

**EXTRACTION ET PURIFICATION DE L'EXO-P-(1-3)-
GLUCANASE DU SUC DIGESTIF D'ESCARGOT
(*Helix pomatia*).
ETUDE DE LA PROTOPLASTISATION sur
*Saccharomyces cerevisiae***

KHOUFACHE K.(1), BENALLAOUA S. (1), IDRES N. (1),
KECHA M. (1) et BELLAL M.M. (2)

(1) Labo. de Bioch. Microbienne Université A. MIRA Béjaia Algérie

(2) Institut National Agronomique Hassan-Badi El-Harrach Alger

R E S U M E

L'extraction et la purification de la β -(1,3)-glucanase du suc d'*Helix pomatia* par précipitation au sulfate d'ammonium 25, 40, 60 et 80% montre que la fraction 40% présente une Meilleure activité spécifique 17U/mg avec un rendement de 24,40%, L'élution chromatographique de la fraction -40% indique que les éluats compris entre les tubes 25 et 31 constituent un seul pic avec un maximum d'activité. spécifique à 104 U/mg. Ces éluats rassemblés forme la fraction dite '25-31' avec une activité spécifique de 161U/mg et un rendement de 2%.

L'étude comparative de la protoplastisation de la levure *Saccharomyces cerevisiae* avec la cytohélicase commerciale et la préparation enzymatique obtenue a été réalisée avec et sans prétraitement au mercapto-éthanol. Les rendements sans prétraitement s'avèrent dans les deux cas trop faibles, par contre les rendements obtenus avec un prétraitement sont de 83 et 80% respectivement avec la cytohélicase commerciale et l'extrait enzymatique. Par ailleurs, les taux de protoplastisation pourraient être améliorés en utilisant des cellules en phase de croissance de 15 heures de culture et avec une concentration d'enzyme égale à 0,022mg/ml.

INTRODUCTION

Le β -(1,3)-glucanases ou β -(1,3)-glucaneglucanohydrolases sont classées comme exo- β -(1,3)-glucanases EC(3.2.1,58). Elles sont largement synthétisées chez les champignons filamenteux, les bactéries, les algues, les plantes supérieures et quelques invertébrés en réponse à des affections biotiques ou abiotiques (2).

Les exo- β -(1,3)-glucanases sont situées dans plusieurs domaines d'application alimentaires et médicales (3).

Depuis les travaux de GIEJA (1922), il a été prouvé que le suc gastrique d'*Helix pomatia* pouvait être utilisé pour lyser la paroi des levures, en vue de l'obtention de protoplastes ou pour extraire l'ADN mitochondrial à des fins de manipulations génétiques. En effet, ce suc hépato-pancréatique d'*Helix pomatia* mélange extrêmement complexe en glycosidases (β -Glucanases, Amylases, Chitinases, Estérases, Futcosidases...), possède une importante activité hydrolysante sur plusieurs polysaccharides dont le β -(1,3)-glucane composé structural majeur de la paroi des champignons et des levures (4).

L'objectif de cette étude est de mettre au point une préparation enzymatique enrichie en β -(1,3)-glucanases à partir du suc digestif d'escargots en vue d'une substitution éventuelle des préparations commercialisées destinées à la proto-plastisation des champignons.

MATERIEL ET METHODE

1.- MATERIEL BIOLOGIQUE ET CULTURE

La souche *Saccharomyces cerevisiae* appartenant à la collection du laboratoire a été sélectionnée d'une part, pour la protoplastisation et, d'autre part, pour extraire la fraction glucane de la paroi ayant servi de substrat pour l'enzyme.

La levure est conservée à + 4°C et cultivée sur le milieu Sabouraud (glucose 20g, peptone 10g, pH 6,5 pour un litre de solution). Les précultures ont été réalisées dans des flacons d'Erlenmeyer de 250 ml contenant 50 ml de milieu, incubés dans un bain Marie de type GFL, à 30°C, et sous agitation à 200rpm durant 15 heures.

La biomasse est obtenue par culture de la levure en fermenteur de type « Meredos » sur un volume utile de 1,5 litre,ensemencé avec les précultures dans les conditions de fermentation : pH = 6, 5; Température =30°C, Agitation = 200rpm.

2.- PREPARATION DE L'EXTRAIT ENZYMATIQUE

Pour faciliter le prélèvement du suc hépatopancréatique, les escargots sont laissés à jeûn durant 02 jours dans un cristalliseur. Ceux-ci sont ensuite noyés dans un cristalliseur rempli d'eau distillée pendant 48 heures, dans une enceinte réfrigérée. La pénétration de l'eau dans l'organisme dilate l'épiderme des escargots et facilite leur dissection. Pour cela, la coquille est éliminée, puis l'escargot fixé sur une plaque en polystyrène. La mise en évidence du tube digestif, permet à l'aide d'une seringue de 10ml d'aspirer son contenu.

Le suc digestif est débarrassé de ces impuretés par centrifugation à 800g. Le culot contenant les impuretés est éliminé, et le surnageant, récupéré pour être soit utilisé immédiatement, soit conservé à -20°C. Toutes ces opérations sont menées à + 40C.

3.- FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT AU SULFATE D'AMMONIUM (NH₄)₂SO₄ ET DIALYSE

Des concentrations en sulfate d'ammonium de 25, 40, 60 et 80% sont utilisées lors du fractionnement de l'extrait brut (6).

Fraction - 25% : 5ml de l'extrait brut subissent une précipitation par une concentration de sulfate d'ammonium à 25% de saturation en sulfate d'ammonium, suivie d'une centrifugation à 5400.g, durant 15mn à + 4°C.

Fraction - 40% : Le surnageant récupéré est ramené à 40% de saturation en sulfate d'ammonium puis centrifugé à 5400.g, durant 15 mn à + 4°C.

Fraction - 60% : Le surnageant récupéré est ramené à 60% de saturation en sulfate d'ammonium puis centrifugé à 5400.g, durant 15mn à + 4°C.

Fraction - 80% : Le surnageant récupéré est ramené à une saturation finale de 80% en sulfate d'ammonium puis centrifugé à 5400.g, durant 15 mn à + 4°C.

Les culots sont récupérés dans 2 ml de tampon citrate Phosphate 25mM, pH 5,6 et conservés à + 4°C.

Les fractions obtenues sont dialysées sur des membranes de Cellophane qui sont préalablement traitées comme suit :

- Plonger le boudin de dialyse dans une solution de Na₂CO₃ à 5% et chauffer à ébullition, durant 15 minutes.
- Rincer abondamment à l'eau distillée.
- Tremper celui-ci dans une solution d'EDTA 1%, tamponnée au tampon citrate-phosphate pH 5,6 (25mM), durant 15 mn.
- Laver abondamment à l'eau distillée.
- Conserver dans une solution d'EDTA 0,03%, tamponnée au tampon citrate phosphate pH5,6 (25mM).

Pour la dialyse, nous avons procédé comme suit :

- Déverser dans un boudin de dialyse fermé à une de ces deux extrémités le précipité protéique.
- Suspendre celui-ci dans un bécher de 250ml contenant de l'eau distillée comme liquide de contre dialyse et déposer le tout dans un cristalliseur rempli de glace Pilée.

Pour assurer une agitation convenable du liquide de contre dialyse, le tout est déposé sur un agitateur magnétique. La concentration d'ions diffusibles dans le liquide de contre dialyse est suivie grâce à un conductimètre.

4.- CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION MOLECULAIRE SUR GEL DE Séphadex-G-75

Le gel de Sephadex-G-75 (lg/7-8ml) est d'abord mis à gonfler pendant 24 heures à température ambiante dans de l'eau distillée stérile. Le gel est alors coulé avec précaution dans une colonne en verre (2/40cm).

La colonne de chromatographie n'est considérée comme prête à l'emploi qu'après équilibrage avec un volume du tampon citrate phosphate pH 5,6 (25mM), à raison de 4 à 5 fois son volume initial.

Le précipité protéique dialysé (2ml) est alors placé à l'intérieur de la colonne à l'aide d'une seringue en prenant soin de ne pas troubler la surface du gel, tout en évitant de laisser celui-ci à sec.

5.- ELECTROPHORESE TUBULAIRE (NATIVE) SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE A 10%

Le dispositif utilisé pour la réalisation de l'électrophorèse est un appareil tubulaire (Disc électrophorèse,). Le protocole suivi pour la réalisation d'une électrophorèse discontinue native à 10% est celui décrit par Perbal., 1991.

6.- PREPARATION DU SUBSTRAT ENZYMATIQUE (Extraction de la fraction glucane pariétale)

Afin de tester l'activité β -(1,3)-glucanolytique une extraction de la fraction glucane est réalisée de la paroi de *Saccharomyces cerevisiae* et purifiée selon le protocole de GRENIER et al., 1993 (9).

15 grammes de cellules de *Saccharomyces cerevisiae* récupérés par fermentation incubée à 75°C durant 6 heures sous agitation douce dans une solution de NaOH(3%). On laisse ensuite refroidir à température ambiante puis on centrifuge à 2100.g, durant 15mn.

Le culot récupéré subit 3 lavages au tampon phosphate sodium (pH6,5) et un lavage à l'eau distillée, il est alors incubé dans une solution d'acide acétique (3%) à 90°C, durant 4h sous une agitation douce. La solution est alors centrifugée à 2100.g, durant 15 mn. Le culot récupéré subit ce même, une nouvelle fois, puis 3 lavages dans le même tampon phosphate de sodium (pH 6,5) un lavage à l'eau distillée et enfin une centrifugation à 2100.g, durant 15mn. Le culot obtenu est alors conservé à +4°C ; il constitue la fraction-f enrichie en β -(1,3)-glucane qui va être utilisée comme substrat enzymatique.

7.- TEST D'ACTIVITE β -(1,3)-glucanalytique

Un volume de l'extrait de la paroi de levure enrichi en β -(1,3)-glucane est mis en contact avec le même volume respectivement du suc gastrique brut, des fractions protéiques 25,40,60 et 80% et des éluats de la chromatographie d'exclusion moléculaire. La réaction enzymatique est réalisée à 37°C à pH 5,6 durant 120mn.

Le dosage des protéines est effectuée selon la méthode de Lowry (1951), en utilisant la B.S.A. (Bovin, Sérum, Albumin) comme protéines standard. Pour le dosage du glucose, la méthode de Summiogyi -.Nelson (10) est utilisée. 039x4102YUne unité (U) d'activité

β -(1,3)-glucanalytique est défini comme étant la quantité d'enzymes qui permet de libérer 1 μ mole de glucose par minute dans les conditions de l'étude. L'activité spécifique (A.S) est définie comme le nombre d'unités rapportées à 1 mg de protéines.

8.- ETUDE DE PROTOPLASTISATION

La protoplastisation des levures est réalisée selon la méthode de DIATEWA et al., (1981) avec et sans prétraitement dont les étapes sont rapportées dans la figure 1 et 2.

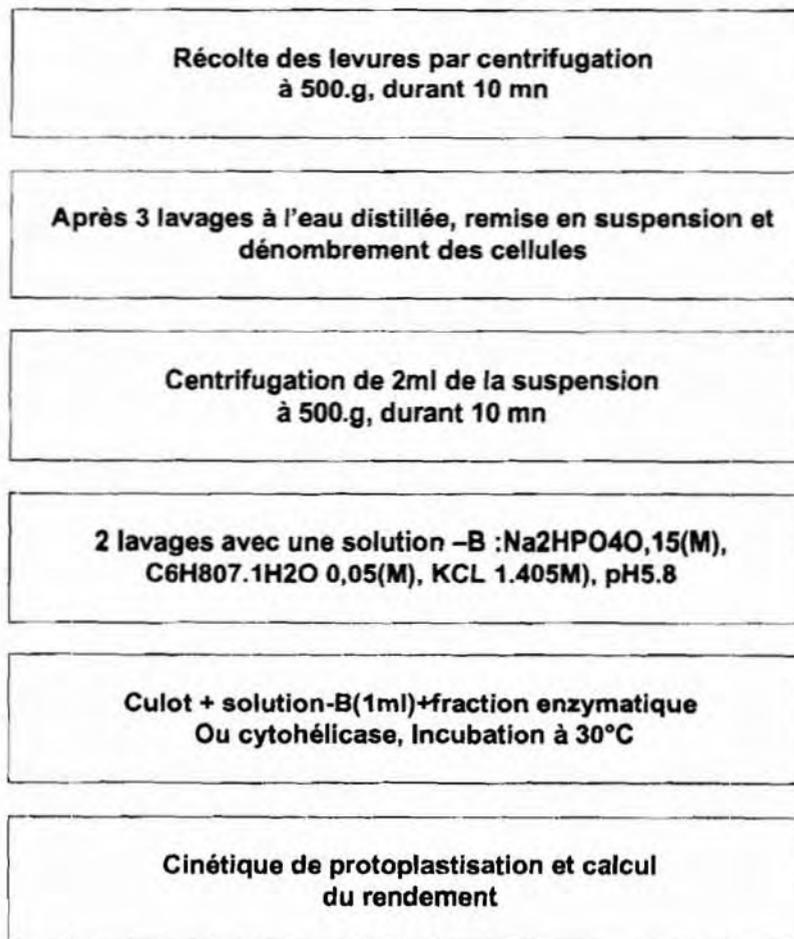


Figure 1 : Protoplastisation sans prétraitement

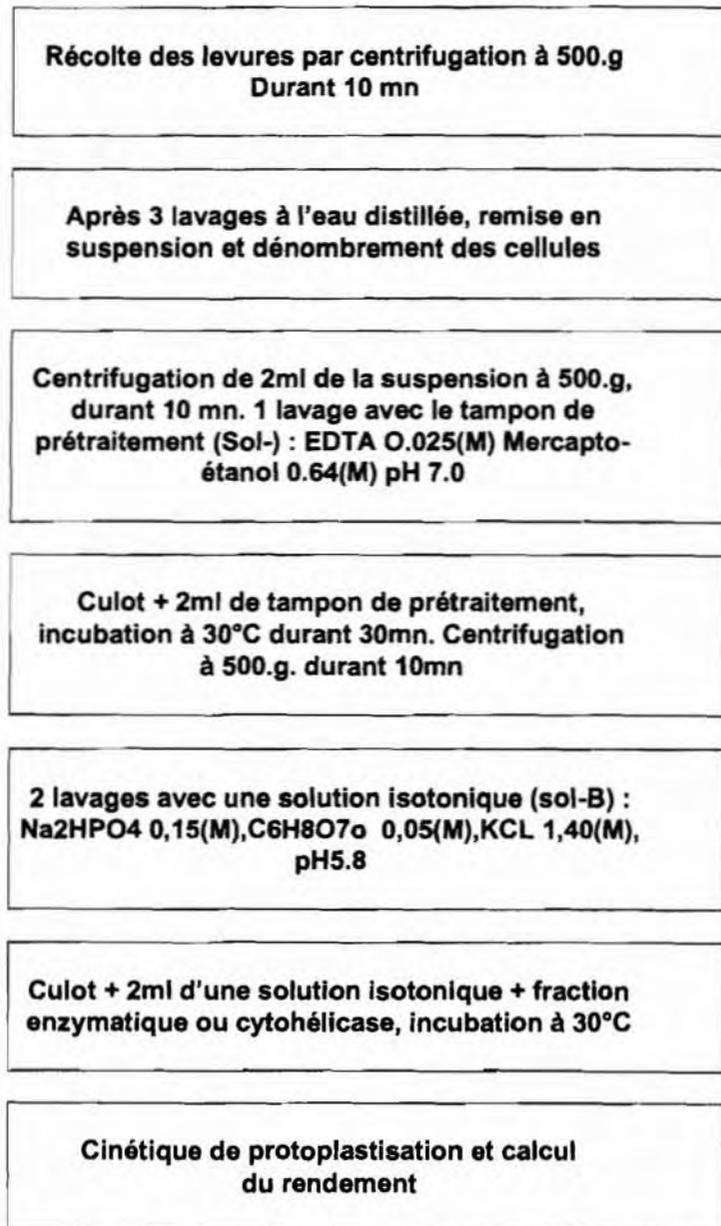


Figure 2 : Protoplastisation avec prétraitement

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Mesure de l'activité β -(1-3)-glucanolytique des fractions - 25,40,60 et 80% après dialyse

Les résultats des tests d'activité β -(1-3)-glucanolytique des fractions - 25, 40, 60 et 80% rapportés dans le tableau 1, indiquent que la fraction - 40% présente une meilleure activité spécifique (17 U/mg) vis-à-vis du substrat utilisé, soit un taux de 81% d'activité β -(1-3)-glucanolytique récupérée. Ceci prouve à priori que la majorité des β -(1-3)-glucanase recherchées précipitent dans la fourchette 25-40% de saturation en sulfate d'ammonium.

Tableau 1 : Résultats des tests d'activité des fractions – 25, 40, 60 et 80 dialysées

	P (mg)	Glu (mM)	(U) (μ mol/mn)	A.S. (U/mg)	R (%)
Suc brut	157.50	3.24	1350	8.60	/
Fr-25%	6.75	0.07	16.10	2.40	12.00
Fr-40%	19.60	3.60	330.00	17.00	81.00
Fr-60%	27.60	0.16	27.00	1.00	5.00
Fr-80%	13.80	0.04	7.00	0.50	2.00

P : Protéine,
 Glu : Glucose,
 (U) : Unité,
 (R) : Rendement,
 A.S. : Activité spécifique

En raison d'une importante activité spécifique de la fraction -40% et du taux de β -(1,3)-glucanases contenu dans celle-ci par rapport aux autres fractions, nous avons axé la purification sur la fraction -40%.

Chromatographie d'exclusion moléculaire sur gel de Sephadex-G-75

L'évolution chromatographique de la fraction -40% ainsi que l'extrait brut utilisé comme témoin montre deux spectres différents qui sont rapportés dans la figure 3.

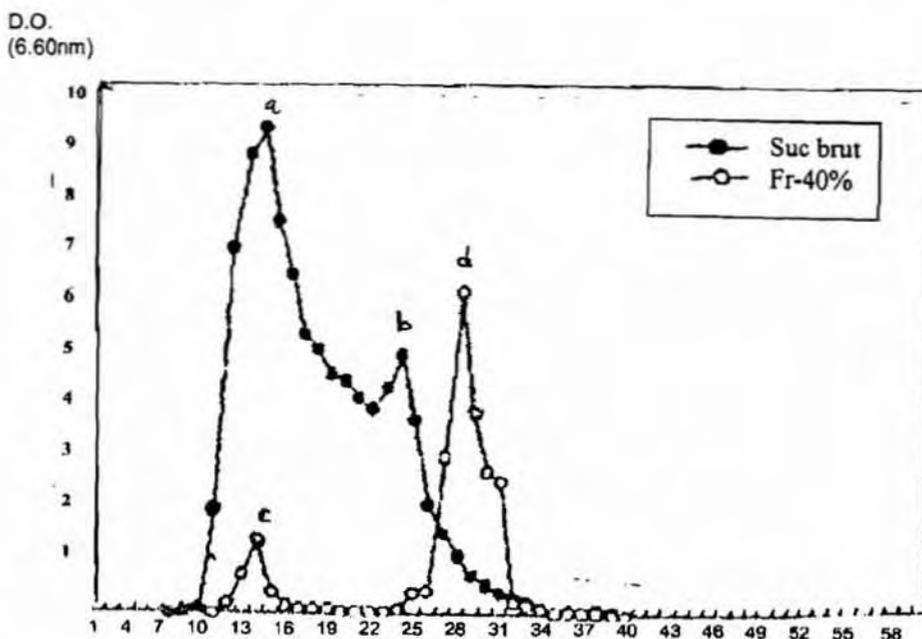


Figure 3 : Profil chromatographique du suc brut et de la fraction - 40%

E.brut

Ces spectre témoignent d'une composition enzymatique de la fraction – 40% différente de celle de l'extrait brut, en raison des précipitations réalisées au préalable et de l'éluion sur une colonne de chromatographie d'exclusion moléculaire.

Un nouveau test d'activité β -(1-3)-glucanalytique sur les éluats constituant le pic (c) et le pic (d). La représentation de l'activité spécifique (U/mg) en fonction des éluats récupérés (Figure 4) montre :

- que le pic (c) ne présenter aucune activité vis-à-vis du substrat utilisé,
- que le pic (d) possède une importante activité, prouvent que la majorité des enzymes recherchées ont été éluées dans cette fraction, c'est-à-dire entre l'éluats 25 et 31, d'où leur rassemblement dans une seule fraction dite « 25 –31 ».

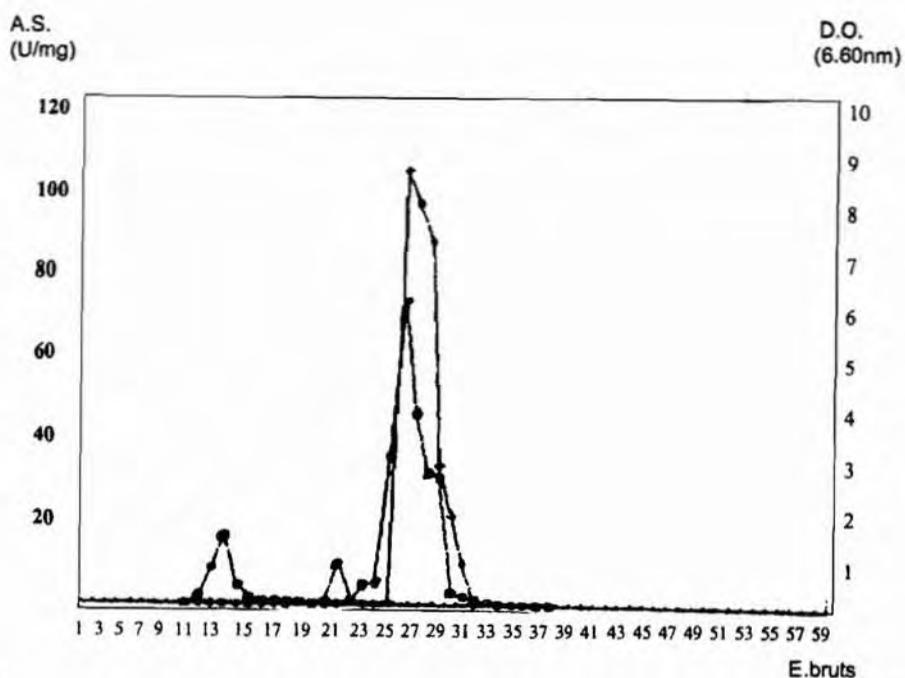


Figure 4 : Profil chromatographique de la fraction-40%

Cette fraction « 25-31 » présente une activité spécifique de 161U/mg alors que celle du suc brut est de 8.60U/mg seulement (Tableau 3), soit un facteur de purification de 19 et un rendement de 22%.

Tableau 3 : Résultats de la purification des β -(1,3)-glucanases

	P (mg)	(U) (μmol/mn)	A.S. (U/mg)	α^2	R (%)
Suc brut	157.50	13.50	8.60	-	100
Fr-40%	6.60	330.00	17.00	2.00	24.4
Fr-25-30%	1.85	297.50	161.0	19.00	22.0

α : Facteur de purification

R : Rendement

Electrophorèse (native) sur gel de polyacrylamide à 10%

Pour tester le degré de pureté des fractions obtenues, une électrophorèse tubulaire native sur gel de polyacrylamide à 10% a été réalisée sur le suc brut.

La figure 5 révèle trois importantes bandes (a, b et c) alors que la fraction – 40% avant et après la dialyse montrait deux bandes seulement au même niveau de migration que les bandes b et c.

La fraction « 25-31 » présente quant à elle une seule bande au même niveau de migration que la bande b est formée majoritairement d'une seule protéine, la β -(1-3)-glucanase.

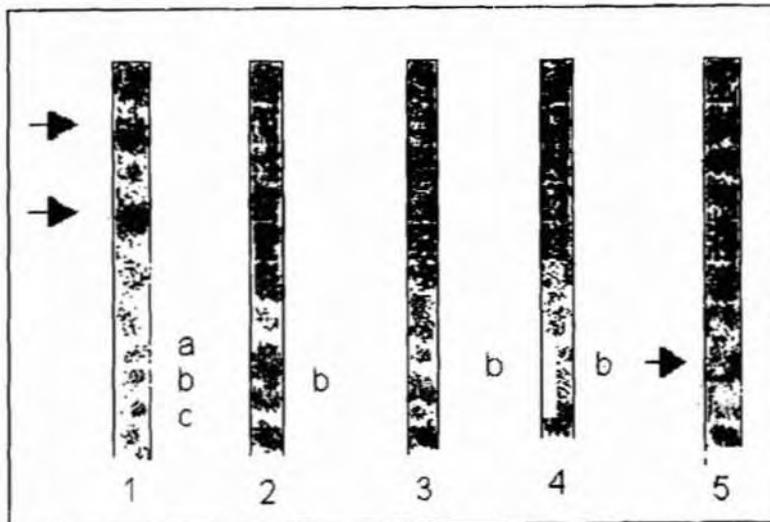


Figure 5 : Electrophorèse tubulaire sur gel de polyacrylamide à 10%

- 1 : Protéine standard (Caséine : 93 Bovine serum albumin : 66 KD).
- 2 : Suc brut d'*Helix pomatia*
- 3 : Fraction -40% obtenu après précipitation a u sulfate d'ammonium
- 4 : Fmetion-40% après dialyse.
- 5 : Fraction « 25-3 l »

II.- ACTIVITE PROTOPLASTISANTE DE LA FRACTION 25-31

L'activité et l'efficacité de la fraction « 25-31 » par rapport à la cytohélécasse commerciale a été testée dans une étude comparative de protoplastisation sur *Saccharomyces cerevisia*. Les résultats sont apportés dans la figure 6. Les taux de protoplastisation obtenus sans prétraitement des levures sont très faibles. Ils sont respectivement de 30 à 31% pour la fraction «25-31» et la cytohélécasse commerciale.

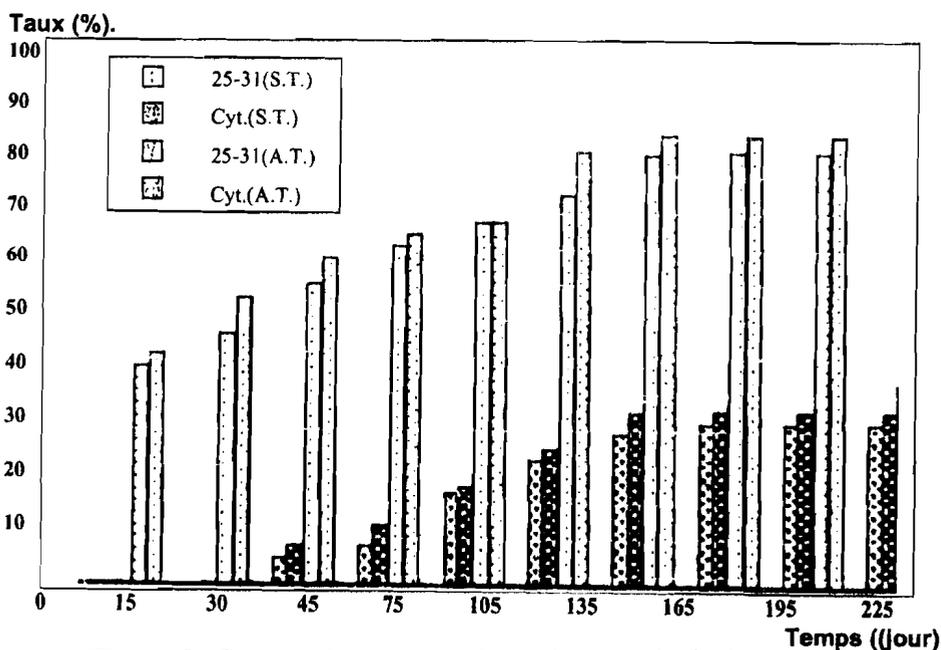


Figure 6 : Comparaison des rendements de protoplastes avec et sans prétraitement

Après un prétraitement des levures au mercaptoéthanol, les taux de protoplastisation sont passés respectivement à 80 et 83% avec un taux intermédiaire de 40% à 15 mn.

Ceux-ci prouvent l'efficacité protoplastisante de la fraction « 25-31 » par rapport à celle de la cytohélécasse commerciale par une composition enzymatique voisine.

Le prétraitement des levures au mercaptoéthanol puissant agent réducteur thiol, faciliterait l'accessibilité des β -(1,3)-glucanases aux polysaccharides de la paroi par élimination de la couche superficielle de mannoprotéines.

L'étude de l'influence du stade de croissance (Figure 7) montre que les taux de protoplastisation des populations jeunes (15 à 20h) sont beaucoup plus élevés que sur les populations âgées (30 à 48), ceci serait la différence de composition de la paroi, d'où l'importance de procéder en phase exponentielle de la croissance pour obtenir une bonne protoplastisation.

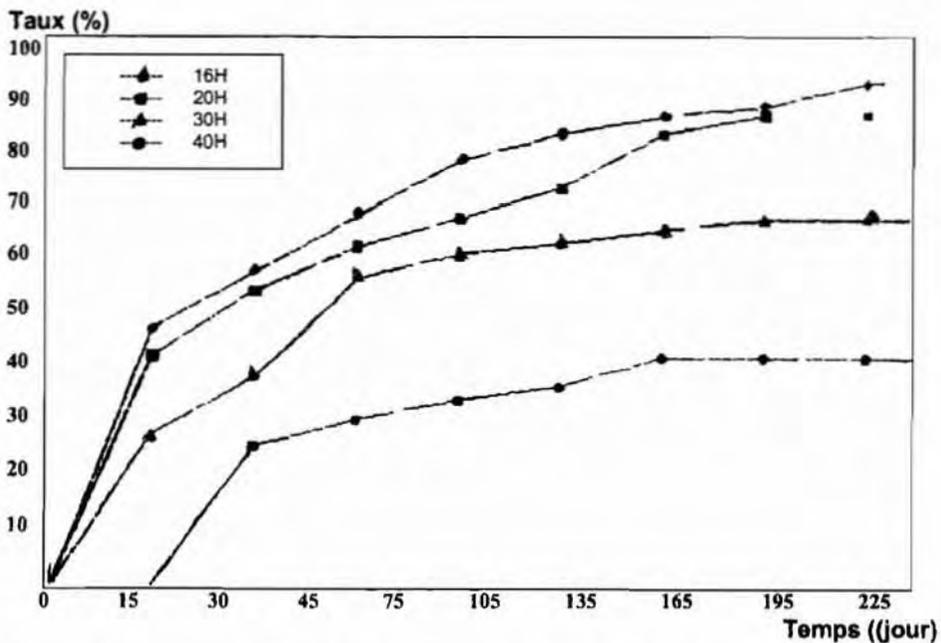


Figure 7 : Influence du stade de croissance sur le taux de protoplastisation

CONCLUSION

β -(1,3)-glucanases qui constituent majoritairement cette préparation enzymatique précipitent dans l'intervalle 25 - 40% de saturation en sulfate d'ammonium avec une activité spécifique de 17 U/mg soit un facteur de purification de 2 et un rendement de 24%. L'élution par chromatographie d'exclusion moléculaire sur gel de Sépliadex-G-75 de la fraction -40% donne une fraction dite «25-31» avec une activité spécifique de 161U/mg par rapport à celle du suc brut soit un facteur de purification de 19 est un rendement de 22%. Une étude comparative sur levure confirme l'activité protoplasmique de la fraction «25-31». Le taux d'activité de celle-ci est comparable à celui de la cytohélicase (80 et 83%), en présence d'agents réducteurs thiols comme le mercapto-éthanol.

L'optimisation de la protoplastisation est obtenue avec des cultures en exponentielle. Cette préparation enzymatique enrichie en glucanases à partir du suc digestif de l'escargot *Hélix pomatia* pourrait éventuellement concurrencer des préparations commerciales utilisées, obtenues dans la protoplastisation des microorganismes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BASTIDE M., HABIBI E., SCHEIBER D., MIEGEVILLE M., VERMEIL C., 1979.-** Annales de microbiologie, Vol. 130 A., N°4, pp 420-433, (4).
- BEAMONT A. et CASSIER P., 1983.-** Zoologie, Embryologie et Histologie animale, pp 201-231, (5).
- BENITHEZ T., LIMON C., JARANA J. D. and REY M., 1998.-** Trichoderma and Gliocladium. Vol. 2, pp 101-127, (3).
- GRENNIER J. and ASSELIN A., 1990.-** Molecular Plant Microbio Interactions, Vol.3, N° 6, pp. 401-40, (1).
- BIZEAU C. et BIZEAU E., 1971.-** J. of General Microbiology N° 223, pp 327-332, (11).
- GRENIER J. and ASSELIN A., 1993.-** Analytical Biochemistry N° 212, pp 301-302, (10).
- GRENIER J., POLVIN and ASSELIN A., 1993.-** Plant physiol. N°103 : pp 1277-1283, (9).
- KALTENBACH H. E., GROBKOOPF E., SANDERMAN JR and ERSNEST D.F., 1997.-** Plant molecular Biology N°33, pp 343-350, (2).
- MARSHALL J.J. and GRAND R.J.A., 1975.-** Archives of Biochemistry and Biophysics, N° 167 : pp 165-175, (6).
- PERBAL B., 1991.-** Clonage moléculaire ISBN 2-7114-1113-3, pp 10-50, (8).
- RENEE R.A., GRIFFITHS J.M., MICKINSON M.L., 1985.-** Basic Biochemical Methods : pp 10-18 ; 29-56, (7).