo-oligosaccharides séparés par chromatographie sur Bio-Gel P-2.

5 et 6 qui ont été rassemblés pour donner deux fractions oligosaccharidiques, la première (Fraction A) étant enrichie en oligosaccharides de DP 4 et 5, la deuxième (Fraction B) étant enrichie en oligosaccharides de DP 5 et 6.

a - Chromatographies préparatives sur papier.

Les chromatogrammes analytiques sur papier sont représentés dans les figures 47 et 48 (p. 140). Après une chromatographie préparative de 16 h, la fraction A, a été séparée en 4 fractions (a à d) tandis qu'après une chromatographie préparative de 40 h, la fraction B a été séparée en 7 fractions (de e à k). Toutes ces fractions ont été éluées.

b - Analyse des différentes fractions oligosaccharidiques.

Les différentes fractions oligosaccharidiques obtenues ont été dessalées sur une colonne de Bio-Gel P-2. Les fractions f, g, h et j issues de la fraction B ont été séparées sur Bio-Gel P-2 en fractions f_1 et f_2 , g_1 et g_2 , h_1 et h_2 , j_1 et j_2 . Les différentes fractions de type₁ étaient éluées à l'exclusion de la colonne et ont donc été séparées des fractions de type₂.

Tous ces oligosaccharides ont été analysés par CCM (Figures 49 et 50, p. 142) où ces composés apparaissaient homogènes. Les compositions en sucres neutres et en acides uroniques de ces différentes fractions sont rassemblées dans le Tableau XIX (p. 142).

c - Discussion.

Nous avons pu isoler par chromatographie papier des oligosaccharides qui migraient initialement de la même manière par CCM. De plus, les dessalages sur Bio-Gel P-2 des oligosaccharides f, g, h et j, nous ont permis de séparer des composés possédant des résidus d'acide uronique. Ces oligosaccharides auraient dûs normalement être éliminés lors de l'étape de chromatographie sur charbon (voir p. 135). L'élucidation de la structure primaire de ces composés, pourra donner des réponses à ce phénomène.

Nous disposons dès à présent, de quantités suffisantes d'oligosaccharides pour procéder à leurs analyses par des expériences de méthylation et de FAB-MS.

TABLEAU XIX

Dosage des sucres neutres et acides des oligosaccharides de DP 4-6 issus de l'hydrolyse enzymatique de xylane de rafles de maïs, et isolés par chromatographie préparative sur papier.

Composition en sucres neutres et acides des oligosaccharides de DP 4-6 issus de l'hydrolyse enzymatique de xylandes de rafles de maïs et séparés par chromatographie papier séparable.															
Oligosaccharides	a	b	c	d	e	f ₁	f ₂	g ₁	g ₂	h ₁	h ₂	i	j ₁	j ₂	k
Sucres neutres (mg)	17,2	3,5	81	4	1,4	3,5	0,25	1	0,7	10	1,2	11	0,8	2	3,5
Acides uroniques (mg)	-	-	-	-	0,28	0,73	-	0,24	-	2,4	-	0,1	0,25	-	-

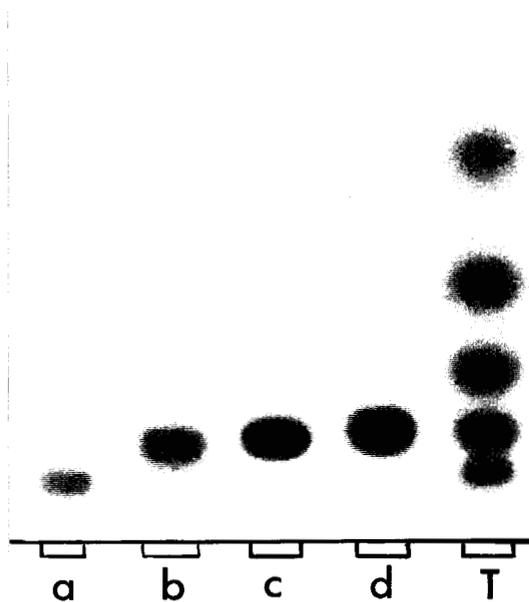


Fig. 49: CCM des oligosaccharides isolés par chromatographie papier préparative, (Fraction A, DP 4, 5), T : témoins xylo-oligosaccharidiques de DP 1 à 5.

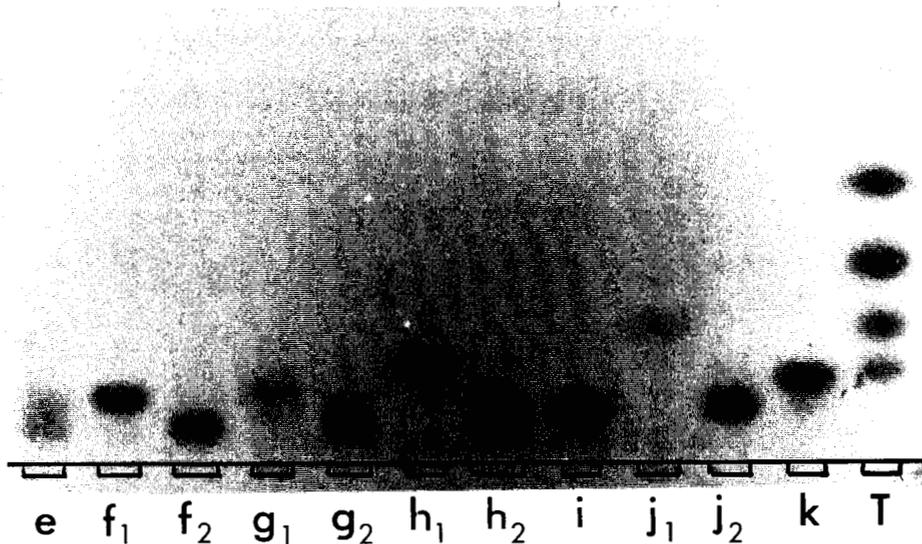


Fig. 50: CCM des oligosaccharides isolés par chromatographie papier préparative, (Fraction B, DP 5, 6), T : témoins xylo-oligosaccharidiques de DP 1 à 5.

F - DISCUSSION.

Nous avons développé un protocole rapide pour la production de xylo-oligosaccharides et d'arabino-xylo-oligosaccharides spécifiques, en utilisant une préparation enzymatique prépurifiée d'endoxylanases issue de la culture d'une bactérie anaérobie thermophile, *Clostridium thermolacticum*, et une préparation de xylane de rafles de maïs. La thermostabilité des endoxylanases utilisées, nous a permis de réaliser l'hydrolyse du xylane au delà de 48 h et à 60°C. La quantité finale d'oligosaccharides produits représentait environ 60 % de l'arabinoxylane initialement présent. Des études préliminaires ont montré que l'inhibition par les produits de la réaction se manifestait en fin d'hydrolyse enzymatique et pour des concentrations en produits solubles libérés atteignant des concentrations de 18,5 g/l, et limitant ainsi le rendement en oligosaccharides. L'élimination en continu du milieu d'incubation, des produits de faible masse moléculaire, devrait permettre d'optimiser la production d'oligosaccharides.

Une endoxylanase purifiée produite par *Streptomyces* sp E-86 a été utilisée pour l'hydrolyse des arabinoxylanes de rafles de maïs (Kusakabe *et al.*, 1983; 1977). Les produits de fin d'hydrolyse étaient principalement constitués de xylose et de xylobiose, et également présents en quantité moindre, de Xyl Ara, de Xyl₂ Ara, de Xyl₃ Ara, et de Xyl₃ Ara₂. Les oligosaccharides produits dans cette étude par l'hydrolyse à long terme de xylanes de rafles de maïs étaient représentés principalement par le xylobiose et le xylotriose, et par des arabino-xylo-oligosaccharides de DP allant de 4 à 7. Les oligosaccharides constitués de glucose et d'acides uroniques n'ont pas fait l'objet de cette étude étant donné qu'ils ne sont pas adsorbés sur le charbon, comme d'ailleurs le xylose, et ont ainsi été éliminés. On a pu néanmoins mettre en évidence des traces de ces composés lors d'analyses plus poussées de ces composés. On a également observé lors d'études des hydrolysats avant passage sur charbon actif, que les xylo-oligosaccharides acides libérés, présents en fin d'hydrolyse, représentaient 12,53 % des sucres neutres totaux, ou 12,27 % des sucres totaux (acides + neutres), qu'ils étaient constitués de 14,39 % d'acides uroniques et que ces derniers représentaient 3,79 % des sucres totaux (neutres + acides).

L'activité enzymatique de la fraction xylanasiqne prépurifiée était attribuée à trois endoxylanases de masses moléculaires de 39, 55, et 65 kDa décrites au chapitre I et qui présentaient des propriétés similaires. L'étude du mode d'action de la xylanase de masse moléculaire de 39 kDa, sur un 4-O-methyl-glucuronoxylane avait déjà été décrit antérieurement (Debeire *et al.*, 1990); les produits neutres de fin d'hydrolyse étaient représentés par le xylobiose et le xylotriase avec des traces de xylose et les produits acides de fin d'hydrolyse étaient représentés par des oligosaccharides de DP supérieurs (Xyl₄GlcA, Xyl₅GlcA, etc.).

Dans cette étude, l'hydrolyse de l'arabino-glucuronoxylane par les trois xylanases de *Clostridium thermolacticum* a également conduit à la production de xylobiose et de xylotriase, mais aussi d'oligosaccharides de DP supérieurs, substitués et non hydrolysables.

Nous avons donc obtenu d'importantes quantités (de l'ordre du kg), de xylo- et d'arabino-xylo-oligosaccharides. Les études premières études nutritionnelles *in vitro*, réalisées à partir de ces produits en vue de leur utilisation potentielle en tant qu'additifs alimentaires, ont montré que ces composés sont rapidement dégradés par les bactéries de la flore du colon humain. Ces oligosaccharides ne seraient donc pas, contrairement aux résultats issus d'études antérieures (se reporter à la liste des brevets), des agents de charge glucidiques non caloriques. D'autres expériences utilisant ces mêmes composés préalablement réduits sont actuellement en cours de réalisation.

CHAPITRE IV

ETUDES DES MODES D'ACTION DES XYLANASES DE *CLOSTRIDIUM THERMOLACTICUM* ET DE *BACILLUS XE*: NOTION D'ISOXYLANASES.

A - ETUDE DE L'HYDROLYSE DE GLUCURONOXYLANES PAR LES XYLANASES DE 65 ET 55 kDA.

I - HYDROLYSE DU XYLANE DE MELEZE.

Les cinétiques d'hydrolyse du xylane soluble de mélèze par les xylanases de masses moléculaires de 55 et 65 kDa (décrites dans le chapitre Matériel et Méthodes), sont représentées figure 51 (p. 146). Au bout de 72 h d'incubation enzymatique à 60°C, les pourcentages d'hydrolyse du xylane de mélèze s'élèvent respectivement à 35,3 % et à 38,4 %. Ces valeurs sont voisines du pourcentage d'hydrolyse du xylane de mélèze obtenu par la xylanase de 39 kDa, qui était de 37 %. Les oligosaccharides neutres libérés par les xylanases de masses moléculaires de 55 et 65 kDa ont été analysés par CCM (Fig. 52, p. 146). Dans les 2 cas, dès les premières minutes d'hydrolyse, des xylo-oligosaccharides de DP 3 à 5 et de DP supérieurs sont libérés alors que le xylobiose est à peine décelé. Les concentrations en xylobiose et en xylotriose augmentent ensuite régulièrement au cours de l'hydrolyse alors que les concentrations en xylo-oligosaccharides de DP supérieurs à 5 diminuent, puis successivement celles des xylo-oligosaccharides de DP 5, puis 4. Au bout de 24 h d'incubation, le xylobiose et le xylotriose constituent les produits majeurs d'hydrolyse. On observe cependant à l'issue des 72 h d'hydrolyse des traces de xylose.

II - DETERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DES XYL_nGlcA .

Les acides aldouroniques ont été préparés à l'issue des 72 h d'hydrolyse du xylane de mélèze par les xylanases purifiées de masses moléculaires de 55 ou 65 kDa (voir le chapitre Matériels et Méthodes). Les oligosaccharides acides représentaient

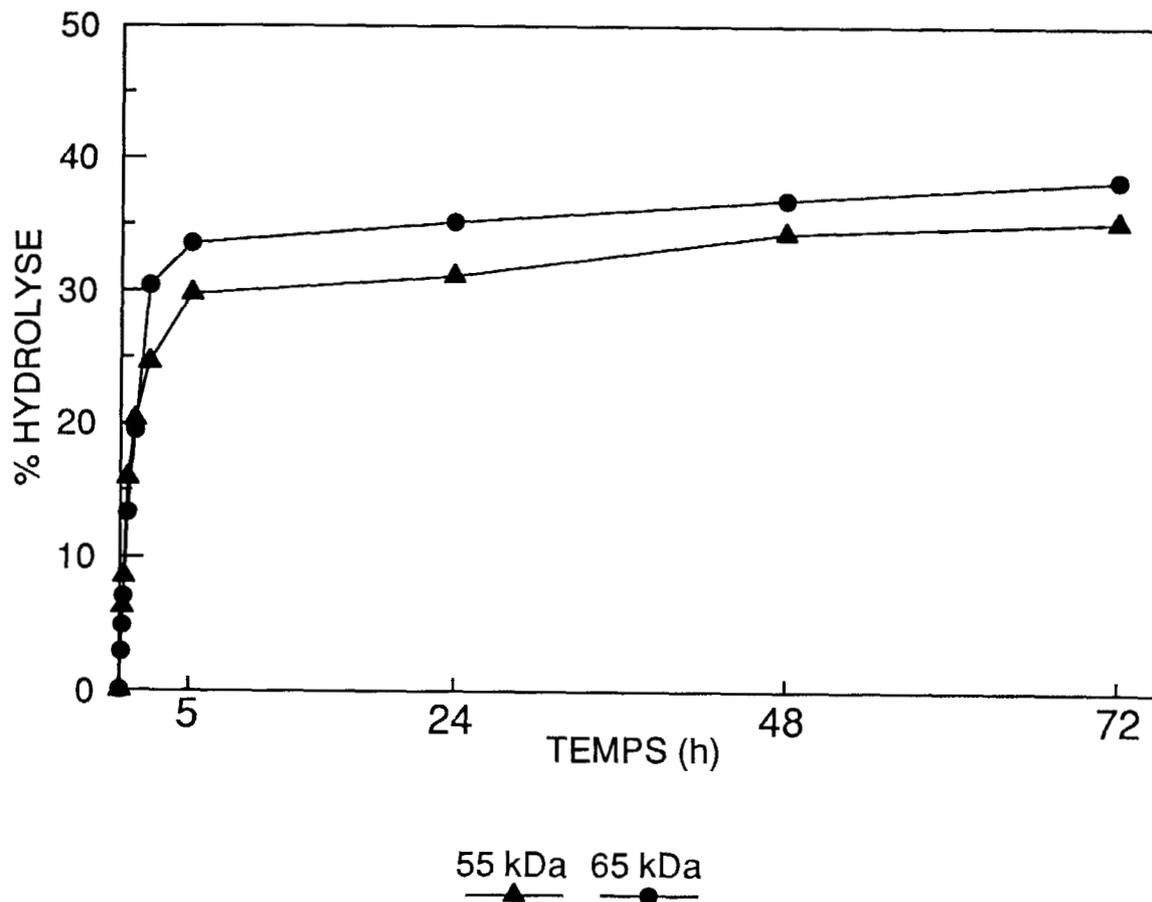


Fig. 51: Cinétique d'hydrolyse du xylane de mélèze par les xylanases purifiées de masses moléculaires de 55 et 65 kDa.

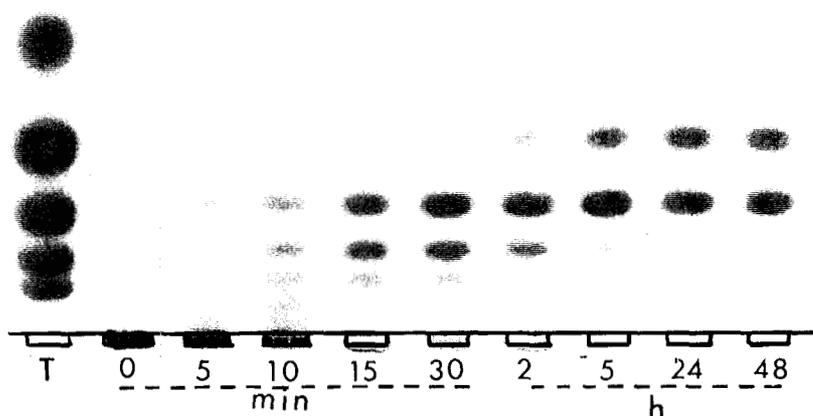


Fig. 52: CCM des xylo-oligosaccharides neutres libérés au cours de l'hydrolyse du xylane de mélèze par la xylanase de 55 kDa.
T : témoins xylo-oligosaccharidiques de DP 1 à 5.

respectivement 40,8 % (fraction A, 55 kDa) et 42,1 % (fraction B, 65 kDa) des sucres totaux (acides + neutres). Ces fractions ont été analysées en CCM et identifiées à l'aide d'acides aldouroniques témoins, issus de l'hydrolyse enzymatique de xylane soluble de mélèze par la xylanase de masse moléculaire de 39 kDa, et dont les structures primaires ont déjà été établies au cours de l'étude du mode d'action de cette enzyme (Debeire *et al.*, 1990).

Les chromatogrammes des 2 fractions acides analysées sont identiques et sont tout à fait comparables au chromatogramme de la fraction acide obtenue par l'hydrolyse à long terme de xylane soluble de mélèze par l'endoxylanase de masse moléculaire de 39 kDa. Elles révèlent la présence de 2 bandes majeures correspondant au Xyl₄GlcA et au Xyl₅GlcA, d'une bande mineure correspondant au Xyl₃GlcA et de plusieurs bandes mineures correspondant à des acides aldouroniques de DP supérieurs.

Les structures primaires des oligosaccharides acides présents en mélange dans les fractions A et B, ont été établies sur la base des analyses en CPG-MS de leurs dérivés perméthylés comparées aux analyses en CPG-MS réalisées à partir des acides aldouroniques purifiés, isolés après hydrolyse de xylane soluble de mélèze par l'endoxylanase de 39 kDa. L'objectif était de comparer les mécanismes d'action de différentes enzymes sur la base des structures primaires des oligosaccharides acides de fin d'hydrolyse.

Après méthanolyse puis acétylation des dérivés perméthylés des fractions A et B, nous avons mis en évidence par CPG-MS (Kovacik *et al.*, 1968; Shimizu *et al.*, 1978; Debeire P. *et al.*, 1990) et dans chaque fraction, 3 disaccharides méthylés, qui avaient déjà été identifiés dans les méthanolysats de Xyl_nGlcA préparés à partir des produits d'hydrolyse de l'endoxylanase de 39 kDa.

Il s'agit des disaccharides suivants dont nous donnerons les teneurs relatives:

- (a) les α - et β -méthyl-3,4-di-O-méthyl-2-O-(méthyl-2,3,4-tri-O-méthyl- α -D-glucopyranosyluronate)-D-xylosides [*m/z* (intensités relatives des pics au niveau des spectres de masses);

319 (5,8 %), 235 (19,8 %), 233 (9 %), 201 (78 %), 175 (16 %), 143 (9,3 %), 141 (14,5 %), 101 (100 %), 88 (50 %), 75 (45,4 %), 59 (12,8 %), 45 (48,8 %)].

Ils dérivent des résidus xylosyl substitués par des acides glucuroniques, situés au niveau de la chaîne oligosaccharidique en position terminale non réductrice et représentent 8 % de la fraction A et 9,8 % de la fraction B.

- (b) le 1,3,5-tri-*O*-méthyl-4-*O*-acétyl-2-*O*-(méthyl-2,3,4-tri-*O*-méthyl- α -D-glucopyranosyluronate)-D-xylitol [*m/z* ; 280 (5,8 %), 233 (3,5 %), 220 (76,7 %), 201 (44,2 %), 161 (13,9 %), 129 (27,4 %), 101 (100 %), 88 (67,5 %), 75 (29,1 %), 59 (9,3 %), 45 (62,8 %)].

Il dérive des résidus xylosyl substitués par des résidus d'acide glucuronique, situés en position terminale réductrice de la chaîne oligosaccharidique et représente 5 % de la fraction A et 3,8 % de la fraction B.

- (c) les α - et β -méthyl-3-*O*-méthyl-4-*O*-acétyl-2-*O*-(méthyl-2,3,4-tri-*O*-méthyl- α -D-glucopyranosyluronate)-D-xylosides [*m/z*; 393 (4,2 %), 263 (34,4 %), 233 (7,7 %), 203 (19,8 %), 143 (65,2 %), 101 (100 %), 75 (60,5 %), 59 (21,9 %), 45 (66,8)]

Ils dérivent des résidus xylosyl substitués par des résidus d'acide glucuronique, situés à l'intérieur de la chaîne oligosaccharidique et représentent 87 % de la fraction A et 86,4 % de la fraction B.

Les teneurs relatives en disaccharides méthylés (a), (b) et (c) dans les fractions A et B sont très proches et laissent par conséquent supposer que les xylanases de 55 et 65 kDa présentent les mêmes modes d'action.

Les résultats de ces analyses, montrent que l'hydrolyse à long terme du xylane soluble de mélèze par les endoxylanases de 55 ou 65 kDa conduit à la libération d'oligosaccharides acides dont les résidus d'acides glucuroniques sont majoritairement (87 %) liés aux résidus xylosyl situés à l'intérieur de la chaîne. Par conséquent, les endoxylanases de *Clostridium thermolacticum* hydrolysent les liaisons β -1,4 situées entre des résidus xylosyl adjacents non substitués ce qui d'une part prouve que leurs mécanismes d'action sont proches et que d'autre part ces enzymes sont différentes des xylanases pour lesquelles des mécanismes d'action ont été proposés.

Par ailleurs, les oligosaccharides acides issus de l'hydrolyse à long terme de glucuronoxylane de bouleau par l'endoxylanase de Mr 22 kDa de *Bacillus*, ont été

analysés par CCM. Nous avons retrouvé la même famille d'acides aldouroniques. Il s'agissait d'un mélange de Xyl₃GlcA, de Xyl₄GlcA, de Xyl₅GlcA et d'oligosaccharides de DP supérieurs (voir chapitre I p. 119). Nous pouvons par conséquent supposer que l'endoxylanase de *Bacillus*, présente des mécanismes d'action, proches de ceux des xylanases de *Clostridium thermolacticum*.

B - ETUDE DE L'HYDROLYSE DES ARABINO-GLUCURONOXYLANES

I - HYDROLYSE DU XYLANE D'AVOINE.

20 ml d'une suspension de xylane d'avoine à 0,5 % dans le tampon acétate de sodium à 0,5 % pH 5,8, ont été incubés à 60°C sous agitation, en présence de 7,2 UI enzymatiques provenant des xylanases purifiées de masses moléculaires de 65, 55, ou 39 kDa. Les pourcentages d'hydrolyse du xylane d'avoine ont été déterminés sur la base des sucres réducteurs libérés dans la phase soluble par rapport aux sucres neutres totaux dosés en fin d'hydrolyse dans la suspension de xylane d'avoine.

Après 72 h d'incubation, les pourcentages d'hydrolyse du xylane d'avoine obtenus par les trois xylanases de 65, 55, ou 39 kDa étaient sensiblement égaux et s'élevaient respectivement à 52 %, 48,1 % et à 49,4 % d'hydrolyse. Le Tableau XX (p. 150) rassemble les proportions d'oligosaccharides acides libérés à l'issue des 72 h d'hydrolyse par les différentes xylanases, comparées aux sucres neutres totaux dosés dans le surnageant après hydrolyse (nous avons constaté en effet que les dosages des sucres neutres totaux effectués au bout de 72 h d'hydrolyse, soit sur la suspension de xylane d'avoine totale, soit sur le surnageant, donnaient les mêmes valeurs et montraient par conséquent qu'en fin d'hydrolyse la totalité du xylane insoluble était solubilisé alors que le xylane d'avoine constitue à 60°C une fraction insoluble à 70 %, et soluble à 30 %.

Les acides uroniques dosés dans les surnageants après hydrolyse par les xylanases de masses moléculaires de 65, 55, ou 39 kDa représentaient respectivement 2,9 %, 2,5 %, et 2,8 % comparé aux sucres neutres totaux.

Les oligosaccharides neutres et acides libérés, ont été séparés sur des colonnes de résines échangeuses d'ions comme décrit dans le chapitre Matériels et Méthodes: 18 ml d'hydrolysats ont été déposés sur 20 ml de résine cationique (forme H⁺) puis sur 40 ml

TABLEAU XX

Etude comparative de l'hydrolyse de xylane d'avoine par les xylanases purifiées de masses moléculaires de 39, 55 et 65 kDa. Détermination des proportions relatives en oligosaccharides acides et neutres libérés respectivement par les xylanases à l'issue des 72 h d'hydrolyse.

masse moléculaire de l'endoxylanase incubée kDa	Suspension de xylane d'avoine après 72 h d'incubation enzymatique				Séparation des oligosaccharides neutres et acides sur des colonnes de résines échangeuses d'ions	
	sucres neutres totaux mg/ml	sucres ⁽¹⁾ réducteurs mg/ml	pourcentage d'hydrolyse	acides uroniques/ neutres	oligosaccharides acides (%)	oligosaccharides neutres (%)
65	3,28	1,75	52	2,9	11,5	88,5
55	3,43	1,7	48,1	2,5	9,8	90,2
39	3,44	1,75	49,4	2,8	10	90

(1) Les sucres réducteurs ont été dosés dans le surnageant.

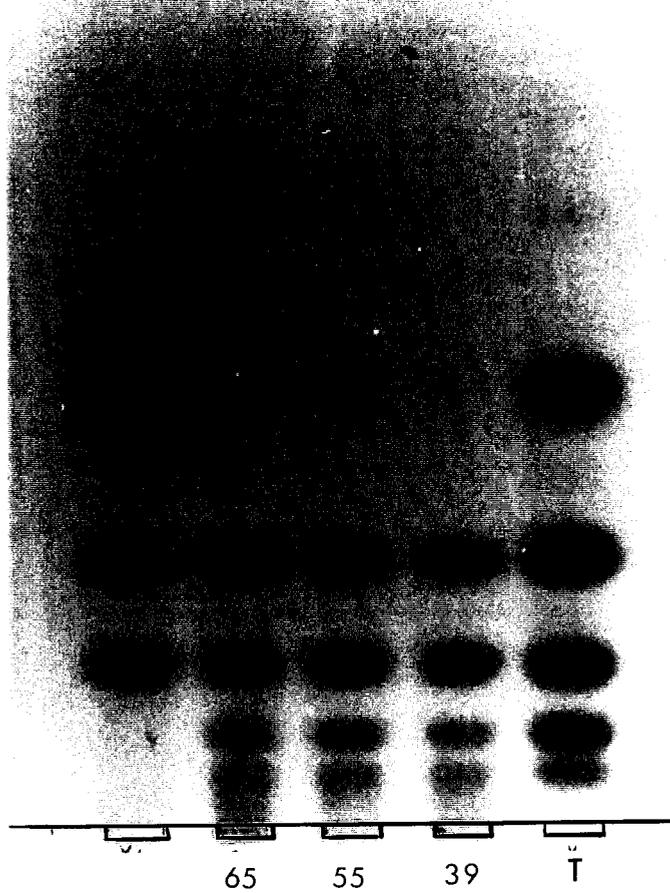


Fig. 53: CCM des xylo-oligosaccharides neutres libérés au cours de l'hydrolyse de xylane d'avoine par les xylanases de masses moléculaires de 39, 55 ou 65 kDa.
T : témoins xylo-oligosaccharidiques de DP 1 à 5.



Fig. 54: CCM des xylo-oligosaccharides acides libérés au cours de l'hydrolyse du xylane d'avoine par les xylanases de masses moléculaires de 39, 55 ou 65 kDa.
T₁ : Xyl₄GlcA, T₂ : Xyl₅GlcA.

de résine anionique (forme formiate). Après élution par le formiate d'ammonium des oligosaccharides acides, ces derniers ont ensuite été dessalés sur une colonne de Bio-Gel P-2 de dimension 2 x 50 cm.

Les familles d'oligosaccharides neutres et acides ont été analysés par CCM (voir figures 53 et 54, p. 151). Les oligosaccharides acides libérés par les xylanases de masses moléculaires de 65, 55 et 39 kDa représentaient respectivement 11,5 %, 9,8 %, et 10 % des sucres totaux (neutres + acides) présents dans la fraction soluble en fin d'hydrolyse. Les profils des CCM des oligosaccharides neutres et acides libérés respectivement par les trois xylanases purifiées sont identiques et confirment qu'elles agissent selon un mécanisme de type endo-. Au bout de 72 h d'hydrolyse, le xylobiose et le xylotriose constituent les produits majeurs d'hydrolyse, ainsi que des tétra- et pentasaccharides également présents en quantité importante. On observe en quantité moindre des xylo-oligosaccharides de DP>5 et des traces de xylose. Les CCM des 3 fractions acides sont identiques et révèlent la présence de nombreuses bandes correspondant notamment au Xyl₄GlcA, au Xyl₅GlcA, et à des acides aldouroniques de DP supérieurs.

C - DISCUSSION

Nous avons constaté que les produits majeurs de fin d'hydrolyse d'un glucuronoxylane de mélèze renfermant 1 résidu d'acide glucuronique pour 15 résidus xylosyl, conduisait à la formation d'oligosaccharides neutres principalement constitués de xylobiose et de xylotriose et de produits d'hydrolyse acide constitués de Xyl₄GlcA et de Xyl₅GlcA, et en quantité moindre de Xyl₃GlcA et d'acides aldouroniques de DP supérieurs constitués d'un mélange de Xyl₆GlcA et de Xyl_nGlcA. Nous avons d'ailleurs montré que les endoxylanases de *Clostridium thermolacticum* hydrolysaient les liaisons β-1,4 situées entre des résidus xylosyl adjacents non substitués.

Les arabino-glucuronoxylanes de Graminées que nous avons étudiés sont moins substitués par des acides glucuroniques que le xylane de mélèze. Par conséquent, si la présence des substituants arabinosyl de ces arabino-glucuronoxylanes limitent l'hydrolyse par les trois xylanases respectives et si ces enzymes hydrolysent les liaisons entre des résidus xylosyl non substitués, nous devrions nous attendre à obtenir des produits de fin d'hydrolyse des arabino-glucuronoxylanes, dont les DP seraient supérieurs aux DP rencontrés dans les produits d'hydrolyse des glucuronoxylanes de mélèze. Les arabino-glucuronoxylanes d'avoine que nous avons étudiés renfermaient 1

acide glucuronique pour 33 résidus xylosyl et 1 résidu arabinosyl pour 10 résidus xylosyl et les arabino-glucuronoxylanes de rafles de maïs que nous avons également étudié dans le cadre de la production de xylo-oligosaccharides à l'échelle du pilote (voir chapitre II), renfermaient 1 acide glucuronique pour 18 résidus xylosyl et 1 résidu arabinosyl pour 9 résidus xylosyl.

L'hydrolyse enzymatique des arabino-glucuronoxylanes de Graminées par les xylanases de *Clostridium thermolacticum*, a conduit en effet à la formation de xylo-oligosaccharides neutres parmi lesquelles, les DP des produits majoritaires allaient du X_2 au X_6 avec toutefois pour les 2 substrats (xylanes d'avoine et de rafles de maïs) la présence majoritaire de xylobiose et de xylotriose. Des arabino-xylo-oligosaccharides de DP 4 à 7 substitués chacun par un seul résidu d'arabinose, ont notamment été mis en évidence dans les produits de fin d'hydrolyse des xylanes de rafles de maïs (voir chapitre III, p. 139). Ces résultats demeurent toutefois insuffisants étant donné que l'hydrolyse enzymatique des xylanes de rafles de maïs a été réalisée à partir des 3 xylanases en mélange. Bien que nous ayons observé par CCM pour les 3 xylanases respectives, les mêmes profils de migration des produits de fin d'hydrolyse d'arabino-glucuronoxylane d'avoine, il nous reste à vérifier que ces dernières libèrent chacune les mêmes produits à partir des xylanes de rafles de maïs.

Contrairement aux produits acides d'hydrolyse de xylanes de mélèze constitués principalement de Xyl_4GlcA et de Xyl_5GlcA , nous avons identifié, par CCM des produits d'hydrolyse des arabino-glucuronoxylanes d'avoine par les trois enzymes respectives, de nombreuses bandes correspondant notamment au Xyl_4GlcA , au Xyl_5GlcA , mais aussi à des oligosaccharides acides de DP supérieurs probablement substitués par des résidus arabinosyl. Les mêmes profils de CCM ont été obtenus à partir des produits d'hydrolyse des xylanes de rafles par les xylanases de masses moléculaires de 39, 55, et 65 kDa en mélange.

En conclusion, ces résultats nous ont permis de montrer que:

- les xylanases de *Clostridium thermolacticum* de masses moléculaire de 39, 55, et 65 kDa agissaient selon un mécanisme endo- et produisaient du xylobiose et du xylotriose.
- l'hydrolyse de xylanes d'origines végétales différentes par les trois enzymes

respectives conduisait en fonction de chaque substrat étudié, à la formation de produits d'hydrolyse identiques reflétant ainsi des mécanismes d'action proches et qu'elles hydrolysaient les liaisons β -1,4 situées entre des résidus xylosyl adjacents non substitués.

D - ETUDE DES XYLANASES EN CATALYSE HETEROGENE.

I - INTRODUCTION

Les rafles de maïs constituent un substrat insoluble et hétérogène et la dégradation enzymatique de ses xylanes est régie par des lois cinétiques qui se distinguent des caractéristiques cinétiques pour des substrats solubles. Les cinétiques se compliquent également car nous sommes en présence d'un substrat lignocellulosique complexe dont la structure n'est pas bien définie comme dans le cas de substrats insolubles modèles tel que la cellulose.

En milieu hétérogène, les réactions d'hydrolyse sont défavorisées par rapport à un réactant entièrement solubilisé dans une phase aqueuse. Le système cellulose-cellulase a été le mieux étudié dans le domaine de la dépolymérisation enzymatique des polysaccharides végétaux. Les paramètres les plus importants susceptibles d'intervenir également dans le cas de notre modèle sont :

a - Le transfert des protéines enzymatiques de la phase aqueuse à la surface des particules de rafles. La figure 55 (p. 155) donne la distribution des macromolécules enzymatiques, des molécules d'eau, des produits solubles d'hydrolyse dans un système cellulose-cellulase à $t = 0$ et à $t > 0$. A $t = 0$, tous les composants sont distribués uniformément dans la phase aqueuse. A $t > 0$, les molécules enzymatiques sont adsorbées à la surface des macropores des particules de cellulose pour former un complexe [E-S].

b - La formation d'un complexe [E-S] par adsorption des molécules enzymatiques à la surface des particules de cellulose. Les cinétiques d'hydrolyse de la cellulose sont affectées de manière significative par certaines caractéristiques structurales de la cellulose (voir Lee et Fan, 1982) comme la surface accessible et le degré de cristallinité de

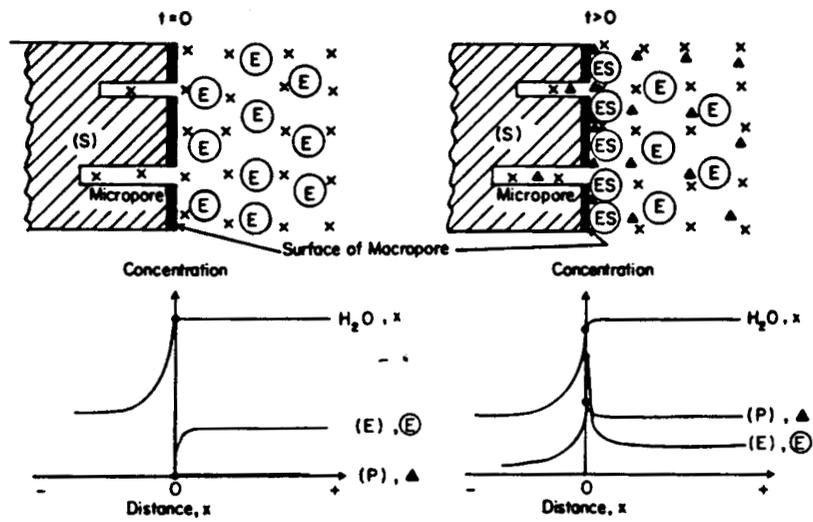


Fig. 55: Représentation hypothétique de la répartition des macromolécules enzymatiques (E), des molécules d'eau (X), et des produits solubles d'hydrolyse dans un système cellulose-cellulose à $t = 0$ et à $t > 0$. (D'après Lee et Fan, 1982).

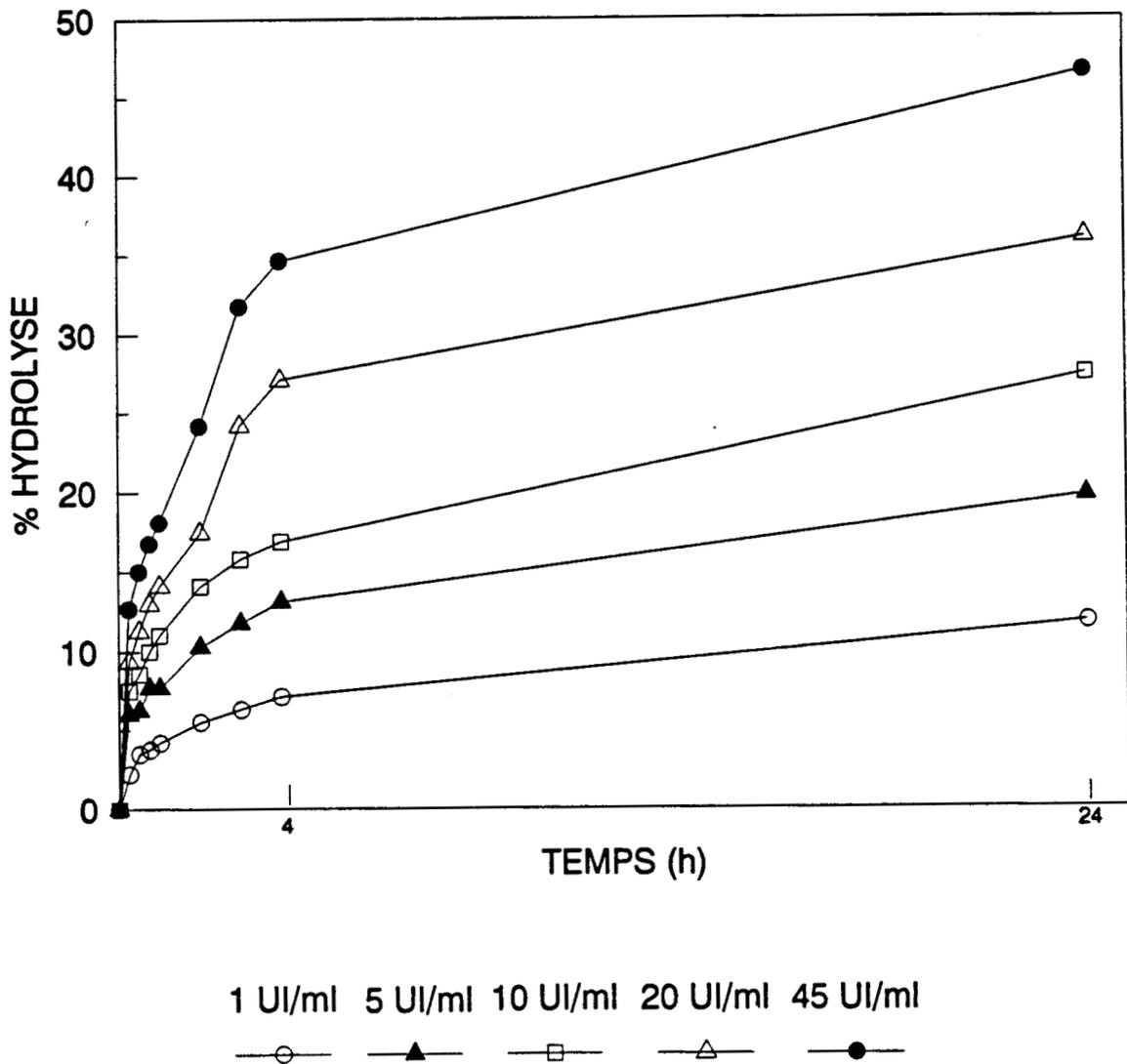


Fig. 56: Hydrolyse enzymatique sur rafles de maïs à différentes concentrations en xylanases (fraction xylanasiqne prépurifiée de *Clostridium thermolacticum*).

la cellulose. Une importante surface à la périphérie des particules de cellulose devrait augmenter l'accessibilité des molécules d'enzyme à la surface des particules de cellulose.

Différents auteurs (Van Dyke, 1972; Suga *et al.*, 1975) ont suggéré que le transfert des molécules d'enzyme de la phase aqueuse aux particules de cellulose conditionnait la vitesse d'hydrolyse car les macromolécules présentent des diffusibilités faibles, et également car les molécules d'enzyme doivent diffuser dans les microcapillaires des particules de cellulose. Dans ces conditions, l'étape de formation du complexe [E-S] constitue l'étape limitante de la réaction contrairement à la cinétique Michaelienne pour laquelle cette étape est instantanée et conduit à la formation d'un complexe intermédiaire [E-S] constant.

c - Le transfert des molécules de réactant (les molécules d'eau), au site actif du complexe [E-S]

d - La catalyse: réaction catalysée par le complexe [E-S] entre les molécules d'eau et le substrat.

e - Le transfert des produits solubles formés, des particules de cellulose à la phase aqueuse.

II - ETUDE DES CINÉTIQUES D'HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES XYLANES INTEGRES PAR LA PREPARATION ENZYMATIQUE PREPURIFIEE.

Afin d'aborder la catalyse hétérogène, nous avons tout d'abord choisi de réaliser des cinétiques d'hydrolyse enzymatique à court terme et à long terme directement sur les rafles de maïs brutes, en choisissant différentes concentrations enzymatiques de la préparation enzymatique de *Clostridium thermolacticum* prépurifiée sur Sépharose Q (voir Chapitre I). Nous avons conjointement étudié les relations entre l'adsorption enzymatique et les pourcentages d'hydrolyse des xylanes *in situ* en fonction des différentes concentrations enzymatiques utilisées.

a - Conditions opératoires.

Les cinétiques ont été réalisées en réacteur de 50 ml, thermostaté à 60°C, contenant 40 ml d'une suspension à 10 mg.ml⁻¹ de rafles de maïs dans le tampon acétate de sodium 50 mM, pH 5,8. Les hydrolyses ont été réalisées aux concentrations enzymatiques suivantes; 1 UI/ml, 5 UI/ml, 10 UI/ml, 20 UI/ml, 45 UI/ml. L'adsorption enzymatique a été évaluée indirectement et a été estimée à partir de l'activité résiduelle mesurée dans le surnageant au cours de l'hydrolyse.

b - Influence de la concentration enzymatique sur les cinétiques d'hydrolyse.

Les cinétiques d'hydrolyse, réalisées pendant 24 h, des suspensions de rafles de maïs à 10 mg/ml, réalisées à partir des xylanases de la préparation enzymatique de *Clostridium thermolacticum* prépurifiée sur Sépharose Q sont représentées figure 56 (p. 155) et montrent l'évolution du % d'hydrolyse du xylane *in situ* en fonction de la concentration enzymatique (les pourcentages d'hydrolyse ont été calculés à partir des valeurs obtenues par le dosage des sucres totaux dans le surnageant au cours de la cinétique). Les pourcentages d'hydrolyse ainsi que les sucres totaux dosés dans le surnageant au cours de la cinétique pour les différentes concentrations enzymatiques sont également rassemblés dans le Tableau XXI (p. 158).

Comme le montre la figure 56 (p. 155), les pourcentages d'hydrolyse aux différentes concentrations enzymatiques augmentent rapidement en début d'incubation, puis au fur et à mesure de l'incubation, on constate une diminution des vitesses d'hydrolyse.

D'autre part, l'évolution du pourcentage de l'hydrolyse à 24 h du xylane *in situ* au niveau des particules de rafles de maïs, n'augmente pas de façon linéaire en fonction de la concentration enzymatique (voir Fig. 57, p. 159). Nous atteignons cependant pour les cinétiques réalisées en présence de 45 UI/ml, 46,6 % d'hydrolyse. La diminution des vitesses d'hydrolyse en fonction des différentes concentrations enzymatiques peut être attribuée à différents paramètres faisant intervenir la saturation des sites les plus accessibles à l'enzyme, une inhibition par les produits de la réaction, et la transformation des particules de rafles de maïs en un substrat plus difficilement dégradable.

TABLEAU XXI

Suivi de l'hydrolyse des xylanes *in situ* dans les rafles de maïs, en fonction de la concentration enzymatique (fraction enzymatique prépurifiée de *Clostridium thermolacticum*).

Concentration enzymatique	1 UI/ml		5 UI/ml		10 UI/ml		20 UI/ml		45 UI/ml			
	Sucres totaux (µg/ml)	Rendement d'hydrolyse %	Activité résiduelle %	Sucres totaux (µg/ml)	Rendement d'hydrolyse %	Activité résiduelle %	Sucres totaux (µg/ml)	Rendement d'hydrolyse %	Activité résiduelle %	Sucres totaux (µg/ml)	Rendement d'hydrolyse %	Activité résiduelle %
0	50	0	23,6	76,7	0	32,8	111,7	0	33,8	213,3	0	52,2
15 min	100	2,2	-	213,3	6	-	258,3	7,5	-	313,3	9,3	-
30 min	140	3,5	24	221,7	6,3	10,4	290	8,5	13,5	371,7	11,3	23,5
45 min	146,7	3,8	-	263,3	7,7	-	333,3	10	-	421,7	12,9	-
1 h	160	4,2	5,3	263,3	7,7	10,4	363,3	11	13,8	456,7	14,1	21,8
2 h	198,3	5,5	5,8	341,7	10,3	9,3	456,7	14,1	12,1	556,7	17,4	19,6
3 h	221,7	6,3	5,8	386,7	11,8	9,9	506,7	15,8	12,7	760	24,2	18,5
4 h	246,7	7,1	5,8	426,7	13,1	9,9	540	16,9	12	846,7	27,1	18
20 h	-	-	6,25	-	-	9,9	-	-	11	-	-	13,4
24 h	385,9	11,7	-	623,9	19,7	-	889,4	27,3	-	1133,3	36	-

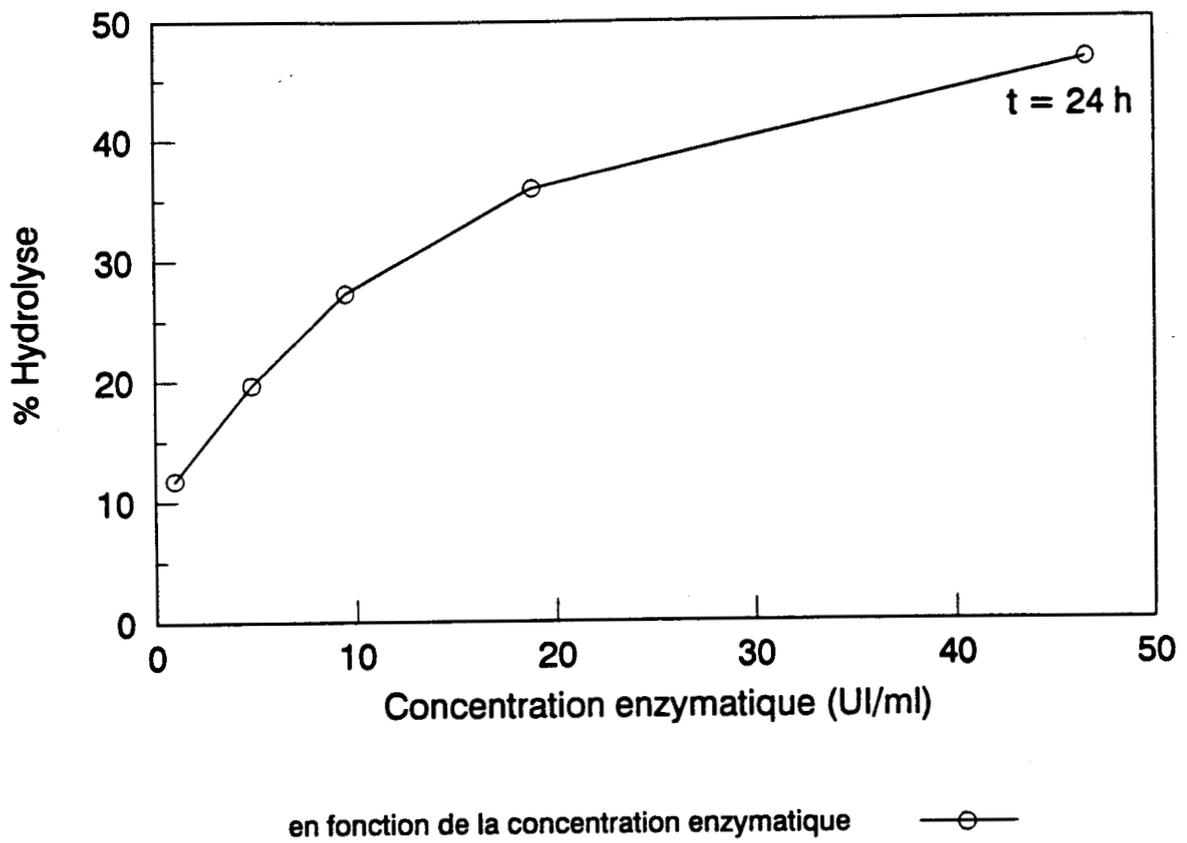


Fig. 57: Evolution des rendements d'hydrolyse au bout de 24 h, du xylane *in situ* en fonction de la concentration enzymatique ((fraction xylanasiqque prépurifiée de *Clostridium thermolacticum*).

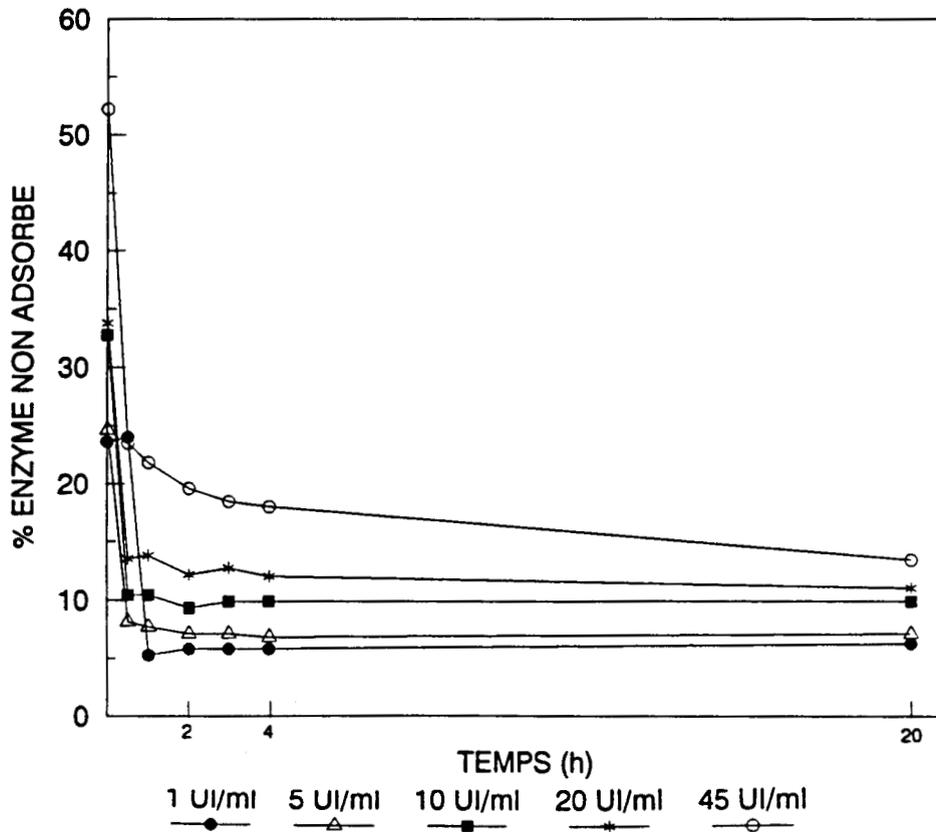


Fig. 58: Adsorption des xylanases à différentes concentrations sur les rafles de maïs (fraction xylanasiqque prépurifiée de *Clostridium thermolacticum*).

c - Détermination de l'adsorption des xylanases.

Les vitesses maximales d'hydrolyse ont été obtenues en début d'incubation à partir des données des cinétiques d'hydrolyse rassemblées dans le Tableau XXI (p. 158) et par la mesure des vitesses initiales à partir de la pente à l'origine des courbes de libération de sucres totaux aux différentes concentrations enzymatiques. Sachant que les rafles de maïs renferment 30 % de xylane, elles ont été exprimées en mg de xylane dégradé /ml de suspension de rafles de maïs à 10 mg/ml/h.

Nous avons suivi parallèlement, l'activité enzymatique résiduelle dans le surnageant au cours de l'hydrolyse. Les résultats de ces expériences sont également rassemblés dans le Tableau XXI (p. 158) et illustrés figure 58 (p. 159).

La figure 58 (p. 159) montre que l'activité résiduelle mesurée dans le surnageant atteint rapidement un équilibre, quelque soit la concentration enzymatique mis à part pour la cinétique d'hydrolyse effectuée à 45 UI/ml. L'activité résiduelle se stabilise dans le surnageant dès 30 min d'incubation pour les concentrations enzymatiques de 5 UI/ml, 10 UI/ml, et 20 UI/ml, et dès 1 h d'incubation pour la concentration enzymatique à 1 UI/ml. Parallèlement, l'étude de l'évolution de la quantité d'enzyme adsorbée aux temps 0 + ϵ , 30 min, 3 h et 20 h, en fonction de la concentration enzymatique illustrée figure 59 (p. 161), montre en effet que la quantité d'enzyme adsorbée en fonction de la concentration enzymatique a atteint un équilibre dès 30 min d'incubation pour toutes les concentrations enzymatiques mis à part pour 45 UI/ml, concentration pour laquelle l'équilibre est seulement atteint au bout de 20 h. Dès 30 mn cependant, à 45 UI/ml, 88 % de la quantité d'enzyme adsorbée à l'équilibre est déjà fixée. Il semblerait qu'à partir de 45 UI/ml, les sites spécifiques de fixation de l'enzyme au substrat les plus accessibles soient saturés et que l'adsorption de l'enzyme au substrat se poursuivrait soit:

- au niveau de sites spécifiques du substrat pour l'enzyme, situés au niveau des capillaires des rafles, mais d'une façon plus lente en raison de la faible diffusibilité des molécules d'enzyme dans les capillaires. Par conséquent dans ces conditions, la formation du complexe [E-S] constituerait l'étape limitante de la réaction.
- au niveau de sites du substrat non spécifiques de l'enzyme, mais plus lentement en raison de la faible affinité de l'enzyme pour ces sites.

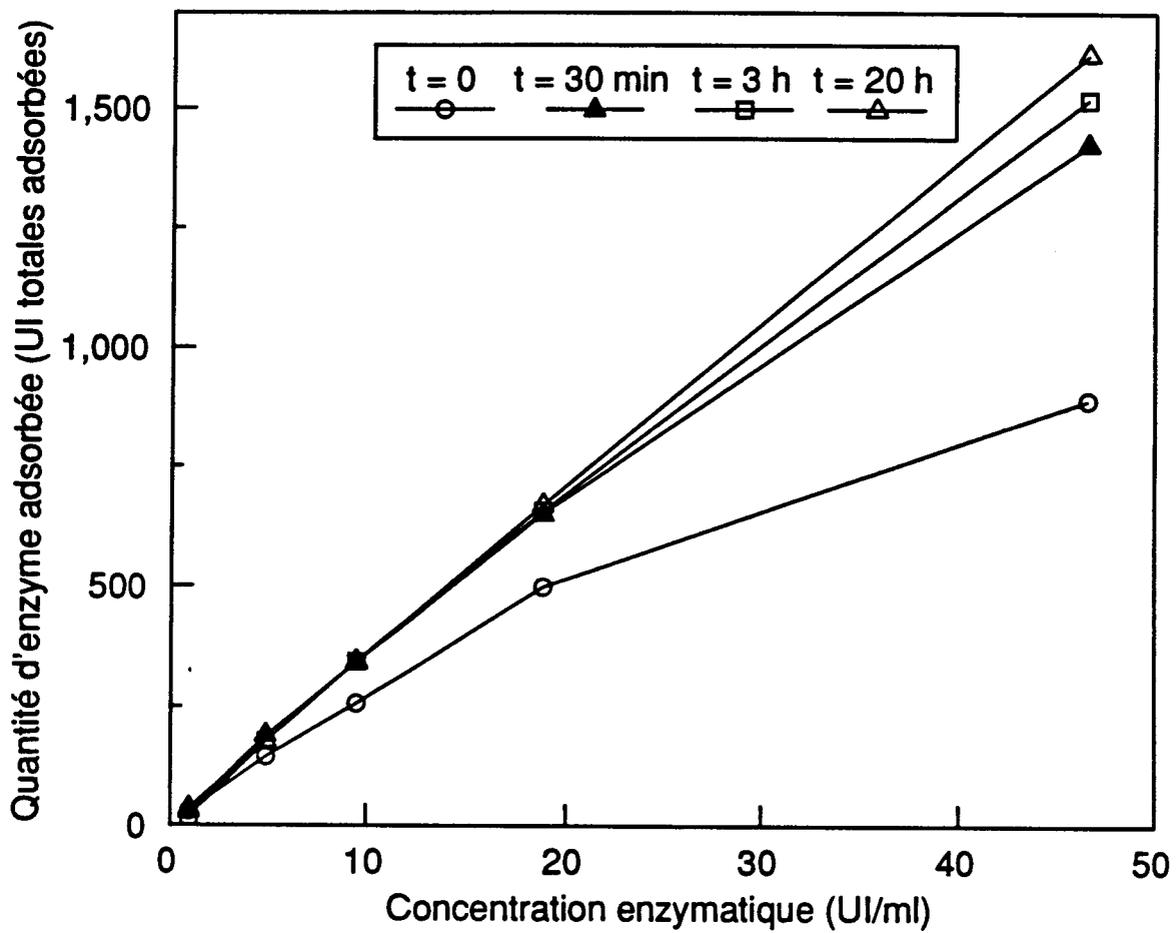
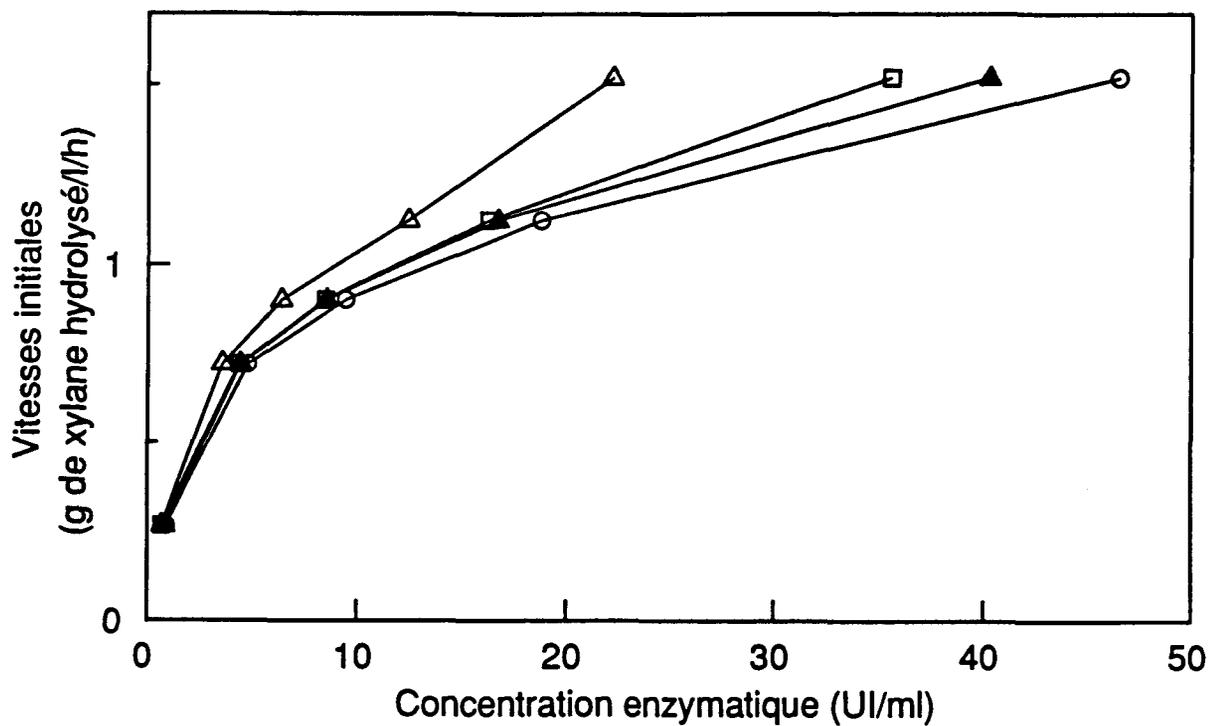


Fig. 59: Quantité d'enzyme adsorbée sur les rafles de maïs en fonction de la concentration enzymatique (fraction xylanasiqne prépurifiée de *Clostridium thermolacticum*).



$V_i = f(E)$ $V_i = f(E_{ads})$ $V_i = f(E_{ads})$ $V_i = f(E_{ads})$
 à t = 20 h à t = 30 min à t = 0
 —○— —▲— —◻— —△—

Fig 60: Expression des vitesses initiales en fonction de la concentration enzymatique (fraction xylanasiqne préparifiée de *Clostridium thermolacticum*) et de la quantité d'enzyme adsorbée sur les rafles.
 $E = [Enz]$, $E_{ads} = [Enz]$ adsorbée.

Par ailleurs, la figure 59 (p. 161) montre également qu'à l'équilibre la quantité d'enzyme adsorbée sur les rafles (valeur calculée au temps $t = 20$ h, et pour lequel on considère avoir atteint l'équilibre), croit proportionnellement en fonction de la quantité d'enzyme initialement incubée.

Les vitesses initiales, déterminées à partir de la pente à l'origine des courbes de libération de sucres totaux pour les différentes concentrations enzymatiques, n'évoluent pas proportionnellement à la concentration enzymatique ni à la quantité d'enzyme adsorbée à l'équilibre. On constate notamment une nette diminution de l'augmentation des vitesses initiales d'hydrolyse pour les concentrations enzymatiques supérieures à 5 UI/ml (voir Fig. 60, p. 162). Ceci pourrait s'expliquer par le fait qu'à $t = 0 + \epsilon$, l'équilibre ne soit pas atteint instantanément et que par conséquent l'évolution des vitesses initiales en fonction de la quantité d'enzyme adsorbée à l'équilibre (représentée Fig. 60, p. 162) ne reflète pas ce qui se produit en réalité. En effet aux concentrations enzymatiques de 1 UI/ml, 5 UI/ml, 10 UI/ml, 20 UI/ml, et 45 UI/ml, la quantité d'enzyme adsorbée à $t = 0 + \epsilon$ représente respectivement 81,5 %, 81,1 %, 74,6 %, 74,4 %, et 55,2 % de la quantité d'enzyme adsorbée à l'équilibre. D'autre part, sachant qu'à $t = 0 + \epsilon$, la quantité d'enzyme adsorbée sur les rafles évolue pratiquement de façon linéaire jusqu'aux concentrations enzymatiques de 20 UI/ml, si de $t = 0 + \epsilon$ jusqu'à l'équilibre (à 30 min), la quantité d'enzyme adsorbée aux rafles à chaque instant t évolue proportionnellement à la concentration enzymatique, l'évolution de la vitesse initiale d'hydrolyse devrait être proportionnelle à la concentration enzymatique jusqu'à 20 UI/ml.

Bien que nous n'ayons pas étudié l'évolution de l'adsorption enzymatique entre $t = 0 + \epsilon$ et $t = 30$ min, il est probable que l'équilibre ne soit pas atteint au même moment pour les différentes concentrations enzymatiques, et que par conséquent la quantité d'enzyme adsorbée augmente plus ou moins rapidement en fonction de la concentration enzymatique.

Par conséquent, ces résultats montrent que :

- l'adsorption de l'enzyme au substrat n'est pas instantanée
- l'évolution des vitesses initiales en fonction des concentrations enzymatiques est conditionnée par la formation du complexe [E-S] par le transfert des molécules enzymatiques de la phase aqueuse vers les particules de rafles.

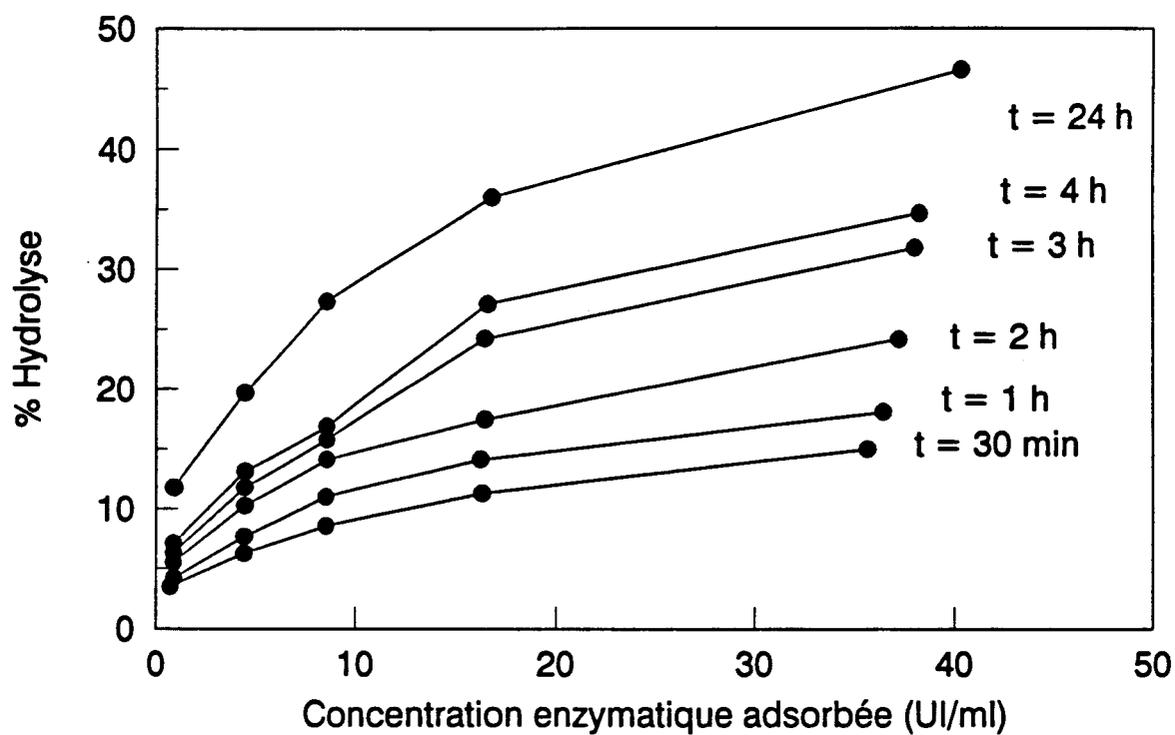


Fig. 61 Evolution des rendements d'hydrolyse à différents temps en fonction de la quantité d'enzyme adsorbée sur les rafles (fraction xylanasiqne prépurifiée de *Clostridium thermolacticum*).

Par ailleurs, nous avons étudié l'évolution des pourcentages d'hydrolyse en fonction de la quantité d'enzyme adsorbée au cours de la cinétique aux temps 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h et 24 h. L'allure des courbes est représentée figure 61 (p. 164) et montre que même en début d'incubation (30 min), l'évolution du pourcentage d'hydrolyse en fonction de la quantité d'enzyme adsorbée n'est pas linéaire. Or, en début d'incubation, nous ne sommes pas limités par une inhibition par les produits de la réaction même pour les concentrations enzymatiques allant jusqu'à 45 UI/ml. Par conséquent, sachant qu'à $t = 30$ min, pour les concentrations enzymatiques allant jusqu'à 20 UI/ml, la quantité d'enzyme adsorbée aux rafles a atteint l'équilibre, ces résultats nous laissent supposer que la totalité de l'enzyme adsorbée n'est pas immédiatement efficace et qu'une partie seulement conditionne les vitesses initiales d'hydrolyse par la dégradation du xylane situé au niveau des sites du substrat les plus accessibles à l'enzyme. Il est probable que la diminution des vitesses initiales d'hydrolyse en fonction de la quantité d'enzyme adsorbée soit le résultat de la saturation des sites les plus accessibles à l'enzyme et que la diffusion des molécules d'enzyme dans les "capillarités" des particules de rafles constitue alors l'étape limitante de la réaction.

d - Analyse des xylo-oligosaccharides.

L'analyse par CCM (Fig. 62, p. 167) des oligosaccharides neutres libérés au cours de l'hydrolyse pour les concentrations enzymatiques de 10 UI/ml, 20 UI/ml, et 45 UI/ml, montre que même pour les temps d'incubation allant de 30 mn à 4 h des oligosaccharides neutres de DP allant de 2 à 5 sont déjà libérés, avec le xylobiose et le xylotriose constituant les produits majeurs d'hydrolyse, ainsi que le xylotétraose et le xylopentaose également présents en quantité importante. On observe en quantité moindre des xylo-oligosaccharides de DP > 5 et des traces de xylose. Au bout de 24 h d'hydrolyse, les bandes correspondant au xylotétraose et au xylopentaose s'atténuent alors que les bandes correspondant au xylobiose et au xylotriose s'intensifient. On assiste également en présence de ces concentrations enzymatiques, à l'apparition de xylose. Ceci peut s'expliquer soit par la présence dans la préparation enzymatique d'une activité β -xylosidasique que l'on avait estimée à 0,001 % de l'activité xylanasiq. Par conséquent pour 1000 UI xylanasiq incubées dans 20 ml de suspension de rafles de maïs à 10 mg/ml, sont également incubées 0,1 UI totales d'activité β -xylosidasique.

Ainsi pour les concentrations en xylanases de 10 UI/ml, 20 UI/ml, et 50 UI/ml l'activité β -xylosidasique est décelée et se manifeste par l'apparition de xylose détecté en CCM. La présence de xylose pourrait également être attribuable à des phénomènes de transglycosylation.

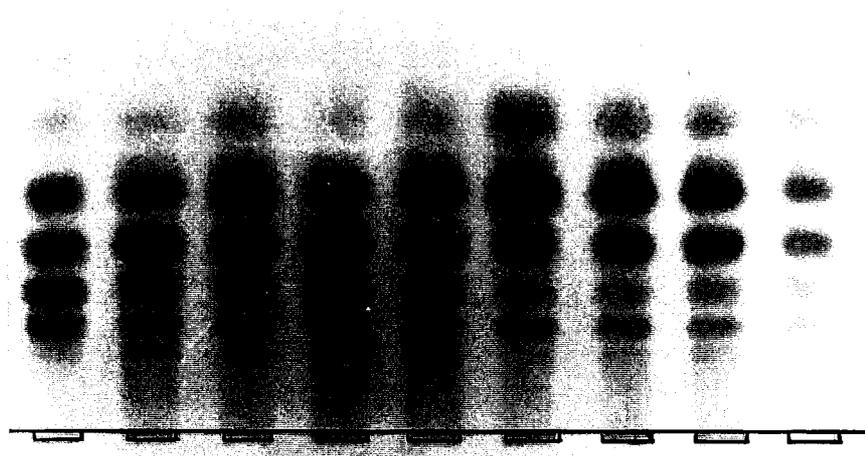
Les hydrolyses enzymatiques d'arabino-glucuronoxylanes d'avoine réalisées à partir des endoxylanases purifiées, et l'hydrolyse enzymatique de xylanes de rafles de maïs réalisées à partir de la préparation xylanasiqye partiellement purifiée sur Sépharose Q (voir Chapitre I) , ont fournies les mêmes produits neutres d'hydrolyse, jugés par analyse en CCM.

III - ETUDE COMPARATIVE DES CINETIQUES D'HYDROLYSE DE XYLANES INTEGRES, REALISES EN PRESENCE DE FRACTIONS ENZYMATIQUES PURIFIEES.

a - Definition des conditions opératoires.

Les expériences de cinétiques d'hydrolyse de xylanes intégrés de rafles de maïs menées en présence de différentes concentrations enzymatiques d'une préparation enzymatique prépurifiée de *Clostridium thermolacticum* (l'activité enzymatique de la fraction enzymatique prépurifiée était attribuée à trois endoxylanases de masses moléculaires de 65, 55, et 39 kDa décrites chapitre I), ont montré:

- (1) - qu'au delà des concentrations enzymatiques atteignant 10 UI/ml, on assistait à une nette diminution de l'augmentation des rendements d'hydrolyse.
- (2) - que l'adsorption de l'enzyme au substrat était proportionnelle à la quantité d'enzyme incubée.
- (3) - qu'il n'existait pas de relation linéaire entre la fixation de l'enzyme au substrat et les rendements d'hydrolyse même en début d'incubation (30 min), alors que le point 2 était observé pour les concentrations enzymatiques allant de 1UI/ml à 20 UI/ml
- (4) - qu'il n'existait pas de relation linéaire entre l'évolution des vitesses initiales d'hydrolyse et la quantité d'enzyme adsorbée, attribuable à une fixation non



	T								
Temps(h)		0,5	2	2	4	24	24	24	24
UI/ml		50	50	10	20	50	20	10	50

Fig. 62: CCM des oligosaccharides neutres libérés au cours de l'hydrolyse pour différentes concentrations enzymatiques (fraction xylanasiqne prépurifiée de *Clostridium thermolacticum*).

T : Xylo-oligosaccharides de DP 2 à 5.

instantanée de l'enzyme au substrat accompagnée probablement de la diminution des vitesses d'adsorption de l'enzyme au substrat avec l'augmentation des concentrations enzymatiques.

Sur la base de ces données et des hypothèses émises concernant les paramètres limitants impliqués au cours de ces cinétiques d'hydrolyse, nous avons choisi d'utiliser pour la suite des expériences des concentrations enzymatiques ne dépassant pas 10 UI/ml. En effet, il est probable que pour des concentrations enzymatiques atteignant 50 UI/ml, la diminution des vitesses d'hydrolyse soit en partie attribuable à une inhibition par les produits de la réaction (sachant que le K_i déterminé sur cette fraction enzymatique était de 2,8 mg/ml).

D'autre part, sachant que les résultats que nous avons obtenus précédemment et qui concernaient les relations entre l'adsorption enzymatique et les cinétiques d'hydrolyse des xylanes *in situ*, étaient le reflet du mélange de trois enzymes, il s'avérait indispensable de poursuivre les expériences en présence d'enzyme purifiée, et en particulier afin de déterminer si les endoxylanases de masses moléculaires de 65, 55, et 39 kDa présentaient des propriétés catalytiques identiques sur un substrat insoluble, bien que nous ayons montré précédemment que vis à vis d'un substrat soluble elles agissaient probablement selon le même mode d'action.

Nous avons donc étudié dans un premier temps, la dépolymérisation enzymatique, réalisée cette fois en présence de fractions xylanasiques purifiées issues de la préparation enzymatique de *Clostridium thermolacticum*, des xylanes intégrés des rafles de maïs et des pâtes à papier. Le choix de ce dernier substrat était directement lié à une étude menée au laboratoire qui concernait l'utilisation des xylanases comme auxiliaire dans le blanchiment des pâtes à papier. Dans un deuxième temps, nous avons étudié les propriétés hydrolytiques des xylanases de masses moléculaires de 65, 55, et 39 kDa purifiées jusqu'à homogénéité sur les rafles de maïs.

b - Comparaison de l'hydrolyse des xylanes intégrés des rafles de maïs et des pâtes à papier par la préparation enzymatique (39 + 55 + 65 kDa) non purifiée et par la xylanase de 39 kDa purifiée.

1 - Conditions opératoires.

Les cinétiques enzymatiques effectuées successivement sur les rafles de maïs brutes et les pâtes à papier ont été réalisées pendant 48 h, en présence de la préparation enzymatique de *Clostridium thermolacticum* prépurifiée sur Sépharose Q et de l'endoxygénase de 39 kDa (les caractéristiques de ces fractions sont données dans le chapitre I p. 99).

Nous avons également choisi de vérifier si les protéines contaminantes pouvaient jouer un rôle au niveau de la stabilisation de la protéine enzymatique en réalisant à partir de la fraction purifiée une cinétique d'hydrolyse en présence de SAB à 0,1 % final, afin d'éviter une éventuelle dénaturation de l'enzyme.

Les cinétiques d'hydrolyse des rafles de maïs ont été réalisées dans les conditions décrites ci-dessus p. 168, en nous plaçant à des concentrations enzymatiques de 10 UI/ml. Les cinétiques enzymatiques sur les pâtes à papier ont été réalisées à partir d'une série de flacons, thermostatés à 60°C et prévus individuellement pour des temps prédéterminés d'incubation et renfermant une préparation de pâte à papier à 40 mg/ml (pâte de pin maritime, constituée de 6 % de xylane), dans le tampon acétate de sodium 50 mM, pH 5,8. Les hydrolyses ont été effectuées aux concentrations enzymatiques de 2 UI/ml.

2 - Résultats et discussion.

Les figures 63 et 64 (p. 171) représentent les cinétiques d'hydrolyse des xylanes *in situ* par la xylanase purifiée de 39 kDa et par le mélange des xylanases partiellement purifiées. Les capacités hydrolytiques des xylanases partiellement purifiées, sont en présence des rafles de maïs, supérieures à celles présentées par la xylanase de 39 kDa. En effet, au bout de 48 h par exemple, nous atteignons 36 % d'hydrolyse des xylanes intégrés des rafles de maïs à partir de la fraction enzymatique partiellement purifiée, alors qu'à partir de la xylanase de 39 kDa nous n'atteignons que 28,7 % d'hydrolyse et

24 % d'hydrolyse en présence de SAB à 0,1 %. En présence des pâtes à papier par contre, les capacités hydrolytiques des 3 enzymes en mélange comparées à celles de la xylanase de 39 kDa semblent être voisines, sauf en présence de SAB. Au bout de 48 h d'hydrolyse cependant, nous atteignons des rendements d'hydrolyse très voisins. Il apparait donc que la présence de SAB au cours des cinétiques d'hydrolyse des xylnes des rafles de maïs ou des pâtes à papier n'aient pas d'influence sur les rendements d'hydrolyse.

Nous avons parallèlement suivi l'activité résiduelle dans le surnageant de la réaction enzymatique au cours des cinétiques d'hydrolyse. Les résultats de ces expériences, réalisées à la fois sur les 2 types de substrats sont illustrés figures 65 et 66 (p. 173), et montrent pour les 2 séries d'expériences, l'évolution du pourcentage d'enzyme non adsorbée en fonction du temps. On constate une importante différence d'adsorption de la xylanase de 39 kDa purifiée comparée aux xylanases en mélange de la préparation enzymatique partiellement purifiée, que ce soit en présence des rafles de maïs ou des pâtes à papier. On observe pour la xylanase de 39 kDa comme pour la fraction enzymatique prépurifiée, que l'activité résiduelle mesurée dans le surnageant atteignait rapidement un équilibre. On constate par contre que la xylanase de 39 kDa s'adsorbe beaucoup moins sur les rafles de maïs et sur les pâtes à papier que la fraction partiellement purifiée. Pour la xylanase de 39 kDa, en présence des rafles de maïs, le pourcentage d'activité résiduelle mesurée dans le surnageant se stabilise très rapidement aux alentours de 50 % alors que pour la fraction prépurifiée l'activité résiduelle se situe aux alentours de 10 %. Il s'avère que les différences de rendements d'hydrolyse observés entre la xylanase de 39 kDa et la fraction prépurifiée soient en partie liés à des différences de capacités d'adsorption sur le substrat par les enzymes.

c - Hydrolyse des xylnes intégrés des rafles de maïs par les xylanases de masses moléculaires de 65, 55, et 39 kDa purifiées jusqu'à homogénéité.

1 - Conditions opératoires.

Les cinétiques ont été réalisées pendant 48 h en réacteur de 50 ml, thermostaté à 60°C, contenant 20 ml d'une suspension à 10 mg/ml de rafles de maïs dans le tampon acétate de sodium 50 mM, pH 5,8. Les cinétiques ont été effectuées successivement en

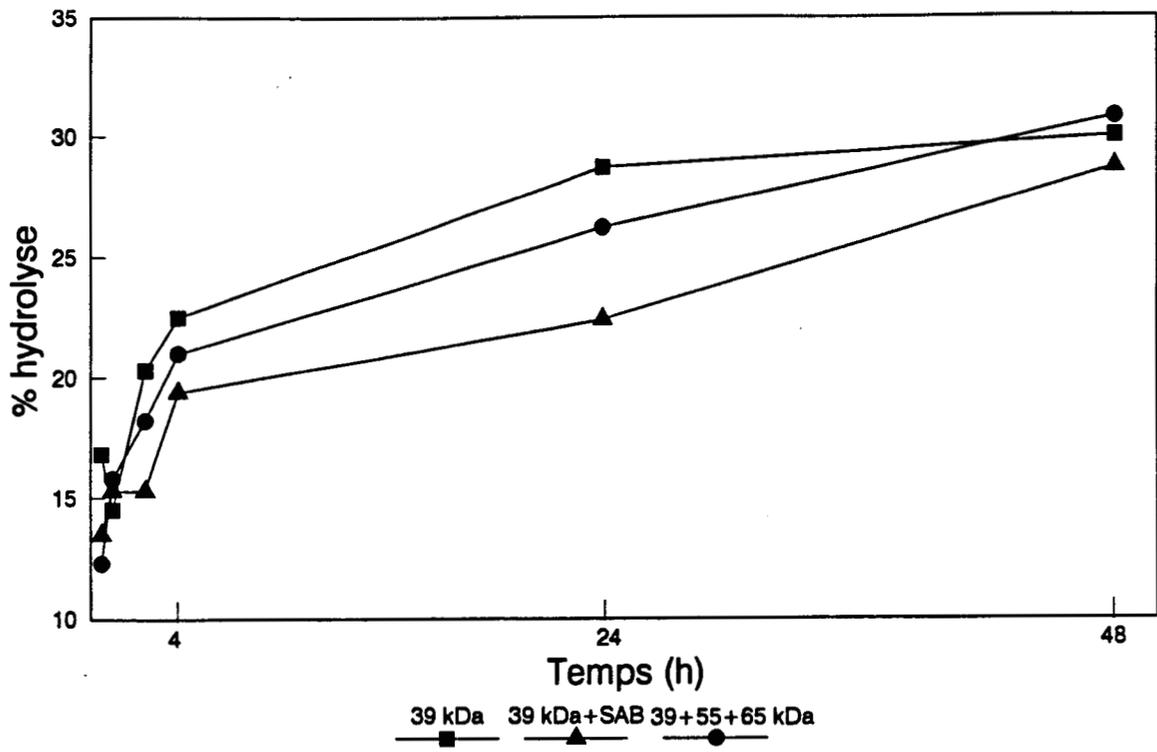


Fig. 63: Hydrolyse enzymatique des xylanes de pâtes à papier de pin, par des xylanases partiellement purifiées ou purifiées de *Clostridium thermolacticum*.

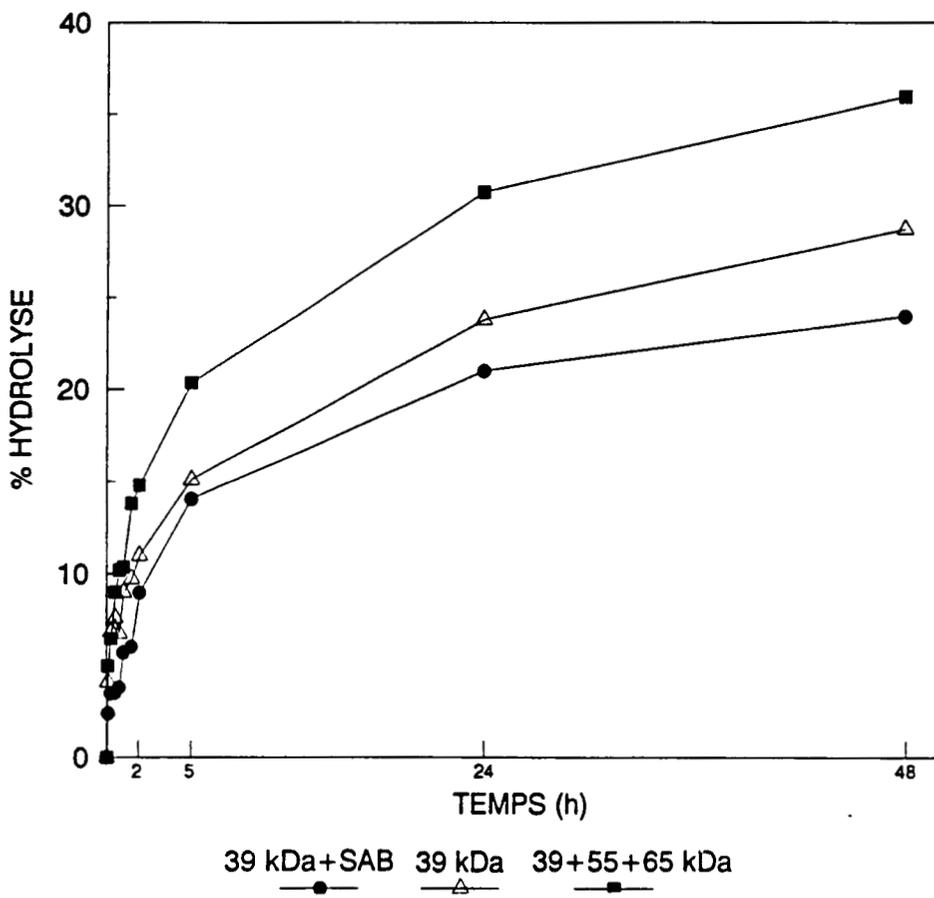


Fig. 64: Hydrolyse enzymatique des xylanes intégrés des rafles de maïs par des xylanases partiellement purifiées ou purifiées de *Clostridium thermolacticum*.

présence des xylanases de *Clostridium thermolacticum* purifiées jusqu'à homogénéité (voir Chapitre I p. 99). Les hydrolyses ont été réalisées pour des concentrations enzymatiques de 5 UI/ml. L'adsorption enzymatique a été évaluée indirectement et a été estimée à partir de l'activité résiduelle mesurée dans le surnageant au cours de l'hydrolyse.

2 - Résultats.

Les cinétiques d'hydrolyse, réalisées pendant 48 h, dans les conditions décrites ci-dessus sont représentées figure 67 (p. 175) et montrent que les xylanases de masses moléculaires de 65, 55, et 39 kDa présentent des capacités hydrolytiques identiques. Au bout de 48 h notamment, nous obtenons en présence des xylanases de 65, 55, 39 kDa des rendements d'hydrolyse proches, qui s'élèvent respectivement à 25,7 %, et à 24,7 % pour les 2 dernières.

Les pourcentages d'hydrolyse, ainsi que les sucres totaux dosés dans le surnageant au cours des 3 cinétiques réalisées successivement en présence des xylanases de masses moléculaires de 65, 55, et 39 kDa, sont également rassemblés dans le Tableau XXII (p. 176). Par ailleurs, les pourcentages d'hydrolyse des xylanes *in situ* de rafles de maïs obtenus au cours de ces cinétiques, comparés aux pourcentages d'hydrolyse obtenus au cours de la cinétique réalisée en présence de la fraction prépurifiée à la concentration enzymatique de 5 UI/ml (voir Tableau XXI, p. 158), sont voisins. Il est par conséquent probable que l'écart observé entre les capacités hydrolytiques de ces dernières et celles présentées par la xylanase de 39 kDa, obtenu au cours des cinétiques à la concentration de 10 UI/ml au paragraphe précédent, appartienne au domaine de l'erreur expérimentale.

Nous avons parallèlement suivi l'activité résiduelle dans le surnageant au cours des 3 cinétiques d'hydrolyse réalisées successivement en présence des trois xylanases purifiées. La figure 68 (p. 175) illustre les résultats obtenus au cours de ces expériences, et montre l'évolution de l'activité résiduelle mesurée dans le surnageant au cours des cinétiques. Nous avons constaté une importante différence d'adsorption entre les 3 xylanases, la xylanase de 39 kDa s'adsorbant le moins aux rafles de maïs (à $t = 24$ h, 27 % de la quantité d'enzyme initialement incubée a été adsorbée), puis la xylanase de 55 kDa (à $t = 24$ h, 75,1 % de la quantité d'enzyme initialement incubée a été adsorbée), et enfin

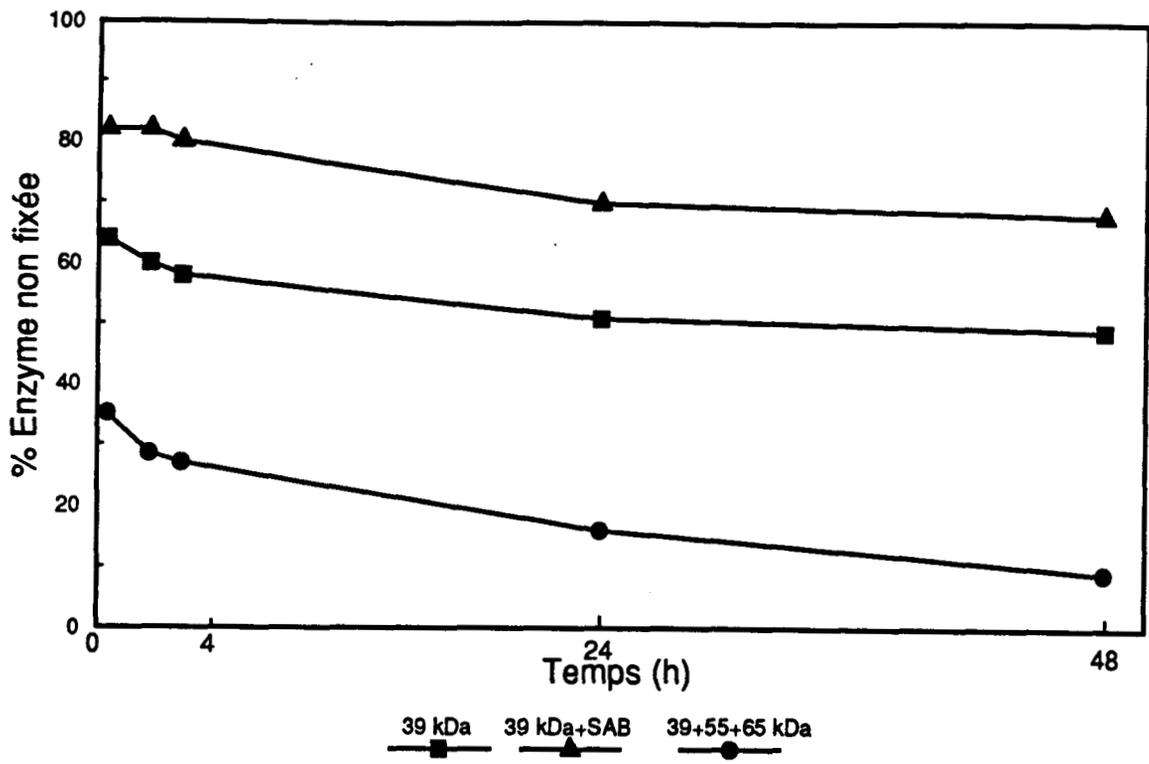


Fig. 65: Adsorption des xylanases partiellement purifiées ou purifiées, sur les pâtes à papier de pin.

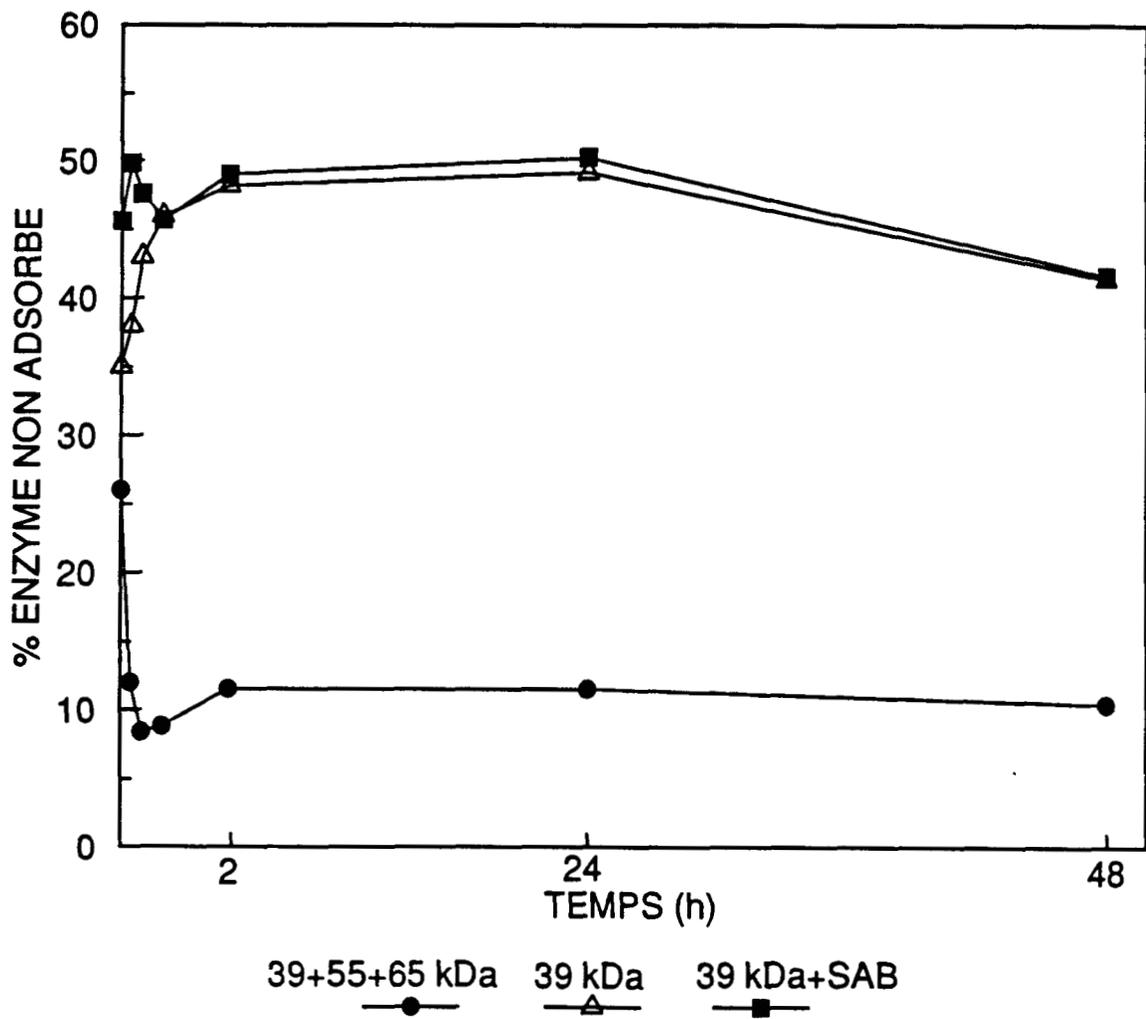


Fig. 66: Adsorption des xylanases partiellement purifiées ou purifiées de *C. thermolacticum*, sur les rafles de maïs.

la xylanase de masse moléculaire de 65 kDa (à t = 24h, 92,6 % de la quantité d'enzyme initialement incubée a été adsorbée).

Connaissant les activités spécifiques de chaque fraction enzymatique purifiée, et en fonction de l'adsorption enzymatique évaluée indirectement par la mesure de l'activité résiduelle dans le surnageant à 24 h, nous en avons déduit la quantité de protéines enzymatiques fixées sur les rafles de maïs ainsi que le nombre de moles d'enzyme fixées aux rafles. Ces résultats sont rassemblés dans le Tableau XXIII (p.178). Il apparaît donc que pour une mole de xylanase de masse moléculaire de 39 kDa, se fixent 2,07 moles de xylanase de masse moléculaire de 55 kDa et 2,35 moles de xylanase de masse moléculaire de 65 kDa alors que les rendements d'hydrolyse obtenus sont identiques. Par conséquent, nous pouvons supposer que pour les xylanases de masses moléculaires de 65 et 55 kDa, la totalité de l'enzyme fixée n'est pas efficace. Avec l'augmentation de la taille des protéines, apparaissent des domaines dont les sites de fixation sont spécifiques du substrat lignocellulosique et pourraient éventuellement s'apparenter aux "cellulose-binding" domaines. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé des essais d'adsorption des xylanases de 65, 55, et 39 kDa sur de la cellulose microcristalline (Avicel).

3 - Etude de l'adsorption des xylanases de 65 kDa, 55 kDa et 39 kDa sur la cellulose.

5 ml d'une suspension d'Avicel à 5 % dans le tampon acétate de sodium 50 mM, pH 5,8 ont été incubés 1 h sous agitation à température ambiante, en présence de 10 UI enzymatiques des xylanases de 65 kDa, 55 kDa, 39 kDa purifiées jusqu'à homogénéité. Le dosage des activités résiduelles a été effectué dans le surnageant après centrifugation et rinçage de l'Avicel.

Nous avons constaté que les xylanases de masses moléculaires de 65 kDa, 55kDa et 39 kDa se fixaient sur la cellulose microcristalline respectivement à 100 %, à 96,6 % et à 86,5 %. Par conséquent, ces résultats montrent bien que ces trois enzymes, sont capables de se fixer sur la cellulose alors qu'elles n'hydrolysent pas la cellulose. Il convient toutefois de noter que la xylanase de 39 kDa présente moins d'affinité pour la cellulose que les xylanases de 55 et 65 kDa. Même si cette différence est minime, elle va dans le même sens que les résultats issus des mesures d'adsorption sur les rafles de maïs.

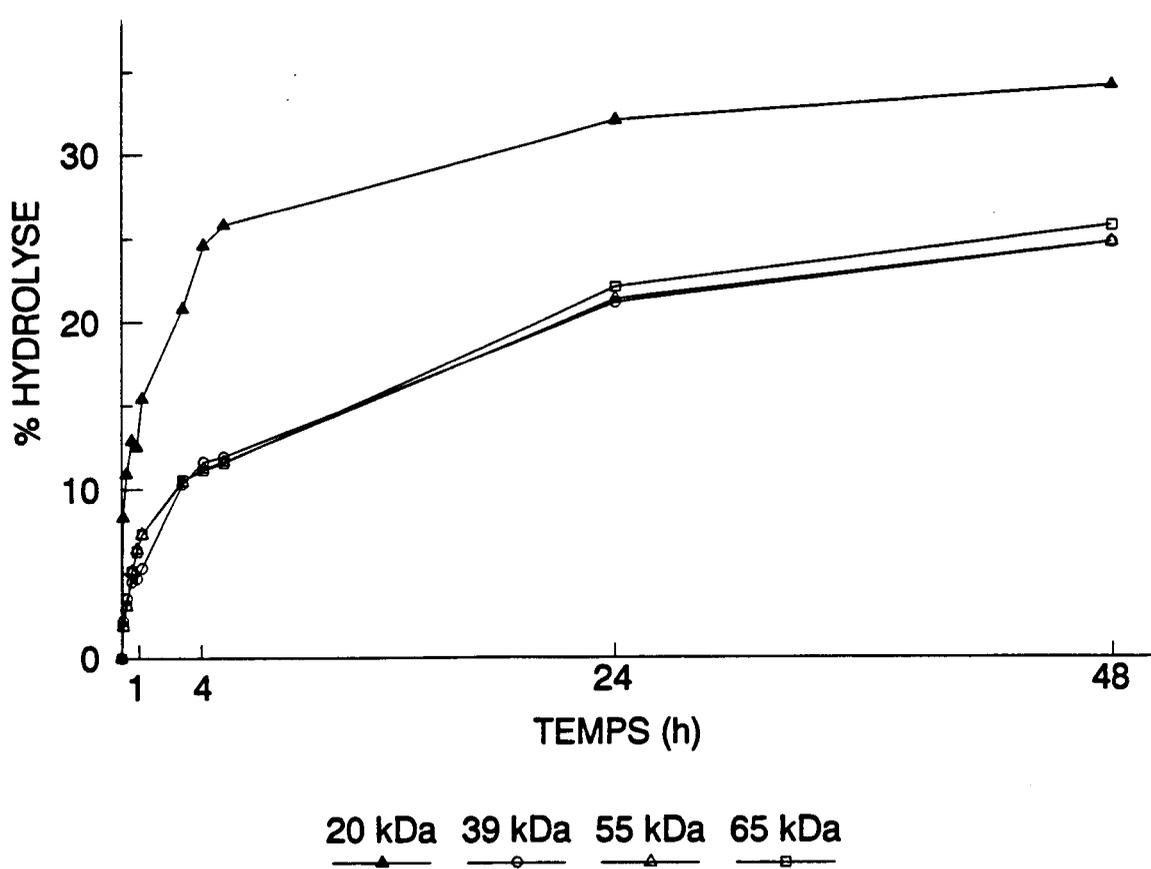


Fig. 67: Cinétiques d'hydrolyse des xylanes intégrés de rafles de maïs par les xylanases purifiées de *Clostridium thermolacticum* et de *Bacillus*.

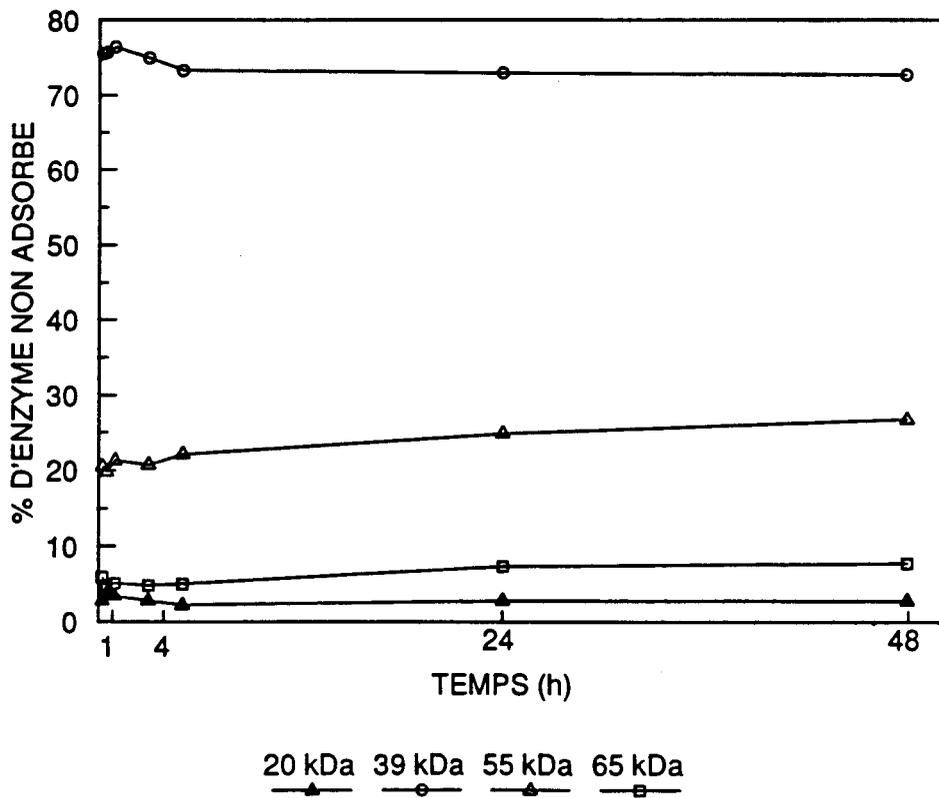


Fig. 68: Suivi de l'adsorption des xylanases purifiées de *C. thermolacticum* et de *Bacillus*, sur les rafles de maïs.

TABLEAU XXII

Suivi des hydrolyses des xylanes intégrés dans les rafles de maïs réalisées successivement par les xylanases purifiées, de masses moléculaires de 65, 55 et 39 kDa de *Clostridium thermolacticum*, et de 22 kDa de *Bacillus*.

Masse moléculaire de l'enzyme	39 kDa			55 kDa			65 kDa			20 kDa		
Temps d'incubation	Sucres totaux (µg/ml)	Rendement d'hydrolyse %	Activité résiduelle %	Sucres totaux (µg/ml)	Rendement d'hydrolyse %	Activité résiduelle %	Sucres totaux (µg/ml)	Rendement d'hydrolyse %	Activité résiduelle %	Sucres totaux (µg/ml)	Rendement d'hydrolyse %	Activité résiduelle %
0	188,9	0	nd	175,1	0	nd	173,2	0	nd	177,7	0	nd
5 min	254,1	2,2	nd	231,8	1,9	nd	229,9	1,9	nd	425,9	8,3	nd
15 min	293,9	3,5	75,5	268	3,1	20,5	264,9	3,1	5,9	503,5	10,9	2,8
30 min	325,4	4,5	75,7	329	5,1	19,8	326,8	5,1	4,8	564	12,9	3,8
45 min	330,6	4,7	nd	366,6	6,4	nd	362,5	6,3	nd	554	12,5	nd
1 h	348,2	5,3	76,4	393,2	7,3	21,3	392,3	7,3	5,1	639,3	15,4	3,4
3 h	496,9	10,3	74,9	487,8	10,4	20,7	486,9	10,5	4,8	800,8	20,8	2,8
4 h	536,4	11,6	nd	510,2	11,2	nd	507,3	11,1	nd	915,6	24,6	nd
5 h	545	11,9	73,3	525	11,6	22,1	519,5	11,5	5	951,3	25,8	2,2
24 h	825,1	21,2	73	817,2	21,4	24,9	837,7	22,1	7,4	1139,5	32,1	2,8
48 h	930,2	24,7	72,7	917,3	24,7	26,8	944,9	25,7	7,8	1200	34,1	2,8

Certains auteurs ont déjà mis en évidence des xylanases de ce type. En particulier, les travaux de Ferreira *et al.*, (1990), ont montré que le domaine de la xylanase produite par *Pseudomonas fluorescens*, situé au niveau de la région Nt de la protéine présentait des homologies de séquence avec les régions N- ou C- terminales de 2 endoglucanases produites par le même microorganisme, et que par conséquent, ce domaine constituait un "cellulose-binding-domain" (CBD), dont la fonction était indépendante du reste de l'enzyme. C'est la première fois que l'on a pu mettre en évidence un CBD, au niveau d'une xylanase n'hydrolysant pas les liaisons glycosidiques (β -1,4) entre 2 résidus de glucose de diverses molécules de cellulose. Ces travaux vont à l'encontre de la notion suivante: la présence d'un CBD confère à la protéine la capacité d'hydrolyser la cellulose (West *et al.*, 1989). En effet, l'exo- β -1,4-glucanase de *Trichoderma reesei* n'est pas capable d'hydrolyser la cellulose en absence du domaine CBD (Tomme *et al.*, 1988, Van Tilbeurgh *et al.*, 1986).

Par ailleurs, nous pouvons nous interroger au sujet du rôle d'un CBD au niveau d'une enzyme hydrolysant le xylane, mais pas la cellulose. Dans les écosystèmes naturels, les bactéries cellulolytiques sont fréquemment associées aux plantes en voie de décomposition. Bien que leurs travaux aient montré que le CBD de leur xylanase ne soit pas directement impliqué dans l'hydrolyse du xylane *in vitro*, il est possible que dans un habitat normal, la présence d'un CBD puisse conférer sélectivement à la xylanase la possibilité de rester intimement associée aux parois végétales contenant à la fois de la cellulose et les hémicelluloses.

d - Hydrolyse des xylanes intégrés de rafles de maïs par la xylanase de *Bacillus* de 22 kDa.

1 - Conditions opératoires.

Les conditions opératoires sont identiques à celles appliquées au cours des cinétiques réalisées en présence des xylanases de 65 kDa, 55 kDa et 39 kDa purifiées (voir Chapitre IV p. 172).

TABLEAU XXIII

Nombre de moles d'enzyme fixé en fonction de la masse moléculaire des xylanases de *Clostridium thermolacticum*.

Masse moléculaire de la xylanase (kDa)	Activité spécifique (UI/mg)	Quantité de protéines adsorbées μg	nombre de moles fixées ($\times 10^{10}$)	$n/N_{39\text{kDa}}$
65	2714,5	34,1	5,25	2,35
55	2955	25,4	4,62	2,07
39	3102	8,7	2,23	1

2 - Résultats.

La cinétique d'hydrolyse, réalisée pendant 48 h, représentée dans la figure 67 (p. 175) montre que la xylanase de *Bacillus* présente des capacités hydrolytiques supérieures aux xylanases de masses moléculaires de 65, 55, et 39 kDa. En effet, au bout de 48 h, nous atteignons 34,1 % d'hydrolyse. D'autre part, au bout de 4 h d'hydrolyse, la xylanase de *Bacillus* a déjà atteint le pourcentage d'hydrolyse obtenu par les xylanases de *Clostridium thermolacticum* au bout de 48 h.

Une autre cinétique d'hydrolyse avait été réalisée dans les mêmes conditions en présence de la xylanase de *Bacillus*, mais à la concentration de 10 UI/ml. Nous avons obtenu cependant les mêmes rendements d'hydrolyse.

Nous avons parallèlement suivi l'activité résiduelle dans le surnageant au cours des cinétiques d'hydrolyse réalisées en présence de la xylanase de *Bacillus*. La figure 68 (p. 175) illustre les résultats obtenus au cours de ces expériences, et montre l'évolution de l'activité résiduelle mesurée dans le surnageant au cours des cinétiques. Nous avons constaté que dès la première heure la fixation de l'enzyme au substrat se stabilise et que 97,2 % de la quantité d'enzyme initialement incubée (5 UI/ml), est adsorbée aux rafles à l'équilibre (à 24 h). En ce qui concerne la cinétique d'hydrolyse réalisée à la concentration enzymatique de 10 UI/ml, la quantité d'enzyme adsorbée à l'équilibre s'élève à 96,9 %. Par conséquent, nous nous situons dans une zone de concentration au niveau de laquelle l'augmentation de la concentration enzymatique ne semble pas influencer sur l'hydrolyse. La totalité de l'enzyme fixée n'est pas efficace.

Comparée aux xylanases de *Clostridium thermolacticum*, la xylanase de 22 kDa de *Bacillus* présente une meilleure capacité d'adsorption. Les meilleures performances hydrolytiques présentées par la xylanase de 22 kDa pourraient être en partie liées à la taille de cette molécule enzymatique comparée à celles des xylanases de *Clostridium thermolacticum*, bien que nous ayons pu constater pour ces dernières que leur taille ne constituait pas le facteur limitant.

CONCLUSIONS GENERALES

Nos recherches ont permis de contribuer à une meilleure connaissance des endoxylanases thermophiles bactériennes et de leurs mécanismes d'action vis à vis des xylanes isolés ou intégrés dans la paroi végétale. Nos études ont également consisté dans le développement des Biotechnologies liées à l'utilisation de xylanases, pour la production d'oligosaccharides à partir de substrats lignocellulosiques ou pour le blanchiment enzymatique des pâtes papetières.

Dans la première phase de nos recherches, nous avons purifié jusqu'à homogénéité, les trois endoxylanases de masses moléculaires de 39, 55 et 65 kDa excrétées par une bactérie anaérobie thermophile, *Clostridium thermolacticum* et l'endoxylanase de 22 kDa produite par une nouvelle espèce de *Bacillus* isolée dans notre laboratoire. Ces quatre endoxylanases possèdent des activités spécifiques très élevées, de l'ordre de 2000 à 3000 UI/mg de protéine à 60°C. De telles valeurs élevées avaient préalablement été décrites dans la littérature. Le problème majeur qui reste actuellement en suspens concerne la nature des relations entre les structures protéiques de telles enzymes et leurs thermostabilités. L'hyperproductivité en xylanase de *Bacillus* XE de même que la méthodologie simple et rapide que nous avons développée permettent d'isoler des centaines de mg de protéine pure à partir d'un litre de milieu de culture. Sur ces bases, des travaux de cristallisation et de séquençage peptidique sont actuellement en cours, dans le cadre de collaborations.

Nous avons pu mettre en évidence que les trois endoxylanases de *C. thermolacticum* possèdent des propriétés catalytiques et physicochimiques identiques (hormis leurs différences de masses moléculaires). Leurs réactions immunologiques croisées et surtout leurs identités de séquence peptidique N-terminale ont montré que ces trois enzymes dérivent d'un seul gène. Afin de pouvoir répondre à la question liée à la signification biologique de l'existence d'isoxylanases produites par un même microorganisme, nous nous sommes attachés à étudier les mécanismes d'action de ces enzymes.

Les trois enzymes de *C. thermolacticum* ne présentent pas de spécificités particulières sur des glucuronoxylanes ou des arabino-glucuronoxylanes isolés. En effet, les oligosaccharides produits par hydrolyse à long-terme de ces substrats étaient identiques.

Le rôle des xylanases dans le milieu naturel consiste en la dégradation des xylanes intégrés dans la paroi végétale pour fournir des substrats carbonés assimilables par les microorganismes producteurs. Ces microorganismes peuvent agir en synergie avec d'autres microorganismes producteurs d'enzymes complémentaires (cellulases, ligninases ...). La signification de la multiplicité des endoxylanases de *C. thermolacticum* pouvait se traduire par des fonctions hydrolytiques différentes. Dans nos conditions expérimentales, les cinétiques d'hydrolyses des xylanes de rafles de maïs et de pâtes papetières de pin n'ont pas montré de différences entre les trois xylanases. Seule la xylanase de masse moléculaire de 39 kDa présentait un comportement différent vis à vis de l'adsorption aux substrats lignocellulosiques, ce qui a conduit à formuler l'hypothèse qu'elle ne possédait pas de "cellulose binding domain". Le clonage et le séquençage de ces trois enzymes pourraient apporter les preuves de l'existence de tels domaines protéiques

Les applications biotechnologiques des xylanases que nous avons étudiées concernaient essentiellement la production de xylo-oligosaccharides à partir de rafles de maïs. Ces composés pourraient être utilisés comme agents de charge peu caloriques ou comme rétenteurs d'eau dans les produits alimentaires. Dans le cadre d'un travail d'équipe, nous avons mis au point un procédé enzymatique de préparation de xylo-oligosaccharides à l'échelle du kg, à partir de xylanes préalablement extraits. Ces composés pourront faire l'objet d'études physico-chimiques et nutritionnelles. D'autre part, nous avons purifié la majeure partie de ces produits pour permettre les analyses de leurs structures primaires.

Un autre volet de nos travaux a consisté à déterminer les conditions enzymatiques (concentration enzymatique, rapports entre l'enzyme adsorbée et l'efficacité de la réaction) permettant la dégradation des xylanes encore intégrés dans les parois végétales. Jusqu'à 50 % des xylanes présents dans les rafles de maïs peuvent être hydrolysés par les xylanases de *C. thermolacticum*. Pour ces types d'applications industrielles, deux sources enzymatiques peuvent être utilisées à partir de nos travaux. Il s'agit soit du mélange prépurifié issu du surnageant de culture de *C. thermolacticum*

soit de l'endoxylanase de *Bacillus*. *Bacillus* XE est un très bon candidat pour une application industrielle dans le domaine de l'hydrolyse spécifique des xylanes du matériel lignocellulosique (conversion en oligosaccharides, blanchiment de pâtes papetières). Cette souche est hyperproductrice, cellulase négative et les premiers résultats issus d'essais comparatifs ont montré que cette enzyme était beaucoup plus efficace pour la dépolymérisation des xylanes intégrés que les xylanases de *C. thermolacticum*. La faible masse moléculaire de cette enzyme ne peut, à notre avis, être uniquement responsable de ces différences. L'explication d'un tel phénomène reste à déterminer.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ADLER, (1977)
Wood Sci. Technol., 11, 169.

- AHLUWALIA, B., and FRY, S.C., (1986)
J. Cer. Sci., 4, 287-295.

- ANDERSON, A.J., (1978)
Phytopathology, 68, 1585-1589.

- ASPINALL, G.O. HIRST, E.L., and MAHOMED, R.S., (1954)
J. Chem. Soc., 1734.

- ASPINALL, G.O. and KAY, J.E.M., (1958)
J. Chem. Soc., 1059.

- ASPINALL, G.O., (1959)
Adv. Carbohydr. Chem., 14, 429-468.

- ASPINALL, G.O., COTTRELL, I.W., EGAN, S.V., MORRISON, I.M., WHYTE, J.L., (1967)
J. Chem. Soc., (C), 1071-1080.

- ASPINALL, G.O., HUNT, K., MORRISON, I.M., (1967)
J. Chem. Soc., (C), 1080-1086.

- ASPINALL, G.O., CRAIG, J.W., WHYTE, J.L., (1968)
Carbohydr. Res., 7, 442-452.

- ASPINALL, G.O., (1970)
In : Polysaccharides, Robinson R. (ed), Pergamon press, Oxford, New York, Toronto, Sydney, Braunschweig.

- ASPINALL, G.O., (1980)
Chemistry of the cell wall polysaccharides.
In: The biochemistry of plants, vol 3, Carbohydrates - Structure and function (ed. J. Preiss), pp 473 - 500. New York: Academic Press.

- AZUMA, J., (1989)
Plant Fibers, 10, 100-126.

- BAKER, C.J., WHALEN, C.H., KORMAN, R.Z., BATEMAN, D.F., (1979)
Phytopathology, 69, 789-793.

- BACHMANN, S.L., Mc CARTY, A.J., (1989)
J. Gen. Microbiol., 135, 293-299.

- BARNOUD, F., (1980)
La cellulose.
In: B. Monties, Les polymères végétaux, Ed. Gauthiers Villars, Paris, 66-86.

- BELDMAN, G., VORAGEN, A.G., ROMBOUITS, F.M., SEARLE-VAN LEEUWEN, M.F., PILNIK, W., (1988)
Biotechnol. and Bioeng., 31, 160-167.

- BERENGER, J.F., FRIXON, C., BIGLIARDI, J., CREUZET, N., (1985)
Can. J. Microbiol., 31, 635-643.

- BIELY, P., VRSANSKA, M., KRATKY, Z., (1980)
Eur. J. Biochem., 108, 313-321.

- BIELY, P., PULS, J., SCHNEIDER, H., (1985 a)
FEBS Lett., 186, 80-84.

- BIELY, P., (1985 b).
Trends in Biotechnology, vol 3, 11, 286-290.

- BIELY, P., MISLOVICOVA, D., TOMAN, R., (1985 c)
Anal. Biochem., 144, 142-146.
- BIELY, P., Mc KENZIE, C.R., PULS, J., SCHNEIDER, H., (1986)
Bio/Technology, 4, 731-733.
- BISHOP, C.T., (1953)
Can. J. Chem., 31, 134.
- BLUMENKRANTZ, N., ASBOE-HANSEN, G., (1973)
G. Anal. Biochem., 54, 484-489.
- BOUVENG, H.O. (1961)
Acta Chem. Scand., 15, 96-100.
- BRADFORD, M.A., (1976)
Anal. Biochem., 72, 248-254.
- BRAUNS, F.E. and BRAUNS, D.A., (1960)
 The chemistry of lignin, Supplement volume, Academic Press, pp. 157-167.
- BRETT, C.T., (1981)
J.Exp. Bot., 32, 1067-77.
- BRILLOUET, J.M., (1987)
Carbohydr. Res., 159, 165-170.
- BRODEL, B., SAMAIN, E., DEBEIRE, P., (1990)
Biotechnol. Lett., 22 (1), 65-70.
- BRONNENMEIER, K., EBENBICHLER, C., STAUDENBAUER, W.L., (1990)
J. Chromatogr., 521, 301-310.

- CARLSTROM, D., (1957)
J. Biophys. Cytol., 3, 669-673.

- CHANZY, H., CHUMPITAZI, B., PEGUY, A., (1982)
Carbohydr. polymers, 2, 35-42.

- CHEN Chen-Loung, (1988)
 In: **Methods in enzymology**, edited by Wood W.A. and Kellogg S.C., Vol. 161:
 110-136.

- CHESSON, A., GORDON, A.H., LOMAX, J.A., (1983)
J. Sci. Food. Agric., 34, 1330-1340.

- CLAEYSSSENS, M., LOONTIENS, F.G., KERSTERS-HILDERSON, DE BRUYNE, C.K.,
 (1971)
Enzymologia, 40, 177-198.

- COMTAT, J. AND JOSELEAU, J.P., (1981)
Carbohydr. Res., 95, 101-112.

- CRAWFORD, R.L., (1971)
Lignin Biodegradation and Transformation, Wiley, New York.

- CRAWFORD, R.L. and CRAWFORD, D.L., (1988)
Methods in enzymology, 161, 18-31.

- DARVILL, A.G., Mc NEIL, N., ALBERSHEIM, P., DELMER, D.P., (1980 a)
 In: **The Biochemistry of Plants**, (ed. N.E. Tolbert), 1, *The Plant Cell*: 91-162. New York:
 Academic Press. p. 705.

- DAS, N.N., DAS, S.C., SARKAR, A.K., and MUKHERJEE (1984)
Carbohydr. Res., 129, 197-207.

- DASHEK, W.V., CHRISPEELS, M.J., (1977)
Planta, 134, 251-256.
- DEBEIRE, P., PRIEM, B., STRECKER, G., VIGNON, G., (1990)
Eur. J. Biochem., 187, 573-580.
- DEKKER, R.F.H., and RICHARDS, G.N., (1975)
Carbohydr. Res., 42, 107-123.
- DEKKER, R.F.H., and RICHARDS, G.N., (1976)
Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 32, 277-352.
- DEKKER, R.F.H., (1985)
Biodegradation of the Hemicelluloses, 505-533.
In: T.Higuchi (ed), Biosynthesis and biodegradation of wood components.
Academic Press, Inc., Orlando, Fla.
- DEY, P.M. and BRINSON, K., (1984)
Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 42, 265-382.
- DOUX-GAYAT, A., AURIOL, P., JOSELEAU, J.P., TOUZE, A., (1978)
Physiol. Plant., 42, 301-306.
- DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A., and SMITH, F., (1956)
F. Anal. Chem., 28, 350-356.
- ERIKSSON, Ö. and LINDGREN, (1977)
Svensk Papperstidn., 80, 59-63
- ERIKSSON, Ö., GORING, D.A.I., LINDGREN, B.O., (1980)
Wood Sci. Technol., 14, 267-279.
- ESRICH, W., (1956)
Protoplasma, 47, 487-530.

- ESTEBAN, R., CHORDI, A., VILLA, T.G., (1983)
FEMS Microbiol. Lett., **17**, 163-166.

- EWALD, C.M. and PERLIN, A.S., (1959)
Can. J. Chem., **37**, 1254-1259.

- FERREIRA, L.M.A., DURRANT, A., HALL, J., HAZLEWOOD, G.P. and GILBERT, H.J., (1990)
Biochem. J., **269**, 261-264.

- FIELDING, A.H., BYRDE, R.J.W., (1969)
J. Gen. Microbiol., **58**, 73-84.

- FINCHER, G.B. and STONE, B.A., (1981)
Metabolism of non cellulosic polysaccharides.
In: Tanner W., Loewus F.A. (eds), *Encyclopedia of plant physiology*, Vol.13 B, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 68-132.

- FINNE, J., KRUSIUS, T., RAUVALA, H., (1980)
Carbohydr. Res., **80**, 336-339.

- FISCHER, F.G and NEBEL, H.G., (1955)
Z. Physiol. Chem., **302**, 10.

- FORD C.W., (1986)
Carbohydr. Res., **147**, 101-117.

- FOURNET, B., STRECKER, G., LEROY, Y., MONTREUIL, J., (1981)
Anal. Biochem., **116**, 489-502.

- FREDERICK, M.M., FREDERICK, J.R., FRATZKE, A.R., REILLY, P.J., (1981)
Carbohydr. Res., **97**, 87.

- FREDERICK, M.M., KIANG, C.-H., FREDERICK, J.R., REILLY, P.J., (1985)
Biotechnol. Bioeng., 27, 524-532.

- FREUDENBERG, K., (1968)
Constitution and Biosynthesis of lignin; (A.C. Neish and K. Freudenberg, eds)
Springer-Verlag, New York.

- FRY S.C., (1982)
Biochem. J., 203, 493-504.

- FRY S.C., (1983)
Planta, 157, 111-123.

- FRY S.C., (1986)
Annu. Rev. Plant Physiol., 37, 165-186.

- FRY S.C., (1989)
Analysis of Cross-Links in the Growing Cell Walls of Higher Plants.
In **Plant Fibers**, 10, 12-36.

- FUKASAKI, E., PANBANGRED, W., SHINMYO, A., OKADA, H., (1984)
FEBS Lett. , 171, 197-201.

- GILKES, N.R., HENRISSAT, B., KILBURN, D.G., MILLER, R.C., and J.R., WARREN,
R.A.J., (1991)
Microbiological Reviews, Juin, 303-315.

- GORBACHEVA, I.V. and RODIONOVA N.A., (1977)
Biochim. Biophys. Acta, 484, 79-93.

- GRETHLEIN, H.E., (1985)
Bio / Technology, 3, 155 - 160.

- GREVE, L.C., LABAVITCH, J.M., HUNGATE, R.E., (1984)
Appl. Environ. Microbiol., **47**, 1135-1140.
- GUBLER, F., ASHFORD, A.E., BACIC, A., BLAKENEY, A.B., STONE, B.A., (1985)
Aust. J. Plant Physiol., **12**: 307-317.
- HAEMMERLI, S.D., LEISOLA, M.S.A., FIECHTER, A., (1986).
FEMS Lett.,**35**: 33-36
- HÄGGLUNG, H., LINDBERG, B., Mc PHERSON, J., (1956)
Acta. Chem. Scand., **10**, 1160-1164.
- HAMAMOTO, T., HONDA, H., KUDO, T., HORIKOSHI, K., (1987)
Agric. Biol. Chem., **51**, 953-955.
- HARTLEY, R.D.and JONES, E.C., (1977)
Phytochemistry, **16**, 1531-1534.
- HARTLEY, R.D., (1987)
HPLC for the separation and determination of phenolic compounds in plant cell walls.
In: Linskens H.F., Jackson J.F. (eds), **Modern methods in plant analysis, new series**, vol. 5, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo.
- HARTLEY, R.D., MORRISON III, W. H., HIMMELSBACH, D.S., BORNEMAN, W.S., (1990)
Phytochemistry, Vol 22, n°12, 3705-3709.
- HAYASHI, T., (1989)
Measuring β -glucan deposition in Plant Cell Walls.
In: **Plant fibers**, edited by H.F. Linskens and J.F. Jackson. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo.

- HEMMINGSON, J.A., LEARY, G.J., MILLER, I.J., THOMAS, W.A., WOODHOUSE, A.D. (1978).
J. Chem. Soc. Chem. Comm., 92-93.

- HEMMINGSON, J.A., (1979)
Aust J. Chem., 32, 225-229.

- HENRISSAT, B., CLAEYSSSENS, M., TOMME, P., LEMESLE, L., and MORNON, J.P., (1989)
Gene, 81, 83-95.

- HIGUCHI, T., ITO, Y., and KAWAMURA, I., (1967)
Phytochemistry, 6, 875.

- HILL, J.B., KESSLER, G.J., CHAPPELL HILL, N.C., CHAUNCE, N.Y., (1961)
Lab., Clin. Med., 57, 970.

- HOEBLER, C., BARRY, J.L., DAVID, A., and DELORT-LAVAL, J., (1989)
J. Agric. Food Chem., 37 (2), 360-367.

- HOFFMANN, W.S., (1937)
J. Biol. Chem., 120, 51.

- HOLLOWAY, W.D. and GREIG, R.I., (1984)
J. Food Sci, 49, 1632-1633.

- HONDA, H., KUDO, T., HORIKOSHI, K., (1985)
J. Bacteriol., 161, 784-785.

- HUGHES, R. and STREET, H.E., (1974)
Ann. Bot., 38, 555-64.

- IKURA, Y., HORIKOSHI, K., (1977)
Agric. Biol. Chem., 41, 1373-1377.

- ISHII, S., (1982)
Phytochem., 21, 778-780.

- JARVIS, M., (1984)
Plant Cell Env., 7, 153-164.

- JARVIS, M.C., FORSYTH, W., DUNCAN, H.J., (1988)
Plant Physiol., 88: 308-314.

- JOHN, M., SCHMIDT, B., SCHMIDT, J., (1979)
Can. J. Biochem., 57, 125-134.

- JOSELEAU, J.P., 1980
les hémicelluloses.
In: B. Monties, Les polymères végétaux, Ed. Gauthiers Villars, 87-121.

- JOSELEAU, J.P., and GANCET C., (1981)
Svensk Papperstidn., 84, R123-127

- JOSELEAU J.P. and RUEL K., (1985)
Biol. Cell., 53, 61-64.

- KANDA, T., AMANO, Y., NISIZAWA, K., (1985)
J. Biochem., 98, 1545-1554.

- KANDA, T., WAKABAYASHI, K., NISIZAWA, K., (1976)
J. Biochem., 79, 989.

- KATO, Y., IKI, K., MATSUDA, K., (1981)
Agric. Biol. Chem. , 45, 2745-53.

- KATO, A., AZUMA, J., KOSHIJIMA, T., (1983)
Chem. Lett. , 137-140.

- KATO, Y., NEVINS, D.J., (1985)
Carbohydr. Res., 137, 139-150.

- KATO, C., KOBAYASHI, T., KUDO, T., HORIKOSHI, (1986)
FEMS Microbiol. Lett., 36, 31-34.

- KATO, A., AZUMA, J., KOSHIJIMA, T., (1987)
Agric. Biol. Chem., 51, 1691-1693.

- KAUSS, H., (1985)
J. Cell Sci. Suppl., 2, 89-103.

- KAUSS, H., (1987)
Ann. Rev. Plant Physiol., 38, 47-72.

- KAUSS, H., (1989)
 Fluorometric measurement of callose and other 1,3- β -Glucans.
 In: **Plant fibers**, edited by H.F. Linskens and J.F. Jackson. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo.

- KERSTERS-HILDERSON, H., LOONTIENS, F.G., CLAEYSSSENS, M., DE BRUYNE, C.K., (1969)
Eur. J. Biochem., 7, 434-441.

- KHAN, A.W., LAMB, K.A., OVEREND, R.P., (1990)
Enz. Microb. Technol., 12, 127-131.

- KHANDKE, K.M., (1986)
Ph.D Thesis, Indian Institute of Science, Bangalore, India.

- KHANDKE, K.M., VITHAYATHIL, P.J., MURTHY, S.K., (1989)
Arch. Biochem. Biophys., 274, 511-517.

- KIDBY, D.K. and DAVIDSON D.J., (1973)
Anal. Biochem., 55, 321-325.

- KIRK, T.K., CROAN, S., TIEN, M., MURTAGH, K.E., and FARELL, R.L. (1986)
Enzyme Micro. Technol., 8, 27.

- KIRK, T.K. and YANG, H.H., (1979)
Biotech. Letters, 1, 347.

- KIRK, T.K. and OBST, J.K., (1988)
 In: **Methods in enzymology**, Vol.161: 87-101.

- KITPREECHAVANICH, V., HAYASHI, M., NAGAI, S., (1986)
Agr. Biol. Chem., 50, 1703-1711.

- KLUEPFEL, D., VATS-MEHTA, S., AUMONT, F., SHARECK, F., MOROSOLI, R.,
 (1990)
Biochem. J., 267, 45-50.

- KNEE, M., BARTLEY, I.M., (1981)
 Composition and metabolism of cell wall polysaccharides in ripening apples.
 In: **Recent Advances in the Biochemistry of Fruits and Vegetables**, (ed.J. Friend and
 M.J.C. Rhodes), 133-148. New York: Academic Press.

- KOHN, R., (1975)
Pure appl. Chem., 42, 371-397.

- KOMAE, K., KAJI, A., SATO, M., (1982)
Agri. Biol. Chem., 46, 1899-1905.

- KORTE, H.E., (1990)
Ph.D. Thesis, University of Hamburg, Hamburg.

- KOVACIK, V., BAUER, S., ROSIK, J., and KOVAK, P., (1968)
Carbohydr. Res., 8, 282-290.
- KOYAMA, H., UJIIE, M., TANIGUCHI, H., SASAKI, T., (1990)
Enz. Microb. Technol., 12, 218-224.
- KRISCH, K., (1971)
In: *The Enzymes*, Boyer P.D., Ed: Academic Press: New York, 43-69.
- KUBACKKOVA, N., KARACSONYI, L., BILISICS, L., TOMAN, R., (1979)
Carbohydr. Res., 76, 177-188.
- KUDO, T., OHKOSHI, A., HORIKOSHI, K., (1985)
J. Gen. Microbiol., 131, 2825-2830.
- KUNTZ, I.D., BRASSFIELD, T.S., LAW, G.D., PURCELL, G.V., (1969)
Science, 163, 1329-1331.
- KUSAKABE, I., OHGUSHI, S., YASUI, T., KOBAYASHI, T., (1983)
Agri. Biol. Chem., 47 (12), 2713-2723.
- KUSAKABE, I., YASUI, T., KOBAYASHI, T., (1977)
Nippon Nogeika-gaku Kaishi., 51, 669-679.
- LAEMMLI, U.K., (1970)
Nature, 227, 680-685.
- LAMPORT, D.T.A. and CATT, J.W., (1981)
Glycoproteins and enzymes of the cell walls.
In: *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series*, 13 B (ed. W. Tanner and F.A. Loewus), 133 -165, Berlin, Heidelberg, New York: Springer - Verlag.

- LAPPALAINEN, A. Espoo (1988)
Cellulolytic and xylanolytic enzymes of *Trichoderma reesei*.
Technical Research Center of Finland, Publications 50.

- LEARY, G.J., SAWTELL, D.A., WONG, H., (1983 a)
Holzforschung, 37, 11-16.

- LEARY G.J., SAWTELL D.A., WONG H., (1983 b)
Holzforschung, 37, 213-215.

- LEATHERS, T.D., (1986)
Appl. Environ. Microbiol., 52, 1026-1030.

- LEE, Y.H. and FAN, L.T., (1982)
Biotechnol. Bioeng., XXIV, 2383-2406.

- LEE, S.F., FORSBERG C.W., (1987 a)
Appl. Environ. Microbiol., 53 (4), 651-654.

- LEE, S.F., FORSBERG, C.W., RATTRAY, J.B. (1987 b)
Appl. Environ. Microbiol., 53 (4), 644-650.

- LEPOUTRE, J.P., (1990)
Mémoire de diplôme d'ingénieur C.N.A.M., (Lille).

- LE RUYET, P., DUBOURGUIER, H.C., ALBAGNAC, G., PRENSIER, G., (1985)
System Appl. Microbiol., 6, 196-202.

- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, L., RANDALL, R.J., (1951)
J. Biol. Chem, 193, 265-275.

- MAINO, A.L., SCHROTH, M.N., PALLERONI, N.J., (1974)
Phytopathology, 64, 881-885.

- MARKWALDER, H.U., and NEUKOM, H., (1976)
Phytochem., 15, 836-837.

- MATSUO, M. AND YASUI, T., (1984 a)
Agric. Biol. Chem., 48 (7), 1845-1852.

- MATSUO, M. AND YASUI, T., (1984 b)
Agric. Biol. Chem., 48 (7), 1853-1860.

- Mc CLEARY, B.V., and MATHESON, N.K., (1983)
Carbohydr. Res., 119, 191-219.

- Mc CLEARY, B.V., (1986)
Int. J. Biol. Macromol., Vol.8, 349-354.

- Mc CLEARY, B.V., (1988)
In: **Methods in Enzymology**, Vol 160, Cellulose and Hemicellulose, (W.A. Wood and S.T. Kellog, Eds), pp. 523-527.

- Mc COMB, E.A. and Mc CREADY, R.M., (1957)
Anal. Chem., 29, 818-821.

- Mc KENZIE, C.R., BILOUS, D., SCHNEIDER, H., JOHNSON, K.J., (1987)
Appl. Environ. Microbiol., 53, 2835-2839.

- Mc NEIL, M., ALBERSHEIM, P., TAIZ, L., JONES, R.L., (1975)
Plant Physiol., 55, 64-68.

- Mc NEIL, M., DARVILL, A.G., FRY, S.C. and ALBERSHEIM, P., (1984)
Ann. Rev. Biochem., 53: 625-663.

- MEDCALF, D.G. and GILLES, K.A., (1968)
Cereal Chem., 45, 550-556.

- MONDOU, F., SHARECK, F., MOROSOLI, R., KLUEPFEL, D., (1986)
Gene, 49, 323-329.

- MONRO, J.A., PENNY, D., BAILEY, R.W., (1976)
Phytochem., 15, 1193-98.

- MONTGOMERY, R. and SMITH, F., (1955 a)
J. Am. Chem. Soc., 77, 3325.

- MONTGOMERY, R. and SMITH, F., (1955 b)
J. Am. Chem. Soc., 77, 2834.

- MONTIES, B., (1980)
Les lignines.
Dans: Les polymères végétaux. Polymères pariétaux et alimentaires non azotés,
Monties B. (ed), Gauthier-Villars, Paris, 122-155.

- MORA, F., COMTAT, J., BARNOUD, F., PLA, F., and NOE, P., (1986)
Journal of wood chemistry and technology, 6(2), 167-184.

- MORIYAMA, H., HATA, Y., YAMAGUCHI, H., SATO, M., SHINMYO, A., TANAKA,
N., OKADA, H., KATSUBE, Y., (1987)
J. Mol. Biol., 193, 237-238.

- MOROSOLI, R., (1985)
Biochim. Biophys. Acta, 826, 202-207.

- MORRISON, I.M., (1976)
Carbohydr. Res., 47, 129-139.

- MUELLER-HARVEY, I.M., HARTLEY, R.D., HARRIS, P.J., CURZON, E.H. (1986)
Carbohydr. Res., 148, 71-85.

- NAKAMURA, Y., HIGUCHI, T., (1976)
Holzforschung, 30, 187-191.

- NAKAYAMA, M., TOMITA, Y., SUSUKI, H., NISIZAWA, K., (1976)
J. Biochem., (Tokyo), 79, 125-138.

- NISHITANI, K. NEVINS, D.J., (1988)
Plant Physiol., 87, 883-890.

- NISHITANI, K. NEVINS, D.J., (1991 a)
J. Biol. Chem., 266, 6539-6543.

- NISHITANI, K. NEVINS, D.J., (1991 b)
Food Hydrocolloids, 5, 197-207.

- OKAZAKI, W., AKIBA, T., HORIKOSHI, K., AKAHOSHI, R., (1985)
Agric. Biol. Chem., 49, 2033-2039.

- OUCHTERLONY, O., (1958)
Prog. Allergy, 5, 1-9.

- PAICE, M.G., BOURBONNAIS, R., DESROCHERS, M., JURASEK, L., and YAGUCHI, M., (1986)
Arch. Microbiol., 144, 201-206.

- PAICE, M.G., BERNIER, R., Jr, JURASEK, L., (1988)
Biotechnol. Bioeng., 32, 235-239.

- PANBANGRED, W., SHINMYO, A., KINOSHITA, S., OKADA, H., (1983)
Agric. Biol. Chem., 47 (5), 957-963.

- PETTIPHER, G.L. and LATHAM, M.J., (1979)
J. Gen. Microbiol., 110, 29-38.

- POUTANEN, K., RÄTTÖ, M., PULS, J., VIIKARI, L., (1987)
J. Biotechnol., **6**, 49-60.

- POUTANEN, K., (1988 b)
Ph.D. Thesis, VTT Pub., Technical Research Centre of Finland.

- POUTANEN, K. and PULS, J., (1988 a)
Appl. Microbiol. Biotechnol., **28**, 425-432.

- POUTANEN, K., TENKANEN, M., KORTE, H., and PULS, J., (1990)
In: **Enzymes in Biomass Conversion**, Chapter 33, 426-436.
ACS Symposium series (460), April 22-27.

- POUTANEN, K., SUNDBERG, M., KORTE, H., and PULS, J., (1991)
Appl. Microbiol. Biotechnol., in Press.

- PREECE, I.A. and HOBKIRK, R., (1954)
J. Inst. Brewing, **60**, 490.

- PRIEM, B., (1990)
Thèse de 3eme cycle, USTLFA (Lille)

- PULS, J., SCHMIDT, O., GRANZOW, C., (1987)
Enz. Microb. Technol., **9**, 83-88.

- PULS, J., POUTANEN, K., KÖRNER, H.U., VIIKARI, L., (1985)
Appl. Microbiol. Biotechnol., **22**, 416-423.

- PULS, J., SINNER, M., DIETRICH, H.H., (1976)
German Patent 26 43 800.

- REDGELL, R.J. and SELVENDRAN, R.R., (1986)
Carbohydr. Res., **157**: 183-199.

- REES, D.A. and WIGHT, A.W., (1971)
J. Chem. Soc., (B) 1366.
- REILLY, P.J., (1981)
Basic. Life Sci., 18, 111-129.
- RIDE, J.P., (1975)
Physiol. Plant Pathol., 5, 125-134.
- ROBERTS, J.C. and EL-KARIM, S., (1983)
Cellulose Chem. Technol., 17, 370-386
- RODIONOVA, N.A., TAVOBILOV, I.M., BEDZOBODOROV, A.M., (1983)
J. Appl. Biochem., 5, 300-312.
- ROSE, D.R., BIRNBAUM, G.I., TAN, L.U.L., SADDLER, J.N., (1987)
J. Mol. Biol., 194, 755-756.
- SALYERS, A.A., BALASCIO, J.R., PALMER, J.K., (1982)
J. Food Biochem., 6, 39.
- SARKANEN, K.V., HERGERT, H.L. (1971)
In: "lignins", Classification and distribution, (K.V.Sarkanen and C.H. Ludwig, eds)
Wiley (Interscience), New York.
- SAWARDEKER, J.S., SLONEKER, J.H., JEANES, A., (1965)
Anal. Chem., 37, 1602-1604.
- SCALBERT, A., MONTIES, B., LALLEMAND, J.Y., GUITTET, E., ROLANDO, C.,
(1985)
Phytochem., 24, 1359-1362.
- SCALBERT, A., MONTIES, B., ROLANDO, C., SIERRA-ESCUADERO, A., (1986)
Holzforschung, 40, 191-195.

- SELVENDRAN, R.R., (1985)
J. Cell. Sci. Suppl., 2, 51-88.

- SENIOR, D.J., MAYERS, P.R. et SADDLER, J.N., (1991)
Biotechnol. Bioeng., 37, 274-279.

- SHEI, J.C., FRATZKE, A.R., FREDERICK, M.M., REILLY, P.J., (1985)
Biotechnol. Bioeng., 27, 533-538.

- SHIBUYA, N., MISAKI, A., (1978)
Agric. Biol. Chem., 42, 2267.

- SHIBUYA, N. and NAKABE, R., (1984)
Phytochem., 23, 1425-1429.

- SHIMADA, M., FUKUZUKA, T., HIGUCHI, T., (1971)
Tappi, 54, 72-78.

- SHIMIZU, K., HASHI, M., and SAKURAI, K., (1978)
Carbohydr. Res., 62, 117-126.

- SINNER, M., DIETRICH, H.H., SIMATUPANG, M.H., (1972)
Holzforschung, 26, 218-228.

- SINNER, M., PARAMESWARAN, N., YAMAZAKI, N., LIESE, W., DIETRICH, H.H., (1976 a)
Appl. Polymer Symp., 28, 993-1024.

- SINNER, M., DIETRICH, H.H., (1976 b)
Holzforschung, 30, 50-59.

- SINNER, M., PARAMESWARAN, N., DIETRICH, H.H., (1979)
Adv. Chem. Ser., 181, 303-329.

- SREENATH, H.K., and JOSEPH, R., (1982)
Folia Microbiol., 27, 107-115.

- STEPHEN, A.M., (1983)
Other plants polysaccharides.
In: **The polysaccharides**, 2, (ed. G.O. Aspinall), 98 - 193. New York London:
Academic Press.

- STURGEON, R.J., (1980)
Methods Carbohydr. Chem., 8, 77-80.

- STÜTTGEN, E., SAHM, H., (1982)
Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 15, 93-99.

- SUGA, K., VAN DEDEM, G., MOO-YOUNG, M., (1975)
Biotechnol. Bioeng., 17, 185.

- TAGAWA, K., KAJI, A., (1969)
Carbohydr. Res., 11, 293-301.

- TAIZ, L. and HONIGMAN, W.A., (1976)
Plant Physiol., (Bethesda), 58, 380-386.

- TAKAHASHI, M., KUTSUMI, S., (1979)
J. Ferment. Technol., 57, 434-439.

- TAKENISHI, S., and TSUJISAKA, Y., (1975)
Agric. Biol. Chem., 39, 2315-2323.

- TANHASHI, M. and HIGUCHI, T., (1988)
Methods in Enzymology, 161, 101-109.

- TANNER, G.R., and MORRISON, I.M., (1983)
Phytochem., 22, 1433-1439.

- TENKANEN, M., SCHUSEIL, J., PULS, J., POUTANEN, K.J, (1991)
J. Biotechnol., in Press.

- TIMELL, T.E., (1964)
Adv. Carbohyd. Chem., 19, 247-32.

- TODA, S., SUZUKI, H., NISIZAWA, K., (1971)
J. Ferment. Technol., 49, 449-521.

- TOMAN, R., KARACSONYL, S., KUBACKOVA, M., (1976)
Cellul. Chem. Technol., 10: 561-565.

- TOMME, P., VAN TILBEURGH, H., PETTERSSON, G., VAN DAMME, J.,
VANDERKERCKHORE, J., KNOWLES, J., TEERI, T., and CLAEYSSSENS, M., (1988)
Eur. J. Biochem., 170, 575-581.

- TOWLE, G.A. and WHISTLER, R.L. (1973)
Hemicelluloses and Gums.
In: Miller, L.P. (ed). *Phytochemistry*, Vol. 1 New York, Van Nostrand Reinhold Co.,
pp. 198-248.

- UCHINO, F., and NAKANE, T., (1981)
Agric. Biol. Chem., 45, 1121-1127.

- UEZAKA, E., SATO, M., RAIJU, M., KAJI, A., (1978)
J. Bacteriol., 133, 1073-1077.

- UZIEE, M., MATSUO, M., YASUI, T., (1985)
Agric. Biol. Chem., 49, (4), 1167-1173.

- VAN DYKE, B.H., (1972)
Jr. "Enzymatic hydrolysis of cellulose - A kinetic study", Ph.D. dissertation,
Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA.

- VAN DOORSLAER, E., KERSTERS-HILDERSON, H., DE BRUYNE, C.K., (1985)
Carbohydr. Res., 140, 342-346.
- VAN TILBEURGH, H., TOMME, P., CLAEYSSSENS, M., BHIKHABHAI, R.,
PETTERSSON, G., (1986)
FEBS Lett., 204, 223-227.
- VATS-MEHTA, S., BOUVRETTE, S., SHARECK, F., MOROSOLI, R., KLUEPFEL, D.,
(1990)
Gene, in Press.
- VOLOCH, M., LADISH, M.R., CANTARELLA, M., TSAO, G.T., (1984)
Biotechnol. Bioeng., 26, 557-559.
- VORAGEN, A.G.J., TIMMERS, J.P.J., LINSSEN, J.P.H., SCHOLS, H.A. and PILNIK,
W., (1983)
Z. Lebensm. Unters. Forsch., 177, 251-256.
- WEINSTEIN, L., ALBERSHEIM, P., (1979)
Plant Physiol., 63, 425-432.
- WEST, C.A., ELZANOWSKI, A., YEH, L.S., BARKER, W., (1989)
FEMS Microbiol. Lett., 59, 167-172.
- WHISTLER, R.L. and TU, C.C., (1952)
J. Am. Chem. Soc., 74, 3609-3612.
- WHISTLER, R.L. and RICHARDS, G.N. (1959)
J. Am. Chem. Soc., 81, 4888.
- WILKIE, K.C.B. and WOO, S.L. (1977)
Carbohydr. Res., 57, 145.

- WILKIE, K.C.B., (1979)
Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., Vol. 36, Academic Press, New York, 215-264.

- WISE, L.E. and RITTENHOUSE, R.C., (1951)
Proc. Forest Products Res. Soc., 5, 239.

- WONG, K.K.Y., TAN, L.U.L., SADDLER, J.N., et YAGUCHI, M., (1986)
Can. J. Microbiol., 32, 570-576.

- WONG, K.K.Y., TAN, L.U.L., SADDLER, J.N. (1988)
Microbiol. Rev., 52 (3), 305-317

- WONG, K.K.Y., DEVERELL, K.F., MACKIE, K.L., CLARK, T.A., DONALDSON, L.A. (1988)
Biotechnol. Bioeng., 31, 447 - 456.

- WOODWARD, J.R., FINCHER, G.B., STONE, B.A., (1983)
Carbohydr. Polymers, 3, 207-25.

- WOODWARD, J.R., FINCHER, G.B., (1983)
Brewers Digest, 28-32.

- WOODWARD, J.R., (1984).
Top. Enzyme Ferment. Biotechnol., 8, 9-30.

- YAMAKI, S., and KAKIUCHI, S., (1979)
Plant Cell Physiol., 20, 301-309.

- YAMAMOTO, R., NEVINS, D.J., (1978)
Carbohydr. Res., 67, 275-80.

- YORK, W.S., DARVILL, A.G., ALBERSHEIM, P. (1984)
Plant Physiol., 75, 295-297.

- YOSHIOKA, H., NAGATA, N., CHAVANICH, S., NILUBOL, N., HAYASHIDA, S.,
(1981)
Agric. Biol. Chem., 45, 579-586.

- ZINBO, M., TIMELL, T.E., (1965)
Svensk Papperstidn., 68, 647-662.

- ZINBO, M., TIMELL, T.E., (1967)
Svensk Papperstidn., 70, 695-701.

**BREVETS CONCERNANT LA PRODUCTION ET L'UTILISATION DE
XYLO-OLIGOSACCHARIDES.**

- Hydrolysis of xylan to give xylo-oligosaccharide mixt. using xylanase obtd. from *Bacillus bacteria*.
SUNTORY LTD, N° JP 61242592, (1987).

- Xylose and xylo-oligosaccharide mfr. includes extrn. of xylan from plant material, treatment with cellulase and removal of hydrolysate.
TOWA KASEI KOGYO KK, N° JP 61285999, (1987)

- Food and drink prepn. - by addn. of reduced xylo-oligosaccharide powder of soln.
DAINIPPON PRINTING KK, TOWA KASEI KOGYO KK, N° JP 62278962 (1988).

- Food and drink prepn. - involves corporation of xylo-oligosaccharide powder of soln.,
TOWA KASEI KOGYO KK, N° JP 62278961, (1988).

- *Lactobacillus bifidus* proliferation promoting composn. - comprising xylooligosaccharide wich contains xylobiose as principal component.
SUNTORY LTD, N° EP 265970, (1988)

- Xylose and/or xylooligosaccharide prodn. - by crushing broadleaf tree chips, steaming, treating extract with ozone, ion exchanging etc.
NORIINSHO KK., TOWA KASEI KOGYO KK, N° JP 62281890, (1988).

- Endoxylanase xylo-oligosaccharide used as sweetener - obtd by culturing *Bacillus stearothermophilus* in nutritive medium and recovering endoxylanase.
NAKANO SUMISE KK, N° JP 1252280, (1988).

- Xylooligosaccharide prepn. - comprises degradation of true grasses by microwave irradiation in diluted acetic acid.
NIPPON KAGAKU KIKAI, N° JP 1224385, (1989)

- Xylo-oligosaccharide(s) used as new sweetener - are prepd. by crushing grasses and/or vegetable materials.

NIPPON KAGAKU KIKAI, N° JP 1224384, (1989).



RESUME DE THESE

Les endoxylanases thermophiles pourraient présenter un intérêt biotechnologique considérable dans le domaine de la conversion des xylanes intégrés dans la paroi végétale. Néanmoins, les mécanismes d'action de ces enzymes sur ces substrats ne sont que très peu connus. D'autre part, il existe une grande hétérogénéité parmi les endoxylanases fongiques et bactériennes dont la signification biologique reste à déterminer.

Nous avons purifié et étudié 4 endoxylanases thermophiles, 3 excrétées par *Clostridium thermolacticum* (MM: 39, 55 et 65 kDa), 1 produite par une nouvelle espèce de *Bacillus* (MM: 22 kDa). Ces 4 enzymes présentent des activités spécifiques voisines et très élevées et de très bonnes stabilités thermiques.

Les 3 endoxylanases produites par *C. thermolacticum*, sont en réalité des isoenzymes. Elles possèdent des propriétés physico-chimiques identiques et surtout la même séquence protéique N-terminale. Leurs spécificités catalytiques vis à vis de xylanes isolés ou intégrés dans la paroi végétale sont similaires. La seule différence réside dans la faible capacité d'adsorption de la xylanase de 39 kDa sur le matériel lignocellulosique.

Nous avons étudié la production de xylo-oligosaccharides par voie enzymatique à partir de rafles de maïs. La préparation d'une quantité suffisante d'un mélange d'endoxylanases de *C. thermolacticum* a permis l'obtention de xylo-oligosaccharides à l'échelle du kg à partir de xylanes de rafles de maïs préalablement isolés. Nous avons également déterminé les conditions catalytiques permettant la dégradation des xylanes encore intégrés dans les rafles de maïs. Jusqu'à 50 % de xylanes pouvaient être hydrolysés par le mélange de xylanases de *C. thermolacticum*. Les mêmes types d'expériences réalisées à partir de l'endoxylanase de 22 kDa de *Bacillus* ont montré que cette enzyme était encore plus efficace et se révélait être une très bonne candidate pour la dégradation des xylanes intégrés dans le matériel lignocellulosique.