



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires

Ecole doctorale : **Ressources Procédés Produits Environnement**

THESE

présentée à l'INPL par

Fadi KHEDER

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires

**Production et purification d'acide férulique estérases.
Application à la synthèse d'esters phénoliques**

Soutenue publiquement le 25 octobre 2007 devant la commission d'examen

Rapporteurs : M. **Eric DUBREUCQ** : Professeur
M. **Pierre VILLENEUVE** : Chargé de Recherche (HDR)

Examineurs : M. **Armand GUCKERT** : Professeur
M. **Sylvain GUYOT** : Chargé de Recherche (HDR)
M. **Michel GIRARDIN** : Professeur (directeur de thèse)
M. **Stéphane DELAUNAY** : Maître de conférences (co-directeur de thèse)
M. **Lionel MUNIGLIA** : Maître de conférences (co-directeur de thèse, invité)

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires

Ecole doctorale : **Ressources Procédés Produits Environnement**

THESE

présentée à l'INPL par

Fadi KHEDER

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires

**Production et purification d'acide férulique estérases.
Application à la synthèse d'esters phénoliques**

Soutenue publiquement le 25 octobre 2007 devant la commission d'examen

Rapporteurs : M. **Eric DUBREUCQ** : Professeur
M. **Pierre VILLENEUVE** : Chargé de Recherche (HDR)

Examineurs : M. **Armand GUCKERT** : Professeur
M. **Sylvain GUYOT** : Chargé de Recherche (HDR)
M. **Michel GIRARDIN** : Professeur (directeur de thèse)
M. **Stéphane DELAUNAY** : Maître de conférences (co-directeur de thèse)
M. **Lionel MUNIGLIA** : Maître de conférences (co-directeur de thèse, invité)

Remerciements

J'exprime mes remerciements les plus sincères à Monsieur le Professeur Michel Girardin pour m'avoir donné la possibilité de réaliser ce travail ainsi que pour son encadrement et ses conseils. Je remercie également Messieurs Stéphane Delaunay et Lionel Muniglia, Maîtres de Conférence à l'ENSAIA, pour leur amitié et pour avoir suivi et co-dirigé cette thèse.

Je remercie Monsieur Eric Dubreucq, Professeur à l'Université de Montpellier et Monsieur Pierre Villeneuve, Chargé de Recherche au CIRAD de Montpellier, qui ont accepté de juger ce travail de thèse en qualité de rapporteurs. Je remercie également Messieurs Sylvain Guyot, Chargé de Recherche à l'INRA et Armand Guckert, Professeur à l'ENSAIA, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tiens à exprimer mes plus sincères remerciements à mon frère Ghassan Abo Chameh, qui a participé à la réalisation de ce travail de thèse en qualité d'étudiant en Mastère, pour son soutien, sa disponibilité, ses idées et ses conseils contribuant toujours à enrichir cette recherche.

Je remercie également Mesdames Catherine Humeau et Bernadette Piffaut ainsi que Monsieur Bernard Rovel (Maîtres de Conférence) et surtout Marie-Noëlle Stutzmann (adjoint technique) et tous les autres membres du Laboratoire Biocatalyse Bioprocédés à l'ENSAIA pour leur amitié, leur encouragement et leur soutien au cours de ces années.

Je remercie tout particulièrement le gouvernement syrien d'avoir financé ces travaux de thèse ainsi que mes Professeurs à la Faculté des Sciences à Damas notamment Madame le Professeur Haifa Al-Azmeh.

Finalement, je tiens à remercier ma famille ainsi que tous mes amis en France et en Syrie pour leur amitié et leur encouragement sans limite.

SOMMAIRE GENERAL

Introduction.....	1
--------------------------	----------

Chapitre 1. Synthèse bibliographique

I. Rôle naturel des acide férulique estérases.....	3
II. Les acide férulique estérases.....	17
III. Les <i>Streptomyces</i>	39
IV. Synthèse d'esters par voie enzymatique : une utilisation récente des acide férulique estérases.....	43

Objectifs de l'étude.....	55
----------------------------------	-----------

Chapitre 2. Matériels et méthodes

I. Sources d'acide férulique estérases.....	57
II. Produits chimiques.....	58
III. Composition et préparation des milieux de culture.....	60
IV. Conditions de culture.....	62
V. Mesure de l'activité acide férulique estérase.....	66
VI. Protocole de purification des acide férulique estérases.....	68
VII. Méthodes analytiques.....	72
VIII. Protocoles des synthèses enzymatiques.....	80

Chapitre 3. Production et purification partielle de l'acide férulique estérase de *S. ambofaciens* ATCC 23877

I. Choix des conditions d'induction de la synthèse d'acide férulique estérase par <i>S. ambofaciens</i> ATCC 23877.....	82
II. Production de l'acide férulique estérase par <i>S. ambofaciens</i> ATCC 23877.....	111

Chapitre 4. Purification partielle de l'acide férulique estérase de *Humicola* sp.

I. Détection de l'activité acide férulique estérase dans le Depol TM 740L.....	121
II. Purification partielle de l'acide férulique estérase présente dans le Depol TM 740L.....	122

Chapitre 5. Caractérisation partielle des acide férulique estérases

1. Influence de l'acide férulique sur l'activité acide férulique estérase de *S. ambofaciens* ATCC 23877..... 131
2. Effet du pH et de la température..... 132
3. Spécificité de substrat des acide férulique estérases..... 134

Chapitre 6. Utilisation des acide férulique estérases en synthèse

- I. Utilisation de l'acide férulique estérase de *S. ambofaciens* ATCC 23877 en synthèse..... 139
- II. Utilisation de l'acide férulique estérase de *Humicola* sp. en synthèse..... 140

Conclusions et perspectives 157

Annexe..... 162

Références bibliographiques..... 164

Abréviations

ABC :	acide bicinchoninique
AF :	acide férulique
AFE :	acide férulique estérase
ASB :	albumine sérique bovine
CEA :	chromatographie échangeuse d'anions
CEC :	chromatographie échangeuse de cations
CEI :	chromatographie échangeuse d'ions
CIH :	chromatographie d'interactions hydrophobes
CLHP :	chromatographie liquide à haute performance
DMF :	N,N-diméthylformamide
DX :	dextrines blanches
FE :	férulate d'éthyle
FM :	férulate de méthyle
GL :	glucose
kDa :	kilo Dalton
M ₂ B ₂ :	2-méthylbutan-2-ol
MOPS :	3-(N-morpholino)propanesulfonique
PB :	pectine de betterave
rpm :	rotation par minute
SA :	sulfate d'ammonium
SB :	son de blé désamidonné
SDS-PAGE :	sodium dodécyle sulfate- électrophorèse sur gel de polyacrylamide
SM :	son de maïs désamidonné
TC :	tourteau de colza
TEMED :	(N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine)
TFA :	acide trifluoroacétique
Tris :	Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane
U :	unité enzymatique
UV :	ultraviolet
XA :	xylane d'avoine

Introduction

Introduction

La paroi cellulaire végétale est une des sources d'énergie renouvelable les plus abondantes sur la terre (Crepin *et al.*, 2003b). Elle est constituée d'un mélange de polymères hétérogènes comprenant la cellulose, la lignine, les hémicelluloses et les pectines. Des composés phénoliques, tels que les acides hydroxycinnamiques (par exemple, l'acide férulique, l'acide caféique, l'acide *p*-coumarique) sont également liés à ces polysaccharides par des liaisons esters (Kroon *et al.*, 2000). Un de leurs rôles est probablement de diminuer la biodégradabilité de la paroi par les micro-organismes (Mastihuba *et al.*, 2002).

Aussi, pour obtenir une dégradation complète de la paroi végétale les micro-organismes emploient une batterie d'enzymes spécifiques dont notamment les acide férulique estérases (AFE). Ces enzymes hydrolysent les liaisons esters formées entre les acides hydroxycinnamiques, surtout l'acide férulique, et les résidus d'arabinose ou de galactose des polysaccharides.

Au cours des dernières années, plusieurs AFE ont été identifiés chez une grande variété de champignons et à un degré moindre chez les bactéries.

Aujourd'hui, les AFE trouvent plusieurs domaines d'applications industrielles notamment pour la production d'acides hydroxycinnamiques à partir des déchets agroalimentaires. Ces acides phénoliques, en particulier l'acide férulique, sont connus pour leurs propriétés intéressantes et tout particulièrement pour leur pouvoir antioxydant. Cependant, leur faible solubilité en phase grasse limite leur utilisation dans les produits alimentaires lipidiques (pour la stabilisation d'acides gras par exemple). La meilleure solution pour effacer ce désavantage est de modifier la structure de ces composés via l'estérification par des alcools aliphatiques conduisant à la formation de dérivés plus lipophiles (Stamatis *et al.*, 2001).

Généralement, les lipases sont très utilisées pour ce type de transformation mais elles sont, la plupart du temps, incapables de catalyser l'estérification lorsque le donneur d'acyle aromatique possède une fonction donneuse d'électron conjuguée à la fonction

carboxylique, c'est le cas de certains acides phénoliques substitués tels que l'acide férulique et l'acide caféique (Guyot *et al.*, 1997 ; Stamatis *et al.*, 1999 ; Enaud, 2004). Aussi, une des solutions pour synthétiser des esters d'acides cinnamiques serait certainement de faire appel à des enzymes plus spécifiques que les lipases à savoir les AFE.

C'est ainsi que le potentiel synthétique de ces biocatalyseurs en milieu hydro-organique attire actuellement l'attention d'un grand nombre de chercheurs et notamment ceux de notre laboratoire. Toutefois, cette approche est rendue difficile par la faible disponibilité commerciale des ces enzymes.

Ce travail de thèse a donc été entrepris dans le but d'une part de mettre au point la production d'AFE par des micro-organismes notamment des bactéries et d'autre part de comparer ses propriétés catalytiques avec celles d'une AFE de champignon purifiée à partir d'un mélange enzymatique industriel.

CHAPITRE 1

Synthèse bibliographique

SOMMAIRE

<u>I. Rôle naturel des acide férulique estérases.....</u>	3
I.1. Présentation de la paroi cellulaire végétale.....	3
I.1.1. Polysaccharides de la paroi végétale.....	3
I.1.2. Composés phénoliques de la paroi végétale.....	5
I.1.3. Propriétés de l'acide férulique.....	7
I.2. Biodégradation de la paroi végétale.....	8
I.2.1. Les enzymes de dégradation de la cellulose.....	10
I.2.2. Les enzymes de dégradation des hémicelluloses.....	11
I.2.3. Les enzymes de dégradation des pectines.....	13
I.2.4. Les enzymes dégradant la lignine.....	13
I.3. Synergie entre les enzymes dégradant la paroi végétale.....	13
I.3.1. Synergie entre les enzymes dégradant le xylane.....	14
I.3.2. Synergie entre les acide férulique estérases et les xylanases.....	14
I.3.3. Synergie entre les enzymes dégradant les pectines.....	16
<u>II. Les acide férulique estérases.....</u>	17
II.1. Distribution des acide férulique estérases.....	18
II.2. Propriétés des acide férulique estérases.....	18
II.3. Spécificité de substrat.....	21
II.4. Classement des acide férulique estérases.....	22
II.5. Gènes codant pour les acide férulique estérases.....	24
II.5.1. Chez les champignons.....	24
II.5.2. Chez les bactéries.....	25
II.5.3. Biosynthèse d'acide férulique estérases par des systèmes d'expression hétérologues.....	26
II.6. Structure et mécanisme catalytique des acide férulique estérases.....	26
II.6.1. Comparaison entre les acide férulique estérases de champignons et les lipases.....	29
II.6.2. Comparaison entre les acide férulique estérases bactériennes et celles de champignons.....	30

II.7. Mécanismes d'induction.....	30
II.7.1. Induction des acide férulique estérases chez les Eucaryotes.....	31
II.7.2. Induction des acide férulique estérases chez les Procaryotes.....	33
II.7.3. Régulation de l'expression du gène <i>cinB</i> chez <i>B. fibrisolvens</i> E14...	34
II.8. Purification des acide férulique estérases.....	35
II.9. Applications des acide férulique estérases.....	38
 <u>III. Les <i>Streptomyces</i></u>	 39
III.1. Généralités.....	39
III.2. Cycle de développement des <i>Streptomyces</i>.....	40
III.2.1. La croissance en milieu solide.....	40
III.2.2. La croissance en milieu liquide.....	41
III.3. Les <i>Streptomyces</i> : une source importante d'enzymes.....	41
 <u>IV. Synthèse d'esters par voie enzymatique : une utilisation récente des acide férulique estérases.....</u>	 43
IV.1. Estérification chimique et estérification enzymatique.....	43
IV.1.1. Estérification chimique.....	43
IV.1.2. Estérification enzymatique.....	43
IV.2. Enzymes catalysant l'estérification.....	44
IV.3. Facteurs influençant les réactions de synthèse.....	45
IV.3.1. Effet du milieu réactionnel.....	45
IV.3.2. Nature de l'enzyme.....	47
IV.3.3. L'activité thermodynamique de l'eau.....	47
IV.3.4. Effet de la nature des substrats.....	48
IV.4. Les acide férulique estérases en synthèse.....	49
IV.4.1. Systèmes de micro-émulsions.....	50
IV.4.2. Synthèse d'esters de sucre et d'acide phénolique.....	51
IV.5. Acylation des flavonoïdes.....	52
IV.5.1. Les flavonoïdes acylées.....	52
IV.5.2. Solubilité des flavonoïdes.....	53
IV.5.3. Stabilité des flavonoïdes.....	53
IV.5.4. Les acide férulique estérases : une alternative pour l'acylation des flavonoïdes.....	54

I. Rôle naturel des acide férulique estérases

Les acide férulique estérases (AFE) appartiennent à la famille des hydrolases qui sont impliquées dans la dégradation de la paroi cellulaire végétale. Elles permettent l'hydrolyse de liaisons esters entre les acides hydroxycinnamiques, notamment l'acide férulique (AF), et des polysaccharides de cette paroi. L'intervention de ces enzymes avec d'autres hydrolases entraîne une dégradation complète des polysaccharides de la paroi végétale.

I.1. Présentation de la paroi cellulaire végétale

La cellule végétale possède une paroi rigide entourant la membrane cytoplasmique. Cette paroi, ayant une structure très complexe, a plusieurs fonctions. Sa rigidité, par exemple, rend la cellule végétale peu flexible au contraire de la cellule animale qui ne possède pas ce type de structure ce qui permet une flexibilité importante et nécessaire pour la locomotion. La paroi cellulaire végétale joue par ailleurs un rôle essentiel dans le mécanisme de protection contre les pathogènes. Ses constituants principaux sont les polysaccharides. D'autres molécules, telles que des composés phénoliques et des protéines, sont également présentes.

I.1.1. Polysaccharides de la paroi végétale

Les polysaccharides de la paroi cellulaire végétale sont les composées organiques les plus abondants trouvés dans la nature. Ils peuvent être divisés en trois groupes principaux : la cellulose, les hémicelluloses et les pectines.

I.1.1.1. La cellulose

La cellulose représente le constituant majeur des polysaccharides de la paroi végétale. Elle est formée de résidus de D-glucose liés par des liaisons β -1,4-glycosidiques constituant un polymère linéaire de plus de 10 000 unités de glucose. Le rôle principal de la cellulose est d'assurer la rigidité de la paroi végétale.

1.1.1.2. Les hémicelluloses

Les hémicelluloses sont des polysaccharides hétérogènes possédant une structure plus complexe que celle de la cellulose. Les hémicelluloses se composent d'une chaîne principale de polysaccharides à laquelle plusieurs chaînes latérales sont attachées. Les hémicelluloses sont nommées selon la nature des résidus sucre de leur chaîne principale. Le xylane, β -1,4-D-xylose, est le polymère majeur des hémicelluloses qui se trouvent dans les céréales et le bois dur. Il peut être substitué avec différents groupements latéraux tels que le L-arabinose, le D-galactose, les résidus d'acide acétique, d'acide férulique, d'acide *p*-coumarique et d'acide glucuronique (Wilkie et Woo, 1977).

Un autre polymère d'hémicellulose rencontré généralement dans les parois cellulaires végétales est le glucomannane qui se compose d'unités de β -1,4-mannose et β -1,4-glucose avec des groupements de galactose attachés latéralement à la chaîne principale du polysaccharide.

Les hémicelluloses sont liées d'une part aux pectines et d'autre part à la lignine dans la paroi végétale. Des liaisons covalentes, de type ester ou éther, entre l'hémicellulose et la lignine créent des structures sucre-lignine très complexes. L'hydrolyse de ces liaisons peut donc être nécessaire et importante pour la dégradation préférentielle de la lignine par les micro-organismes.

1.1.1.3. Les pectines

Les pectines forment un autre groupe de polysaccharides hétérogènes. La chaîne principale des pectines est constituée de résidus d'acide galacturonique liés en α -1,4. Dans la nature, la fonction acide de ces résidus peut être soit sous forme libre soit sous forme estérifiée par un groupement méthyle le plus souvent. Cependant, dans des régions spécifiques de la pectine, cette chaîne principale d'acide galacturonique est interrompue par des résidus d' α -1,2-rhamnose. De longues chaînes latérales de L-arabinose et de D-galactose peuvent être reliées à ces unités de rhamnose. Les résidus terminaux liés au galactose ou à l'arabinose peuvent être différents selon l'origine de la pectine. Approximativement, 20 à 30% des résidus d'acide férulique sont liés à la chaîne latérale d'arabinose dans les pectines des betteraves. Par contre, le reste de ces résidus est lié à la chaîne de galactose (Guillon et Thibault, 1989).

Les polysaccharides d'hémicellulose et de pectine et le polymère aromatique de lignine interagissent avec la cellulose produisant une structure rigide qui renforce la paroi cellulaire végétale (**Fig. 1**). Des liaisons covalentes sont, d'autre part, formées entre ces macromolécules. Les acides phénoliques sont un bon exemple de molécules impliquées dans ce type de liaison.

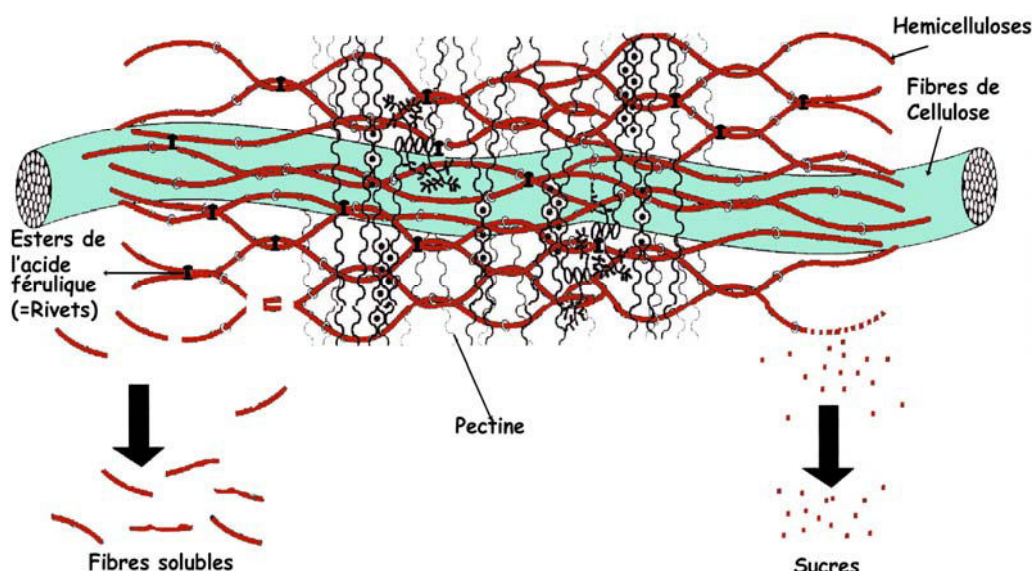


Fig. 1. Schéma de la structure de la paroi cellulaire végétale et de son hydrolyse.

I.1.2. Composés phénoliques de la paroi végétale

L'acide férulique [3-(4-hydroxy-3-méthoxyphényl)-2-acide propénoïque ou 4-hydroxy-3-méthoxy acide cinnamique] est l'acide phénolique principal trouvé sous forme d'ester de polysaccharide dans la paroi cellulaire végétale (Donaghy *et al.*, 1998). Parmi les autres acides cinnamiques rencontrés dans la paroi végétale nous pouvons citer l'acide sinapique, l'acide caféique et l'acide *p*-coumarique.

L'acide férulique est lié aux polysaccharides de la paroi cellulaire végétale par plusieurs types de liaisons esters (Thibault *et al.*, 1998 ; Kroon *et al.*, 2000 ; Mastihubova *et al.*, 2003) :

- **1,2** avec les résidus de l'arabinofuranose ou **1,6** avec les résidus de galactopyranose dans la pulpe de betterave à sucre (**Fig. 2a,b**),
- **1,5** avec les résidus de l'arabinofuranose dans les arabinoxylanes du son de blé et du maïs (**Fig. 2c**).

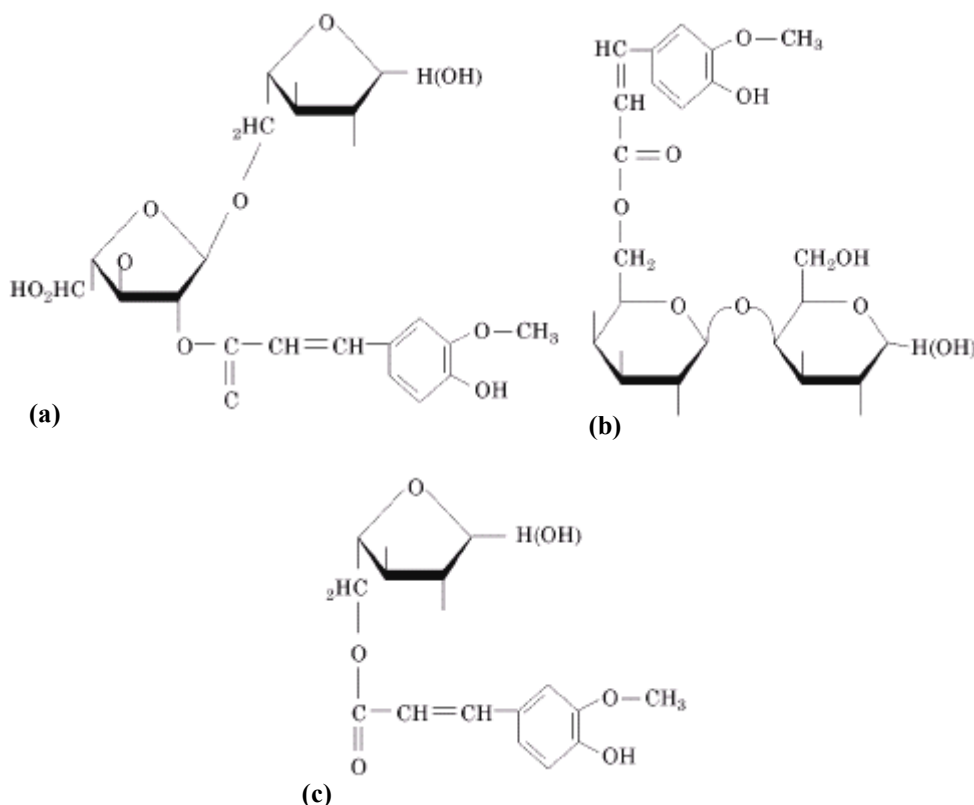


Fig. 2. Structures de trois oligosaccharides féruloylés montrant les liaisons esters **1,2** et **1,6** de l'acide férulique avec l'arabinose (**a**) et avec le galactose (**b**), respectivement, dans la pulpe de betterave à sucre, ainsi que les liaisons esters **1,5** entre l'acide férulique et l'arabinose dans le son du blé (**c**) (Thibault *et al.*, 1998).

Des liaisons éthers peuvent également associer ces acides phénoliques avec la lignine (McSweeney *et al.*, 1999). De plus, des ponts d'acide di-férulique entre les polysaccharides et la lignine sont rencontrés chez de nombreuses plantes. Ils peuvent être formés entre les pectines chez les betteraves à sucre (Oosterveldt *et al.*, 1997) ou entre la lignine et le xylane dans le blé (Lam *et al.*, 1992).

I.1.3. Propriétés de l'acide férulique

L'acide férulique est lié à l'hémicellulose et à la pectine de la paroi végétale (Fig. 2). Il est capable d'associer les chaînes de polysaccharides les unes avec les autres ou avec la lignine (Lam *et al.*, 1994 ; Ishii, 1997) entraînant une augmentation de la rigidité de la paroi végétale. Cette structure complexe permet une résistance particulière de la paroi contre sa dégradation par les micro-organismes. Une limite de cette dégradation enzymatique de l'arabinoxylane lié à l'acide férulique a déjà été observée par Grabber *et al.*, 1998. Ces auteurs ont indiqué qu'une réduction de la féruloylation d'arabinoxylane était susceptible d'améliorer l'hydrolyse enzymatique de la paroi lignocellulosique végétale.

De plus, la propriété anti-microbienne des composants phénoliques de la paroi végétale peut être un moyen de défense supplémentaire contre les pathogènes (Aziz *et al.*, 1998).

L'acide férulique forme facilement un radical phénoxy stabilisé par résonance grâce à son noyau phénolique et à sa chaîne latérale conjuguée (Fig. 3) ce qui lui donne des propriétés antioxydantes importantes (Graf, 1992). Il pourrait donc préserver l'intégrité physiologique de la cellule exposée à l'air ainsi qu'aux radiations UV.

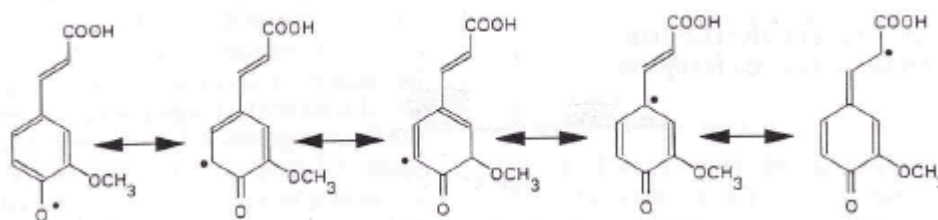


Fig. 3. Stabilisation du radical de l'acide férulique par résonance (Graf, 1992).

Ces propriétés antioxydantes expliquent l'incorporation de l'acide férulique dans des lotions cosmétiques destinées à être appliquées sur la peau (Graf, 1992). L'acide férulique joue de plus un rôle intéressant dans l'industrie alimentaire, surtout dans des procédés à base d'huile où il inhibe la peroxydation des lipides. Par le même mécanisme, l'acide férulique protégerait aussi de l'athérosclérose, de l'hypercholestérolémie, de certains cancers et des maladies cardio-vasculaires (Graf,

1992). Par ailleurs, le férulate d'éthyle, l'ester éthylique de l'acide férulique, protège les neurones de certaines molécules neurotoxiques (Sultana *et al.*, 2005). Un assez grand nombre d'autres applications industrielles basées sur le potentiel antioxydant de l'acide férulique sont actuellement envisagées.

I.2. Biodégradation de la paroi végétale

Parmi les composants de la paroi cellulaire végétale, la lignine, qui se trouve spécifiquement dans des tissus matures de la plante, est le plus difficile à dégrader, suivi par la cellulose, les hémicelluloses et les pectines (Williamson *et al.*, 1998). Ces dernières sont particulièrement abondantes dans les fruits qui sont fréquemment attaqués par les micro-organismes. La lignine et les polysaccharides des végétaux ont des structures complexes et organisées d'une façon leur permettant de résister à des attaques enzymatiques. L'attachement latéral aux chaînes principales des polysaccharides est le meilleur exemple de cette protection. Ce type d'attachement limite l'accès des enzymes aux chaînes principales des polysaccharides. L'enchaînement latéral joue aussi un rôle essentiel pour renforcer la résistance physique et l'intégrité de la paroi cellulaire en reliant les chaînes principales de polysaccharides les unes avec les autres.

Cependant, plusieurs micro-organismes sont capables de produire une large gamme d'hydrolases, appelées « enzymes accessoires », pour éliminer les chaînes latérales permettant ensuite l'accès aux autres enzymes hydrolytiques pour dégrader complètement les chaînes principales de polysaccharides. Les AFE, les acétyl estérases et les pectine méthyl estérases forment les trois groupes principaux de ces « enzymes accessoires ». Grâce à cet outil enzymatique, même les parois végétales les plus résistantes peuvent être hydrolysées (Williamson *et al.*, 1998).

Les différents sites d'action de ces enzymes, dégradant les chaînes latérales des polysaccharides de la paroi végétale, sont présentés dans les figures 4 et 5 qui montrent la structure de l'arabinoxylane de céréale et de la pectine de betterave à sucre.

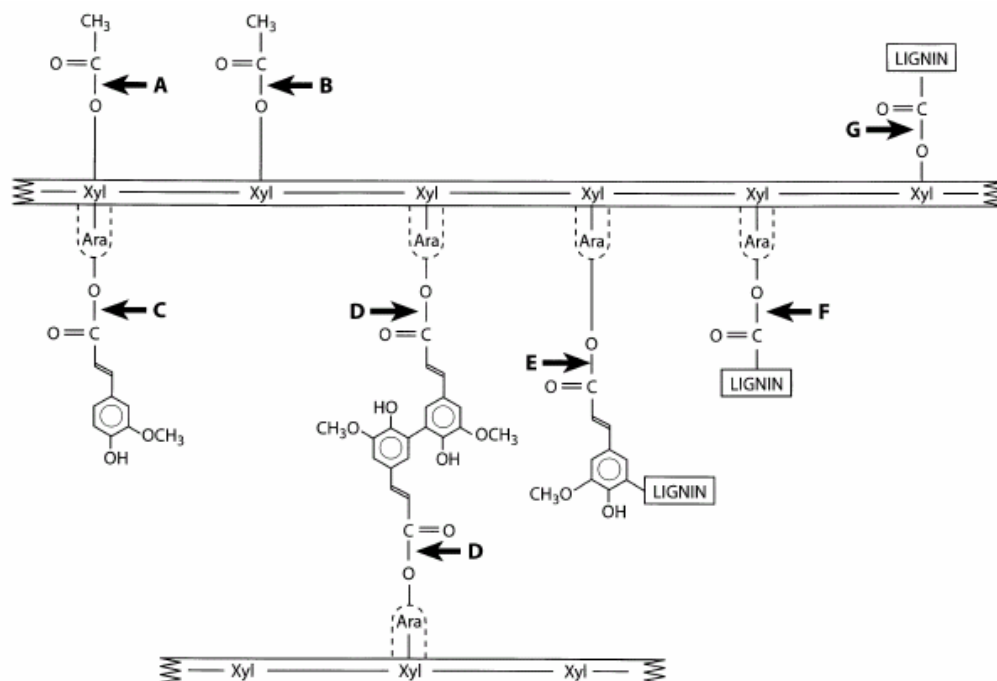


Fig. 4. Schéma simplifiée de la structure de l'arabinoxylane et de son hydrolyse enzymatique : les groupements 2-*O*-acétyle (**A**) et 3-*O*-acétyle (**B**) sont hydrolysés par des xylane acétylestérases ; les groupements 5-*O*-féruloyle (**C**) et 5-*O*-diféruloyle (**D**) sont hydrolysés par des AFE. Les groupements 5-*O*-féruloyle-lignine (**E**), arabinose-lignine (**F**) et xylose-lignine (**G**) sont des structures proposées pour lesquelles aucune estérase n'est encore rapportée comme étant capable de les hydrolyser. Ara et Xyl représentent, respectivement, l'arabinose et le xylopyranose, l'unité de la chaîne principale du xylane (Williamson *et al.*, 1998).

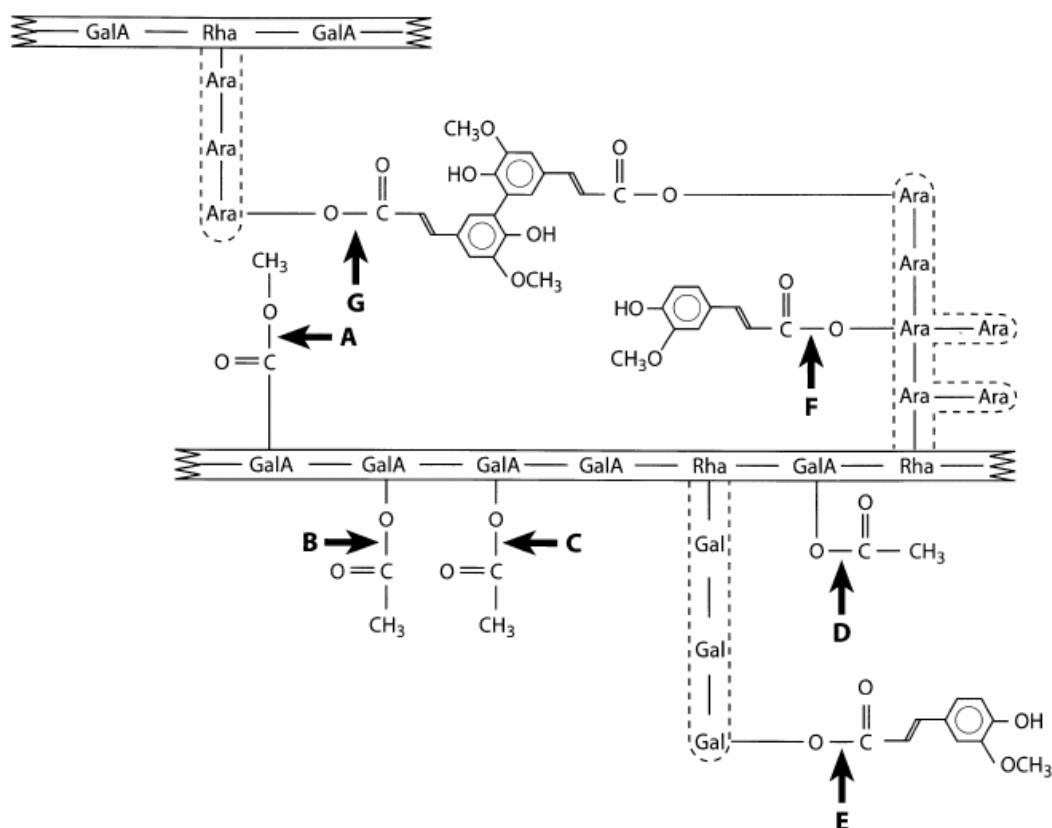


Fig. 5. Schéma simplifiée de la structure de la pectine de betterave à sucre et de son hydrolyse enzymatique : les groupements d'esters méthyliques (**A**) liés au C-6 de l'acide galacturonique sont hydrolysés par une pectine méthylestérase ; les groupements 2-*O*-acétyl (**B**) ou 3-*O*-acétyl (**C**) sont hydrolysés par une pectine acétylestérase et les groupements acétyl (**D**) dans les régions ramifiées sont hydrolysés par des rhamnogalacturonane acétylestérases. Les chaînes latérales de sucre (indiquées par des lignes pointillées) portent des groupements féruloyles (**E**) liés au C-6 du galactose ou des groupements féruloyles (**F**) ou diféruloyles (**G**) liés au C-2 de l'arabinose. Ces liaisons (**E-G**) sont hydrolysées par des AFE. Gal, GalA, Ara et Rha représentent le galactose, l'acide galacturonique, l'arabinose et le rhamnose, respectivement (Williamson *et al.*, 1998).

I.2.1. Les enzymes de dégradation de la cellulose

Les cellulases microbiennes ont été classées en plus de 60 familles selon leurs structures, leurs spécificités de substrat et leurs modes d'action. Les cellulases possèdent deux types d'activité, endo- et exo-glucanase. Cependant, certaines cellulases possèdent les deux types d'activité (Henrissat et Davies, 1997). Une synergie peut être observée en présence de ces deux types d'enzymes. Dans ce cas, l'activité enzymatique est plus forte que celle détectée pour chaque enzyme prise séparément.

Trois familles de cellulases sont principalement impliquées dans la dégradation de la cellulose. Les **endoglucanases** (E.C. 3.2.1.4) sont des enzymes qui hydrolysent les régions amorphes de la cellulose. Par contre, les **cellobiohydrolases** (E.C. 3.2.1.91) sont des enzymes exo- qui coupent la chaîne de cellulose en cellobiose à partir de son extrémité non réductrice. Ce dernier est dégradé ensuite avec d'autres petits oligosaccharides solubles par les **β -glucosidases** (E.C. 3.2.1.21). Les endoglucanases créent par leur action de nouveaux sites de reconnaissance pour les cellobiohydrolases, ce qui explique la synergie entre ces enzymes.

Souvent, une dégradation enzymatique efficace des polysaccharides insolubles exige une forte interaction entre les enzymes et leurs substrats. Dans le cas de la dégradation de la cellulose, plusieurs cellulases sont connues pour leur capacité à s'associer avec la cellulose cristalline et/ou amorphe via des domaines spécifiques de fixation qui sont différents des domaines catalytiques (Ohmiya *et al.*, 1997). Les cellulases peuvent trouver plusieurs applications dans l'industrie textile, l'industrie des détergents et la papeterie (Cao et Tan, 2002 ; Cherry et Fidantsef, 2003). Dans le futur, le marché des cellulases est susceptible de devenir encore plus important en raison de la conversion des biomatériaux cellulosiques en éthanol-carburant.

I.2.2. Les enzymes de dégradation des hémicelluloses

La dégradation enzymatique des hémicelluloses nécessite l'intervention de différentes hydrolases en raison de la structure complexe de ces hémicelluloses. Leur hydrolyse a lieu à la suite de l'action d'enzymes de type endo- libérant de petits fragments d'oligosaccharides substitués. Ces derniers sont ensuite dégradés par les enzymes clivant les chaînes latérales et les enzymes de type exo-. Cependant, les chaînes latérales peuvent être coupées avant la dégradation de la chaîne principale libérant ainsi des monomères de sucres qui peuvent être utilisés par les micro-organismes comme source de carbone.

Parmi les hémicellulases principales nous pouvons citer les **endo-1,4- β -D-xylanases** (E.C. 3.2.1.8), et les **endo-1,4- β -D-mannanases** (E.C. 3.2.1.78). Les xylanases sont probablement les hémicellulases les plus étudiées, surtout chez les champignons, en raison de leur large domaine d'applications biotechnologiques et industrielles telles que la papeterie et les industries alimentaires (Viikari *et al.*, 1994 ;

Subramaniyan et Prema, 2002). Les xylanases peuvent, par exemple, améliorer les propriétés et les qualités des pâtes à pain par l'hydrolyse de leurs polysaccharides (Li *et al.*, 2000 ; Bhat, 2000). Elles sont également utilisées dans des procédés de liquéfaction pour les jus de fruits, d'extraction des huiles végétales et très récemment dans la conversion de déchets d'agriculture en éthanol-carburant (Eriksson *et al.*, 2002 ; Sorensen *et al.*, 2003 ; Damaso *et al.*, 2003).

L'hydrolyse enzymatique du xylane en xylose est catalysée par les xylanases et les **β -xylosidases** (E.C. 3.2.1.37). Les premières dégradent, d'une manière aléatoire, le xylane en des xylooligomères qui sont ensuite hydrolysés par les β -xylosidases en xylose. En revanche, les groupements des chaînes latérales sont libérés par d'autres enzymes telles que l' α -L-arabinofuranosidase, l' α -D-glucuronidase, l' α -galactosidase et l'acétylxylane estérase (Subramaniyan et Prema, 2002).

Les acide férulique estérases (AFE) font aussi partie du système d'enzymes xylanolytiques. Elles appartiennent à la famille des acide phénolique estérases clivant les liaisons esters formées entre les acides phénoliques et les chaînes latérales des polysaccharides de la paroi cellulaire végétale. Ces enzymes sont actuellement largement étudiés en raison de leurs nombreuses applications potentielles agroalimentaires et médicales. On peut citer, par exemple, l'amélioration de l'étape de filtration des sirops de glucose issus du blé, la production de vanilline et la production d'acide férulique pour son utilisation potentielle en tant que composé anti-cancéreux ou antioxydant (Michelsen *et al.*, 2000 ; Kikuzaki *et al.*, 2002). De plus, les AFE sont depuis très récemment utilisées comme catalyseurs de synthèse d'esters phénoliques (Giuliani *et al.*, 2001 ; Topakas *et al.*, 2003b).

La dégradation complète du glucomannane, une autre hémicellulose, exige également l'action de plusieurs enzymes. La **mannanase** (E.C. 3.2.1.78) hydrolyse aléatoirement les liaisons 1,4- β -D-mannopyranosyles des chaînes du glucomannane et du galactoglucomannane en libérant des oligomères qui sont ensuite dégradés par d'autres activités enzymatiques telles que la **β -mannosidase** (E.C. 3.2.1.25) et la **β -glucosidase** (E.C. 3.2.1.21).

I.2.3. Les enzymes de dégradation des pectines

Les pectinases forment une catégorie d'enzymes [**polygalacturonases** (E.C 3.2.1.15 et E.C 3.2.1.67), **pectine lyases** (E.C 4.2.2.10) et **pectate lyases** (E.C 4.2.2.2)] qui coupent les liaisons glycosidiques des résidus d'acide galacturonique dans les matériaux pectiques. D'autres enzymes, telles que les rhamnogalacturonane hydrolases et les rhamnogalacturonane lyases, sont impliquées dans la dégradation des régions ramifiées des pectines. Les pectinases ont actuellement plusieurs domaines d'applications notamment dans les procédés de clarification des jus de fruits.

I.2.4. Les enzymes dégradant la lignine

En plus des hydrolases précédemment présentées, d'autres enzymes peuvent être également impliquées dans la dégradation de la paroi cellulaire végétale. Par exemple, certaines souches de champignons produisent des peroxydases et des polyphénol oxydases qui sont indispensables pour la dégradation de la lignine. Ces enzymes agissent, d'une manière non spécifique, via la génération de radicaux libres instables. Ces derniers peuvent subir ensuite de multiples réactions de clivage spontanées. Les **lignine peroxydases** (E.C 1.11.1.14), les **manganèse peroxydases** (E.C 1.11.1.13) et les **laccases** (E.C 1.10.3.2) sont les trois groupes d'enzymes qui affectent essentiellement les structures de la lignine. Les laccases sont des polyphénol oxydases catalysant l'oxydation d'une large variété de composés. Elles sont actuellement utilisées dans plusieurs domaines industriels notamment pour le blanchiment des textiles et en papeterie (Kiiskinen *et al.*, 2004).

I.3. Synergie entre les enzymes dégradant la paroi végétale

En raison de l'hétérogénéité de composition et de structure de la pectine et de l'arabinoxylane, une large gamme d'enzymes est donc nécessaire pour la biodégradation complète de ces deux polysaccharides. Ainsi, certaines activités enzymatiques dégradant le xylane et la pectine ont été déjà identifiées et purifiées chez plusieurs micro-organismes, notamment chez des espèces appartenant au genre *Aspergillus*. Toutes ces enzymes, hydrolysant les chaînes principales ainsi que les chaînes latérales des polysaccharides, doivent agir en synergie pour accomplir une dégradation complète de la paroi cellulaire végétale (De Vries *et al.*, 2000). Cette

interaction coopérative s'effectue habituellement entre une enzyme clivant la chaîne principale et une ou plusieurs « enzymes accessoires ».

I.3.1. Synergie entre les enzymes dégradant le xylane

Ce domaine de recherche a notamment été abordé chez les champignons. En ce qui concerne les *Aspergillus*, une synergie a été rapportée pour certaines enzymes impliquées dans la dégradation du xylane. Cette action synergique a été observée, dans la dégradation de différents glucuronoarabino-xylanes, entre l'endoxylanase, la β -xylosidase, l'arabinoxylane arabinofuranohydrolase et l'acétylxylane estérase (Kormelink et Voragen, 1993). Une synergie a également été remarquée entre ces activités enzymatiques et d'autres enzymes dégradant le xylane. Par exemple, l'endoxylanase et la β -xylosidase ont toutes les deux influencé positivement le relargage de l'acide 4-*O*-méthyl-glucuronique du xylane du bois de bouleau par une α -glucuronidase d'*Aspergillus tubingensis* (De Vries *et al.*, 1998).

Il a déjà été démontré que la synergie observée lors de la dégradation de l'arabinoxylane n'était pas présente uniquement entre les enzymes clivant la chaîne principale et les « enzymes accessoires », mais qu'elle se produisait également entre la quasi-totalité des « enzymes accessoires » elles-mêmes (De Vries *et al.*, 2000), conduisant à une dégradation efficace et complète de ce polysaccharide hétérogène. Ces données sont en accord avec celles rapportées sur l'induction des gènes codant pour les enzymes xylanolytiques (Van Peij *et al.*, 1998).

I.3.2. Synergie entre les acide férulique estérases et les xylanases

La nature de la xylanase a une influence sur la quantité d'acide férulique libéré des matériaux de la paroi des céréales par l'AFE. Le type d'AFE utilisée joue aussi un rôle important dans cette hydrolyse. De plus, les différents types d'AFE n'agissent pas sur les polysaccharides féruloylés de la même façon. Cela peut être dû d'une part à leur spécificité de substrat et d'autre part à l'effet des différents produits résultant de l'hydrolyse des polysaccharides par la xylanase (Faulds *et al.*, 2003). La production des xylo-oligosaccharides féruloylés d'une longueur et d'une structure variables par différentes xylanases affecte la vitesse de libération de l'acide férulique par les AFE. Par exemple, les xylanases peuvent libérer, dans certains cas, des fragments féruloylés qui ne sont pas d'une taille ni d'une structure optimale, ou qui ne sont pas féruloylés

aux bonnes positions pour que les AFE agissent de façon optimale. En effet, la capacité de différentes xylanases à produire des xylo-oligosaccharides féruloylés à partir de l'arabinoxylane dépend de la spécificité de l'enzyme et de la localisation des résidus d'acide férulique dans la chaîne de ce polysaccharide. De plus, la composition de ces xylo-oligosaccharides féruloylés varie selon la nature des matériaux de la paroi végétale utilisés (Faulds *et al.*, 2003).

Les AFE peuvent être regroupées en deux catégories selon leur capacité à libérer l'acide férulique des substrats lignocellulosiques utilisés.

Il existe des AFE qui ne peuvent libérer l'acide férulique qu'en présence de xylanases. L'AFE de *Streptomyces olivochromogenes* fait partie de cette catégorie d'enzymes (Faulds et Williamson, 1991). Cela peut suggérer que les molécules de petits poids molaires sont indispensables pour l'efficacité de ces AFE (Christov et Prior, 1993). De telles molécules peuvent être fournies par l'hydrolyse de la chaîne principale du xylane par les xylanases. La taille du substrat utilisé peut donc avoir un effet sur l'activité AFE. Etant donné que l'activité xylanase est nécessaire pour la détection de ce type d'activités AFE, l'échec de l'identification d'une activité AFE dans le surnageant de culture d'un micro-organisme donné peut probablement être attribué à la faible activité xylanase dans ce surnageant (Garcia *et al.*, 1998a). Ainsi, avec un substrat lignocellulosique, il est important de réaliser le test de dosage de l'activité AFE en présence d'une forte activité xylanase.

Au contraire, pour certaines AFE, la présence de xylanases n'est pas indispensable pour la libération d'acide férulique. Toutefois, l'efficacité et le taux de cette libération peuvent augmenter lorsque la xylanase est ajoutée. Plusieurs AFE de champignons peuvent être classées dans cette catégorie d'enzymes (Kroon *et al.*, 2000 ; Topakas *et al.*, 2003c). Par exemple, la libération d'acide férulique du xylane par une AFE d'*Aspergillus niger* (la FaeA) est fortement renforcée par l'ajout d'endoxylanases dans le test de dosage de l'activité enzymatique (Bartolomé *et al.*, 1995). En conséquence, cette libération d'acide férulique dépend largement de la dégradation de la chaîne principale de l'arabinoxylane par l'endoxylanase. *Sporotrichum thermophile* produit également une AFE capable de libérer l'acide férulique du son de blé en absence

d'autres enzymes dégradant le xylane. Néanmoins, la quantité d'acide férulique libérée est multipliée par 10 en ajoutant de la xylanase (Topakas *et al.*, 2005b).

Il faut cependant noter qu'aucune quantité d'acide férulique ne peut être libérée du substrat lignocellulosique en présence de xylanase seule (Topakas *et al.*, 2003b ; Topakas *et al.*, 2005b). Ainsi, cette dernière fonctionne en synergie avec les AFE, ainsi qu'avec d'autres activités enzymatiques, pour dégrader complètement la paroi végétale. Une telle synergie a déjà été rapportée entre l'AFE (FaeA) d'*A. niger* et la xylanase de la famille 11 de *Trichoderma viride*, ainsi qu'entre cette AFE et la xylanase de la famille 10 de *Thermoascus aurantiacus* pour la libération d'acide férulique et d'acide di-férulique, respectivement, à partir de l'arabinoxylane (Faulds *et al.*, 2006).

I.3.3. Synergie entre les enzymes dégradant la pectine

Certaines actions synergiques ont également été rapportées entre les enzymes hydrolysant les pectines. Nous pouvons citer à titre d'exemple la synergie observée entre la pectine méthylestérase d'*Aspergillus aculeatus* et la polygalacturonase d'*A. niger* (Christgau *et al.*, 1996). De plus, la pectine lyase influence positivement la libération d'acide férulique de la pectine de betterave par l'AFE (FaeA) d'*A. niger*, mais à un faible niveau (De Vries *et al.*, 1997). Cependant, la libération d'acide férulique de la pectine par une deuxième AFE d'*A. niger* (la FaeB) est améliorée par la présence de l'endoarabinase et de l'arabinofuranosidase d'*A. niger* (Kroon et Williamson, 1996), indiquant qu'une synergie intervient entre les enzymes pectinolytiques « accessoires » elles-mêmes.

En conclusion, certaines synergies ont été rapportées entre les enzymes clivant les chaînes principales et les « enzymes accessoires » dans les systèmes de dégradation des xylanes et des pectines chez certains micro-organismes. Une action synergique a également été observée entre les « enzymes accessoires » elles-mêmes. Ainsi, l'utilisation de différentes combinaisons d'enzymes peut donner une gamme variée de produits. Dans les procédés industriels, des préparations d'enzymes brutes contenant plusieurs activités enzymatiques sont souvent utilisées conduisant à des rendements élevés d'hydrolyse, notamment lorsqu'une dégradation complète des polysaccharides en monosaccharides est souhaitée. Cependant, dans certains cas (production d'oligosaccharides spécifiques), l'utilisation d'une combinaison d'enzymes définie peut

être plus efficace pour augmenter la quantité du produit désiré sans le dégrader en monosaccharides.

Afin de déterminer des stratégies raisonnables pour de tels procédés, il est nécessaire d'étudier en détail le phénomène de synergie entre les enzymes dégradant la paroi cellulaire végétale. De ce fait, des échantillons purs de toutes les enzymes impliquées sont nécessaires. Actuellement, les enzymes participant à la dégradation de la paroi végétale ne sont pas encore toutes identifiées. C'est pourquoi, des effets synergiques supplémentaires peuvent être observés.

II. Les acide férulique estérases

Les **estérases** (E.C. 3.1.1, carboxyle ester hydrolases) constituent une famille variée d'hydrolases catalysant le clivage et la formation des liaisons esters. Elles sont stables, conservent leur activité dans les milieux organiques et de plus ne demandent pas de cofacteurs (Bornscheuer, 2002). Les **lipases** (E.C. 3.1.1.3, tri-acyl glycérol hydrolases) forment une autre catégorie majeure d'hydrolases. En fait, ces deux classes d'enzymes catalysent des réactions chimiquement similaires. Mais, les lipases peuvent être distinguées des estérases en prenant en compte le phénomène contesté de l'activation interfaciale observée uniquement chez les lipases. Les estérases, quant à elles, suivent la loi classique de Michaelis-Menten (Bornscheuer, 2002) et n'exhibent pas d'activité lipasique significative (Aliwan *et al.*, 1999).

L'acide férulique est estérifié avec les résidus d'arabinose dans les xylanes (5-O), et avec les résidus de galactose (6-O) ou d'arabinose (2-O) dans les pectines. Ces liaisons esters formées entre les résidus d'acide férulique et les chaînes latérales de polysaccharides de la paroi végétale peuvent être hydrolysées par une sous-classe d'acide carboxylique estérases : les **acide férulique estérases**, AFE, (E.C. 3.1.1.73). L'intervention de ces enzymes permet l'accès à d'autres hydrolases pour dégrader complètement les chaînes principales des polysaccharides (Williamson *et al.*, 1998).

II.1. Distribution des acide férulique estérases

L'activité AFE a été décrite pour la première fois chez la bactérie *S. olivochromogenes* par Mackenzie *et al.*, 1987. Ensuite, elle a été purifiée pour la première fois par Faulds et Williamson en 1991. Plusieurs estérases libérant des acides phénoliques ont plus tard été identifiées chez une large variété de champignons (**Tableau 1**). Par contre, très peu d'études ont été effectuées sur la production d'AFE par les bactéries (**Tableau 2**) malgré la détection d'un grand nombre d'AFE bactériennes surtout chez des *Bacillus* et des *Lactobacillus* (Donaghy *et al.*, 1998).

Des activités AFE ont également été observées chez certaines levures telles que *Candida lambica*, *Rhodotorula rubra/glutinis*, *Rhodotorula minuta* (Donaghy *et al.*, 1999) et récemment chez *Saccharomyces cerevisiae* (Coghe *et al.*, 2004). De plus, certaines plantes possèdent des activités AFE, notamment l'orge (Sancho *et al.*, 1999 ; Sancho *et al.*, 2001).

II.2. Propriétés des acide férulique estérases

Chez les champignons (Castanares *et al.*, 1992 ; Borneman *et al.*, 1992 ; Brézillon *et al.*, 1996 ; Faulds *et al.*, 1997 ; Topakas *et al.*, 2003b,c) et certaines bactéries (McSweeney *et al.*, 1998 ; Donaghy *et al.*, 2000), notamment les *Streptomyces* (MacKenzie *et al.*, 1987 ; Faulds et Williamson, 1991 ; Garcia *et al.*, 1998a,b ; Bartolomé *et al.*, 2003), les AFE sont extracellulaires. Par contre, la bactérie *Butyrivibrio fibrisolvens* E14 possède au moins cinq AFE parmi lesquelles deux sont intracellulaires, la CinA et la CinB (Dalrymple et Swadling, 1997 ; McSweeney *et al.*, 1998). Une AFE intracellulaire a également été détectée chez *Clostridium* sp. (McSweeney *et al.*, 1999).

Plusieurs types d'AFE peuvent être identifiées selon leurs propriétés physiques ainsi que leurs spécificités de substrat. En prenant en compte leurs masses molaires, les AFE peuvent être divisées en trois groupes : petits monomères (20-36 kDa), gros dimères (60-120 kDa) et monomères de taille intermédiaire (57-75 kDa).

Tableau 1. Propriétés physiques des AFE de champignons. Mm, pH_{opt.}, T_{opt.} et pI représentent la masse molaire, le pH optimum, la température optimale et le point isoélectrique de l'enzyme, respectivement.

Organisme	Enzyme* AFE	Mm (kDa)	pH _{opt.}	T _{opt.} (°C)	pI	Référence
<i>Aspergillus awamori</i>	FE	112	-	-	3,7	(1)
<i>Aspergillus awamori</i>	p-CE	75	-	-	4,2	(1)
<i>Aspergillus niger</i>	FAE-I	63	-	-	3,0	(2)
<i>Aspergillus niger</i>	FAE-II	29	-	-	3,6	(2)
<i>Aspergillus niger</i>	FaeA	36	5,0	55	3,3	(3)
<i>Aspergillus niger</i>	CinnAE	75,8	6,0	50	4,8	(4)
<i>Aspergillus niger</i>	FAE-PL	36	5,0	60	-	(5)
<i>Aspergillus oryzae</i>	FE	30	4,5-6,0	-	3,6	(6)
<i>Aspergillus tubingensis</i>	FaeA	36	-	-	-	(3)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	FeE	110	6,7	60	6,5	(7)
<i>Neocallimastix</i>		11	7,2	-	4,7	(8)
<i>Neocallimastix MC-2</i>	FAE-I	69	-	-	-	(9)
<i>Neocallimastix MC-2</i>	FAE-II	24	-	-	-	(9)
<i>Penicillium expansum</i>		57,5	5,6	37	-	(10)
<i>Penicillium pinophilum</i>	FAE / p-CAE	57	6,0	55	4,6	(11)
<i>Penicillium funiculosum</i>	FAEB	53	-	-	6,0	(12)
<i>Fusarium oxysporum</i>	FoFAE-I	31	7,0	55	9,5	(13)
<i>Fusarium oxysporum</i>	FAE-II	27	7,0	45	9,9	(14)
<i>Fusarium proliferatum</i>	FAE	31	6,5-7,5	50	-	(15)
<i>Sporotrichum thermophile</i>	FAE	27	8,0	60	5,0	(16)
<i>Sporotrichum thermophile</i>	StFAE-A	33	6,0	55-60	3,1	(17)
<i>Sporotrichum thermophile</i>	StFaeC	23	6,0	55	3,1	(18)

* Noms donnés par les auteurs aux différentes AFE.

(1) : McCrae *et al.*, 1994 ; (2) : Faulds et Williamson, 1993 ; (3) : De Vries *et al.*, 1997 ; (4) : Kroon *et al.*, 1996 ; (5) : Tsuchiyama *et al.*, 2006 ; (6) : Tenkanen *et al.*, 1991 ; (7) : Rumbold *et al.*, 2003 ; (8) : Borneman *et al.*, 1991 ; (9) : Borneman *et al.*, 1992 ; (10) : Donaghy et McKay, 1997 ; (11) : Castanares *et al.*, 1992 ; (12) : Kroon *et al.*, 2000 ; (13) : Topakas *et al.*, 2003c ; (14) : Topakas *et al.*, 2003b ; (15) : Shin et Chen, 2006 ; (16) : Topakas *et al.*, 2003a ; (17) : Topakas *et al.*, 2004 ; (18) : Topakas *et al.*, 2005b.

Tableau 2. Propriétés physiques des AFE bactériennes. Mm, pH_{opt.}, T_{opt.} et pI représentent la masse molaire, le pH optimum, la température optimale et le point isoélectrique de l'enzyme, respectivement.

Organisme	Enzyme	Mm (kDa)	pH _{opt.}	T _{opt.} (°C)	pI	Référence
<i>Streptomyces olivochromogenes</i>	AFE	29	5,5	30	7,9-8,5	(1)
<i>Clostridium stercoreum</i>	AFE	33	8,0	65	-	(2)
<i>Streptomyces avermitilis</i>	AFE	-	6,0	50	-	(3)
<i>Lactobacillus fermentum</i>	-	-	6,5	30	-	(4)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	AFE	36	5,6	37	-	(5)

(1) : Faulds et Williamson, 1991 ; (2) : Donaghy *et al.*, 2000 ; (3) : Garcia *et al.*, 1998b ; (4) : Donaghy *et al.*, 1998 ; (5) : Wang *et al.*, 2004.

Les valeurs des points isoélectriques des AFE varient selon l'origine de l'enzyme de 3,0 à 9,9 (**Tableaux 1 et 2**). Deux bandes présentant un point isoélectrique de 7,9 et de 8,5 ont été observées pour l'AFE de *S. olivochromogenes* (Faulds et Williamson, 1991) suggérant la présence de deux formes différentes de l'enzyme chez cette bactérie, mais pour Johnson *et al.* (1988) trois formes distinctes d'activité AFE seraient présentes chez ce micro-organisme. Les valeurs optimales de pH et de température de la plupart des AFE sont comprises entre 4,5 et 8,0 et entre 30 °C et 65 °C, respectivement (**Tableaux 1 et 2**).

Selon la littérature, la synthèse de ce type d'enzymes est induite par le substrat qui sert également à la croissance du micro-organisme utilisé. Généralement, la présence de composés riches en esters d'acide férulique est connue pour induire la synthèse de l'AFE chez plusieurs micro-organismes dégradant les lignocelluloses (Brézillon *et al.*, 1996 ; Garcia *et al.*, 1998a). Les meilleures productions d'AFE ont été obtenues en présence de son de blé désamidonné ou de xylane d'avoine (Faulds *et al.*, 1997 ; Garcia *et al.*, 1998a,b). Le tableau 3 ci-dessous montre un exemple de la capacité de ces deux composés à induire la synthèse d'une AFE chez *S. avermitilis*. La pulpe de betterave à sucre peut également induire la synthèse d'AFE chez *A. niger* et *S. avermitilis* (Kroon *et al.*, 1996 ; Ferreira *et al.*, 1999).

Tableau 3. Influence de la nature de la source de carbone sur la production d'AFE par *S. avermitilis* UAH30. D'après Garcia *et al.*, 1998a.

Source de carbone	Activité AFE	
	(mU*/ml)	(mU*/mg protéines)
Bagasse de canne à sucre	0,44 ± 0,19	2,61
Son de blé	1,75 ± 0,70	16,82
Xylane d'avoine	1,55 ± 0,70	11,15

* 1U = quantité d'enzyme libérant 1 μ mol d'AF par min à pH 6 et à 50 °C.

II.3. Spécificité de substrat

Les constantes cinétiques K_m et V_{max} sont probablement les meilleures mesures pour caractériser la spécificité des enzymes, elles fournissent des informations importantes sur l'affinité et l'efficacité catalytique. Dans le cas de l'AFE d'*A. niger*, les valeurs de K_m et de V_{max} sont fortement affectées par le type de substitutions sur le cycle du benzène, la distance entre la liaison ester et le cycle du benzène, la nature de la séquence aliphatique (forme saturée ou forme insaturée) et le nombre de résidus sucre (Williamson *et al.*, 1998). La spécificité de substrat peut être utilisée pour classer les AFE entre elles. Certaines estérases, par exemple, sont uniquement actives sur des petits substrats oligomériques solubles, alors que d'autres montrent aussi une bonne activité sur les substrats plus polymérisés.

La majorité des AFE sont actives sur le férulate de méthyle, un ester synthétique utilisé souvent comme un substrat permettant de quantifier l'activité AFE. Néanmoins, un grand nombre d'études d'activité AFE avec des substrats naturels est également réalisé sur le xylane et ses dérivés oligosaccharidiques. Le son de blé désamidonné est largement utilisé comme un exemple de ces substrats naturels à partir desquels la plupart des AFE sont capables de libérer de l'acide férulique (MacKenzie *et al.*, 1987 ; Bartolomé *et al.*, 2003 ; Topakas *et al.*, 2003c). A l'inverse, très peu d'AFE montrent une capacité à libérer de l'acide férulique à partir des pectines (Kroon *et al.*, 1996 ; De Vries *et al.*, 1997).

Généralement, un micro-organisme d'une espèce donnée peut produire plus d'une activité AFE (**Tableau 1**). Certaines espèces d'*Aspergillus* produisent, par exemple, plusieurs AFE avec des spécificités de substrat différentes. Une étude comparative entre

deux AFE d'*A. niger* (FaeA et CinnAE, Kroon *et al.*, 1997) a montré une préférence de la FaeA pour les substrats ayant des groupements méthoxyles en position 3 du cycle aromatique. D'autre part, une augmentation de l'activité enzymatique a été observée avec l'augmentation du nombre de groupements méthoxyles sur le cycle aromatique. En revanche, l'activité CinnAE est faible ou absente sur les substrats contenant des groupements méthoxyles en position 3 du cycle aromatique. De plus, une réduction de cette activité a été décrite en présence de groupements méthoxyles supplémentaires par comparaison avec des composés non substitués. Avec un cycle aromatique substitué par des groupements hydroxyles, une augmentation de l'activité CinnAE a été mesurée. Par contre, une réduction de l'activité FaeA a été décrite en présence de ce type de substitution.

La capacité de ces deux enzymes à libérer l'acide férulique des oligosaccharides dérivés du son de blé et des pulpes de betteraves a également été étudiée (Ralet *et al.*, 1994). L'enzyme FaeA a été capable de libérer l'acide férulique lié à l'arabinose en 5-O de l'arabinoxylane du son de blé, et au galactose en 6-O de la pectine de betterave. Mais elle n'a pas été capable de libérer l'acide férulique lié à l'arabinose en 2-O de la pectine de betterave. Cela peut suggérer une influence importante de la nature des liaisons esters sur la spécificité de l'enzyme. CinnAE, à son tour, a été capable de libérer l'acide férulique de tous les oligosaccharides testés mais avec une meilleure activité vis-à-vis des liaisons acide férulique-arabinose (Ralet *et al.*, 1994). Ces données semblent montrer que les différentes AFE d'*A. niger* ont des fonctions complémentaires pour la dégradation des polysaccharides de la paroi végétale.

II.4. Classement des acide férulique estérases

Généralement, les enzymes sont classées selon leur spécificité de substrat ou par comparaison de leurs séquences primaires en acides aminés. Il est nécessaire que toutes les enzymes à comparer soient analysées, préférentiellement dans des conditions réactionnelles similaires, sur le même substrat ou sur un autre composé similaire. Toutefois, grâce à la disponibilité croissante des informations sur les séquences dans les bases de données publiques, la comparaison entre les séquences en acides aminés peut donner une image plus claire sur la corrélation entre différentes enzymes. Cependant, il peut arriver qu'une haute homologie de séquence n'ait aucun rapport avec les propriétés

enzymatiques (spécificité de substrat, stéréosélectivité, valeurs optimales de pH et de température...). Des réactions complètement différentes peuvent, de plus, avoir lieu dans certains cas. Ainsi, les séquences en acides aminés d'une bromopéroxydase de *Streptomyces aureofaciens* et d'une estérase de *Pseudomonas fluorescens* possèdent près de 55% d'identité, alors que ces deux enzymes présentent des spécificités de substrat très différentes (Hecht *et al.*, 1994 ; Pelletier et Altenbuchner, 1995).

Souvent, lorsqu'une estérase est purifiée en utilisant un substrat X, elle est appelée X estérase. Alors que, lorsque la même enzyme est purifiée dans un autre laboratoire en utilisant Y comme substrat, l'enzyme est dite Y estérase. En conséquence, une même enzyme peut avoir plusieurs noms. Un séquençage de chaque enzyme purifiée ou au moins la détermination de la séquence N-terminale est donc nécessaire pour résoudre ce problème (Williamson *et al.*, 1998).

D'après les informations disponibles dans la littérature, les AFE sont réparties en quatre classes principales (**Tableau 4**) selon leurs inducteurs préférentiels, leur spécificité pour les esters méthyliques des acides hydroxycinnamiques, leurs séquences en acides aminés et leur capacité à libérer les acides di-féruliques (Crepin *et al.*, 2004). Mais, les noms de certaines enzymes ne sont pas en harmonie avec leurs classes. Par exemple, la FaeB d'*A. niger* n'est pas une estérase de type B mais de type C (**Tableau 4**). Pourtant, cette classification reste, à notre connaissance le seul essai pour regrouper les AFE.

Les membres de chaque classe montrent, d'une part, des profils semblables d'activité envers les quatre substrats utilisés [les esters méthyliques d'acide férulique, d'acide sinapique, d'acide caféique et d'acide *p*-coumarique] et d'autre part, des capacités similaires à libérer ou pas l'acide di-férulique des matériaux de la paroi cellulaire végétale. Les estérases d'une même classe peuvent également avoir des séquences en acides aminés présentant un haut degré d'identité.

Tableau 4. Classement des AFE selon leurs meilleurs inducteurs, leur spécificité pour les esters méthyliques des acides hydroxycinnamiques, leur capacité à libérer les acides di-féruliques et leurs séquences en acides aminés (Crepin *et al.*, 2004). SB et PBS signifient son de blé et pulpe de betterave sucrière, respectivement. MAF, MAS, MAC, MA_pC sont les esters méthyliques d'acide férulique, d'acide sinapique, d'acide caféique et d'acide *p*-coumarique, respectivement.

Paramètre	Type A (1)	Type B (2)	Type C (3)	Type D (4)
Milieu préférentiel d'induction	SB	PBS	PBS-SB	SB
Hydrolyse des esters méthyliques	MAF, MAS, MA _p C	MAF, MA _p C, MAC	MAF, MAS, MA _p C, MAC	MAF, MAS, MA _p C, MAC
Libération d'acide di-férulique	Oui (5-5')	Non	Non	Oui (5-5')
Similarité de séquence	Lipase	Acétylxylane estérase	Chlorogénate estérase Tannase	Xylanase

(1) **FaeA** d'*A. niger* (Ralet *et al.*, 1994 ; Faulds et Williamson, 1994 ; Kroon *et al.*, 1999)

(2) **FaeB** de *Penicillium funiculosum* (Kroon *et al.*, 2000), **Fae-1** de *Neurospora crassa* (Crepin *et al.*, 2003a)

(3) **FaeB** d'*A. niger* (Ralet *et al.*, 1994 ; Kroon *et al.*, 1996 ; Kroon *et al.*, 1999), **FaeC** de *Talaromyces stipitatus* (Crepin *et al.*, 2003b)

(4) **EstA** de *Piromyces equi* (Fillingham *et al.*, 1999), **XYLD** de *Pseudomonas fluorescens* (Ferreira *et al.*, 1993).

II.5. Gènes codant pour les acide férulique estérases

II.5.1. Chez les champignons

Plusieurs études ont déjà été menées pour identifier et cloner les gènes de certaines AFE. A titre d'exemple, le gène *faeA* a été identifié et cloné pour la première fois chez *A. niger* et *A. tubingensis* par De Vries *et al.*, 1997. L'analyse de séquence a montré que les gènes structuraux d'*A. niger* et d'*A. tubingensis* contiennent 900 (Fig. 6) et 897 paires de bases, respectivement, avec un haut degré d'identité de séquence entre eux (87,1%).

Encore une fois, l'équipe de De Vries a réussi, en 2002, à cloner le gène *faeB* codant pour une deuxième AFE, la FaeB, chez *A. niger*. Aucune similarité significative de séquence n'a pu être détectée avec le gène *faeA*. Par contre, une similarité de séquence a été trouvée avec une tannase d'*A. oryzae* : 24% d'identité avec la FaeB. Pourtant, cette dernière ne possède aucune activité tannase (De Vries *et al.*, 2002).

D'autres gènes codant pour des AFE ont également été clonés et identifiés tels que *faeB* chez *P. funiculosum* (Kroon *et al.*, 2000), *fae-1* chez *Neurospora crassa* (Crepin *et al.*, 2003a), *faeC* chez *Talaromyces stipitatus* (Garcia-Conesa *et al.*, 2004) et *estA* chez *Piromyces equi* (Fillingham *et al.*, 1999).

```
- ATGAAGCAATTCTCTGCAAAATACGCCCTCATTCCTTTTGGCGACTGCAGG - 50
- ACAAGCCCTCGCGGCCCTCCACGCAAGGCATCTCCGAAGACCTCTACAATC - 100
- GCTTGGTAGAGATGGCCACTATCTCCCAAGCCGCCCTACGCCGACCTATGC - 150
- AATATTCCATCGACTATTATCAAGGAGAGAAATTTACAACGCTCAAAC - 200
- TGATATCAACGGATGGATCCTCCGCGACGACACCAGCAAAGAAATTATCA - 250
- CCGTCTTCGTTGGCACTGGCAGTGACACAAACCTACAGCTCGATACTAAC - 300
- TACACGCTCACGCCATTTCGACACTCTACCTCAATGCAACGATTGCGAGGT - 350
- ACACGGTGGATACTATATTGGATGGATCTCAGTCCAAGACCAAGTCGAGT - 400
- CGCTTGTCAAACAACAGGCTAGCCAGTATCCGGACTATGCGCTTACCSTG - 450
- ACAGGCCATAggtatgogtgettbacgtottacaatttgttgtatgatat - 500
- ataactaaotttatgataGTCTGGGAGCGTCGATGGCAGCACTCACTGCCG - 550
- CCCAGCTGTCCGCGACATACGACAACGTCCTGTGTACACATTCCGGCGAA - 600
- CCGCGCAGCGGCAACCAGGCCCTTCGCGTCGTACATGAACGATGCGTTCCA - 650
- GGTCTCGAGCCCGGAGACGACCCAGTACTTCCGGGTCACTCATTCCAAACG - 700
- ACGGCATCCCAAACCTTGCCCCCGGCGGACGAGGGTTACGCCCATGGTGGT - 750
- GTAGAGTACTGGAGCGTTGATCCTTACAGCGCCAGAACACGTTTGTCTG - 800
- TACTGGGGATGAAGTACAGTGTGTGAGGCACAGGGCGGACAGGGGGTGA - 850
- ATGATGCGCATACTACTTATTTTGGGATGACGAGCGGAGCTTGTACTTGG - 900
```

Fig. 6. Séquence nucléotidique du gène structural *faeA* codant pour la FaeA chez *A. niger*. Un intron situé entre les positions 461 et 517 est représentée par des lettres minuscules (De Vries *et al.*, 1997).

II.5.2. Chez les bactéries

La littérature a rapporté beaucoup moins de recherches sur les AFE d'origine bactérienne par rapport à celles issues de champignons. En 1996, Dalrymple et ses collègues sont parvenus, pour la première fois, à isoler ainsi qu'à séquencer le gène *cinA* codant pour une AFE chez *B. fibrisolvens* E14. Une année plus tard, un clonage du gène *cinB*, codant pour une deuxième AFE chez cette même bactérie, a aussi été effectué (Dalrymple et Swadling, 1997). Les protéines résultant de l'expression de ces deux gènes sont identiques à hauteur de 28% dans leurs séquences en acides aminés (Dalrymple et Swadling, 1997). En 2001, Prates *et al.* ont également réussi à cloner une AFE (la FAE-Xyn10B) issue de *Clostridium thermocellum*.

Ultérieurement, l'équipe de Wang a identifié, en 2004, la séquence N-terminale d'une AFE provenant de la bactérie intestinale humaine *Lactobacillus acidophilus*. Leur

travail a montré un très haut niveau d'identité de séquence en acides aminés (95%), entre cette enzyme et une L-lactate déshydrogénase (L-LDH) de *Lactobacillus helveticus* (**Fig. 7a**). Par contre, une très faible homologie de séquence a été constatée entre l'estérase de *L. acidophilus* et d'autres AFE (**Fig. 7b**).

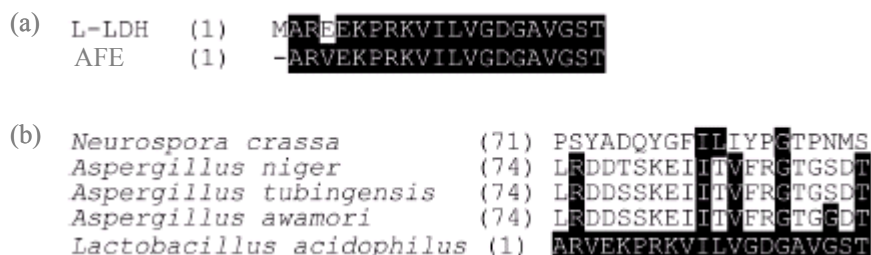


Fig. 7. Homologie de séquence N-terminale entre l'AFE purifiée de *L. acidophilus* et la L-LDH de *L. helveticus* (a). Alignement de la séquence N-terminale de l'AFE de *L. acidophilus* avec celles d'*A. niger*, d'*A. tubingensis*, d'*A. awamori* et de *N. crassa* (b). Les résidus d'acides aminés identiques parmi toutes les AFE sont représentés en lettres blanches sur arrière-plan noir. Les chiffres entre parenthèses indiquent les positions de départ des séquences N-terminales (Wang *et al.*, 2004).

II.5.3. Biosynthèse d'acide férulique estérases par des systèmes d'expression hétérologues

La souche bactérienne d'*Escherichia coli* est très souvent utilisée comme une cellule hôte pour effectuer les manipulations d'ADN recombinant, alors que la levure *Pichia pastoris* peut représenter un excellent modèle pour la production des AFE recombinantes en quantité importante. Le premier essai a été réalisé en 2001 par Juge et ses collègues qui ont réussi à obtenir l'expression de *faeA* d'*A. niger* dans cette levure à un haut niveau (300 mg/l). Ultérieurement, des sur-expressions de *faeC* et de *fae-1*, gènes codant pour la FaeC de *T. stipitatus* et la Fae-1 de *Neurospora crassa*, ont également été effectuées chez *P. pastoris*. Suite à ces manipulations génétiques, des concentrations extracellulaires élevées en enzymes ont pu être atteintes (respectivement 297 et 210 mg/l) (Crepin *et al.*, 2003a,b).

II.6. Structure et mécanisme catalytique des acide férulique estérases

Les AFE font partie des hydrolases à serine contenant le repli α/β -hydrolase (Kroon *et al.*, 2000), un ordre défini des feuilletts β et des hélices α (**Fig. 8**). La triade catalytique de ce repli est composée des acides aminés Ser-Asp-His. Habituellement,

une séquence consensus Gly-X-Ser-X-Gly (où X est un acide aminé arbitraire) peut se trouver également autour du site actif de la serine (Bornscheuer, 2002). Certaines AFE possèdent cette séquence qui est fortement conservée chez les estérases à serine (Kroon *et al.*, 2000 ; Crepin *et al.*, 2003b).

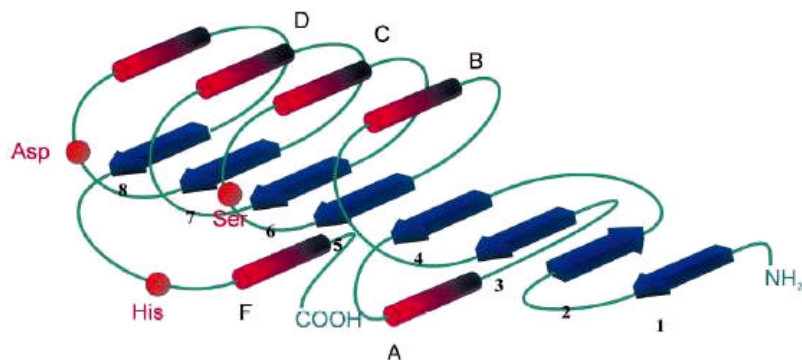


Fig. 8. Présentation schématique du repli α/β -hydrolase. Les flèches bleues et les colonnes rouges représentent les feuillets β (1-8) et les hélices α (A-F), respectivement. La position relative des acides aminés de la triade catalytique est indiquée par les cercles oranges (Bornscheuer, 2002).

La première structure cristalline des AFE a été reportée pour l'estérase FAE-Xyn10B de la bactérie *C. thermocellum* (Prates *et al.*, 2001). L'analyse de séquence a montré que cette enzyme est une α/β -hydrolase avec la triade catalytique classique Ser-Asp-His contenant les résidus Ser954, Asp1018 et His1058. Ces résidus se trouvent aussi chez certains homologues structuraux des AFE. La présence d'une telle triade a également été constatée chez les AFE de champignons. Par exemple, le site actif de la FaeA d'*A. niger* contient les résidus Ser133, Asp194 et His247 (McAuley *et al.*, 2004).

Les trois résidus Ser-Asp-His sont arrangés dans le site actif d'une façon particulière permettant le clivage des liaisons amides ou esters par une attaque nucléophile de l'atome C du carbonyle du substrat produisant un état de transition tétraédrique. Ce dernier se transforme pour donner l'intermédiaire covalent acyl-enzyme. Dans l'étape suivante, une attaque se réalise contre l'intermédiaire acyl-enzyme par une molécule d'eau conduisant à libérer l'acide via un deuxième état de transition tétraédrique. La figure 9 ci-dessous résume ce mécanisme catalytique pour l'estérase FAE-Xyn10B de *C. thermocellum* (Prates *et al.*, 2001).

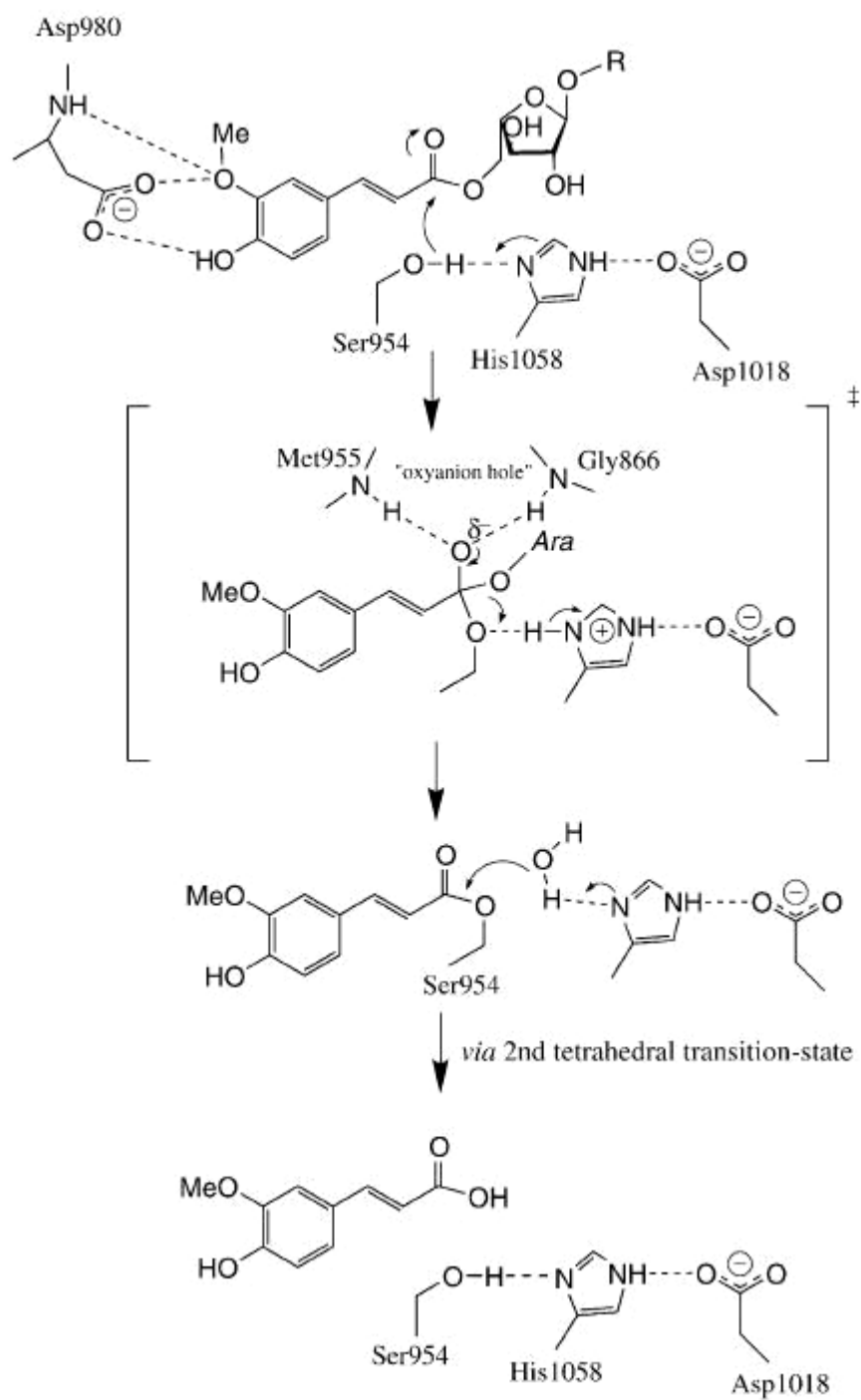


Fig. 9. Présentation du mécanisme catalytique de l'estérase FAE-Xyn10B de *C. thermocellum* (Prates *et al.*, 2001).

II.6.1. Comparaison entre les acide férulique estérases de champignons et les lipases

Les AFE et les lipases sont des hydrolases à serine dont la structure tertiaire possède le repli α/β -hydrolase. Un haut degré de similarité de séquence entre la FaeA d'*A. niger* et la lipase de *Rhizomucor miehei* a déjà été observé, ce qui peut entraîner une homologie de structure et un mécanisme catalytique similaire entre ces deux enzymes (McAuley *et al.*, 2004). Pourtant, aucune activité lipasique n'a été observée pour la FaeA d'*A. niger* (Aliwan *et al.*, 1999).

En réalité, la structure tertiaire de la FaeA est très semblable à celle des lipases de champignons (McAuley *et al.*, 2004). La figure 10 montre une comparaison de structure entre la FaeA (a) et la lipase TIL de *Thermomyces lanuginosa* (b). D'après cette comparaison, l'hélice dans la structure de la FaeA (résidus 71 à 77), correspondant au couvercle de la TIL, ne masque pas les résidus du site actif. De plus, cette hélice ressemble fortement à celle de la forme ouverte de la lipase (b). Au contraire de la lipase, l'hélice de la FaeA n'a pas besoin d'adopter deux conformations car cette enzyme ne possède pas d'activité lipasique.

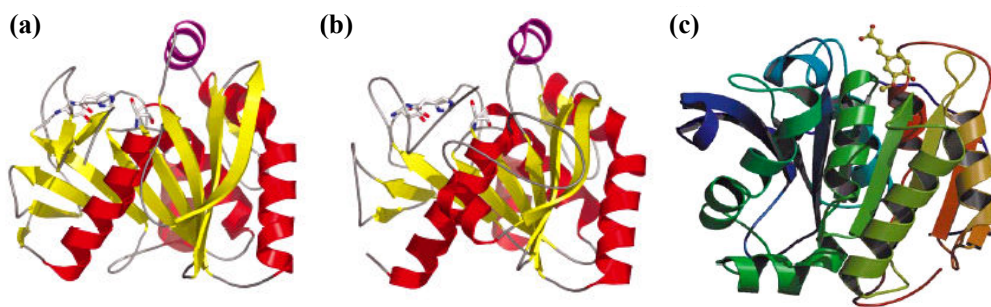


Fig. 10. Structure de la FaeA d'*A. niger* (a), de la forme ouverte de la lipase TIL de *T. lanuginosa* (b) (McAuley *et al.*, 2004) et de la FAE-Xyn10B de *C. thermocellum* (c) avec la localisation d'une molécule de férulate attachée, représentation en jaune, (Prates *et al.*, 2001).

Puisque la FaeA ne possède pas l'activité de la lipase bien que leurs structures soient similaires, les régions de leurs sites actifs doivent donc être différentes pour s'accommoder de substrats différents. Cette hypothèse a été confirmée par McAuley *et al.* (2004) qui ont montré que le nombre des résidus polaires de la région située autour

du site actif de FaeA est plus important que dans le cas des lipases qui ont des surfaces plus hydrophobes.

II.6.2. Comparaison entre les acide férulique estérases bactériennes et celles de champignons

D'après Prates *et al.* (2001), la structure de l'estérase FAE-Xyn10B de *C. thermocellum*, étudiée avec une molécule d'acide férulique liée, révèle une poche superficielle située sur la surface de l'enzyme. Cette poche possède une spécificité de liaisons hydrogènes et hydrophobes essentielle pour la fixation des substituants hydroxyles et méthoxyles du résidu férulate (**Fig. 10c**).

Les deux estérases bactériennes, FAE-XynZ et FAE-Xyn10B, de *C. thermocellum* ont une fonctionnalité semblable à celle de la FaeA d'*A. niger*, mais sans aucune homologie de séquence apparente entre ces trois enzymes (McAuley *et al.*, 2004). De plus, la FaeA a plus de similarité avec les lipases de champignons qu'avec les AFE bactériennes. Néanmoins, la FaeA d'*A. niger*, les AFE de *C. thermocellum* et les lipases font toutes partie de la famille des α/β -hydrolases. La grande majorité des AFE possèdent la triade catalytique et le motif de la sérine, par exemple Gly-X-Ser-X-Gly, commun avec les autres hydrolases à sérine.

En conclusion, les AFE bactériennes ne possèdent pas un haut niveau d'identité de séquence entre elles (Dalrymple et Swadling, 1997 ; McAuley *et al.*, 2004). D'autre part, aucune homologie apparente n'a été trouvée avec les AFE de champignons (McAuley *et al.*, 2004 ; Wang *et al.*, 2004). A l'inverse, les structures de certaines AFE de champignons sont semblables à celles des lipases (McAuley *et al.*, 2004). Elles peuvent également avoir une similarité plus ou moins importante entre elles (De Vries *et al.*, 1997).

II.7. Mécanismes d'induction

Les AFE microbiennes représentent un outil important pour la dégradation des polysaccharides de la paroi cellulaire végétale, la modification des propriétés physiques et chimiques de cette paroi et l'élucidation de sa structure (Williamson *et al.*, 1998). L'effet de la source de carbone utilisée afin d'obtenir une production d'AFE par un

micro-organisme confirme la nécessité de la présence d'un composé lignocellulosique pour induire la synthèse de ces enzymes (Garcia *et al.*, 1998b).

Il faut cependant noter que la production d'AFE est indépendante de la quantité d'acide férulique trouvé dans le composé lignocellulosique utilisé comme inducteur. En revanche, cette production peut dépendre de la nature exacte de la liaison ester entre l'acide férulique et le sucre dans l'inducteur utilisé (Tenkanen *et al.*, 1991 ; Christov et Prior, 1993).

D'autre part, il est difficile de prédire si une molécule donnée est le véritable inducteur ou un précurseur de l'inducteur ou d'un autre composé inconnu (Williamson *et al.*, 1998). C'est pourquoi, certaines recherches sont menées pour essayer d'expliquer la procédure d'induction de la synthèse des AFE chez les champignons ainsi que chez les bactéries.

II.7.1. Induction des acide férulique estérases chez les eucaryotes

Deux facteurs de régulation peuvent affecter l'expression des gènes codant pour les AFE chez *A. niger*. D'une part, le répresseur catabolique CreA empêche la transcription de ces gènes en présence d'un substrat facilement métabolisable comme le glucose par exemple (De Vries *et al.*, 1999b). Les deux gènes *faeA* et *faeB*, codant respectivement pour la FaeA et la FaeB chez *A. niger*, sont régulés par cette protéine catabolique (**Fig. 11a**) (De Vries *et al.*, 2002). D'autre part, la présence de l'activateur transcriptionnel XlnR est indispensable pour permettre l'expression de tous les gènes xylanolytiques, dont *faeA*, en présence de xylane (Van Peij *et al.*, 1998 ; De Vries et Visser, 1999). Par contre, le xylane n'est pas capable d'induire la transcription de *faeB* (**Fig. 11b**) (De Vries *et al.*, 2002).

Un troisième facteur peut également influencer l'expression des gènes codant pour les AFE chez *A. niger*. Ce régulateur est lié à la présence de certains acides phénoliques possédant une structure définie tels que l'acide férulique. Pour *faeA*, cette structure nécessite la présence d'un groupement méthoxyle en C-3 et d'un groupement hydroxyle en C-4, mais sans substitution en C-5 du cycle aromatique. La substitution en C-1 par contre ne semble pas être très importante (De Vries *et al.*, 1999a ; De Vries et Visser, 1999).

Pour permettre la transcription de *faeB*, le composé aromatique doit avoir au moins un groupement hydroxyle. Une chaîne $-\text{CH}=\text{CH}-$ liée au C-1 de son cycle aromatique est également nécessaire. La présence des groupements méthoxyles réduit ou supprime la capacité à stimuler la transcription de *faeB* (De Vries *et al.*, 2002), ce qui est totalement l'inverse des conditions permettant l'induction de la transcription de *faeA* (De Vries et Visser, 1999).

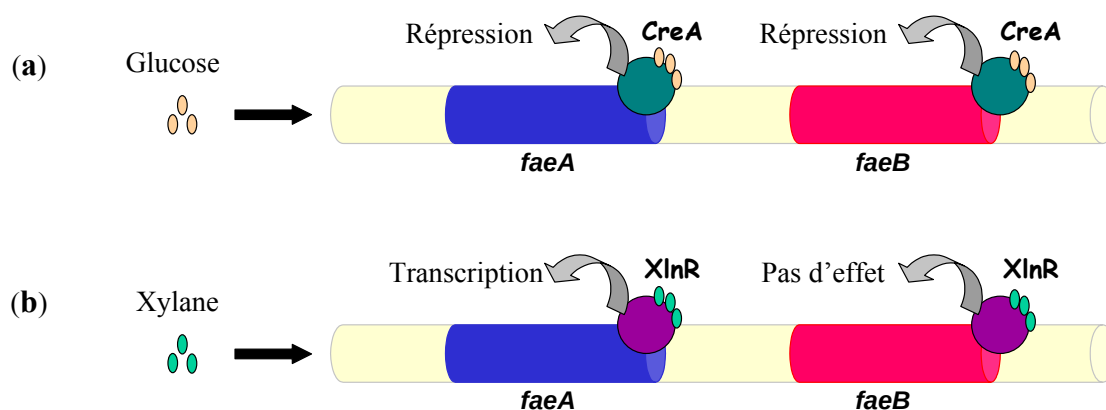


Fig. 11. Schéma du système de la régulation contrôlant l'expression des gènes *faeA* et *faeB* codant pour la FaeA et la FaeB chez *A. niger*. La transcription des deux gènes est réprimée en présence de glucose via le répresseur catabolique CreA (a). L'activateur XlnR est nécessaire pour effectuer l'expression de *faeA* en présence de xylane, il n'a aucun effet sur le *faeB* (b).

Ainsi, l'induction de la synthèse des AFE chez *A. niger* peut s'effectuer, en présence de xylane, selon l'hypothèse suivante : de faibles niveaux constitutifs de l'expression de *faeB* pourraient rendre *A. niger* capable de libérer de petites quantités d'acide férulique du xylane. Ces quantités d'acide férulique vont ensuite activer la transcription de *faeA* et de *faeB*. Le *faeA* s'exprime aussi via XlnR entraînant une libération d'acide férulique qui produit une stimulation supplémentaire de la transcription des deux gènes, *faeA* et *faeB* (De Vries *et al.*, 2002).

L'induction d'un autre gène codant pour une AFE chez une autre espèce de champignons, *Penicillium funiculosum*, a été le sujet de recherche de l'équipe de Kroon *et al.*, 2000. L'expression de ce gène, appelé aussi *faeB*, est fortement contrôlée par la nature de la source de carbone disponible dans le milieu de culture. Il ne peut pas s'exprimer en présence de sucres simples tels que le glucose. Le mécanisme de régulation proposé implique la répression de *faeB* par la protéine CreA. D'autre part,

l'induction de sa transcription par les sucres complexes de la pulpe de betterave sucrière pourrait être expliquée par la présence d'un activateur transcriptionnel chez *P. funiculosum* homologue au XlnR des *Aspergillus*.

En conclusion, un système de régulation complexe contrôle donc l'expression des gènes codant pour les AFE chez les champignons. L'activateur XlnR et ses homologues, l'induction spécifique par certains composés phénoliques et la répression catabolique par CreA jouent un rôle essentiel dans ce système de régulation.

II.7.2. Induction des acide férulique estérases chez les procaryotes

Comme chez les champignons, la production des AFE bactériennes dépend de la nature du substrat de croissance utilisé dans le milieu de culture (Ferreira *et al.*, 1999). Par exemple, l'induction de la synthèse des AFE s'effectue chez les *Streptomyces* en présence de substrats issus de la paroi cellulaire végétale, tels que le son de blé désamidonné, le xylane ou la pulpe de betterave à sucre (MacKenzie *et al.*, 1987 ; Ferreira *et al.*, 1999).

D'après Bartolomé et ses collaborateurs (2003), les gènes codant pour l'activité AFE chez *S. avermitilis* peuvent être sous le contrôle d'un promoteur inductible qui répond différemment selon la nature de la source de carbone utilisée. Cela aura pour conséquence une production d'enzyme plus ou moins importante. Par contre, cette activité n'est pas détectée en présence de glucose comme seule source de carbone (Garcia *et al.*, 1998b).

Dans la littérature, aucun mécanisme d'induction défini n'est disponible. De plus, le composé véritablement responsable de la procédure d'induction n'est pas encore déterminé. Seuls, Dalrymple et Swadling ont publié en 1997 un travail portant sur l'expression du gène *cinB* codant pour une AFE chez la bactérie *B. fibrisolvens* E14.

II.7.3. Régulation de l'expression du gène *cinB* chez *B. fibrisolvens* E14

La localisation des gènes bactériens dans un seul opéron est une forte preuve que les protéines codées participent à la même fonction (par exemple, la dégradation des hémicelluloses et des pectines). Tous les gènes nécessaires pour réaliser cette fonction sont donc transcripts.

Chez *Erwinia chrysanthemi* les gènes qui codent pour les estérases dégradant la paroi cellulaire végétale sont localisés dans un opéron avec d'autres gènes qui codent pour des protéines effectuant une fonction similaire. Parmi les gènes rencontrés dans cet opéron, nous pouvons citer par exemple *paeY*, *pelD* et *pemA* qui codent pour une pectine acétyl estérase, une pectinase et une pectine méthylestérase, respectivement (Williamson *et al.*, 1998).

Le gène *cinB* codant pour une AFE chez *B. fibrisolvens* est régulé négativement par la protéine CinR dont le gène se trouve directement en amont de *cinB* sur le brin d'ADN complémentaire (**Fig. 12**). Cette protéine est capable de réprimer l'expression de *cinB*, mais elle n'a aucun effet sur le gène *cinA* codant pour une autre AFE chez ce micro-organisme. La présence d'oligosaccharides riches en esters d'acide férulique annule presque complètement la fixation de CinR sur la région située entre les deux gènes *cinB* et *cinR*, ce qui rend la transcription de *cinB* possible. Toutefois, les monomères d'acides cinnamiques (tels que l'acide férulique), le cellobiose ou le xylobiose n'induisent pas cet effet sur la protéine CinR. Le gène *cinB* est donc réprimé par CinR en présence de ces molécules. Les oligosaccharides riches en esters d'acide férulique sont donc indispensables pour induire la synthèse de cette AFE chez *B. fibrisolvens* (Dalrymple et Swadling, 1997 ; Williamson *et al.*, 1998).

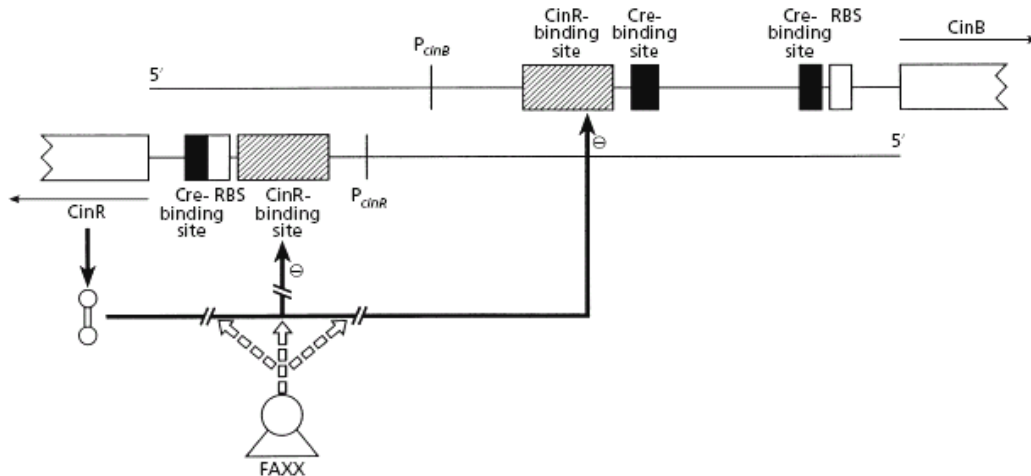


Fig. 12. Mécanisme proposé de la régulation du gène *cinB* chez *B. fibrisolvens*. Cette régulation peut être sous le contrôle d'un répresseur catabolique (Cre) en présence de glucose, et d'un répresseur négatif (CinR) dont le gène est situé en amont du *cinB* sur le brin d'ADN opposé. Les deux promoteurs (P_{cinB} et P_{cinR}) ainsi que les sites putatifs de fixation de CinR (CinR-binding site), de ribosome (RBS) et de Cre (Cre-binding site) sont situés dans la région entre les deux gènes *cinB* et *cinR*. Des oligosaccharides féruloylés (FAXX) restreignent la répression de CinR par un mécanisme inconnu, mais les monomères d'AF ou des sucres ne le font pas (Williamson *et al.*, 1998).

II.8. Purification des acide férulique estérases

Etant donné la nature protéique des enzymes, les techniques utilisées pour la purification des AFE sont les mêmes que celles connues pour la purification de protéines. En effet, la purification d'une protéine est un processus qui s'effectue en plusieurs étapes, chaque étape visant à éliminer telle ou telle classe de contaminant. Après chacune de ces étapes, la protéine sera enrichie par rapport aux autres substances, même si la quantité totale de cette protéine va probablement baisser à chaque étape.

Les différentes étapes de la purification des acide férulique estérases

Ce sont ses caractéristiques intrinsèques, celles qui rendent une protéine unique, qui permettent de la séparer de l'ensemble des protéines cellulaires. Une protéine a une masse, une forme, des structures primaire, secondaire, tertiaire voire quaternaire. Elle a une certaine charge à un pH donné, elle présente une certaine densité. De plus, elle possède un certain degré d'hydrophobicité. Tous ces critères peuvent être considérés dans la démarche de la purification. Ainsi, plusieurs techniques seront impliquées dans la stratégie de purification en fonction de ces paramètres. Les techniques de purification utilisées peuvent varier de celles simples et peu coûteuses (par exemple, précipitation

différentielle au sulfate d'ammonium) à d'autres plus compliquées et plus onéreuses telles que les techniques de chromatographie. De plus, le choix des techniques utilisées peut dépendre de la nature de la protéine à purifier.

Souvent, la précipitation au sulfate d'ammonium est utilisée en tant que première étape de purification des AFE. Par exemple, au cours de la purification de la FaeA d'*A. niger*, un rendement d'activité enzymatique de 69% a été obtenu lors de la précipitation au sulfate d'ammonium à 80% de saturation. Cependant, seulement 24% de l'activité ont été récupérés avec 50% de saturation en sel (Faulds et Williamson, 1994). Par ailleurs, à 80% de saturation en sulfate d'ammonium, 48% d'activité ont été obtenus lors de la purification de l'AFE de *L. acidophilus*, mais avec un facteur de purification relativement élevé (6,5) (Wang *et al.*, 2004).

Pour certaines AFE, cette étape de précipitation est remplacée par une ultrafiltration à l'aide de membranes avec un seuil de coupure de 10 à 30 kDa pour concentrer les échantillons (Faulds et Williamson, 1991 ; Donaghy *et al.*, 2000 ; Kroon *et al.*, 2000 ; Rumbold *et al.*, 2003 ; Topakas *et al.*, 2005b).

Cependant, dans d'autres études, l'ultrafiltration est réalisée avant l'étape de la précipitation au sel. C'est le cas de la FaeB d'*A. niger* pour laquelle une saturation en sulfate d'ammonium de 70-100% a été utilisée. D'autres activités AFE ont également été observées pour 40% et 40-70% de saturation en sel, ce qui peut confirmer la présence de plusieurs AFE (avec différentes spécificités de substrat) chez ce micro-organisme (Kroon *et al.*, 1996).

Une ultrafiltration suivie par une précipitation au sulfate d'ammonium a également été utilisée comme première étape de purification des trois AFE de *T. stipitatus* (Garcia-Conesa *et al.*, 2004).

Dans les étapes suivantes de purification des AFE, ce sont généralement des techniques de chromatographie qu'on utilise, notamment la chromatographie d'échange d'ions (anions et/ou cations), d'interactions hydrophobes et/ou la chromatographie par gel-filtration. Par exemple, le premier essai de purification d'une AFE microbienne a été effectué par Faulds et Williamson en 1991 sur l'AFE de *S. olivochromogenes*. Le tableau 5, ci-dessous, résume le résultat de cette purification.

Tableau 5. Purification de l'AFE de *S. olivochromogenes*. CEA : chromatographie d'échange d'anions, CIH : chromatographie d'interactions hydrophobes. D'après Faulds et Williamson, 1991.

Etape	Protéines totales (mg)	Activité totale AFE (U*)	Activité spécifique AFE (U*/mg)	Facteur de purification	Rendement (%)
Surnageant	1024	4,00	0,004	1,00	100
1 ^{ère} CEA (BioGel A)	218	2,95	0,014	3,47	74
2 ^{ème} CEA (Mono Q)	96	0,42	0,004	1,11	10
gel-filtration (Sephacryl)	3	0,16	0,054	13,5	4
CIH	0,46	0,22	0,190	47,5	5,5

* 1U = quantité d'enzyme libérant 1 μ mol d'AF par min à pH 6 et à 50 °C.

Le surnageant a été concentré par ultrafiltration avant la première étape de chromatographie d'échange d'anions sur une colonne BioGel A. Des pigments noirs ont été éliminés grâce à cette étape de chromatographie qui a également entraîné une petite augmentation de l'activité spécifique (mesurée en utilisant du férulate de méthyle comme substrat, **Tableau 5**).

Une diminution du rendement et de l'activité spécifique a été observée lors de la deuxième étape de chromatographie d'échange d'anions sur une colonne Mono Q. L'enzyme n'a pas été retenue dans les deux colonnes échangeuses d'anions utilisées, mais dans la colonne de chromatographie gel-filtration (Sephacryl S200). Enfin, un facteur de purification de l'ordre de 47,5 et une activité spécifique AFE de 0,19 U/mg de protéines ont été obtenus après la dernière étape de purification par chromatographie d'interactions hydrophobes (**Tableau 5**).

II.9. Applications des acide férulique estérases

Aujourd'hui, les AFE sont exploitées dans plusieurs domaines industriels. Le rôle naturel de ces enzymes, impliqué dans l'hydrolyse de la paroi végétale, permet leur utilisation pour produire de l'acide férulique à partir de déchets agroalimentaires tels que ceux issus de la brasserie et de l'industrie du sucre. L'acide férulique est connu actuellement pour ses propriétés intéressantes notamment en tant qu'antioxydant (§ **I.1.3**). Ainsi, de nouvelles approches sont explorées par plusieurs travaux de recherche pour exploiter les déchets agroalimentaires en vue de produire de nouveaux composés à haute valeur ajoutée (Tapin *et al.*, 2006).

Dans la papeterie, l'utilisation des AFE avec d'autres hydrolases comme les xylanases, favorise l'extraction de la lignine conduisant d'une part à la réduction de la consommation du chlore utilisé dans les étapes de blanchiment, et d'autre part à l'obtention de pulpes plus brillantes (Topakas *et al.*, 2007).

Les AFE pourraient également être exploitées, avec les xylanases et les cellulases, pour la conversion de la cellulose et des hémicelluloses en éthanol-carburant (Topakas *et al.*, 2007).

En outre, les AFE sont depuis plus récemment utilisées en biocatalyse. Leur potentiel synthétique en milieu hydro-organique attire actuellement l'attention d'un grand nombre de chercheurs. Par exemple, Topakas *et al.* (2003b) ont étudié la capacité d'une AFE de *Fusarium oxysporum* (la FAE-II) à estérifier plusieurs acides phénoliques en utilisant comme solvant un mélange de *n*-hexane/1-propanol/eau. La synthèse de férulate de pentyle par une AFE d'*A. niger* (la FaeA) a aussi été réalisée dans des micro-émulsions eau/huile (Giuliani *et al.*, 2001). Ces recherches ont pour but d'améliorer les propriétés de certaines molécules, telles que les acides hydroxycinnamiques, afin de les exploiter dans différents domaines industriels. Nous allons ultérieurement traiter ce sujet en détail dans la partie IV de ce chapitre.

III. Les *Streptomyces*

Les systèmes enzymatiques des actinomycètes, ordre auquel appartiennent les *Streptomyces*, sont capables d'hydrolyser les composés lignocellulosiques issus de la paroi végétale. La production des enzymes extracellulaires, impliquées dans la dégradation de la paroi cellulaire végétale, dont des AFE, a déjà été rapportée chez certains *Streptomyces* tels que *Streptomyces flavogriseus* (MacKenzie *et al.*, 1984) et *S. olivochromogenes* (MacKenzie *et al.*, 1987).

Etant donné qu'un *Streptomyces*, *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877, a été sélectionné au cours de ces travaux de thèse pour la production d'AFE, ce genre bactérien est abordé de façon un peu plus détaillée dans les paragraphes suivants.

III.1. Généralités

Le genre *Streptomyces* forme un sous-groupe des streptomycètes qui sont les membres les plus étudiés des actinomycètes. D'après les classifications des micro-organismes, les actinomycètes constituent un groupe de bactéries Gram positives, aérobies, dont l'ADN est habituellement riche en guanine et en cytosine. La majorité d'entre eux sont filamenteuses ou sous forme de baguette. Généralement, ils ne sont pas capables de se déplacer pendant la phase végétative (Madigan *et al.*, 1997). Les actinomycètes sont abondamment présents dans tous les environnements (par exemple, dans les sols, les bassins d'eau fraîche et dans les sédiments profonds de la mer, Colquhoun *et al.*, 1998). Bien que les *Streptomyces* ne soient pas visibles à l'œil, leur présence abondante est perceptible grâce à un composé volatile appelé géosmine, qui est responsable de l'odeur de terre ou de moisi caractéristique des forêts et des caves humides (Gust *et al.*, 2003).

Les *Streptomyces* sont bien connus pour la production de nombreux métabolites secondaires parmi lesquels un grand nombre d'antibiotiques est utilisé actuellement en médecine (Bentley *et al.*, 2002). En 1952, le prix Nobel a été attribué à Selman A. Waksman pour sa découverte d'une molécule agissant contre l'agent responsable de la tuberculose, l'antibiotique streptomycine, produit par *Streptomyces griseus* (Smith, 2000).

III.2. Cycle de développement des *Streptomyces*

Les valeurs optimales de pH et de température pour la croissance cellulaire de la majorité de *Streptomyces* sont comprises entre 6,5 et 8,0 et entre 25 et 35 °C, respectivement. Leur croissance peut s'effectuer en milieu solide ou liquide. Néanmoins, l'étude d'un cycle complet de développement se réalise préférentiellement en milieu solide. Ce cycle de croissance conduit à la formation de spores. La sporulation est une forme de résistance permettant la propagation de l'espèce et la survie dans des conditions défavorables (changement de pH et de température, carence en nutriments).

III.2.1. La croissance en milieu solide

Les streptomycètes présentent deux phases de croissance distinctes. Initialement, un mycélium végétatif branchu se forme colonisant le substrat (**Fig. 13-A**). Leurs enzymes excrétées dégradent les polymères organiques, qui se trouvent par exemple dans les matériaux des plantes, en des molécules plus petites servant de nutriments pour la croissance du mycélium. Dans la deuxième phase de croissance, des hyphes poussent vers l'extérieur du substrat dans l'air conduisant à la formation de colonies blanches ayant un aspect pelucheux (**Fig. 13-D**).

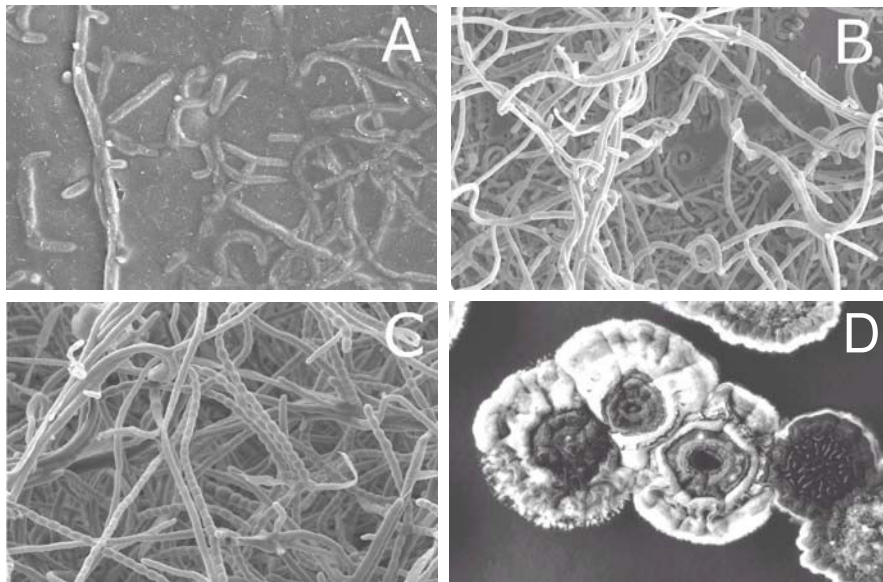


Fig. 13. Cycle de développement de *Streptomyces coelicolor* sur un milieu solide. Les streptomycètes présentent un développement complexe. Dans un premier temps, un mycélium filamenteux colonise son substrat (**A**). Ensuite, après une période de la croissance assimilative, des hyphes aériens se développent (**B**). Ces hyphes forment par la suite des chaînes d'exospores grises (**C**). La formation des hyphes rend les colonies blanches et pelucheuses (**D**) (Claessen, 2004).

Les hyphes aériens vont ensuite se différencier par cloisonnement. Ils subissent de multiples divisions cellulaires conduisant à la formation de chaînes de spores. Chacune de ces chaînes peut contenir 50 à 100 spores unigénomiques. En raison de la présence d'un pigment qui se trouve dans les parois des spores, les colonies obtenues sont grises. Les spores produites se dispersent par le vent ou les animaux.

III.2.2. La croissance en milieu liquide

Etant donné que les *Streptomyces* sont des bactéries aérobies strictes, leur croissance en milieu liquide nécessite une aération par agitation et/ou par alimentation en oxygène. Trois types de morphologies peuvent être rencontrés lors de la culture liquide (**Fig. 14**). Des mycéliums filamenteux se forment dans un premier temps. Ceux-ci se ramifient conduisant par la suite à la formation d'enchevêtrements ou encore de pelotes denses dont la taille peut atteindre, à l'extrême, quelques millimètres (Drouin, 1996 ; Amanullah *et al.*, 2000). La formation de pelotes peut entraîner une limitation du transfert d'oxygène et/ou des nutriments du milieu de culture vers les bactéries situées à l'intérieur de la pelote (Papagianni, 2004).

Il est à noter que la sporulation en milieu liquide est rare. Cependant, elle peut avoir lieu dans certain cas, par exemple suite à un manque en azote ou en phosphore (Kendrick et Ensign, 1983 ; Daza *et al.*, 1989).

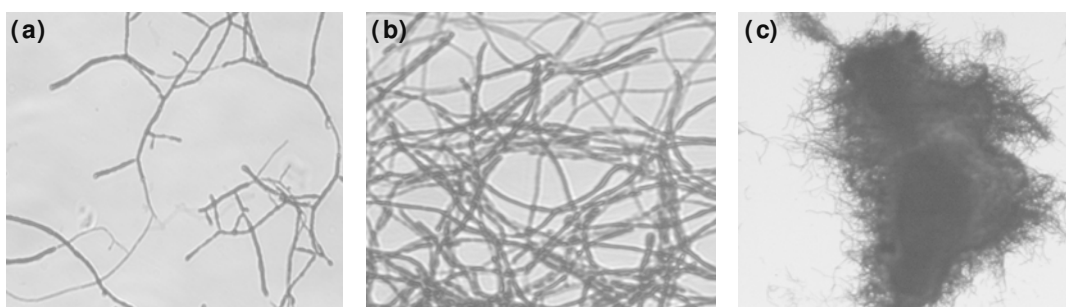


Fig. 14. Morphologies de *S. ambofaciens* ATCC 23877 rencontrées lors d'une culture liquide réalisée au cours de ce travail. Formation des mycéliums libres (a) et leurs enchevêtrements (b), grossissement X 1000. Formation de pelotes (c), grossissement X 100.

III.3. Les *Streptomyces* : une source importante d'enzymes

Les *Streptomyces* jouent un rôle important dans l'écologie des sols et dans la dégradation d'une variété de composés polymériques végétaux, tels que la cellulose et le xylane. Au cours de ces dernières années, plusieurs espèces de *Streptomyces* ont été

isolées à partir de différents environnements. De plus, plusieurs études ont rapporté la production de cellulases et d'AFE par ces micro-organismes. D'autres activités enzymatiques ont également été identifiées chez des *Streptomyces*. Le tableau 6 regroupe certaines de ces enzymes produites par ce genre bactérien.

Tableau 6. Différentes enzymes produites par des *Streptomyces*.

Enzyme	Source	Référence
AFE	<i>S. olivochromogenes</i>	MacKenzie <i>et al.</i> , 1987
AFE	<i>S. avermitilis</i> CECT 3339	Garcia <i>et al.</i> , 1998a
AFE	<i>S. avermitilis</i> UAH30	Garcia <i>et al.</i> , 1998b
AFE	<i>Streptomyces</i> sp. UAH 47	Hernandez <i>et al.</i> , 2001
AFE	<i>Streptomyces tendae</i>	Ferreira <i>et al.</i> , 2007
AFE	<i>Streptomyces</i> sp.	Mukherjee <i>et al.</i> , 2007
Coumarate estérase	<i>Streptomyces viridosporus</i>	Deobald et Crawford, 1987
Exoglucanase	<i>Streptomyces flavogriseus</i>	MacKenzie <i>et al.</i> , 1984
Cellulase	<i>S. viridosporus</i>	Deobald et Crawford, 1987
Endoglucanase	<i>Streptomyces</i> sp. F2621	Tuncer <i>et al.</i> , 2004
Endoglucanase	<i>Streptomyces rochei</i> A2	Tamburini <i>et al.</i> , 2004
Xylanase	<i>S. viridosporus</i>	Deobald et Crawford, 1987
Xylanase	<i>Streptomyces</i> sp. AMT-3	Nascimento <i>et al.</i> , 2002
Xylanase	<i>S. avermitilis</i> CECT 3339	Bartolomé <i>et al.</i> , 2003
Xylanase	<i>Streptomyces</i> sp. F2621	Tuncer <i>et al.</i> , 2004
Aldéhyde aromatique oxydase	<i>S. viridosporus</i>	Deobald et Crawford, 1987
Peroxydase	<i>Streptomyces</i> sp. F2621	Tuncer <i>et al.</i> , 2004
Acétylxylane estérase	<i>Streptomyces lividans</i>	Nisole <i>et al.</i> , 2006
Polygalacturonase	<i>S. tendae</i>	Ferreira <i>et al.</i> , 2007
Cinnamate: coenzyme A Ligase	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	Kaneko <i>et al.</i> , 2003
Kinase	<i>S. coelicolor</i> A3(2)	Sawai <i>et al.</i> , 2004
Acylase	<i>Streptomyces mobaraensis</i>	Koreishi <i>et al.</i> , 2006

IV. Synthèse d'esters par voie enzymatique : une utilisation récente des acide férulique estérases

IV.1. Estérification chimique et estérification enzymatique

IV.1.1. Estérification chimique

Dans cette méthode traditionnelle de synthèse, les catalyseurs chimiques utilisés sont soit des catalyseurs acides ou basiques soit des substrats activés tels que les chlorure d'acides. Un exemple de ce type de catalyse peut être la synthèse de polyesters textiles qui s'effectue actuellement à une échelle industrielle.

Les conditions réactionnelles utilisées en estérification chimique sont souvent drastiques (pH, température, etc.) ce qui peut conduire dans certains cas à des dégradations importantes des substrats (en oléochimie par exemple). D'autre part, l'utilisation des substrats activés peut mener à la synthèse de sous-produits toxiques. Cependant, à cause du manque de sélectivité des estérifications chimiques, les recherches se sont orientées aujourd'hui vers le développement de procédés utilisant la catalyse enzymatique qui répond mieux au besoin croissant de réactions chimio, régio et énantiosélectives.

IV.1.2. Estérification enzymatique

Ce sont différentes enzymes qui catalysent ce type de réaction avec, la plupart du temps, une haute sélectivité. De plus, les conditions réactionnelles utilisées dans cette catalyse enzymatique sont douces et le nombre d'étapes nécessaires à l'obtention d'un produit est généralement beaucoup plus réduit. Pour ces raisons, la catalyse enzymatique peut être une excellente méthode afin de réaliser des réactions d'estérification. De plus, le choix d'un procédé enzymatique seul ou en contribution d'un procédé chimique peut être justifié par le respect de l'environnement et de la législation correspondante.

Actuellement, les hydrolases sont les enzymes le plus souvent utilisées dans les secteurs industriels (Hari Krishna, 2002). A titre d'exemple, les réactions catalysées par les lipases sont largement mises en œuvre (détergents, oléochimie).

Aujourd'hui, une production par voie enzymatique de molécules semble être intéressante pour certains domaines industriels tels que la chimie fine et l'industrie pharmaceutique (Zaks, 2001). Néanmoins, la majorité de ces molécules ont très souvent une solubilité réduite en phase aqueuse. C'est pourquoi de nombreux chercheurs se sont intéressés à réaliser des réactions enzymatiques en milieu non aqueux surtout après la découverte du maintien de l'activité de certaines enzymes dans ces milieux. Cela augmente, en outre, le rendement des estérifications qui restent très limitées en milieu purement aqueux.

IV.2. Enzymes catalysant l'estérification

Les enzymes responsables de la synthèse des esters dans les organismes vivants sont des acyles transférases. Elles permettent de greffer un groupement acyle (provenant le plus souvent d'un substrat activé : un acyl-CoA) sur une fonction alcool. Par contre, l'utilisation des dérivés du coenzyme A est évitée dans les procédés industriels, essentiellement en raison de leurs coûts élevés. Néanmoins, certains chercheurs ont réussi à recycler ce coenzyme mais avec de faibles rendements (Nakajima *et al.*, 2000).

Il existe cependant des enzymes catalysant l'hydrolyse et la synthèse des liaisons esters sans coenzyme. Les lipases et les estérases forment une grande catégorie de ces enzymes. Classiquement, les lipases sont différenciées des estérases par le phénomène d'activation interfaciale. En effet, les lipases ont la capacité de s'adsorber à l'interface huile/eau ce qui conduit à une augmentation de leur pouvoir catalytique. Dans un milieu à faible teneur en eau, les estérases et les lipases peuvent catalyser la synthèse d'esters notamment par hydrolyse inverse ou par transestérification.

Certaines protéases sont également connues pour pouvoir hydrolyser et parfois synthétiser des esters en milieux organiques. Parmi les protéases à sérine, nous pouvons citer, à titre d'exemple, l' α -chymotrypsine, la subtilisine et la papaïne (Wong et Whitesides, 1994). Récemment, une synthèse d'esters de saccharose (2-O-lauroyl-saccharose) par une métalloprotéase, la thermolysine a également été effectuée (Pedersen *et al.*, 2002).

IV.3. Facteurs influençant les réactions de synthèse

Les réactions de synthèse sont gouvernées par plusieurs paramètres pouvant être liés au milieu réactionnel, à la nature de l'enzyme, à l'activité de l'eau et à la nature du substrat.

IV.3.1. Effet du milieu réactionnel

IV.3.1.1. nature des milieux

Les systèmes biologiques sont essentiellement des systèmes aqueux. Ils forment naturellement des milieux convenables pour les enzymes. Cependant, les milieux organiques pauvres en eau peuvent également permettre à certaines réactions enzymatiques d'avoir lieu. L'activité enzymatique dans ces milieux non aqueux a été rapportée pour la première fois à la fin du 19^{ème} siècle (Hill, 1898 ; Kastle et Loevenhart, 1900 ; Bourquelot et Bridel, 1913). Néanmoins, les recherches ont réellement commencé pendant les années 1980 avec la mise en évidence du maintien de nombreuses activités enzymatiques en milieu organique. De plus, il a été constaté qu'une très faible teneur en eau n'était pas défavorable au maintien de l'activité enzymatique de certaines enzymes telles que les lipases (Zaks et Klivanov, 1985). Généralement, les hydrolases catalysent des réactions d'hydrolyse en milieu aqueux. Par contre, en milieu non aqueux, une teneur en eau très faible permet d'orienter l'équilibre thermodynamique vers la synthèse (**Fig. 15**).

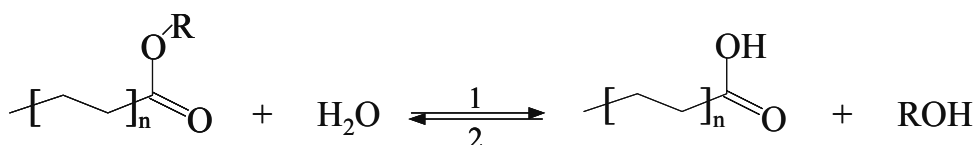


Fig. 15. Réaction catalysée par une hydrolase en fonction du milieu. (1) : milieu aqueux : **hydrolyse** ; (2) : milieu non aqueux : **synthèse**.

Les milieux utilisés peuvent être divisés en plusieurs types :

- les milieux organiques et hydro-organiques : substrats et enzyme sont solubilisés ou suspendus dans un solvant organique. Suivant la miscibilité de ce solvant avec l'eau, la teneur en eau devra être ajustée pour maintenir l'activité enzymatique.
- les milieux biphasiques : dans ce cas, substrats, enzyme et produits se retrouvent dans plusieurs phases. Généralement, l'enzyme est en solution dans la phase

aqueuse, tandis que la phase organique sert de réservoir pour les substrats hydrophobes et permet l'extraction des produits formés.

- les milieux sans solvant : les réactions peuvent s'effectuer sans solvant rajouté si les réactifs sont miscibles ou solubles l'un dans l'autre. Ce système est notamment utilisé pour la modification de triglycérides (Selmi *et al.*, 1998 ; Borg *et al.*, 2001). Ce type de milieu est conseillé pour éviter l'utilisation de solvants coûteux et parfois toxiques et inflammables.
- les systèmes en phase gazeuse : ils peuvent être utilisés pour faire réagir des substrats de faible masse moléculaire, vaporisables à faible température (Lamare et Legoy, 1993 ; Lamare *et al.*, 1996).
- les systèmes supercritiques : les gaz supercritiques (par exemple le CO₂ supercritique) ont une faible viscosité et d'excellentes propriétés solvantes. De plus, ils peuvent être utilisés dans les industries alimentaire et pharmaceutique grâce à leur non toxicité (Cernia et Palocci, 1997).
- les milieux ioniques : actuellement, plusieurs recherches se focalisent sur leur utilisation car ils peuvent améliorer l'activité, la stabilité et la sélectivité des préparations enzymatiques (Madeira-Lau *et al.*, 2000 ; Kim *et al.*, 2001).

IV.3.1.2. Choix du solvant organique

Le choix du solvant à utiliser dans les systèmes réactionnels de synthèse en milieu organique est très critique notamment dans les domaines de l'agroalimentaire et de la pharmacie.

Parmi les conditions pouvant restreindre l'utilisation de certains solvants, nous pouvons citer les suivantes : le solvant doit être non toxique et facilement séparable des autres constituants du milieu. Il doit permettre la solubilisation du substrat. Le solvant doit également être compatible avec l'activité enzymatique, il ne doit donc pas affecter la structure tridimensionnelle de la protéine ainsi que la couche d'hydratation indispensable à l'activité enzymatique.

IV.3.2. Nature de l'enzyme

Ce paramètre est lié à la structure des substrats utilisés. La sélectivité des enzymes vis-à-vis des substrats dépend, d'une part, des interactions stériques entre le site actif de l'enzyme et le substrat, et d'autre part, de la nature et de la position des atomes du substrat qui doivent permettre d'établir les liaisons électrostatiques convenables avec l'enzyme, ce qui conduit par la suite à la réalisation de la catalyse.

De plus, l'utilisation des enzymes libres ou immobilisées joue également un rôle très important sur l'activité de l'enzyme, sa stabilité et parfois sur sa spécificité. Plusieurs avantages peuvent être obtenus lors de l'immobilisation des enzymes. Notamment, ce processus améliore leur stabilité thermique (De Oliveira *et al.*, 2000). Il permet également de les séparer facilement du milieu réactionnel et éventuellement de les recycler (Coulon *et al.*, 1997).

Actuellement, six types d'immobilisation sont connus (Villeneuve *et al.*, 2000) : l'adsorption, la liaison covalente, l'inclusion, l'encapsulation, la granulation et la réticulation. Les immobilisations par adsorption et par liaison covalente sont les plus utilisées.

IV.3.3. L'activité thermodynamique de l'eau

Ce paramètre a la capacité de gouverner les niveaux d'hydratation de l'enzyme, des substrats et du solvant. La présence d'eau dans le milieu réactionnel permet à l'enzyme d'avoir la mobilité fonctionnelle nécessaire à une activité catalytique optimale. Pourtant, cette présence d'eau est thermodynamiquement défavorable à la réaction de synthèse des esters, mais certaines enzymes comme les lipases n'ont besoin que d'une petite quantité d'eau pour leur fonctionnement. Cette quantité d'eau est variable suivant l'enzyme considérée et le solvant utilisé. Par exemple, l'activité de l'eau nécessaire au fonctionnement de la lipase B de *Candida antarctica* en transestérification est inférieure à 0,1 (Humeau *et al.*, 1998), alors que celle de la lipase de *Candida rugosa* est de 0,33 (Ma *et al.*, 2002).

Par ailleurs, la présence d'eau peut aussi influencer le déroulement de la réaction enzymatique en modifiant la solubilité de certains substrats. Cette influence est observée, par exemple, lors des réactions de synthèse de sucroesters (Watanabe *et al.*, 2000). Dans ce cas, la présence d'eau au début de la réaction la dirige vers la synthèse d'esters car elle augmente la solubilisation du sucre dans les solvants miscibles à l'eau, ce qui peut mener à une augmentation de la vitesse initiale de réaction mais à une diminution des rendements de conversion obtenus.

IV.3.4. Effet de la nature des substrats

Les réactions d'estérification sont réversibles. Toutefois, une amélioration des rendements de conversion peut être effectuée grâce à l'utilisation de donneurs d'acyles activés, ce qui rend la réaction irréversible (**Fig. 16**). Parmi les nombreux esters activés utilisés en synthèse enzymatique peuvent être citer les esters de chloroéthyle, de trichloroéthyle, de cyanométhyle, les esters énoliques, les anhydrides d'acide, les thioesters, les oximes et les carbonates de vinyle.

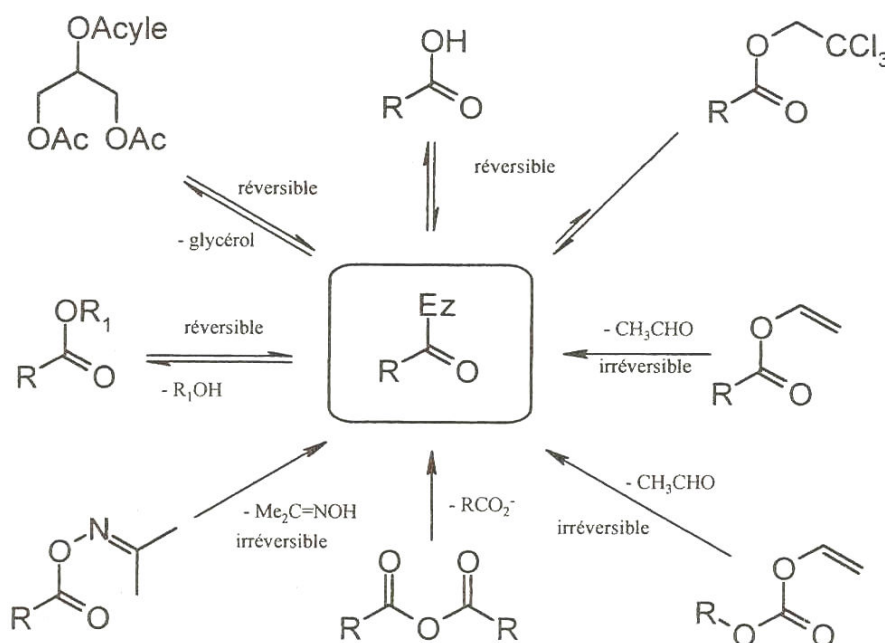


Fig. 16. Réactivité de différents donneurs d'acyle en catalyse enzymatique (Andersch *et al.*, 1997).

Un autre avantage de l'utilisation de tels donneurs d'acyles est qu'ils réagissent plus vite que leurs homologues éthylés ou méthylés. Mais malheureusement, une inhibition enzymatique causée par les groupements relargués au cours de la réaction a été observée avec beaucoup de ces substrats (Wong et Whitesides, 1994).

Il est également à noter que le rendement de conversion peut être amélioré en utilisant l'un des substrats en excès, ce qui entraîne un déplacement de l'équilibre thermodynamique de la réaction (Coulon *et al.*, 1996 ; Humeau *et al.*, 1998). D'autre part, l'élimination d'un des produits formés peut aussi être un moyen efficace pour améliorer le rendement de conversion. Cela peut être fait par évaporation à pression atmosphérique (Fregapane *et al.*, 1991), par évaporation sous pression réduite (Weber *et al.*, 2001), par pervaporation (Bartling *et al.*, 2001) ou encore par précipitation du produit formé (Virto et Adlercreutz, 2000).

IV.4. Les acide férulique estérases en synthèse

Plusieurs lipases, libres ou immobilisées, peuvent catalyser l'estérification des acides organiques ainsi que l'acylation des thiols et des amines (Habulin *et al.*, 1996, Karra-Chaabouni *et al.*, 1996). Malgré le grand nombre d'études sur l'utilisation des estérases et des lipases en synthèse, l'estérification enzymatique des acides phénoliques a rarement été rapportée. Une lipase immobilisée de *C. antarctica* a été capable d'estérifier des alcools gras avec des acides phénoliques dans les milieux alcooliques avec des rendements variant de 3 à 98% selon la nature des alcools gras et des acides phénoliques utilisés. Le rendement d'estérification avec les acides hydroxycinnamiques, comme l'acide férulique, a cependant été très faible (2% pendant trois jours) (Guyot *et al.*, 1997). La capacité d'autres lipases à catalyser l'estérification directe des acides phénoliques avec les alcools aliphatiques dans les milieux organiques a été rapportée, mais le rendement ainsi que la vitesse réactionnelle sont restés très faibles (Buisman *et al.*, 1998 ; Stamatis *et al.*, 1999 ; Compton *et al.*, 2000 ; Stamatis *et al.*, 2001).

Généralement, l'estérification par les lipases peut uniquement avoir lieu lorsque le cycle aromatique n'est pas hydroxylé en position *para*, et que la chaîne latérale est saturée. Par contre, l'estérification enzymatique des acides hydroxycinnamiques peut s'effectuer en utilisant les AFE comme biocatalyseurs (Vafiadi *et al.*, 2006b). Par

exemple, la FAE-II produite par *F. oxysporum* a été capable de catalyser l'estérification de plusieurs acides phénoliques à l'exception de l'acide cinnamique montrant la nécessité d'une hydroxylation du cycle phénolique (Topakas *et al.*, 2003b).

IV.4.1. Systèmes de micro-émulsions

L'utilisation des enzymes solubilisées dans les micro-émulsions eau/huile est une méthode de choix pour réaliser une bioconversion englobant des substrats hydrophiles, tels que les acides hydroxycinnamiques, et des produits hydrophobes. Ainsi, l'équipe de Giuliani a réussi en 2001 à synthétiser le férulate de pentyle avec un haut rendement (50-60%) par une AFE d'*A. niger* (la FaeA) en utilisant un système de micro-émulsion contenant du bromure de cetyltriméthylammonium : (CTAB)/hexane/1-pentanol. Toutefois, les applications de ce système à grande échelle peuvent être problématiques à cause de concentrations élevées en tensio-actifs. De plus, la solubilité des acides phénoliques, tels que l'acide férulique, est très limitée dans ces milieux (Topakas *et al.*, 2003b).

Les micro-émulsions sans tensio-actif représentent des dispersions de micro-gouttelettes aqueuses dans un solvant hydrophobe. Ces systèmes de dispersions sont transparents et stables thermodynamiquement et peuvent servir de milieux appropriés à la synthèse enzymatique (Khmelnitsky *et al.*, 1988 ; Vulfson *et al.*, 1991). Parmi les avantages de ces systèmes réactionnels de micro-émulsions peuvent être cités la résolution simplifiée du problème de séparation des produits de réaction ainsi que la réutilisation de l'enzyme (Khmelnitsky *et al.*, 1988). D'autre part, la solubilité des acides phénoliques, relativement polaires, augmente grâce à l'ajout d'une grande quantité d'alcool qui peut ou non servir de substrat.

Très récemment, le potentiel de ce système réactionnel de micro-émulsions sans tensio-actif a été rapporté pour l'estérification d'une variété d'acides phénoliques catalysée par des AFE dans des milieux ternaires composés soit de *n*-hexane/1-propanol/eau, soit de *n*-hexane/1-butanol/eau avec différentes proportions (Topakas *et al.*, 2003b,c ; Topakas *et al.*, 2004). Dans tous les cas, le comportement catalytique de l'AFE utilisée a été affecté par la composition du système réactionnel ternaire. La plus haute activité synthétique de l'enzyme a été observée dans le milieu qui contenait la plus faible teneur en eau avec une quantité importante de l'alcool. Par ailleurs, le

rendement de conversion pour l'estérification des dérivés d'acide hydroxycinnamique par la FAE-II de *F. oxysporum* (16% pour l'acide férulique par exemple, Topakas *et al.*, 2003b) a été plus important que celui observé en utilisant des lipases commerciales comme biocatalyseurs (2% pour l'acide férulique en utilisant la lipase immobilisée de *C. antarctica*, Guyot *et al.*, 1997). Il est d'ailleurs à noter que le rendement de l'estérification de l'acide férulique obtenu dans le système réactionnel sans tensio-actif a été plus faible que celui mesuré dans les micro-émulsions eau/huile formées par mélange du CTAB dans le *n*-hexane (Giuliani *et al.*, 2001). En revanche, la solubilité des dérivés d'acide cinnamique dans le premier système réactionnel, tels que l'acide férulique, a été 100 fois plus élevée que celle observée dans les micro-émulsions stabilisées par les tensio-actifs (Topakas *et al.*, 2003b).

IV.4.2. Synthèse d'esters sucre-acide phénolique

La capacité des AFE à catalyser la formation de la liaison ester sucre-acide phénolique a été rapportée pour la première fois en utilisant la StFaeC de *S. thermophile* et la TsFaeC de *T. stipitatus* (Topakas *et al.*, 2005b ; Vafiadi *et al.*, 2006b). Ces deux AFE ont été capables de transférer le résidu d'acide férulique sur le L-arabinose dans un milieu réactionnel ternaire composé de *n*-hexane/*t*-butanol/eau (53,4:43,4:3,2 v/v/v).

Les esters de sucres trouvent actuellement plusieurs domaines d'applications tels que l'industrie des cosmétiques, des détergents et l'industrie pharmaceutique. Ces composés sont biocompatibles, biodégradables et possèdent des activités antimicrobiennes. Certaines estérifications entre les acides phénoliques et les sucres produisent également des agents anti-cancéreux ou anti-inflammatoires (Topakas *et al.*, 2005b).

IV.5. Acylation des flavonoïdes

Les flavonoïdes (**Fig. 17**) sont des composés polyphénoliques les plus caractéristiques des plantes supérieures. Ils participent à la pigmentation des fleurs et des fruits. Actuellement, plus de 4000 flavonoïdes naturels sont identifiés sous forme glycosylée la plus souvent. De plus, des substituants hydroxyles et méthoxyles peuvent être distribués sur le squelette carboné en C_{15} des flavonoïdes.

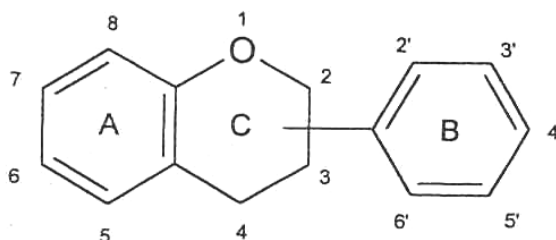


Fig. 17. Structure de base des flavonoïdes.

Les propriétés antioxydantes de flavonoïdes intéressent un grand nombre de chercheurs pour les impliquer dans différents domaines industriels. Cependant, beaucoup de recherches sont menées depuis maintenant une vingtaine d'années pour modifier ces molécules, via l'acylation par exemple, afin d'améliorer leurs propriétés par cette fonctionnalisation. Ainsi, le greffage d'un groupement phénolique peut, par exemple, entraîner une modification importante de la solubilité et/ou de la stabilité des flavonoïdes (Giusti et Wrolstrad, 2003).

IV.5.1. Les flavonoïdes acylés

Des groupements acyles peuvent être liés aux flavonoïdes, souvent sur la partie glycosidique (**Fig. 18**). Les groupements acyles les plus communément utilisés sont des acides phénoliques tels que l'acide *p*-coumarique, l'acide caféique et l'acide férulique.

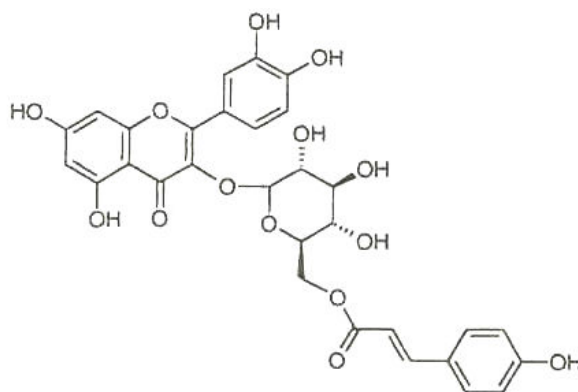


Fig. 18. Exemple d'un flavonoïde glycosylé acylé : l'ester *p*-coumarique de l'isoquercitrine (Danieli *et al.*, 1993).

IV.5.2. Solubilité des flavonoïdes

La plupart des flavonoïdes, exceptés les anthocyanes, présentent une solubilité très faible dans l'eau. La présence d'un résidu glycosyle les rend moins solubles, voire insolubles dans les solvants apolaires. Par contre, les dérivés hautement méthoxylés sont particulièrement solubles dans ces solvants. Cette faible solubilité pose un problème de biodisponibilité, à la fois dans les phases aqueuses et dans les phases lipidiques. C'est pourquoi la modification par voie chimique ou enzymatique des flavonoïdes est envisagée actuellement surtout pour améliorer leur solubilité (Abou El Hassan *et al.*, 2000).

IV.5.3. Stabilité des flavonoïdes

La majorité des flavonoïdes sont relativement stables. Cependant, ils peuvent subir des dégradations plus ou moins favorisées par les milieux alcalins, les hautes températures, les oxydants et la lumière.

Ainsi, les anthocyanes constituent une grande famille de flavonoïdes qui sont utilisées comme colorants alimentaires. Néanmoins, leur utilisation est restreinte par leur faible stabilité à la lumière, à la température et aux pH élevés (Giusti et Wrolstad, 2003).

Il est d'ailleurs à noter que l'augmentation du nombre de résidus glycosiles liés au sucre en position 3 ou à un autre hydroxyle phénolique améliore cette stabilité. Ce sont surtout les acides hydroxycinnamiques greffés sur les sucres qui améliorent la stabilité

des flavonoïdes. De ce fait, plus les flavonoïdes sont acylés plus ils sont stables à la chaleur, à la lumière et au pH.

IV.5.4. Les acide férulique estérases : une alternative pour l'acylation des flavonoïdes

Ce sont les lipases qui sont le plus généralement utilisées pour catalyser l'acylation de flavonoïdes. La capacité de la lipase B de *C. antarctica* à estérifier des flavonoïdes avec l'acide cinnamique a déjà été rapportée (Enaud, 2004). Toutefois, les esters de flavonoïdes les plus intéressants tels que les esters caféiques et féruliques n'ont pas pu être obtenus à l'aide de cette enzyme. Cela a été attribué au manque de sélectivité de cette lipase vis-à-vis du groupement acyle. La meilleure solution pour estérifier des flavonoïdes avec des acides phénoliques conjugués (par exemple : acide férulique et/ou caféique) serait donc d'utiliser des enzymes plus spécifiques de ces acides telles que les AFE.

Objectifs de l'étude

Objectifs de l'étude

Les acides hydroxycinnamiques possèdent un potentiel industriel important dû à leurs propriétés anti-oxydantes. Cependant, leur faible solubilité en milieu lipidique limite leurs applications industrielles alimentaires et cosmétiques. L'hydrophobicité de ces composés peut s'accroître par l'estérification de leur groupement carboxylique avec des molécules aliphatiques, telles que les alcools, en utilisant des AFE comme catalyseurs (Topakas *et al.*, 2003b).

La majorité des recherches se focalisent sur l'identification, la purification et la caractérisation des activités AFE. A l'inverse, leur potentiel synthétique en milieu hydro-organique n'a pas fréquemment été étudié essentiellement en raison de leur faible disponibilité. Actuellement, l'activité AFE n'est commercialisée que sous forme de mélanges enzymatiques destinés à l'hydrolyse des parois végétales.

Au sein du Laboratoire Biocatalyse Bioprocédés, des études ont déjà été réalisées pour estérifier l'acide férulique ou l'acide caféique notamment avec des flavonoïdes en utilisant la lipase B de *C. antarctica*, mais aucune synthèse n'a été concluante. De plus, de faibles rendements ont été observés lors de l'estérification de ces acides phénoliques avec des alcools (Enaud, 2004).

C'est pourquoi, l'utilisation d'une enzyme plus spécifique de ces acides conjugués, telle que l'AFE, peut conduire à réaliser ce type de synthèse. Pour cette raison, les travaux réalisés lors de cette thèse ont pour but d'obtenir une AFE en quantité suffisante permettant son utilisation comme biocatalyseur en milieu hydro-organique.

Ainsi, nous avons envisagé d'une part de produire l'AFE directement par des souches bactériennes et d'autre part de purifier l'enzyme à partir d'un mélange enzymatique commercial (DepolTM 740L) produit par le champignon *Humicola* sp.

Après la caractérisation des enzymes obtenues, leur potentiel pour la synthèse d'esters phénoliques sera abordé.

CHAPITRE 2

Matériels et méthodes

SOMMAIRE

<u>I. Sources d'acide férulique estérases</u>	57
I.1. Source commerciale (DepolTM 740L)	57
I.2. Sources bactériennes	57
<u>II. Produits chimiques</u>	58
<u>III. Composition et préparation des milieux de culture</u>	60
III.1. Milieux de culture pour <i>Bacillus</i> sp	60
III.1.1. Bouillon nutritif	60
III.1.2. Gélose nutritive	60
III.1.3. Milieu liquide pour la production de l'acide férulique estérase	60
III.2. Milieux de culture pour <i>Lactobacillus</i> sp	61
III.2.1. MRS (De Man, Rogosa, Sharpe) liquide	61
III.2.2. MRS gélosé	61
III.2.3. Milieu liquide pour la production de l'acide férulique estérase	61
III.3. Milieux de culture pour <i>Streptomyces</i> sp	61
III.3.1. Milieu CS liquide (milieu de Croissance pour <i>Streptomyces</i> sp.)	61
III.3.2. Milieu CS gélosé	62
III.3.3. Milieu liquide pour la production de l'acide férulique estérase	62
<u>IV. Conditions de culture</u>	62
IV.1. En tube à essai	62
IV.2. En fioles d'Erlenmeyer	62
IV.3. En bioréacteur	62
IV.4. Recherche de bactéries productrices d'acide férulique estérase	64
IV.4.1. En milieu solide	64
IV.4.2. En milieu liquide	65
<u>V. Mesure de l'activité acide férulique estérase</u>	66
V.1. Acide férulique estérase bactérienne	66
V.2. Acide férulique estérase issue du DepolTM 740L	68

<u>VI. Protocole de purification des acide férulique estérases</u>	68
VI.1. Précipitation à l'acétone	68
VI.2. Précipitation au sulfate d'ammonium	68
VI.3. Dialyse	69
VI.4. Chromatographie d'échange d'ions	69
VI.4.1. Appareillage utilisé.....	69
VI.4.2. Fractionnement par chromatographie d'échange d'anions.....	70
VI.4.3. Fractionnement par chromatographie d'échange de cations.....	71
<u>VII. Méthodes analytiques</u>	72
VII.1. Analyse par CLHP	72
VII.2. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)	76
VII.2.1. Préparation des échantillons protéiques.....	76
VII.2.2. Préparation des gels et conditions de migration.....	76
VII.3. Electrophorèse sur bande d'acétate de cellulose (conditions non dénaturantes)	77
VII.3.1. Réactifs utilisés.....	77
VII.3.2. Mode opératoire.....	77
VII.4. Détermination de la concentration en protéines	78
<u>VIII. Protocoles des synthèses enzymatiques</u>	80
VIII.1. Synthèses où l'accepteur d'acyle joue le rôle du solvant	80
VIII.2. Synthèses en milieu solvant	80
VIII.3. Synthèses avec le donneur d'acyle comme solvant	81

I. Sources d'acide férulique estérases

I.1. Source commerciale (Depol™ 740L)

Le Depol™ 740L est un mélange industriel contenant des enzymes hydrolytiques, dont essentiellement l'AFE, produites par le champignon *Humicola* sp. Elle est commercialisée par la société Biocatalysts sous forme d'un liquide brun très visqueux. Ce mélange est annoncé actif dans une gamme de température allant de 40 à 65 °C et pour un pH variant de 4 à 6.

I.2. Sources bactériennes

Au cours de ce travail, l'activité AFE a été recherchée chez plusieurs espèces de bactérie. Les espèces testées sont les suivantes :

- ✓ *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877, *Streptomyces pristinaespiralis* PR11 (Paquet, 1990) et *Streptomyces lividans* TK24 (Hopwood *et al.*, 1983).
- ✓ *Lactobacillus fermentum* DSM 20052 et *Lactobacillus fermentum* INRA 233.
- ✓ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 et *Bacillus licheniformis* CIP 5771.

Ces micro-organismes sont conservés à moyen terme (quelques mois) à –20 °C dans leurs milieux respectifs. A cet effet, les souches sont mises en culture dans leurs milieux liquides (voir ci-dessous). Ensuite, elles sont réparties de la façon suivante : pour les *Bacillus* et les *Lactobacillus*, 1 ml de chaque culture bactérienne est ajouté à 9 ml du milieu liquide neuf correspondant. Puis, ces suspensions bactériennes sont conservées à –20 °C. Par contre, les cellules de *Streptomyces* sont réparties et conservées à –20 °C directement après culture sans ajout de milieu neuf.

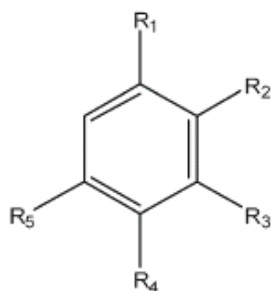
II. Produits chimiques

Les différentes substances utilisées au cours de ce travail sont répertoriées dans le tableau suivant :

Tableau 7. Substances chimiques utilisées au cours de cette étude.

Produit	Fournisseur	Masse molaire (g/mol)	Pureté %
Acide cinnamique	Fluka	148,16	> 99
Acide <i>p</i> -coumarique	Fluka	164,16	> 98
Acide hydrocaféique	Fluka	182,18	> 98
Acide caféique	Fluka	180,16	> 99
Acide férulique	Aldrich	194,18	> 98
Acide sinapique	Acros Organics	224,21	98
Acide vanillique	Fluka	168,15	> 97
Acide syringique	Merck	198,17	98
Cinnamate de méthyle	Fluka	162,19	99
Cinnamate d'éthyle	Fluka	176,21	98
Cinnamate de butyle	Fluka	204,26	-
<i>p</i> -Coumarate de méthyle	APIN Chemicals LTD	178,18	-
Caféate de méthyle	APIN Chemicals LTD	194,19	-
Férulate de méthyle	Extrasynthèse	208,20	-
Férulate d'éthyle	Aldrich	222,24	98
Sinapate de méthyle	APIN Chemicals LTD	238,24	-
Vanillate de méthyle	APIN Chemicals LTD	182,18	-
Syringate de méthyle	APIN Chemicals LTD	212,21	-
Phloridzine	Extrasynthèse	436,41	-
Son de blé désamidonné	A.R.D	-	-
Son de maïs désamidonné	A.R.D	-	-
Xylane d'avoine	Sigma	-	-
Pectine de betterave	Degussa	-	-
Tourteau de colza	Novance	-	-

De plus, les structures des différents substrats phénoliques utilisés dans cette étude sont présentées dans la figure 19.



Substrat	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Acide cinnamique	(CH=CH)COOH	H	H	H	H
Acide <i>p</i> -coumarique	(CH=CH)COOH	H	H	OH	H
Acide hydrocaféique	C ₂ H ₄ COOH	H	OH	OH	H
Acide caféique	(CH=CH)COOH	H	OH	OH	H
Acide férulique	(CH=CH)COOH	H	OCH ₃	OH	H
Acide sinapique	(CH=CH)COOH	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Acide vanillique	COOH	H	OCH ₃	OH	H
Acide syringique	COOH	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Cinnamate de méthyle	(CH=CH)C(O)OCH ₃	H	H	H	H
Cinnamate d'éthyle	(CH=CH)C(O)OC ₂ H ₅	H	H	H	H
Cinnamate de butyle	(CH=CH)C(O)OC ₄ H ₉	H	H	H	H
<i>p</i> -Coumarate de méthyle	(CH=CH)C(O)OCH ₃	H	H	OH	H
Caféate de méthyle	(CH=CH)C(O)OCH ₃	H	OH	OH	H
Férulate de méthyle	(CH=CH)C(O)OCH ₃	H	OCH ₃	OH	H
Sinapate de méthyle	(CH=CH)C(O)OCH ₃	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Vanillate de méthyle	C(O)OCH ₃	H	OCH ₃	OH	H
Syringate de méthyle	C(O)OCH ₃	H	OCH ₃	OH	OCH ₃

Fig. 19. Structures des substrats phénoliques utilisés au cours de cette étude.

III. Composition et préparation des milieux de culture

Différents milieux de culture solides et liquides sont utilisés au cours de ce travail. Les compositions de ces milieux varient selon les bactéries utilisées. L'ensemble des milieux est stérilisé par autoclavage pendant 20 minutes à 120 °C.

III.1. Milieux de culture pour *Bacillus* sp.

III.1.1. Bouillon nutritif

La composition de ce milieu est la suivante :

- Extrait de viande (#19022, Organotechnie) 3 g/l
- Tryptone (#104001, Biokar Diagnostics) 5 g/l

Le pH est ajusté à 7,0 à l'aide d'une solution de NaOH 4 N.

III.1.2. Gélose nutritive

- Extrait de viande (#19022, Organotechnie) 5 g/l
- Tryptone (#104001, Biokar Diagnostics) 10 g/l
- NaCl 5 g/l
- Agar bactériologique 20 g/l

Le pH est ajusté à 7,0 (à l'aide d'une solution de NaOH 4 N) avant l'ajout de l'agar.

III.1.3. Milieu liquide pour la production de l'acide férulique estérase

La composition de ce milieu est la suivante (Donaghy *et al.*, 1998) :

- Extrait de levure (#UY2010, Euromedex) 1 g/l
- (NH₄)₂SO₄ 1,30 g/l
- KH₂PO₄ 0,37 g/l
- MgSO₄.7H₂O 0,25 g/l
- CaCl₂.2H₂O 0,07 g/l
- FeCl₃ 0,03 g/l
- Xylane d'avoine 1% p/v

Le pH est ajusté à 6,5 à l'aide d'une solution de NaOH 4 N.

III.2. Milieux de culture pour *Lactobacillus* sp.

III.2.1. MRS (De Man, Rogosa, Sharpe) liquide

Ce milieu est recommandé pour les cultures de *Lactobacillus* sp. (De Man *et al.*, 1960). Sa composition est la suivante :

➤ Peptone de viande (#19543, Organotechnie)	10 g/l
➤ Extrait de viande (#19022, Organotechnie)	10 g/l
➤ Extrait de levure (#UY2010, Euromedex)	5 g/l
➤ Glucose	20 g/l
➤ Tween 80	1,08 g/l
➤ Phosphate di-potassique	2 g/l
➤ Acétate de sodium	5 g/l
➤ Citrate d'ammonium	2 g/l
➤ MgSO ₄ .7H ₂ O	0,20 g/l
➤ MnSO ₄ .H ₂ O	0,05 g/l

Le pH est ajusté à 6,8 à l'aide d'une solution de NaOH 4 N.

III.2.2. MRS gélosé

La composition de ce milieu est la même que le milieu liquide MRS, mais 20 g/l d'agar sont ajoutés juste après l'ajustement du pH à 6,8.

III.2.3. Milieu liquide pour la production de l'acide férulique estérase

Ce milieu est le même que le milieu liquide MRS, mais le glucose est remplacé par un des inducteurs testés à une concentration finale de 1% p/v (à l'exception du férulate d'éthyle : 0,1% p/v). Le pH de ce milieu est ajusté à 6,5 à l'aide d'une solution de NaOH 4 N.

III.3. Milieux de culture pour *Streptomyces* sp.

III.3.1. Milieu CS liquide (milieu de Croissance pour *Streptomyces* sp.)

Ce milieu est recommandé pour les cultures de *Streptomyces* sp. (Corvini, 2000). Sa composition est la suivante :

➤ Extrait de levure (#UY2010, Euromedex)	1 g/l
➤ Extrait de viande (#19022, Organotechnie)	1 g/l
➤ Dextrines blanches (#23276.361, Prolabo)	10 g/l

➤ $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,02 g/l

Le pH est ajusté à 7,2 à l'aide d'une solution de NaOH 4 N.

III.3.2. Milieu CS gélosé

La composition de ce milieu est la même que le milieu liquide CS, mais 20 g/l d'agar sont ajoutés juste après l'ajustement du pH à 7,2.

III.3.3. Milieu liquide pour la production de l'acide férulique estérase

Ce milieu est le même que le milieu liquide CS, mais les dextrines blanches sont remplacées par un des inducteurs testés à une concentration finale de 1% p/v (à l'exception du férulate d'éthyle : 0,1% p/v). Le pH de ce milieu est ajusté à 6,5.

IV. Conditions de culture

IV.1. En tube à essai

Dans un tube à essai, 9 ml de bouillon nutritif frais (pour les *Bacillus*) ou de milieu MRS frais (pour les *Lactobacillus*) sontensemencés avec 1 ml de la suspension cellulaire correspondante conservée à -20°C . Ces cultures sont incubées pendant une nuit à 37°C sans agitation.

IV.2. En fioles d'Erlenmeyer

Pour chaque espèce de *Streptomyces*, 50 ml de milieu CS frais sontensemencés, dans une fiole d'Erlenmeyer à chicanes, avec 5 ml d'une suspension de cellules conservée à -20°C . La culture est ensuite incubée pendant 48 h à 28°C sous agitation à 250 rpm.

IV.3. En bioréacteur

Quatre pré-cultures de *S. ambofaciens* ATCC 23877 sont réalisées comme décrit précédemment (§ IV.2). Après leur incubation pendant 48 h à 28°C sous agitation à 250 rpm, les pré-cultures sont utilisées pour ensemencer 1,8 l de milieu CS neuf contenant 1% p/v de son de blé désamidonné. La culture est poursuivie dans le bioréacteur pendant 48 h à 37°C sous agitation à 500 rpm. Le pH est réglé à 6,5 à l'aide d'une

solution de NaOH 1 N. Des prélèvements sont effectués au cours du temps pour doser l'activité AFE produite ainsi que l'acide férulique libéré dans le milieu de culture.

Le réacteur utilisé est de la marque Applikon et a un volume de 2 l (**Fig. 20**). Il est constitué des éléments suivants :

- ❑ cuve 2l Applikon.
- ❑ module de contrôle : Bio controller ADI 1030 Applikon.
- ❑ agitation : Stirrer controller P310 ADI 1032 Applikon.
- ❑ chauffage : type enveloppe chauffante.
- ❑ circuit de refroidissement (eau du réseau) commandé par électrovanne.
- ❑ sonde pH à gel DPAS Mettler Toledo.
- ❑ sonde de mesure du potentiel rédox : Mettler Toledo.
- ❑ sonde à O₂ Applikon.
- ❑ pompes Masterflex pump drive modèle 7016-20 (Cole Parmer).
- ❑ débitmètre massique : Bronkhorst Hi-Tech.

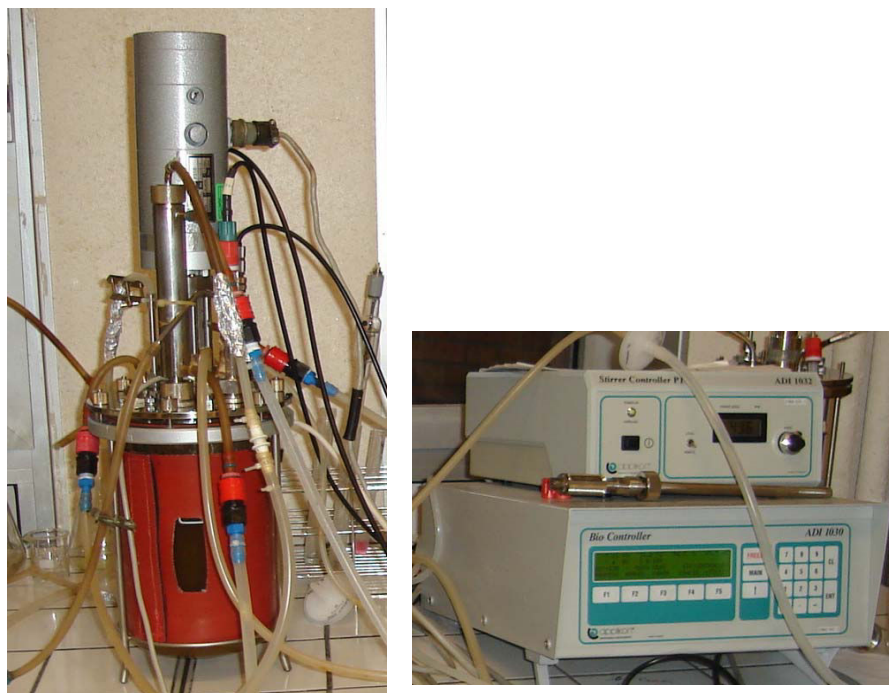


Fig. 20. Réacteur et Bio controller (Applikon).

IV.4. Recherche de bactéries productrices d'acide férulique estérase

IV.4.1. En milieu solide

Dans ce cas, le milieu utilisé est du MRS gélosé, mais sans ajout de glucose. Le pH de ce milieu est ajusté à 6,5 avant l'ajout d'agar. Après la stérilisation, une solution de férulate d'éthyle est ajoutée à une concentration finale de 0,1% p/v (Donaghy *et al.*, 1998). Le férulate d'éthyle est préalablement solubilisé dans du N, N-diméthylformamide (DMF) à une concentration de 10% p/v.

IV.4.1.1. Principe

Les boîtes de Pétri contenant du milieu MRS gélosé avec du férulate d'éthyle sont ensemencées en surface avec des colonies bactériennes à tester. Les boîtes sont incubées pendant 24 à 48 h à 37 °C. Une zone d'éclaircissement peut ensuite être détectée en périphérie des colonies possédant l'activité AFE. En effet, l'ajout de l'ester férulate d'éthyle dans le milieu MRS gélosé, destiné à détecter l'activité AFE, conduit à l'apparition d'un trouble homogène dans ce milieu. L'apparition des zones d'éclaircissement autour des colonies possédant l'activité AFE est due au clivage de l'ester par cette enzyme (**Fig. 21**). Cette méthode qualitative de détection a été décrite pour la première fois par Donaghy *et al.*, 1998 pour détecter des activités AFE chez des espèces bactériennes appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Bacillus*.

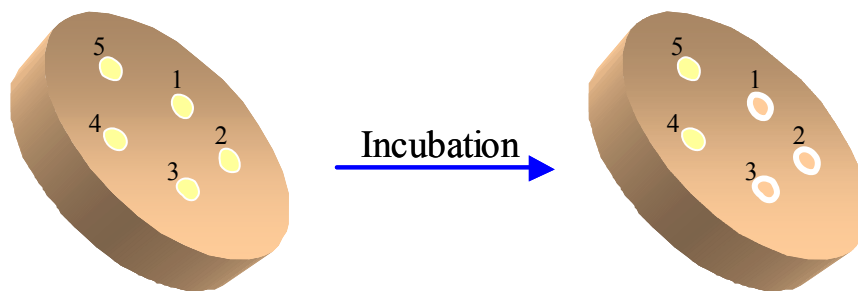


Fig. 21. Principe de la détection de l'activité AFE en milieu MRS gélosé. Un trouble est apparu dans le milieu après avoir ajouté du férulate d'éthyle. Des zones d'éclaircissement sont formées autour des colonies 1, 2, 3 produisant de l'activité AFE, alors que les colonies 4 et 5 ne sont pas productrices.

IV.4.1.2. Protocole suivi

Les pré-cultures bactériennes (§ IV.1 ; § IV.2) sont centrifugées à 4 °C pendant 15 min à 10000 rpm (BECKMAN, Avanti™ 30). Les culots cellulaires obtenus sont lavés trois fois avec de l'eau physiologique stérile (en centrifugeant dans les mêmes conditions à chaque fois). Puis, chacun des culots cellulaires lavés est suspendu dans 2,5 ml d'eau physiologique stérile. Ensuite, 200 µl de chaque suspension bactérienne obtenue sont déposés en surface des milieux gélosés correspondants. Les boîtes sont incubées pendant 24 h à 37 °C (ou pendant 48 h à 28 °C pour les *Streptomyces*). Ensuite, des fragments des colonies obtenues sont déposés à la surface du milieu MRS gélosé contenant du férulate d'éthyle. Les boîtes sont incubées par la suite pendant 24 à 48 h à 37 °C.

IV.4.2. En milieu liquide

Les bactéries possédant une activité AFE sont examinées pour leur capacité à produire l'AFE en milieu liquide en absence et en présence d'inducteur. Ces bactéries sont alors cultivées de la manière suivante : un inoculum (5% v/v) de chaque suspension bactérienne lavée (§ IV.4.1.2) est introduit dans le milieu liquide correspondant destiné à la production d'AFE avec ou sans inducteur. Lorsque les cultures de *Lactobacillus* sp. et de *Streptomyces* sp. sont réalisées en absence d'inducteur, 20 g/l de glucose ou 10 g/l de dextrines blanches sont ajoutés, respectivement, dans les milieux MRS et CS.

Les bactéries sont cultivées pendant deux jours (à 28 °C sous agitation à 120 rpm pour *L. fermentum* DSM 20052, *B. subtilis* ATCC 6633 et *B. licheniformis* CIP 5771, et à 37 °C sous agitation à 160 rpm pour *S. ambofaciens* ATCC 23877). Les prélèvements effectués au cours des cultures sont centrifugés pendant 15 min à 13400 rpm (Mini Spin, Eppendorf) avant filtration (0,22 µm, Millipore). Le filtrat est concentré, environ 10 fois, par ultrafiltration à l'aide de membranes avec un seuil de coupure de 10 kDa (Nanosep® Centrifugal Devices, PALL Life Science). Ensuite, afin de détecter l'activité AFE produite, 10 µl du filtrat concentré sont déposés à la surface du milieu MRS gélosé contenant du férulate d'éthyle. Les boîtes sont incubées pendant 24 à 48 h à 37 °C.

Cette méthode qualitative de mise en évidence de la présence d'activité AFE est également utilisée avec tous les échantillons liquides dans lesquels on désire vérifier la présence d'une activité AFE.

Parallèlement, des prélèvements sont effectués pour doser l'acide férulique libéré dans le milieu de culture. Chacun de ces prélèvements est centrifugé pendant 15 min à 13400 rpm (Mini Spin, Eppendorf) puis filtré (0,22 µm, Millipore). Le filtrat obtenu est ensuite dilué au cinquième par du méthanol/TFA, 100:0,01 v/v, homogénéisé pendant 20 secondes et centrifugé pendant 5 min à 13400 rpm (Mini Spin, Eppendorf). Le surnageant est ensuite filtré (0,22 µm) et analysé par chromatographie liquide à haute performance (CLHP).

V. Mesure de l'activité acide férulique estérase

V.1. Acide férulique estérase bactérienne

Différents protocoles ont été testés afin de déterminer la méthode la plus adéquate permettant la quantification de l'activité AFE de *S. ambofaciens* ATCC 23877, produite lors de la culture en milieu liquide. Ces protocoles sont présentés dans le tableau 8.

Les extraits de culture sont concentrés soit par ultrafiltration (environ 10 fois à l'aide de membranes de 10 kDa.) soit par précipitation au sulfate d'ammonium (50% de saturation). La concentration par ultrafiltration a été utilisée pour tous les protocoles (**Tableau 8**), alors que la concentration par précipitation au sulfate d'ammonium a été uniquement utilisée pour le protocole 6. Dans ce cas, le culot obtenu après précipitation des protéines, contenues dans 10 ml de l'extrait de culture, est repris dans 200 µl d'eau distillée. Ensuite, 150 µl de la solution obtenue sont dilués dans 1350 µl de férulate d'éthyle (1,33 mM) pour réaliser la mesure de l'activité AFE. Il est également à noter que le férulate d'éthyle se dissout difficilement dans le tampon phosphate. La dissolution complète n'est obtenue qu'après environ 1 h à 40 °C sous agitation.

Tableau 8. Différentes conditions de dosage testées pour mettre au point la mesure de l'activité AFE produite par *S. ambofaciens* ATCC 23877. FE, FM, SB et MOPS représentent le férulate d'éthyle, le férulate de méthyle, le son de blé désamidonné et l'acide 3-(N-morpholino)propanesulfonique, respectivement.

Protocole	Substrat	Tampon	Volume d'extrait de culture	T (°C)
1	FE 10 % (p/v) dans du DMF (200 µl)	Phosphate de sodium 100 mM – pH 7 (400 µl)	(200 µl)	37 50
2	SB 40 mg	Phosphate de sodium 70 mM – pH 6 (1000 µl)	(1000 µl)	40 50
3	FE 2 mg/ml dans du tampon (960 µl)	Acétate de sodium 100 mM – pH 4,8 –	(40 µl)	40 50
4	FE 5 mM dans du tampon (1000 µl)	MOPS 100 mM – pH 6 –	(1000 µl)	50
5	FE 1,33 mM dans du tampon (1500 µl)	Phosphate de sodium 50 mM – pH 5 –	(500 µl)	40 50
6	FE 1,33 mM dans du tampon (1500 µl)	Phosphate de sodium 70 mM – pH 6,5 –	(500 µl)	40
7	FM 1,33 mM dans du tampon (1500 µl)	Phosphate de sodium 70 mM – pH 6,5 –	(500 µl)	40

Pour chaque protocole, la réaction s'effectue pendant 24 h (protocole 1 à 7) ou 4 h (dans le cas de l'utilisation d'un échantillon précipité au sulfate d'ammonium). Des prélèvements de 100 µl sont effectués au cours du temps afin de mesurer l'hydrolyse du férulate d'éthyle ou de méthyle et l'apparition de l'acide férulique. Chacun de ces prélèvements est dilué au dixième par du méthanol/TFA, 100:0,01 v/v, homogénéisé pendant 20 secondes et centrifugé pendant 5 min à 13400 rpm (Mini Spin, Eppendorf). Le surnageant est ensuite filtré (0,22 µm) et analysé par CLHP. L'activité AFE est exprimée en unités (U). 1 unité correspond à la quantité d'enzyme libérant 1 µmol d'acide férulique par min à pH 6,5 et à 40 °C. L'activité spécifique, pour sa part, est exprimée en unités par g de protéines.

V.2. Acide férulique estérase issue du DepolTM 740L

La quantification de l'activité AFE de *Humicola* sp. est réalisée par dosage de l'acide férulique libéré dans un milieu réactionnel contenant un volume de DepolTM 740L dilué 400 fois par la solution de férulate d'éthyle préparée dans un tampon phosphate de sodium (70 mM – pH 6,5) :

- ✓ férulate d'éthyle (1,33 mM) 1995 µl
- ✓ DepolTM 740L 5 µl

La réaction s'effectue à 40 °C pendant 2 à 10 min. Les prélèvements effectués subissent le même traitement que celui expliqué précédemment.

VI. Protocole de purification des acide férulique estérases

L'AFE de *S. ambofaciens* ATCC 23877 et celle de *Humicola* sp. sont partiellement purifiées par des étapes successives de précipitation au sulfate d'ammonium (ou à l'acétone), de dialyse et de passage sur colonne échangeuse d'ions.

VI.1. Précipitation à l'acétone

Pour l'AFE de *S. ambofaciens* ATCC 23877, 60 ml de surnageant issu de la culture en bioréacteur sont mélangés avec 240 ml d'acétone froid (–20 °C) (concentration finale 80% v/v). La précipitation des protéines est obtenue en gardant cet échantillon à –20 °C pendant 30 à 60 min. Puis, la suspension est centrifugée à 10000 rpm (BECKMAN, AvantiTM 30) pendant 20 minutes à 0 °C. Le culot obtenu est ensuite séché par l'azote gazeux.

En ce qui concerne l'AFE de *Humicola* sp., 1 ml de DepolTM 740L dialysé contre l'eau distillée est précipité à l'acétone en suivant le même protocole.

VI.2. Précipitation au sulfate d'ammonium

Une précipitation au sulfate d'ammonium (50% de saturation) est effectuée à 20 °C pendant 1 h pour 400 ml de surnageant issu de la culture de *S. ambofaciens* ATCC 23877 en bioréacteur. Après centrifugation à 20 °C pendant 15 min à 10000 rpm

(BECKMAN, AvantiTM 30), le culot obtenu est dispersé dans de l'eau distillée pour être dialysé contre de l'eau distillée.

Pour l'AFE de *Humicola* sp., 1 ml de DepolTM 740L dialysé est fractionné par précipitation successive au sulfate d'ammonium (0-20% ; 20-40% ; 40-60% ; 60-80% ; 80-100% de saturation) en suivant le protocole antérieur. De manière semblable, des précipitations indépendantes au sulfate d'ammonium sont également réalisées (20% ; 40% ; 50% ; 60% ; 80% ; 100% de saturation).

VI.3. Dialyse

La méthode la plus utilisée pour diminuer la concentration en sels d'une solution protéique est la dialyse. Dans une dialyse contre l'eau distillée, l'échantillon protéique est placé dans une membrane poreuse immergée dans de l'eau distillée. Les sels peuvent donc traverser la membrane vers l'eau, alors que de l'eau pénètre la membrane jusqu'à l'équilibre. Les pores de la membrane de dialyse peuvent avoir différentes tailles. Certaines membranes ne laissent passer que des ions alors que d'autres laissent même passer de petites protéines.

Au cours de ce travail, des dialyses contre l'eau distillée sont effectuées avec une membrane Spectra/Pro[®] d'une porosité de 12-14 kDa (Spectrum Laboratories, Inc.). Les échantillons sont placés dans la membrane pendant une nuit, à 8 °C, sous agitation.

VI.4. Chromatographie d'échange d'ions

VI.4.1. Appareillage utilisé

Le système de chromatographie d'échange d'ions utilisé est un BioLogic (Bio-Rad). Il est constitué des éléments suivants (**Fig. 22**) :

- ❑ un système de contrôle : il permet la mise en route et la création d'une méthode de séparation à l'aide d'un logiciel d'acquisition et de traitement des données (BioLogic system Ver.3.11).
- ❑ une station : elle représente l'unité centrale du système de chromatographie utilisé. Elle est constituée de deux pompes et d'un mélangeur permettant d'apporter les deux éluants jusqu'à la colonne *via* la valve d'injection.

- ❑ un détecteur UV constitué d'une lampe à mercure et d'un filtre permettant de détecter les protéines à 280 nm à la sortie de la colonne.
- ❑ un détecteur de conductivité (conductimètre) qui est un moyen de vérifier les conditions d'équilibration de la colonne et de formation du gradient salin. La conductivité s'exprime en Siemens (S).
- ❑ un collecteur de fractions modèle 2128 comportant 128 tubes (12 mm de diamètre, 180 mm de hauteur) permettant de récolter les échantillons à la sortie de la colonne.
- ❑ un enregistreur qui permet de récupérer les données chromatographiques.

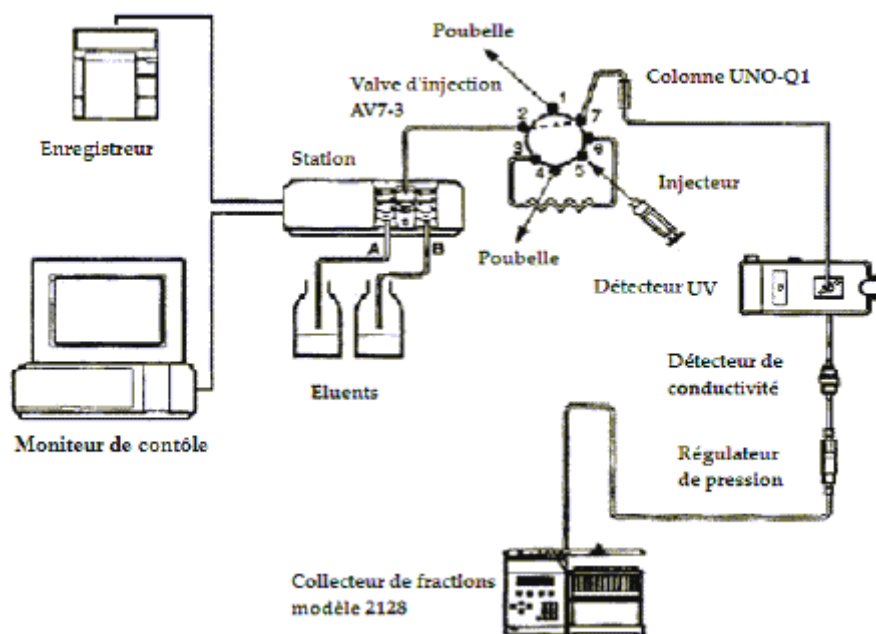


Fig. 22. Représentation schématique du système de chromatographie d'échange d'ions BioLogic (Bio-Rad).

VI.4.2. Fractionnement par chromatographie d'échange d'anions

VI.4.2.1. Pour l'acide férulique estérase de *S. ambofaciens* ATCC 23877

1 ml de la solution obtenue après dialyse (§ VI.2) est fractionné par chromatographie échangeuse d'anions forts (BioLogic ; Bio-Rad). Les séparations sont réalisées sur une colonne Bio-Scale MT2 (7 x 52 mm, phase stationnaire UNOsphere Q, $-N^+(CH_3)_3$). La phase mobile est composée de deux tampons : A (Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane, 10 mM, dont le pH est ajusté à 8,5 à l'aide de HCl) et

B (NaCl 1 M dans le tampon A) en utilisant un débit de 1 ml/min. Des fractions de 2 ml sont collectées. Le tableau 9 indique le gradient d'élution utilisé.

VI.4.2.2. Pour l'acide férulique estérase de *Humicola* sp.

Le culot obtenu après fractionnement au sulfate d'ammonium (50% de saturation) est dissous dans 1 ml d'eau distillée, puis dialysé. La solution issue de la dialyse est ensuite congelée à -30°C pendant 48 h avant d'être lyophilisée. Le lyophilisat obtenu ainsi que le culot issu de la précipitation à l'acétone (§ VI.1) sont dissous dans le minimum du tampon A puis fractionnés par chromatographie échangeuse d'anions comme précédemment (§ VI.4.2.1).

Tableau 9. Gradient d'élution utilisé pour la colonne échangeuse d'anions UNOsphere Q.

Temps (min)	Solution A %	Solution B %	Temps (min)	Solution A %	Solution B %
0	100	0	25,5	70	30
4	100	0	28,5	70	30
4,3	97	3	29	60	40
10,3	97	3	32	60	40
10,6	94	6	32,5	40	60
16,6	94	6	35,5	40	60
16,9	90	10	36,5	20	80
20,9	90	10	38	0	100
21,4	85	15	40	100	0
25	85	15	44	100	0

VI.4.3. Fractionnement par chromatographie d'échange de cations

Après fractionnement sur la colonne échangeuse d'anions, les fractions possédant une activité AFE sont réunies et concentrées par lyophilisation. Le résidu est repris dans le minimum du tampon acétate de sodium A' (10 mM - pH 5) et passé sur une colonne échangeuse de cations forts (Bio-Rad, UNO S1R 7 x 35 mm, phase stationnaire UNOsphere S, $-\text{SO}_3^-$). La colonne est équilibrée avec le même tampon A'. L'élution est effectuée en utilisant un gradient (0-100%) de tampon B' : NaCl 1 M dans le tampon A' (Tableau 10). Des fractions de 2 ml sont collectées avec un débit de 1 ml/min.

Tableau 10. Gradient d'élution utilisé pour la colonne échangeuse de cations UNOsphere S.

Temps (min)	Solution A' %	Solution B' %	Temps (min)	Solution A' %	Solution B' %
0	100	0	20,9	80	20
4	100	0	22,9	80	20
4,2	99	1	23,4	70	30
7,8	99	1	26	70	30
8	97	3	26,5	60	40
11,6	97	3	28,5	60	40
11,9	95	5	29	40	60
15,7	95	5	31	40	60
16	93	7	32	20	80
18,6	93	7	33	0	100
18,9	90	10	36	100	0
20,6	90	10	40	100	0

VII. Méthodes analytiques

VII.1. Analyse par CLHP

Les échantillons prélevés pour la mesure de l'activité AFE ainsi que d'autres échantillons obtenus lors de cette étude sont analysés par CLHP (Shimadzu Class-VP). Les séparations sont réalisées en phase inverse sur une colonne de silice greffée de type C-18 (LiChroCART® RP-18 Merck, 25 x 0,4 cm, taille de particule 5 µm).

La chaîne CLHP utilisée est constituée des éléments suivants :

- ❑ un injecteur automatique : SIL-10 AD_{vp}.
- ❑ une pompe : LC-10 AT_{vp}.
- ❑ un détecteur à barrettes de diodes UV/VIS : SPD-M 10 A_{vp}.
- ❑ un système de contrôle : SCL-10 A_{vp}.
- ❑ un logiciel d'acquisition et de traitement des chromatogrammes : CLASS-VP.

Un gradient de deux solvants [A (méthanol/H₂O/TFA, 50:50:0,01 v/v/v), B (méthanol 100%)] est utilisé à un débit de 0,6 ml/min en cinq étapes (**Fig. 23**) : 0-5 min, 20% B ; 5-10 min, 50% B ; 10-16 min, 80% B ; 16-20 min, 20% B ; 20-25 min, 20% B. 50 µl d'échantillon sont injectés.

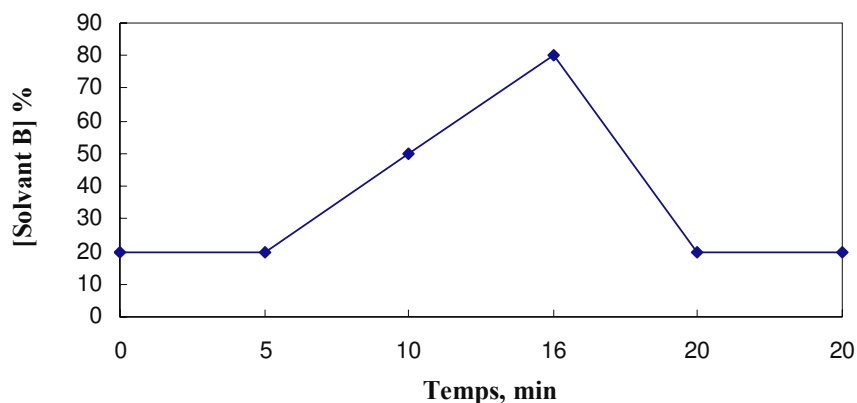


Fig. 23. Gradient d'élution utilisé lors des analyses par CLHP. Solvant B : méthanol 100%.

Les quantifications des différents acides phénoliques, utilisés au cours de cette étude sont effectuées à l'aide de gammes d'étalonnage correspondantes. Le tableau 11 indique les différentes valeurs de λ_{max} (longueur d'onde d'absorption maximale) et de temps de rétention pour ces substrats phénoliques dans les conditions d'analyse utilisées.

Tableau 11. Valeurs de λ_{max} et de temps de rétention (TR) pour les différents acides phénoliques analysés par CLHP au cours de cette étude.

Substrat	λ_{max} (nm)	TR (min)
Acide hydrocaféique	280	4,5
Acide caféique	325	4,9
Acide syringique	274	5,0
Acide vanillique	260	5,2
Acide sinapique	323	5,5
Acide férulique	322	5,7
Acide <i>p</i> -coumarique	309	6,1
Acide cinnamique	275	13,1

Les différentes gammes d'étalonnage de ces acides phénoliques sont réalisées dans les mêmes conditions que les essais. Un exemple d'une de ces gammes est présenté dans la figure 24.

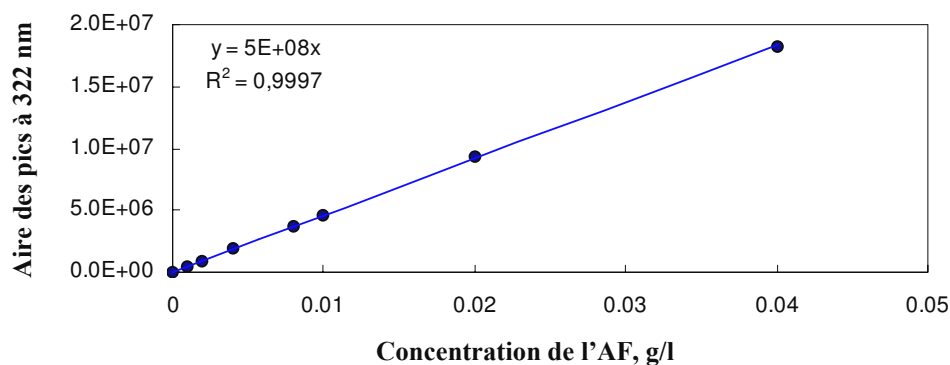


Fig. 24. Courbe d'étalonnage pour le dosage de l'acide férulique (AF) par CLHP.

La figure 25, pour sa part, représente les spectres UV de ces acides phénoliques.

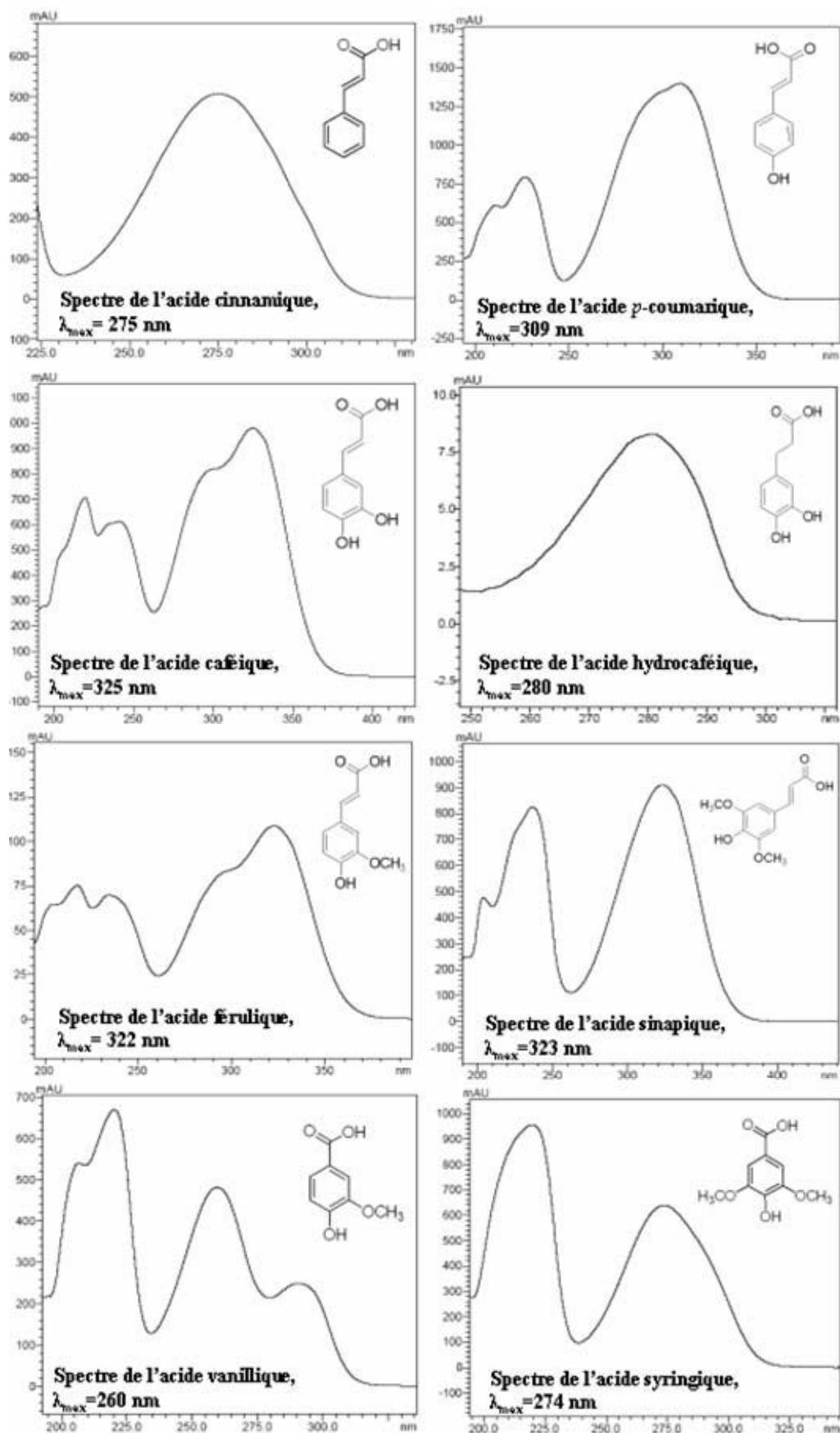


Fig. 25. Spectres UV des acides phénoliques utilisés dans cette étude.

VII.2. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

Dans la technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE), les échantillons sont concentrés en une bande très fine dans un gel de concentration puis les protéines sont séparées selon leur masse moléculaire dans un gel de séparation.

VII.2.1. Préparation des échantillons protéiques

Les protéines doivent être dénaturées avant d'être déposées dans les puits des gels de polyacrylamide. De ce fait, leur séparation s'effectue en conditions dénaturantes. Les échantillons à analyser sont, si nécessaire, concentrés par précipitation à l'acétone froid (80%) à -20°C pendant 30 min, puis centrifugés pendant 5 min à 13400 rpm (Mini Spin, Eppendorf). Chacun des culots obtenus est suspendu dans une solution de dépôt. Les solutions protéiques sont incubées à 98°C pendant 5 min afin de dénaturer les protéines. La composition de la solution dépôt est la suivante :

- H_2O 4,8 ml
- Tris-HCl (0,5 M - pH 6,8) 1,2 ml
- SDS (10%) 2 ml
- glycérol 1 ml
- bleu de bromophénol (0,5% p/v) 0,5 ml
- β -mercapto-éthanol à une concentration finale de 5% v/v.

VII.2.2. Préparation des gels de polyacrylamide et conditions de migration

Deux gels se succèdent : un gel de concentration suivi d'un gel de séparation. Une solution d'acrylamide : bisacrylamide (30%:0,8%) est diluée à 4% dans un tampon Tris-HCl pour le gel de concentration et à 12,5 % pour le gel de séparation.

Composition du gel de séparation

- H_2O 6,7 ml
- Tris-HCl (1,5 M - pH 8,8) 5 ml
- SDS (10%) 0,2 ml
- acrylamide:bisacrylamide (30%:0,8%) 8 ml
- persulfate d'ammonium (10%) 100 μl
- TEMED (N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine) 10 μl

Composition du gel de concentration

- | | |
|---------------------------------------|--------|
| • H ₂ O | 6,1 ml |
| • Tris-HCl (0,5 M - pH 6,8) | 2,5 ml |
| • SDS (10%) | 0,1 ml |
| • acrylamide:bisacrylamide (30%:0,8%) | 1,3 ml |
| • persulfate d'ammonium (10%) | 50 µl |
| • TEMED | 10 µl |

La migration est réalisée à température ambiante, dans un tampon composé de Tris base [Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane] (15 g/l), glycine (72 g/l) et SDS (5 g/l) sous un ampérage de 25 mA et une tension de 180 V. A la fin de la migration le gel est coloré au bleu de Coomassie.

Composition de la solution au bleu de Coomassie (pour 1 l)

- | | |
|--------------------------|--------|
| • bleu de Coomassie R250 | 100 ml |
| • éthanol | 400 ml |
| • acide acétique | 75 ml |
| • H ₂ O | 425 ml |

VII.3. Electrophorèse sur bande d'acétate de cellulose (conditions non dénaturantes)

VII.3.1. Réactifs utilisés

Le tampon de migration est un tampon véronal à pH 9,2. Il est constitué des éléments suivants :

- | | |
|--------------------------|--------|
| • véronal sodique : | 10,3 g |
| • véronal : | 1,84 g |
| • Tris : | 7,2 g |
| • H ₂ O qsq : | 100 ml |

VII.3.2. Mode opératoire

Les échantillons sont repris dans du tampon véronal. Une bande d'acétate de cellulose est trempée dans ce tampon pendant 5 à 10 min. La bande est ensuite installée à sa place dans l'appareil (Bio-Rad, 3000Xi). Un échantillon de la solution protéique est

ensuite déposé sur cette bande à l'aide d'une lame de verre (lamelle couvre-objet de microscope). Ce dépôt doit se faire perpendiculairement à la longueur de la bande, du côté de la cathode. La migration est réalisée sous une tension de 240 V pendant 40 min.

A la fin de la migration, la bande subit un traitement particulier pour détecter la présence d'activité estérase dans l'échantillon analysé. Le protocole appliqué est le suivant :

5 mg d'acétate de β -naphtyle sont dissous dans 0,5 ml d'acétone. Puis, 25 ml de tampon phosphate de sodium (0,15 M - pH 7) sont ajoutés. Dans la solution opalescente obtenue, 10 mg de diazo bleu B (*o*-dianisidine tétra azotée) sont dissous. Le réactif obtenu est filtré (0,22 μ m) et doit être utilisé très rapidement. Pour cela, la bande d'acétate de cellulose est trempée pendant 30 min dans cette solution puis lavée à l'acide acétique 2%. Les fractions protéiques à activité estérasique apparaissent colorées en rouge-violet.

VII.4. Détermination de la concentration en protéines

Dans la littérature, de nombreuses méthodes de dosage des protéines ont été mises au point. Ce sont généralement des méthodes spectrophotométriques basées sur diverses caractéristiques spectrales ou réactionnelles des acides aminés constituant les protéines. Parmi ces différentes techniques de dosage, la méthode à l'acide bicinchoninique (ABC, Sigma) est largement utilisée grâce à sa sensibilité et à sa facilité de mise en œuvre. C'est pourquoi, les concentrations en protéines sont déterminées en utilisant cette méthode de dosage.

Dans la méthode à l'acide bicinchoninique, les protéines à quantifier réduisent les ions Cu^{2+} , dans un milieu alcalin, en Cu^+ . L'acide bicinchoninique dans sa forme saline est un réactif spécifique et sensible aux ions Cu^+ . Ainsi, une réaction a lieu entre ces ions et deux molécules de l'ABC conduisant à la formation d'un complexe coloré en pourpre ($\lambda_{\text{max}}=562$ nm) (**Fig. 26**).

L'intensité de la coloration, proportionnelle à la concentration en protéines dans l'échantillon, est directement mesurée à 562 nm (Smith *et al.*, 1985).

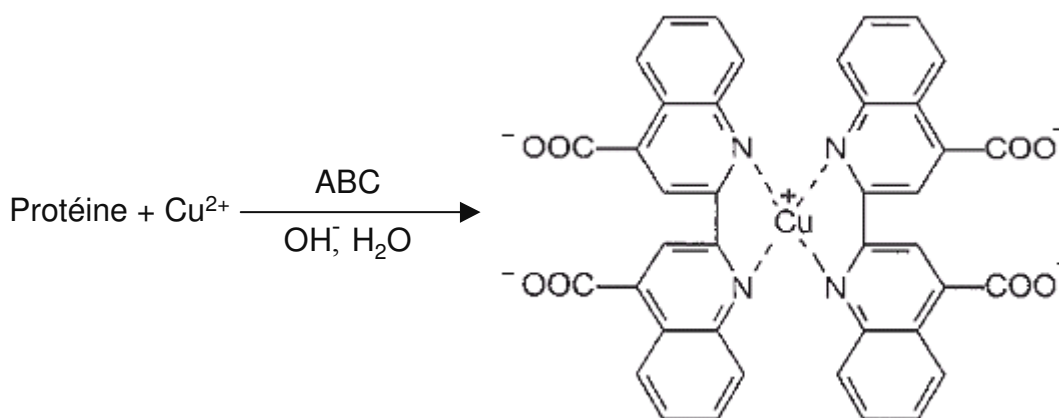


Fig. 26. Réaction de l'acide bicinchoninique (ABC) avec les protéines et formation d'un complexe coloré en pourpre.

La solution ABC est préparée en mélangeant deux réactifs :

- Réactif A : solution de carbonate de sodium, bicarbonate de sodium, acide bicinchoninique et tartrate de sodium dans NaOH (0,1 M).
- Réactif B : solution aqueuse de sulfate de cuivre (II), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, à une concentration de 4% p/v.

A 1 volume du réactif B sont ajoutés 50 volumes du réactif A. Ensuite, 50 μl de l'échantillon protéique à doser sont mélangés avec 1 ml du mélange (A+B). Une solution, constituée de 50 μl de tampon phosphate de sodium (0,1 M - pH 7,5) dans 1 ml du mélange (A+B), est utilisée comme blanc. Les échantillons sont homogénéisés pendant quelques secondes avant leur incubation à 37 °C pendant 30 min. Ensuite, une mesure de leur absorbance est effectuée à 562 nm.

La concentration en protéines dans les échantillons est déterminée à l'aide d'une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions que les échantillons en utilisant de l'albumine de sérum bovin (ASB, 1 mg/ml dans du NaCl 0,15 M). Les concentrations de l'ASB sont comprises entre 0 et 1000 $\mu\text{g/ml}$ (**Fig. 27**). Ainsi, les teneurs en protéines sont exprimées en μg par ml d'échantillon.

Il est à noter que lors de ce dosage de protéines, les peptides éventuellement présents dans les milieux de culture employés sont également dosés, ce qui provoque une surestimation de la concentration en protéines.

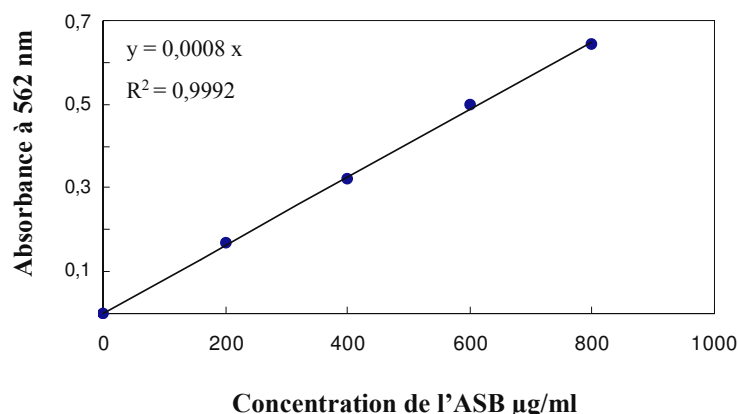


Fig. 27. Courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines par la méthode à l'acide bicinchoninique (ABC).

VIII. Protocoles des synthèses enzymatiques

VIII.1. Synthèses où l'accepteur d'acyle joue le rôle du solvant

La composition du milieu réactionnel est la suivante :

- 5 µmol de donneur d'acyle (acide cinnamique ou hydroxycinnamique)
- 500 µl d'accepteur d'acyle (alcool aliphatique)

Le donneur d'acyle est dissous dans l'alcool. Le mélange réactionnel est ensuite incubé pendant 24 h à 50 °C. Les réactions sont initiées par l'introduction de 5 mg de l'AFE de *Humicola* sp. ou de 50 mg de l'AFE de *S. ambofaciens* ATCC 23877. Les prélèvements réalisés au cours du temps sont dilués avec du méthanol/TFA (100/0,01% v/v) puis analysé par CLHP.

VIII.2. Synthèses en milieu solvant

Dans ce type de réaction, un solvant organique est généralement utilisé pour dissoudre les réactifs. Des essais préliminaires de synthèse d'esters phénoliques de phloridzine (un flavonoïde) sont réalisés dans le 2-méthylbutan-2-ol (M₂B₂) comme solvant en utilisant l'AFE de *Humicola* sp.

La composition du milieu réactionnel est la suivante :

- 1 μmol de phloridzine
- 5 μmol de donneur d'acyle (acide férulique ou acide cinnamique)
- 500 μl de M_2B_2

Les réactifs sont placés dans le M_2B_2 , préalablement déshydraté par stockage sur tamis moléculaire 4 Å (α_w : 0,06), pendant 24 h à 50 °C. L' α_w a été mesurée avec un appareil Novasina TH200. La réaction est ensuite initiée par l'introduction de 5 mg de l'AFE de *Humicola* sp. dans le milieu réactionnel. Des prélèvements sont réalisés au cours du temps pendant 200 h et dilués avec du méthanol/TFA (100/0,01% v/v) avant l'analyse par CLHP.

VIII.3. Synthèses avec le donneur d'acyle comme solvant

Dans ce cas, la réaction s'effectue en mode transestérification. La composition du milieu réactionnel est la suivante :

- 10 μmol de phloridzine
- 2 ml de donneur d'acyle (cinnamate d'éthyle)

Après incubation du milieu réactionnel pendant 24 h à 50 °C, 50 mg de l'AFE de *Humicola* sp. sont introduits dans le milieu pour commencer la réaction. Des prélèvements sont réalisés au cours du temps pendant 200 h et dilués avec du méthanol/TFA (100/0,01% v/v) avant l'analyse par CLHP.

CHAPITRE 3

*Production et purification partielle de l'acide
férulique estérase de S. ambofaciens ATCC 23877*

SOMMAIRE

<u>I. Choix des conditions d'induction de la synthèse d'acide férulique estérase par <i>S. ambofaciens</i> ATCC 23877</u>	82
I.1. Mise en évidence de l'activité acide férulique estérase chez différentes espèces bactériennes	82
I.1.1. En milieu gélosé	82
I.1.2. En milieu liquide	84
I.2. Choix de l'inducteur et du milieu de culture pour la production d'acide férulique estérase par <i>S. ambofaciens</i> ATCC 23877	88
I.3. Quantification de l'activité acide férulique estérase	92
I.3.1. Dosage de l'activité acide férulique estérase par CLHP	92
I.3.2. Concentration de l'activité acide férulique estérase par précipitation au sulfate d'ammonium	93
I.4. Etudes des paramètres influençant la production d'acide férulique estérase chez <i>S. ambofaciens</i> ATCC 23877	95
I.4.1. Influence de la nature de l'inducteur sur la production de l'acide férulique estérase	95
I.4.2. Dosage de l'acide férulique libéré dans les milieux de culture	98
I.4.3. Détermination de la quantité totale d'acide férulique estérifié présent dans les inducteurs	101
I.4.4. Influence de l'acide férulique sur l'induction de la synthèse de l'acide férulique estérase	105
I.4.5. Etude de paramètres susceptibles d'influencer la production de l'acide férulique estérase	107
 <u>II. Production de l'acide férulique estérase par <i>S. ambofaciens</i> ATCC 23877</u>	 111
II.1. Production de l'acide férulique estérase en bioréacteur	111
II.2. Purification partielle de l'acide férulique estérase produite en bioréacteur	113
II.2.1. Purification par des techniques de précipitations	113
II.2.2. Fractionnement de l'acide férulique estérase par chromatographie d'échange d'anions et par électrophorèses	115

L'objectif principal de ces travaux de thèse est d'obtenir une AFE en quantité suffisante permettant son utilisation en milieu hydro-organique pour catalyser la synthèse d'esters d'intérêt.

Dans un premier temps, il a donc été envisagé de produire l'AFE par des micro-organismes. Pour cette étude, nous avons criblé plusieurs espèces bactériennes pour l'activité AFE. Le choix des conditions permettant une meilleure production d'AFE a ensuite été étudié. Une purification de l'AFE produite a également été mise en œuvre.

I. Choix des conditions d'induction de la synthèse d'acide férulique estérase par *S. ambofaciens* ATCC 23877

I.1. Mise en évidence de l'activité acide férulique estérase chez différentes espèces bactériennes

I.1.1. En milieu gélosé

L'incorporation d'un ester synthétique dans un milieu gélosé a déjà été décrite pour détecter des activités AFE chez des espèces bactériennes appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Bacillus* (Donaghy *et al.*, 1998). Dans cette méthode qualitative de détection, les souches testées poussent sur un milieu gélosé dans lequel un ester d'acide férulique, le férulate d'éthyle, a été ajouté à une concentration finale de 0,1% p/v. Cet ajout conduit à l'apparition d'un trouble dans ce milieu. Une zone d'éclaircissement est, ensuite, détectée en périphérie des colonies productrices de l'AFE en raison du clivage de l'ester par cette enzyme. Il est à noter que l'ajout d'un autre ester d'acide férulique, le férulate de méthyle, ne provoque pas l'apparition de ce trouble dans le milieu préconisé par les auteurs. En conséquence, le férulate de méthyle ne peut pas être utilisé pour détecter les activités AFE par cette méthode.

Dans ce travail, plusieurs espèces bactériennes sont criblées pour l'activité AFE (trois espèces de *Streptomyces* : *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877, *Streptomyces pristinaespiralis* PR11 et *Streptomyces lividans* TK24, deux espèces de *Bacillus* : *Bacillus subtilis* ATCC 6633 et *Bacillus licheniformis* CIP 5771 et deux souches de

CH. 3 : Production et purification partielle de l'acide férulique estérase de *S. ambofaciens*

Lactobacillus fermentum : *Lactobacillus fermentum* DSM 20052 et *Lactobacillus fermentum* INRA 233).

Pour mettre en évidence une activité AFE chez les espèces bactériennes testées, des boîtes contenant du milieu MRS gélosé avec du férulate d'éthyle sont ensemencées en surface avec des colonies de ces bactéries qui sont préalablement développées sur leurs milieux gélosés respectifs (**Chapitre 2 ; § IV.4.1.2**). En effet, le milieu MRS est préconisé pour la croissance des micro-organismes du genre *Lactobacillus*, mais nous avons vérifié que toutes les autres espèces testées peuvent également croître sur ce milieu.

Parmi les bactéries testées, des zones d'éclaircissement sont apparues uniquement autour des colonies de *S. ambofaciens* ATCC 23877, *Lactobacillus fermentum* DSM 20052, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 et *Bacillus licheniformis* CIP 5771 (**Tableau 12**). Ces dernières possèdent donc une activité AFE détectable selon le protocole utilisé ici.

Tableau 12. Présence de l'activité AFE chez les espèces bactériennes utilisées lors de ce travail.

Souche bactérienne	Activité AFE
<i>L. fermentum</i> DSM 20052	+
<i>L. fermentum</i> INRA 233	–
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	+
<i>B. licheniformis</i> CIP 5771	+
<i>S. ambofaciens</i> ATCC 23877	+
<i>S. lividans</i> TK24	–
<i>S. pristinaespiralis</i> PR11	–

(+) Présence d'une zone d'éclaircissement, (–) Aucune zone d'éclaircissement.

Des exemples de zones d'éclaircissement obtenues sont montrés dans la figure 28 pour *B. subtilis* ATCC 6633, *B. licheniformis* CIP 5771 et *S. ambofaciens* ATCC 23877.

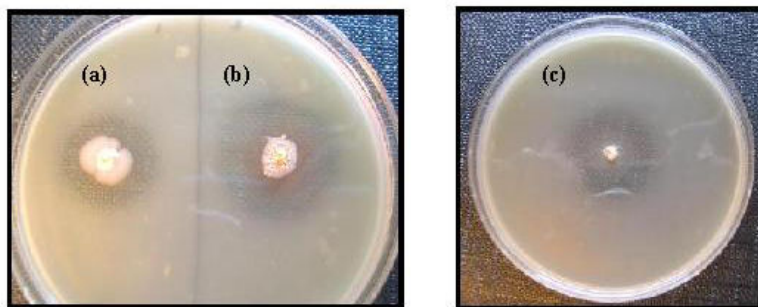


Fig. 28. MRS gélosé sans glucose et avec du férulate d'éthyle, sur lequel des colonies de *B. subtilis* ATCC 6633 (a), *B. licheniformis* CIP 5771 (b) et *S. ambofaciens* ATCC 23877 (c) ont été déposées. Les boîtes ont été incubées pendant 48 h à 37 °C. La formation des zones claires autour des colonies est due à l'activité AFE.

Donaghy *et al.* (1998) ont déjà rapporté, pour la première fois, la capacité de *B. licheniformis*, de *B. subtilis* et de *L. fermentum* (des souches différentes de celles que nous avons utilisées dans ce travail) à hydrolyser des esters phénoliques. C'est grâce à leur méthode qualitative de détection, mentionnée ci-dessus, que nous avons pu confirmer la présence des activités AFE chez les quatre espèces bactériennes testées (**Tableau 12**).

Jusqu'à présent, la recherche de l'activité AFE n'avait jamais été réalisée chez les espèces de *Streptomyces* selon cette méthode. La mise en évidence de cette activité enzymatique chez les *Streptomyces* avait été effectuée par CLHP en suivant la disparition de l'ester phénolique ou l'apparition de l'acide phénolique libéré (MacKenzie *et al.*, 1987 ; Faulds et Williamson, 1991 ; Garcia *et al.*, 1998a,b ; Bartolomé *et al.*, 2003). D'après les résultats présentés dans le tableau 12, *S. ambofaciens* ATCC 23877 est le seul actinomycète testé possédant une activité AFE. De plus, parmi les zones d'éclaircissement obtenues à partir des culots cellulaires des quatre espèces bactériennes positives, *S. ambofaciens* ATCC 23877 est celle qui donne la zone la plus large (**Fig. 28c**). A notre connaissance, ce résultat est le premier rapport sur la capacité de cette espèce bactérienne à synthétiser une AFE.

I.1.2. En milieu liquide

Le rôle naturel des AFE est d'hydrolyser les liaisons esters formées entre les polysaccharides de la paroi végétale et les acides phénoliques, surtout l'acide férulique.

La majorité des AFE sont extracellulaires et leur synthèse peut être induite lors de la croissance du micro-organisme producteur dans un milieu contenant un inducteur, un composé lignocellulosique, tel que le son de blé désamidonné ou le xylane d'avoine par exemple. Afin de vérifier cette propriété chez les AFE produites par les quatre bactéries présentant une activité AFE (**Tableau 12**), nous avons examiné leur production en présence ainsi qu'en absence d'inducteur, en milieu liquide.

1.1.2.1. En absence d'inducteur

Les bactéries sont mises en croissance (à 28 °C sous agitation à 120 rpm pour *L. fermentum* DSM 20052, *B. subtilis* ATCC 6633 et *B. licheniformis* CIP 5771, et à 37 °C sous agitation à 160 rpm pour *S. ambofaciens* ATCC 23877) pendant 48 h dans un milieu de culture approprié contenant comme source de carbone soit le glucose (milieu MRS), soit les dextrines blanches (milieu CS). A l'issue de ces cultures, 10 µl de surnageant filtré (0,22 µm, Millipore), sont déposés sur du milieu MRS gélosé contenant du férulate d'éthyle pour détecter l'activité AFE. En parallèle, cette activité est également recherchée dans tous les culots cellulaires selon le même protocole. Les boîtes sont ensuite incubées pendant 24 à 48 h à 37 °C.

Tableau 13. Recherche de l'activité AFE dans les surnageants acellulaires ainsi que dans les culots des quatre bactéries présentant cette activité enzymatique.

Souche bactérienne	Activité AFE	
	Culot	Surnageant
<i>L. fermentum</i> DSM 20052	+	—
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	+	—
<i>B. licheniformis</i> CIP 5771	+	—
<i>S. ambofaciens</i> ATCC 23877	+	—

(+) Présence d'une zone d'éclaircissement, (—) Aucune zone d'éclaircissement.

Une activité AFE est détectée à la proximité immédiate des dépôts de culot cellulaire. Par contre, aucune activité AFE n'est observée dans tous les surnageants testés (**Tableau 13**). La figure 29, ci-dessous, illustre ce résultat pour *L. fermentum* DSM 20052.

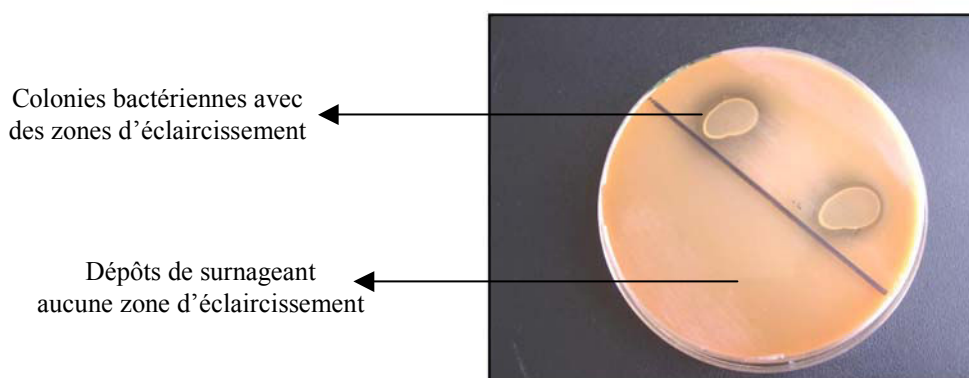


Fig. 29. Comparaison entre une suspension bactérienne de *L. fermentum* DSM 20052 et son surnageant acellulaire sur milieu MRS gélosé. La culture a été réalisée en présence de glucose comme source de carbone.

Il apparaît clairement qu'aucune AFE n'est synthétisée lors des cultures sur milieu liquide ne contenant pas d'inducteur. Cependant, la présence d'une activité AFE avec les culots cellulaires pourrait s'expliquer par une croissance bactérienne, lors du protocole de détection (37 °C pendant 24 à 48 h), qui s'accompagnerait d'une synthèse induite d'AFE en raison de la présence du férulate d'éthyle dans la boîte.

Selon la littérature, pour obtenir une synthèse d'AFE en milieu liquide, l'ajout d'une molécule induisant la synthèse de l'enzyme est nécessaire. C'est pourquoi, nous avons étudié la capacité des bactéries testées à produire l'AFE en milieu liquide avec du xylane d'avoine comme inducteur.

1.1.2.2. En présence du xylane d'avoine comme inducteur

Les milieux utilisés au cours de cette expérience ne contiennent que le xylane d'avoine comme inducteur à une concentration finale de 1% p/v. Les sources de carbone classiquement utilisées dans ces milieux (glucose ou dextrines blanches) ont été éliminées. Le xylane d'avoine a été choisi parce qu'il est déjà connu pour induire la synthèse d'AFE chez certains *Streptomyces* tels que *S. olivochromogenes* et *S. avermitilis* (MacKenzie *et al.*, 1987 ; Garcia *et al.*, 1998a,b). Les quatre espèces bactériennes sont incubées pendant 48 h dans leurs milieux respectifs (à 28 °C sous agitation à 120 rpm pour *L. fermentum* DSM 20052, *B. subtilis* ATCC 6633 et *B. licheniformis* CIP 5771, et à 37 °C sous agitation à 160 rpm pour *S. ambofaciens* ATCC

CH. 3 : Production et purification partielle de l'acide férulique estérase de *S. ambofaciens*

23877). Comme précédemment, une détection de l'activité AFE est effectuée sur des boîtes contenant du milieu MRS gélosé avec du férulate d'éthyle à partir des surnageants filtrés et des culots cellulaires obtenus. Les résultats sont présentés dans le tableau 14.

Tableau 14. Détection de l'activité AFE en milieu liquide contenant du xylane d'avoine comme inducteur.

Souche bactérienne	Activité AFE	
	Culot	Surnageant
<i>L. fermentum</i> DSM 20052	+	–
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	+	–
<i>B. licheniformis</i> CIP 5771	+	–
<i>S. ambofaciens</i> ATCC 23877	+	+

(+) Présence d'une zone d'éclaircissement, (–) Aucune zone d'éclaircissement.

Des zones d'éclaircissement révélant la présence d'une activité AFE sont présentes en périphérie de tous les culots cellulaires testés. Par contre, en ce qui concerne *L. fermentum* DSM 20052, *B. subtilis* ATCC 6633 et *B. licheniformis* CIP 5771, aucune activité AFE n'est observée dans les surnageants testés. Les hypothèses suivantes peuvent donc être envisagées pour ces trois bactéries :

- pour obtenir la synthèse de l'AFE, il faudrait soit utiliser une concentration en xylane d'avoine plus importante (pourtant, 1% p/v de xylane d'avoine est la concentration généralement employée dans la littérature pour la production d'AFE (Faulds et Williamson, 1991 ; Garcia *et al.*, 1998a)), soit incuber les bactéries avec un autre composé connu pour induire la synthèse d'AFE chez d'autres micro-organismes.
- une activité AFE extracellulaire serait produite dans les milieux contenant du xylane d'avoine mais à une concentration trop faible pour être détectée dans les surnageants de cultures selon le protocole utilisé.

- une synthèse d'AFE serait induite dans ces milieux mais l'enzyme serait intracellulaire ou fortement liée à la surface cellulaire. Une étape de sonication pourrait donc être nécessaire pour confirmer la nature intracellulaire de l'enzyme. Il est à noter qu'une activité AFE a déjà été extraite de la bactérie intestinale *Lactobacillus acidophilus* après sonication (Wang *et al.*, 2004), ce qui montre la nature intracellulaire de cette enzyme. Donaghy *et al.* (1998) ont également extrait des AFE de souches de *L. fermentum* et de *Bacillus* sp. (autres que celles utilisées dans ce travail) après sonication des cellules.

Des études complémentaires sur la synthèse d'AFE par *L. fermentum* DSM 20052, *B. subtilis* ATCC 6633 et *B. licheniformis* CIP 5771 seraient donc à mener afin de confirmer la localisation de cette enzyme chez ces bactéries.

Par contre, comme le montrent les résultats obtenus (**Tableau 14**), une zone d'éclaircissement est observée dans la boîte correspondant au surnageant filtré de culture de *S. ambofaciens* ATCC 23877. Une activité AFE extracellulaire est donc produite par cette bactérie lorsque celle-ci est cultivée dans le milieu CS en présence de 1% de xylane d'avoine. Ce résultat est en accord avec la littérature puisque tous les *Streptomyces* sp., chez lesquels une activité AFE a été mise en évidence, possédaient une enzyme de nature extracellulaire (MacKenzie *et al.*, 1987 ; Faulds et Williamson, 1991 ; Garcia *et al.*, 1998a,b ; Bartolomé *et al.*, 2003). La nature extracellulaire de cette AFE devrait rendre les étapes de sa purification plus faciles. Par ailleurs, la manipulation génétique et la culture à grande échelle s'effectuent facilement chez les actinomycètes ce qui donne l'accès à des applications biotechnologiques potentielles (Bartolomé *et al.*, 2003). Pour tous ces arguments, ce travail s'est focalisé, dans un premier temps, sur la production d'AFE par *S. ambofaciens* ATCC 23877.

I.2. Choix de l'inducteur et du milieu de culture pour la production d'acide férulique estérase par *S. ambofaciens* ATCC 23877

Il ressort de la partie précédente qu'une activité AFE est présente dans le surnageant d'une culture de *S. ambofaciens* ATCC 23877 menée pendant 48 h dans le milieu CS contenant du xylane d'avoine (1% p/v). Néanmoins, la zone d'éclaircissement visualisée lors de cette expérience est de petite taille (< 1 cm de

diamètre), c'est pourquoi un traitement par ultrafiltration (à l'aide de membranes avec un seuil de coupure de 10 kDa) sera, par la suite, effectué afin de concentrer l'activité AFE produite.

En raison de la nature inductible de l'AFE, six composés sont testés afin d'induire sa synthèse chez *S. ambofaciens* ATCC 23877. Deux milieux de culture différents sont utilisés. Etant donné que la détection de l'activité AFE se fait dans les boîtes contenant du milieu MRS gélosé et que ce dernier n'empêche pas la croissance de *S. ambofaciens* ATCC 23877, ce milieu est donc retenu ainsi que le milieu CS, préconisé pour la croissance des *Streptomyces* de façon générale.

S. ambofaciens ATCC 23877 est mis en culture pendant neuf jours à 37 °C sous agitation à 160 rpm, dans le milieu CS ou MRS dont la source de carbone (dextrines blanches ou glucose, respectivement) a été remplacée par l'un des inducteurs potentiels suivants : le son de blé désamidonné (SB), le son de maïs désamidonné (SM), le xylane d'avoine (XA), la pectine de betterave (PB), le tourteau de colza (TC) ou le férulate d'éthyle (FE). D'autres cultures, effectuées en absence d'inducteur ainsi qu'en présence uniquement de glucose ou de dextrines blanches, sont réalisées simultanément comme témoins (GL (-), GL, DX (-) et DX, respectivement). Des prélèvements de milieux de culture sont effectués toutes les 48 h environ. Ensuite, 10 µl des surnageants filtrés et concentrés 10 fois à l'aide de membranes de 10 kDa sont déposés sur des boîtes contenant du milieu MRS gélosé avec du férulate d'éthyle. Après incubation des boîtes à 37 °C pendant 24 à 48 h, des zones d'éclaircissement apparaissent dans certaines boîtes à partir du deuxième jour de culture (**Tableau 15**).

Il est à noter que pour le même inducteur, la zone d'éclaircissement formée à partir de deuxième jour de culture est souvent plus large que celles correspondant au cinquième, septième et neuvième jour de culture. Cela pourrait indiquer que le plus haut niveau d'activité AFE est atteint dès le deuxième jour de culture.

La plus large zone d'éclaircissement est détectée dans la boîte correspondant à la culture réalisée avec du son de blé désamidonné dans le milieu CS (**Tableau 15**). Par contre, ce composé semblerait induire un peu moins bien la synthèse de l'AFE dans le milieu MRS (**Tableau 15**). De plus, un niveau d'induction similaire est observé lorsque

CH. 3 : Production et purification partielle de l'acide férulique estérase de *S. ambofaciens*

du son de maïs désamidonné, du tourteau de colza ou du xylane d'avoine sont utilisés comme inducteur dans les deux milieux de culture CS et MRS. Il est également à noter qu'une activité AFE peut être détectée même si les surnageants ne sont pas concentrés, pour ces quatre cultures.

Tableau 15. Détection de l'activité AFE dans les surnageants concentrés des cultures de *S. ambofaciens* ATCC 23877 réalisées dans le milieu CS ou MRS en présence de différents inducteurs (au deuxième jour). La concentration finale de l'inducteur est fixée à 1% p/v, à l'exception du FE (0,1% p/v).

Inducteur	Activité AFE (au deuxième jour de culture)	
	Milieu CS	Milieu MRS
SB	+++	++
XA	++	++
SM	++	++
TC	++	++
PB	+	+
FE	–	++
DX	+	Nt
DX (-)	–	Nt
GL	Nt	+
GL (-)	Nt	–

(+++ , ++ , +) Présence d'une large (2 à 3 cm de diamètre), moyenne (1 à 2 cm de diamètre) ou petite (< 1 cm de diamètre) zone d'éclaircissement, respectivement. (–) Aucune zone d'éclaircissement. SB : son de blé désamidonné, SM : son de maïs désamidonné, XA : xylane d'avoine, PB : pectine de betterave, TC : tourteau de colza, FE : férulate d'éthyle, GL : glucose, DX : dextrines blanches, GL (-) : culture sans glucose, DX (-) : culture sans dextrines blanches. Nt= non testé.

De petites zones d'éclaircissement sont apparues lors de la culture en présence de pectine de betterave dans les deux milieux CS et MRS. De plus, une faible activité AFE est remarquée lors de la culture sur les dextrines blanches dans le milieu CS, alors qu'aucune activité AFE n'est détectée en absence de toute source de carbone (DX (-)) ainsi qu'en présence du férulate d'éthyle comme inducteur (**Tableau 15**). Par contre, cet ester semble induire une assez forte synthèse d'AFE dans le milieu MRS. Enfin, une petite activité AFE est observée en présence de glucose (GL) dans ce milieu, alors qu'aucune activité n'est détectée en son absence (GL (-)).

Selon ces résultats (**Tableau 15**), un niveau constitutif d'activité AFE pourrait être présent en absence de composés lignocellulosiques dans le milieu de culture. Le niveau de production semblerait augmenter dans les deux milieux de culture, CS et MRS, en présence d'un inducteur (son de blé désamidonné, son de maïs désamidonné, xylane d'avoine, tourteau de colza ou férulate d'éthyle mais uniquement dans le milieu MRS). Ainsi, le glucose ne semble pas être un répresseur de la synthèse de l'AFE chez *S. ambofaciens* ATCC 23877. Ce résultat est en contradiction avec ceux déjà rapportés dans la littérature. Ainsi, l'activité AFE chez *Streptomyces avermitilis* n'a pas été détectée en présence de glucose comme unique source de carbone (Garcia *et al.*, 1998b). D'autre part, le répresseur catabolique CreA empêche la transcription de gènes des AFE chez *A. niger* en présence d'un substrat facile à métaboliser comme le glucose (De Vries *et al.*, 1999b ; De Vries et Visser, 1999).

Dans les deux milieux MRS et CS, la pectine de betterave semble induire une synthèse de l'AFE mais à un faible niveau. D'autre part, un résultat surprenant est observé lors de l'utilisation du férulate d'éthyle comme inducteur. Cette molécule induit une synthèse de l'AFE uniquement dans le milieu MRS mais aussi fortement que le son de maïs désamidonné, le xylane d'avoine ou le tourteau de colza (**Tableau 15**). Il est d'ailleurs à noter qu'un résultat semblable a été déjà obtenu dans le milieu MRS gélosé lors du criblage des souches productrices d'AFE (§ **I.1.2.1**). Par contre, aucune activité AFE n'est détectée lors de la culture de *S. ambofaciens* ATCC 23877 en présence du férulate d'éthyle dans le milieu CS (**Tableau 15**). Un composé dans ce milieu pourrait donc empêcher l'action inductrice du férulate d'éthyle voire provoquer une répression de la synthèse de l'AFE en présence de cet ester.

Les résultats présentés dans cette partie suggèrent donc que le milieu de culture exerce une influence importante sur l'induction de la synthèse de l'AFE chez *S. ambofaciens* ATCC 23877. De plus, le son de blé désamidonné semble être le meilleur inducteur pour la synthèse de l'AFE chez cette bactérie dans le milieu CS, c'est pourquoi nous avons choisi ces conditions pour la production de l'AFE par *S. ambofaciens* ATCC 23877.

I.3. Quantification de l'activité acide férulique estérase

I.3.1. Dosage de l'activité acide férulique estérase par CLHP

Afin de pouvoir quantifier l'activité AFE produite, plusieurs essais ont été effectués pour mettre au point un protocole permettant le dosage de cette activité enzymatique (**Tableau 16**).

S. ambofaciens ATCC 23877 est cultivé dans le milieu CS dans les conditions évoquées plus haut mais pendant 48 h en présence uniquement de 1% de son de blé désamidonné. A l'issue de cette culture, le surnageant filtré est concentré 10 fois environ par ultrafiltration, à l'aide de membranes de 10 kDa, puis différents volumes du filtrat concentré sont incubés avec la solution de substrat de l'enzyme, le férulate d'éthyle. Un essai est également réalisé avec du férulate de méthyle (FM) comme substrat (**Tableau 16**). Pour chaque essai de dosage, des prélèvements sont effectués pendant 24 h afin de mesurer, par CLHP, l'apparition d'acide férulique, ce qui permet de calculer l'activité enzymatique. L'activité AFE est exprimée en unités définies comme suite : 1U = quantité d'enzyme libérant 1 μ mol d'acide férulique par min à pH 6,5 et à 40 °C.

Seuls les essais 6 et 7 sont positifs alors que l'activité AFE n'est pas quantifiable pour les autres. De meilleurs résultats sont obtenus en utilisant le férulate d'éthyle comme substrat (1,2 mU/ml). Les conditions de l'essai 6 sont donc retenues pour doser l'activité de l'AFE produite.

Tableau 16. Mise au point du dosage de l'activité AFE dans le filtrat d'une culture de *S. ambofaciens* ATCC 23877 de 48 h réalisée en présence de 1% de son de blé désamidonné. Il est à noter que le férulate d'éthyle se dissout dans le tampon phosphate après environ 1 h à 40 °C.

Essai	Substrat	Tampon	Volume d'extrait de culture	T (°C)	Activité AFE (mU/ml)
1	FE 10 % (p/v) dans du DMF (200 µl)	Phosphate de sodium 100 mM – pH 7 (400 µl)	(200 µl)	37	0
				50	0
2	SB 40 mg	Phosphate de sodium 70 mM – pH 6 (1000 µl)	(1000 µl)	40	0
				50	0
3	FE 2 mg/ml dans du tampon (960 µl)	Acétate de sodium 100 mM – pH 4,8 –	(40 µl)	40	0
				50	0
4	FE 5 mM dans du tampon (1000 µl)	MOPS 100 mM – pH 6 –	(1000 µl)	50	0
5	FE 1,33 mM dans du tampon (1500 µl)	Phosphate de sodium 50 mM – pH 5 –	(500 µl)	40	0
				50	0
6	FE 1,33 mM dans du tampon (1500 µl)	Phosphate de sodium 70 mM – pH 6,5 –	(500 µl)	40	1,2
7	FM 1,33 mM dans du tampon (1500 µl)	Phosphate de sodium 70 mM – pH 6,5 –	(500 µl)	40	0,5

FE, FM, SB et MOPS représentent le férulate d'éthyle, le férulate de méthyle, le son de blé désamidonné et l'acide 3-(N-morpholino)propanesulfonique, respectivement.

I.3.2. Concentration de l'activité acide férulique estérase par précipitation au sulfate d'ammonium

Dans cette partie de travail nous avons réalisé des essais de précipitation du surnageant de culture au sulfate d'ammonium afin de concentrer l'activité AFE.

S. ambofaciens ATCC 23877 est mis en culture dans le milieu CS, dans les conditions précédemment évoquées, en présence de 1% de son de blé désamidonné comme inducteur. A l'issue de cette culture, le surnageant acellulaire est fractionné par précipitation au sulfate d'ammonium (0-50% et 50-70% de saturation). Les culots obtenus sont suspendus dans de l'eau distillée. Ensuite, une quantification de l'activité

CH. 3 : Production et purification partielle de l'acide férulique estérase de *S. ambofaciens*

AFE est réalisée pour les solutions obtenues ainsi que pour le surnageant issu de la précipitation avec 50 à 70% de saturation en sulfate d'ammonium.

Une activité spécifique AFE de 0,22 mU/mg de protéines est mesurée dans le précipité obtenu avec 50% de saturation en sulfate d'ammonium (**Tableau 17**). Par contre, aucune activité AFE n'est détectée pour celui obtenu avec 50 à 70% de saturation en sulfate d'ammonium ou dans le surnageant final issu de cette précipitation.

Tableau 17. Fractionnement du surnageant de culture de *S. ambofaciens* ATCC 23877, réalisée dans le milieu CS contenant 1% de SB, par précipitation successive au sulfate d'ammonium (SA).

Etape	Activité AFE (mU/ml)	Activité spécifique AFE (mU/mg protéines)
0-50% de saturation en SA	1,5	0,22
50-70% de saturation en SA	0	0
Surnageant final	0	0

La valeur d'activité volumique AFE mesurée après précipitation pour la culture sur son de blé désamidonné est similaire à celle mesurée après ultrafiltration par membranes de 10 kDa (1,5 ; 1,2 mU/ml, respectivement). La baisse de la valeur d'activité spécifique après précipitation (0,22 contre 0,5 mU/mg de protéines après ultrafiltration) est due à la différence de concentration en protéines mesurée après chaque méthode. Il faut cependant noter que ces valeurs d'activité AFE sont proches de celles déjà obtenues dans le surnageant de *S. avermitilis* (Garcia *et al.*, 1998a). Le maximum d'activité AFE produite par cette bactérie (1,75 mU/ml) a été mesuré lors de la culture en présence de 1% p/v de son de blé désamidonné.

Par ailleurs, un témoin sans cellule est également effectué, non seulement en présence du son de blé désamidonné mais aussi pour tous les autres inducteurs. Les résultats de ces tests montrent l'absence de l'activité AFE, ce qui permet de vérifier qu'aucune AFE n'est apportée dans les milieux de cultures par les différents inducteurs.

I.4. Etudes des paramètres influençant la production d'acide férulique estérase chez *S. ambofaciens* ATCC 23877

Les travaux présentés dans cette partie sont réalisés afin de déterminer les différents paramètres influençant la synthèse de l'AFE chez *S. ambofaciens* ATCC 23877. Ces différents paramètres sont : la nature et la concentration de l'inducteur et la concentration en azote du milieu de culture.

I.4.1. Influence de la nature de l'inducteur sur la production de l'acide férulique estérase

Selon les expériences précédentes menées dans le milieu CS en présence de différents inducteurs, des niveaux d'activité AFE plus ou moins importants ont été détectés (**Tableau 15**). Aussi, afin d'étudier quantitativement l'influence de la nature de l'inducteur sur la synthèse de l'AFE chez *S. ambofaciens* ATCC 23877, toutes ces cultures sont répétées dans cette partie selon les mêmes conditions mais pendant 48 h.

S. ambofaciens ATCC 23877 est mis en culture à 37 °C avec chacun des inducteurs testés (le son de blé désamidonné, le son de maïs désamidonné, le xylane d'avoine, la pectine de betterave, le tourteau de colza ou le férulate d'éthyle). Un essai complémentaire a également été effectué sans dextrines blanches, DX (-). Ce test peut servir de témoin négatif. A l'issue des cultures, 10 ml de chaque surnageant filtré (0,22 µm, Millipore) sont fractionnés par précipitation au sulfate d'ammonium (0-50% de saturation). Les différentes valeurs d'activité spécifique AFE, déterminées par CLHP, sont présentées dans la figure 30.

L'activité spécifique maximale, 0,22 mU/mg de protéines, est mesurée lors de la culture avec 1% de son de blé désamidonné. Un même niveau d'activité (0,21 mU/mg de protéines) est observé dans la culture lorsque 1% de xylane d'avoine est utilisé comme inducteur.

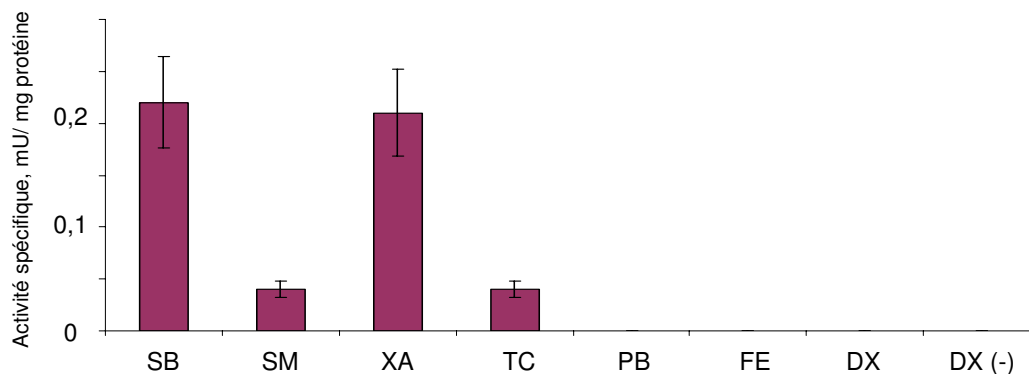


Fig. 30. Valeurs des activités spécifiques de l'AFE détectée dans les surnageants de cultures de *S. ambofaciens* ATCC 23877 avec différents inducteurs après précipitation par le sulfate d'ammonium (50% de saturation). SB : son de blé désamidonné, SM : son de maïs désamidonné, XA : xylane d'avoine, PB : pectine de betterave, TC : tourteau de colza, FE : férulate d'éthyle, DX : dextrines blanches, DX (-) : culture sans dextrines blanches.

Selon MacKenzie *et al.* (1987) et Johnson *et al.* (1988), le xylane d'avoine est plus efficace que le son de blé désamidonné pour induire la synthèse de l'AFE chez *S. olivochromogenes*. Cependant, d'autres études montrent que le son de blé désamidonné peut induire la synthèse d'AFE chez *S. avermitilis* à de hauts niveaux par rapport à celle réalisée lors de l'utilisation de xylane d'avoine (Garcia *et al.*, 1998a,b). Chez *S. ambofaciens* ATCC 23877, selon nos résultats, ces deux composés induisent la synthèse de l'AFE à un niveau similaire (**Fig. 30**).

Par ailleurs, un faible niveau d'activité (0,04 mU/mg de protéines) est observé en présence du son de maïs désamidonné ou du tourteau de colza. Dans le cas de la pectine de betterave et des dextrines blanches, l'activité AFE, précédemment détectée lors du test sur milieu gélosé, est trop faible pour pouvoir être quantifiée par CLHP. Par contre, aucune activité AFE n'est observée en absence de toute source de carbone, DX (-), ou en présence de 0,1% de férulate d'éthyle. Comme observé précédemment (**Tableau 15**), la présence de cet ester dans le milieu CS pourrait provoquer une répression de la synthèse de l'AFE.

Comme nous l'avons déjà proposé (§ I.2), des productions constitutives de l'AFE sont constatées (mais non quantifiables) en absence de composés lignocellulosiques dans les milieux de culture (lors de l'utilisation des dextrines blanches comme source de

carbone principale). Cependant, le faible niveau d'activité obtenu dans ces conditions est fortement accrue en présence de composés lignocellulosiques (son de blé désamidonné, son de maïs désamidonné, xylane d'avoine ou tourteau de colza). Ceci confirme le caractère inductible de la synthèse de l'AFE de *S. ambofaciens* ATCC 23877.

Un résultat similaire a déjà été publié par Johnson *et al.*, 1988. Ces auteurs ont rapporté la présence d'activités AFE constitutives en absence de molécules lignocellulosiques dans le milieu de culture d'un autre *Streptomyces*, *S. olivochromogenes*. Toutefois, l'activité produite par cette bactérie était 173 fois ou 59 fois plus importante en présence de 1% p/v de xylane d'avoine ou de son de blé désamidonné, respectivement.

La pectine de betterave, quant à elle, ne semble pas induire la synthèse de l'AFE chez *S. ambofaciens* ATCC 23877. L'activité détectée lors de la culture sur la pectine de betterave (**Tableau 15**) pourrait être due au niveau constitutif d'AFE présent chez la bactérie. Il est également possible que ce composé induise la synthèse de l'AFE mais à un faible niveau, l'activité produite restant alors non quantifiable.

L'influence de la nature de l'inducteur sur la production de l'AFE par *S. ambofaciens* ATCC 23877 confirme donc la nécessité de la présence d'un composé lignocellulosique pour induire la synthèse de cette enzyme. Ce résultat est en accord avec ce qui a été proposé précédemment pour *S. avermitilis* cultivé en présence de 1% p/v de xylane d'avoine ou de son de blé désamidonné (Garcia *et al.*, 1998a,b).

Cependant, aucun mécanisme clair d'induction de la synthèse des AFE n'est rapporté dans la littérature. Nous pouvons proposer que l'induction de la synthèse de l'AFE de *S. ambofaciens* ATCC 23877 puisse avoir lieu selon l'hypothèse suivante : le niveau constitutif de l'AFE chez *S. ambofaciens* ATCC 23877 hydrolyse les inducteurs lignocellulosiques en différents oligosaccharides féruloylés solubles. Ces derniers seraient alors impliqués dans la procédure de l'induction à des niveaux plus ou moins importants selon leurs natures et leurs compositions qui diffèrent d'un inducteur à l'autre. Différents niveaux de production d'AFE seraient donc obtenus selon l'inducteur utilisé.

Nous ne pouvons pas exclure que les différences d'activités AFE soient dues à des niveaux de croissance différents avec les différents inducteurs utilisés. Malheureusement, la plupart des inducteurs utilisés lors de ce travail sont insolubles, tel que le son de blé désamidonné par exemple, ce qui est gênant pour l'estimation de la croissance cellulaire de *S. ambofaciens* ATCC 23877. De plus, celle-ci est une bactérie filamenteuse qui peut se développer sur la surface de l'inducteur insoluble ce qui rend difficile voire impossible la détermination de la croissance bactérienne par les méthodes spectrophotométriques (en mesurant la densité optique cellulaire). L'estimation de la croissance de *S. ambofaciens* ATCC 23877 par dosage des protéines cellulaires est également problématique puisqu'une quantité de protéines est apportée dans le milieu de culture par l'inducteur.

Il existe cependant d'autres méthodes pour mesurer la croissance bactérienne telles que celle réalisée par dosage d'ADN. Néanmoins, il aurait fallu développer cette méthode pour qu'elle soit adaptée aux conditions utilisées lors de ce travail. Mais nous avons fait le choix de ne pas suivre l'évolution de la concentration en biomasse au cours des cultures réalisées pendant ce travail. Il est également à noter que la détermination de la croissance bactérienne est rarement rapportée dans la majorité des recherches portant sur la production des AFE par les *Streptomyces*. Par exemple, Johnson *et al.*, (1988) ont pu estimer la croissance de *S. olivochromogenes*, lors de sa culture en présence de 1% de son de blé désamidonné, par mesure des protéines mycéliennes. Toutefois, leur méthode n'était pas clairement expliquée.

D'après les résultats obtenus jusque maintenant, des niveaux plus ou moins forts de la production de l'AFE par *S. ambofaciens* ATCC 23877 sont mesurés. Mais, existe-t-il une relation entre le niveau d'activité enzymatique produite et la richesse en acide férulique de l'inducteur utilisé ? Afin de répondre à cette question, des essais ont été réalisés pour mesurer la quantité d'acide férulique présent dans les différents inducteurs utilisés.

I.4.2. Dosage de l'acide férulique libéré dans les milieux de culture

Généralement, la production d'AFE s'accompagne d'une accumulation d'acide férulique dans le milieu de culture des micro-organismes producteurs. C'est pourquoi, l'acide férulique libéré à partir des inducteurs par l'AFE de *S. ambofaciens* ATCC 23877 est mesuré. Les cellules sont donc incubées avec chacun des inducteurs testés (à

l'exception du tourteau de colza) pendant neuf jours à 37 °C sous agitation à 160 rpm. Des échantillons de surnageants de culture sont prélevés au cours du temps afin de doser l'acide férulique libéré par l'AFE produite.

La figure 31, ci-dessous, montre l'évolution de la concentration en acide férulique libéré à partir des inducteurs, par l'AFE de *S. ambofaciens* ATCC 23877, au cours des différentes cultures réalisées.

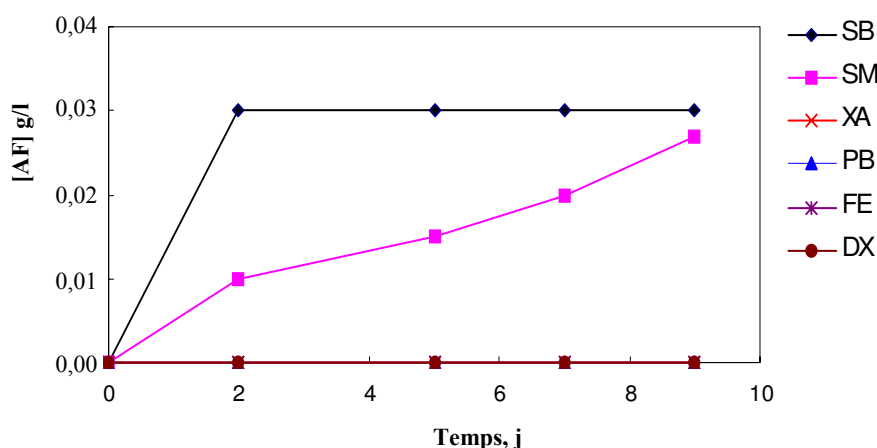


Fig. 31. Concentrations de l'acide férulique (AF) libéré dans les surnageants de culture de *S. ambofaciens* ATCC 23877 pendant neuf jours en présence de différents inducteurs. SB : son de blé désamidonné, SM : son de maïs désamidonné, XA : xylane d'avoine, PB : pectine de betterave, FE : férulate d'éthyle, DX : dextrines blanches.

La concentration maximale d'acide férulique libéré du son de blé désamidonné et du son de maïs désamidonné est environ de 0,03 g/l. La concentration augmente progressivement à partir du deuxième jour de culture sur le son de maïs désamidonné jusqu'à la valeur de 0,03 g/l au neuvième jour. Par contre, cette valeur est atteinte dès le deuxième jour de culture sur le son de blé désamidonné. Cela peut s'expliquer par la production d'une activité AFE plus forte que celle formée lors de la culture sur le son de maïs désamidonné (**Fig. 30**). La structure du son de maïs désamidonné est peut-être plus complexe que celle du son de blé désamidonné, ce qui expliquerait une hydrolyse plus difficile des liaisons esters d'acide férulique du son de maïs désamidonné par l'AFE produite.

En ce qui concerne les autres cultures, aucune accumulation d'acide férulique n'est mesurée dans les surnageants. Ceci était attendu, d'une part dans le cas des dextrines blanches car ce sont des glucides dont la structure ne contient pas d'acide férulique estérifié, et d'autre part dans le cas du férulate d'éthyle puisqu'aucune activité AFE n'est détectée lors de la culture réalisée avec ce composé (**Fig. 30**).

Quant au xylane d'avoine, aucune accumulation d'acide férulique n'est également détectée dans le milieu de culture, ceci s'explique sans doute par la présence d'acide férulique estérifié dans cet inducteur en trop faible quantité pour être détectée (Faulds *et al.*, 1997 ; De Vries *et al.*, 1999a). La pectine de betterave pourrait également contenir un niveau non détectable d'acide férulique estérifié puisqu'aucune accumulation d'acide férulique n'est observée dans le milieu de culture réalisée avec 1% de cet inducteur (**Fig. 31**).

D'après ces résultats, il ne semble pas exister de relation entre la quantité d'acide férulique présent dans l'inducteur et la production de l'AFE. Des résultats similaires ont déjà été publiés chez *S. avermitilis* (Garcia *et al.*, 1998a ; Ferreira *et al.*, 1999). L'acide férulique accumulé ne semble donc pas jouer un rôle dans l'induction de la synthèse d'AFE chez *S. ambofaciens* ATCC 23877. Cette induction serait plutôt la conséquence de la présence des composés lignocellulosiques dans le milieu de culture (Tenkanen *et al.*, 1991). Il est cependant à noter que Borneman *et al.* (1990) ont rapporté une corrélation entre l'activité AFE du champignon *Neocallimastix* MC-2 et la quantité d'acide férulique estérifié dans l'inducteur.

Par ailleurs, l'acide férulique libéré dans les surnageants de culture de *S. ambofaciens* ATCC 23877 ne semble pas être consommé par la bactérie car sa concentration reste stable au cours du temps. Cela a déjà été montré chez *Streptomyces griseus* B1 qui n'est pas capable de croître sur un milieu contenant l'acide férulique comme seule source de carbone (Arora *et al.*, 2005). Cependant, certains micro-organismes, tels que *Paecilomyces varioti* et *Pestalotia palmarum* (Rahouti *et al.*, 1989), utilisent l'acide férulique et d'autres composés phénoliques comme source de carbone quand les sucres initialement présents dans le milieu de culture sont totalement consommés. Nishimura *et al.* (2006) ont également rapporté la capacité de *Streptomyces* NL15-2K à utiliser des acides phénoliques, tels que l'acide férulique et l'acide caféique,

comme seule source de carbone. De plus, chez *A. niger*, lorsque 0,03% (p/v) d'acide férulique sont ajoutés dans un milieu de culture contenant 1% de xylane d'avoine, l'acide férulique ajouté est rapidement consommé pendant les 24 premières heures de culture (Faulds *et al.*, 1997). Donc, chez *S. ambofaciens* ATCC 23877, les seules sources de carbone disponibles dans le milieu de culture semblent être celles apportées par les extraits de levure et de viande voire les sucres issus de l'hydrolyse de l'inducteur.

En ce qui concerne le tourteau de colza, au terme de la culture réalisée sur cet inducteur pendant 48 h, une accumulation de 0,01 g/l d'un composé phénolique est observée dans le milieu de culture. Ce composé phénolique est identifié par CLHP à l'acide sinapique grâce à son spectre UV et à un témoin commercial. L'acide sinapique et ses dérivés sont les composés phénoliques principaux trouvés dans le tourteau de colza (Fenton *et al.*, 1980 ; Vuorela *et al.*, 2003). D'autres acides phénoliques peuvent aussi être présents, mais la détermination de leur quantité et la détection de leur présence peuvent varier d'une étude à l'autre selon la méthode analytique utilisée. Par exemple, Fenton *et al.*, 1980 ont rapporté la présence de très petites quantités d'acide vanillique, d'acide férulique et d'acide syringique dans le tourteau de colza comparativement à l'acide sinapique.

I.4.3. Détermination de la quantité totale d'acide férulique estérifié présent dans les inducteurs

L'estimation de la quantité totale d'acide férulique estérifié présent dans les différents inducteurs est réalisée après hydrolyse par une AFE commerciale, le DepolTM 740L. Cette préparation industrielle est riche en activité AFE produite par le champignon *Humicola* sp.

Ainsi, 1% p/v de chaque inducteur (le son de blé désamidonné, le son de maïs désamidonné, le xylane d'avoine ou la pectine de betterave) est incubé avec le DepolTM 740L à 40 °C. Des prélèvements sont effectués au cours du temps pour mesurer l'acide férulique libéré (**Fig. 32**).

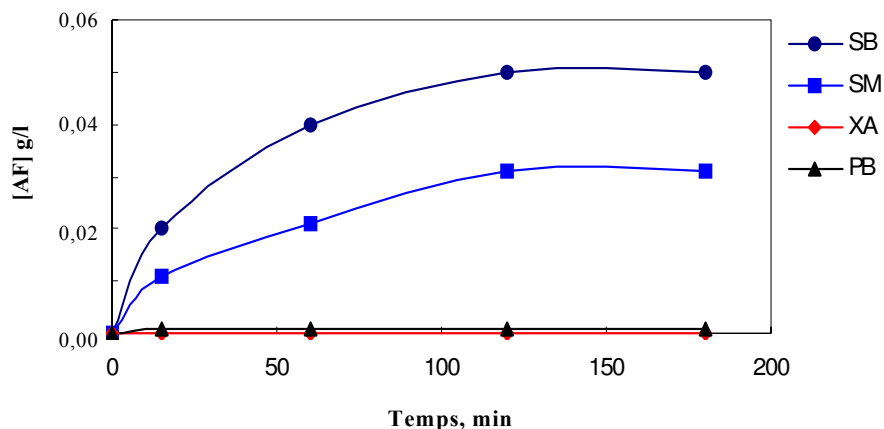


Fig. 32. Cinétique de libération de l'acide férulique estérifié dans différents inducteurs par le DepolTM 740L. SB : son de blé désamidonné, SM : son de maïs désamidonné, XA : xylane d'avoine, PB : pectine de betterave.

D'après la figure 32, le maximum d'acide férulique que le DepolTM 740L peut libérer de 1% p/v du son de blé désamidonné est de 0,05 g/l, soit 0,5% p/p, tandis que seuls 0,03 g/l d'acide férulique sont libérés à partir du son de maïs désamidonné.

Andreasen *et al.* (2001) ont déjà déterminé la quantité totale d'acide férulique présent dans le son de blé désamidonné à l'aide d'une extraction alcaline pendant 18 h. Leur résultat (0,54% p/p) est très proche de celui que nous avons obtenu. D'autres recherches ont également constaté des valeurs similaires (0,45% p/p (Garcia *et al.*, 1998a) ; 0,5% p/p (Ferreira *et al.*, 1999)). Tout l'acide férulique, présent dans le son de blé désamidonné et extractible par un traitement alcalin, est donc libéré par l'action du DepolTM 740L après 2 h d'incubation (**Tableau 18**).

Dans le son de maïs désamidonné, la quantité d'acide férulique libérée par le DepolTM 740L est de 0,3% p/p. Cette quantité est loin de représenter le total de l'acide férulique estérifié présent dans le son de maïs désamidonné car, d'après la littérature, il en contient près de 3% p/p (Saulnier *et al.*, 1999). Cette faible libération de l'acide férulique tient au fait que la paroi cellulaire de son de maïs est très résistante vis-à-vis des dégradations enzymatiques à cause de la grande complexité structurale de sa partie hémicellulosique (Faulds *et al.*, 1995). L'accessibilité des estérases aux régions féruloylés de son de maïs est donc limitée. L'AFE du DepolTM 740L est vraisemblablement bloquée par les branchements et les substitutions de la chaîne

principale de l'hétéroxylane. Cette AFE, en agissant uniquement sur les régions accessibles, ne libère que 10% p/p de l'acide férulique présent dans le son de maïs désamidonné (**Tableau 18**).

Tableau 18. Quantité totale d'acide férulique (AF) estérifié présent dans l'inducteur et pourcentages d'acide férulique libéré à partir de cet inducteur par le DepolTM 740L ainsi que par l'AFE de *S. ambofaciens* ATCC 23877 après 48 h de culture. Ces pourcentages sont calculés par rapport à la quantité totale d'acide férulique estérifié présent dans l'inducteur.

Inducteur (1% p/v)	[AF] total (% p/p)	[AF] libéré (% p/p)	
		par le Depol TM 740L	par l'AFE de <i>S. ambofaciens</i>
SB	0,5	100	60
SM	3	10	3,3

SB : son de blé désamidonné, SM : son de maïs désamidonné.

En ce qui concerne la pectine de betterave, il n'y a pas d'acide férulique libéré par le DepolTM 740L (**Fig. 32**). Pourtant, cette pectine est considérée, dans la littérature, comme une source intéressante d'acide férulique : 0,6% à 3% de la matière sèche, quantités qui dépendent de la variété des betteraves, du climat et du terroir (Synytsya *et al.*, 2002). Cependant, la libération de l'acide férulique à partir de la pectine de betterave exige une batterie d'enzymes qui ne sont pas présentes dans le DepolTM 740L. D'après De Vries *et al.* (2002), un pré-traitement de la pectine de betterave par d'autres activités enzymatiques, notamment une rhamnogalacturonane acétylestérase et une rhamnogalacturonane hydrolase, est indispensable pour la libération de l'acide férulique par des AFE d'*A. niger*. De plus, le maximum de l'acide férulique n'est libéré qu'en présence d'une combinaison de ces AFE avec une arabinofuranosidase et une β -galactosidase. Ainsi, le manque éventuel de telles activités enzymatiques dans le DepolTM 740L pourraient expliquer l'incapacité de ce dernier à libérer l'acide férulique présent dans la pectine de betterave.

Le xylane d'avoine, quant à lui, ne contient pas de quantité détectable d'acide férulique estérifié (**Fig. 32**), ce qui est en accord avec les résultats de la littérature (Faulds *et al.*, 1997 ; De Vries *et al.*, 1999a).

En ce qui concerne le tourteau de colza, nous l'avons également incubé avec le DepolTM 740L dans les conditions évoquées plus haut. Aucune quantité d'acide férulique n'est détectée. Par contre, de l'acide sinapique est libéré, après 2 h de traitement, à une concentration de 0,03 g/l. Ainsi, la quantité de cet acide phénolique libéré par le DepolTM 740L est de 0,3% p/p, alors que l'AFE de *S. ambofaciens* ATCC 23877, en 48 h de culture, ne peut libérer que 0,1% p/p d'acide sinapique (soit 0,01 g/l ; § I.4.2).

Dans le tableau 18 sont résumés l'ensemble de ces résultats. Il en ressort que les quantités d'acide férulique libéré à partir de son de blé désamidonné et de son de maïs désamidonné sont plus élevées en utilisant le DepolTM 740L que celles observées avec l'AFE produite par *S. ambofaciens* ATCC 23877. Une plus forte activité AFE est donc présente dans le DepolTM 740L. De plus, la présence probable d'autres enzymes dans le DepolTM 740L pourrait expliquer cette efficacité par un phénomène de synergie. Souvent, une hydrolyse de l'acide férulique présent dans les composés lignocellulosiques exige une telle interaction synergique entre plusieurs enzymes, comme l'ont déjà rapporté Faulds *et al.*, 1995. Selon leur résultat, seul 0,3% du total de l'acide férulique présent dans le son de maïs désamidonné est libéré par une activité AFE d'*A. niger*. Cette libération augmente jusqu'à 0,6% et 2,3% en présence, respectivement, de xylanase et de Driselase (mélange complexe de plusieurs enzymes dégradant les polysaccharides).

En conclusion, il n'y a pas de rapport entre la production d'AFE par *S. ambofaciens* ATCC 23877 et le contenu en acide férulique des composés lignocellulosiques utilisés comme inducteur. D'autres études ont également donné le même résultat (Tenkanen *et al.*, 1991 ; Christov et Prior, 1993 ; Garcia *et al.*, 1998a). Cela peut être interprété par le fait que l'induction de la synthèse des AFE dépend plutôt de la nature des liaisons esters entre l'acide férulique et les sucres dans l'inducteur utilisé (Tenkanen *et al.*, 1991 ; Christov et Prior, 1993).

I.4.4. Influence de l'acide férulique sur l'induction de la synthèse de l'acide férulique estérase

Chez *A. niger*, les deux systèmes principaux de régulation des gènes codant pour les AFE sont le répresseur CreA et l'activateur transcriptionnel XlnR. Néanmoins, un troisième facteur peut aussi influencer l'expression de ces gènes, il s'agit de la présence des composés aromatiques ayant une structure semblable à celle de l'acide férulique (**Chapitre 1 ; § II.7.1**). Ainsi, la capacité de l'acide férulique à induire la synthèse des AFE chez les eucaryotes a déjà été rapportée dans plusieurs travaux notamment chez *A. niger* (De Vries *et al.*, 1999a ; De Vries et Visser, 1999).

Afin d'examiner cette propriété de l'acide férulique chez *S. ambofaciens* ATCC 23877, la bactérie est incubée pendant 48 h à 37 °C dans le milieu CS, contenant 1% p/v de son de blé désamidonné, supplémenté avec différentes concentrations d'acide férulique (**Tableau 19**). Des essais complémentaires sont également réalisés avec de l'acide férulique seul (en absence de son de blé désamidonné) ou en présence de 1% p/v de xylane d'avoine.

Tableau 19. Effet de l'acide férulique (AF) sur la production de l'AFE par *S. ambofaciens* ATCC 23877.

Inducteur	Activité spécifique AFE (mU/mg protéines)
SB 1%	0,22
SB 1% + 0,03 g/l d'AF	0,20
SB 1% + 0,17 g/l d'AF	0,06
SB 1% + 0,3 g/l d'AF	0
XA 1% + 0,3 g/l d'AF	0
0,3 g/l d'AF	0

SB : son de blé désamidonné, XA : xylane d'avoine.

D'après les résultats obtenus (**Tableau 19**), aucune activité AFE n'est détectée en présence d'acide férulique seul à 0,3 g/l. Cela confirme, de nouveau, le besoin de la présence d'un composé lignocellulosique pour effectuer l'induction de la synthèse de l'AFE chez *S. ambofaciens* ATCC 23877.

Par ailleurs, la présence de 0,03 g/l d'acide férulique dans le milieu de culture contenant 1% de son de blé désamidonné n'a aucun effet sur la production de l'AFE puisqu'un niveau similaire d'activité est produit en absence d'acide férulique. Par contre, l'augmentation de la quantité d'acide férulique ajouté dans le milieu jusqu'à 0,17 g/l entraîne une diminution de 75% environ de l'activité spécifique AFE, et à 0,3 g/l d'acide férulique, la synthèse de l'AFE est complètement réprimée malgré la présence de 1% d'inducteur (son de blé désamidonné ou xylane d'avoine).

Dans la littérature, des résultats différents ont déjà été obtenus chez certaines souches de champignons. Chez *A. niger* par exemple, l'ajout de 0,3 g/l d'acide férulique dans le milieu de culture contenant du xylane d'avoine comme inducteur (à 1% p/v) augmente la production de l'activité AFE (De Vries *et al.*, 1999a ; Faulds et Williamson., 1999). De Vries et Visser (1999) ont constaté une augmentation du niveau de l'expression du gène *faeA*, codant la FaeA chez *A. niger*, lors de l'ajout de 0,3 g/l d'acide férulique dans un milieu de culture contenant de l'arabinose. Cependant, cet ajout d'acide férulique n'avait pas un effet significatif sur l'expression d'autres gènes tels que *aguA*, codant une α -glucuronidase, ce qui peut indiquer que l'acide férulique n'affecte pas la régulation de tous les gènes xylanolytiques. De plus, un haut niveau d'expression de *faeA* a été observé en présence de 0,3 g/l d'acide férulique seul (De Vries et Visser, 1999 ; De Vries *et al.*, 2002). Par contre, cette même quantité d'acide férulique est responsable de la réduction de la transcription du gène *faeB*, codant pour une autre AFE, la FaeB, chez le même champignon (De Vries *et al.*, 2002).

Pour Faulds *et al.* (1997), cet acide phénolique peut stimuler ou dé-réprimer la production des AFE chez *A. niger*, mais il n'est pas absolument essentiel pour cette production.

A l'inverse, nos résultats montrent un effet répressif de l'acide férulique (à 0,3 g/l) sur l'induction de la synthèse de l'AFE chez *S. ambofaciens* ATCC 23877, ce qui suggère que les mécanismes d'induction chez les eucaryotes sont différents de ceux observés chez les procaryotes. Une étude réalisée par Dalrymple et Swadling (1997) a déjà montré une répression du gène *cinB*, codant pour une AFE chez la bactérie *B. fibrisolvens* E14, par une protéine appelée CinR (**Chapitre 1 ; § II.7.3**). Cependant, la présence des oligosaccharides riches en esters d'acide férulique annule presque

complètement cet effet de CinR, ce qui rend la transcription du gène *cinB* possible. Toutefois, l'acide férulique seul (à 0,2 g/l) n'est pas capable de jouer le même rôle que les oligosaccharides sur CinR. Le gène *cinB* reste donc réprimé en présence de cette quantité d'acide férulique.

I.4.5. Etude de paramètres susceptibles d'influencer la production de l'acide férulique estérase

D'après les résultats obtenus jusque maintenant, les deux meilleurs composés utilisés pour induire la synthèse de l'AFE chez *S. ambofaciens* ATCC 23877 sont le son de blé désamidonné et le xylane d'avoine. Cependant, nous avons fait le choix de continuer ce travail avec le son de blé désamidonné. En effet, ce composé est plus utilisé dans la littérature pour l'induction de synthèse d'AFE chez les *Streptomyces*, notamment chez *S. avermitilis* (Garcia *et al.*, 1998a,b).

L'objectif des études réalisées dans cette partie est d'étudier l'influence de paramètres pouvant avoir un impact sur le niveau de production de l'AFE telles que la concentration en son de blé désamidonné. D'autres paramètres, tels que la concentration en azote du milieu de culture, sont également étudiés.

I.4.5.1. Influence de la concentration en son de blé

Dans la plupart des recherches déjà publiées, 1% d'inducteur est utilisé pour induire la synthèse d'AFE (MacKenzie *et al.*, 1987 ; Faulds et Williamson, 1991 ; Garcia *et al.*, 1998a,b ; Bartolomé *et al.*, 2003). Afin de tenter d'augmenter le niveau de production de l'AFE par *S. ambofaciens* ATCC 23877, des essais sont effectués en utilisant cinq concentrations en son de blé désamidonné : 0,1 ; 0,5 ; 1 ; 2 et 5% p/v.

S. ambofaciens ATCC 23877 est mis en croissance dans du milieu CS contenant différentes concentrations en son de blé désamidonné. Après 48 h de culture, des prélèvements sont effectués pour doser l'acide férulique libéré ainsi que l'activité AFE produite. Les résultats de ces expériences sont présentés dans le tableau 20 ci-dessous.

Tableau 20. Influence de la concentration en son de blé désamidonné (SB) sur l'activité AFE de *S. ambofaciens* ATCC 23877. [AF] représente la concentration en acide férulique libéré dans les milieux de culture après 48 h.

SB% (p/v)	[AF] libéré (g/l)	Protéines (mg/ml)	Activité AFE (mU/ml)	Activité spécifique AFE (mU/mg protéines)
0,1	0	1,8	0	0
0,5	0,01	5,6	0,5	0,09
1	0,03	6,8	1,5	0,22
2	0,07	11	2	0,19
5	0,17	17,6	1,4	0,08

Aucune activité AFE n'est mesurée en présence de 0,1% de son de blé désamidonné. Cette concentration ne semble pas être suffisante pour induire la synthèse de l'AFE chez *S. ambofaciens* ATCC 23877. Par contre, un faible niveau d'activité spécifique (0,09 mU/mg de protéines) est mesuré pour une concentration de 0,5% en son de blé désamidonné. Cette activité augmente de presque 2,5 fois lors de la culture avec 1% de son de blé désamidonné jusqu'à atteindre la valeur maximale de 0,22 mU/mg de protéines. En augmentant la quantité de son de blé désamidonné à 2%, un niveau similaire d'activité spécifique est obtenu (0,19 mU/mg de protéines). Par contre, une augmentation à 5% réduit de 65% l'activité spécifique mesurée. Néanmoins, l'activité AFE est presque identique pour 1% et 5% de son de blé désamidonné. La différence de la valeur d'activité spécifique dans ces deux cas peut être attribuée à la différence de concentration en protéines mesurée dans les milieux de culture. La raison pour la quelle l'activité AFE n'augmente plus en utilisant 5% de son de blé désamidonné semble être due à une accumulation d'acide férulique dans le milieu de culture (0,17 g/l) qui pourrait réprimer partiellement la synthèse de l'enzyme (§ I.4.4).

Pour conclure, la meilleure concentration en son de blé désamidonné induisant la plus forte activité AFE (2 mU/ml) est théoriquement 2%. Néanmoins, la concentration de protéines mesurée dans ce cas est importante, ce qui peut entraîner une réduction de l'activité spécifique. Par ailleurs, l'augmentation de la concentration en son de blé désamidonné peut rendre problématique la purification de l'AFE produite. Pour cette raison, 1% de son de blé désamidonné est la concentration que nous avons choisie afin

d'induire la synthèse de l'AFE chez *S. ambofaciens* ATCC 23877 lors des expériences suivantes.

1.4.5.2. Influence de la concentration en source d'azote

La concentration en source d'azote fournie au micro-organisme au cours de ce travail est de 0,1% p/v. Cette valeur est inférieure à celle relevée dans la littérature (0,6% p/v) pour une autre espèce de *Streptomyces*, *S. avermitilis* utilisée pour la production d'AFE (Garcia *et al.*, 1998b). Il pourrait donc être judicieux d'augmenter la concentration en source d'azote, ce qui pourrait permettre, en favorisant la croissance du micro-organisme, une amélioration de la production d'AFE par *S. ambofaciens* ATCC 23877. Les cellules sont donc mises en culture dans le milieu CS contenant 1% p/v de son de blé désamidonné mais en présence de 0,5% p/v de source d'azote (extrait de levure) contre 0,1% p/v précédemment. Après les 48 h de culture à 37 °C, une activité AFE de 1,3 mU/ml est mesurée et 0,03 g/l d'acide férulique sont accumulés dans le milieu de culture. Il apparaît donc que l'augmentation de la concentration en source d'azote n'améliore pas le niveau de production de l'AFE. Ainsi, 0,1% d'extrait de levure semble être suffisant comme source d'azote pour produire l'AFE par *S. ambofaciens* ATCC 23877 dans le milieu CS contenant du son de blé désamidonné.

La nécessité de la présence, à la fois, de l'extrait de levure comme source d'azote (à 0,6% p/v) et du son de blé désamidonné (à 1% p/v) comme source de carbone pour induire la synthèse de l'AFE chez *S. avermitilis* avait déjà été confirmée par Garcia *et al.*, 1998b. Le maximum d'activité AFE a été mesuré en présence de ces deux composés. Par contre, les cellules ont eu du mal à croître dans des milieux contenant d'autres sources azotées, telles que l'urée ou le sulfate d'ammonium.

1.4.5.3. Influence de la présence de xylanase sur l'induction de la synthèse de l'acide férulique estérase

Aucun mécanisme clair d'induction de la synthèse des AFE n'est rapporté dans la littérature. Pour notre part, nous avons proposé une hypothèse pour tenter d'expliquer l'induction de la synthèse de l'AFE chez *S. ambofaciens* ATCC 23877 (§ **1.4.1**) : le niveau constitutif de l'AFE pourrait hydrolyser l'inducteur lignocellulosique en différents oligosaccharides féruloylés solubles qui seraient alors impliqués dans la procédure d'induction.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons pensé que l'ajout d'une xylanase dans le milieu de culture de *S. ambofaciens* ATCC 23877 pourrait conduire à la production d'oligosaccharides féruloylés d'une structure et/ou d'une taille favorable à une meilleure induction de la synthèse de l'AFE. C'est pourquoi, avant la mise en culture de *S. ambofaciens* ATCC 23877, le milieu CS contenant 1% de son de blé désamidonné a été traité par la xylanase de *Theryomyces lanuginosus* (2,5 U/ml) pendant 17 h à 50 °C afin d'hydrolyser le xylane du son de blé. 1 unité de xylanase est définie comme la quantité d'enzyme produisant 1 µmol de sucres réducteurs tels que le xylose par min à 50 °C. Nous avons vérifié que cette xylanase ne possédait aucune activité AFE, ce qui est en accord avec la littérature (Topakas *et al.*, 2003b ; Topakas *et al.*, 2005b).

Après 48 h de culture, une activité AFE de 0,19 mU/mg de protéines est mesurée. Cette valeur d'activité spécifique est similaire à celle obtenue en présence de son de blé non traité par la xylanase (0,22 mU/mg de protéines). De plus, une accumulation d'acide férulique à un niveau similaire (0,03 g/l) est mesurée dans les deux milieux de culture après 48 h. Aucun effet de la xylanase n'est donc observé sur l'induction de la synthèse de l'AFE chez *S. ambofaciens* ATCC 23877.

II. Production de l'acide férulique estérase par *S. ambofaciens* ATCC 23877

Jusqu'à présent, c'est dans des fioles d'Erlenmeyer que les conditions de culture permettant la meilleure production d'AFE par *S. ambofaciens* ATCC 23877 ont été établies. Celles-ci seront donc appliquées à des cultures en bioréacteur de 2 l. L'objectif de ce changement d'échelle est de produire l'AFE de *S. ambofaciens* ATCC 23877 en quantité importante permettant, par la suite, sa purification puis son utilisation en milieu hydro-organique afin de synthétiser de nouvelles molécules intéressantes.

II.1. Production de l'acide férulique estérase en bioréacteur

Des productions d'AFE en bioréacteur sont réalisées en utilisant le son de blé désamidonné (1% p/v) comme inducteur. La culture est poursuivie pendant 48 h à 37 °C sous agitation à 500 rpm. Des prélèvements sont effectués au cours du temps pour doser l'activité AFE produite ainsi que l'acide férulique libéré dans le milieu de culture. Les différentes valeurs d'activité AFE sont mesurées après précipitation au sulfate d'ammonium (50% de saturation). Les résultats sont présentés sur la figure 33.

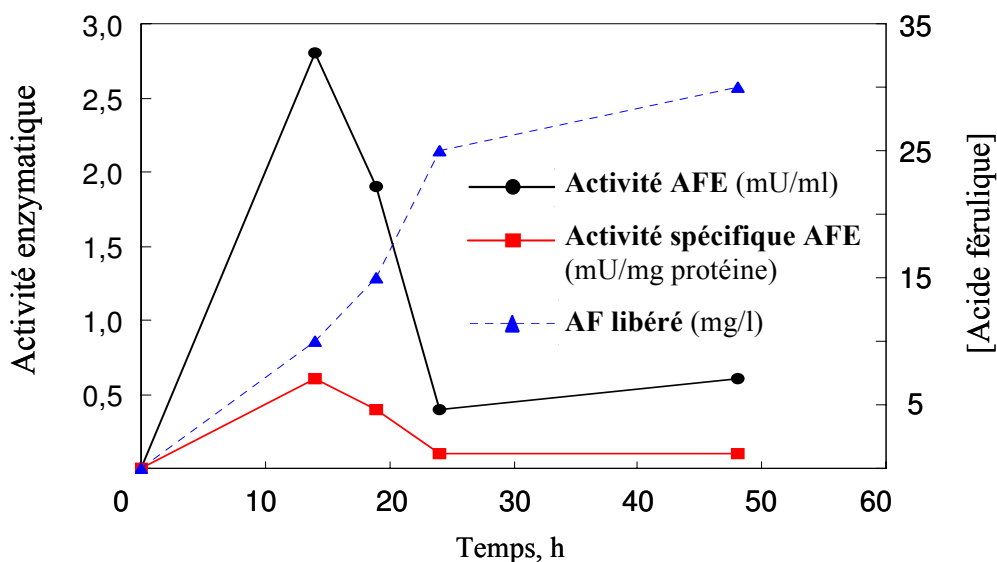


Fig. 33. Evolution de l'activité AFE obtenue en bioréacteur ainsi que des concentrations en acide férulique (AF) libéré au cours du temps.

Le niveau de production de l'AFE semble être plus important en bioréacteur qu'en fiole d'Erlenmeyer. En effet, les valeurs maximales d'activité spécifique et volumique obtenues en bioréacteur sont de l'ordre de 0,6 mU/mg de protéines et de 2,8 mU/ml contre 0,22 mU/mg de protéines et 1,5 mU/ml en fiole, respectivement (**Tableau 17**). Ce maximum d'activité AFE est obtenu après environ 14 h de culture. Au-delà, l'activité décroît. Par ailleurs, l'action de l'AFE sur le son de blé désamidonné libère de l'acide férulique qui s'accumule dans le milieu de culture jusqu'à atteindre une concentration de 0,03 g/l après 48 h (**Fig. 33**), concentration insuffisante pour exercer une répression sur la synthèse d'AFE (**Tableau 19**). L'acide férulique n'est donc pas la cause de la diminution de l'activité AFE pendant la culture en bioréacteur. Cette diminution pourrait être due à une instabilité de l'AFE produite et/ou à l'action hydrolytique de protéases produites éventuellement par *S. ambofaciens* ATCC 23877 au cours de la culture.

Stabilité thermique de l'acide férulique estérase de *S. ambofaciens* ATCC 23877

Une des raisons pour lesquelles l'activité AFE diminue après 14 h de culture en bioréacteur pourrait être l'instabilité de l'enzyme à 37 °C (température de culture). Pour vérifier cette hypothèse, l'enzyme est incubée à 37 °C pendant 2 h. Le résultat de cette expérience est représenté dans la figure 34 ci-dessous.

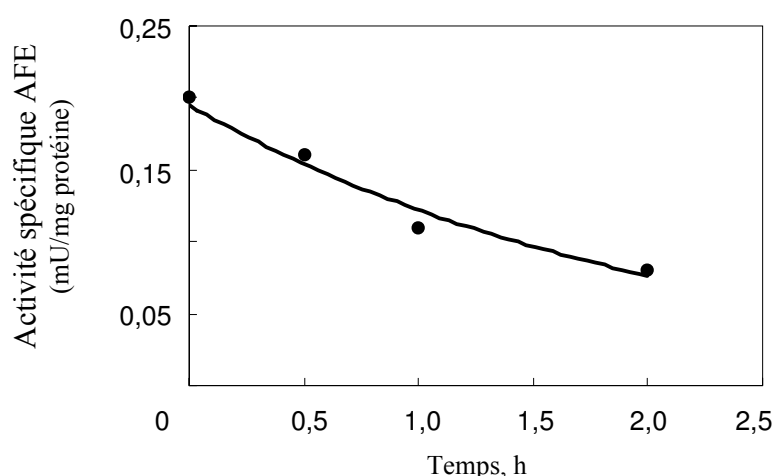


Fig. 34. Evolution de l'activité AFE de *S. ambofaciens* ATCC 23877 lors de l'incubation de l'enzyme à 37 °C pendant 2 h.

Approximativement, 60% de l'activité sont perdus après 2 h d'incubation de l'AFE à 37 °C. Ainsi, une instabilité de cette enzyme est clairement constatée lors de son incubation à cette température, ce qui peut expliquer la diminution de l'activité produite en bioréacteur après 14 h de culture (**Fig. 33**).

II.2. Purification partielle de l'acide férulique estérase produite en bioréacteur

La purification de l'AFE de *S. ambofaciens* ATCC 23877 doit être réalisée rapidement après la production. En effet, la congélation a un effet négatif sur cette enzyme, ce qui rend difficile sa conservation. Une perte d'environ 40% d'activité est observée lors de la congélation de l'enzyme à -20 °C pendant quatre semaines et l'ajout de 10% ou 20% de glycérol ne permet pas une meilleure conservation (**Fig. 35**).

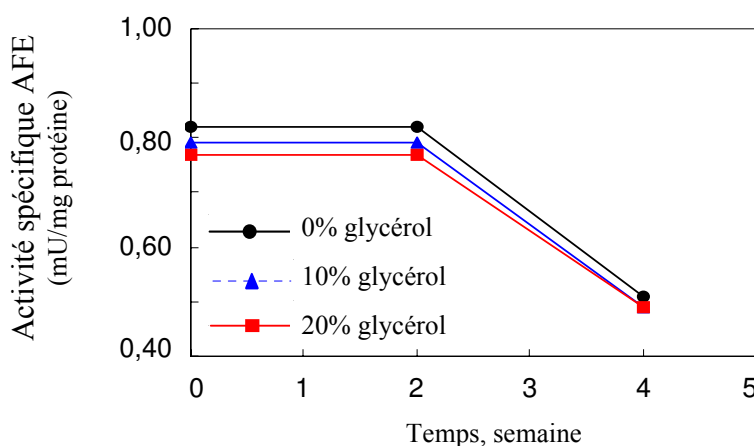


Fig. 35. Evolution de l'activité AFE de *S. ambofaciens* ATCC 23877 à -20 °C pendant 4 semaines sans ajout de glycérol (cercle), avec 10% (triangle) ou 20% (carré) de glycérol.

II.2.1. Purification par des techniques de précipitations

L'AFE de *S. ambofaciens* ATCC 23877, produite en bioréacteur, est partiellement purifiée par précipitation au sulfate d'ammonium (50% de saturation) suivie par une dialyse (12-14 kDa) ou par précipitation à l'acétone (80%) de la solution obtenue après dialyse. Les résultats de ces purifications sont présentés dans le tableau 21.

CH. 3 : Production et purification partielle de l'acide férulique estérase de *S. ambofaciens*

Tableau 21. Purification partielle de l'AFE de *S. ambofaciens* ATCC 23877 produite en bioréacteur par précipitation au sulfate d'ammonium (SA, 50% de saturation), dialyse et précipitation à l'acétone.

Etape	Activité Totale (mU)	Activité spécifique (mU/mg protéines)	Facteur de purification	Rendement %
SA (50%)	26	0,4	1	100
Dialyse	30	0,8	2	115
Acétone (80%)	1	0,05	0,1	4

Après dialyse, le doublement de l'activité spécifique AFE peut être attribuée à la diminution de la concentration en azote protéique. En effet, le milieu de culture de *S. ambofaciens* ATCC 23877 peut contenir une quantité assez importante de peptides qui sont éliminés par dialyse.

Par contre, la précipitation à l'acétone provoque une forte diminution de l'activité spécifique AFE (**Tableau 21**). Ce processus de précipitation semble donc être particulièrement néfaste pour l'AFE de *S. ambofaciens* ATCC 23877.

Pour confirmer l'effet de l'acétone sur l'AFE de *S. ambofaciens* ATCC 23877, une précipitation est réalisée directement sur le surnageant de la culture en bioréacteur sans précipitation préalable au sulfate d'ammonium et sans dialyse. A la fin de ce test, une activité AFE est détectée sur boîte contenant du milieu MRS gélosé avec du férulate d'éthyle, mais elle est tellement faible qu'elle ne peut pas être quantifiée par CLHP. Ainsi, l'acétone semble provoquer une altération importante de l'AFE de *S. ambofaciens* ATCC 23877.

Généralement, la précipitation au sulfate d'ammonium est utilisée en tant que première étape de purification des AFE. Par exemple, au cours de la purification de la FaeA d'*A. niger*, un rendement d'activité enzymatique de 69% a été obtenu lors de la précipitation au sulfate d'ammonium à 80% de saturation (Faulds et Williamson, 1994). Pour cette même concentration en sel, 48% d'activité ont été obtenus lors de la purification de l'AFE de *L. acidophilus*, mais avec un facteur de purification relativement élevé (6,5) (Wang *et al.*, 2004).

Par ailleurs, certaines études ont déjà montré l'efficacité de la précipitation au sulfate d'ammonium par rapport à celle effectuée par solvant organique tel que l'acétone, ce qui est en accord avec le résultat que nous avons obtenu ci-dessus. Par exemple, une kératinase d'*Aspergillus oryzae* a été purifiée par plusieurs étapes de purification dont la précipitation à l'acétone, à l'éthanol ou au sulfate d'ammonium. Le meilleur rendement d'activité a été obtenu par la précipitation au sulfate d'ammonium (Farg et Hassan, 2004).

II.2.2. Fractionnement de l'acide férulique estérase par chromatographie d'échange d'anions et par électrophorèses

La solution enzymatique dialysée obtenue précédemment est fractionnée par chromatographie échangeuse d'anions (pH 8,5). Une recherche de l'activité AFE est effectuée sur boîtes contenant du milieu MRS gélosé avec du férulate d'éthyle pour toutes les fractions obtenues. Une faible activité AFE est détectée dans les fractions 17 et 18 (Fig. 36). Cependant, cette activité est trop faible pour pouvoir être quantifiée.

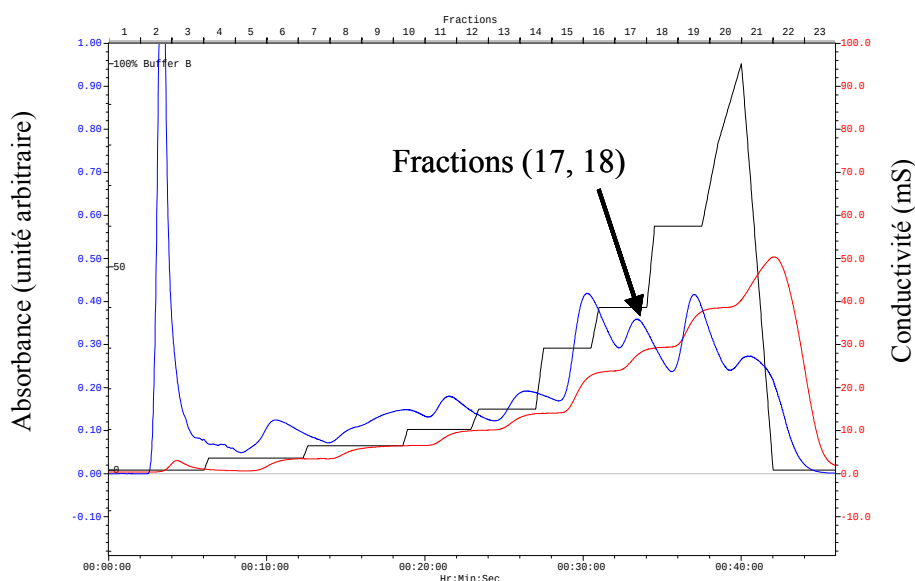


Fig. 36. Chromatogramme obtenu lors du passage de l'AFE de *S. ambofaciens* ATCC 23877 sur colonne échangeuse d'anions. Absorbance des protéines à 280 nm (bleu) ; conductivité mesurée (rouge) et gradient en NaCl utilisé (noir).

Une migration est ensuite réalisée sur gel de polyacrylamide dénaturant SDS-PAGE (**Fig. 37**) pour un échantillon du surnageant de culture avant et après précipitation au sulfate d'ammonium (50% de saturation) ainsi que pour les fractions 17 et 18 rassemblées et concentrées 4 fois par ultrafiltration (à l'aide de membranes avec un seuil de coupure de 10 kDa)

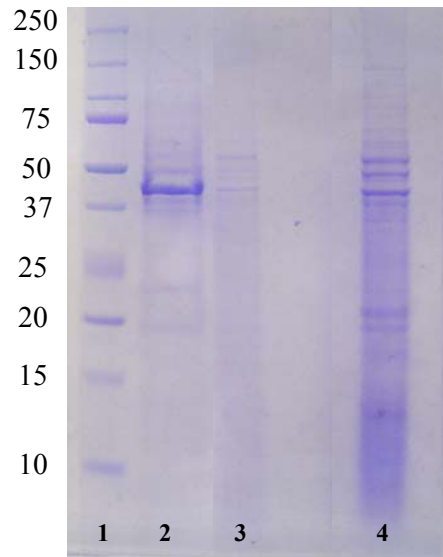


Fig. 37. Gel d'électrophorèse SDS-PAGE présentant l'évolution de la purification partielle de l'AFE de *S. ambofaciens* ATCC 23877 : **piste 1** : marqueur de taille (Dual Color, Bio-Rad), **piste 2** : fractions positives (17, 18) issues de la colonne échangeuse d'anions, **piste 3** : surnageant de culture après précipitation au SA (50%) suivie par dialyse et **piste 4** : surnageant de culture avant précipitation.

Plusieurs bandes sont visibles dans la piste 2 correspondant aux fractions 17 et 18 de la colonne anionique. Parmi ces bandes une est largement majoritaire (**Fig. 37-piste2**). Elle a une taille d'environ 43 kDa. Cette valeur est proche de celles observées pour la plupart des AFE de bactéries et de champignons déjà identifiées (Donaghy *et al.*, 2000 ; Wang *et al.*, 2004 ; Tsuchiyama *et al.*, 2006). Une de ces bandes pourrait donc correspondre à l'AFE de *S. ambofaciens* ATCC 23877.

En parallèle, une migration dans des conditions non dénaturantes, en utilisant des bandes d'acétate de cellulose, est réalisée pour l'échantillon du surnageant précipité et dialysé ainsi que pour l'ensemble des fractions 17 et 18 concentré. A l'issue de cette migration, une recherche d'activité estérasique est effectuée parmi les protéines

présentes dans l'échantillon analysé (**Chapitre 2 ; § VII.3.2**). Les fractions protéiques possédant une activité estérase apparaissent en rouge-violet (**Fig. 38**).

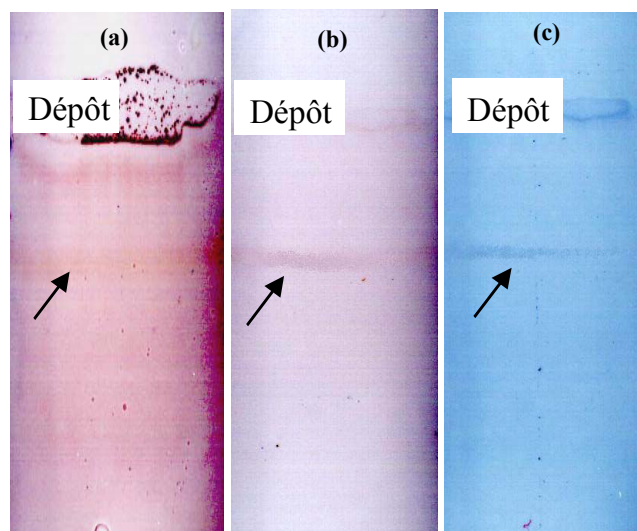


Fig. 38. Electrophorèse sur bandes d'acétate de cellulose (conditions non dénaturantes, 240 V pendant 40 min) réalisée pour l'échantillon obtenu après dialyse (**a**) et l'ensemble concentré des fractions 17 et 18 issues de la colonne d'échange d'anions (**b**). Une détection d'activité estérasiqque est effectuée pour ces deux bandes. La troisième bande d'acétate de cellulose (**c**) est la même que la bande (**b**) après coloration au bleu de Coomassie. Les flèches indiquent les fractions protéiques observées après la migration.

Une seule fraction protéique colorée en rouge-violet est observée sur la bande d'acétate de cellulose correspondante à la solution issue de la dialyse (**Fig. 38a**). Un résultat similaire est obtenu pour l'ensemble des fractions (17,18) issu de la chromatographie d'échange d'anion (**Fig. 38b**). Cela pourrait s'expliquer par la présence d'une seule estérase dans la solution enzymatique dialysée, cette estérase sortant de la colonne d'échange d'anions dans les fractions 17 et 18. Ainsi, la purification partielle de l'AFE de *S. ambofaciens* ATCC 23877, réalisée par précipitation au sulfate d'ammonium (50%) puis une dialyse suivie par chromatographie d'échange d'anion, pourrait éliminer la quasi-totalité des protéines du milieu de culture.

Une coloration au bleu de Coomassie est réalisée pour la bande (**b**) d'acétate de cellulose. A la fin de cette procédure, une seule fraction protéique, située au même endroit que la fraction rouge-violet observée avant coloration, est visible (**Fig. 38c**).

CH. 3 : Production et purification partielle de l'acide férulique estérase de *S. ambofaciens*

Cette fraction protéique pourrait donc correspondre à l'activité estérase remarquée sur la bande (b) avant coloration (**Fig. 38b**). D'autre part, cette fraction protéique (estérasique) observée sur la bande (b) après coloration pourrait correspondre à la bande majoritaire observée sur gel SDS-PAGE pour l'ensemble des fractions 17 et 18 (**Fig. 37-piste2**) donc à l'AFE de *S. ambofaciens* ATCC 23877. Afin de vérifier l'exactitude cette hypothèse, une détermination de la séquence N-terminale de cette bande protéique est effectuée (Service Commun de Séquences des Protéines, Université Henri Poincaré, Nancy). Le résultat est le suivant : **H₂N-A-R-I-Y-S-S-D-T-H-W-R-V-(E-K-W-I)-**. Les quatre acides aminés entre parenthèses sont incertains.

La séquence N-terminale obtenue a été introduite dans les banques de données publiques afin de rechercher une protéine précédemment identifiée. La réponse la plus pertinente a été la protéine dont le numéro d'accension est CAJ87957 (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/). Cette protéine correspond à un composant putatif d'un système de transport de cation. Il est très intéressant de constater que cette protéine a été identifiée chez *S. ambofaciens* ATCC 23877, c'est-à-dire la bactérie avec laquelle ce travail a été réalisé. Chez *S. ambofaciens* ATCC 23877, cette protéine est annotée SAMR0248. La séquence en acides aminés de cette protéine est la suivante :

MSPVLAGVLQ	LLALIAALAL	AYVPLGNMYA	RAYSSDTHWR
VEKWIYKGIG	ADPDTEMRWP	AYLRGVLAFS	LAGVLFLYLL
QRLQGVLPQS	LGFASIDPDQ	AFNTAASFVA	NTNWQSYIGE
QAMGHVVQTA	GLAVQNFVSA	AVGIAVAVAL	VRGFARSRTG
ELGNFWADLV	RGVVRVLVPI	AVVGALILVA	CGVIQNFSGI
HEVGQFMGGT	QQWNGGAVAS	QEVIKELGTN	GGGYFNANSA
HPFENPTPFT	NLFEIFLILV	IPVALTRTFG	VMVGSVRQGH
AILATMGTIW	VGFVALMMWT	EFAHHGPALQ	AAGGAMEGKE
LRFGIGGSSI	FAVSTTLTST	GAVDSFHSSY	TGLGGGITML
GMMLGEIAPG	GVGSGLYGML	VMAVIAVFIA	GLMVGRTPPY
LGKKIGTREI	KFAALYILIT	PALVLVLTA	AMALPTPGNS
MTNSGAHGFS	EILYAYTSAS	NNNGSAFAGL	NADTQWFNST
LGLAMLLGRF	LPMVFVLALA	GSLAEQKPVP	ATAGTLRTEK
PLFTGLLAGA	ILIITGLTYF	PALALGPLAE	GLAA

Les acides aminés correspondant à la séquence identifiée apparaissent surlignés. Il est à noter qu'excepté le remplacement d'une isoleucine par une alanine, l'alignement est quasi-parfait sur une longueur de 16 acides aminés (93% d'identité). Il est donc très peu probable, que la séquence que nous avons identifiée puisse correspondre à une autre protéine chez la bactérie avec laquelle ce travail a été effectué. Cette protéine comporte 554 acides aminés et son poids moléculaire théorique est de 57,8 kDa (www.expasy.org/tools/pi_tool.html). Ce poids est donc un peu plus important que celui qui a été observé sur le gel SDS page et qui a été estimé à environ 43 kDa. Chez les hydrolases à sérine auxquelles appartiennent les AFE, il existe généralement une séquence consensus qui se trouve à proximité du site actif. Celle-ci, composée de 5 acides aminés est la suivante G-x-S-x-G où x peut être n'importe quel acide aminé. Cette séquence consensus a été recherchée dans la protéine mise en évidence mais sans succès. Seules des séquences de type G-x-S-x-x (aux positions 327-331, 437-441 et 448-452) et x-x-S-x-G (aux positions 88-92 et 337-341) sont présentes.

Le génome de *S. ambofaciens* ATCC 23877 étant partiellement séquencé (www.weblgm.scbiol.uhp-nancy.fr/ambofaciens/index.html), le gène codant SAMR0248 a pu être identifié et localisé. Ce gène, de 1665 nucléotides, est situé sur le bras droit du chromosome. Sa séquence est indiquée en annexe. Ce gène est similaire au gène *kdpA* précédemment caractérisé chez *E. coli*. *kdpA* code la sous-unité A d'un système de transport de potassium, de type ABC. Cette sous-unité participe à la partie transmembranaire du système permettant le passage des ions potassium à travers la membrane cytoplasmique (Gassel *et al.*, 1998). Dans le génome de *S. ambofaciens* ATCC 23877, les gènes à proximité immédiate du gène codant SAMR0248 ont été identifiés comme un gène codant une sous-unité B d'un système de type ABC (SAMR0247) et un gène codant une sous-unité C d'un système de type ABC (SAMR0246) (**Fig. 39**).

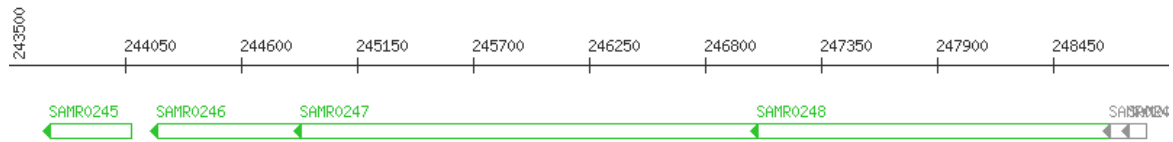


Fig. 39. Position du gène codant SAMR0248 dans le génome de *S. ambofaciens* ATCC 23877. L'échelle au-dessus du schéma indiquant les différents gènes donne la position relative de ces gènes dans le génome de *S. ambofaciens* ATCC 23877.

Les résultats obtenus à l'issue du séquençage de la partie N-terminale de la protéine majoritaire suite aux différentes étapes de purification menées à partir d'un surnageant de culture de *S. ambofaciens* ATCC 23877 sont assez surprenants. En effet, en se basant uniquement sur l'analyse de la séquence protéique mise en évidence, il ne semble pas que celle-ci corresponde à une estérase puisqu'elle ne possède pas la séquence consensus caractéristique des hydrolases à sérine et a de plus un poids moléculaire théorique supérieur à celui attendu. Cependant, il serait également étonnant que cette protéine corresponde à une sous-unité A d'un système ABC. En effet, si tel était le cas, cette protéine devrait être strictement membranaire or, il ne faut pas oublier qu'elle a été purifiée à partir d'un surnageant (centrifugé et filtré, donc acellulaire) de culture. Afin de trancher quant à la nature de la protéine dont la séquence N-terminale a été séquencée, il faudrait envisager une délétion du gène codant SAMR0248. La présence ou l'absence d'activité AFE chez le mutant ainsi obtenu permettra de répondre à cette interrogation.

CHAPITRE 4

*Purification partielle de l'acide férulique estérase
de Humicola sp.*

SOMMAIRE

<u>I. Détection de l'activité acide férulique estérase dans le DepolTM 740L.....</u>	121
--	------------

<u>II. Purification partielle de l'acide férulique estérase présente dans le DepolTM 740L.....</u>	122
--	------------

II.1. Purification partielle par précipitation au sulfate d'ammonium.....	122
--	------------

II.1.1. Précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium.....	122
--	-----

II.1.2. Chromatographie d'échange d'ions.....	124
---	-----

II.2. Purification partielle par précipitation à l'acétone.....	127
--	------------

II.2.1. Analyse sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE.....	129
--	-----

Le champignon *Humicola* sp. est exploité industriellement pour sa capacité à produire une gamme d'enzymes hydrolytiques destinées à la dégradation de la paroi cellulaire végétale. Différentes préparations de ces enzymes sont actuellement commercialisées. Par exemple, le DepolTM 740L est un de ces mélanges industriels commercialisé pour son activité AFE.

Dans cette partie du travail sont présentés les résultats concernant la purification partielle de l'AFE de *Humicola* sp.

I. Détection de l'activité acide férulique estérase dans le DepolTM 740L

Le dépôt de 5 µl de DepolTM 740L sur du milieu MRS gélosé avec du férulate d'éthyle provoque la formation d'une zone d'éclaircissement, ce qui confirme la présence d'une activité AFE dans ce mélange enzymatique. Cette zone d'éclaircissement est observée après seulement 30 min d'incubation de la boîte à 37 °C, alors que celle correspondante à l'AFE de *S. ambofaciens* ATCC 23877 ne peut être détectée qu'après 24 à 48 h d'incubation à la même température (**Chapitre 3 ; § I.1.1**). Ceci indique que l'activité AFE de *Humicola* sp. est beaucoup plus élevée que celle produite par *S. ambofaciens* ATCC 23877.

Afin de confirmer quantitativement ce résultat, un dosage d'activité enzymatique est réalisé pour un échantillon de DepolTM 740L. L'échantillon est dilué avec de la solution de substrat, le férulate d'éthyle, à 1,33 mM. La réaction s'effectue à 40 °C pendant 2 min. Ensuite, l'activité AFE est mesurée par dosage CLHP de l'acide férulique apparu dans le milieu réactionnel.

Une activité spécifique AFE de 0,5 U/mg de protéines (**Tableau 22**) est mesurée dans le DepolTM 740L, soit 625 fois plus que la plus forte activité obtenue avec *S. ambofaciens* ATCC 23877 (0,8 mU/mg de protéines, **Chapitre 3 ; Tableau 21**). En général, les champignons présentent une plus forte activité AFE que les bactéries. A titre d'exemple, une activité AFE de l'ordre de 132 U/mg de protéines a été obtenue avec une souche d'*A. niger* (Johnson *et al.*, 1989). Cependant, une activité AFE de 6,9

U/mg de protéines a été mesurée chez *S. olivochromogenes* (Johnson *et al.*, 1988), indiquant que certaines souches bactériennes peuvent également produire des activités AFE importantes.

Tableau 22. Valeur d'activité AFE de *Humicola* sp. présente dans 1 ml de DepolTM 740L. L'intervalle de confiance à 95% sur ces valeurs est de l'ordre de 4% de l'activité mesurée.

Etape	Protéines totales (mg)	Activité totale AFE (U)	Activité spécifique AFE (U/mg protéines)
Depol TM 740L	61,5	30,9	0,5
Dialyse	25	29	1,2

Si on procède à une dialyse préalable (12-14 kDa), l'activité spécifique AFE augmente fortement (1,2 U/mg de protéines ; Tableau 23), mais l'activité totale AFE reste cependant inchangée. Ceci est certainement dû à la présence de peptides qui provoque une surestimation de la concentration en protéines. Ainsi, près de 60% de composés aminés sont éliminées lors de la dialyse.

II. Purification partielle de l'acide férulique estérase présente dans le DepolTM 740L

L'AFE de *Humicola* sp., présente dans le DepolTM 740L, est partiellement purifiée en utilisant des étapes successives de précipitation au sulfate d'ammonium ou à l'acétone et de chromatographie d'échange d'ions.

II.1. Purification partielle par précipitation au sulfate d'ammonium

II.1.1. Précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium

1 ml de DepolTM 740L est fractionné par précipitation successive au sulfate d'ammonium (0-20% ; 20-40% ; 40-60% ; 60-80% ; 80-100% de saturation) à 20 °C pendant 1 h. Ensuite, une détection de l'activité AFE dans toutes les fractions obtenues est effectuée sur du milieu MRS gélosé contenant du férulate d'éthyle (**Fig. 40**).

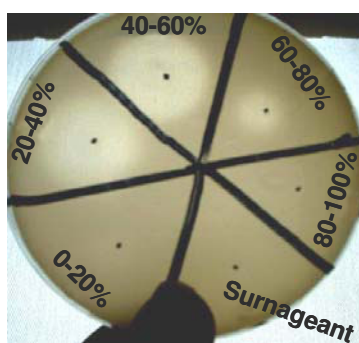


Fig. 40. Détection de l'activité AFE de *Humicola* sp. dans les fractions obtenues après précipitation successive au sulfate d'ammonium ainsi que dans le surnageant final issu de cette précipitation.

Après incubation de la boîte à 37 °C pendant 2 h, trois zones d'éclairement sont observées. Elles correspondent aux fractions obtenues après précipitation par le sulfate d'ammonium aux concentrations de 20-40% ; 40-60% et 60-80%. L'activité la plus importante est localisée dans les deux premières de ces trois fractions (**Fig. 40**). Par contre, aucune activité AFE n'est détectée dans les autres fractions ainsi que dans le surnageant final. Une confirmation quantitative de ce résultat est d'ailleurs effectuée par dosage d'activités enzymatiques dans toutes les fractions récupérées (**Tableau 23**).

Tableau 23. Activités AFE du Depol™ 740L (1 ml) après dialyse et après précipitation successive au sulfate d'ammonium (SA).

Saturation en SA	Protéines totales (mg)	Activité totale AFE (U)	Activité spécifique AFE (U/mg protéines)
0-20%	0,5	0	0
20-40%	12,2	15,3	1,2
40-60%	11,9	7,6	0,6
60-80%	2,8	Nq	Nq
80-100%	0,7	0	0

Nq : non quantifiable.

La plus haute activité AFE est mesurée dans la fraction correspondant à une saturation en sel de 20-40% (**Tableau 23**). L'activité de la fraction obtenue ensuite avec 40-60% de saturation en sel est deux fois moins élevée. De plus, ces deux fractions contiennent presque la même quantité en protéines. Ainsi, la meilleure saturation en sel,

permettant une précipitation quasi-totale de l'AFE, est certainement aux alentours de 40%. Afin de déterminer cette quantité de sel, une précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium, mais non successive, est réalisée (**Tableau 24**).

Tableau 24. Activités AFE du DepolTM 740L après précipitation non successive au sulfate d'ammonium (SA). Toutes les valeurs sont calculées pour 1 ml de DepolTM 740L dialysé dont l'activité totale AFE et la quantité des protéines sont 29 U et 25 mg, respectivement.

Saturation en SA	Protéines totales	Activité totale AFE	Activité spécifique
	(mg)	(U)	AFE (U/mg protéines)
0-20%	0,6	0	0
0-40%	6,2	4,6	0,7
0-50%	11,4	8,7	0,8
0-60%	16,3	7,9	0,5
0-80%	16,9	7,1	0,5
0-100%	17,2	7,1	0,4

D'après les résultats présentés dans le tableau 24, la meilleure activité AFE (8,7 U) est obtenue lors de la précipitation au sulfate d'ammonium à 50% de saturation. De plus, cette saturation en sel (50%) permet d'éliminer environ 54% des protéines totales présentes dans le DepolTM 740L dialysé. Cependant, 70% environ de l'activité totale AFE sont perdus lors de cette précipitation. Cela pourrait s'expliquer par un problème de stabilité de l'enzyme lors de la procédure de précipitation.

II.1.2. Chromatographie d'échange d'ions

A la suite de ces résultats, l'AFE de *Humicola* sp. est précipitée au sulfate d'ammonium (50% de saturation) à 20 °C, puis le précipité obtenu est dialysé (12-14 kDa) contre l'eau distillée et lyophilisé. Le lyophilisat est ensuite fractionné par chromatographie d'échange d'anions (CEA) puis de cations (CEC). Le tableau 25 résume les différentes étapes de cette purification.

Tableau 25. Activités de l'AFE de *Humicola* sp. après précipitation au sulfate d'ammonium (SA, 50% de saturation) et chromatographie d'échange d'anions (CEA) et de cations (CEC).

Etape	Activité totale AFE (U)	Protéines totales (mg)	Activité spécifique AFE (U/mg)	Facteur de purification	Rendement (%)
Depol TM 740L non dialysé	30,9	61,5	0,5	1	100
SA (50)%	16,2	15,5	1	2	52
CEA	4,5	3,4	1,3	2,6	14
CEC	1,5	0,9	1,7	3,4	5

L'activité spécifique AFE récupérée après précipitation au sulfate d'ammonium est deux fois plus élevée que celle présente au départ dans le DepolTM 740L non dialysé. Cette étape simple de purification permet non seulement d'éliminer une quantité importante des protéines non enzymatiques, certaines molécules présentes dans le DepolTM 740L telles que le glycérol et des composés phénoliques sont également éliminées.

D'autre part, l'AFE n'est pas retenue dans la colonne échangeuse d'anions lors de l'étape de CEA menée à un pH de 8,5. La protéine enzymatique est éluée avec le volume mort dans les fractions 2, 3 et 4 (**Fig. 41a**). D'autres essais sont également réalisés à un pH plus élevé (9,5), mais avec un résultat identique. Ceci diffère du résultat obtenu lors de passage de l'AFE de *S. ambofaciens* ATCC 23877 par la même colonne anionique (pH 8,5).

Dans la littérature, la plupart des AFE ne sont pas retenues sur les colonnes échangeuses d'anions, comme par exemple en utilisant les colonnes Macro-Prep High Q à pH 8 (Shin et Chen, 2006) ou Q Sepharose à pH 7 (Rumbold *et al.*, 2003). Néanmoins, cette étape conduit à une augmentation de l'activité spécifique AFE, car elle permet d'éliminer des protéines contaminantes.

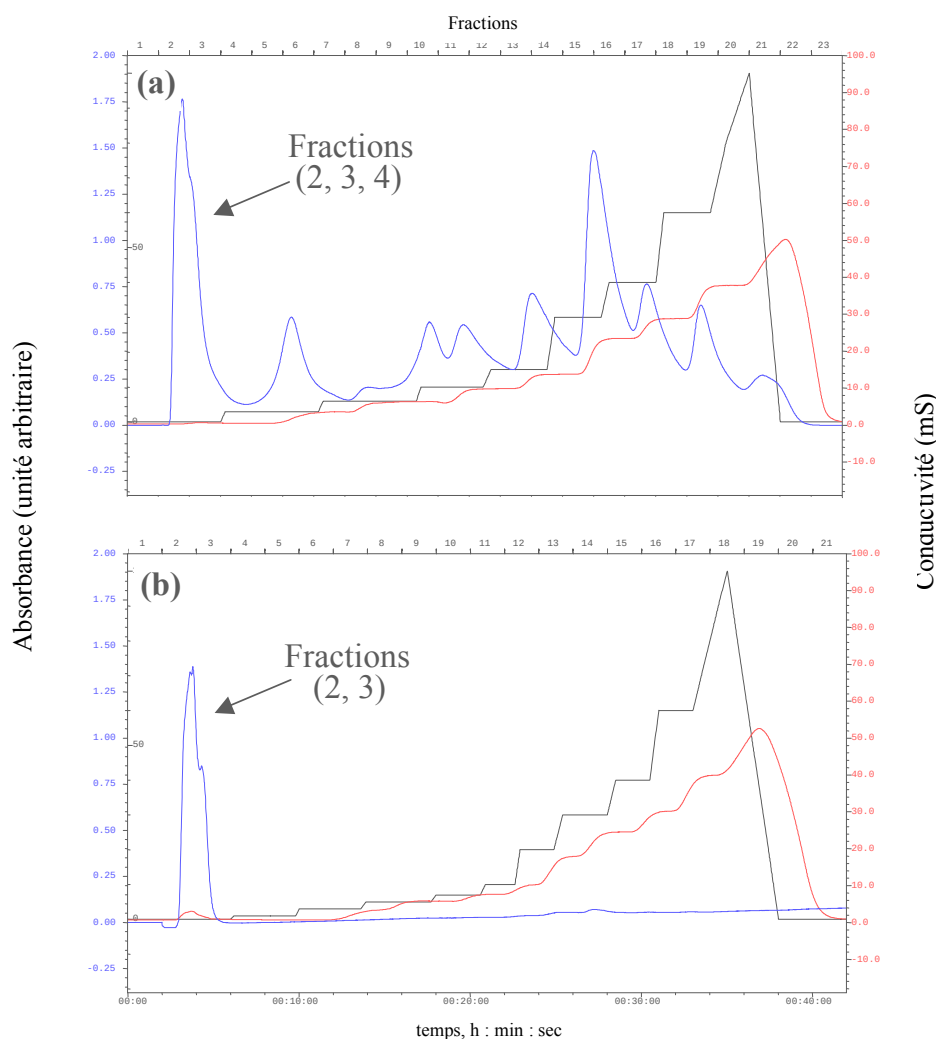


Fig. 41. Chromatogrammes obtenus au cours du passage de l'AFE de *Humicola* sp. sur colonne échangeuse d'anions (a) et de cations (b). Absorbance des protéines à 280 nm (bleu) ; conductivité mesurée (rouge) et gradient en NaCl utilisé (noir).

Lors de la CEC, l'AFE n'est détectée que dans les fractions 2 et 3 (**Fig. 41b**). L'enzyme n'est donc pas retenue non plus dans la colonne cationique à pH 5 ; elle est éluée avec le volume mort. Après la CEC, l'activité totale AFE est trois fois plus faible que celle obtenue après passage sur la colonne anionique (**Tableau 25**). Etant donné qu'une étape de lyophilisation a été réalisée préalablement à la séparation par CEC, il est possible que la congélation soit la cause de la diminution de l'activité AFE. En effet, la lyophilisation affecte négativement l'activité AFE (§ II.2 ; **Tableau 26**). Les essais sur CEC menés avec un tampon différent (pH inférieur à 5) ne sont pas concluants en raison d'une forte perte d'activité de l'AFE à cette valeur de pH, rendant hasardeuse sa détection après le passage sur la colonne.

Parmi les études menées sur la purification d'AFE, Shin et Chen (2006) ont rapporté une rétention de l'AFE de *Fusarium proliferatum* sur la colonne cationique Macro-Prep High S à pH 5. L'enzyme a été éluée entre 0 et 10 mM de NaCl. La rétention des AFE sur les colonnes échangeuses d'ions peut donc dépendre de plusieurs facteurs tels que la structure de l'enzyme et le type de colonne utilisée.

D'après ces résultats, nous constatons que le protocole de purification utilisé entraîne une trop forte perte d'activité de l'AFE, c'est pourquoi nous avons envisagé de modifier le procédé en faisant appel à une précipitation totale des protéines par l'acétone plutôt que par le sulfate d'ammonium.

II.2. Purification partielle par précipitation à l'acétone

Après dialyse d'un échantillon de DepolTM 740L, une précipitation par l'acétone (80%) est réalisée à -20 °C suivie par un passage successif sur CEA et CEC. Les différentes valeurs d'activité AFE mesurées après chacune de ces étapes de purification sont présentées dans le tableau 26.

Comme précédemment, l'activité spécifique AFE augmente après l'étape de dialyse (1,2 U/mg de protéines) en raison de l'élimination de près de 60% des composés aminés.

Tableau 26. Activités de l'AFE de *Humicola* sp. après précipitation à l'acétone (80%) et chromatographie d'échange d'anions (CEA) et de cations (CEC).

Etape	Activité totale AFE (U)	Protéines totales (mg)	Activité spécifique AFE (U/mg)	Facteur de purification	Rendement (%)
Depol TM 740L	30,9	61,5	0,5	1	100
Dialyse	29,4	24,9	1,2	2,4	95
Acétone	28,8	21,5	1,3	2,6	93
CEA	7,8	2,3	3,4	6,8	25
Lyophilisation	4,7	2,0	2,4	4,8	15
CEC	4,1	1,3	3,2	6,4	13

La précipitation à l'acétone ne conduit pas à une augmentation significative de l'activité spécifique AFE (1,3 U/mg de protéines), mais elle contribue à concentrer l'enzyme. Cette dernière est obtenue sous forme de poudre ce qui facilite sa conservation et son utilisation ultérieure. De plus, contrairement à la précipitation au sulfate d'ammonium, il n'y a qu'une très faible baisse de l'activité totale.

Lors de l'étape de passage sur la CEA, l'AFE sort de nouveau avec le volume mort dans les fractions 2, 3 et 4. (**Fig. 41a**). Cependant, l'activité spécifique AFE est presque 2,6 fois plus importante que celle mesurée après précipitation à l'acétone (**Tableau 26**). Par contre, environ 40% de l'activité totale sont perdus durant l'étape de lyophilisation. Ceci montre clairement l'effet négatif de cette étape sur l'enzyme.

En ce qui concerne le passage sur la CEC, l'AFE est concentrée comme précédemment dans les deux premières fractions 2 et 3 donc sans être retenue par la colonne (**Fig. 41b**). Cette dernière étape de purification permet d'éliminer environ 35% des protéines, ce qui peut expliquer l'augmentation de l'activité spécifique AFE de 2,4 à 3,2 U/mg de protéines.

Si on compare les valeurs d'activité AFE de *Humicola* sp. après précipitation au sulfate d'ammonium et à l'acétone, on constate que le sulfate d'ammonium (à 50% de saturation) conduit à une activité spécifique AFE deux fois plus élevée que celle présente au départ dans le DepolTM 740L, mais à une perte d'activité de l'ordre de 50% (**Tableau 25**). Avec l'acétone, le facteur de purification est de l'ordre de 2,6. De plus, la quasi-totalité de l'activité AFE est conservée lors de cette précipitation (rendement 93%, **Tableau 26**). Ainsi, la précipitation à l'acétone, comme première étape de purification de l'AFE de *Humicola* sp., est plus efficace que celle menée avec le sulfate d'ammonium, comme cela a déjà été rapporté par certains auteurs pour d'autres enzymes (Zotos et Taylor, 1996 ; Popova et Pishtiyski, 2001).

Par contre, nous avons précédemment constaté que la précipitation à l'acétone était néfaste pour l'AFE de *S. ambofaciens* ATCC 23877 car elle provoquait une forte diminution d'activité spécifique (**Chapitre 3 ; § II.2.1**). Ceci peut suggérer que l'AFE de *S. ambofaciens* ATCC 23877 et celle de *Humicola* sp. sont de structures différentes. Le choix entre les techniques de précipitation par le sulfate d'ammonium ou par un

solvant organique peut dépendre de l'enzyme à purifier. Cependant, une combinaison de ces deux techniques est parfois intéressante. Ainsi, une précipitation au sulfate d'ammonium (30%) suivie d'une autre précipitation à l'éthanol froid (67%) ont donné de bons résultats pour la purification d'une glutamyle aminopeptidase (Maehashi *et al.*, 2003).

II.2.1. Analyse sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE

Un échantillon de DepolTM 740L ainsi que toutes les fractions positives issues de la précipitation à l'acétone, de la dialyse et des colonnes échangeuses d'ions (CEA et CEC) sont analysées sur gel SDS-PAGE (**Fig. 42**). Après la dernière étape de purification, la CEC, deux bandes importantes sont observées sur le gel d'électrophorèse. La première bande a une taille proche de 20 kDa et la deuxième est près de 30 kDa. Ces valeurs sont très similaires à celles rapportées dans la littérature pour la majorité des AFE déjà identifiées chez des champignons (**Chapitre 1 ; Tableau I**). Une de ces deux bandes pourrait donc correspondre à l'AFE de *Humicola* sp. L'identification de la séquence N-terminale de ces deux bandes serait à réaliser pour confirmer ce résultat.

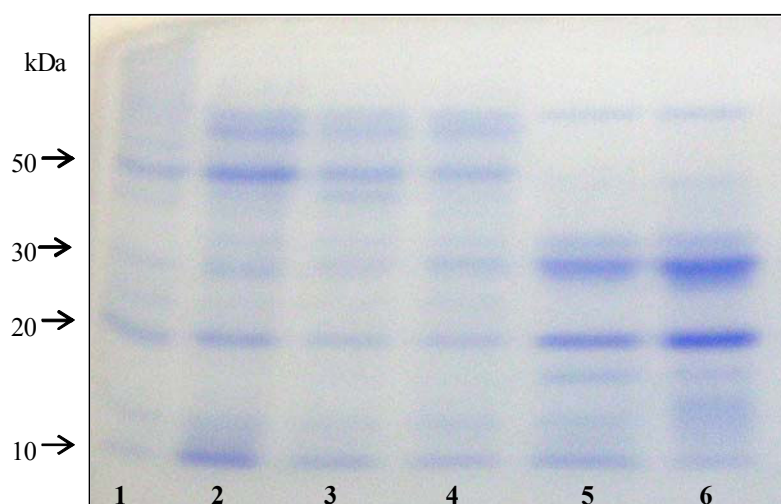


Fig. 42. Gel SDS-PAGE de l'AFE de *Humicola* sp. au cours de différentes étapes de sa purification. **1** un marqueur de taille (PageRulerTM, SM0661-Fermentas) ; **2** DepolTM 740L ; **3** après dialyse ; **4** après précipitation à l'acétone ; **5** après CEA et **6** après CEC.

En conclusion, l'AFE de *Humicola* sp., présente dans le DepolTM 740L, peut être partiellement purifiée aussi bien par précipitation au sulfate d'ammonium que par précipitation à l'acétone. Cependant, un meilleur rendement et facteur de purification sont obtenus lors de ce dernier protocole.

CHAPITRE 5

*Caractérisation partielle des acide férulique
estérases*

SOMMAIRE

1. Influence de l'acide férulique sur l'activité acide férulique estérase de <i>S. ambofaciens</i> ATCC 23877.....	131
2. Effet du pH et de la température.....	132
3. Spécificité de substrat des acide férulique estérases.....	134
3.1. Spécificité vis-à-vis des esters phénoliques.....	134
3.2. Influence de la longueur de la chaîne latérale alcoolique de l'ester cinnamique sur les activités acide férulique estérases.....	137

L'objectif des travaux présentés dans ce chapitre est de caractériser et de comparer l'AFE de *Humicola* sp. et celle produite par *S. ambofaciens* ATCC 23877. Ainsi, l'effet du pH et de la température sur les deux activités AFE, la spécificité de substrat et d'autres paramètres sont étudiés. En raison de la très faible activité de l'AFE de *S. ambofaciens* ATCC 23877 récupérée après la colonne d'échange d'anions (**Chapitre 3 ; § II.2.2**), la plupart des expériences présentées dans ce chapitre ont été réalisées en utilisant l'enzyme obtenue après précipitation au sulfate d'ammonium (50%) et dialyse.

1. Influence de l'acide férulique sur l'activité acide férulique estérase de *S. ambofaciens* ATCC 23877

Lors du dosage de l'activité AFE en utilisant le férulate d'éthyle comme substrat, l'acide férulique est le produit final de la réaction. Afin de tester l'effet de cet acide phénolique comme inhibiteur de l'activité AFE produite par *S. ambofaciens* ATCC 23877, des concentrations croissantes d'acide férulique sont ajoutées dans le milieu de dosage de l'activité enzymatique (**Fig. 43**).

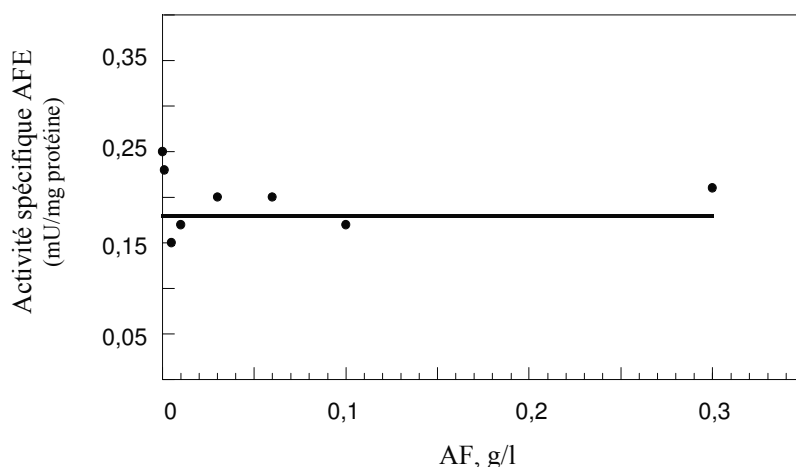


Fig. 43. Effet de l'acide férulique (AF) sur l'activité AFE produite par *S. ambofaciens* ATCC 23877.

Des activités AFE similaires sont obtenues pour toutes les concentrations utilisées en acide férulique (**Fig. 43**). Ce dernier ne semble donc pas être un inhibiteur de l'activité AFE de *S. ambofaciens* ATCC 23877. Un résultat différent a déjà été publié par Garcia *et al.* en 1998b qui ont constaté une inhibition de 90% de l'activité AFE

produite par *S. avermitilis* en présence de 0,05 g/l d'acide férulique. De plus, l'ajout de 0,1 g/l d'acide férulique a entraîné une inhibition complète de l'activité AFE. Ainsi, le rôle de l'acide férulique comme inhibiteur de l'activité AFE pourrait dépendre de l'origine de l'enzyme.

2. Effet du pH et de la température

La détermination de l'influence du pH et de la température sur les activités AFE de *S. ambofaciens* ATCC 23877 et de *Humicola* sp. est réalisée avec le férulate d'éthyle comme substrat. D'après les résultats présentés dans la figure 44a, une meilleure activité hydrolytique AFE de *S. ambofaciens* ATCC 23877 est observée autour de pH 7 (0,18 et 0,20 mU/mg de protéines pour pH 6,5 et 7, respectivement). Par contre, la température optimale est proche de 40 °C puisque à cette température la plus haute activité spécifique est mesurée (0,13 mU/mg de protéines, **Fig. 44b**).

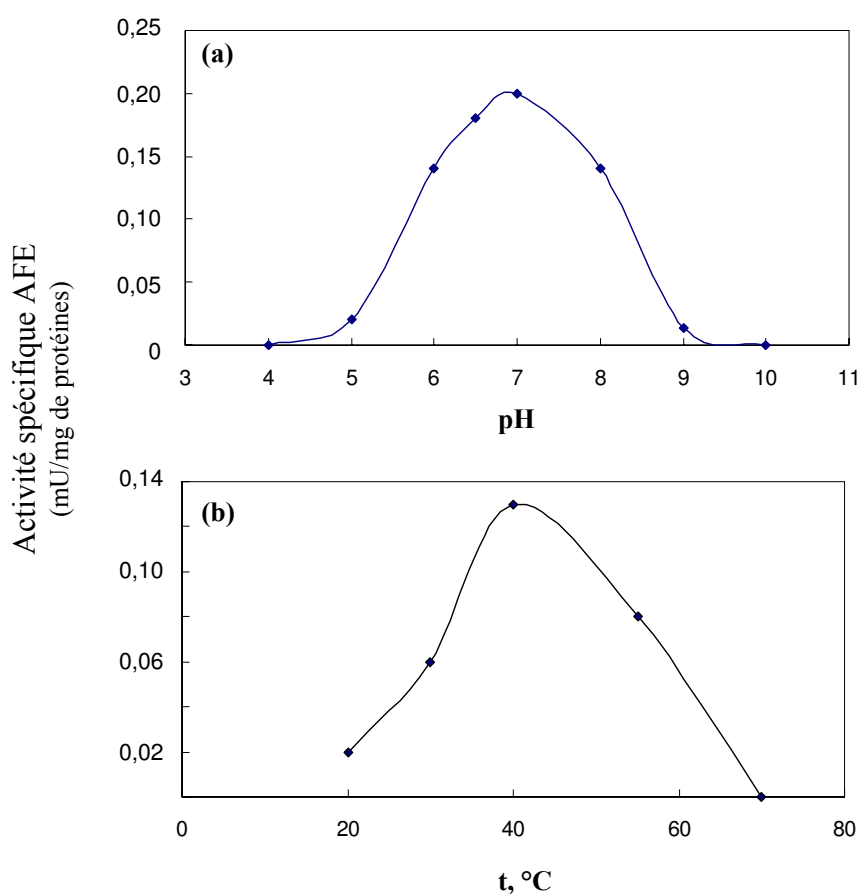


Fig. 44. Effet du pH à 40 °C (a) et de la température à pH 6,5 (b) sur l'activité AFE de *S. ambofaciens* ATCC 23877.

Ces données sont en accord avec certaines recherches déjà rapportées dans la littérature. Par exemple, les bactéries *S. avermitilis* (Garcia *et al.*, 1998b) et *Lactobacillus fermentum* (Donaghy *et al.*, 1998) possèdent des AFE présentant des pH optimaux de 6 et 6,5, et des valeurs optimales de température de 50 °C et 30 °C, respectivement. L'AFE de *L. acidophilus*, pour sa part, présente une température optimale de 37 °C (Wang *et al.*, 2004), très proche de celle mesurée pour l'AFE de la bactérie étudiée ici. Il existe cependant d'autres AFE bactériennes qui nécessitent des valeurs de température et de pH plus élevées pour atteindre leurs activités maximales, ainsi une AFE de *Clostridium stercoarium* est active à 65 °C et à un pH de 8 (Donaghy *et al.*, 2000).

La figure 45a représente l'effet du pH sur l'AFE de *Humicola* sp. La plus haute activité hydrolytique est observée autour de pH 7 (0,52 et 0,53 U/mg de protéines pour pH 6,5 et 7, respectivement). D'autre part, l'étude de l'influence de température sur cette AFE montre que l'activité enzymatique la plus élevée (1,09 U/mg de protéines) est mesurée à 50 °C (**Fig. 45b**).

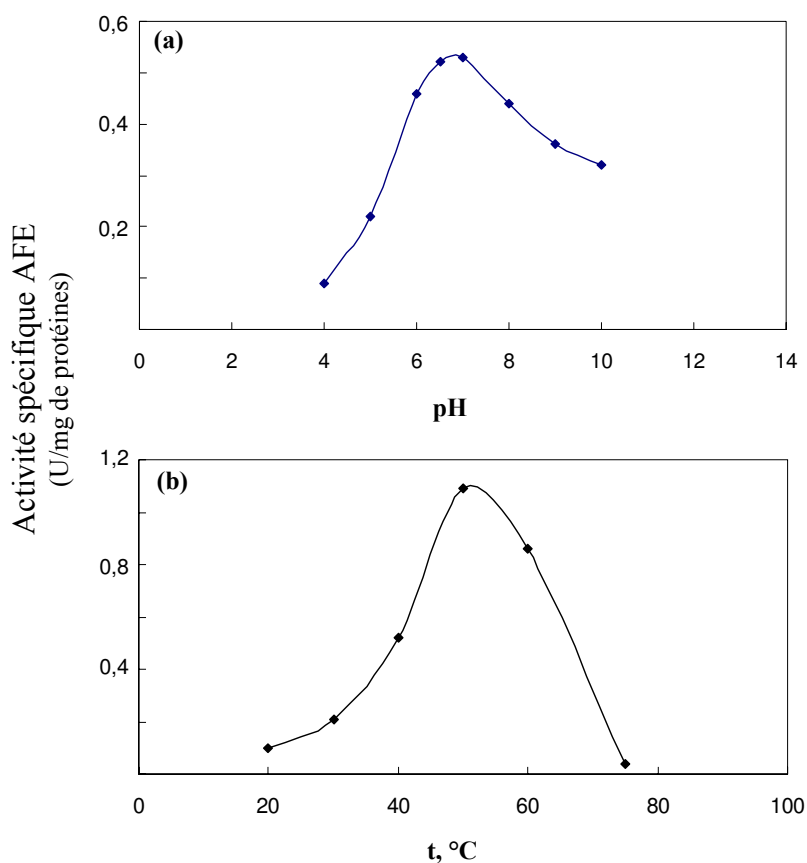


Fig. 45. Effet du pH à 40 °C (a) et de la température à pH 6,5 (b) sur l'activité AFE de *Humicola* sp.

Dans la littérature, la majorité des AFE de champignons sont actives dans un domaine de pH optimum allant de 6 à 7,5 (Castanares *et al.*, 1992 ; Kroon *et al.*, 1996 ; Shin et Chen, 2006) et à des températures optimales voisines de 50 °C (Kroon *et al.*, 1996 ; De Vries *et al.*, 1997 ; Topakas *et al.*, 2003a ; Topakas *et al.*, 2005b ; Shin et Chen, 2006 ; Tsuchiyama *et al.*, 2006). Ceci est en accord avec les valeurs obtenues ci-dessus pour l'AFE de *Humicola* sp. Il existe cependant des AFE de champignons qui possèdent des températures optimales voisines de 40 °C (Donaghy et McKay, 1997 ; Topakas *et al.*, 2003b).

Ainsi, comme la majorité des AFE, les deux enzymes étudiées dans ce travail sont actives autour de pH 7. De plus, l'AFE de *Humicola* sp. possède une meilleure activité à 50 °C, alors que pour celle de *S. ambofaciens* ATCC 23877, 40% environ de l'activité sont perdus à 55 °C.

3. Spécificité de substrat des acide férulique estérases de *S. ambofaciens* ATCC 23877 et de *Humicola* sp.

3.1. Spécificité vis-à-vis des esters phénoliques

La capacité de l'AFE de *S. ambofaciens* ATCC 23877 et de celle de *Humicola* sp. à hydrolyser les esters méthyliques de certains acides phénoliques est examinée. Le cinnamate de méthyle et quatre de ses dérivés hydroxylés ainsi que deux dérivés du benzoate de méthyle sont utilisés comme substrat. Les deux enzymes sont incubées séparément avec chacun des esters testés, préparés à une concentration de 1,33 mM dans du tampon phosphate de sodium (70 mM - pH 6,5).

Le tableau 27 résume les différentes valeurs d'activité AFE obtenues et montre qu'en ce qui concerne les dérivés du *p*-hydroxycinnamate, l'AFE de *S. ambofaciens* ATCC 23877 est active uniquement sur les esters méthyliques du *p*-coumarate et du férulate, avec une activité spécifique élevée pour le premier (0,30 mU/mg de protéines). Par contre, l'activité enzymatique diminue avec le cinnamate de méthyle (0,16 mU/mg de protéines). Ainsi, les différentes substitutions sur le cycle aromatique peuvent avoir un effet plus ou moins important sur l'activité AFE de *S. ambofaciens* ATCC 23877. Par exemple, la présence d'un deuxième OH en C-3 du cycle aromatique du *p*-coumarate de méthyle annule complètement l'activité (cas du caféate). La présence d'un

groupement méthoxyle sur ce carbone provoque une légère diminution de l'activité enzymatique (cas du férulate), alors que deux groupements méthoxyles sur le cycle inhibe totalement l'activité AFE de *S. ambofaciens* ATCC 23877 (cas du sinapate).

Tableau 27. Spécificité de substrat des AFE de *S. ambofaciens* ATCC 23877 et de *Humicola* sp. pour des esters méthyliques de cinnamate et de benzoate. L'intervalle de confiance à 95% sur ces valeurs est de l'ordre de 4% de l'activité mesurée pour l'AFE *Humicola* sp.

Substrat	Activité spécifique AFE	
	<i>S. ambofaciens</i> (mU/mg protéines)	<i>Humicola</i> sp. (U/mg protéines)
Cinnamate de méthyle	0,16	2,80
<i>p</i> -Coumarate de méthyle	0,30	1,86
Férulate de méthyle	0,20	1,00
Caféate de méthyle	0	1,90
Sinapate de méthyle	0	0,19
Vanillate de méthyle	0	0,10
Syringate de méthyle	0	0,12

Certaines études ont déjà rapporté des résultats similaires. Par exemple, de meilleures activités AFE ont été mesurées avec l'ester méthylique du *p*-coumarate, alors que l'activité sur l'ester méthylique de sinapate était très faible (FAE-I de *Fusarium oxysporum*, Topakas *et al.*, 2003c), ou nulle (AFE de *Penicillium funiculosum*, Kroon *et al.*, 2000). Au contraire, la deuxième AFE de *F. oxysporum*, FAE-II, a montré un meilleur niveau d'activité sur le sinapate de méthyle (Topakas *et al.*, 2003b). Ainsi, l'effet de différents substituants du cycle aromatique du substrat n'est pas toujours le même pour toutes les AFE. De plus, un même organisme peut posséder plusieurs AFE présentant des spécificités de substrat contraires. Néanmoins, la quasi-totalité des AFE déjà caractérisées possède un domaine de spécificité de substrat plus large que l'AFE produite par *S. ambofaciens* ATCC 23877.

Contrairement à l'AFE de *S. ambofaciens* ATCC 23877, la plus forte activité AFE de *Humicola* sp. est observée pour le cinnamate de méthyle (2,80 U/mg de protéines ; **Tableau 27**). Elle hydrolyse également tous les autres substrats testés avec une activité plus ou moins importante dans l'ordre, caféate de méthyle $\geq$ *p*-coumarate de méthyle > férulate de méthyle > sinapate de méthyle, comme déjà observé pour la FAE-I de *F.*

oxysporum (Topakas *et al.*, 2003c) et pour la CinnAE d'*A. niger* (Kroon *et al.*, 1996). Par contre, c'est l'inverse pour la FAE-II de *F. oxysporum* (Topakas *et al.*, 2003b) et la FaeA d'*A. niger* (Faulds et Williamson, 1994).

L'activité AFE de *Humicola* sp. est donc identique en présence d'un ou deux groupements OH sur le cycle aromatique (cas du *p*-coumarate ou du caféate de méthyle, 1,90 ; 1,86 U/mg de protéines, respectivement). Cependant, ce niveau d'activité reste inférieur à celui mesuré lors de l'absence de substituants sur le cycle aromatique (cas du cinnamate). La présence des substituants sur le cycle aromatique affecte donc négativement l'activité AFE de *Humicola* sp. Ce résultat est contradictoire avec ce qui a déjà été rapporté par Vafiadi *et al.*, (2006b) pour l'AFE de *Talaromyces stipitatus*, TsFaeC. La plus haute activité pour cette enzyme a été mesurée avec le *p*-coumarate et le caféate de méthyle indiquant l'importance des groupements hydroxyles aux positions *meta* et/ou *para* du cycle aromatique.

D'autre part, la présence d'un groupement méthoxyle sur le carbone 3 du cycle aromatique de *p*-coumarate de méthyle entraîne une diminution de l'activité AFE de *Humicola* sp. (cas du férulate, **Tableau 27**). De plus, dans le cas du sinapate de méthyle, la présence d'un deuxième méthoxyle sur le cycle aromatique de férulate de méthyle diminue fortement cette activité enzymatique.

Ces résultats montrent à nouveau l'influence des différents substituants du cycle aromatique du substrat sur les activités AFE. De fait, ces enzymes sont réparties en quatre classes principales selon plusieurs paramètres dont leurs spécificités pour les esters méthyliques des acides hydroxycinnamiques (**Chapitre 1 ; Tableau 4**). En prenant en compte ce classement, nous pouvons placer l'AFE de *Humicola* sp. avec ses homologues de type C ou D. Néanmoins, pour classer plus précisément cette enzyme, les déterminations de sa séquence en acides aminés et de sa capacité à libérer l'acide di-férulique sont nécessaires. Par contre, il est plus difficile de prédire à quelle classe l'AFE de *S. ambofaciens* ATCC 23877 peut appartenir, puisqu'elle montre un très étroit domaine de spécificité de substrat. Elle semble donc être plus spécifique que les autres AFE déjà identifiées.

Enfin, comme d'autres AFE déjà caractérisées (Faulds et Williamson, 1994 ; Donaghy et McKay, 1997 ; Donaghy *et al.*, 2000), aucune activité n'est détectée pour les dérivés du *p*-hydroxybenzoate en utilisant l'AFE de *S. ambofaciens* ATCC 23877 (**Tableau 27**). La présence d'une chaîne aliphatique latérale est donc indispensable pour l'activité AFE, ce qui peut montrer la nécessité d'avoir une certaine distance entre le cycle aromatique et la liaison ester (Kroon *et al.*, 1997 ; Topakas *et al.*, 2005a ; Vafiadi *et al.*, 2006b). Cependant, de faibles niveaux d'activité AFE de *Humicola* sp. sont mesurés sur ce type de substrat (0,10 et 0,12 U/mg de protéines pour le vanillate de méthyle et le syringate de méthyle, respectivement ; **Tableau 27**). Ceci suggère que l'AFE de *Humicola* sp. possède une plus large gamme d'activité que les AFE déjà identifiées.

En conclusion, l'AFE de *Humicola* sp. est plus active en absence de substitutions sur le cycle aromatique du substrat. Sa meilleure activité est mesurée avec le cinnamate de méthyle. De son côté, l'AFE de *S. ambofaciens* ATCC 23877 est aussi active sur le cinnamate de méthyle, mais son activité augmente avec une certaine substitution du cycle aromatique. Néanmoins, l'augmentation du nombre de substituants méthoxyles a un effet négatif sur les deux activités enzymatiques. De plus, pour les deux enzymes, l'activité AFE dépend aussi de la distance entre le cycle aromatique et la liaison ester du substrat.

3.2. Influence de la longueur de la chaîne latérale alcoolique de l'ester cinnamique sur les activités acide férulique estérases

D'après le tableau 27, l'AFE de *S. ambofaciens* ATCC 23877, obtenue après dialyse, possède une activité spécifique, mesurée avec le férulate de méthyle comme substrat, quatre fois moins importante que celle précédemment mesurée avec le férulate d'éthyle (**Chapitre 3 ; Tableau 21**). De même, l'activité AFE de *Humicola* sp. observée avec le férulate d'éthyle (**Chapitre 4 ; Tableau 26**) est plus élevée que celle mesurée avec le férulate de méthyle (**Tableau 27**) (1,3 et 1,0 U/mg de protéines, respectivement). Des résultats similaires ont été observés par Donaghy *et al.* (2000) pour une AFE de *Clostridium stercoarium*. De même, l'AFE de *T. stipitatus*, la TsFaeC, était plus efficace pour hydrolyser le férulate d'éthyle que le férulate de méthyle (Vafiadi *et al.*, 2006b).

La longueur de la chaîne alcoolique de l'ester semble donc affecter l'activité AFE. Afin de le vérifier, les deux AFE sont incubées avec des esters méthylque, éthylique ou butylique de l'acide cinnamique [1,33 mM dans un tampon phosphate de sodium (70 mM - pH 6,5)].

Tableau 28. Influence de la longueur de la chaîne alcoolique d'ester d'acide cinnamique sur les activités AFE de *S. ambofaciens* ATCC 23877 et de *Humicola* sp. L'intervalle de confiance à 95% sur ces valeurs est de l'ordre de 4% de l'activité mesurée pour l'AFE *Humicola* sp.

Substrat	Activité spécifique AFE	
	<i>S. ambofaciens</i> (mU/mg protéines)	<i>Humicola</i> sp. (U/mg protéines)
Cinnamate de méthyle	0,16	2,8
Cinnamate d'éthyle	0,22	1,8
Cinnamate de butyle	0	0,4

L'activité spécifique AFE de *S. ambofaciens* ATCC 23877 obtenue est similaire pour le cinnamate d'éthyle ainsi que pour le cinnamate de méthyle, mais nulle avec le cinnamate de butyle (**Tableau 28**). Par contre, l'activité spécifique AFE de *Humicola* sp. diminue avec l'augmentation de la longueur de la chaîne latérale alcoolique. Approximativement, 86% d'activité sont perdus avec le cinnamate de butyle par rapport au cinnamate de méthyle.

Ces résultats montrent que les deux AFE sont actives sur des esters cinnamiques à courtes chaînes alcooliques. La présence de plus longues chaînes réduit, voire annule complètement l'activité en raison, peut-être, d'un encombrement stérique. Vafiadi *et al.* (2006b) ont également mesuré une meilleure activité hydrolytique de l'AFE de *T. stipitatus* sur des esters à courts groupements alkyles.

CHAPITRE 6

*Utilisation des acide férulique estérases en
synthèse*

SOMMAIRE

<u>I. Utilisation de l'acide férulique estérase de <i>S. ambofaciens</i> ATCC 23877 en synthèse.....</u>	139
<u>II. Utilisation de l'acide férulique estérase de <i>Humicola</i> sp. en synthèse.....</u>	140
II.1. Synthèse d'esters d'acide férulique.....	140
II.1.1. Estérification en milieu aqueux.....	140
II.1.2. Effet de l'eau sur la synthèse du férulate d'éthyle.....	141
II.1.3. Synthèse avec l'enzyme partiellement purifiée.....	142
II.1.4. Effet de la longueur de la chaîne alcoolique.....	144
II.1.5. Essai de synthèse du férulate d'arabinose.....	145
II.2. Spécificité de l'acide férulique estérase de <i>Humicola</i> sp. en synthèse.....	146
II.3. Synthèse d'acide chlorogénique.....	151
II.4. Synthèse d'esters de phloridzine.....	153
II.4.1. Etude de la synthèse de cinnamate et de férulate de phloridzine par estérification directe.....	153
II.4.2. Etude de la synthèse d'esters de phloridzine par transestérification...	154
II.5. Effet du M₂B₂ sur la synthèse.....	155

Dans ce chapitre, les premiers essais de synthèse enzymatique réalisés avec l'AFE de *Humicola* sp. et celle de *S. ambofaciens* ATCC 23877 sont présentés notamment les tentatives d'estérification directe et de transestérification de certains phénols et flavonoïdes.

I. Utilisation de l'acide férulique estérase de *S. ambofaciens* ATCC 23877 en synthèse

L'AFE de *S. ambofaciens* ATCC 23877 issue de la précipitation au sulfate d'ammonium (50% de saturation) est utilisée pour catalyser l'estérification de l'acide férulique avec l'éthanol. Le mélange réactionnel, contenant 5 μ mol d'acide férulique dissous dans 500 μ l d'éthanol, est incubé pendant 24 h à 50 °C. L'analyse CLHP indique qu'il n'y a ni dégradation de l'acide férulique, ni apparition spontanée de férulate d'éthyle en absence d'enzyme. La réaction est initiée par l'introduction dans le milieu réactionnel de 50 mg de précipité (séché par de l'azote gazeux) contenant 0,7 mU d'enzyme. Des prélèvements sont réalisés au cours du temps pendant 200 h et analysés par CLHP.

Malheureusement, aucune synthèse de férulate d'éthyle n'est observée. Ceci peut être dû soit à la faible activité AFE utilisée, soit à la valeur élevée de la température de la réaction (50 °C), en prenant en compte le manque de stabilité thermique de l'enzyme observé à 37 °C (*Chapitre 3 ; § II.1*) ou encore à la présence de sulfate d'ammonium résiduel.

Des études supplémentaires sont à envisager pour résoudre ce problème. Les outils de la biologie moléculaire peuvent par exemple être une des solutions proposées. Le clonage du gène codant l'AFE de *S. ambofaciens* ATCC 23877 pourrait conduire à la production d'une enzyme assez pure et en quantité importante.

A notre connaissance, les AFE bactériennes n'ont jamais été utilisées auparavant en biocatalyse. Tous les essais de synthèse déjà rapportés dans la littérature, en utilisant les AFE, sont effectués avec des enzymes produites par des champignons. Les travaux

réalisés au cours de cette étude forment donc le premier essai d'utilisation d'AFE bactériennes en biocatalyse.

De ce fait, le but des travaux réalisés dans les paragraphes suivants est d'étudier le potentiel de l'AFE du champignon *Humicola* sp. en synthèse en milieux hydro-organiques.

II. Utilisation de l'acide férulique estérase de *Humicola* sp. en synthèse

II.1. Synthèse d'esters d'acide férulique

II.1.1. Estérification en milieu aqueux

Dans un premier temps, nous nous sommes contentés d'utiliser l'AFE de *Humicola* sp. obtenue par simple précipitation à l'acétone pour catalyser la synthèse d'esters d'acide férulique avec plusieurs alcools (méthanol, éthanol, butanol ou glycérol). Les réactions sont menées à 50 °C pendant 24 h en milieu tampon acétate (1 M - pH 4,5 ; 50 µl) contenant 10 µl d'une solution d'acide férulique (0,35% dans le DMF), 20 µl de solution enzymatique (5 mg d'AFE dissous dans de l'eau) et 420 µl de l'alcool.

Aucune estérification n'est observée avec le méthanol (**Tableau 29**). Ceci pourrait être attribué à l'effet dénaturant du méthanol sur l'enzyme. Les rendements sont également faibles avec l'éthanol et le butanol.

Par contre, un rendement de 55% est mesuré dans le cas du glycérol. Nous n'avons trouvé qu'un seul produit, sans intermédiaires, ce qui laisse supposer la synthèse de mono-férulate de glycérol mais cela reste à confirmer. Tsuchiyama *et al.* (2006) ont aussi rapporté un rendement proche de 80% pour la synthèse de férulate de glycérol par estérification directe (dans un milieu tampon acétate) en utilisant une AFE d'*A. niger*, la FAE-PL.

Tableau 29. Synthèse d'esters d'acide férulique (AF) à l'aide de l'AFE de *Humicola* sp. issue de la précipitation à l'acétone. Les rendements d'estérification sont exprimés en % d'acide férulique transformé au bout de 24 h.

Substrat	Rendement (%)
Méthanol (100%)	-
Ethanol (95%)	5
Butanol (99,5%)	2
Glycérol (99,5%)	55

II.1.2. Effet de l'eau sur la synthèse du férulate d'éthyle

Généralement la présence d'eau initiale dans le milieu réactionnel de synthèse est défavorable à la production d'ester. Aussi, pour mettre en évidence le rôle néfaste de l'eau sur la synthèse, l'expérience précédente est recommencée dans un milieu réactionnel constitué uniquement de l'alcool (méthanol ou l'éthanol), de l'enzyme et de l'acide férulique dissous dans l'alcool utilisé.

Les résultats sont comparés avec ceux obtenus précédemment pour les milieux aqueux. De nouveau, aucune synthèse n'est observée avec le méthanol. Par contre, le férulate d'éthyle est synthétisé avec un rendement plus important que celui obtenu en milieu aqueux. La figure 46 montre l'évolution de la concentration en férulate d'éthyle synthétisé dans ces deux milieux réactionnels. Le rendement d'estérification le plus élevé (30%) est mesuré après 24 h de réaction. Comme attendu, l'absence d'eau initiale déplace donc la réaction dans le sens de la synthèse.

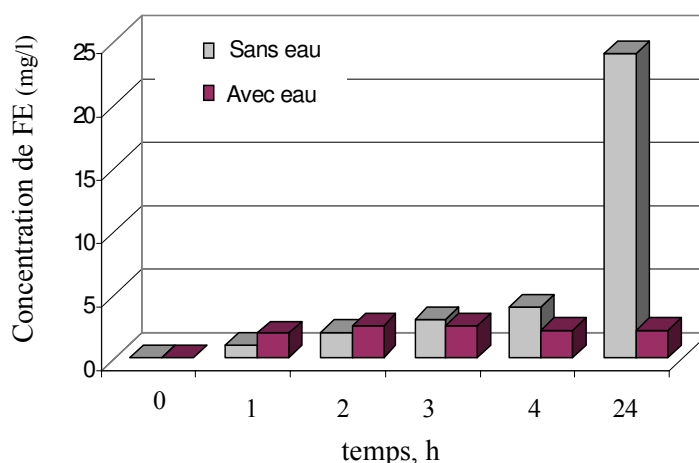


Fig. 46. Influence de la présence d'eau sur l'évolution de la réaction de synthèse du férulate d'éthyle (FE) en utilisant l'AFE de *Humicola* sp.

Topakas *et al.* (2003b) ont déjà étudié l'influence de la composition du milieu réactionnel sur l'estérification enzymatique de l'acide *p*-hydroxyphénylacétique avec le 1-propanol dans un système ternaire composé de *n*-hexane/1-propanol/eau (47,2/50,8/2,0 ; 59,0/38,5/2,5 ou 45,9/47,8/6,3). Le comportement catalytique de l'enzyme FAE-II de *F. oxysporum* était légèrement affecté par la composition du milieu réactionnel, mais le rendement le plus important a été observé dans le milieu contenant la quantité minimale d'eau (47,2/50,8/2,0). Compton *et al.* (2000) ont réussi à synthétiser, par transestérification en milieu non aqueux, le férulate de glycérol en présence de la lipase de *C. antarctica* avec un rendement de près de 44%.

II.1.3. Synthèse avec l'enzyme partiellement purifiée

Pour vérifier l'influence de la pureté de l'enzyme, nous avons recommencé la synthèse du férulate d'éthyle, en utilisant l'AFE de *Humicola* sp. obtenue après passage sur chromatographie d'échange d'anions (facteur de purification égal à 6,8).

Le mélange réactionnel, contenant 5 μ mol d'acide férulique dissous dans 500 μ l d'éthanol, est incubé pendant 24 h à 50 °C. L'analyse CLHP indique qu'il n'y a ni dégradation d'acide férulique, ni apparition spontanée de férulate d'éthyle en absence d'enzyme. La réaction est initiée par l'introduction de 5 mg de l'AFE (3,4 U/mg de protéines) issue de la CEA dans le milieu réactionnel. Des prélèvements sont réalisés au

cours du temps pendant 200 h. En parallèle, une réaction similaire est effectuée en utilisant l'AFE issue de la précipitation à l'acétone (1,3 U/mg de protéines).

Pour les deux réactions, les analyses CLHP montrent une diminution de la concentration en acide férulique au cours du temps et une apparition de férulate d'éthyle. Les graphiques présentés dans la figure 47 reportent l'évolution des concentrations d'acide férulique restant et du férulate d'éthyle formé au cours du temps. La réaction de synthèse du férulate d'éthyle avec l'AFE de *Humicola* sp. obtenue par précipitation à l'acétone (**Fig. 47a**) atteint un rendement d'environ 33% en 24 h, rendement qui passe à 87% après 150 h de réaction.

La réaction d'estérification en utilisant l'enzyme issue de la CEA se déroule de la même façon (**Fig. 47b**) avec 31% et 79% de conversion de l'acide férulique au bout de 24 h et de 150 h, respectivement.

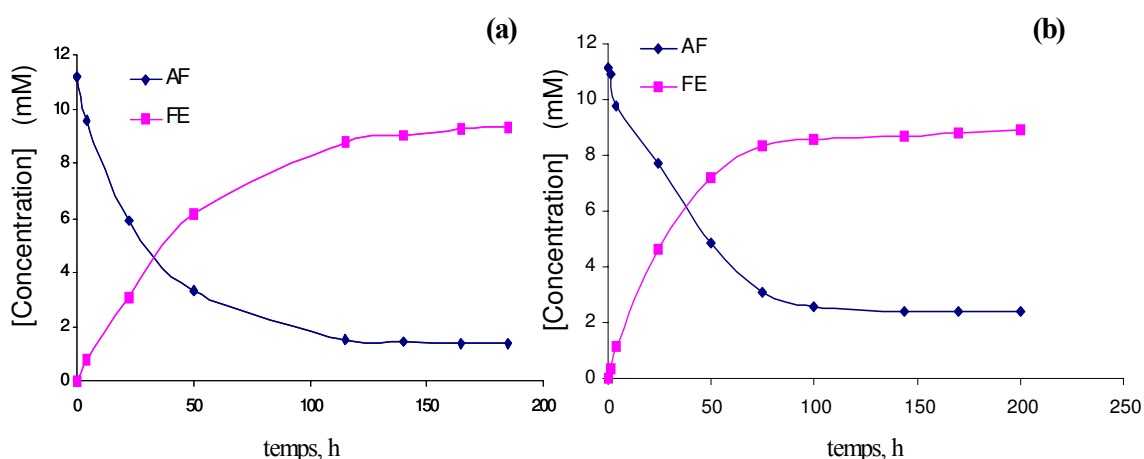


Fig. 47. Synthèse du férulate d'éthyle, FE, en utilisant l'AFE de *Humicola* sp. issue de la précipitation à l'acétone (**a**) et de la CEA (**b**).

Nous pouvons observer que les rendements des deux estérifications sont quasiment identiques. De plus, l'équilibre des deux synthèses est à peu près atteint après 150 h de réaction. Un plus haut degré de pureté ne semble donc pas être nécessaire pour utiliser cette AFE en synthèse. Dans ces conditions, l'enzyme issue de la précipitation à l'acétone sera utilisée dans tous les essais suivants de synthèse.

II.1.4. Effet de la longueur de la chaîne alcoolique

Pour étudier l'influence de la longueur de la chaîne alcoolique, les synthèses des férulates d'éthyle, de propyle et de butyle ont été comparées dans les conditions précédemment utilisées. L'avancement des réactions a été suivi en mesurant la disparition de l'acide férulique, faute de disposer des témoins commerciaux de férulate de propyle et de butyle. Les rendements de synthèse sont exprimés en pourcentage de disparition de l'acide férulique.

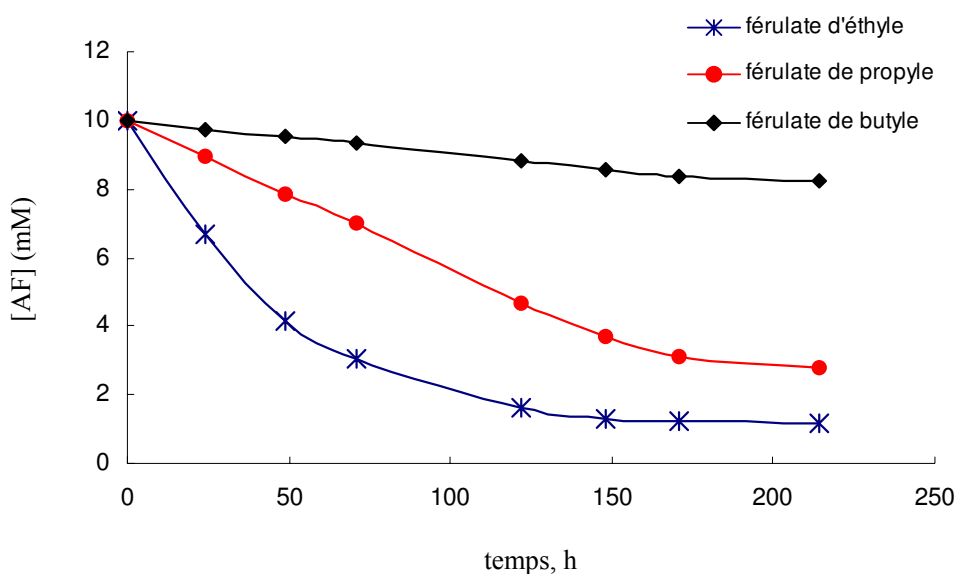


Fig. 48. Evolution de la concentration en acide férulique lors de l'estérification avec de l'éthanol, du propanol et du butanol par l'AFE de *Humicola* sp.

D'après les résultats présentés dans la figure 48, la réaction de synthèse du férulate d'éthyle atteint un rendement d'environ 33% en 24 h. Ce rendement augmente jusqu'à 87% après 150 h de réaction. L'équilibre est atteint à ce point. La réaction d'estérification du propanol se déroule de la même façon avec 11% et 63% de conversion de l'acide férulique au bout de 24 h et de 150 h, respectivement. Par contre, le rendement le moins élevé est mesuré lors de la synthèse du férulate de butyle (3% et 14% au bout 24 h et de 150 h, respectivement) car la réaction est très lente.

Ces résultats montrent clairement que l'AFE de *Humicola* sp. catalyse préférentiellement la synthèse d'esters à courte chaîne. Cette activité synthétique diminue en augmentant la longueur de la chaîne alcoolique. Il faut également noter que

l'AFE de *Humicola* sp. possède aussi une meilleure activité hydrolytique pour les esters à courtes chaînes alcooliques (**Chapitre 5 ; § 3.2**).

L'estérification par des lipases de l'acide cinnamique, dans des milieux sans solvant, a déjà été rapportée. Stamatis *et al.* (1999) ont trouvé une meilleure activité synthétique de la lipase de *Rhizomucor miehei* avec des alcools à longues chaînes. Ainsi, l'effet du type de l'alcool en synthèse peut varier selon sa structure et la nature de l'enzyme utilisée comme biocatalyseur.

II.1.5. Essai de synthèse du férulate d'arabinose

Les AFE hydrolysent naturellement les liaisons esters entre l'acide férulique et l'arabinose dans les parois végétales (**Chapitre 1 ; § II**). De ce fait, elles devraient être capables de faire la réaction inverse. Afin de vérifier cette propriété chez l'AFE de *Humicola* sp., un essai est réalisé en dissolvant 5 μ mol d'acide férulique avec 50 μ mol de L-arabinose dans 500 μ l du M₂B₂ préalablement déshydraté (α_w : 0,06) pendant 24 h à 50 °C. La réaction est ensuite initiée par l'introduction de 5 mg d'AFE de *Humicola* sp. Des prélèvements sont réalisés au cours du temps pendant 200 h et analysés par CLHP.

Malheureusement, aucune synthèse de férulate d'arabinose n'est observée. Cela pourrait être dû à plusieurs causes notamment aux conditions opératoires utilisées : le M₂B₂, par exemple, pourrait avoir un effet néfaste sur l'enzyme.

Vafiadi et son équipe (2006a) sont parvenu à synthétiser le férulate d'arabinose par transestérification en utilisant une AFE de *S. thermophile*, la StFaeC. Toutefois, ils ont utilisé des conditions très différentes des nôtres. Ils ont réalisé la synthèse dans un système de micro-émulsion : *n*-hexane/méthyl-2 propanol-2/eau (47,2:50,8:2,0 v/v/v) avec toutefois un rendement de conversion de seulement 15% après 4 jours de réaction. Toujours en micro-émulsion, *n*-hexane/*t*-butanol/eau (53,4:43,4:3,2 v/v/v), ils ont montré que l'AFE de *T. stipitatus* (la TsFaeC) était également capable de synthétiser le férulate d'arabinose par transestérification avec presque 21% de conversion après 4 jours de réaction (Vafiadi *et al.*, 2006b).

II.2. Spécificité de l'acide férulique estérase de *Humicola* sp. en synthèse

Nous avons précédemment étudié la spécificité de l'AFE de *Humicola* sp. en hydrolyse (**Chapitre 5 ; § 3.1**). Les expériences réalisées dans cette partie ont pour but d'étudier la spécificité de cette enzyme pour la synthèse d'esters éthyliques d'acide cinnamique ou de ses dérivés. Pour cette étude, plusieurs acides de la série cinnamique sont utilisés comme donneurs d'acyles aromatiques, alors que l'éthanol sert, lui, à la fois d'accepteur d'acyle et de solvant de tous les donneurs d'acyles étudiés. Il est, de ce fait, en large excès ce qui peut favoriser la réaction de synthèse.

5 μmol du donneur d'acyle (acide cinnamique, acide *p*-coumarique, acide caféique, acide férulique ou acide sinapique) sont dissous dans 500 μl d'éthanol pendant 24 h à 50 °C. Aucune estérification n'a lieu sans ajout de l'enzyme. Ensuite, 5 mg de l'AFE sont ajoutés dans le milieu réactionnel. Des prélèvements sont réalisés au cours du temps et analysés par CLHP. La figure 49 montre l'évolution de la disparition de chaque acide testé tout au long de la réaction (200 h).

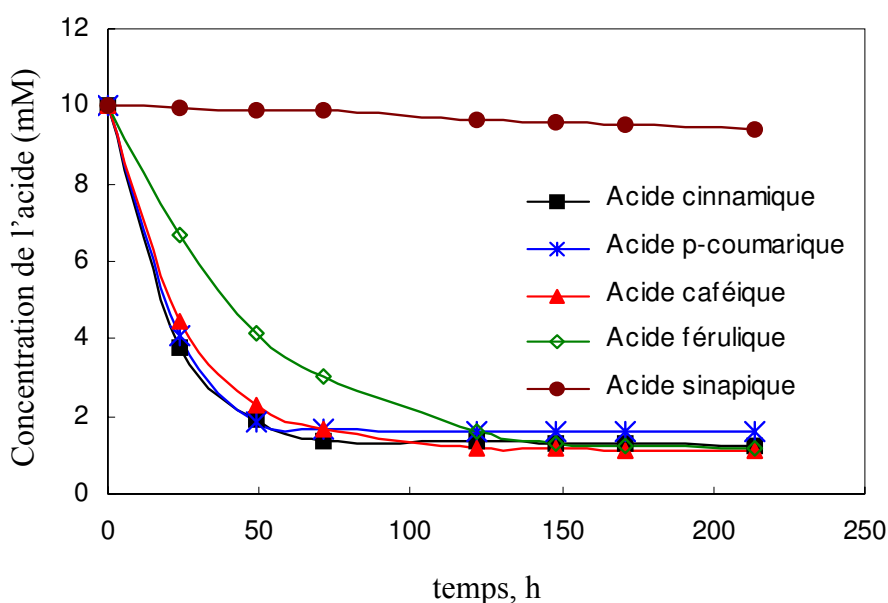


Fig. 49. Evolution des concentrations des acides phénoliques lors de leur estérification par l'éthanol en présence de l'AFE de *Humicola* sp.

L'AFE de *Humicola* sp. montre une activité plus ou moins importante pour tous les acides étudiés. Des niveaux similaires de rendement d'estérification sont mesurés pour l'acide cinnamique, l'acide *p*-coumarique et l'acide caféique après 24 h ou 150 h

de réaction (**Tableau 30**). Par contre, un rendement plus faible (33%) est observé pour le férulate d'éthyle après 24 h de réaction, mais il atteint, après 150 h, le même niveau (87%) que celui observé pour les trois premiers acides. L'acide sinapique, lui n'est quasiment pas estérifié : rendement de seulement 4% après 150 h de réaction (**Tableau 30**).

Tableau 30. Synthèse d'esters éthyliques d'acides cinnamiques à l'aide de l'AFE de *Humicola* sp. Les rendements d'estérification sont calculés à partir de la disparition du substrat.

Substrat	Rendement (%)	
	à 24 h	à 150 h
Acide cinnamique	62	87
Acide <i>p</i> -coumarique	59	84
Acide caféique	56	88
Acide férulique	33	87
Acide sinapique	0,5	4

Ces résultats suggèrent que l'AFE de *Humicola* sp. est plus spécifique pour l'acide cinnamique et ses dérivés hydroxylés en positions *meta* et/ou *para* du cycle aromatique (acide *p*-coumarique et caféique). Par contre, la présence de groupements méthoxyles sur le cycle aromatique ralentit (acide férulique) ou inhibe la réaction d'estérification (acide sinapique).

Ces résultats sont relativement similaires à ceux précédemment obtenus pour la même enzyme en hydrolyse (**Chapitre 5 ; § 3.1**). Topakas *et al.* (2005b) ont montré une action hydrolytique de la StFaeC de *S. thermophile* identique à celle observée en synthèse. Néanmoins, cela n'est pas toujours valable pour toutes les AFE car un résultat contraire a déjà été rapporté par Vafiadi *et al.* (2006b) pour la TsFaeC de *T. stipitatus*.

Une comparaison de ces résultats avec des données bibliographiques est présentée dans le tableau 31. En ce qui concerne l'acide cinnamique, un résultat différent a été rapporté par Topakas *et al.* (2003b) pour l'enzyme FAE-II de *F. oxysporum*. Cette AFE n'est pas capable de synthétiser le cinnamate de propyle (**Tableau 31**) ce qui fait dire à ces auteurs qu'une hydroxylation du cycle aromatique est indispensable pour l'activité

synthétique des AFE. Toutefois, cette proposition n'est pas du tout confirmée dans notre étude, bien au contraire.

Par contre, les rendements élevés de synthèse d'esters d'acides hydroxycinnamiques à l'exception de l'acide sinapique (**Tableau 31**) corroborent ceux obtenus dans ce travail avec l'AFE de *Humicola* sp. Les rendements de synthèse mesurés à l'aide de cette enzyme restent malgré tout les meilleurs (**Tableau 30**).

Tableau 31. Données bibliographiques concernant l'estérification et la transestérification d'acide cinnamique ainsi que d'acides hydroxycinnamiques à l'aide d'AFE.

Groupement acyle	Réf.	Accepteur d'acyle (milieu)	AFE	Rendement (temps réactionnels)
Acide cinnamique	(1)	1-propanol (micro-émulsion) ^a	FAE-II de <i>F. oxysporum</i>	trace (224 h)
Acide <i>p</i> -coumarique	(2)	1-butanol (micro-émulsion) ^b	FAE-I de <i>F. oxysporum</i>	75% (140 h)
	(3)	1-butanol (micro-émulsion) ^b	StFAE-A de <i>S. thermophile</i>	55% (140 h)
Acide caféique	(2)	1-butanol (micro-émulsion) ^b	FAE-I de <i>F. oxysporum</i>	23% (140 h)
	(3)	1-butanol (micro-émulsion) ^b	StFAE-A de <i>S. thermophile</i>	25% (140 h)
Acide férulique	(4)	n-pentanol (micro-émulsion) ^a	FaeA d' <i>A. niger</i>	60% (6 h)
	(5)	glycérol (milieu aqueux/ tampon acétate) ^a	FAE-PL d' <i>A. niger</i>	80% (48 h)
Acide sinapique	(2)	1-butanol (micro-émulsion) ^b	FAE-I de <i>F. oxysporum</i>	1% (140 h)

(1) Topakas *et al.*, 2003b ; (2) Topakas *et al.*, 2003c ; (3) Topakas *et al.*, 2004 ; (4) Giuliani *et al.*, 2001 ; (5) Tsuchiyama *et al.*, 2006.

Notes : a : estérification directe ; b : transestérification. Composition des micro-émulsions : *n*-hexane/alcool/eau (47,2:50,8:2,0 v/v/v) à l'exception des références 4 et 5.

Par ailleurs, afin d'étudier l'effet de la conjugaison sur l'estérification des acides hydroxycinnamiques, un essai de synthèse d'ester d'acide hydrocaféique avec l'éthanol est effectué dans les mêmes conditions opératoires. Une comparaison entre cette estérification et celle de l'acide caféique peut donc être effectuée (**Fig. 50**).

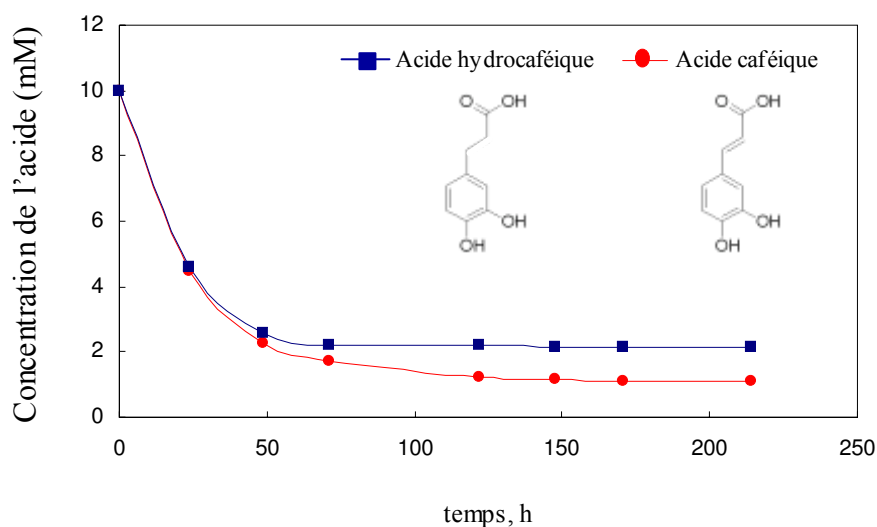


Fig. 50. Evolution de la concentration en acide caféique ainsi qu'en acide hydrocaféique lors de l'estérification par l'éthanol en utilisant l'AFE de *Humicola* sp.

Les deux acides sont estérifiés par l'éthanol de façon quasi identique, avec des rendements (à 24 h) de 56% et 54% pour l'acide caféique et hydrocaféique, respectivement. Cependant, après 150 h de réaction, le rendement d'estérification de l'acide caféique est légèrement plus élevé que celui obtenu dans le cas de l'acide hydrocaféique.

Généralement, les lipases peuvent catalyser la synthèse d'esters d'acide cinnamique (la lipase de *C. antarctica*, Guyot *et al.*, 1997 ; Stamatis *et al.*, 1999) ou d'acide hydrocinnamique (la lipase de *Pseudomonas cepacia*, Priya et Chadha, 2003) à des rendements élevés. Par contre, elles ne sont pas capables de catalyser la synthèse d'esters d'acides hydroxycinnamiques (acide *p*-coumarique, acide caféique et/ou acide férulique) ou alors avec de très faibles rendements (Guyot *et al.*, 1997 ; Stamatis *et al.*, 1999 ; Compton *et al.*, 2000 ; Stamatis *et al.*, 2001) par rapport aux estérifications menées par des AFE. Néanmoins, des améliorations de ces rendements peuvent être réalisées dans certaines conditions réactionnelles (Compton *et al.*, 2000). Le tableau 32 montre certaines données bibliographiques sur une telle utilisation de lipases en synthèse.

Tableau 32. Synthèse bibliographique concernant l'estérification directe d'acide cinnamique et d'acides hydroxycinnamiques à l'aide de Novozym 435® : forme immobilisée de la lipase B de *C. antarctica*.

Groupement acyle	Réf.	Accepteur d'acyle (solvant)	Conditions réactionnelles	Rendement (temps réactionnels)
Acide cinnamique	(1)	1-butanol (1-butanol)	65 °C, 500 mbar	40% (48 h)
	(2)	1-octanol (1-octanol)	50 °C, 1 atm.	82% (12 jours)
	(3)	1-butanol (1-butanol)	60 °C, 1 atm.	97% (15 jours)
Acide <i>p</i> -coumarique	(1)	1-butanol (1-butanol)	65 °C, 500 mbar	2% (48 h)
	(2)	1-octanol (1-octanol)	50 °C, 1 atm.	25% (12 jours)
	(3)	1-butanol (1-butanol)	60 °C, 1 atm.	20% (40 jours)
Acide caféique	(1)	1-butanol (1-butanol)	65 °C, 500 mbar	pas de réaction
	(2)	1-octanol (1-octanol)	50 °C, 1 atm.	traces (12 jours)
	(3)	1-butanol (1-butanol)	60 °C, 1 atm.	pas de réaction
Acide hydrocaféique	(1)	1-butanol (1-butanol)	65 °C, 500 mbar	50% (48 h)
	(3)	1-butanol (1-butanol)	60 °C, 1 atm.	78% (15 jours)
	(3)	1-octanol (1-octanol)	60 °C, 1 atm.	80% (8 h)
Acide férulique	(1)	1-butanol (1-butanol)	65 °C, 500 mbar	<1% (48 h)
	(2)	1-octanol (1-octanol)	50 °C, 1 atm.	11% (12 jours)
	(3)	1-butanol (1-butanol)	60 °C, 1 atm.	traces (15 jours)
	(4)	1-octanol (<i>t</i> -butanol)	60 °C, sous azote	14% (312 h)
	(4)	éthanol (<i>t</i> -butanol)	60 °C, sous azote	20% (312 h)
Acide 3,4,5-triméthoxycinnamique	(1)	1-butanol (1-butanol)	65 °C, 500 mbar	<5% (48 h)
Acide sinapique	(1)	1-butanol (1-butanol)	65 °C, 500 mbar	pas de réaction

(1) Enaud, 2004 ; (2) Stamatis *et al.*, 1999 ; (3) Guyot *et al.*, 1997 ; (4) Compton *et al.*, 2000.

Enaud (2004) a rapporté des estérifications réalisées avec la lipase B de *C. antarctica* en utilisant le 1-butanol comme accepteur d'acyle et comme solvant (**Tableau 32**). Un rendement de 40% a été obtenu après 48 h lors de synthèse du cinnamate de butyle. La présence d'un hydroxyle sur le cycle aromatique de l'acide cinnamique a réduit considérablement le rendement de synthèse jusqu'à 2% (cas de l'acide *p*-coumarique). De plus, aucune synthèse n'a été observée lors de la présence d'un deuxième hydroxyle en C-3 du cycle (cas de l'acide caféique). Par contre, de faibles rendements de conversion ont été mesurés avec les substrats méthoxylés (<1% ou 5% pour l'acide férulique ou l'acide 3,4,5-triméthoxycinnamique, respectivement).

Cet effet néfaste de la substitution du cycle aromatique, notamment par des hydroxyles, n'est pas observé en absence de double liaison entre le noyau aromatique et la fonction carboxylique. C'était le cas de l'acide hydrocaféique qui est estérifié avec un bon rendement de 50% (Enaud, 2004 ; **Tableau 32**). Ces résultats corroborent ceux obtenus par Guyot *et al.*, 1997 et Stamatidis *et al.*, 1999 (**Tableau 32**).

L'explication qui est généralement donnée, est que les substituants méthoxyles ou hydroxyles exercent un effet mésomère donneur d'électron conduisant à une déstabilisation électronique au niveau de la fonction carboxyle, ce qui peut expliquer, d'une part, l'échec de l'estérification de l'acide caféique, et d'autre part, l'obtention d'un très faible rendement d'estérification de l'acide férulique en utilisant la lipase B de *C. antarctica* (Enaud, 2004). Cependant, la présence d'un « bras espaceur » saturé à deux carbones entre le cycle aromatique et la fonction carboxyle empêche la délocalisation électronique jusqu'à cette fonction. Un rendement élevé d'estérification est alors obtenu (cas de l'acide hydrocaféique).

Donc, contrairement à la plupart des lipases, l'AFE de *Humicola* sp. est capable d'estérifier les acides hydroxycinnamiques, tels que les acides caféique et *p*-coumarique, par l'éthanol avec un bon rendement (**Tableau 30**). Par contre, la substitution du cycle aromatique par des groupements méthoxyles réduit considérablement le rendement de synthèse comme on peut le voir dans le cas de l'acide férulique et surtout de l'acide sinapique.

Pour conclure, certains donneurs d'acyles de la série cinnamique sont d'excellents substrats pour l'AFE de *Humicola* sp., alors que la lipase B de *C. antarctica* n'accepte que l'acide cinnamique ou ses dérivés hydroxylés ayant un « bras espaceur » saturé à deux carbones entre le cycle aromatique et la fonction carboxyle.

II.3. Synthèse d'acide chlorogénique

Les acides chlorogéniques sont des esters formés entre certains acides hydroxycinnamiques, notamment l'acide caféique, et l'acide quinique (**Fig. 51**). Ils sont abondants dans la majorité de fruits ainsi que dans les grains de café. Ces composés phénoliques font partie des métabolites secondaires chez les plantes. Ils possèdent

également de nombreuses propriétés intéressantes. Par exemple, l'acide chlorogénique (acide 3-caféoylquinique) est connu comme un agent antibactérien, antimutagène, antitumoral, antioxydant et antiviral (Sefkow, 2001).

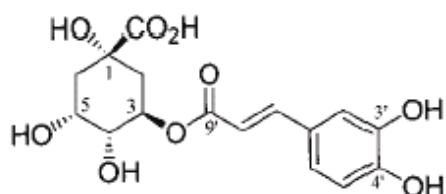


Fig. 51. Structure d'un acide chlorogénique (acide 3-caféoylquinique).

Le premier essai de synthèse chimique de l'acide chlorogénique a été réalisé en 1955 par Panizzi *et al.* avec un rendement de l'ordre de 5%. En 2001, Sefkow a rapporté une synthèse chimique de cet acide avec un rendement de 65%. Néanmoins, la synthèse de ce composé par voie enzymatique est peu étudiée. En 2003, Armesto *et al.* sont parvenu à synthétiser des dérivés d'acides chlorogéniques en mode transestérification en utilisant la lipase A de *C. antarctica*.

A notre connaissance, la littérature ne rapporte aucune utilisation d'AFE pour la synthèse enzymatique d'acides chlorogéniques, c'est pourquoi nous avons testé la capacité de l'AFE de *Humicola* sp. à réaliser ce type de synthèse par une réaction d'estérification directe entre l'acide caféique (50 μ mol) et l'acide quinique (50 μ mol) avec du M_2B_2 (5 ml) comme solvant. La réaction est effectuée à 50 °C pendant 200 h en présence de 50 mg de l'AFE de *Humicola* sp.

L'analyse CLHP du milieu réactionnel ne montre aucun changement de la concentration des réactifs tout au long de la réaction. De plus, aucun nouveau pic n'est détecté, ce qui indique l'échec de la synthèse d'acide chlorogénique par de l'AFE de *Humicola* sp. Un manque de sélectivité de cette enzyme pour l'acide quinique pourrait peut-être expliquer l'insuccès de cette synthèse. D'autres raisons peuvent être également évoquées telles que l'influence du M_2B_2 sur l'enzyme.

II.4. Synthèse d'esters de phloridzine

La capacité de la lipase B de *C. antarctica* à estérifier la partie glycosidique de la phloridzine avec l'acide cinnamique a déjà été démontrée (Enaud, 2004). Toutefois, il n'y a pas de synthèse lorsqu'un acide cinnamique substitué, tel que l'acide férulique ou l'acide caféique, est utilisé comme donneur d'acyle. Cela a été attribué au manque de sélectivité de cette enzyme vis-à-vis du groupement acyle, d'où l'intérêt d'utiliser des enzymes spécifiques de ces acides telles que les AFE.

La faisabilité de l'acylation des flavonoïdes, avec la phloridzine comme modèle, par un groupement aromatique a donc été étudiée en utilisant l'AFE de *Humicola* sp. En fait, la phloridzine, outre son pouvoir antioxydant, possède des propriétés biologiques et physico-chimiques intéressantes pour des applications cosmétiques. Il serait très intéressant soit de valoriser ces propriétés (augmentation de la solubilité dans les phases lipophiles par exemple) soit d'apporter des propriétés complémentaires (propriétés anti-UV) par greffage d'acide de type cinnamique.

II.4.1. Etude de la synthèse de cinnamate et de férulate de phloridzine par estérification directe

La phloridzine (1 μmol) et le donneur d'acyle (5 μmol d'acide férulique ou d'acide cinnamique) sont placés dans 500 μl de M_2B_2 préalablement déshydraté (α_w : 0,06) pendant 24 h à 50 °C. L'analyse CLHP indique qu'aucune apparition spontanée d'ester de phloridzine n'est observée en absence d'enzyme. La réaction est ensuite initiée par l'introduction, dans le milieu réactionnel, de 5 mg de l'AFE de *Humicola* sp.

Les analyses de tous les prélèvements effectués pendant les 200 h de réaction ne montrent aucun changement de la concentration des réactants. Aucun ester de phloridzine n'est synthétisé que ce soit avec l'acide férulique ou avec l'acide cinnamique. D'autres essais sont également menés en faisant varier la quantité d'enzyme utilisée (1, 10 et 20 mg) ainsi qu'en utilisant l'enzyme plus pure obtenue après la CEA (3,4 U/mg de protéines), mais les résultats sont toujours négatifs.

Contrairement à la lipase B de *C. antarctica*, l'AFE utilisée dans cette étude n'est pas capable de réaliser l'acylation de la phloridzine par l'acide cinnamique. A notre connaissance, aucune estérification de flavonoïdes n'a été réalisée à l'aide d'AFE.

Ainsi, l'échec de la synthèse de férulate ou de cinnamate de phloridzine pourrait être dû aux conditions réactionnelles. C'est pourquoi, des essais de synthèse par transestérification sont réalisés.

II.4.2. Etude de la synthèse d'esters de phloridzine par transestérification

Contrairement aux transestérifications, les réactions d'estérification directe conduisent à la production d'eau dans le milieu favorisant l'hydrolyse inverse. Ainsi, des différences entre estérification et transestérification peuvent être observées. Humeau (1998) a observé un allongement des temps réactionnels nécessaires pour atteindre l'équilibre passant de 2 h en mode transestérification à 2 jours en mode estérification directe pour la synthèse du palmitate d'ascorbyle en utilisant la lipase de *C. antarctica*. D'autre part, Coulon *et al.* (1995) ont obtenu un meilleur rendement de synthèse d'oléate de fructose en transestérification avec la même lipase. De plus, les plus hauts rendements de synthèse d'esters de phloridzine ont été mesurés par transestérification en utilisant cette même enzyme (Enaud, 2004). C'est pourquoi, des essais sont menés afin d'étudier la capacité de l'AFE de *Humicola* sp. à synthétiser des esters de phloridzine en mode transestérification.

10 μmol de la phloridzine sont soit mélangés avec 50 μmol de férulate d'éthyle en présence de 5 ml de M_2B_2 préalablement déshydraté (α_w : 0,06), soit dissous dans 2 ml de cinnamate d'éthyle pendant 24 h à 50 °C. 50 mg de l'AFE de *Humicola* sp. sont alors introduits dans chaque milieu pour catalyser les réactions. Des prélèvements sont réalisés au cours du temps pendant 200 h et analysés par CLHP.

De nouveau, il n'y a pas de synthèse d'ester de phloridzine. Cela peut probablement être dû soit aux conditions réactionnelles utilisées, comme la présence du M_2B_2 , soit à un problème d'encombrement stérique empêchant l'accès au site actif de l'enzyme.

II.5. Effet du M_2B_2 sur la synthèse

Il ressort des résultats précédents que l'AFE de *Humicola* sp. est capable d'estérifier des acides hydroxycinnamiques avec des alcools. Par contre, aucune synthèse n'est réalisée en présence de M_2B_2 comme solvant. Ainsi, nous avons jugé nécessaire d'étudier l'effet du M_2B_2 sur l'enzyme en prenant comme exemple la synthèse du férulate d'éthyle.

Les essais sont réalisés en dissolvant 5 μ mol de l'acide férulique avec des quantités variables de M_2B_2 (200 μ l, 400 μ l) pendant 200 h à 50 °C. L'éthanol est ajouté respectivement (6000 μ mol, 2000 μ mol) en complétant le volume réactionnel jusqu'à 500 μ l. Ensuite les réactions sont initiées par l'ajout de 5 mg d'AFE de *Humicola* sp. Un essai est également mené sans ajout de M_2B_2 comme témoin. La figure 52 montre l'effet du M_2B_2 sur le déroulement de la synthèse du férulate d'éthyle.

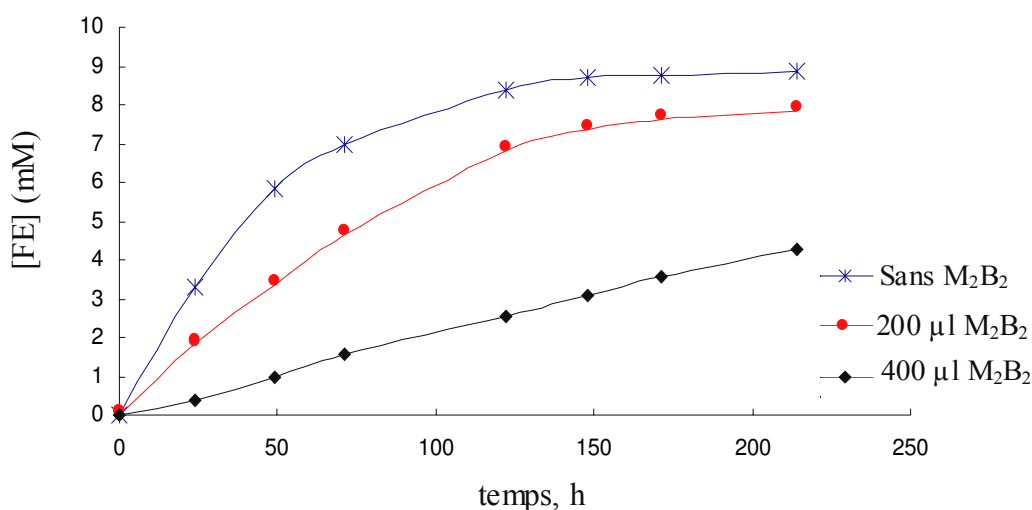


Fig. 52. Effet du M_2B_2 sur l'évolution de la réaction de synthèse du férulate d'éthyle (FE) en utilisant l'AFE de *Humicola* sp.

D'après la figure 52, le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre en présence du M_2B_2 est plus long que sans M_2B_2 . De plus le rendement de la synthèse dans un milieu contenant 400 μ l de M_2B_2 est deux fois moins important que celui obtenu sans M_2B_2 (40% contre 89%, **Tableau 33**).

En terme de vitesse réactionnelle, la présence de M_2B_2 affecte fortement la vitesse initiale de la synthèse du férulate d'éthyle (**Tableau 33**). La vitesse initiale de la réaction diminue d'environ deux ou dix fois en présence de 40% v/v (200 μ l) ou de 80% v/v (400 μ l) de M_2B_2 , respectivement. Cette diminution de la vitesse initiale de la synthèse peut être due à un effet dénaturant du M_2B_2 sur l'AFE de *Humicola* sp.

Tableau 33. Influence du M_2B_2 sur le rendement et la vitesse initiale de la synthèse du férulate d'éthyle par l'AFE de *Humicola* sp.

Pourcentage de M_2B_2	Rendement (%)	Vitesse initiale de la réaction (μ mol.h ⁻¹)
0	89	0,07
40%	80	0,04
80%	40	0,007

De nombreuses études ont déjà rapporté la faisabilité de la synthèse enzymatique de différents esters, dans le M_2B_2 comme solvant, avec plusieurs lipases telles que la lipase B immobilisée de *C. antarctica* (Enaud, 2004). La capacité de cette lipase à réaliser de très nombreuses synthèses dans le M_2B_2 pourrait être attribuée, entre autre, à une éventuelle stabilisation de l'enzyme par son immobilisation.

De plus, une étude menée par Jamrozik (2001), sur la synthèse d'oléyl-lysine dans l'hexane en utilisant l'Estérase[®] 18700, a déjà démontré une augmentation significative de la production de l'ester lors d'immobilisation de l'enzyme. Ces données nous laissent espérer de meilleurs résultats en synthèse d'esters phénoliques avec l'AFE de *Humicola* sp. immobilisée, dans des milieux plus appropriés que le M_2B_2 .

Conclusions et perspectives

Conclusions et perspectives

A l'heure actuelle, dans le domaine de la synthèse enzymatique des esters, les lipases sont, sans conteste, les meilleurs catalyseurs. Elles sont extrêmement résistantes à la chaleur, capables de travailler en milieu quasiment anhydre et elles acceptent de très nombreux substrats non lipidiques permettant ainsi la synthèse d'une multitude d'esters à structures très diversifiées comme en témoigne l'abondante littérature qui leur est consacrée. Cependant, il y a un domaine où ces enzymes sont inefficaces, c'est celui de la préparation des esters phénoliques, car la quasi totalité d'entre elles sont incapables de catalyser l'estérification des acides phénoliques des séries benzoïque et cinnamique. Ces esters ont pourtant de nombreuses propriétés, notamment anti-radicalaires, qui intéressent les industries pharmaceutiques, cosmétiques et agroalimentaires. On pourrait citer, parmi les molécules naturelles, les acides chlorogéniques, les pigments anthocyaniques polyacylés, les catéchines et épicatechines gallates, etc., sans compter les nouveaux esters qui pourraient être éventuellement obtenus par greffage enzymatique.

Tout ceci pour rappeler, que c'est, dans ce contexte, que nous avons défini notre travail de thèse avec pour objectifs la production et l'utilisation en synthèse, d'enzymes plus spécifiques des substrats aromatiques que les lipases, à savoir les acides féruliques estérases. Par rapport à ces objectifs, nous allons essayer de faire un bilan des principaux résultats obtenus et d'en tirer quelques pistes de recherche pour la poursuite de ce travail.

L'objectif principal de cette recherche était donc de parvenir à obtenir des quantités importantes de l'activité AFE soit en la faisant produire directement par des micro-organismes, soit en purifiant l'enzyme présente dans un mélange enzymatique commercial.

Production et purification de l'AFE de S. ambofaciens ATCC 23877

Nous nous sommes intéressés, dans un premier temps, à la production d'une AFE d'origine bactérienne. Les AFE sont pourtant plus connues chez les champignons mais notre choix s'est porté sur une bactérie car leurs AFE sont beaucoup moins étudiées.

En criblant plusieurs souches bactériennes, nous avons mis en évidence une activité AFE chez *S. ambofaciens* ATCC 23877, *L. fermentum* DSM 20052, *B. subtilis* ATCC 6633 et *B. licheniformis* CIP 5771, mais seule *S. ambofaciens* ATCC 23877 possédait une activité AFE extracellulaire. Pour cette raison notre travail s'est focalisé sur la production d'AFE par cette bactérie.

En raison de la nature inductible de l'AFE, plusieurs composés ont été testés afin d'induire sa synthèse (le son de blé désamidonné, le son de maïs désamidonné, le xylane d'avoine, la pectine de betterave, le tourteau de colza et le férulate d'éthyle).

Même si des productions constitutives de l'AFE sont constatées en absence de composés lignocellulosiques dans les milieux de culture, la présence de telles molécules entraîne une augmentation significative du niveau de la production de l'AFE. Ceci confirme la nécessité de la présence d'un composé lignocellulosique pour induire la synthèse de cette enzyme en quantité importante chez *S. ambofaciens* ATCC 23877.

La plus haute activité AFE a été mesurée lors de la culture avec 1% de son de blé désamidonné ou de xylane d'avoine comme inducteur. Il est à noter que les valeurs d'activité AFE mesurées pour *S. ambofaciens* ATCC 23877 sont proches de celles déjà obtenues dans le surnageant de culture d'un autre *Streptomyces*, *S. avermitilis* (Garcia *et al.*, 1998a).

L'AFE produite par *S. ambofaciens* ATCC 23877 est capable de libérer environ 60% p/p du total de l'acide férulique estérifié présent dans le son de blé. Cependant, aucune relation n'a pu être observée entre le niveau d'activité AFE produite et la richesse en acide férulique de l'inducteur utilisé.

Contrairement aux champignons (notamment *A. niger*), l'acide férulique n'a aucun rôle inducteur dans la synthèse de l'AFE chez *S. ambofaciens* ATCC 23877. Par contre, il montre un effet répressif sur cette synthèse à partir d'une concentration de 0,17 g/l. Ainsi, le mécanisme de cette induction chez *S. ambofaciens* ATCC 23877 reste pour le moment inconnu.

La culture en bioréacteur permet d'obtenir une production d'AFE trois fois plus importante qu'en fiole d'Erlenmeyer. Un maximum d'activité est obtenu après environ 14 h de culture, mais au-delà l'activité décroît. Cette diminution de l'activité peut être due à une instabilité de l'AFE produite et/ou à l'action hydrolytique de protéases produites éventuellement par *S. ambofaciens* ATCC 23877 au cours de la culture.

L'enzyme produite a été ensuite partiellement purifiée par des étapes successives de précipitation au sulfate d'ammonium, de dialyse et de passage sur colonne échangeuse d'anions. Après cette purification, plusieurs bandes sont encore visibles sur gel (SDS-PAGE) d'électrophorèse mais une est largement majoritaire. Elle correspond à une protéine d'environ 43 kDa, valeur proche de celles observées pour la plupart des AFE déjà identifiées. Cette bande pourrait correspondre à l'AFE de *S. ambofaciens* ATCC 23877. La séquence N-terminale de cette bande protéique est : **H₂N-A-R-I-Y-S-S-D-T-H-W-R-V-(E-K-W-I)-**. Malheureusement, la détermination de cette séquence N-terminale ne nous a pas encore permis d'identifier avec certitude le gène codant pour l'AFE de *S. ambofaciens* ATCC 23877. Par ailleurs, à l'issue de la purification, il nous a fallu constater que l'activité AFE récupérée était trop faible pour pouvoir être utilisée ultérieurement en synthèse. De plus, l'enzyme semble être particulièrement sensible à la congélation ce qui rend difficile sa conservation.

Au vu de ces résultats, il apparaît clairement que *S. ambofaciens* ATCC 23877 est certes capable de produire une activité AFE mais que la production, en quantité importante, de cette enzyme passera nécessairement par l'identification de son gène codant puis par son clonage.

Pour la suite de ce travail, nous nous sommes tournés vers une AFE de champignon, celle de *Humicola* sp. plus disponible car présente, avec une forte activité, dans un mélange enzymatique commercial, le DepolTM 740L.

Nous sommes parvenus à purifier partiellement cette enzyme par précipitation à l'acétone et par chromatographie d'échange d'ions, ce qui nous a permis de la comparer à celle de *S. ambofaciens* ATCC 23877.

Comparaison entre l'AFE de S. ambofaciens ATCC 23877 et celle de Humicola sp.

L'activité spécifique AFE de *Humicola* sp. (0,5 U/mg de protéines) est 625 fois plus forte que l'activité obtenue avec *S. ambofaciens* ATCC 23877 (0,8 mU/mg de protéines).

L'AFE de *Humicola* sp. n'est pas retenue dans les colonnes échangeuses d'ions, alors que celle de *S. ambofaciens* ATCC 23877 est retenue dans la colonne échangeuse d'anions. Ces résultats suggèrent que les deux AFE sont d'une structure différente, mais cela reste à approfondir.

Comme la plupart des AFE déjà caractérisées dans la littérature, les deux AFE étudiées lors de ce travail sont plus actives à des valeurs de pH proches de 7 et pour des températures comprises entre 40 et 50 °C.

Les deux AFE hydrolysent les esters méthyliques des acides cinnamique, *p*-coumarique et férulique mais seule l'AFE de *Humicola* sp. est active vis-à-vis du caféate de méthyle et surtout des esters méthyliques de certains acides benzoïques. Il n'y a donc pas de spécificité stricte pour l'acide férulique et le nom « d'acide férulique estérase », pourtant consacré par la littérature, est inadapté.

Enfin, les deux AFE sont surtout actives sur des esters cinnamiques ayant de courtes chaînes latérales alcooliques. La présence de plus longues chaînes alcooliques réduit (cas de l'AFE de *Humicola* sp.), voire annule complètement l'activité enzymatique (cas de l'AFE de *S. ambofaciens* ATCC 23877).

Synthèse d'esters phénoliques par l'AFE de *Humicola* sp.

L'AFE de *Humicola* sp. catalyse la synthèse d'esters de l'acide férulique, tels que les férulates d'éthyle, de butyle et de glycérol, en milieu aqueux, mais le meilleur rendement de synthèse du férulate d'éthyle est obtenu en absence d'eau initiale.

L'AFE de *Humicola* sp. est plus spécifique des alcools à courte chaîne. De plus, la plus haute activité synthétique de l'AFE est obtenue si le cycle aromatique de l'acide utilisé n'est pas substitué ou seulement substitué par des groupements hydroxyles. Par contre, la présence de groupements méthoxyles rend l'enzyme moins active. Ce profil de spécificité est relativement similaire à celui obtenu précédemment en hydrolyse.

Ces résultats sont importants car ils montrent que, contrairement aux lipases, l'AFE de *Humicola* sp. accepte comme substrat la plupart des acides phénoliques de la série cinnamique. Cela laisse présager la possibilité de synthétiser d'autres esters aromatiques.

Par contre, l'acylation des sucres comme l'arabinose ou le glucose de la phloridzine par l'acide cinnamique ou l'acide férulique dans un milieu non aqueux (M_2B_2) s'est montrée infructueuse dans nos conditions expérimentales. Le solvant semble être néfaste pour l'AFE de *Humicola* sp. Cet échec, notamment avec l'arabinose, est surprenant car le férulate d'arabinose est un substrat naturel des AFE en hydrolyse.

Précisons, cependant, qu'au cours de ce travail, nous n'avons pas eu le temps d'étudier l'influence des paramètres réactionnels comme l'immobilisation de l'enzyme, la nature du solvant, l'activité d'eau, l'activation des substrats, etc., qui peuvent être parfois déterminants pour favoriser ou non la synthèse.

Pour conclure, il faut insister sur le fait qu'avec ces premiers résultats, nous n'avons fait qu'aborder, superficiellement, les potentialités des AFE en synthèse mais que ces potentialités apparaissent, pourtant, bien réelles. Il reste donc beaucoup de travail à accomplir pour améliorer nos connaissances concernant ces estérases à l'instar de ce qui a été effectué pour les lipases.

Annexe

Séquence du gène codant pour SAMR0248

ATGAGCCCCG	TCCTCGCCGG	CGTGCTCCAG	CTGCTCGCGC
TCATAGCGGC	GCTGGCGCTC	GCCTACGTCC	CCCTCGGCAA
CTACATGGCC	AGGGCCTACT	CCTCCGACAC	GCACTGGCGC
GTGGAGAAGT	GGATCTACAA	GGGCATCGGT	GCCGACCCGG
ACACAGAGAT	GCGCTGGCCC	GCGTACCTGC	GCGGCGTCCT
CGCCTTCTCC	CTCGCCGGAG	TCCTCTTCCT	CTACCTGCTC
CAGCGGCTCC	AGGGCGTGCT	GCCCGGCTCG	CTGGGGTTTCG
CCTCCATCGA	CCCGGACCAG	GCGTTCAACA	CCGCCGCGTC
CTTCGTGGCC	AACACCAACT	GGCAGTCGTA	CTACGGCGAG
CAGGCCATGG	GCCACGTCGT	GCAGACCGCC	GGGCTTGCCG
TGCAGAACTT	CGTCTCGGCC	GCCGTCGGCA	TCGCCGTGGC
CGTCGCCCTC	GTCCGCGGCT	TCGCTCGGTC	CCGCACCGGT
GAAGTCGGCA	ACTTCTGGGC	GGACCTGGTC	CGCGGTGTCG
TCCGCGTCCT	GGTGCCCATC	GCCGTGGTCG	GCGCGTTGAT
CCTGGTGGCC	TGCGGGGTCA	TCCAGAACTT	CTCCGGCATC
CACGAGGTCG	GACAGTTCAT	GGGCGGCACG	CAGCAGTGGA
ACGGCGGCGC	TGTGGCCTCC	CAGGAGGTCA	TCAAGGAGCT
GGGCACCAAC	GGGGGCGGCT	ACTTCAACGC	CAACTCCGCC
CACCCCTTCG	AGAACCCAC	CCCGTTCACC	AACCTCTTCG
AGATCTTTCT	GATCCTGGTC	ATCCCGGTCG	CCCTGACCCG
GACCTTCGGT	GTCATGGTCG	GCTCGGTCCG	CCAGGGTCAC
GCGATCCTCG	CGACCATGGG	CACCATCTGG	GTCGGCTTCG
TCGCCCTGAT	GATGTGGACC	GAGTTCGCCC	ATCACGGCCC
GGCGCTGCAG	GCGGCCGGGG	GCGCGATGGA	GGGCAAGGAG
CTGCGCTTCG	GCATCGGCGG	CTCGTCGATC	TTCGCGGTGT
CGACCACCCT	GACTTCCACC	GGCGCCGTGG	ACTCCTTCCA
CTCCTCCTAC	ACCGGCCTGG	GGGGCGGCAT	CACCATGCTC
GGCATGATGC	TGGGCGAGAT	CGCGCCGGGC	GGTGTGGGCT
CCGGTCTCTA	CGGCATGCTG	GTCATGGCGG	TCATCGCGGT
GTTTCATCGCC	GGTCTGATGG	TCGGCCGCAC	CCCCGAGTAC

CTGGGCAAGA	AGATCGGCAC	CCGCGAGATC	AAGTTCGCGG
CCCTCTACAT	CCTCATCACG	CCCGCCCTGG	TCCTGGTCCT
CACCGCCGCC	GCCATGGCCC	TGCCGACCCC	GGGCAACTCG
ATGACCAACA	GCGGGGCGCA	CGGATTCTCC	GAGATCCTCT
ACGCCTACAC	GTCGGCCTCG	AACAACAACG	GCTCCGCCTT
CGCCGGCCTG	AACGCCGACA	CGCAGTGGTT	CAACAGCACC
CTCGGCCTCG	CCATGCTCCT	CGGCCGCTTC	CTGCCGATGG
TGTTCGTCCT	GGCGCTCGCC	GGCTCGCTGG	CCGAGCAGAA
ACCGGTCCCC	GCCACCGCGG	GCACCCTGCG	CACCGAGAAG
CCGCTGTTCA	CCGGCCTGCT	GGCGGGCGCC	ATCCTCATCA
TCACCGGTCT	GACGTACTTC	CCGGCACTCG	CGCTGGGCCC
GCTCGCCGAA	GGA CTGGCGG	CATGA	

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abou El Hassan M.A.I., Touw D.J., Wilhelm A.J., Bast A., van der Vijgh W.J.F.** Stability of monoHER in an aqueous formulation for *i.v.* administration. *International Journal of Pharmaceutics* 211 (2000) 51-56.
- Aliwan F.O., Kroon P.A., Faulds C.B., Pickersgill R., Williamson G.** Ferulic acid esterase-III from *Aspergillus niger* does not exhibit lipase activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79 (1999) 457-459.
- Amanullah A., Justen P., Davies A., Paul G.C., Nienow A.W., Thomas C.R.** Agitation induced mycelial fragmentation of *Aspergillus oryzae* and *Penicillium chrysogenum*. *Biochemical Engineering Journal* 5 (2000) 109-114.
- Andersch P., Berger M., Hermann J., Laumen K., Lobell M., Seemayer R., Waldinger C., Schneider M.P.** Ester synthesis via acyl transfer. In *Methods in enzymology ; Lipases, part B. Enzymes characterization and utilisation*, 286 (1997). Edited by B. Rubin and E.A. Dennis: Academic Press.
- Andreasen M.F., Kroon P.A., Williamson G., Garcia-Conesa M.T.** Esterase activity able to hydrolyze dietary antioxidant hydroxycinnamates is distributed along the intestine of mammals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (2001) 5679-5684.
- Armesto N., Ferrero M., Fernandez S., Gotor V.** Novel Enzymatic Synthesis of 4-*O*-Cinnamoyl Quinic and Shikimic Acid Derivatives. *Journal of Organic Chemistry* 68 (2003) 5784-5787.
- Arora A., Nain L., Gupta J.K.** Solid-state fermentation of wood residues by *Streptomyces griseus* B1, a soil isolate, and solubilization of lignins. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 21 (2005) 303-308.
- Aziz N.H., Farag S.E., Mousa L.A.A., Abo-Zaid M.A.** Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. *Microbios.* 93 (1998) 43-54.
- Bartling K., Thompson J.U.S., Pfromm P.H., Czermak P., Rezac M.E.** Lipase-catalysed synthesis of geranyl acetate in *n*-hexane with membrane-mediated water removal. *Biotechnology and Bioengineering* 75 (2001) 505-509.
- Bartolomé B., Faulds C.B., Tuohy M., Hazlewood G.P., Gilbert H.J., Williamson G.** Influence of different xylanases on the activity of ferulic acid esterase on wheat bran. *Biotechnology and applied Biochemistry* 22 (1995) 65-73.
- Bartolomé B., Gómez-Cordovés C., Sancho A.I., Diez N., Ferreira P., Soliveri J., Copa-Patiño J.L.** Growth and release of hydroxycinnamic acids from Brewer's spent grain by *Streptomyces avermitilis* CECT 3339. *Enzyme and Microbial Technology* 32 (2003) 140-144.
- Bentley S.D., Chater K.F., Cerdano-Tarraga A.M., Challis G.L., Thomson N.R., James K.D., Harris D.E., Quail M.A., Kieser H., Harper D., Hopwood D.A.** Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 417 (2002) 141-147.

- Bhat M.K.** Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances* 18 (2000) 353-383.
- Borg P., Binet C., Girardin M., Rovel B., Barth D.** Enzymatic synthesis of triicosapentaenoylglycerol in a solvent-free medium. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 11 (2001) 835-840.
- Borneman W.S., Hartley R.D., Morrison W.H., Akin D.E., Ljungdahl L.G.** Feruloyl and *p*-coumaroyl esterase from anaerobic fungi in relation to plant cell wall degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 33 (1990) 345-351.
- Borneman W.S., Ljungdahl L.G., Hartley R.D., Akin D.E.** Isolation and characterisation of *p*-coumaroyl esterase from the anaerobic fungus *Neocallimastix* strain MC-2. *Applied and Environmental Microbiology* 57 (1991) 2337-2344.
- Borneman W.S., Ljungdahl L.G., Hartley R.D., Akin D.E.** Purification and partial characterization of two feruloyl esterases from anaerobic fungus *Neocallimastix* strain MC-2. *Applied and Environmental Microbiology* 58 (1992) 3762-3766.
- Bornscheuer U.T.** Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiology Reviews* 26 (2002) 73-81.
- Bourquelot E., Bridel M.** Synthèse des glycosides d'alcools à l'aide de l'émulsine et réversibilité des actions fermentaires. *Annales de chimie et de physique* 29 (1913) 145-218.
- Brézillon C., Kroon P.A., Faulds C.B., Brett G.M., Williamson G.** Novel ferulic acid esterases are induced by growth of *Aspergillus niger* on sugar-beet pulp. *Applied Microbiology and Biotechnology* 45 (1996) 371-376.
- Buisman G.H., Van Helteren C.W., Kramer G.H., Veldsink J.W., Derksen J.P., Cuperus F.P.** Enzymatic esterifications of functionalized phenols for the synthesis of lipophilic antioxidants. *Biotechnology Letters* 20 (1998) 131-136.
- Cao Y., Tan H.** Effects of cellulase on the modification of cellulose. *Carbohydrate Research* 337 (2002) 1291-1296.
- Castanares A., McCrae S.I., Wood T.M.** Purification and properties of a feruloyl / *p*-coumaroyl esterase from the fungus *Penicillium pinophilum*. *Enzyme and Microbial Technology* 14 (1992) 875-884.
- Cernia E., Palocci C.** Lipases in supercritical fluids. In *Methods in enzymology ; Lipases, part B. Enzymes characterization and utilisation*, 286 (1997). Edited by B. Rubin and E.A. Dennis: Academic Press.
- Cherry J.R., Fidantsef A.L.** Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Current Opinion in Biotechnology* 14 (2003) 438-443.
- Christgau S., Kofod L.V., Halkier T., Anderson L.N., Hockauf M., Ddorreich K., Dalboge H., Kauppinen S.** Pectin methyl esterase from *Aspergillus aculeatus*: expression cloning in yeast and characterization of the recombinant enzyme. *Biochemical Journal* 319 (1996) 705-712.
- Christov L.P., Prior B.A.** Esterase of xylan-degrading microorganisms: Production, properties, and significance. *Enzyme and Microbial Technology* 15 (1993) 460-475.

- Claessen D.** Structural proteins involved in morphological differentiation of Streptomycetes (2004). Thesis, Rijksuniversiteit Groningen.
- Coghe S., Benoot K., Delvaux F., Vanderhaegen B., Delvaux F.R.** Ferulic Acid Release and 4-Vinylguaiacol Formation during Brewing and Fermentation: Indications for Feruloyl Esterase Activity in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52 (2004) 602-608.
- Colquhoun J.A., Mexon J., Goodfellow M., Ward A.C., Horikoshi K., Bull A.T.** Novel rhodococci and other mycolate actinomycetes from the deep sea. Antonie van Leeuwenhoek 74 (1998) 27-40.
- Compton D.L., Laszlo J.A., Berhow M.A.** Lipase-catalyzed synthesis of ferulate esters. Journal of the American Oil Chemists' Society 77 (2000) 513-519.
- Corvini P.F.X.** Etude physiologique de *Streptomyces pristinaespiralis* producteur de pristinamycines : Activité enzymatiques du métabolisme central et mesure du pH intracellulaire (2000). Thèse de doctorat, ENSAIA-INPL, Nancy, France.
- Coulon D., Girardin M., Rovel B., Ghoul M.** Comparison of direct esterification and transesterification of fructose by *Candida antarctica* lipase. Biotechnology Letters 16 (1995) 183-186.
- Coulon D., Ismail A., Girardin M., Rovel B., Ghoul M.** Effect of different biochemical parameters on the enzymatic synthesis of fructose oleate. Journal of Biotechnology 51 (1996) 115-121.
- Coulon D., Girardin M., Engasser J.M., Ghoul M.** Investigation of keys parameters of fructose oleate enzymatic synthesis catalysed by an immobilized lipase. Industrial Crops and Products 6 (1997) 375-381.
- Crepin V.F., Faulds C.B., Connerton I.F.** A non-modular Type-B Feruloyl Esterase from *Neurospora crassa* Exhibits Concentration-Dependent Substrate Inhibition. Biochemical Journal 370 (2003a) 417-427.
- Crepin V.F., Faulds C.B., Connerton I.F.** Production and characterisation of the *Talaromyces stipitatus* feruloyl esterase FAEC in *Pichia pastoris*: identification of the nucleophilic serine. Protein Expression and Purification 29 (2003b) 176-184.
- Crepin V.F., Faulds C.B., Connerton I.F.** Functional classification of the microbial feruloyl esterases. Applied Microbiology and Biotechnology 63 (2004) 647-652.
- Dalrymple B.P., Swadling Y., Cybinski D.H., Xue G.** Cloning of a gene encoding cinnamoyl ester hydrolase from the ruminal bacterium *Butyrivibrio fibrisolvens* E14 by a novel method. FEMS Microbiology Letters 143 (1996) 115-120.
- Dalrymple B.P., Swadling Y.** Expression of a *Butyrivibrio fibrisolvens* E14 gene (cinB) encoding an enzyme with cinnamoyl ester hydrolase activity is negatively regulated by the product of an adjacent gene (cinR). Microbiology 143 (1997) 1203-1210.
- Damaso M.C.T., Almeida M.S., Kurtenbach E., Martins O.B., Pereira N., Andrade C.M.M.C., Albano R.M.** Optimized expression of a thermostable xylanase from *Thermomyces lanuginosus* in *Pichia pastoris*. Applied and Environmental Microbiology 69 (2003) 6064-6072.

- Danieli B., Bertario A., Carrea G., Redigolo B., Secundo F., Riva S.** Chemo-enzymatic synthesis of 6''-O-(3-arylprop-2-enoyl) derivatives of the flavonol glucoside isoquercitrin. *Helvetica Chimica Acta* 76 (1993) 2981.
- Daza A., Martin J.F., Dominguez A., Gil J. A.** Sporulation of several species of *Streptomyces* in submerged cultures after nutritional downshift. *Journal of General Microbiology* 135 (1989) 2483-2491.
- De Man J.C., Rogosa M., Sharpe M.E.** A Medium for the Cultivation of Lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology* 23 (1960) 130-135.
- Deobald L.A., Crawford D.L.** Activities of cellulase and other extracellular enzymes during lignin solubilization by *Streptomyces viridosporus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 26 (1987) 158-163.
- De Oliveira P.C., Alves G.M., De Castro H.F.** Immobilisation studies and catalytic properties of microbial lipase onto styrenedivinylbenzene copolymer. *Biochemical Engineering Journal* 5 (2000) 63-71.
- De Vries R.P., Michelsen B., Poulsen C.H., Kroon P.A., Van Den Heuvel R., Faulds C.B., Williamson G., Van Den Hombergh J., Visser J.** The *faeA* Genes from *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubingensis* Encode Ferulic Acid Esterase Involved in Degradation of Complex Cell Wall Polysaccharides. *Applied and Environmental Microbiology* 63 (1997) 4638-4644.
- De Vries R.P., Poulsen C.H., Madrid S., Visser J.** *aguA*, the gene encoding an extracellular α -glucuronidase from *Aspergillus tubingensis*, is specifically induced on xylose and not on glucuronic acid. *Journal of Bacteriology* 180 (1998) 243-249.
- De Vries R.P., Visser J.** Regulation of the Feruloyl Esterase (*faeA*) Gene from *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (1999) 5500-5503.
- De Vries R.P., Faulds C.B., Visser J.** The *faeA* gene from *Aspergillus niger* encoding a feruloyl esterase with activity on xylan and pectin is subject to a complex system of regulation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79 (1999a) 443-446.
- De Vries R.P., Visser J., De Graaff L.H.** CreA modulates the XlnR-induced expression on xylose of *Aspergillus niger* genes involved in xylan degradation. *Research in Microbiology* 150 (1999b) 281-285.
- De Vries R.P., Kester H.C.M., Poulsen C.H., Benen J.A.E., Visser J.** Synergy between enzymes from *Aspergillus* involved in the degradation of plant cell wall polysaccharides. *Carbohydrate Research* 327 (2000) 401-410.
- De Vries R.P., vanKuyk P.A., Kester H.C., Visser J.** The *Aspergillus niger faeB* gene encodes a second feruloyl esterase involved in pectin and xylan degradation and is specifically induced in the presence of aromatic compounds. *Biochemical Journal* 363 (2002) 377-386.
- Donaghy J., McKay A. M.** Purification and characterization of feruloyl esterase from the fungus *Penicillium expansum*. *Journal of Applied Microbiology* 83 (1997) 718-726.
- Donaghy J., Kelly P.F., McKay A.M.** Detection of ferulic acid esterase production by *Bacillus* spp. and lactobacilli. *Applied Microbiology and Biotechnology* 50 (1998) 257-260.

- Donaghy J.A., Kelly P.F., McKay A.** Conversion of ferulic acid to 4-vinyl guaiacol by yeasts isolated from unpasteurised apple juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79 (1999) 453-456.
- Donaghy J.A., Bronnenmeier K., Soto-Kelly P.F., McKay A.M.** Purification and characterization of an extracellular feruloyl esterase from the thermophilic anaerobe *Clostridium stercorarium*. *Journal of Applied Microbiology* 88 (2000) 458-466.
- Drouin J.F.** Analyse d'image en biotechnologie. Quantification de la morphologie de micro-organismes filamenteux au cours de fermentations et suivi de la croissance de cellules animales sur microporteurs au cours de cultures (1996).Thèse de doctorat, ENSAIA-INPL, Nancy, France.
- Enaud E.** Fonctionnalisation enzymatique de composés phénoliques: synthèse d'esters aromatiques de flavonoïdes glycosylés catalysées par la lipase B de *Candida antarctica* (2004). Thèse de doctorat, ENSAIA-INPL, Nancy, France.
- Eriksson T., Börjesson J., Tjerneld F.** Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Enzyme and Microbial Technology* 31 (2002) 353-364.
- Farag A.M., Hassan M.A.** Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme and Microbial Technology* 34 (2004) 85-93.
- Faulds C.B., Williamson G.** The purification and characterization of 4-hydroxy-3-methoxycinnamic (ferulic) acid esterase from *Streptomyces olivochromogenes*. *Journal of General Microbiology* 137 (1991) 2339-2345.
- Faulds C.B., Williamson G.** Ferulic acid esterase from *Aspergillus niger*: purification and partial characterization of two forms from a commercial source of pectinase. *Biotechnology and applied Biochemistry* 17 (1993) 349-359.
- Faulds C.B., Williamson G.** Purification and characterization of a ferulic acid esterase (FAE-III) from *Aspergillus niger*: specificity for the phenolic moiety and binding to microcrystalline cellulose. *Microbiology* 140 (1994) 779-787.
- Faulds C.B., Kroon P.A., Saulnier L., Thibault J.F., Williamson G.** Release of ferulic acid from maize bran and derived oligosaccharides by *Aspergillus niger* esterases. *Carbohydrate Polymers* 27 (1995) 187-190.
- Faulds C.B., DE Vries R.P., Kroon P.A., Visser J., Williamson G.** Influence of ferulic acid on the production of feruloyl esterases by *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiology Letters* 157 (1997) 239-244.
- Faulds C.B., Williamson G.** Effect of hydroxycinnamates and benzoates on the production of feruloyl esterase by *Aspergillus niger*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79 (1999) 450-452.
- Faulds C.B., Zanichelli D., Crepin V.F., Connerton I.F., Juge N., Bhat M.K., Waldron K.W.** Specificity of feruloyl esterases for water-extractable and water-unextractable feruloylated polysaccharides: influence of xylanase. *Journal of Cereal Science* 38 (2003) 281-288.

- Faulds C.B., Mandalari G., Lo Curto R.B., Bisignano G., Christakopoulos P., Waldron K.W.** Synergy between xylanases from glycoside hydrolase family 10 and family 11 and a feruloyl esterase in the release of phenolic acids from cereal arabinoxylan. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71 (2006) 622-629.
- Fenton T.W., Leung J., Clandinin D.R.** Phenolic components of rapeseed meal. *Journal of Food Science* 45 (1980) 1702-1705.
- Ferreira L.M.A., Wood T.M., Williamson G., Faulds C., Hazlewood G.P., Black G.W., Gilbert H.J.** A modular esterase from *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa* contains a noncatalytic cellulose-binding domain. *Biochemical Journal* 294 (1993) 349-355.
- Ferreira P., Diez N., Gutiérrez C., Soliveri J., Copa-Patiño J.L.** *Streptomyces avermitilis* CECT 3339 produces a ferulic acid esterase able to release ferulic acid from sugar beet pulp soluble feruloylated oligosaccharides. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79 (1999) 440-442.
- Ferreira P., Diez N., Faulds C.B., Soliveri J., Copa-Patiño J.L.** Release of ferulic acid and feruloylated oligosaccharides from sugar beet pulp by *Streptomyces tendae*. *Bioresource Technology* 98 (2007) 1522-1528.
- Fillingham I.J., Kroon P.A., Williamson G., Gilbert H.J., Hazlewood G.P.** A modular cinnamoyl ester hydrolase from the anaerobic fungus *Piromyces equi* acts synergistically with xylanase and is part of a multiprotein cellulose-binding cellulase-hemicellulase complex. *Biochemical Journal* 343 (1999) 215-224.
- Fregapane G., Sarney D.B., Vulfson E.N.** Enzymatic solvent free synthesis of sugar acetal fatty acid esters. *Enzyme and Microbial Technology* 13 (1991) 796-800.
- Garcia B.L., Ball A.S., Rodriguez J., Pérez-Leblic M.I., Arias M.E., Copa-Patiño J.L.** Induction of ferulic acid esterase and xylanase activities in *Streptomyces avermitilis* UAH30. *FEMS Microbiology Letters* 158 (1998a) 95-99.
- Garcia B.L., Ball A.S., Rodriguez J., Pérez-Leblic M.I., Arias M.E., Copa-Patiño J.L.** Production and characterisation of ferulic acid esterase activity in crude extracts by *Streptomyces avermitilis* CECT 3339. *Applied Microbiology and Biotechnology* 50 (1998b) 213-218.
- Garcia-Conesa M., Crepin V.F., Goldson A.J., Williamson G., Cummings N.J., Connerton I.F., Faulds C.B., Kroon P.A.** The feruloyl esterase system of *Talaromyces stipitatus*: production of three discrete feruloyl esterases, including a novel enzyme, TsFaeC, with a broad substrate specificity. *Journal of Biotechnology* 108 (2004) 227-241.
- Gassel M., Siebers A., Epstein W., Altendorf K.** Assembly of the Kdp complex, the multi-subunit K⁺-transport ATPase of *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1415 (1998) 77-84.
- Giuliani S., Piana C., Setti L., Hochkoeppler A., Pifferi P.G., Williamson G., Faulds C.B.** Synthesis of pentylferulate by a feruloyl esterase from *Aspergillus niger* using water-in-oil microemulsions. *Biotechnology Letters* 23 (2001) 325-330.
- Giusti M.M., Wrolstad R.E.** Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochemical Engineering Journal* 14 (2003) 217-225.

- Grabber J.H., Ralph J., Hatfield R.D.** Ferulate cross-links limit the enzymatic degradation of synthetically lignified primary walls of maize. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46 (1998) 2609- 2614.
- Graf E.** Antioxidant potential of ferulic acid. *Free Radical Biology and Medicine* 13 (1992) 435-448.
- Guillon F., Thibault J.F.** Enzymic hydrolysis of the "hairy" fragments of sugarbeet pectins. *Carbohydrate Research* 190 (1989) 97-108.
- Gust B., Challis G.L., Fowler K., Kieser T., Chater K.F.** Gene replacement by PCR targeting in *Streptomyces* and its use to identify a protein domain involved in the biosynthesis of the sesquiterpene odor geosmin. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 100 (2003) 1541-1546.
- Guyot B., Bosquette1 B., Pina M., Graille J.** Esterification of phenolic acids from green coffee with an immobilized lipase from *Candida antarctica* in solvent-free medium. *Biotechnology Letters* 19 (1997) 529-532.
- Habulin M., Krmelj V., Knez Z.** Synthesis of oleic-acid esters catalyzed by immobilized lipase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44 (1996) 338-342.
- Hari Krishna S.** Development and trends in enzyme catalysis in nonconventional media. *Biotechnology Advances* 20 (2002) 239-267.
- Hecht H.J., Sobek H., Haag T., Pfeifer O., van Pée K.H.** The metal-ion-free oxidoreductase from *Streptomyces aureofaciens* has an α/β hydrolase fold. *Nature Structural Biology* 1 (1994) 532-537.
- Henrissat B., Davies G.** Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Current Opinion in Structural Biology* 7 (1997) 637-644.
- Hernandez M., Hernandez-Coronado M.J., Montiel M.D., Rodriguez J., Pérez M.I., Bocchini P., Galletti G.C., Arias M.E.** Pyrolysis/gas chromatography/mass spectrometry as a useful technique to evaluate the ligninolytic action of streptomycetes on wheat straw. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 58-59 (2001) 539-551.
- Hill A.C.** Reversible zymohydrolysis. *Journal of Chemical Society* 73 (1898) 634-658.
- Hopwood D.A., Kieser T., Wright H.M., Bibb M.J.** Plasmids recombination and chromosome mapping in *Streptomyces lividans* 66. *Journal of General Microbiology* 129 (1983) 2257-2269.
- Humeau C.** Synthèse enzymatique du palmitate d'ascorbyle. Application à la synthèse d'esters d'acide L-ascorbique et de lipides polyinsaturés hautement oxydables (1998). Thèse de doctorat, ENSAIA-INPL, Nancy, France.
- Humeau C., Girardin M., Rovel B., Miclo A.** Effect of the thermodynamic water activity and the reaction medium hydrophobicity on the enzymatic synthesis of ascorbyl palmitate. *Journal of Biotechnology* 63 (1998) 1-8.
- Ishii T.** Structure and functions of feruloylated polysaccharides. *Plant Science* 127 (1997) 111-127.

- Jamrozik C.** Mise en œuvre d'enzymes hydrolytiques pour l'acylation de la lysine par des acides gras en milieu organique (2001). Thèse de doctorat, ENSAIA-INPL, Nancy, France.
- Johnson K.G., Harrison B.A., Schneider H., MacKenzie C.R., Fontana J.D.** Xylan-hydrolysing enzymes from *Streptomyces* spp. Enzyme and Microbial Technology 10 (1988) 403-409.
- Johnson K.G., Silva M.C., MacKenzie C.R., Schneider H., Fontana J.D.** Microbial degradation of hemicellulosic materials. Applied Biochemistry and Biotechnology 20-21 (1989) 245-258.
- Juge N., Williamson G., Puigserver A., Cummings N.J., Connerton I.F., Faulds C.B.** High-level production of recombinant *Aspergillus niger* cinnamoyl esterase (FAEA) in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. FEMS Yeast Research 1 (2001) 127-132.
- Kaneko M., Ohnishi Y., Horinouchi S.** Cinnamate: Coenzyme A Ligase from the Filamentous Bacterium *Streptomyces coelicolor* A3(2). Journal of Bacteriology 185 (2003) 20-27.
- Karra-Chaabouni M., Pulvin S., Touraud D., Thomas D.** Enzymatic synthesis of geraniol in a solvent-free system by lipases. Biotechnology Letters 18 (1996) 1083-1088.
- Kastle J.H., Loevenhart A.S.** Concerning lipase, the fat-splitting enzyme, and the reversibility of its action. Am. Chem. J. 24 (1900) 491-525.
- Kendrick K.E., Ensign J.C.** Sporulation of *Streptomyces griseus* in submerged culture. Journal of Bacteriology 155 (1983) 357-366
- Khmelnitsky Y.L., Hilhorst R., Veeger C.** Detergentless microemulsions as media for enzymatic reactions. European Journal of Biochemistry 176 (1988) 265-271.
- Kiiskinen L.L., Kruus K., Bailey M., Ylosmaki E., Siika-aho M., Saloheimo M.** Expression of *Melanocarpus albomyces* laccase in *Trichoderma reesei* and characterization of the purified enzyme. Microbiology 150 (2004) 3065-3074.
- Kikuzaki H., Hisamoto M., Hirose K., Akiyama K., Taniguchi H.** Antioxidant Properties of Ferulic Acid and Its Related Compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50 (2002) 2161-2168.
- Kim K.W., Song B., Choi M.Y., Kim M.J.** Biocatalysis in ionic liquids: markedly enhanced enantioselectivity of lipase. Organic Letters 3 (2001) 1507-1509.
- Koreishi M., Zhang D., Imanaka H., Imamura K., Adachi S., Matsuno R., Nakanishi K.** A Novel Acylase from *Streptomyces mobaraensis* that Efficiently Catalyzes Hydrolysis/Synthesis of Capsaicins as Well as N-Acyl-L-amino Acids and N-Acyl-peptides. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54 (2006) 72-78.
- Kormelink F.J.M., Voragen A.G.J.** Degradation of different[(glucurono)arabino]xylans by combination of purified xylan-degrading enzymes. Applied Microbiology and Biotechnology 38 (1993) 688-695.
- Kroon P.A., Williamson G.** Release of ferulic acid from sugar-beet pulp by using arabinase, arabinofuranosidase and an esterase from *Aspergillus niger*. Biotechnology and applied Biochemistry 23 (1996) 263-267.

- Kroon P.A., Faulds C.B., Williamson G.** Purification and characterization of a novel esterase induced by growth of *Aspergillus niger* on sugar-beet pulp. *Biotechnology and applied Biochemistry* 23 (1996) 255-262.
- Kroon P.A., Faulds C.B., Brézillon C., Williamson G.** Methyl phenylalkanoates as substrates to probe the active sites of esterases. *European Journal of Biochemistry* 248 (1997) 245-251.
- Kroon P.A., Garcia-Conesa M.T., Fillingham I.J., Hazlewood G.P., Williamson G.** Release of ferulic acid dehydrodimers from plant cell walls feruloyl esterases. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79 (1999) 428-434.
- Kroon P.A., Williamson G., Fish N.M., Archer D.B., Belshaw N.J.** A modular esterase from *Penicillium funiculosum* which releases ferulic acid from plant cell walls and binds crystalline cellulose contains a carbohydrate binding module. *European Journal of Biochemistry* 267 (2000) 6740-6752.
- Lam T.B.T., Iiyama K., Stone B.A.** Cinnamic acid bridges between cell wall polymers in wheat and phalaris internodes. *Phytochemistry* 31 (1992) 1179-1183.
- Lam T.B.T., Iiyama K., Stone B.A.** An approach to the estimation of ferulic acid bridges in unfractionated cell walls of wheat internodes. *Phytochemistry* 37 (1994) 327-333.
- Lamare S., Legoy M.D.** Biocatalysis in gas phase. *Trends in Biotechnology* 11 (1993) 413-418.
- Lamare S., Lortie R., Legoy M.D.** Kinetic studies of *Fusarium solani pisi* cutinase used in a gas/solid system: transesterification and hydrolysis reactions. *Biotechnology and Bioengineering* 56 (1996) 1-8.
- Li K., Azadi P., Collins R., Tolan J., Kim J.S., Eriksson K.E.L.** Relationships between activities of xylanases and xylan structures. *Enzyme and Microbial Technology* 27 (2000) 89-94.
- Ma L., Persson M., Adlercreutz P.** Water activity dependence of lipase catalysis in organic media explains successful transesterification reaction. *Enzyme and Microbial Technology* 31 (2002) 1024-1029.
- MacKenzie C.R., Bilous D., Johnson K.G.** Purification and characterization of an exoglucanase from *Streptomyces flavogriseus*. *Canadian Journal of Microbiology* 30 (1984) 1171-1178.
- MacKenzie C.R., Bilous D., Schneider H., Johnson K.G.** Induction of Cellulolytic and Xylanolytic Enzyme Systems in *Streptomyces* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 53 (1987) 2835-2839.
- Madeira-Lau R., Rantwijk F., Seddon K.R., Seldon R.A.** Lipase-catalysed reactions in ionic liquids. *Organic Letters* 2 (2000) 4189-4191.
- Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J.** Brock biology of microorganisms (1997). Prentice-Hall international limited, London, UK.
- Maehashi K., Abe T., Yasuhara T., Yamasato K., Yamamoto Y., Udaka S.** Purification and characterization of a novel glutamyl aminopeptidase from chicken meat. *Meat Science* 64 (2003) 163-168.

- Mastihuba V., Kremnický L., Mastihubová M., Willett J.L., Côté G.L.** A spectrophotometric assay for feruloyl esterases. *Analytical Biochemistry* 309 (2002) 96-101.
- Mastihubová M., Szemesová J., Biely P.** Two efficient ways to 2-O- and 5-O-feruloylated 4-nitrophenyl α -L-arabinofuranosides as substrates for differentiation of feruloyl esterases. *Tetrahedron Letters* 44 (2003) 1671-1673.
- McAuley K.E., Svendsen A., Patkar S.A., Wilson K.S.** Structure of a feruloyl esterase from *Aspergillus niger*. *Acta Crystallographica D60* (2004) 878-887.
- McCrae S.I., Leith K.M., Gordon A.H., Wood T.M.** Xylan-degrading enzyme system produced by the fungus *Aspergillus awamori*: isolation and characterization of a feruloyl esterase and a *p*-coumaroyl esterase. *Enzyme and Microbial Technology* 16 (1994) 826-834.
- McSweeney C.S., Dulieu A., Bunch R.** *Butyrivibrio* spp. and Other Xylanolytic Microorganisms From the Rumen have Cinnamoyl Esterase Activity. *Anaerobe* 4 (1998) 57-65.
- McSweeney C.S., Dulieu A., Webb R.I., Dot T.D., Blackall L.L.** Isolation and characterization of a *Clostridium* sp. with cinnamoyl esterase activity and unusual cell envelope ultrastructure. *Archives of Microbiology* 172 (1999) 139-149.
- Michelsen B., De Vries R.P., Visser J., Soe J.B., Poulsen C.H., Zargahi M.R.** Enzyme system comprising ferulic acid esterase from *Aspergillus*. *US* 6 (2000) 143-543.
- Mukherjee G., Singh R.K., Mitra A., Sen S.K.** Ferulic acid esterase production by *Streptomyces* sp. *Bioresource Technology* 98 (2007) 211-213
- Nakajima N., Ishihara K., Hamada H., Kawabe S.I., Furuya T.** Regioselective acylation of flavonoid glucoside with aromatic acid by an enzymatic reaction system from cultured cells of *Ipomoea batatas*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 90 (2000) 347-349.
- Nascimento R.P., Coelho R.R., Marques S., Alves L., Girio F.M., Bon E.S., Amaral-Collaço M.T.** Production and partial characterization of xylanase from *Streptomyces* sp. strain AMT-3 isolated from Brazilian cerrado soil. *Enzyme and Microbial Technology* 31 (2002) 549-555.
- Nishimura M., Ooi O., Davies J.** Isolation and characterization of *Streptomyces* sp. NL15-2K capable of degrading lignin-related aromatic compounds. *Journal of Biosciences and Bioengineering* 102 (2006) 124-127.
- Nisole A., Lussier F.X., Morley K.L., Shareck F., Kazlauskas R.J., Dupont C., Pelletier J.N.** Extracellular production of *Streptomyces lividans* acetyl xylan esterase A in *Escherichia coli* for rapid detection of activity. *Protein Expression and Purification* 46 (2006) 274-284.
- Ohmiya K., Sakka K., Karita S., Kimura T.** Structure of cellulases and their applicants. *Biotechnology & Genetic Engineering* 14 (1997) 365-414.
- Oosterveldt A., Grabber J.H., Beldman G., Ralph J., Voragen A.G.J.** Formation of ferulic acid dehydrodimers through oxidative cross-linking of sugar beet pectin. *Carbohydrate Research* 300 (1997) 179-189.
- Panizzi L., Scarpati M.L., Oriente G.** *Experientia* 11 (1955) 383-384.

- Papagianni M.** Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances* 22 (2004) 189-259.
- Paquet V.** Mise en évidence de facteurs d'induction de la production des pristinaamycines chez *Streptomyces pristinaespiralis* (1990). Thèse de doctorat, INSA, Toulouse, France.
- Pedersen N.R., Halling P.J., Pedersen L.H., Wimmer R., Matthiesen R., Veltman O.R.** Efficient transesterification of sucrose catalysed by the metalloprotease thermolysin in dimethylsulfoxide. *FEBS Letters* 519 (2002) 181-184.
- Pelletier I., Altenbuchner J.** A bacterial esterase is homologous with non-haem haloperoxidases and displays brominating activity. *Microbiology* 141 (1995) 459-468.
- Popova V., Pishtiyski I.** Isolation of cyclodextrin glucanotransferase preparations of different purities. *European Food Research and Technology* 213 (2001) 67-71.
- Prates J.A.M., Tarbouriech N., Charnock S.J., Fontes C.M.G., Ferreira L.M.A., Davies G.J.** The Structure of the Feruloyl Esterase Module of Xylanase 10B from *Clostridium thermocellum* Provides Insights into Substrate Recognition. *Structure* 9 (2001) 1183-1190.
- Priya K., Chadha A.** Synthesis of hydrocinnamic esters by *Pseudomonas cepacia* lipase. *Enzyme and Microbial Technology* 32 (2003) 485-490.
- Rahouti M., Seigle-Murandi F., Steiman R., Erikson K.E.** Metabolism of ferulic acid by *Paecilomyces varioti* and *Pestalotia palmarum*. *Applied and Environmental Microbiology* 55 (1989) 2391-2398.
- Ralet M.C., Faulds C.B., Williamson G., Thibault J.F.** Degradation of feruloylated oligosaccharides from sugar beet pulp and wheat bran by ferulic acid esterases from *Aspergillus niger*. *Carbohydrate Research* 263 (1994) 257-269.
- Rumbold K., Biely P., Mastihubova M., Gudelj M., Gubitz G., Robra K.H., Prior B.A.** Purification and Properties of a Feruloyl Esterase Involved in Lignocellulose Degradation by *Aureobasidium pullulans*. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (2003) 5622-5626.
- Sancho A.I., Faulds C.B., Bartolomé B., Williamson G.** Characterization of feruloyl esterase activity in barley. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79 (1999) 447-449.
- Sancho A.I., Bartolomé B., Gomez-Cordovés C., Williamson G., Faulds C.B.** Release of Ferulic Acid from Cereal Residues by Barley Enzymatic Extracts. *Journal of Cereal Science* 34 (2001) 173-179.
- Saulnier L., Thibault J.F.** Ferulic acid and diferulic acids as components of sugar-beet pectins and maize bran. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79 (1999) 396-402.
- Sawai R., Suzuki A., Takano Y., Lee P.C., Horinouchi S.** Phosphorylation of AfsR by multiple serine/threonine kinases in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Gene* 334 (2004) 53-61.
- Sefkow M.** First Efficient Synthesis of Chlorogenic Acid. *European Journal of Organic Chemistry* (2001) 1137-1141.
- Selmi B., Gontier E., Ergen F., Thomas D.** Effects of fatty acid chain length and unsaturation number on triglyceride synthesis in solvent-free medium. *Enzyme and Microbial Technology* 23 (1998) 182-186.

- Shin H.D., Chen R.R.** Production and characterization of a type B feruloyl esterase from *Fusarium proliferatum* NRRL 26517. *Enzyme and Microbial Technology* 38 (2006) 478-485.
- Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C.** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150 (1985) 76-85.
- Smith T.** Antibiotics from soil bacteria. *Nature Structural Biology* 7 (2000) 189-190.
- Sorensen H.R., Meyer A.S., Pedersen S.** Enzymatic hydrolysis of water-soluble wheat arabinoxylan. 1. Synergy between α -L-arabinofuranosidases, Endo-1,4- β -xylanases, and β -xylosidase activities. *Biotechnology and Bioengineering* 81 (2003) 726-731.
- Stamatis H., Sereti V., Kolisis F.N.** Studies on the enzymatic synthesis of lipophilic derivatives of natural antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 76 (1999) 1505-1510.
- Stamatis H., Sereti V., Kolisis F.N.** Enzymatic synthesis of hydrophilic and hydrophobic derivatives of natural phenolic acids in organic media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 11 (2001) 323-328.
- Subramaniyan S., Prema P.** Biotechnology on microbial xylanases: Enzymology, molecular biology, and application. *Critical Reviews in Biotechnology* 22 (2002) 33-64.
- Sultana R., Ravagna A., Mohmmad-Abdul H., Calabrese V., Butterfield D.A.** Ferulic acid ethyl ester protects neurons against amyloid β -peptide(1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: relationship to antioxidant activity. *Journal of Neurochemistry* 92 (2005) 749-758.
- Synytsya A., Copikova J., Jankovska P.** Spectroscopic Estimation of Feruloyl Groups in Sugar Beet Pulp and Pectin. *Association AVH – 9^e Symposium – Reims* (2002).
- Tamburini E., Perito B., Mastromei G.** Growth phase-dependent expression of an endoglucanase encoding gene (*eglS*) in *Streptomyces rochei* A2. *FEMS Microbiology Letters* 237 (2004) 267-272.
- Tapin S., Sigoillot J.C., Asther M., Petit-Conil M.** Feruloyl Esterase Utilization for Simultaneous Processing of Nonwood Plants into Phenolic Compounds and Pulp Fibers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (2006) 3697-3703.
- Tenkanen M., Schuseil J., Puls J., Poutanen K.** Production, Purification and characterization of an esterase liberating phenolic acids from lignocellulosics. *Journal of Biotechnology* 18 (1991) 69-84.
- Thibault J.F., Asther M., Ceccaldi B.C., Couteau D., Delattre M., Duarte J.C., Faulds C., Heldt-Hansen H., Kroon P., Lesage-Meessen L., Micard V., Renard C., Tuohy M., Hulle S.V., Williamson G.** Fungal Bioconversion of Agricultural By-Products to Vanillin. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 31 (1998) 530-536.
- Topakas E., Kalogeris E., Kekos D., Macris B.J., Christakopoulos P.** Production and partial characterization and feruloyl esterase by *Sporotrichum thermophile* in solid-state fermentation. *Process Biochemistry* 38 (2003a) 1539-1543.
- Topakas E., Stamatis H., Biely P., Kekos D., Macris B.J., Christakopoulos P.** Purification and characterization of a feruloyl esterase from *Fusarium oxysporum* catalyzing esterification

of phenolic acids in ternary water-organic solvent mixtures. *Journal of Biotechnology* 102 (2003b) 33-44.

Topakas E., Stamatis H., Mastihubova M., Biely P., Kekos D., Macris B.J., Christakopoulos P. Purification and characterization of a *Fusarium oxysporum* feruloyl esterase (FoFAE-I) catalysing transesterification of phenolic acid esters. *Enzyme and Microbial Technology* 33 (2003c) 729-737.

Topakas E., Stamatis H., Biely P., Christakopoulos P. Purification and characterization of a type B feruloyl esterase (StFAE-A) from the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63 (2004) 686-690.

Topakas E., Christakopoulos P., Faulds C.B. Comparison of mesophilic and thermophilic feruloyl esterases: Characterization of their substrate specificity for methyl phenylalkanoates. *Journal of Biotechnology* 115 (2005a) 355-366.

Topakas E., Vafiadi C., Stamatis H., Christakopoulos P. *Sporotrichum thermophile* type C feruloyl esterase (StFaeC): purification, characterization, and its use for phenolic acid (sugar) ester synthesis. *Enzyme and Microbial Technology* 36 (2005b) 729-736.

Topakas E., Vafiadi C., Christakopoulos P. Microbial production, characterization and applications of feruloyl esterases. *Process Biochemistry* 42 (2007) 497-509.

Tsuchiyama M., Sakamoto T., Fujita T., Murata S., Kawasaki H. Esterification of ferulic acid with polyols using a ferulic acid esterase from *Aspergillus niger*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1760 (2006) 1071-1079.

Tuncer M., Kuru A., Isikli M., Sahin N., Celenk F.G. Optimization of extracellular endoxylanase, endoglucanase and peroxidase production by *Streptomyces* sp. F2621 isolated in Turkey. *Journal of Applied Microbiology* 97 (2004) 783-791.

Vafiadi C., Topakas E., Christakopoulos P. Regioselective esterase-catalyzed feruloylation of L-arabinobiose. *Carbohydrate Research* 341 (2006a) 1992-1997.

Vafiadi C., Topakas E., Christakopoulos P., Faulds C.B. The feruloyl esterase system of *Talaromyces stipitatus*: Determining the hydrolytic and synthetic specificity of TsFaeC. *Journal of Biotechnology* 125 (2006b) 210-221.

Van Peij N.M.E., Gielkens M.M.C., DE Vries R.P., Visser J., DE Graaff. The Transcriptional Activator XlnR Regulates Both Xylanolytic and Endoglucanase Gene Expression in *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (1998) 3615-3619.

Viikari L., Kantelinen A., Sundquist J., Linko M. Xylanases in bleaching: from an idea to the industry. *FEMS Microbiology Reviews* 13 (1994) 335-350.

Villeneuve P., Muderhwa J.M., Graille J., Haas M.J. Customizing lipases for biosynthesis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 9 (2000) 113-148.

Virto C., Adlercreutz P. Lysophosphatidylcholine synthesis with *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435). *Enzyme and Microbial Technology* 26 (2000) 630-635.

- Vulfson E.N., Ahmed G., Gill I., Kozlov I.A., Goodenough P.W., Law B.A.** Alterations to the catalytic properties of polyphenoloxidase in detergentless microemulsions and ternary water-organic solvent mixtures. *Biotechnology Letters* 13 (1991) 91-96.
- Vuorela S., Meyer A.S., Heinonen M.** Quantitative analysis of the main phenolics in rapeseed meal and oils processed differently using enzymatic hydrolysis and HPLC. *European Food Research and Technology* 217 (2003) 517-523.
- Wang X., Geng X., Egashira Y., Sanada H.** Purification and Characterization of a Feruloyl Esterase from the Intestinal Bacterium *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (2004) 2367-2372.
- Watanabe Y., Miyawaki Y., Adachi S., Nakanishi K., Matsuno R.** Synthesis of lauroyl saccharides through lipase-catalysed condensation in microaqueous water-miscible solvents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 10 (2000) 241-247.
- Weber N., Weitkamp P., Mukherjee K.D.** Steryl and stanyl esters of fatty acids by solvent-free esterification and transesterification in vacuo using lipases from *Rhizomucor miehei*, *Candida antarctica* and *Carica papaya*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (2001) 5210-5216.
- Wilkie K.C.B., Woo S.L.** A heteroxytan and hemicellulosic materials from bamboo leaves, and a reconsideration of the general nature of commonly occurring xylans and other hemicelluloses. *Carbohydrate Research* 57 (1977) 145-162.
- Williamson G., Kroon P.A., Faulds C.B.** Hairy plant polysaccharides: a close shave with microbial esterases. *Microbiology* 144 (1998) 2011-2023.
- Wong C.H., Whitesides G.M.** *Enzymes in synthetic organic chemistry* (1994). Elsevier Science Ltd.
- Zaks A., Klibanov A.M.** Enzyme-catalysed processes in organic solvents. *Biochemistry* 82 (1985) 3192-3196.
- Zaks A.** Industrial biocatalysis. *Current Opinion in Chemical Biology* 5 (2001) 130-136.
- Zotos A., Taylor K.A.D.** Partial purification and characterization of proteases from Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) and their role in the phenolase activation process. *Food Chemistry* 56 (1996) 61-68.

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Monsieur Eric DUBREUCQ, Professeur, Montpellier SupAgro, Montpellier

Monsieur Pierre VILLENEUVE, Directeur de Recherche, CIRAD, Montpellier

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Monsieur KHEDER Fadi

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**"Production et purification d'acide férulique estérases. Application à la synthèse
d'esters phénoliques"**

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Procédés biotechnologiques et alimentaires** »

Fait à Vandoeuvre, le 12 octobre 2007

Le Président de l'I.N.P.L.,

F. LAURENT



NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 54501
VANDŒUVRE CEDEX

Production et purification d'acide férulique estérases. Application à la synthèse d'esters phénoliques

Résumé : L'induction de la synthèse d'une acide férulique estérase (AFE) a été étudiée chez *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877. L'activité la plus élevée a été détectée en présence de son de blé désamidonné ou de xylane d'avoine (0,22, 0,21 mU/mg protéine, respectivement). Des productions d'AFE en bioréacteur ont également été réalisées en utilisant 1% (p/v) de son de blé comme inducteur. Le niveau de production de l'AFE a été trois fois plus important en bioréacteur qu'en fiole d'Erlenmeyer. L'AFE de *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877 et celle de *Humicola* sp., présente dans un mélange enzymatique commercial (DepolTM 740L), ont été partiellement purifiées et caractérisées. A l'issue de la purification, l'activité AFE de *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877 a été trop faible pour pouvoir être utilisée ultérieurement en synthèse. Par contre, le potentiel de l'AFE de *Humicola* sp., concentrée par précipitation à l'acétone, pour la synthèse de différents esters phénoliques a été testé. Les meilleurs rendements de conversion ont été observés lors de l'absence de substitutions sur le cycle aromatique de l'acide phénolique ou en présence de groupements hydroxyles. Les synthèses en milieu non aqueux (M₂B₂) se sont montrées infructueuses en raison, peut-être, d'un effet néfaste du solvant sur l'enzyme.

Mots clés : acide férulique estérase, acides phénoliques, estérification enzymatique, *Humicola* sp., induction, purification partielle, *Streptomyces ambofaciens*.

Production and purification of ferulic acid esterases. Application to the synthesis of phenolic esters

Abstract: The induction of the ferulic acid esterase (FAE) synthesis was studied with *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877. The highest activity was detected in the presence of either destarched wheat bran or oat spelt xylan (0,22, 0,21 mU/mg protein, respectively). FAE productions in bioreactor were also carried out using 1% (w/v) of wheat bran as inducer. The FAE production level was three times higher in bioreactor than in Erlenmeyer flask. FAE of *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877 and that of *Humicola* sp., present in an enzymatic commercial mixture (DepolTM 740L), were partially purified and characterised. At the end of the purification, FAE activity of *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877 was too weak to be used later in synthesis. However, the FAE potential of *Humicola* sp., concentrated by acetone precipitation, for the synthesis of various phenolic esters was tested. The best conversion yields were observed in the absence of substitution on the phenolic acid aromatic cycle or in the presence of hydroxyl groups. The synthesis in non-aqueous medium (M₂B₂) were unsuccessful maybe because of an harmful effect of the solvent on the enzyme.

Key words: ferulic acid esterase, phenolic acids, enzymatic esterification, *Humicola* sp., induction, partial purification, *Streptomyces ambofaciens*.