



THESIS / THÈSE

MASTER

Mise en évidence et isolement d'une activité enzymatique responsable de la synthèse d'inuline chez la chicorée *Cichorium intybus* L.

STEINIER, Julie

Award date:
1995

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

2 PSM N° 281

FACULTES UNIVERSITAIRES N.-D. DE LA PAIX
NAMUR
FACULTE DES SCIENCES



Mise en évidence et isolement d'une activité enzymatique
responsable de la synthèse d'inuline chez la chicorée
Chicorium intybus L.

Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Licencié en Sciences
biologiques

Julie Steinier
1995

Mise en évidence et isolement d'une activité enzymatique
responsable de la synthèse de l'inuline chez la chicorée
Chicorium intybus L.

STEINIER Julie

Résumé

Chez la chicorée industrielle, l'inuline est synthétisée grâce à l'action concertée de deux fructosyltransférases. La SST (sucrose : sucrose fructosyltrasférase), d'une part, catalyserait l'étape initiale par la formation d'un intermédiaire trisaccharide, l'isokestose. La FFT, d'autre part, utiliserait l'isokestose comme donneur de fructosyls et permettrait l'élongation des chaînes de fructanes. La synthèse enzymatique *de novo* d'inuline à partir de sucrose par l'association SST/FFT n'est toutefois pas encore clairement comprise. La purification de la FFT était une étape indispensable. Le processus de purification s'est basé sur les caractéristiques biochimiques générales de l'enzyme. Les protéines solubles ont été obtenues par précipitations au sulfate d'ammonium. La glycosylation de la FFT nous a conduits à réaliser une chromatographie d'affinité impliquant une lectine (la concanavaline). Une chromatographie échangeuse d'anions et une séparation sur gel IEF ont confirmé le point isoélectrique acide de l'enzyme. La séparation consécutive sur gel natif et IEF a permis une purification partielle de la FFT. L'enzyme purifiée nous amènera, par la suite, à envisager son microséquençage. La connaissance de la séquence en acides aminés et en acides nucléiques nous permettra d'une part, d'isoler le gène et d'autre part, de localiser cette enzyme.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Décembre 1995

Promoteur : Prof.P. Van Cutsem

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements, au professeur Pierre Van Cutsem pour m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Toute ma reconnaissance va à Messieurs Remacle, Cassart, Goblet et Van Herck qui ont accepté de lire ce mémoire.

Merci à Laurence pour son épaulement durant toute l'année.

Merci à Pierre pour les mille et une injections à l'HPLC.

Merci à tous les membres du laboratoire. Leur accueil chaleureux et leur bonne humeur me laisseront un excellent souvenir.

Enfin, je remercie mes parents pour leur soutien tout au long de ces années d'études.

Abréviations :

APS	ammonium persulfate
BSA	sérum albumine bovine
DDT	dithiothréitol
DP	degré de polymérisation
EDTA	acide éthylènediaminetétraacétique
F	fructose
FFT	fructane : fructane fructosyltransférase
F _n	polyfructoses sans glucose terminal
G	glucose
GUS	β-D-glucuronidase
HPLC	chromatographie liquide haute pression
IEF	isoelectric focusing (électrofocalisation)
PD	plasmodesme
PI	point isoélectrique
PMSF	phénylméthanesulfonyl fluoride
S	sucrose
SDS	sodium dodécyl sulfate
SST	sucrose : sucrose fructosyltransférase
SUT	transporteur de sucrose
TEMED	NNN'N'-tétraméthyléthylène diamine
TTP	transporteur de triose phosphate

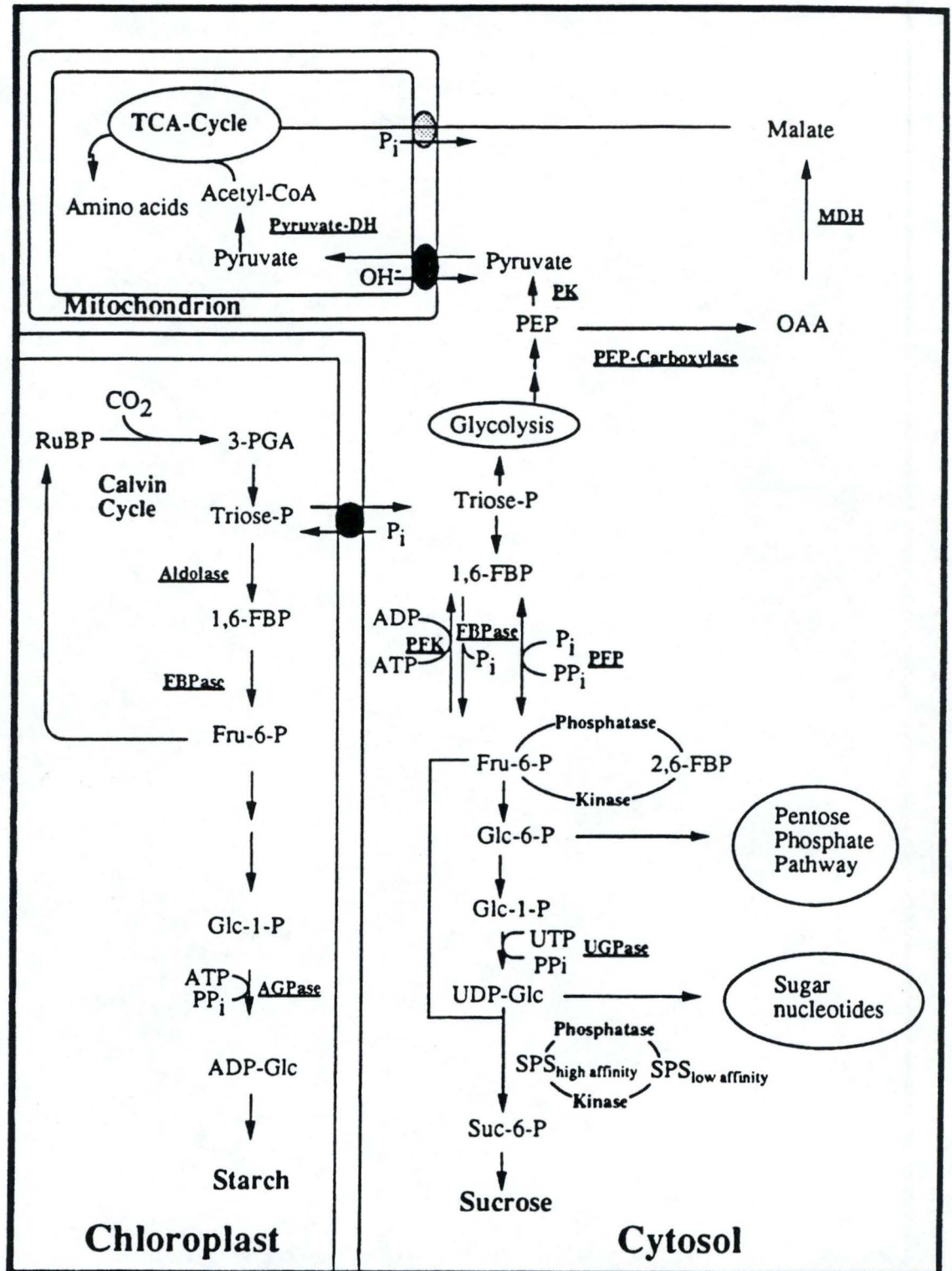


Figure I.1 : Modèle schématique de la répartition du carbone photosynthétique dans les feuilles des plantes en C₃ (AGPase : ADP-G pyrophosphorylase, UGPase : UDP-G pyrophosphorylase, FBPase : fructo biphosphatase, PFK : phosphofructokinase, PFP : fructose-6-phosphate-1-phospho-transférèse, SPS : sucrose-phosphate synthase) (Frommer Wolf B, Sonnewald Uwe, 1995).

I. INTRODUCTION

I.1. LES FRUCTANES

I.1.1 Introduction

La croissance et le développement des végétaux dépendent de leur capacité à fixer le CO₂ de l'air et de le transformer en sucres, une forme de stockage d'énergie pour la cellule. Ce processus est rendu possible d'une part grâce à la lumière qui fournira la puissance réductrice (NADPH) et l'énergie (ATP), d'autre part grâce à la fixation du CO₂ qui produira "in fine" les sucres nécessaires à la plante (sucrose, amidon, fructanes).

Chez la plupart des plantes, les produits principaux, accumulés durant le jour, sont le sucrose et l'amidon (substances de réserve). Durant la photosynthèse, le triose phosphate représente le produit principal du cycle de Calvin. Il peut être impliqué dans plusieurs voies de biosynthèse :

- soit dans les chloroplastes comme pour la formation de l'amidon ou la synthèse des lipides,
- soit, exporté vers le cytosol en échange de phosphate inorganique, pour être converti en sucrose, en acides aminés, en polysaccharides de la paroi cellulaire ou encore en pentoses phosphates,
- soit impliqué dans la voie de la glycolyse (figure I.1).

Certaines plantes vasculaires monocotylédones (ex : les Liliacées, les Graminées...) et dicotylédones (ex : la famille des Composées...) possèdent la particularité de stocker en plus de l'amidon (dans les feuilles), des composés polysaccharidiques riches en fructoses, les fructanes, dans les organes de réserves (figure I.2). La chicorée, le dahlia, l'artichaut, par exemple, membres de la famille des Composées font partie des plantes capables de stocker un de ces types d'hydrates de carbone, l'inuline, au niveau du pivot racinaire.

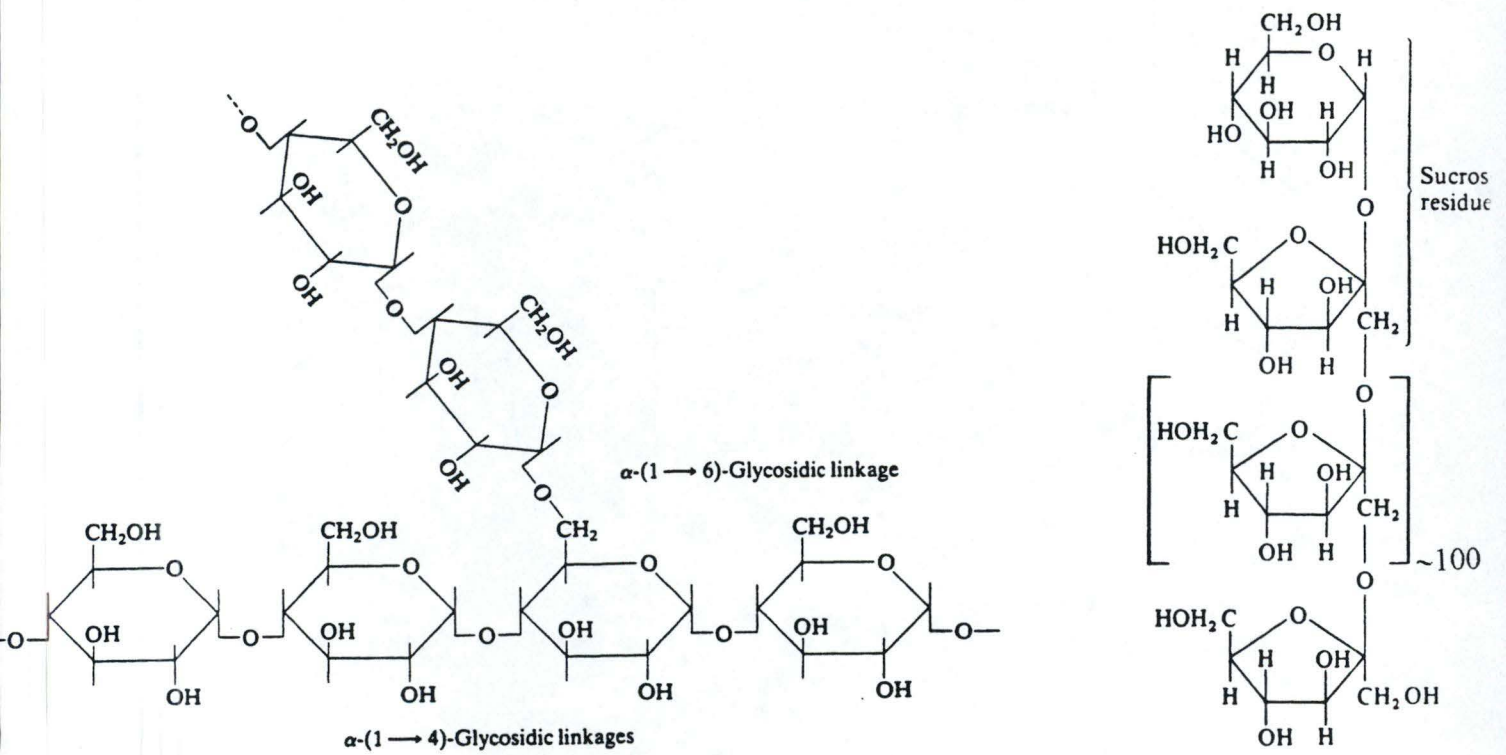


Figure I.2 : Formules structurales de l'amidon et des fructanes (l'amidon est constitué d'unités de glucose reliées par des liaisons $\alpha(1-4)$ et $\alpha(1-6)$, les fructanes sont constitués d'unités fructosyls avec un glucose terminal).

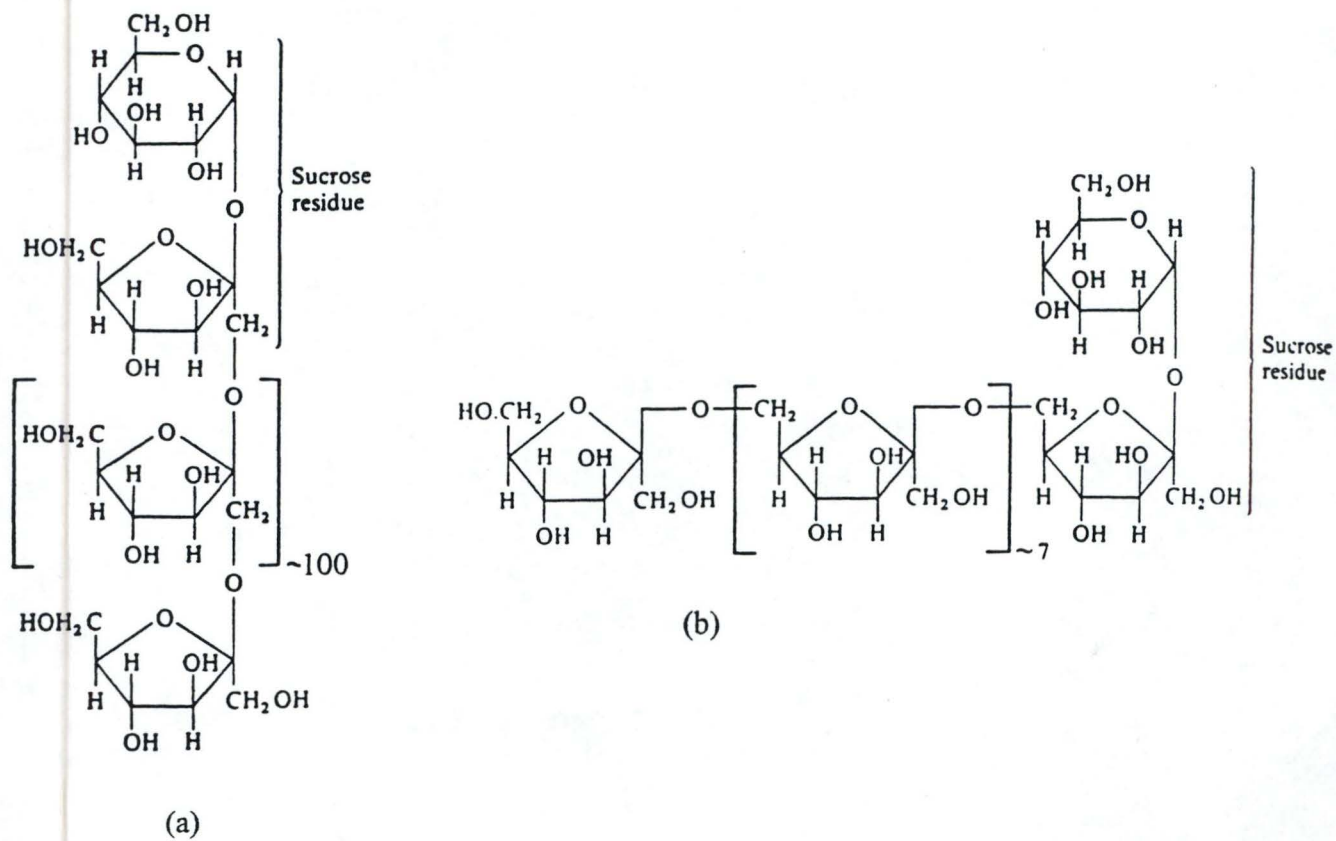


Figure I.3 : Formules structurales de l'inuline (a) et des levans (b).

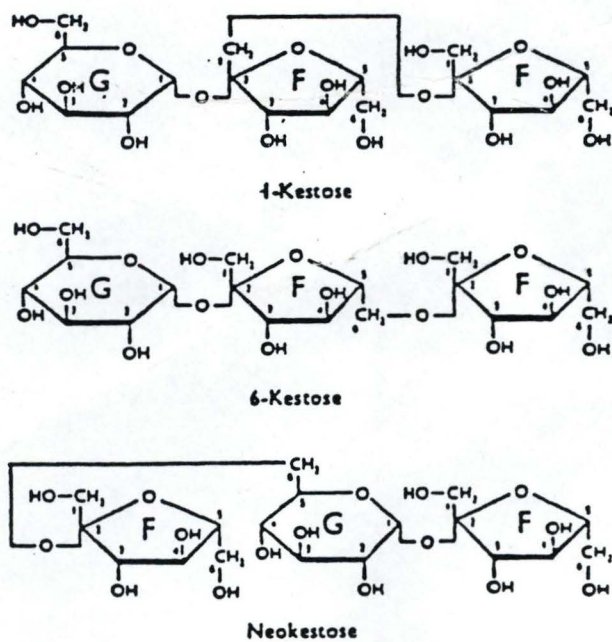


Figure I.4 : Formules structurales du 1-kestose, du 6-kestose et du néokestose.

I.1.2 Structure et localisation

Les fructanes sont des polymères de fructoses dont le premier monomère est un D-glucose. Ils sont linéaires ou ramifiés avec soit des liaisons β (2-1), c'est l'inuline, soit des liaisons β (2-6), ce sont des levans (figure I.3).

L'inuline est synthétisée via un intermédiaire trisaccharidique (**DP3**), formé par l'addition d'un résidu fructosyl au sucrose. Il s'agit de l'isokestose et du néokestose dans le cas des liaisons β (2-1) et du 6-kestose dans le cas des liaisons β (2-6) (figure I.4). Des degrés de polymérisation élevés s'obtiennent par l'élongation de la chaîne osidique grâce à l'addition séquentielle de molécules de fructose.

L'inuline se retrouve entre autres chez le blé et l'orge (dans les feuilles et les tiges), chez les plantes à bulbes comme la tulipe et l'oignon ainsi que chez la chicorée et le topinambour (racines et tubercules).

I.1.3 Les applications des fructanes

I.1.3.1 La chicorée industrielle, matière première pour la production d'inuline et de fructose

Au niveau mondial, le sucre est produit à raison de 60% par la canne et 40% par la betterave. La consommation moyenne européenne s'établit aux environs de 35 kg par habitant (au total 13.10^6 T / an), avec une pointe dans les pays anglo-saxons. La consommation plafonne toutefois, et est menacée par deux produits de la technologie alimentaire : l'isoglucose, amidon de céréales et de pommes de terre, hydrolysé en glucose et les édulcorants dont l'aspartame.

Le marché du sucre n'est donc certainement plus, pour l'Europe, un marché en expansion, ce qui contraint à terme tant les producteurs (les betteraviers) que les transformateurs (les sucreries), à envisager une diversification. De plus, les consommateurs exigent actuellement des produits alimentaires pauvres en graisses, pauvres en calories, riches en fibres, mais de qualités organoleptiques optimales.

Notre pays cultivait traditionnellement la chicorée industrielle en vue de son utilisation en tant que succédané du café. Depuis peu, cette culture a repris une importance croissante pour la production de sucre et de fibre. Le rendement potentiel de la chicorée industrielle (55 000 kg / ha; 18 à 19% d'inuline) supporte la comparaison avec celui de la betterave sucrière (62 500 kg / ha; 16% de sucre).

Le principal constituant de la matière sèche de la racine de chicorée est l'inuline. L'inuline peut être hydrolysée, chimiquement ou enzymatiquement, pour produire un sirop contenant du fructose.

L'inuline est aussi une fibre capable de concilier les aspirations consuméristes et les exigences industrielles.

I.1.3.2 Les caractéristiques spécifiques

L'inuline et les oligofructanes ont une influence sur la flore bifidogène. Ils ne se dégradent ni dans l'estomac, ni dans l'intestin grêle. En conséquence de leur hydrolyse incomplète, ils fermentent dans le colon où ils favorisent le développement d'une flore intestinale utile.

La spécificité de ces bifidobactéries pour les fructooligosaccharides est due à la production par ces bactéries de β -fructosidases. Ces bactéries, par leur fermentation, créent un environnement acide, empêchant le développement de germes pathogènes (*Escherichia*, *Clostridium*). De plus, elles produisent des toxines dirigées contre ceux-ci. Les oligofructanes permettent donc un bon transit intestinal et empêchent les problèmes de constipation.

Le fructose est un sucre non cariogène. Le développement de la plaque dentaire par "*Streptococcus mutans*" qui se produit en présence de saccharose et de glucose, serait inexistante en présence de fructose.

L'effet sur le métabolisme n'est pas minime. Le fructose a un effet positif sur la vitesse de disparition de l'alcool dans le sang, il stabilise le taux d'insuline et de glucose sanguin. Il provoque l'augmentation de l'excrétion de stérols neutres (cholestérol) et la diminution de la teneur sanguine en triglycérides. De plus, la fermentation des oligofructanes favorise l'absorption de certains ions, comme le Ca^{2+} , le Mg^{2+} et le Fe^{2+} (Gibson Glenn R., Roberfroid Marcel B., 1995).

Le fructose possède de nombreuses propriétés technologiques comme une solubilité élevée, un pouvoir anticristallisant, une faible viscosité ainsi que de nombreuses propriétés organoleptiques comme un pouvoir sucrant supérieur, exhausteur de goût et d'arômes (A. Fuchs, 1993).

L'inuline et le fructose sont utilisés comme produits de départ pour la production de nombreux dérivés chimiques (éthanol, chimie des furanes, des polymères, des plastiques, des colorants, des additifs).

Dans le secteur pharmaceutique, les dérivés de l'inuline peuvent être utilisés comme transporteurs de médicaments rapidement excrétés, pour les maladies urogénitales notamment. L'inuline est à ce titre couramment utilisée dans les tests diagnostiques des fonctions rénales (Ministère de l'agriculture, 1994).

Grâce à cet ensemble de propriétés, les fructosucres peuvent être utilisés dans de nombreuses spécialités alimentaires, soit comme édulcorant pour diabétiques, soit en tant qu'agent gélifiant, et depuis peu en substitut de matières grasses.

Ceci n'est pas une liste exhaustive...

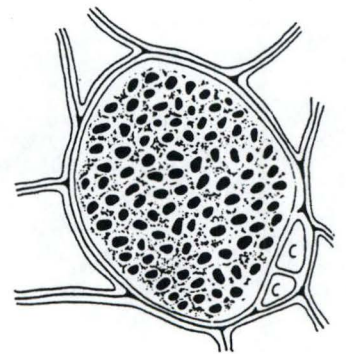
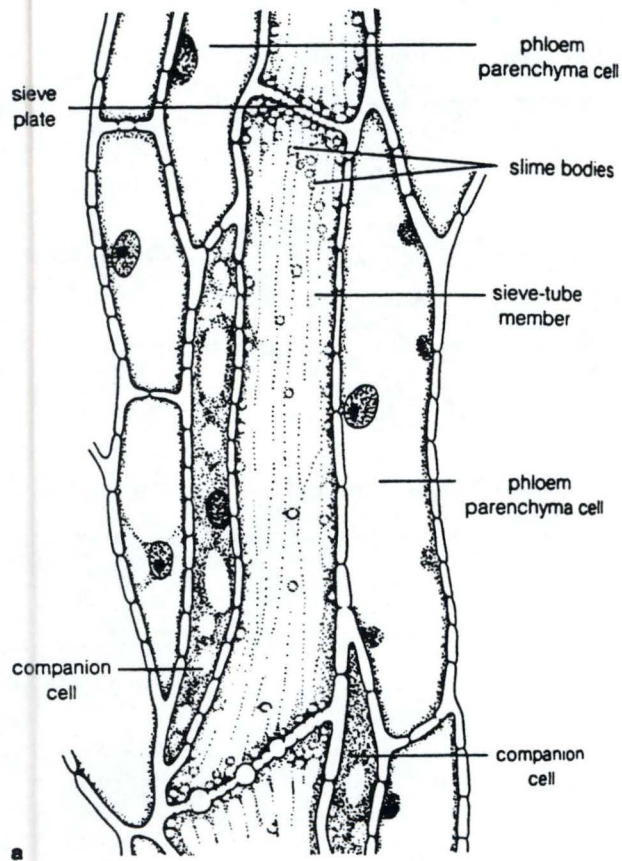


Figure I.5 : Coupe longitudinale (a) et verticale (b) du tissu phloémien (Salisbury Frank B, Ross Cleon W, 1991).

I.2. LE METABOLISME DES SUCRES

I.2.1 Le transport du sucrose

Les trioses-P produits dans les chloroplastes des feuilles matures sont exportés vers le cytosol, lieu de synthèse du sucrose par la sucrose-phosphate synthase. Le surplus de sucrose, non utilisé pour le métabolisme, est transporté des sites de synthèse vers les sites consommateurs et les sites de réserves pour y être métabolisé.

D'une part, le sucrose transporté est accumulé sous forme d'amidon dans les amyloplastides des cellules parenchymateuses. Dans le cas des plantes à inuline, il est accumulé dans les vacuoles des cellules parenchymateuses de racines. D'autre part, il fournit l'énergie et les substrats nécessaires pour la croissance cellulaire, la différenciation des tissus. En effet, le sucrose est un précurseur de la synthèse des polysaccharides de la paroi cellulaire, de la glycolyse, de la formation des acides aminés, du pentose phosphate...

Son transport des cellules du mésophylle foliaire vers les cellules des organes accumulateurs se fait via les tubes criblés du phloème. Le tissu phloémien est un tissu améatique conducteur de la sève dite élaborée, constitué d'éléments criblés conducteurs, de cellules compagnes et de cellules parenchymateuses (figure I.5).

Le mécanisme par lequel s'effectue l'étape de concentration fait l'unanimité, à défaut d'être connu en détail chez les végétaux. Le sucrose arriverait dans les cellules compagnes en provenance des cellules productrices, d'une part par une étape de sécrétion grâce à un transporteur (SUT) dans la paroi des cellules du mésophylle et d'autre part grâce à un cotransporteur spécifique du sucrose dans la paroi des cellules compagnes. Ce cotransport fait intervenir un pompage actif par une ATPase membranaire qui couple l'hydrolyse d'ATP au transport de protons à travers la membrane.

Cette énergie est nécessaire pour accumuler le sucrose. Ainsi, le proton excrété retraverserait ensuite la membrane et le transporteur (SUT) spécifique transférerait en même temps une molécule de sucre (Wolf B.Frommer, Uwe Sonnewald, 1995).

Ensuite, le sucrose transiterait des cellules compagnes par le symplasma (voie de transfert via le cytoplasme des cellules en connection par les plasmodesmes (PD)) dans les tubes criblés du phloème. La concentration élevée en sucrose dans les tubes criblés créerait une forte différence de potentiel hydrique par rapport aux cellules avoisinantes. L'eau pénétrerait dans les tubes criblés et générerait une forte pression de turgescence, qui constitue la force motrice du flux de phloème.

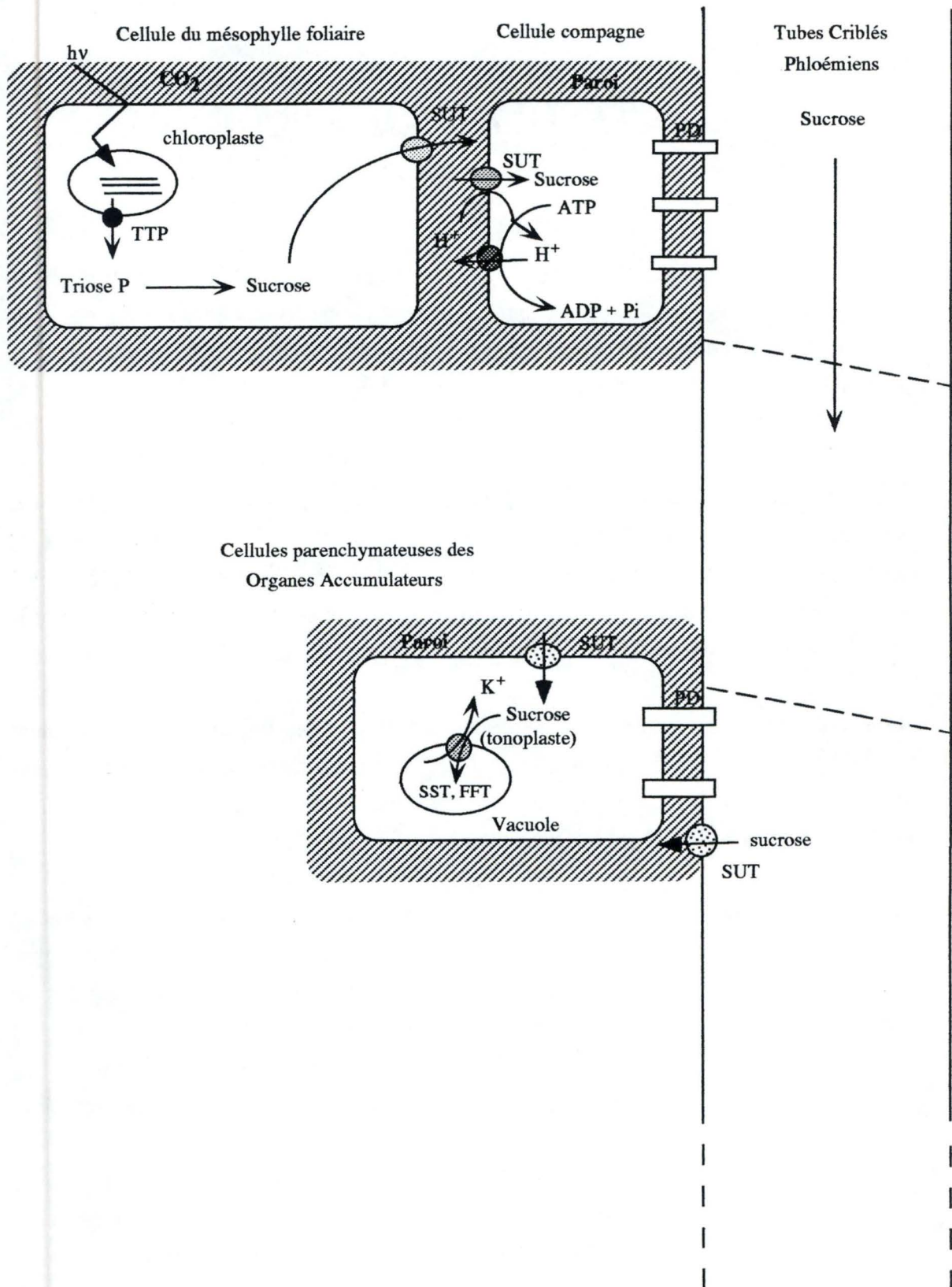


Figure I.6 : Schéma général du transport du sucrose des feuilles vers les organes de réserves.

Arrivé au niveau des sites consommateurs, le sucrose contenu dans la sève organique quitte le phloème :

- soit par les plasmodesmes via la voie du symplasme grâce un gradient de concentration plus élevé dans les tubes criblés que dans les cellules consommatrices. Le maintien de ce gradient est assuré par l'utilisation régulière des métabolites importés (aa, sucres...),

- soit par la voie apoplastique faisant intervenir un transporteur à la fois dans la paroi du tube criblé et dans la paroi de la cellule parenchymateuse.

Avant d'être métabolisé, le sucrose doit être hydrolysé en glucose et fructose au moyen d'une invertase. Cette hydrolyse se réalise, soit dans la paroi de la cellule parenchymateuse, soit dans la vacuole de la cellule consommatrice. Dans le cas des organes accumulateurs comme la racine de betterave, le sucrose n'est bien sûr pas hydrolysé mais activement accumulé dans la vacuole via un système de cotransport K^+ /sucrose localisé dans le tonoplaste. Les fructanes sont, eux, synthétisés dans la vacuole à partir du sucrose (figure I.6).

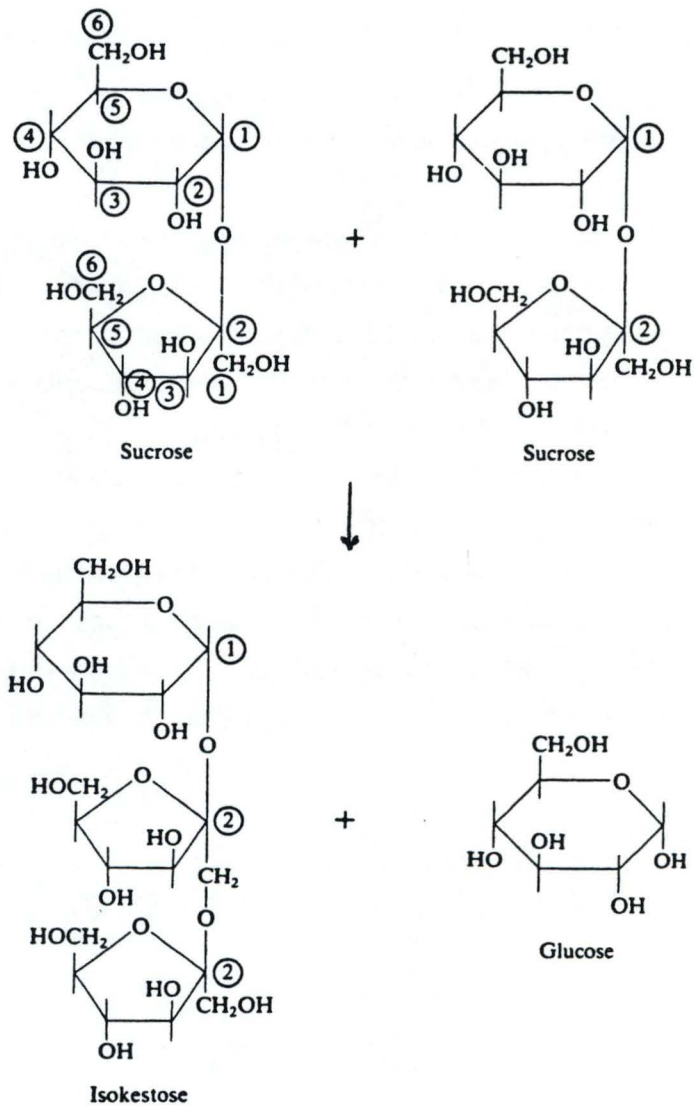


Figure I.7 : Action de la SST sur son substrat, le sucrose : production d'isokestose et de glucose.

I.2.2 Les enzymes impliquées dans la synthèse de l'inuline

Chez les "plantes à inuline", les fructanes sont synthétisés dans la vacuole grâce à l'action concertée de 2 fructosyltransférases à partir du sucrose. Un modèle de biosynthèse de l'inuline dans la racine d' *Hélianthus tuberosus* été élaboré en 1968 par Edelman et Jefford (Edelman J, Jefford TG, 1968), modèle qui a servi de base pour la plupart des analyses sur la biosynthèse des fructanes chez les plantes supérieures.

Le modèle d'Edelman et Jefford propose dans un premier temps l'action de la :

Sucrose : sucrose fructosyltransférase (SST) qui catalyserait l'étape initiale de la synthèse des fructanes, par la formation d'un intermédiaire trisaccharide, le **DP₃** (1-kestose) à partir de 2 molécules de sucrose (figure I.7).

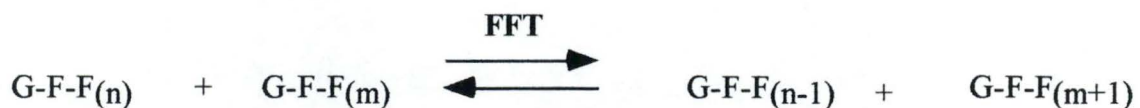
L'activité SST consiste à ce qu'un sucrose donneur cède un fructose à un sucrose accepteur qui devient un trisaccharide, en libérant un glucose. L'activité SST augmente avec concentration de son substrat : il s'avère que la SST a une faible affinité pour son substrat. C'est pourquoi on teste cette activité à une concentration en sucrose de 600 mM.



La synthèse des fructanes par la SST peut être mesurée *in vitro* soit directement par la mesure de la formation de trisaccharides, soit indirectement en quantifiant le glucose libéré.

Ensuite, l'action de la :

Fructane : fructane fructosyltransférase (FFT) qui utiliserait le 1-kestose comme donneur de fructosyls et permettrait l'élongation de la chaîne par transfert de groupements fructosyls entre molécules de fructanes (figure I.8).



avec $n \geq 1$ et $m \geq 0$

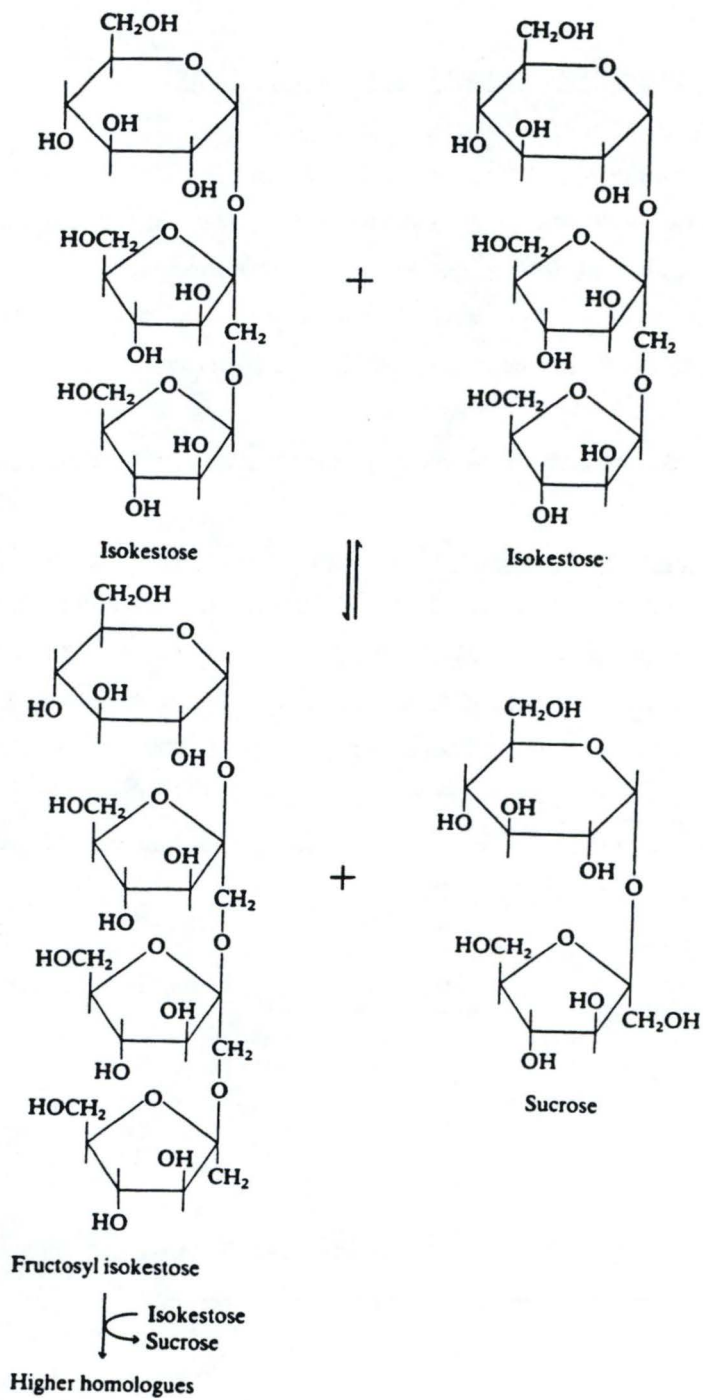


Figure I.8 : La synthèse de DP4 par la FFT.

L'activité FFT consiste à ce qu'un sucre donneur, de nombre de fructose supérieur ou égal à 1, donne un fructosyl à un sucre accepteur, de nombre de fructose supérieur ou égal à 0. Cette activité est mesurée par l'apparition de sucres de degrés de polymérisation ≥ 4 par chromatographie "HPLC".

Le sucrose peut être donc un accepteur de fructosyls. En fait, il s'avère être un accepteur avide, ce qui signifierait que la FFT en présence d'une concentration en sucrose plus grande que les autres polymères redistribuerait les fructoses sur le sucrose et ainsi empêcherait l'augmentation de la longueur des chaînes d'inuline.

On entrevoit ici la contradiction des conditions de fonctionnement des deux enzymes : l'une, la SST, travaillerait à haute concentration en sucrose, alors que l'autre, serait inhibée à cette concentration. Ce qui a fait penser à Edelman et Jefford que ces deux enzymes se situeraient dans des compartiments différents.

Or il s'avère que les deux enzymes possèdent des caractéristiques biochimiques communes, telles que leur pH d'activité acide, leur glycosylation et leur solubilité, qui permettraient d'affirmer qu'elles sont toutes les deux vacuolaires. On pourrait imaginer que la SST, travaillant à une forte concentration en sucrose, se situerait dans la vacuole du tube criblé phloémien et la FFT, travaillant à une faible concentration en sucrose, se situerait plutôt dans la vacuole de la cellule parenchymateuse.

De plus, des études utilisant des sucres marqués ont montré que le sucrose était le seul précurseur de l'inuline "in vivo"; c'est pourquoi ces auteurs ont postulé que la synthèse de l'inuline pourrait se faire "de novo" avec du sucrose comme seul précurseur et un mélange SST/FFT (Edelman, Dickerson, 1966). Il se pourrait, en effet, qu'il y ait une seule enzyme responsable des deux activités.

Cependant, une critique a été émise à cet égard par Cairns (Cairns AJ, 1993), selon qui les trisaccharides seraient bien synthétisés à partir du sucrose par la SST. Par contre, le sucrose étant le plus avide accepteur de résidus fructosyls, la FFT en présence de sucrose comme seul précurseur catalyserait préférentiellement le transfert du groupement fructosyl du DP₃ vers le sucrose.

Ceci aurait pour conséquence que le transfert de fructosyls aux oligofructanes serait inhibé en présence de sucrose. La synthèse enzymatique "de novo" d'inuline à partir du

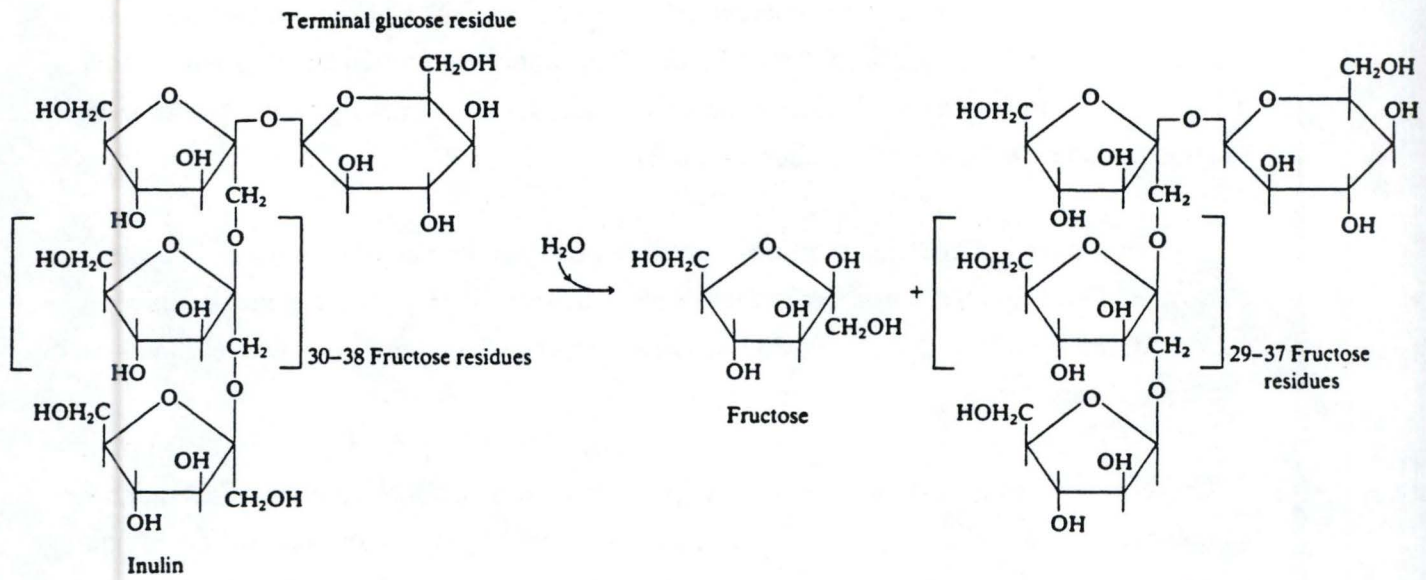


Figure I.9 : L'action des hydrolases sur les fructanes.

sucrose par l'association SST/FFT serait donc impossible et le modèle ne pourrait pas être testé "in vitro".

En fait, beaucoup d'études sur la biosynthèse des fructanes ont été réalisées sur différentes espèces de plantes, mais aucune ne permet de démontrer "in vitro" sans ambiguïté la synthèse "de novo" de fructanes de haut poids moléculaire.

De plus, la détection des activités SST et FFT est rendue plus difficile par la présence d'invertases et d'exohydrolases. L'invertase catalyse l'hydrolyse du sucrose en fructose et glucose, mais elle peut également catalyser la synthèse de trisaccharides et d'oligofructanes. L'exohydrolase catalyse la libération de fructose des chaînes d'inuline au départ de l'extrémité non réductrice (figure I.9).

Ces activités enzymatiques compliquent donc l'interprétation de ce modèle (Cairns, Ashton, 1991) (Van den Ende Win, Van Laere André, 1995).

La purification et la caractérisation de ces enzymes est une étape nécessaire pour comprendre le métabolisme des fructanes. Au cours de ce travail, nous nous sommes principalement attachés à la purification de la FFT.

I.2.3 L'accumulation des fructanes

On a observé au niveau des racines d'asperges que le contenu en fructo-oligosaccharides et fructo-polysaccharides dans les racines est très bas en juillet et augmente jusqu'en novembre. Durant cette période, le sucrose est accumulé en premier lieu, puis les trisaccharides, et par la suite les tétra et pentasaccharides. Le trisaccharide 1-kestose est l'isomère fructo-oligosaccharide prédominant.

L'activité SST est basse en juillet, monte jusqu'à un maximum en septembre et ensuite décroît.

L'activité invertase est pratiquement constante, mais est 20 fois plus élevée que l'activité SST en novembre.

L'activité FFT augmente lentement jusqu'à un maximum en septembre, est constante en octobre et décroît légèrement par la suite (N. Shiomi, 1992).

Le métabolisme des fructanes est en étroite relation avec les stades phénologiques de la plante tout au long de l'année (que ce soit pour l'induction florale, la dormance ou la différenciation des tissus) : nous savons qu'il y a réélongation des anciennes racines et

croissance des nouvelles racines après septembre, ce qui correspond à la période d'accumulation.

Le métabolisme des fructanes dépend aussi des conditions environnementales. Les fructanes permettraient entre autre d'augmenter la résistance des tissus au stress, au froid et à la sécheresse. En effet, les fructanes, étant solubles, contribue à la pression osmotique de la vacuole face au gel ou la sécheresse.

I.3. PURIFICATION ET CARACTERISTIQUES DE LA FFT CHEZ DIFFERENTES ESPECES

Chez *Taraxacum Officinale* Weber (le pissenlit), la FFT est une glycoprotéine avec un poids moléculaire apparent de 49 kDa déterminé par gel d'électrophorèse SDS-polyacrylamide. L'activité est détectée par l'apparition du nystose (DP4) qui est dépendante de la formation du 1-kestose. L'enzyme a un maximum d'activité à pH 6,5 et est stable à 30°C.

La séparation par électrofocalisation sur gel IEF (principe : les protéines vont migrer dans un gradient de pH, réalisé par des ampholines, jusqu'à arriver à leur point d'équilibre où leurs charges sont neutres) donne un point isoélectrique aux environs de pH 4,8. La FFT a été purifiée des racines du pissenlit par une procédure impliquant un broyage des racines suivi d'une précipitation des protéines au sulfate d'ammonium, une chromatographie d'affinité impliquant une lectine, une chromatographie échangeuse d'anions, une perméation de gel et enfin une électrofocalisation (Lüscher *et al.*, 1993).

Chez *Helianthus Tuberosus* L. (le topinambour), la FFT a été purifiée des racines en suivant le même schéma de purification que celui de la FFT de *Taraxacum Officinale* Weber.

Sur gel IEF (isoelectric focusing), Lüscher, Frehner et Nösberger observent 6 formes distinctes entre un pH de 4,3 et 4,5 qui correspondent peut-être à des isoformes possédant des degrés de glycosylation différents. L'enzyme a tout comme chez *Taraxacum Officinale* Weber un pH d'activité maximale de 6,5 (Lüscher *et al.*, 1993).

Chez *Helianthus Tuberosus* Colombia, la FFT est une glycoprotéine d'un poids moléculaire apparent de 70 kDa. L'enzyme a été purifiée des racines impliquant des techniques, comme la précipitation des protéines au sulfate d'ammonium, une chromatographie échangeuse d'anions, une chromatographie à interactions hydrophobes, une perméation de gel et des gels IEF.

Sur gel IEF, on distingue 5 formes situées entre le pH 4,5 et 5. L'activité optimale se situe entre un pH de 5,5 et 7,5 et la température optimale d'activité entre 25°C et 35°C. La FFT est insensible aux basses températures. Cette activité enzymatique est inhibée en présence d'ions Cu^{2+} et Ag^+ , ce qui conforte l'hypothèse de l'existence de groupements sulfhydryles dans le site catalytique (Koops and Joncker, 1994).

C'est l'ensemble de ces données qui nous ont permis d'élaborer un processus de purification de la FFT de la chicorée (*Chicorium intybus* L) : la précipitation au sulfate d'ammonium, la chromatographie d'affinité, la chromatographie échangeuse d'anions ainsi que les gels de polyacrylamide natifs et l'IEF (isoelectric focusing).

I.4. BUT DU TRAVAIL

Le but final de ce travail s'inscrit dans le cadre de l'étude de l'amélioration quantitative et qualitative de l'inuline, polysaccharide produit par la racine de chicorée industrielle (*Cichorium intybus L.*).

Deux enzymes interviendraient dans la synthèse de l'inuline. La SST (sucrose : sucrose fructosyltransférase) d'une part synthétiserait de l'isokestose (DP₃) à partir de deux molécules de sucrose, la FFT, d'autre part, utiliserait le DP₃ comme donneur de fructosyls pour l'élaboration de molécules de fructanes. La synthèse enzymatique "de novo" d'inuline à partir de sucrose par l'association du système SST / FFT n'est toutefois pas encore clairement comprise.

La purification et la caractérisation de ces enzymes est une étape nécessaire pour comprendre le métabolisme des fructanes.

Au cours de ce travail, nous nous attacherons principalement à la purification enzymatique de la FFT. Nous établirons un protocole de purification de la FFT basé sur ses caractéristiques biochimiques et en nous inspirant des techniques utilisées pour la purification de la FFT d'autres espèces végétales.

D'abord, les protéines solubles seront extraites par précipitation au sulfate d'ammonium. L'activité FFT sera détectée par l'incubation de l'extrait protéique dans le substrat, le *néosugar*.

Ensuite, la glycosylation de la FFT nous amènera à réaliser une chromatographie d'affinité impliquant une lectine (la concanavaleine).

Leur pI et pH d'activité acide nous permettront par la suite de réaliser une chromatographie échangeuse d'anions.

Enfin, nous terminerons la purification sur gel natif, suivi d'une séparation par IEF (isoelectric focusing).

Solutions :

Tampon d'extraction (A)

100 mM acide citrique

20 mM acide ascorbique (l'acide ascorbique en solution s'oxyde à l'air et à la lumière)

1 mM PMSF (à préparer fraîchement)

2 mM DTT

1 mM EDTA

Mettre à pH 5

Tampon (B)

50 mM acétate de sodium

1 mM MgCl₂

1 mM CaCl₂

1 mM MnCl₂

Mettre à pH 5

Sulfate d'ammonium ultra pur

II. MATERIEL ET METHODES

II.1. EXTRACTION DES PROTEINES SOLUBLES DES RACINES DE CHICOREES

II.1.1 Principe

L'extraction des protéines solubles se fait par précipitation aux sels, encore appelée précipitation par salting-out. Elle fait intervenir le caractère plus ou moins hydrophobe des protéines. La modification de la couche d'hydratation, par addition de sels, entraîne l'exclusion des molécules d'eau et permet la formation du précipité.

II.1.2 Protocole

- Plus ou moins 1kg de racines sont coupées, pelées, et plongées entièrement dans 750 ml de tampon d'extraction froid (A).
- Elles sont passées dans un mixer (Waring Blender) quelques minutes à grande vitesse.
- La solution est filtrée sur deux couches de Miracloth et le volume est mesuré.
- La solution est centrifugée 20 minutes à 13000 RPM dans un rotor *Beckman* JA14 (26 000 g) à 4°C afin d'éliminer les débris cellulaires, les membranes, et autres gros éléments.
- Le surnageant est récupéré et le volume est mesuré.
- Par la suite, le surnageant est porté à **30% en sulfate d'ammonium**. Les tables nous donnent une valeur de 176 g/l, qui est la quantité nécessaire à ajouter au surnageant pour atteindre 30% de saturation en sels. Le sulfate d'ammonium, sous forme solide, est ajouté petit à petit. Nous laissons précipiter 1h.
- Ensuite, le surnageant est centrifugé 1h à 13000 RPM dans le rotor JA14 à 4°C afin de récolter les éléments qui ont précipité à 30 % en sulfate d'ammonium (les noyaux notamment).
- Le surnageant est récupéré et le volume est mesuré.
- Le surnageant est porté à **70% en sulfate d'ammonium**. La table nous donne une valeur de 273 g/l à ajouter au surnageant déjà saturé à 30% afin d'avoir une solution saturée à 70% en sulfate d'ammonium. Le sulfate d'ammonium est ajouté petit à petit. Nous laissons précipiter une nuit à 4°C.
- La solution obtenue est centrifugée 30 minutes à 13000 RPM, toujours dans le rotor JA14 *Beckman* à 4°C.

Solutions du dosage des protéines par la méthode Folin

Solution (A) : 20 g de Na_2CO_3
4 g de NaOH
Porter à 1L avec de l'eau distillée

Solution (B) : 500 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
1 g de citrate de sodium
Porter à 100 ml avec de l'eau distillée

Solution (C) : 50 ml de solution (A) et 1ml de solution (B), à préparer fraîchement

Réactif de Folin-Ciocalteu du phénol : Dilué 2 X

BSA : Solution stock 2,5mg/ml

$$y = -1,4 \cdot 10^{-3} + 2,23 \cdot 10^{-3} x \quad R^2 = 0,999$$

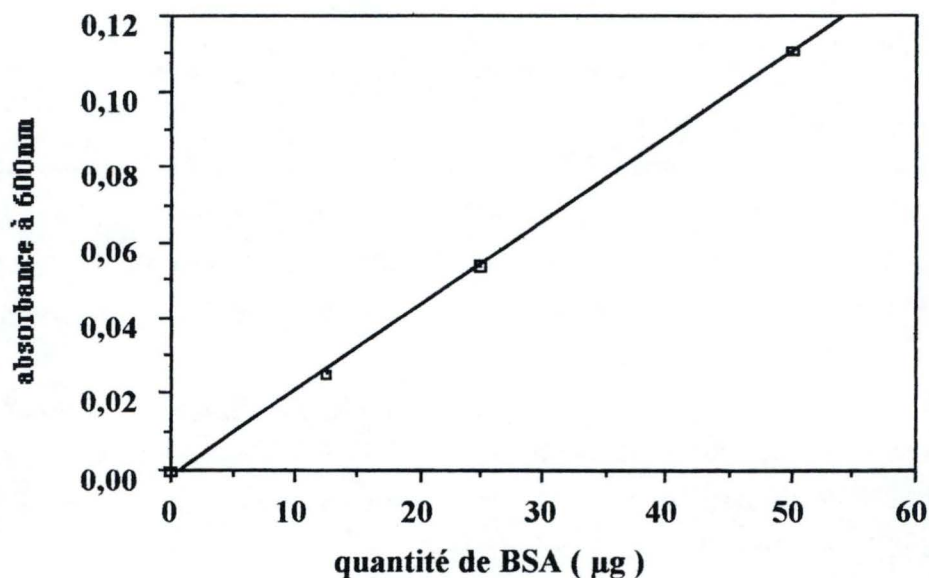


Figure II.1 : Droite standard avec, en abscisse, des quantités croissantes en BSA (12,5; 25 et 50 µg) et, en ordonnée, leur densité optique correspondantes à 600 nm.

- Le surnageant résultant est écarté et le culot, comprenant des protéines solubles et insolubles, est resuspendu dans au minimum 100 ml de tampon (B) (cela dépend de la quantité de protéines qui a été précipitée à 70%). Il faut que le culot soit bien dissous, si besoin en vortexant.
- Enfin la solution de protéines est centrifugée 15 minutes à 13000 RPM dans un rotor JA20 *Beckman* afin d'éliminer les protéines insolubles.
- Le surnageant récupéré contient donc les protéines solubles.

Ces deux précipitations successives (30 et 70 %) au sulfate d'ammonium nous permettent de récupérer les deux activités enzymatiques (SST et FFT), étudiées actuellement au laboratoire.

Remarques

- l'ensemble du protocole est réalisé à 4°C. 1mM de PMSF est ajouté à chaque étape de la purification pour empêcher l'action des protéases (à sérine). L'emploi de gants est nécessaire.
- A chaque étape, une aliquote est prélevée pour un dosage protéique. Les échantillons sont conservés à -70°C et sont prêts à être déposés sur la colonne Concanavalline-A-Sépharose-4B.

II.1.3 Dosage des protéines par la méthode de Folin modifiée par lowry (Lowry O.H et al ,1951)

II.1.3.1 Principe

C'est une méthode colorimétrique permettant de quantifier les protéines présentes dans un échantillon. Les acides aminés tyrosines, tryptophanes et cystéines (agents réducteurs) réduisent en complexes colorés des réactifs oxydés présents dans le réactif de Folin. Ces complexes ainsi réduits absorbent à une longueur d'onde de 600 nm. La méthode n'est sensible qu'à partir de quantités de protéines de l'ordre de 5 µg.

II.1.3.2 Protocole

- Une droite standard est réalisée avec en abscisse, des quantités croissantes de BSA allant de 10 à 50 µg et leur densité optique correspondante mesurée à 600 nm, en ordonnée. Une droite de régression est établie (figure II.1).
- Des dilutions de l'échantillon à doser sont réalisées de manière à avoir des quantités de protéines qui se situent dans la gamme étalon.

- 5 ml de solution C sont ajoutés dans chaque tube, en n'oubliant pas le blanc qui ne contient que de l'eau. L'incubation dure 10 minutes à t° ambiante.

- Par la suite, 500µl de réactif de Folin dilué 2X sont ajoutés dans chaque tube, l'incubation dure 30 minutes.
- Nous lisons l'absorbance à 600 nm.

Les valeurs des densités optiques à 600 nm des échantillons permettent, par la droite de régression, de déduire la quantité de protéines présente dans les échantillons.

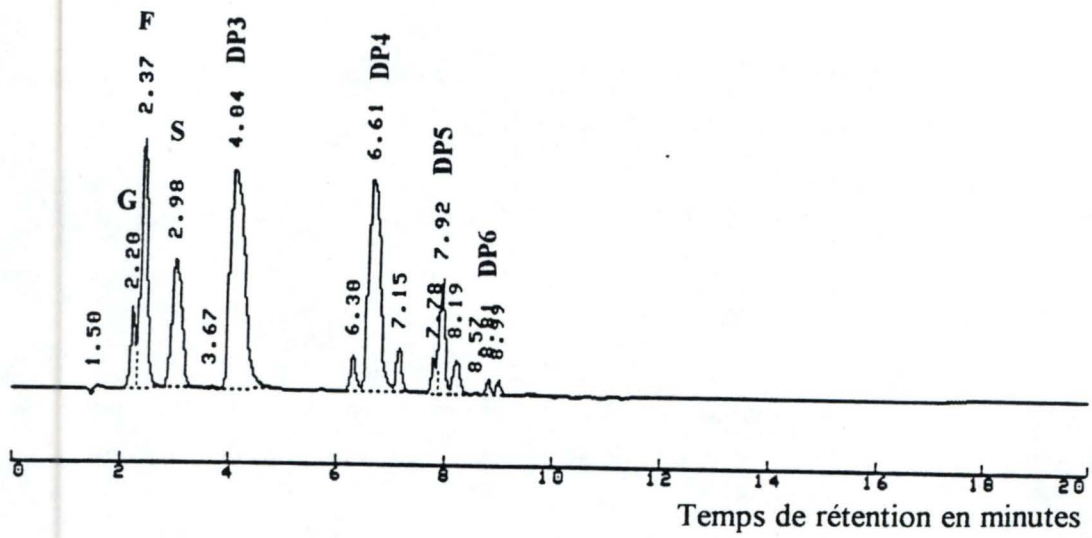


Figure II.2 : Chromatogramme du néosugar obtenu par HPLC avec

Le glucose	au temps de rétention	2' 20"
Le fructose		2' 37"
Le sucrose		2' 98"
Le DP ₃		4' 04"
Le DP ₄		6' 61"
Le DP ₅		7' 92"
Le DP ₆		8' 81"

II.2. DOSAGE DE L'ACTIVITE FFT

La solution protéique est incubée à chaque étape de la purification dans **25 mM de *néosugar***, tampon acétate 20mM pH 5,5, 1mM PMSF, et 0,05% de toluène à 30°C pendant quelques heures. Le *néosugar* constitue le substrat permettant de détecter l'activité FFT.

La réaction enzymatique est arrêtée en chauffant 5 min à 95°C.

Le *néosugar* est un don de la société Meiji Seika Kaisha Ltd, Tokyo Japan. La composition du *néosugar* a été obtenue par HPLC PAD sur colonne carboPac PA-100 (figure II.2).

G : 0,5 %

S : 3,3 %

DP3 : 41,2%

DP4 : 46%

DP5 : 9,9%

L'activité FFT se traduit par une augmentation progressive de la quantité de polyfructoses au cours du temps, détectable par HPLC.

Solutions nécessaires pour la séparation des sucres sur HPLC

-NaOH 150 mM

-NaOH 150 mM + 500 mM d'acétate de sodium

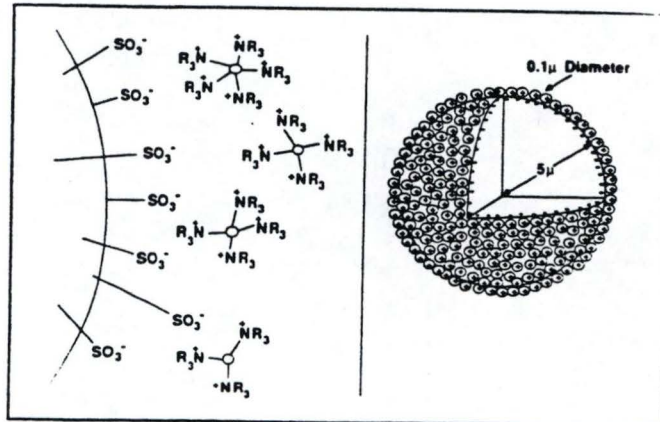


Figure II.3 : Représentation de la résine échangeuse d'anions conçue par *Dionex* pour séparer des sucres.

II.3. ANALYSE DES HYDRATES DE CARBONE PAR HPLC

II.3.1 Mécanisme de séparation de la colonne Carbo Pac PA100

Les hydrates de carbone possèdent des groupements hydroxyles très stables et c'est seulement à pH élevé (12 à 14) que les sucres sont partiellement ou complètement chargés négativement. Ils peuvent alors être séparés par échange anionique. Ce pH très élevé implique qu'on ne puisse pas utiliser les colonnes classiques, vu leur faible stabilité à ce pH.

La firme DIONEX a mis au point une résine spécialement conçue pour la séparation des sucres. Sur cette résine pelliculaire (de polystyrène-divinylbenzène) sont greffés des groupements SO_3^- (sulfites) et des groupements NR_3^+ (amines) (figure II.3). Les sucres à doser sont chargés négativement dans une solution de NaOH 150 mM (pH > 12,5).

Plus les chaînes des sucres sont longues, plus les charges négatives sont nombreuses et donc plus elles sont retenues sur la colonne. L'élution se réalise avec un gradient d'acétate de sodium 500 mM. Les petits sucres seront les premiers à apparaître sur le chromatogramme. La figure II.4 reprend les conditions générales d'élution des sucres.

II.3.2 Détection ampérométrique pulsée

La détection ampérométrique pulsée utilise une séquence répétée de 3 potentiels (E1, E2, E3) appliqués pendant une durée spécifique (t1, t2, t3) au niveau d'une électrode en or placée en sortie de colonne HPLC.

E1 est le potentiel auquel est mesuré le courant résultant de l'oxydation des hydrates de carbone pendant le temps t1.

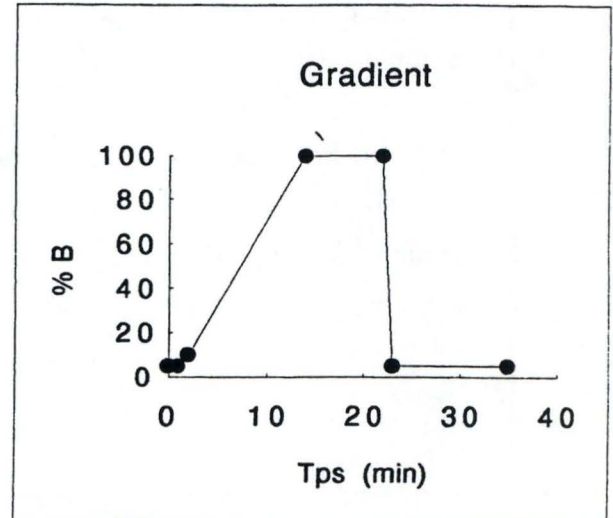
E2 a un potentiel positif afin de "nettoyer" électrochimiquement la surface de l'électrode.

E3 a un potentiel négatif afin de réduire l'oxyde d'or en or métallique.

Colonne : Carbo Pac PA-100 Guard + 4x250mm
 Stockage : NaOH 0.1M
 pH : 0 à 14
 T° : 23°C
 Pression max : 5000 psi
 Débit : 1ml/min
 Injection: 20µl
 Eluant A : NaOH 0.15M
 Eluant B : NaOH 0.15M + NaOAc 0.5M

Gradient

Temps (min)	A	B	C
0	95	5	
1	95	5	
2	90	10	
14	0	100	
22	0	100	
23	95	5	
35	95	5	



Détecteur : PAD (gold) DIONEX

Réglages : T1=480ms E1=+0.05V
 T2=180ms E2=+0.70V
 T3=360ms E3=-0.10V
 Rang : 2

Output range : 30mA

Intégrateur : Shimadzu:

Figure II.4 : Données récapitulatives des conditions dans lesquelles les sucres sont séparés par la colonne Carbo Pac PA-100, ainsi que la description du gradient utilisé.



Figure II.5 : Composition du système HPLC-PAD :

- a) Intégrateur (Shimadzu C-R4A Chromatopac)
- b) Injecteur automatique (SCL-10A Shimadzu)
- c) Pompe réalisant le gradient (Pharmacia LKB.Gradient Pump 2249)
- d) Solvants utilisés
- e) Dégazeur à hélium
- f) Colonne CarboPac PA100 (Dionex)
- g) Détecteur ampérométrique pulsée (Dionex)

Remarques

- Les tampons utilisés sont préparés avec de l'eau milliQ et filtrés sur une membrane 0,22 μ m.
- La pompe est rincée avant utilisation avec de l'eau milliQ et par la suite avec les tampons utilisés.
- Les injections se font de façon automatique (injecteur " SCL-10A Shimadzu ").
- Le détecteur (DIONEX) est relié à un intégrateur (Shimadzu C-R4A Chromatopac) afin de suivre l'évolution de l'élution et de permettre l'enregistrement du chromatogramme (figure II.5).
- Le stockage de la colonne se fait dans du tampon 150 mM de NaOH.
- Les échantillons doivent être filtrés sur une membrane 0,22 μ m.

Solutions pour la chromatographie d'affinité

Tampon (A) : 50 mM acétate de sodium

1 mM CaCl₂

1 mM MgCl₂

1 mM MnCl₂

Mettre à pH 5

Tampon (B) : Tampon (A) + 500 mM de méthyl α -D-mannopyranoside

Tampon (C) : TRIS HCl 0,1 M

NaCl 0,5 M

Mettre à pH 5

Tampon (D) : NaAc 0,1 M

NaCl 0,5 M

Mettre à pH 5

(les tampons sont réalisés avec de l'eau milliQ et sont filtrés sur une membrane 0,22 μ m)

II.4. CHROMATOGRAPHIE D’AFFINITE

II.4.1 Principe

Sachant que les enzymes responsables du métabolisme de l'inuline sont glycosylées, nous avons fait appel à une colonne concanavoline - Sépharose 4B.

La concanavoline, attachée de manière covalente à un support (le Sépharose), permet une chromatographie d'affinité où la molécule à purifier est spécifiquement et réversiblement adsorbée.

La concanavoline lie les molécules qui contiennent des α -D-mannoses, des α -D-glucoses, ainsi que les sucres qui contiennent des groupements hydroxyles en position C3, C4, C5. Elle permet donc de séparer et de purifier des glycoprotéines, des polysaccharides, des glycolipides entre autres.

II.4.2 Protocole

- La colonne (XK 26 PHARMACIA) a un diamètre de 26mm et contient 25 ml de gel.
- Le tampon (A) est passé selon le flux naturel et nous calculons le débit.
- La colonne est réfrigérée à 4°C grâce à un groupe froid.
- Le détecteur UV (UNICAM 8625) est placé juste après la sortie de la colonne et le collecteur est placé à la suite du détecteur. Les protéines sont dosées en continu au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 280 nm.
- Le détecteur UV est relié à un intégrateur (SHIMADZU C-R4A Chromatopac).
- L'échantillon contenu dans le tampon (A) et filtré sur une membrane 0,22 μ m, est déposé sur la colonne.
- Lorsque l'échantillon est passé, la colonne est lavée avec le tampon (A) jusqu'à ce que les protéines non retenues soient éluées.
- L'éluant (B) permettra de décrocher les protéines glycosylées. Elles sont récoltées et conservées à -70°C.
- La colonne est régénérée avec les tampons (C) et (D) .
- Par la suite, la colonne est rééquilibrée avec le tampon de départ et conservée à 4°C.

Solutions pour la chromatographie échangeuse d'anions

Tampon (A) : Phosphate de sodium 0,01 M pH 6,6
(1mM PMSF, 2mM DTT, 1mM EDTA)

Tampon d'éluion : Phosphate de sodium 0,01 M pH 6,6 + 500 mM NaCl

Tampon de lavage : Phosphate de sodium 0,01 M pH 6,6 + 2 M NaCl
et du NaOH 1 M

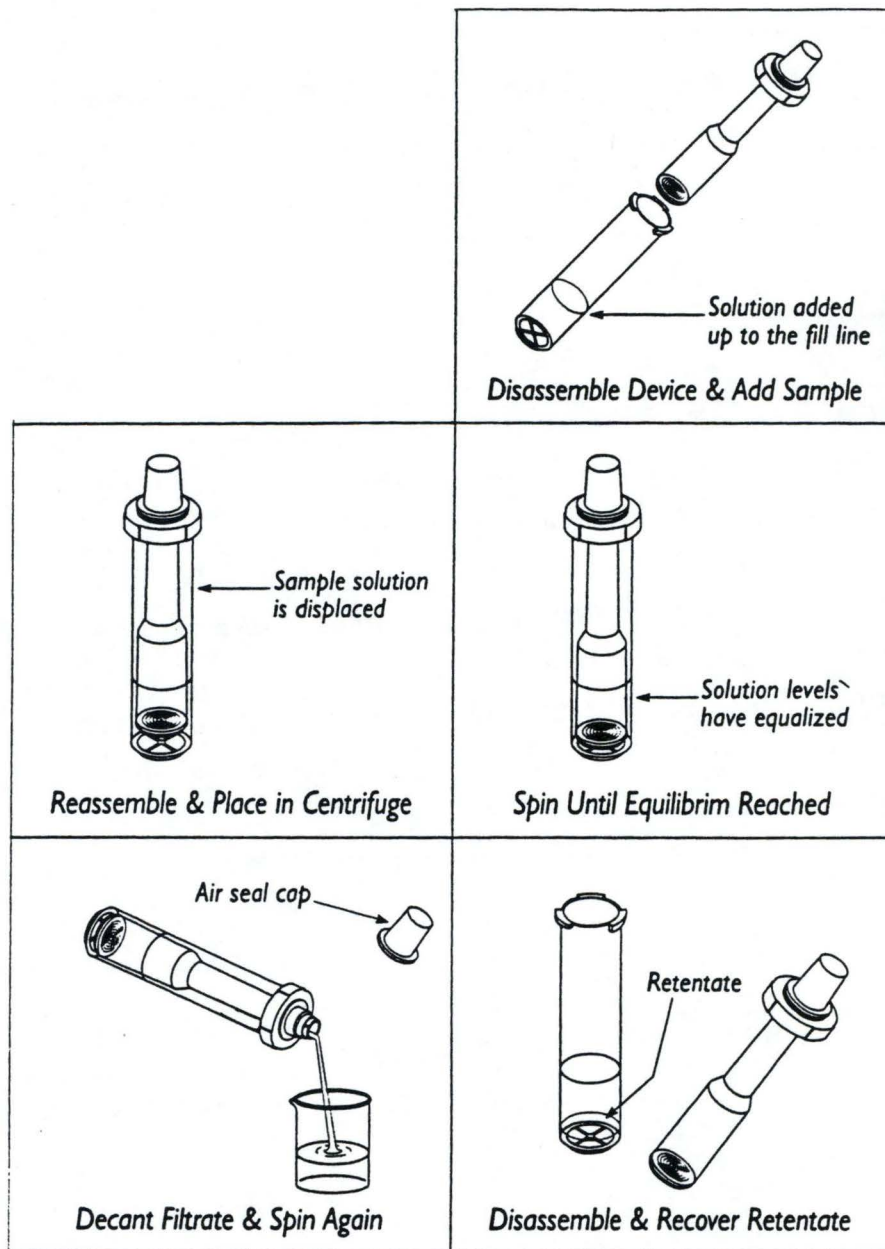


Figure II.7 : Le "Centriprep", système de concentration de l'échantillon protéique par un principe de dialyse par centrifugations successives.

II.5. CHROMATOGRAPHIE SUR ECHANGEURS D'ANIONS

II.5.1 Principe

Une colonne échangeuse d'ions consiste en une matrice insoluble liée de façon covalente à des groupes chargés. Ces groupes chargés sont associés à des contre ions mobiles. Ces contre ions peuvent être réversiblement échangés avec d'autres ions de la même charge sans altérer la matrice (figure II.6).

Le choix de l'échangeur d'ions est déterminé par la charge de la molécule, qui dépend elle-même du pH de la solution. Si le pH de la solution est supérieur au pI de la protéine, la protéine sera chargée négativement et s'accrochera donc à une matrice chargée positivement. Les contre ions seront quant à eux, chargés négativement.

II.5.2 Protocole

- La colonne (PHARMACIA XK 16) a un diamètre de 16 mm et contient 5 ml de gel (Q Sépharose fast flow). La capacité du gel est de 120 mg/ml.
 - La colonne est équilibrée avec le tampon (A) (5x le volume de la colonne)
 - La capacité du gel est de 120 mg/ml.
 - Etant donné que notre échantillon à la sortie de la colonne d'affinité concanavaleine est dans un tampon acétate de sodium 50 mM pH 5, il faut changer le tampon acétate par le tampon phosphate sur Centriprep 30 Amicon (membrane à limite d'exclusion égale à 30 000 Da) (figure II.7).
- Pour un volume de 15 ml et une centrifugation de 2700 RPM pendant 30 min (JOUAN CR 412), un volume final de 2 ml est obtenu.
- Même type de montage que lors de la chromatographie d'affinité.
 - L'échantillon est déposé et nous contrôlons la densité optique à 280 nm au spectrophotomètre au cours du temps.
 - Par la suite, l'élution se réalise avec un gradient linéaire de NaCl (0-500 mM).
 - La colonne est ensuite lavée avec le tampon de départ additionné de NaCl 2M pour permettre de tout décrocher et ensuite du NaOH 1M.
 - La colonne est rééquilibrée avec le tampon (A).

Solutions stocks des gels dénaturants

- 1,5 M TRIS HCl pH 8,8
 - acrylamide 30% bisacrylamide 0,8%
 - SDS 10%
 - TEMED
 - APS 10%
 - 0,5 M Tris-HCl pH 6,8
-
- Tampon de migration : TRIS 25 mM, Glycine 192 mM, SDS 0,1%, pH 8,3
 - Tampon (A) : 62,5 mM TRIS HCl pH 6,8; glycérol 10%; SDS 2%; 5% β -Mercaptoéthanol

II.6. LES GELS DENATURANTS EN UNE DIMENSION

(Laemmli, U.K., 1970)

Les plaques d'électrophorèse sont nettoyées et passées à l'alcool si nécessaire. L'épaisseur du gel est de 1,5 mm et la longueur de la plaque est de 16 cm, ce qui nécessite 40 ml pour le gel de séparation et 10 ml pour le gel d'empilement.

<u>Gel de séparation</u>	<u>7,5%</u>	<u>10%</u>	<u>12%</u>
1,5 M Tris- HCl pH 8,8	10 ml	10 ml	10 ml
acrylamide 30 %	10 ml	13,3 ml	16 ml
bisacrylamide 0,8 %			
SDS 10 %	400 µl	400 µl	400 µl
H ₂ O	19,32 ml	16,02 ml	13,32 ml
TEMED	30 µl	30 µl	30 µl
APS 10 %	250 µl	250 µl	250 µl
	<hr/>	<hr/>	<hr/>
	40 ml	40 ml	40 ml

- Après avoir coulé le gel, il faut le recouvrir avec de l'eau afin que la surface de polymérisation soit bien homogène et laisser polymériser 1h.

<u>Gel d'empilement</u>	<u>4 %</u>
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	2,5 ml
acrylamide 30 %	1,3 ml
bisacrylamide 0,8 %	
H ₂ O	6,1 ml
SDS 10 %	100 µl
TEMED	12 µl
APS 10 %	80 µl
	<hr/>
	10 ml

- Le gel doit polymériser 1h.

- Les échantillons sont déposés dans le tampon (A) et chauffés 5 minutes à 95°C.

II.7. LES COLORATIONS DES GELS

II.7.1 Coloration à l'argent (non ammoniacale)

Solutions :

- Fixateur 1 : Méthanol 50%
Acide acétique 10%
- Fixateur 2 : Méthanol 5%
Acide acétique 7%
- Fixateur 3 : Glutaraldéhyde 10%
- Solution de nitrate d'argent 0,1%
- Solution de développement : Carbonate de sodium 3%
- Formaldéhyde 37% : 500 µl pour 100 ml de solution
- Solution d'arrêt : Acide acétique 3%

- Le gel est démoulé et est mis dans 250 ml de fixateur 1, on agite pendant 30 minutes.
- Le fixateur 1 est retiré et le gel est immergé de 250 ml de fixateur 2 pendant 30 min sous agitation.
- La solution de décoloration est retirée et le gel est couvert de 200 ml de glutaraldéhyde 10% pendant 30 minutes sous agitation.
- Le gel est lavé plusieurs fois à l'eau pendant 1h.
- 200 ml de nitrate d'argent 0,1% est ajouté et le gel est agité pendant 30 minutes.
- Le nitrate d'argent est enlevé et le gel est lavé rapidement avec de l'eau. Il est immergé avec 200 ml de solution de développement.
- La réaction est arrêtée lorsque les bandes protéiques sont bien visibles avec 200 ml d'acide acétique 3%.

II.7.2 Coloration au bleu de Coomassie

- Solution de coloration : Méthanol 45%
Acide acétique 9%
Bleu de Coomassie R 0,25%
- Solution de décoloration : Méthanol 45%
Acide acétique 7%

- Le gel est démoulé et plongé dans la solution de coloration pendant 30 minutes.
- La solution de coloration est éliminée et le gel est placé dans des bains de décoloration successifs jusqu'à ce que le fond du gel soit clair et les protéines bien visibles.

Solutions stocks des gels natifs

- TRIS Glycine 5x pH 8,3
 - acrylamide 30% bisacrylamide 0,8%
 - TEMED
 - APS 10%
 - TRIS HCl 1 M pH 7,6
 - Glycérol 10%
 - Bleu de Bromophénol 0,01%
 - Riboflavine (40 µg/ml)
 - Thioglycolate 100 mM
- Tampon de migration : TRIS 25 mM, Glycine 192 mM pH 8,3

II.8. LES GELS NON DENATURANTS CONTINUS

Composition d'un gel de 7,5% en acrylamide

Données établies pour un grand gel : L : 160 mm
E : 0,75 mm

TRIS/Glycine 5X pH 8,3	4 ml
acrylamide 30%	5 ml
bisacrylamide 0,8%	
H ₂ O	10,5 ml
TEMED	2,5 µl
APS 10%	500 µl
	<hr/>
	20 ml

- Après avoir coulé le gel, il faut le recouvrir d'eau afin que la surface de polymérisation soit bien homogène et laisser polymériser 1h.
- La migration est effectuée à 4°C
- Un pré-run d'1h à 15 mA est réalisé.
- Les protéines contenues dans du TRIS HCl 100 mM pH 7,6, glycérol 10% et du bleu sont déposées.
- Le gel est installé dans la cuve et la migration est effectuée à ampérage constant en imposant une puissance maximale de 8 W afin d'éviter la surchauffe du gel.
- L'APS, utilisé comme catalyseur, peut être remplacé par de la riboflavine, illuminée en présence d'une faible quantité d'O₂.
- Le thioglycolate peut être ajouté au gel et au tampon de la cathode pour neutraliser les radicaux libres formés lors de la polymérisation.

Solutions stocks des gels IEF

- acrylamide 30% bisacrylamide 0,8%
 - Ampholines 4-6; 3,5-10
 - TEMED
 - APS 10%
-
- NaOH 0,01 M à l'anode
 - H₃PO₄ 0,01 M à la cathode

II.9. LES GELS IEF (ISOELECTRIC FOCUSING)

II.9.1 Principe

Les protéines vont migrer dans un gradient de pH, réalisé par des ampholines, jusqu'à leur point d'équilibre où leurs charges sont neutres (point isoélectrique).

II.9.2 protocole

Données établies pour un gel de 16 cm sur 20 cm avec une épaisseur de 1,5 mm :

acrylamide 30%	6,7 ml
bisacrylamide 0,8%	
ampholines 4-6	3,2 ml
ampholines 3,5-10	800 µl
H ₂ O	28,25 ml
TEMED	5 µl
APS 10%	1 ml
	<hr/>
	40 ml

- Le gel est coulé et polymérise pendant 1h.
- Dans la cuve, 400 ml de NaOH 0,01 M sont placés dans la partie supérieure et 4,5 l de H₃PO₄ 0,01 M dans la partie inférieure.
- Un pré-run est effectué en appliquant une tension de 200 V pendant 1/4 h, de 300 V pendant 1/2 h, 400 V pendant 1/4 h.
- Les protéines sont déposées en présence de bleu et de 10% de glycérol.
- Une différence de potentiel de 400 V est appliquée pendant une nuit.
- La focalisation se réalise pendant 1h30 à 800 V.

REMARQUE : Afin de détecter une activité enzymatique, il convient d'effectuer l'ensemble de ces opérations à 4°C et donc de maintenir tous les tampons et les solutions au froid.

III. RESULTATS

Au cours de ce mémoire, notre intérêt s'est porté sur le métabolisme des fructanes chez la chicorée (*Chicorium intybus* L.) : rappelons que la racine de chicorée synthétise des sucres, des polyfructoses possédant des degrés de polymérisation (nombre de sucre par chaîne ou DP) allant jusqu'à 100 grâce à l'action concertée de deux activités enzymatiques.

La SST, d'une part, synthétiserait de l'isokestose (DP₃) à partir de deux molécules de sucrose, la FFT, d'autre part, utiliserait le DP₃ comme donneur de fructosyls pour l'élaboration des molécules de fructanes (Edelman J, Jefford TG, 1968).

Nous nous sommes intéressés plus particulièrement au cours de ce travail à purifier la FFT présente dans la racine de chicorée.

Nous remarquons toutefois que toutes les purifications des activités SST et FFT réalisées jusqu'il y a peu chez diverses espèces végétales n'avaient pas permis de déterminer avec certitude la présence d'enzymes distinctes. Il se pourrait en effet qu'il y ait une seule enzyme responsable des deux activités. Cependant, dans un récent article concernant la purification de la FFT, Koops et Jonker (1994) parviennent à séparer les deux activités enzymatiques par une précipitation sélective au sulfate d'ammonium . C'est pourquoi nous pouvons parler de l'enzyme FFT et non plus de l'activité FFT.

Les FFT purifiées chez divers végétaux sont glycosylées, solubles et ont un pH d'activité optimum acide. Toutes ces caractéristiques suggèrent une localisation vacuolaire.

Nous avons ainsi établi un protocole de purification de la FFT basé à la fois, sur ses caractéristiques biochimiques et sur les techniques utilisées pour la purification de la FFT d'autres espèces (voir point I.3 dans l'introduction).

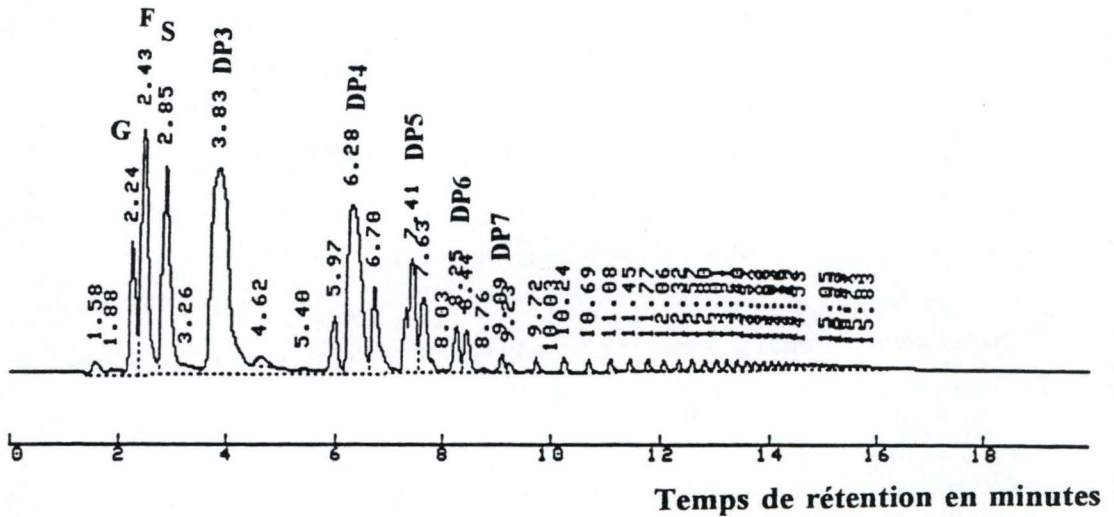
L'extraction des protéines solubles s'est réalisée par précipitations au sulfate d'ammonium.

Leur glycosylation nous a amené par la suite à réaliser une chromatographie d'affinité impliquant une lectine (la Concanavoline).

Figure III.1 : Profil d'éluion par HPLC des sucres produits par l'incubation de l'extrait protéique brut dans le *néosugar*.

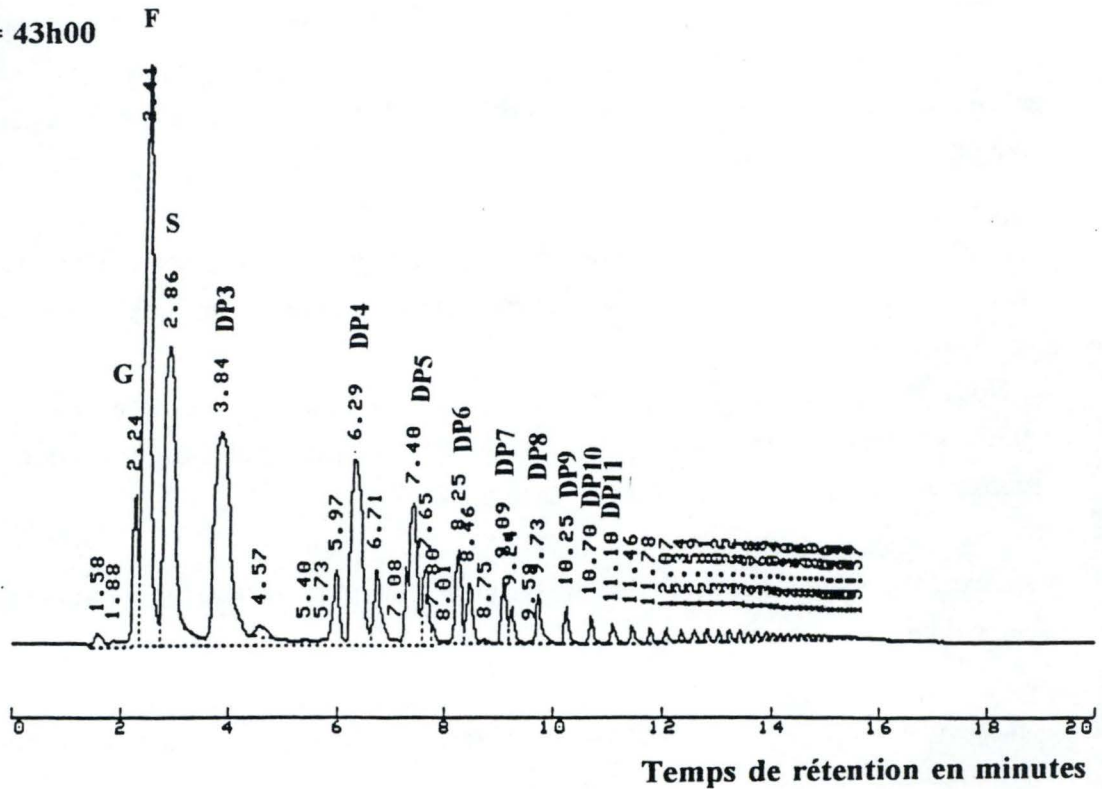
a)

Temps = 0h



b)

Temps = 43h00



a : L'extrait protéique en présence du *néosugar* au temps 0.
 b : Séparation des sucres résultant de l'action des protéines de l'extrait brut sur le *néosugar* pendant 43h00 à 30°C.

Leur pI et leur pH d'activité acide nous ont conduit ensuite à réaliser une chromatographie échangeuse d'anions.

Nous avons terminé la purification sur gel natif et poursuivi par une séparation par IEF (isoelectric focusing).

III.1. L'EXTRACTION DES PROTEINES SOLUBLES DES RACINES DE CHICOREES

L'extraction des protéines solubles des racines de chicorée s'effectue au départ de 100 à 500 g de racines récoltées en champ et broyées dans un tampon à pH 5 en présence d'anti-protéases à 4°C. L'extrait obtenu est soumis à deux précipitations successives (30 et 70 %) au sulfate d'ammonium. La première précipitation permet une clarification préalable du surnageant brut.

Pour vérifier la présence de l'enzyme qui nous intéresse dans notre extrait protéique, nous avons incubé cet extrait obtenu en présence du substrat de la FFT.

III.1.1 l'activité enzymatique FFT

L'activité FFT est détectée en incubant la solution protéique à chaque étape de la purification dans 25 mM de *néosugar*, tampon acétate 20 mM pH 5,5 à 30°C pendant quelques heures.

Nous avons pu mettre en évidence l'activité FFT dans l'extrait brut. Elle se traduit par une augmentation progressive de la quantité de polyfructoses au cours du temps, détectable par HPLC. Les figures III.1 a et b montrent le profil obtenu par HPLC avec la détection ampérométrique pulsée au temps 0 et après un temps d'incubation de 43h00.

Nous observons une augmentation de la quantité de sucrose et des sucres de DP ≥ 5 ainsi qu'une diminution de la quantité de DP3 (isokestose) et du DP4.

En effet, Les DP3, DP4 les plus abondants dans le *néosugar* au début de la réaction enzymatique, sont des donneurs de fructosyls qui diminuent fortement au cours du temps. L'utilisation du DP3 par la FFT permet le largage du sucrose qui augmente.

Nous remarquons ici que nous avons obtenu de l'inuline dans l'extrait (figure III.1) : le *néosugar* ne contient que des sucres de DP ≤ 7 (voir matériel et méthodes).

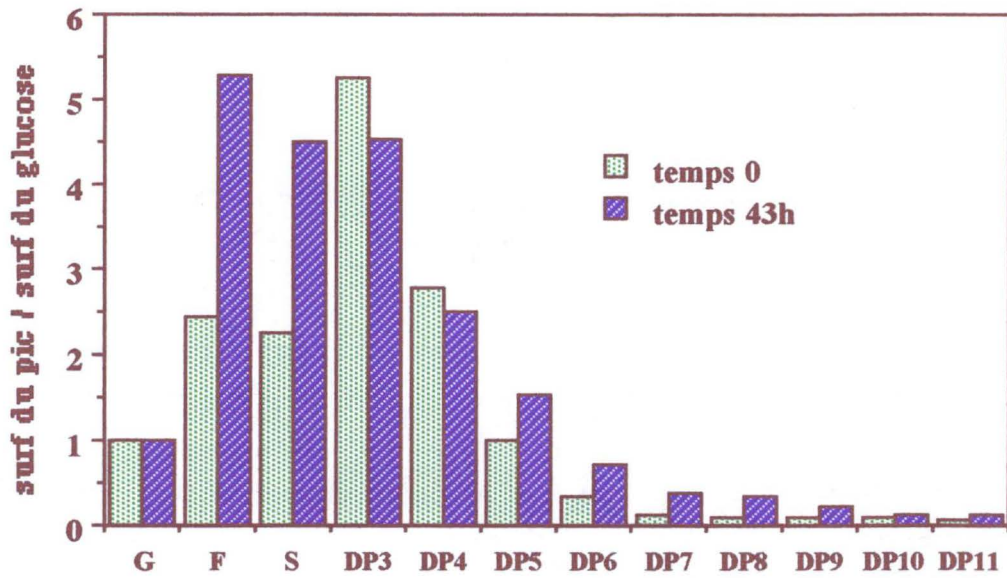


Figure III.2 : Evolution au cours du temps de la quantité des différents sucres formés (exprimés par la surface de chaque pic / surface du glucose) résultant de l'activité de l'extrait protéique brut sur le *néosugar*.

L'augmentation importante de la quantité de fructose au cours du temps ne peut pas résulter de l'activité FFT sur le *néosugar*, ni d'une activité invertasique qui cliverait le sucrose en glucose et fructose en quantité égale. En effet, la quantité de glucose ne varie dans aucun cas.

L'augmentation en fructose serait due à la présence d'une activité exohydrolase qui hydrolyserait les polyfructoses formés en fructose. La présence de cette activité dans l'extrait masque partiellement l'activité réelle de la FFT en hydrolysant les polymères nouvellement formés par celle-ci.

L'histogramme de la figure III.2 reprend la variation des différents sucres suite à l'incubation de l'extrait protéique brut dans le *néosugar* au cours du temps (après 43h00). La variation des sucres est exprimée par la surface du sucre / la surface du glucose.

III.1.2 La variation de la teneur en différents sucres

Afin de traduire la variation de la quantité des différents sucres, suite à l'incubation de la solution protéique dans le *néosugar*, le plus justement et le plus facilement possible, nous avons pris pour chaque type de sucre formé :

$$\frac{\text{Surface du pic}}{\text{Surface du pic glucose}} = x$$

On rapporte chaque surface à la surface du glucose (G) qui ne varie pas au cours du temps et nous sert de standard interne.

Ensuite, On rapporte chaque valeur obtenue (x) à la quantité de protéines.

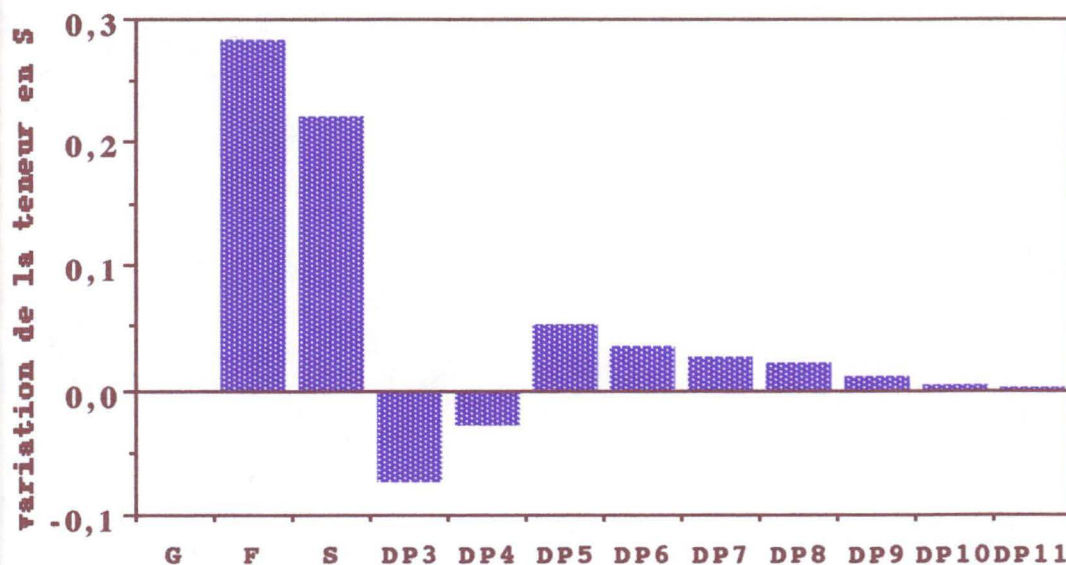
On effectue la différence entre le temps T_0 d'incubation et le temps T_X .

$$\left[\frac{x}{\text{quantité de protéines en } \mu\text{g}} \right]_{T_X} - \left[\frac{x}{\text{quantité de protéines en } \mu\text{g}} \right]_{T_0}$$

Figure III.3 : Variation de la teneur en différents sucres suite à l'incubation pendant 43h00 de l'extrait protéique brut dans le *néosugar*.

sucre	variation de la teneur en différents sucres (μg^{-1} protéines)	sucre	variation de la teneur en différents sucres (μg^{-1} protéines)
glucose	0	DP6	0,037
fructose	0,286	DP7	0,028
sucrose	0,223	DP8	0,024
DP3	-0,073	DP9	0,012
DP4	-0,028	DP10	0,007
DP5	0,054	DP11	0,005

a : Ce tableau représente la variation de la teneur en différents sucres suite à l'incubation de l'extrait protéique brut dans le *néosugar*.



b : Histogramme découlant du tableau ci-dessus représentant la variation de la teneur en différents sucres suite à l'incubation de l'extrait protéique brut dans le *néosugar*.

Nous obtenons une valeur qui reflète la variation de la quantité de chaque sucre suite à l'incubation de la solution protéique dans le *néosugar*.

- Si cette valeur est positive, il y a apparition du sucre en question
- Si cette valeur est négative, il y a dégradation de ce sucre.

Cette variation sera donc exprimée en terme d'apparition des différents sucres formés au cours du temps, étant donné que la variation de la quantité de chaque sucre due à l'action des protéines est différente de l'un à l'autre.

Le degré de purification de la FFT sera exprimé par l'étude de l'apparition des sucres de $DP \geq 6$, qui sont les sucres qui augmentent suite à l'action de la FFT.

Remarque : La détection ampérométrique pulsée répondant spécifiquement à chaque type de sucre, il nous aurait fallu isoler chaque sucre indépendamment (à utiliser comme standard interne) pour mettre en relation la surface d'un sucre donné à sa concentration en g / l.

Le tableau de la figure III.3 a et l'histogramme correspondant (figure III.3 b) représentent la variation de la teneur en différents sucres après avoir incubé l'extrait protéique pendant 43h00 dans le *néosugar*. On voit clairement par cette représentation qu'il y a production de fructose et de sucrose, que les sucres de $DP \geq 5$ augmentent d'autant moins que la chaîne est grande.

III.1.3 La composition des pics secondaires

Sur les chromatogrammes présentés à la figure III.1, on observe la présence de pics secondaires en avant des différents sucres de petits DP.

Ces pics sont présents dans le *néosugar*, substrat de l'enzyme FFT et sont présents dans les produits résultant de l'incubation de la solution protéique dans le *néosugar*.

Deux hypothèses sont émises concernant leur composition :

- soit ce sont des polyfructoses sans glucose terminal (F_n), substrat susceptible d'être utilisé par la FFT et l'exohydrolase.

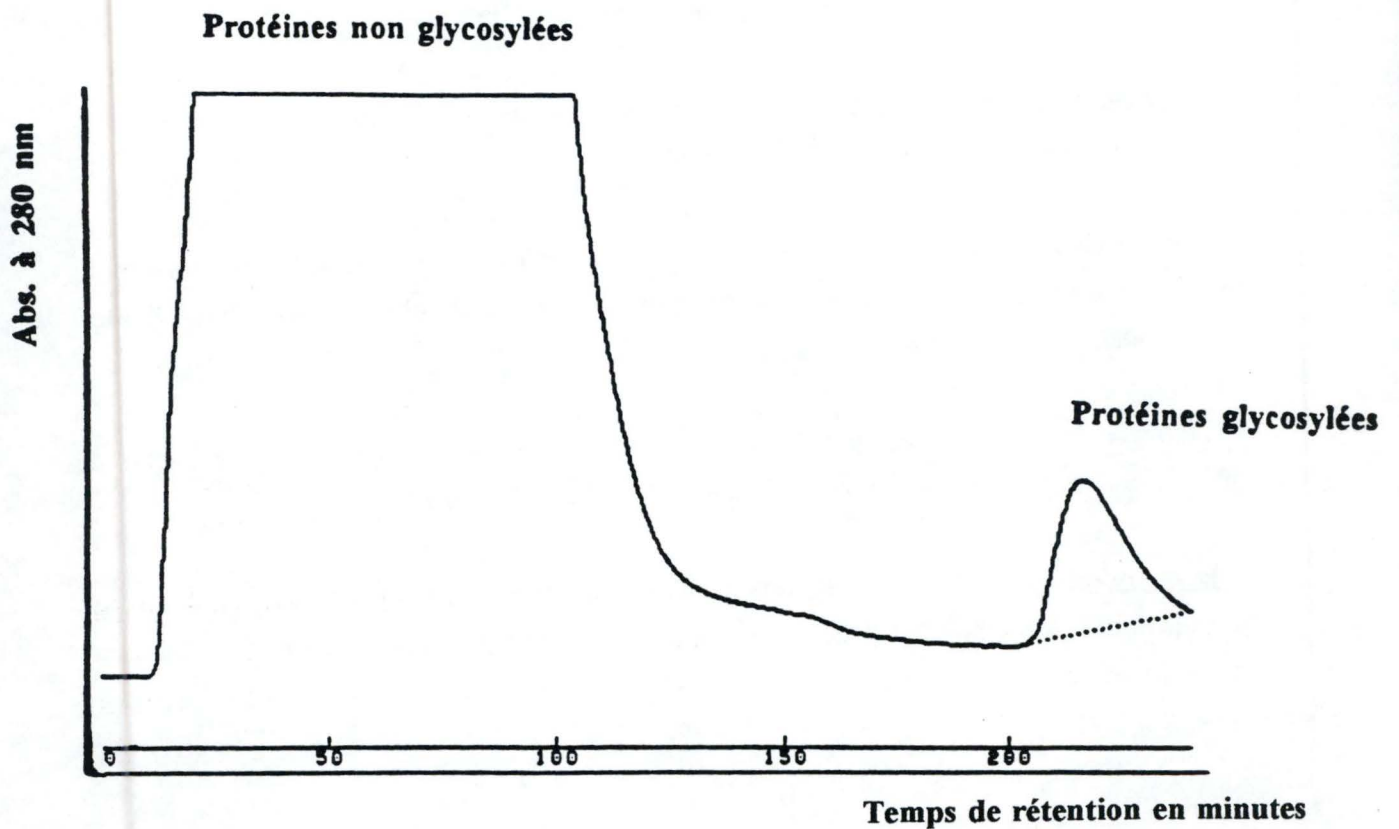


Figure III.4 : Profil d'élution des protéines isolées de la racine de chicorée après passage sur colonne d'affinité Con A-Sépharose-4B. Le premier pic qui sort correspond aux protéines non glycosylées qui ne sont pas retenues par la colonne. Le second pic correspond aux protéines glycosylées.

- soit ce sont des isoformes de l'inuline, substrat lui aussi susceptible d'être utilisé par la FFT et l'exohydrolase.

L'évolution des teneurs en ces sucres ne peut être interprétée. En effet, ces pics fusionnent avec le pic principal lorsque on monte dans les sucres de hauts degrés de polymérisation ($DP \geq 8$) (De Leenheer en Hoebregs, 1994).

Nous avons choisi de poursuivre la purification de la FFT par une chromatographie d'affinité. En effet, sachant que les enzymes responsables du métabolisme de l'inuline sont glycosylées, nous avons continué la purification par une chromatographie faisant appel à la concanavoline-Sépharose-4B.

III.2. LA CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE

La concanavoline, attachée de manière covalente à un support (le Sépharose), permet une chromatographie d'affinité où la molécule à purifier est spécifiquement et réversiblement adsorbée. La concanavoline lie les molécules qui contiennent des α -D-mannoses, des α -D-glucoses ainsi que les sucres qui contiennent des groupements hydroxyles en position C3, C4 et C5. Elle permet donc de séparer des glycoprotéines, des polysaccharides et des glycolipides.

L'extrait final, après avoir été filtré sur une membrane de $0,22 \mu\text{m}$, est déposé sur la colonne. Seules les protéines glycosylées y sont adsorbées. Les protéines non glycosylées sont récoltées pour un dosage protéique et un dosage d'activité FFT. L'éluion des protéines glycosylées se réalise avec de l' α -D-méthyl-mannopyranoside (figure III.4). Les protéines glycosylées sont récoltées afin de déterminer l'activité FFT présente.

Nous n'observons aucune activité FFT dans les aliquotes des protéines non-glycosylées, ce qui atteste de la spécificité de l'étape de chromatographie Con A (figure III.5 a et b), mais l'activité FFT est bien présente dans les protéines glycosylées (figure III.6 a et b). La quantité de sucrose et des $DP \geq 5$ augmentent au cours du temps, alors que la quantité de DP_3 et de DP_4 diminuent.

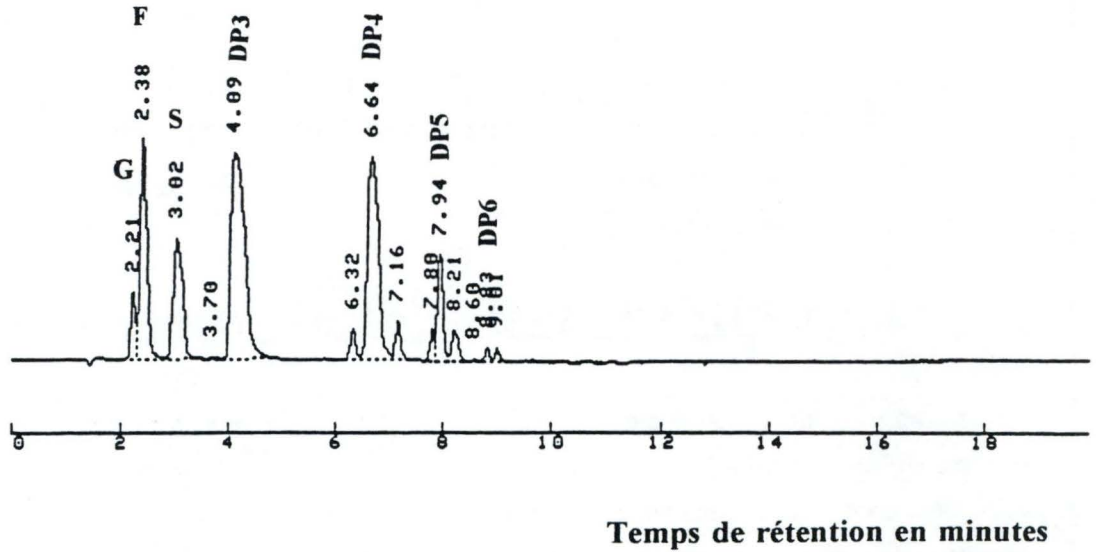
La quantité de fructose augmente toujours, ce qui atteste la présence de l'activité exohydrolase. Cette enzyme à activité exohydrolase s'avère donc être glycosylée.

Le tableau de la figure III.7 et l'histogramme correspondant comparent la variation de la teneur en différents sucres avant et après la chromatographie d'affinité Con A.

Figure III.5 : Profil d'élution par HPLC des sucres produits par l'incubation des protéines non glycosylées dans le *néosugar*.

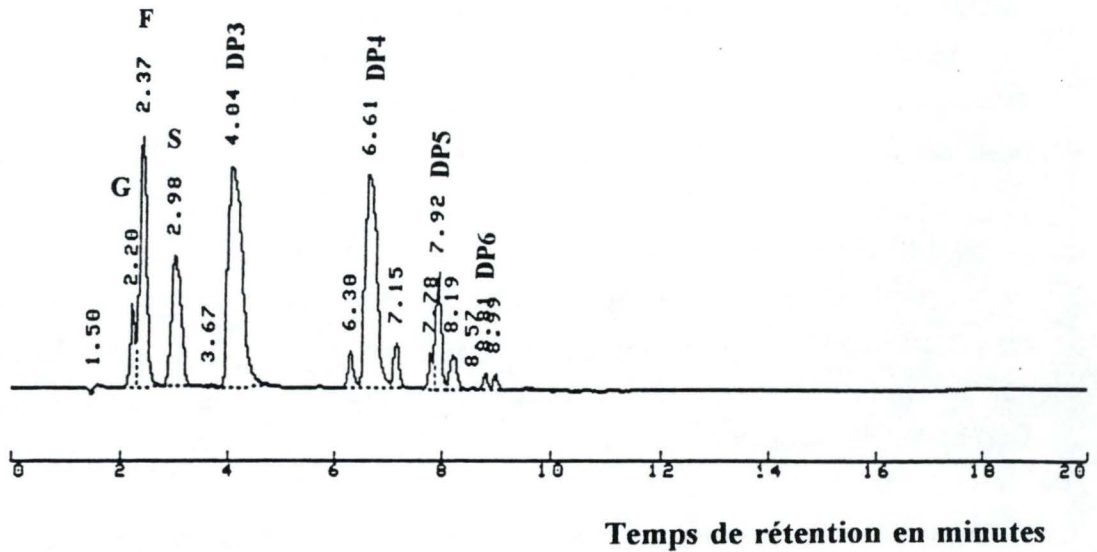
a)

Temps = 0h



b)

Temps = 43h00



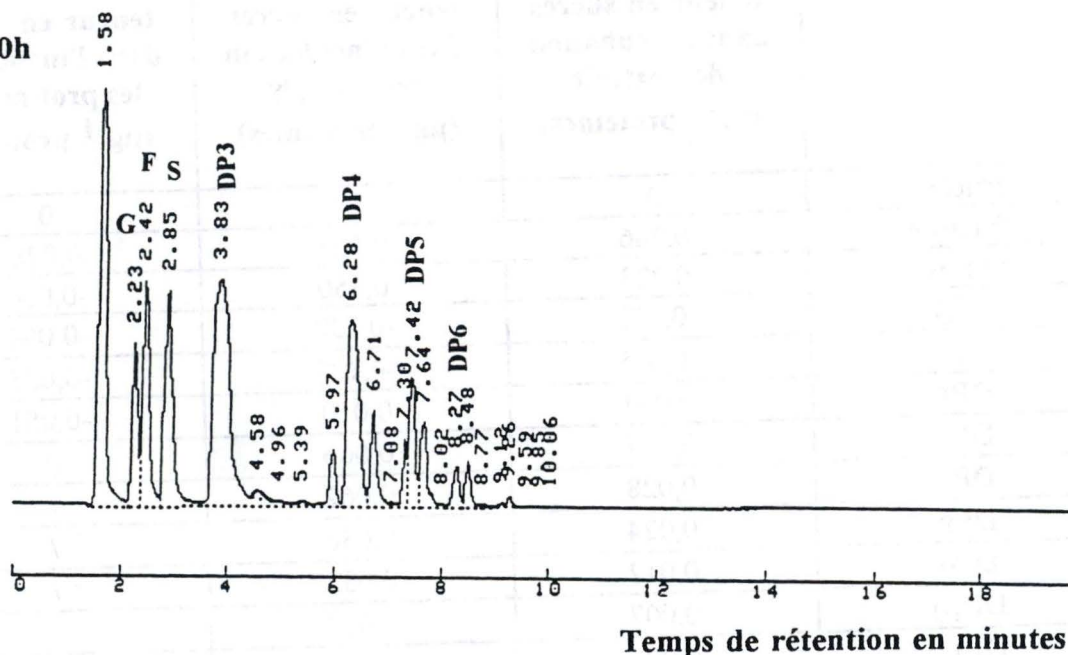
a : Les protéines non glycosylées en présence du *néosugar* au temps 0.

b : Séparation des sucres résultant de l'action des protéines non glycosylées sur le *néosugar* pendant 43h00 à 30°C.

Figure III.6 : Profil d'élution par HPLC des sucres produits par l'incubation des protéines glycosylées dans le *néosugar*.

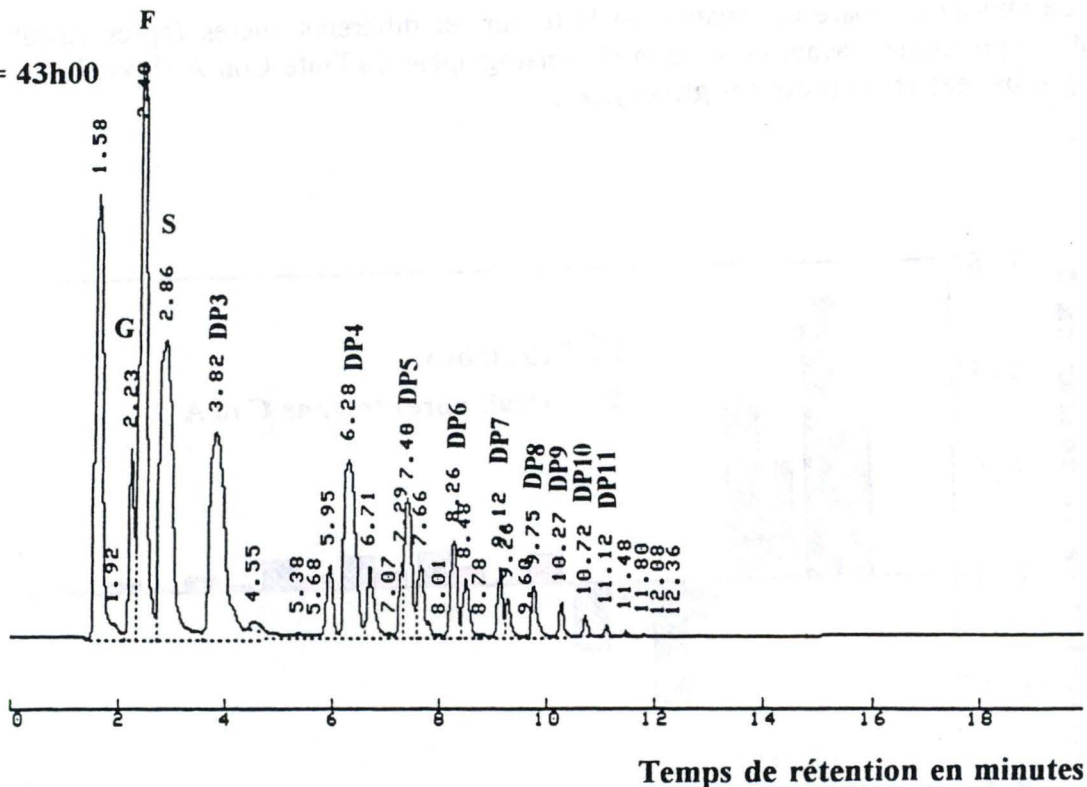
a)

Temps = 0h



b)

Temps = 43h00



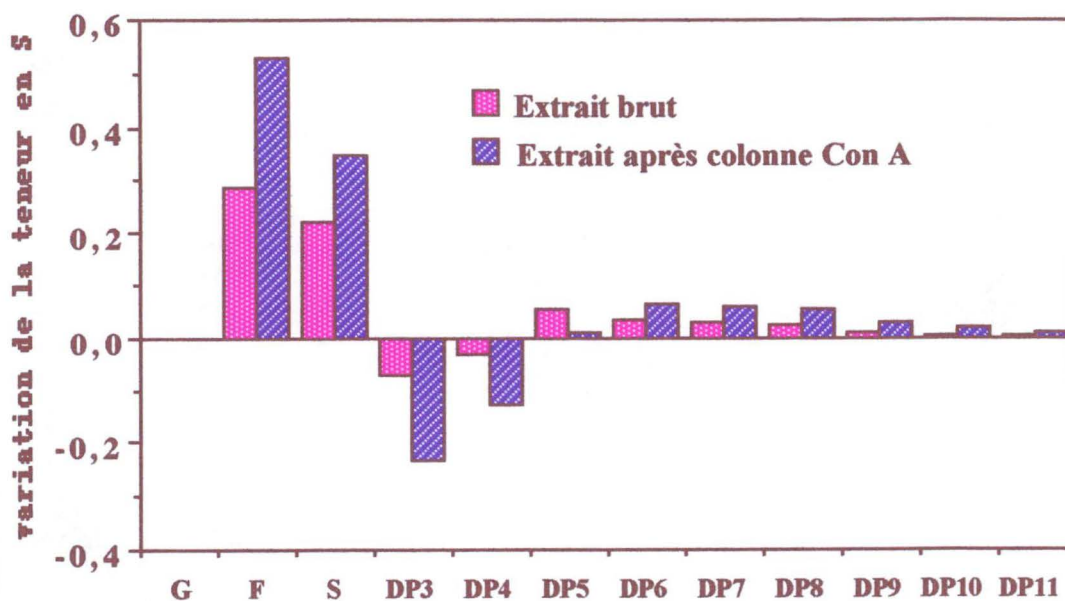
a : Les protéines glycosylées en présence du *néosugar* au temps 0.

b : Séparation des sucres résultant de l'action des protéines glycosylées sur le *néosugar* pendant 43h00 à 30°C.

Figure III.7 : Comparaison de la variation de la teneur en différents sucres avant et après la chromatographie d'affinité.

	variation de la teneur en sucres dans l'incubation de l'extrait (μg^{-1} protéines)	variation de la teneur en sucres dans l'incubation des prot gly (μg^{-1} protéines)	variation de la teneur en sucres dans l'incubation des prot non gly (μg^{-1} protéines)
glucose	0	0	0
fructose	0,286	0,528	0,028
sucrose	0,223	0,350	-0,004
DP3	-0,073	-0,232	-0,064
DP4	-0,028	-0,128	-0,038
DP5	0,054	0,010	-0,051
DP6	0,037	0,066	0
DP7	0,028	0,062	/
DP8	0,024	0,056	/
DP9	0,012	0,032	/
DP10	0,007	0,018	/
DP11	0,005	0,009	/

a : Ce tableau compare la variation de la teneur en différents sucres (après l'incubation des solutions protéiques) avant et après la chromatographie d'affinité Con A (l'extrait, les protéines non-glycosylées et les protéines glycosylées).



b : Histogramme comparant la variation de la teneur en différents sucres (après l'incubation des solutions protéiques) avant et après la chromatographie d'affinité Con A.

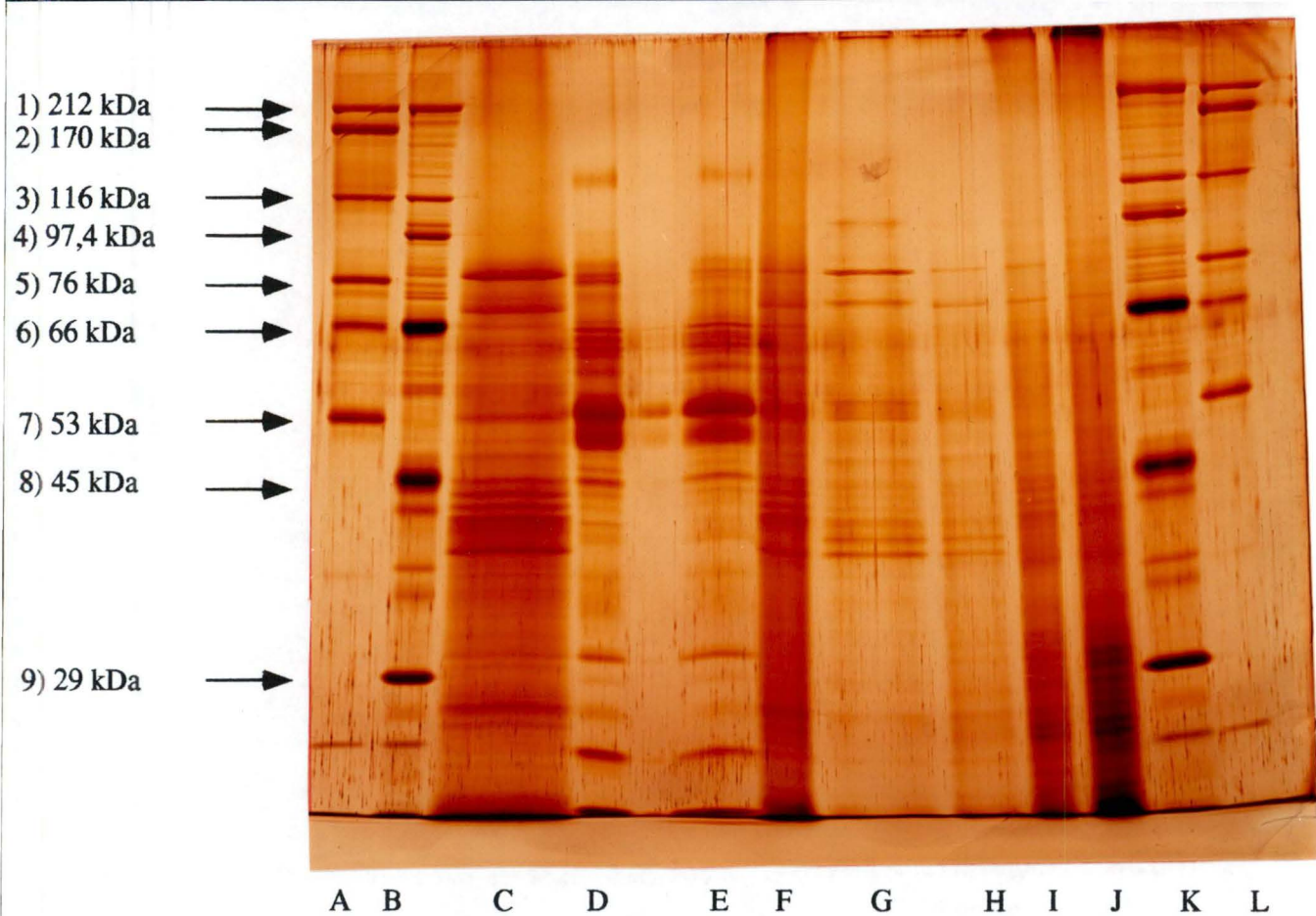


Figure III.8 : Gel SDS-Page avec en :

- Piste A : Les étalons (la myosine (1), l' α_2 -macroglobuline (2), la β -galactosidase (3), la transferrine (5), la déshydrogénase glutamique (7))
- Piste B : Les étalons (la myosine (1), la β -galactosidase (3), la phosphorylase b (4), la BSA (6), l'albumine d'oeuf (8), l'anhydrase carbonique (9))
- Piste C : Les protéines non glycosylées
- Piste D : Les protéines glycosylées concentrées
- Piste E : Les protéines glycosylées
- Piste F : L'extrait brut
- Piste G : Le surnageant après 70 % en sulfate d'ammonium
- Piste H : Le surnageant après 30 % en sulfate d'ammonium
- Piste I : L'extrait après centrifugation
- Piste J : L'extrait après filtration
- Piste K : Idem que piste B
- Piste L : Idem que piste A

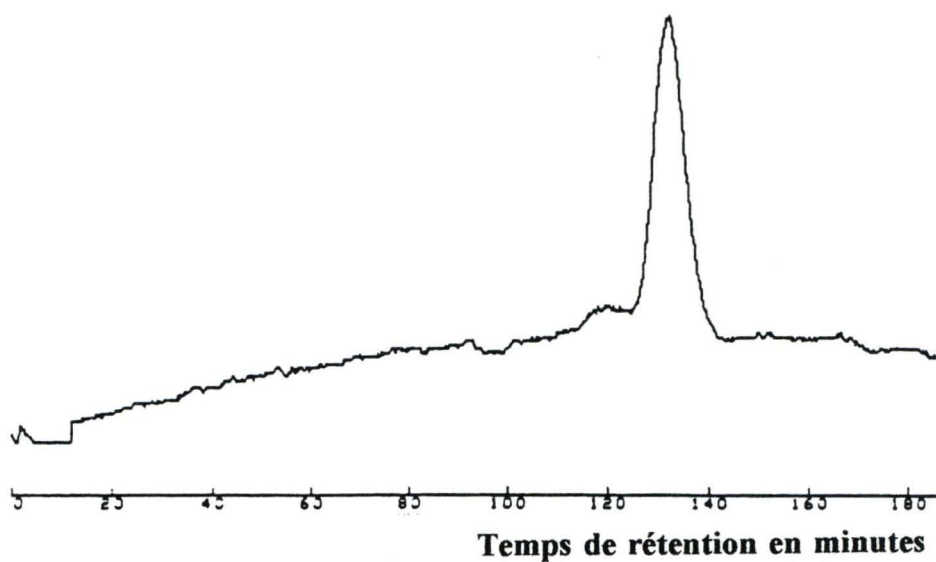


Figure III.9 : Profil d'élution des protéines glycosylées séparées par l'échange d'anions. Un seul pic sort entre 42 et 50 % en NaCl.

Après la chromatographie d'affinité, nous remarquons une diminution de la formation de DP5. Le degré de purification de la FFT pour chaque sucre de $DP \geq 6$ est doublé.

La photo de la figure III.8 présente l'évolution de la purification sur gel SDS-Page, des étapes de l'extraction, en passant par les protéines glycosylées et non glycosylées, ainsi que les protéines glycosylées concentrées sur un système de dialyse par centrifugations successives (le "Centriprep").

Nous remarquons que la chromatographie d'affinité élimine une grande partie des protéines obtenues par précipitation au sulfate d'ammonium.

Après cette première chromatographie, nous avons décidé de poursuivre la purification de la FFT par une chromatographie échangeuse d'anions.

III.3. LA CHROMATOGRAPHIE ECHANGEUSE D'ANIONS

Le choix de l'échangeuse d'ions est déterminé par la charge de la protéine qui dépend du pH de la solution. La littérature indique un point isoélectrique acide et une activité stable à pH 6,5 pour la FFT de différentes espèces. Si le pH de la solution est supérieur au pI de la protéine, la protéine sera chargée négativement. Elle peut donc être séparée sur colonne échangeuse d'anions.

Nous avons déposé sur une colonne Q-Sépharose les protéines glycosylées dans du tampon phosphate à pH 6,6. Le profil d'éluion par un gradient linéaire de NaCl (0-500 mM) est présenté à la figure III.9. Nous n'avons obtenu qu'un seul pic de protéines détectable entre 42 et 50 % en NaCl.

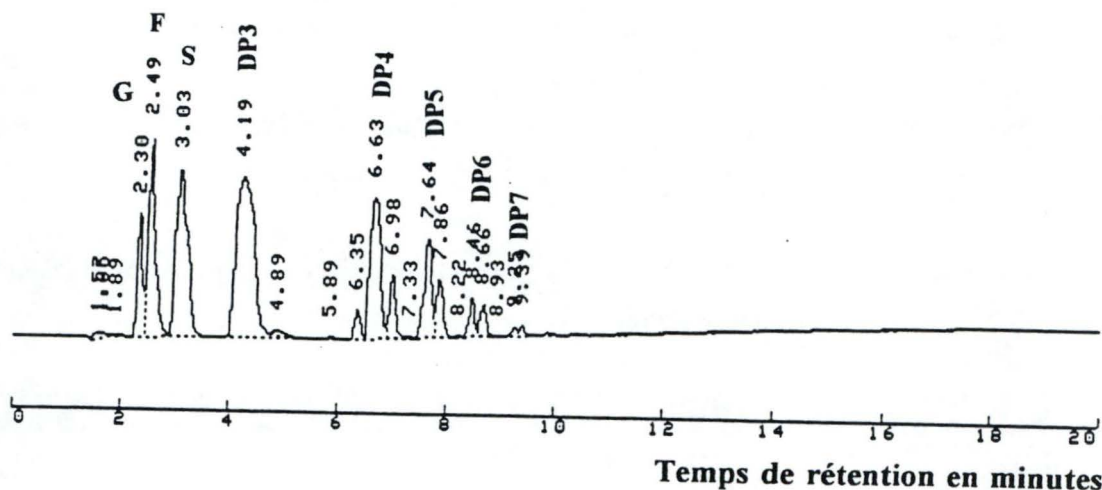
Lors de la première colonne de ce type, nous avons récolté le pic d'éluion en une seule fraction et mesuré la variation de la teneur en différents sucres suite à l'incubation pendant 43h00 de ces protéines dans le *néosugar* (tableau III.11). Les chromatogrammes des figures III.10 a et b nous montrent que nous avons en effet récolté la FFT dans le pic de protéines : nous observons une augmentation de la quantité de DP5 à DP7 et une apparition des $DP \geq 7$.

L'histogramme présenté à la figure III.12 compare la variation de la teneur en différents sucres dans les trois étapes de purification réalisées jusqu'à présent : dans l'extrait (en vert),

Figure III.10 : Profil d'élution par HPLC des sucres produits par l'incubation des protéines du pic récolté lors de l'échange d'anions dans le *néosugar*.

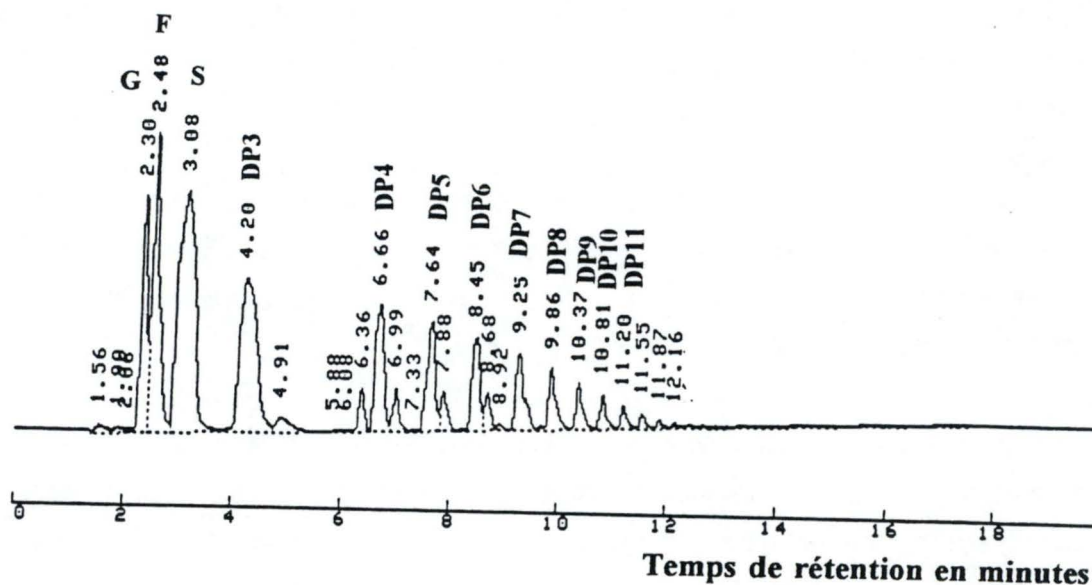
a)

Temps = 0h



b)

Temps = 43h00



a : Protéines du pic récolté lors de l'échange d'anions en présence du *néosugar* au temps 0.
b : Séparation des sucres résultant de l'action des protéines du pic récolté lors de l'échange d'anions sur le *néosugar* pendant 43h00 à 30°C.

sucre	variation de la teneur en différents sucres (μg^{-1} protéines)	sucre	variation de la teneur en différents sucres (μg^{-1} protéines)
glucose	0	DP6	0,038
fructose	-0,06	DP7	0,12
sucrose	0,12	DP8	0,095
DP3	-0,35	DP9	0,079
DP4	-0,33	DP10	0,060
DP5	-0,034	DP11	0,045

Tableau III.11 : Ce tableau représente la variation de la teneur en différents sucres suite à l'incubation pendant 43h00 dans le néosugar des protéines récolté dans le pic de l'échange d'anions.

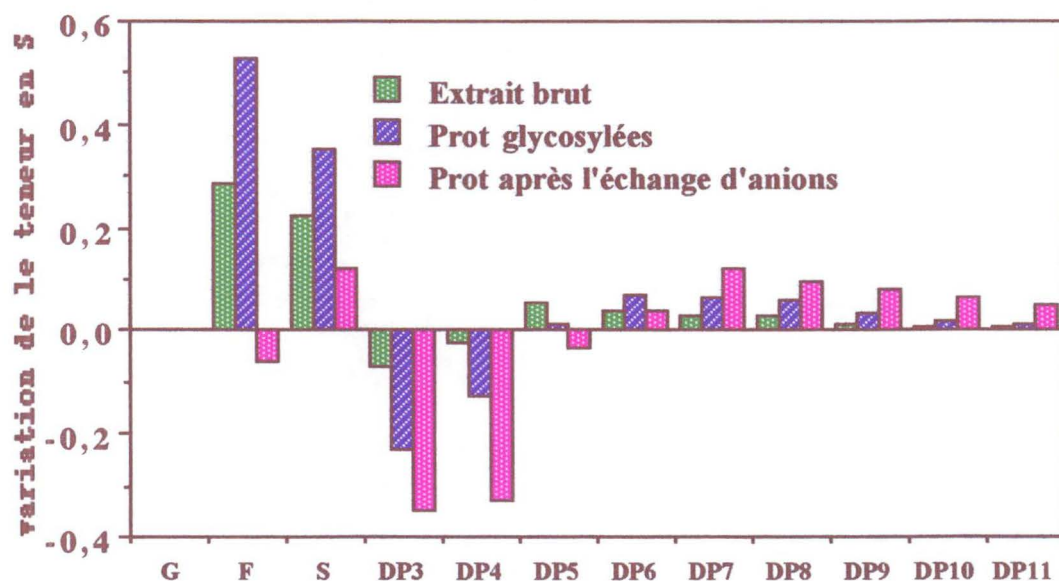


Figure III.12 : Evolution de la variation de la teneur en différents sucres (après l'incubation des solutions protéiques) au cours des trois étapes de purification (l'extraction, la chromatographie d'affinité et la chromatographie échangeuse d'anions). Les valeurs indiquées pour l'extrait et les protéines glycosylées proviennent de la figure III.7 a.

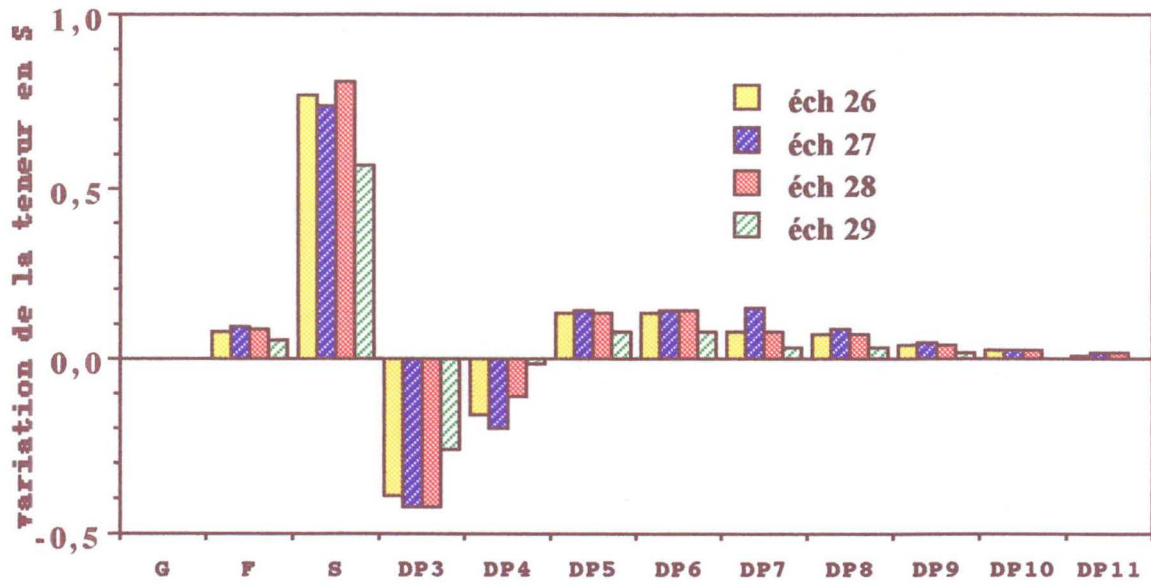


Figure III.13 : Comparaison de la variation de la teneur en différents sucres dans les quatre fractions numérotées de 26 à 29 récoltées dans le pic d'éluion des protéines à la sortie de la chromatographie échangeuse d'anions.

dans les protéines glycosylées (en bleu) et dans les protéines du pic récolté lors de l'échangeuse d'anions (en rose).

On constate toujours une diminution de la quantité de DP₃ et de DP₄ et à cette étape le DP₅ est aussi utilisé comme substrat. Nous observons une diminution de la production des DP₆.

De plus, nous voyons clairement qu'il n'y a plus de fructoses produits : cela suggère que nous avons éliminé l'activité exohydrolase.

Au cours d'une seconde chromatographie échangeuse d'anions, réalisée dans les mêmes conditions, nous avons à nouveau observé un seul pic entre 42 et 50 % en NaCl. Ce pic a été récolté en plusieurs fractions et nous avons calculé la variation de la teneur en différents sucres dans les différentes fractions.

L'histogramme de la figure III.13 compare la variation de la teneur en différents sucres pour les différentes fractions 26, 27, 28, 29. Il n'y a pas de différences marquées dans les trois premières fractions et l'activité diminue dans la dernière.

La colonne échangeuse d'anions purifie l'enzyme recherchée.

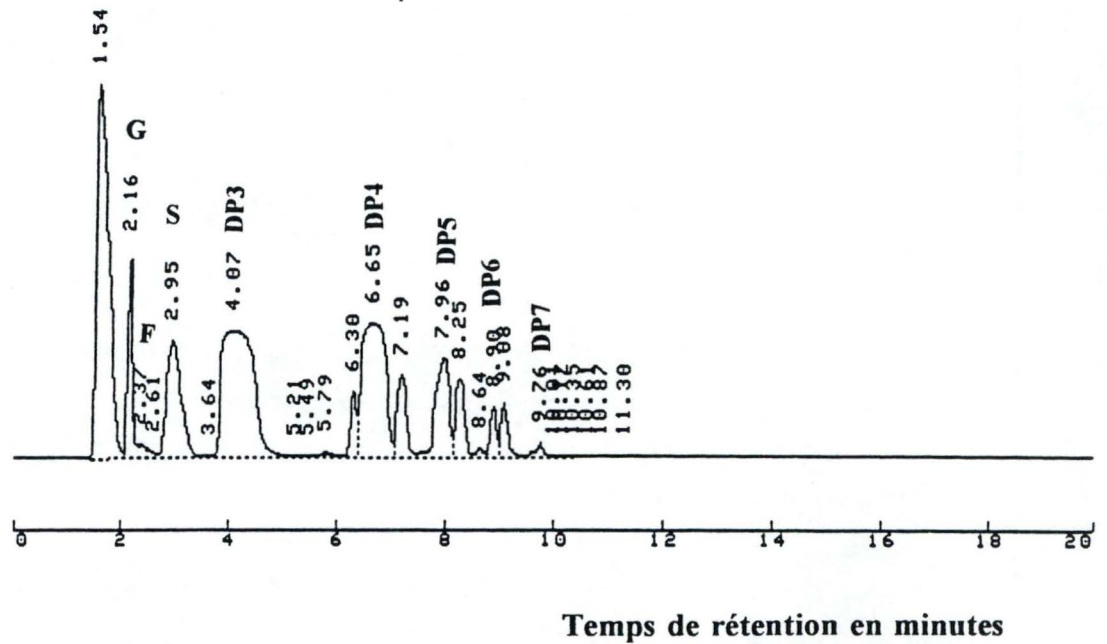
Toutefois, il faut prendre en compte que l'activité exohydrolase présente dans les protéines glycosylées masque l'activité réelle de la FFT sur son substrat. Les sucres produits par l'action FFT constituent le substrat de l'activité exohydrolase. Celle-ci hydrolyse les sucres nouvellement synthétisés et largue du fructose.

Nous ne pouvons pas estimer le degré de purification entre les deux chromatographies. Le degré de purification apparent entre ces deux étapes serait peut-être dû au fait que l'exohydrolase n'agit plus sur les sucres nouvellement formés après la colonne échangeuse d'anions. Cependant l'échangeuse d'anions constitue une étape de purification par le fait qu'elle supprime l'activité exohydrolase.

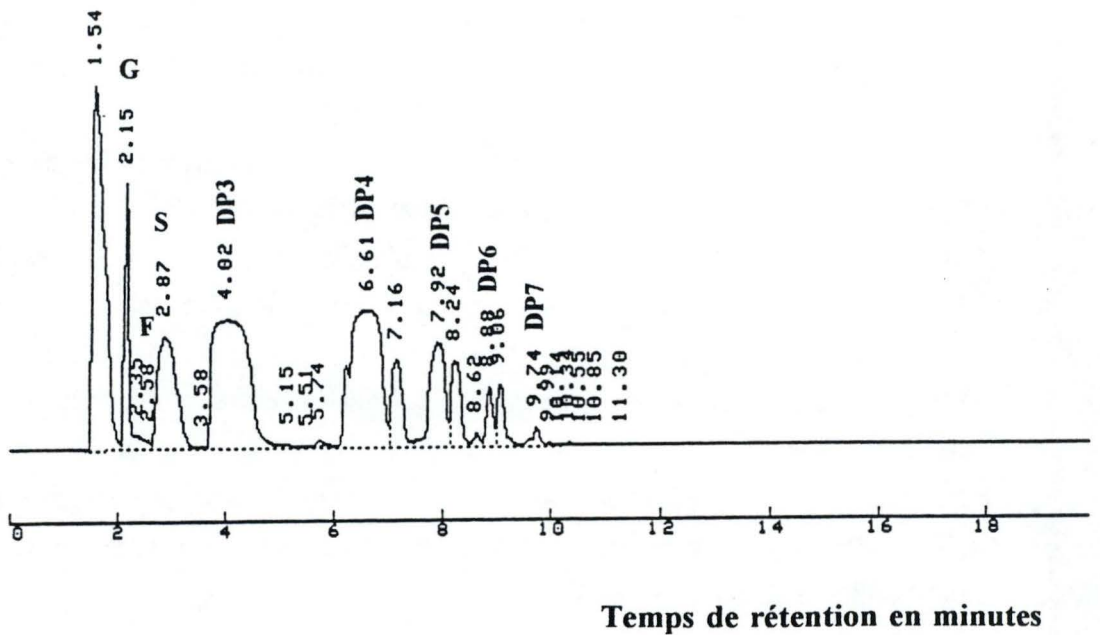
Les rendements de la chromatographie d'échange d'anions étant faibles, nous avons changé de technique de purification. Le but de ce travail étant de purifier l'enzyme afin d'en connaître la séquence en acides aminés et non pas ses caractéristiques biochimiques, nous avons décidé de poursuivre la séparation sur gels natifs et IEF à partir de protéines glycosylées.

Figure III.14 : Profil d'élution par HPLC des sucres produits par l'incubation des sections du gel natif dans le *néosugar*.

a)



b)



a : La section 1 du gel natif en présence du *néosugar* au temps 0.

b : La séparation des sucres résultant de l'action des protéines présentes dans la section 1 du gel natif sur le *néosugar* pendant 26h00 à 30°C.

III.4. SEPARATION PAR ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE

Nous avons poursuivi la purification par la séparation sur gel de polyacrylamide natif continu (non dénaturant) à partir des protéines glycosylées.

Ensuite, nous sommes passés à la technique de séparation selon le point isoélectrique sur gel IEF (isoelectric focusing), le but étant de parvenir à obtenir une bande sur gel coloré à l'argent, correspondant à l'activité FFT.

III.4.1 Les gels natifs continus (non dénaturants)

La stabilité de l'enzyme pouvant être affectée par des forces ioniques trop fortes ou trop faibles et des pH extrêmes, nous avons opté pour un gel natif continu au lieu d'un gel natif discontinu.

Lors d'un premier gel, nous avons déposé 50 µg de protéines glycosylées en présence de TRIS HCl pH 7,6. Sachant que la protéine concernée a un pI acide, elle sera donc chargée négativement. Sa migration s'effectuera vers l'anode dans un tampon TRIS Glycine pH 8,3 à 4°C.

Le gel obtenu a été sectionné horizontalement en 13 parties égales de 1cm. Ces sections ont été mises à incuber avec le *néosugar* 25 mM, tampon acétate de sodium 20 mM pH 5,5. Les sections du gel ont un pH 8,3; c'est pourquoi le milieu d'incubation a été mis de suite à pH 5,5 avec de l'acide acétique dilué.

Après 26h00 d'incubation, les chromatogrammes ne montrent aucune activité FFT détectable par HPLC dans aucune section. Le chromatogramme de la première section, identique à tous les chromatogrammes des autres sections, est présenté à la figure III.14.

Remarque : La quantité de protéines dans chaque section ne pouvant pas être estimée, nous ne parlerons pas de variation de la teneur en différents sucres, suite à l'incubation, mais nous parlerons plutôt d'absence ou de présence d'activité FFT dans chaque section.

Afin d'éviter tout problèmes d'inactivation enzymatique dans le gel natif, nous avons d'abord effectué une série d'essais d'incubation de protéines glycosylées en présence des différents constituants du gel et des tampons utilisés.

sucres	Variation de la teneur en différents sucres (μg^{-1} protéines)				
	le contrôle positif	APS 10% (25 μl / ml)	APS 10% (10 μl / ml)	TEMED (1 μl / ml)	Riboflavine (0,25mg / ml)
DP6	0,024	-0,012	0,02	0,014	0,068
DP7	0,045	-0,011	-0,003	0,005	0,037
DP8	0,025	/	/	/	0,054
DP9	0,014	/	/	/	0,029
DP10	0,006	/	/	/	0,015
DP11	0,001	/	/	/	0,007

Tableau III.15 : Ce tableau représente la variation de la teneur en différents sucres ($6 \leq \text{DP} \leq 11$) suite à l'activité FFT dans les essais d'incubation avec les différents catalyseurs.

Dans les différents essais d'incubation, nous ne parlerons que de la variation de la teneur en sucres de $DP \geq 6$.

a) Le contrôle positif

Nous avons incubé 50 μg de protéines glycosylées dans le *néosugar* 25 mM, tampon acétate de sodium 20 mM pH 5,5. Après 20h00 d'incubation, nous avons observé une variation nette de la quantité des sucres de $DP \geq 6$ (voir tableau III.15).

Le gel natif classique est constitué d'acrylamide 30 %, bisacrylamide 0,8 %, de TEMED, d'APS 10 %, de TRIS 25 mM, de Glycine 192 mM et d'eau distillée.

b) Nous avons commencé par tester les catalyseurs, susceptibles d'inhiber l'enzyme en formant des radicaux libres qui pourraient attaquer les acides aminés des protéines.

L'APS 10% (25 μl / ml)

Nous avons incubé 50 μg de protéines glycosylées dans le *néosugar* 25 mM, tampon acétate de sodium 20 mM pH 5,5 en présence d'APS à une concentration de 25 μl / ml de milieu d'incubation. Après 20h00 d'incubation, nous n'avons observé aucune variation de la quantité de sucres de $DP \geq 6$ (voir tableau III.15).

L'APS 10% (10 μl / ml)

Nous avons répété la même expérience avec une quantité moindre en APS, 10 μl / ml de milieu d'incubation, quantité à laquelle la polymérisation est encore possible. Après 20h00 d'incubation, nous n'avons observé aucune variation de la quantité de sucres de $DP \geq 6$ (voir tableau III.15).

Nous remarquons nettement que l'APS inhibe l'enzyme FFT. En fait, l'APS, très instable en solution aqueuse, peut former spontanément des radicaux libres, même en absence d'acrylamide. Ces radicaux libres oxydent les résidus cystéine en acides cystéiques (Righetti, 1988).

Cette dénaturation par l'APS, indique que les cystéines sont importantes pour le fonctionnement de l'enzyme : elles pourraient être présentes dans le site actif et leur oxydation gênerait l'activité enzymatique, ou alors agirait sur des cystéines importantes pour la conformation native de l'enzyme.

Variation de la teneur en différents sucres (μg^{-1} protéines)				
Sucres	TRIS HCl 100 mM pH 7,6 (mis à pH de suite)	TRIS HCl 100 mM pH 7,6 (mis à pH après 5h00)	TRIS 25 mM, Glycine 192 mM pH 8,3 (mis à pH de suite)	TRIS 25mM, Glycine 192 mM pH 8,3 (mis à pH après 5h00)
DP6	0,023	0,018	0,033	-0,003
DP7	0,043	0,009	0,028	0,005
DP8	0,033	0,022	0,040	/
DP9	0,019	0,011	0,025	/
DP10	0,011	0,005	0,016	/
DP11	0,006	0,002	0,010	/

Tableau III.16 : Ce tableau représente la variation de la teneur en différents sucres ($6 \leq DP \leq 11$) suite à l'activité FFT dans les essais d'incubation avec le tampon dans lequel les protéines sont déposées et le tampon de migration.

Le TEMED (1 µl / ml)

Nous avons incubé 50 µg de protéines glycosylées dans le *néosugar* 25 mM, tampon acétate de sodium 20 mM pH 5,5 en présence de TEMED à une concentration de 1 µl / ml de milieu d'incubation. Après 20h00 d'incubation, nous n'avons observé que très peu de variation de la quantité de sucres de $DP \geq 6$ (voir tableau III.15).

Nous remarquons que le TEMED à cette concentration inhibe l'enzyme FFT.

L'APS inhibant, nous l'avons remplacé par un autre catalyseur, la riboflavine.

La Riboflavine (0,25 mg / ml)

Nous avons incubé 50 µg de protéines glycosylées dans le *néosugar* 25 mM, tampon acétate de sodium 20 mM pH 5,5 en présence de la riboflavine à une concentration de 0,25mg / ml de milieu d'incubation. Après 20h00 d'incubation, nous observons une nette variation de la quantité de sucres de $DP \geq 6$ (voir tableau III.15).

La riboflavine, seule, ne semble pas gêner l'activité FFT.

c) Après avoir essayé les catalyseurs, nous avons testé le tampon dans lequel les protéines sont déposées.

TRIS HCl pH 7,6 100 mM

Nous avons incubé 50 µg de protéines glycosylées dans le *néosugar* 25 mM, tampon acétate de sodium 20 mM pH 5,5 et en présence de TRIS HCl pH 7,6 100 mM, le tampon dans lequel les protéines sont déposées.

D'une part, nous avons testé l'activité en mettant le milieu d'incubation à pH 5,5 directement avec de l'acide acétique dilué. Après 65h00 d'incubation, nous avons observé une variation nette de la quantité des sucres de $DP \geq 6$ (voir tableau III.16).

Cela indique que les ions TRIS HCl ne semblent pas gêner l'activité FFT.

D'autre part, nous avons testé l'activité en mettant le milieu d'incubation à pH 5,5 cinq heures plus tard, heures durant lesquelles ont lieu la migration, avec de l'acide acétique dilué. Après 65h00 d'incubation, nous avons observé une variation nette de la quantité des sucres de $DP \geq 6$ (voir tableau III.16).

Cela indique que le pH du tampon (ici 7,6) ne semble pas gêner l'activité FFT.

d) Après avoir essayé le tampon utilisé pour déposer les protéines, nous avons testé le tampon de migration (tampon du gel).

TRIS 25 mM, Glycine 192 mM pH 8,3

Nous avons incubé 50 µg de protéines glycosylées avec le *néosugar* 25 mM, tampon acétate de sodium 20 mM pH 5,5 en présence du tampon TRIS 25 mM, Glycine 192 mM pH 8,3, le tampon dans lequel s'effectue la migration.

D'une part, nous avons testé l'activité en mettant le milieu d'incubation à pH 5,5 directement avec de l'acide acétique dilué. Après 75h00 d'incubation nous avons observé une nette variation de la quantité de sucres de DP ≥ 6 (voir tableau III.16).

Nous savons par l'expérience réalisée ci-dessus que le TRIS n'interfère pas avec l'activité. Cette expérience nous apprend que la Glycine à 192 mM ne gêne pas aussi l'activité FFT.

D'autre part, nous avons testé l'activité en mettant le milieu d'incubation à pH 5,5 cinq heures plus tard, heures durant lesquelles ont lieu la migration, avec de l'acide acétique dilué. Après 65h00 d'incubation, nous n'observons aucune variation de la quantité de sucres de DP ≥ 6 (voir tableau III.16).

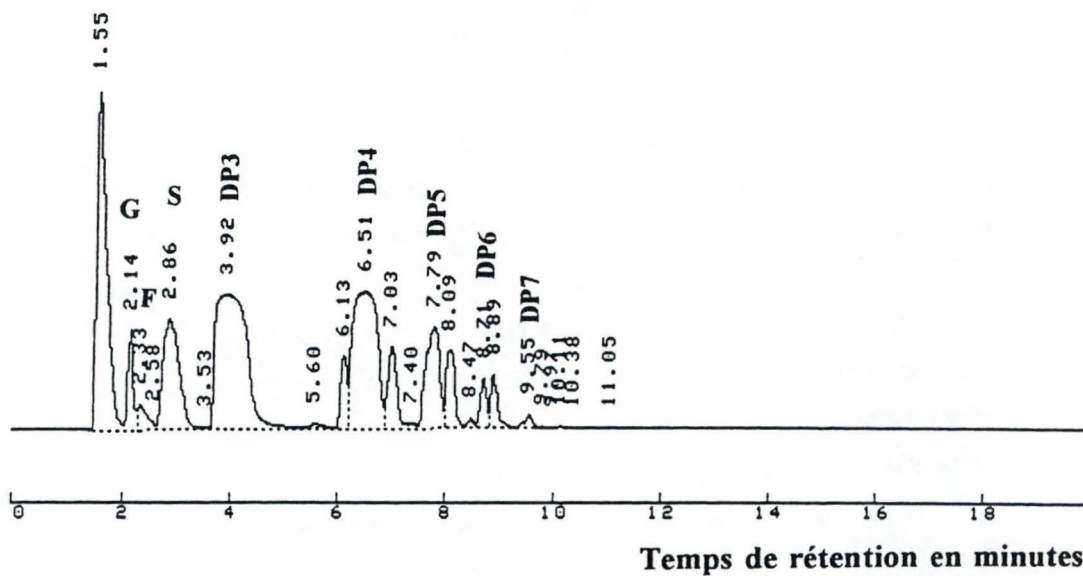
Ce qui suggère que le pH du tampon (ici 8,3) semble gêner l'activité FFT.

Pour résumer :

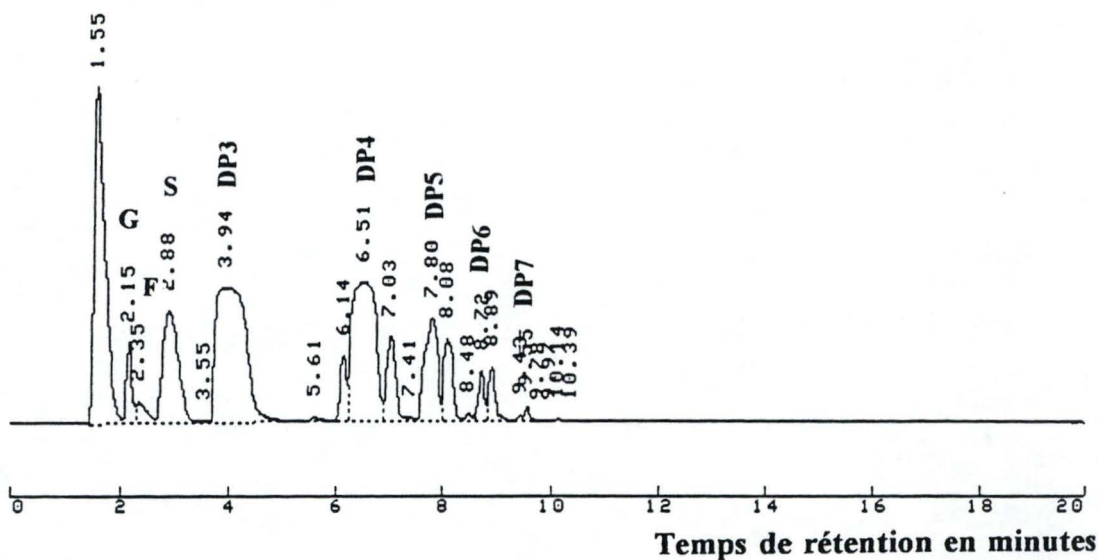
<u>substances</u>	<u>activité enzymatique</u>
TEMED (1µl / ml)	absente
APS (25µl / ml)	absente
APS (10µl / ml)	absente
Riboflavine (0,25mg / ml)	présente
TRIS HCl 100 mM pH 7,6 (mis à pH de suite)	présente

Figure III.17 : Profil d'éluion par HPLC des sucres produits par l'incubation des sections du gel natif dans le *néosugar*.

a)



b)



a : La section 1 du gel natif en présence du *néosugar* au temps 0.

b : La séparation des sucres résultant de l'action des protéines présentes dans la section 1 du gel natif sur le *néosugar* pendant 20h00 à 30°C.

TRIS HCl 100 mM pH 7,6 (mis à pH après 5h00)	présente
TRIS 25 mM, Glycine 192 mM pH 8,3 (mis à pH de suite)	présente
TRIS 25 mM, Glycine 192 mM pH 8,3 (mis à pH après 5h00)	absente

Suite à ces différents essais, nous avons une alternative à l'utilisation du catalyseur APS, la riboflavine; l'inhibition par le pH 8,3 nous oblige à changer le pH du tampon de migration TRIS Glycine à pH 7,6. Pour le gel IEF par la suite, l'APS a été aussi remplacé par de la riboflavine.

Nous avons réalisé un gel natif (1,5 mm) de composition :

- acrylamide 30%	10 ml
bisacrylamide 0,8%	
- TRIS Glycine pH 7,6	8 ml
- H ₂ O	20 ml
- TEMED	15 µl
- Riboflavine (40 µg / ml)	3,333 ml
	<hr/>
	40 ml

La polymérisation de l'acrylamide avec la riboflavine exige une illumination continue et une faible présence d'oxygène.

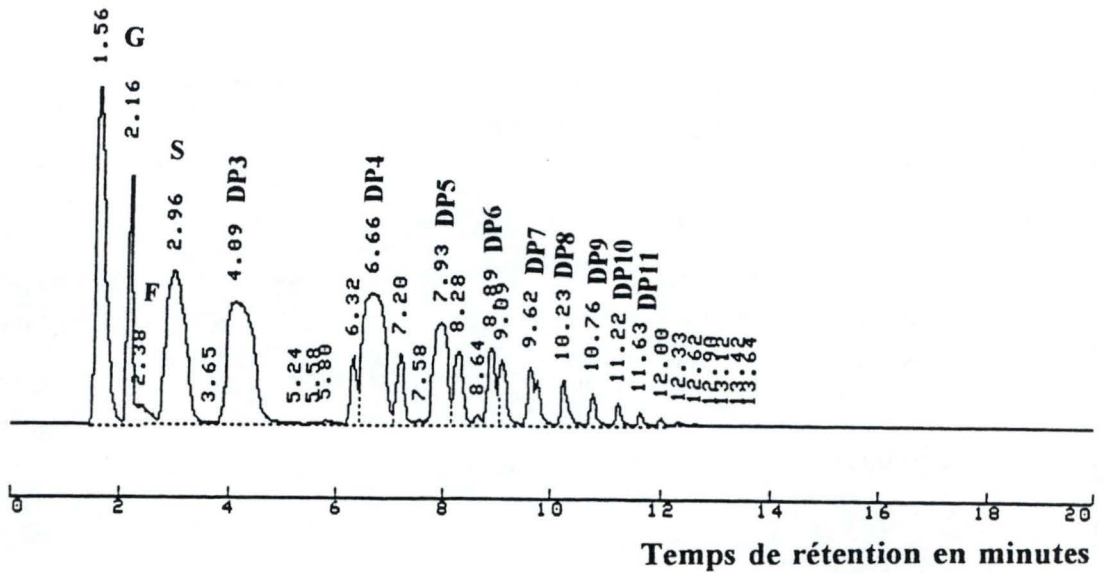
Nous avons déposé 50 µg de protéines glycosylées dans un tampon TRIS HCl 100 mM pH 7,6. La migration s'est effectuée avec du tampon TRIS Glycine (5 X dilué) pH 7,6.

Le gel obtenu a été sectionné horizontalement en 13 parties égales de 1 cm. Ces sections ont été mises à incuber avec le *néosugar* 25 mM, tampon acétate de sodium 20 mM pH 5,5. Ensuite le milieu d'incubation a été mis à pH 5,5 avec de l'acide acétique dilué.

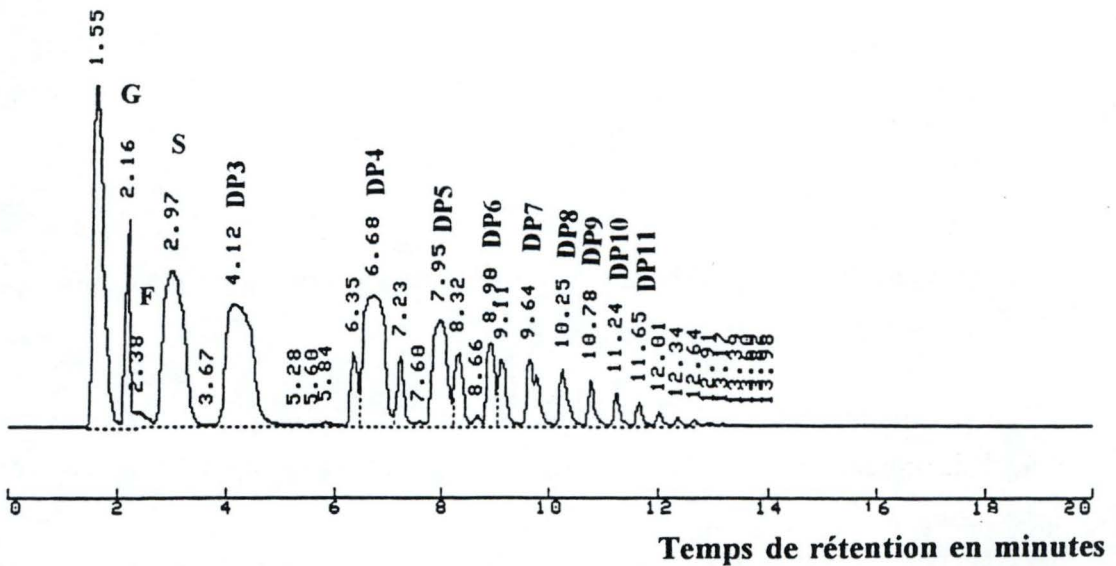
Après 20h00 d'incubation, les chromatogrammes ne montrent aucune activité FFT détectable par HPLC dans aucune section. Le chromatogramme de la première section, identique à tout les chromatogrammes des autres sections est présenté à la figure III.17.

Figure III.18 : Profil d'élution par HPLC des sucres produits par l'incubation des sections du gel natif dans le *néosugar*.

a)



b)



a : La séparation des sucres résultant de l'action des protéines présentes dans la **section 2** sur le *néosugar* pendant 20h00 à 30°C.

b : La séparation des sucres résultant de l'action des protéines présentes dans la **section 3** sur le *néosugar* pendant 20h00 à 30°C.

Comment notre enzyme serait-elle inhibée ?

En fait, la polymérisation de la riboflavine, le catalyseur, avec l'acrylamide entraîne la formation de radicaux libres attaquant les groupements thiols des protéines.

La littérature indique qu'un pré-run (pré-migration) d'une nuit en présence de thioglycolate (0,1 mM dans le gel et dans la cuve côté cathodique) réduirait les radicaux libres (Righetti, 1988).

Nous avons à nouveau réalisé un gel dans les mêmes conditions, mais en présence de thioglycolate dans le gel et dans la cuve côté cathodique et avons effectué un pré-run d'une nuit à 15 mA.

250 µg de protéines glycosylées ont été déposées dans un tampon TRIS HCl 100 mM pH 7,6. La migration s'est effectuée dans du tampon TRIS Glycine pH 7,6 (dilué 5X).

Le gel obtenu a été sectionné en 13 parties horizontales égales de 1 cm. Ces sections ont été mises à incuber dans le *néosugar* 25 mM, tampon acétate de sodium 20 mM pH 5,5. Le milieu d'incubation a été mis à pH 5,5 de suite avec de l'acide acétique dilué.

Après 20h00 d'incubation, nous avons observé une activité FFT dans la **section 2** et dans la **section 3** détectable par HPLC (figure III.18).

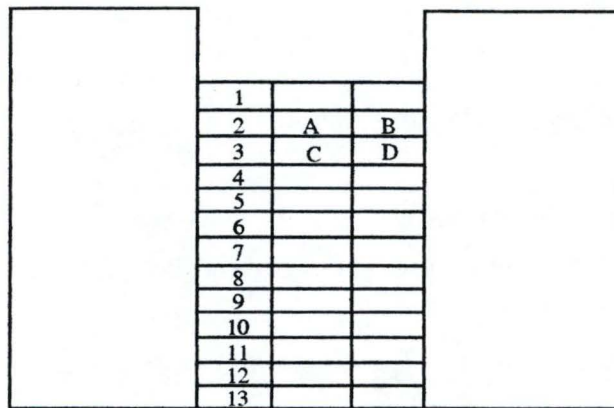
Nous avons poursuivi la purification sur gel IEF (isoelectric focusing).

III.4.2 Les gels IEF (isoelectric focusing)

Nous avons à nouveau réalisé un gel natif (0,75 mm) dans les mêmes conditions (avec 500 µg de protéines glycosylées). Nous avons sectionné le gel en trois pistes parallèles :

- une première piste a été découpée en 13 sections horizontales afin de détecter l'activité FFT présente suite à l'incubation dans le *néosugar*.
- une seconde piste a été déposée sur gel IEF (les sections possédant de l'activité).
- une troisième piste (les sections possédant de l'activité) a été destinée à la coloration à l'argent après migration sur gel IEF.

Le gel natif



Le gel IEF

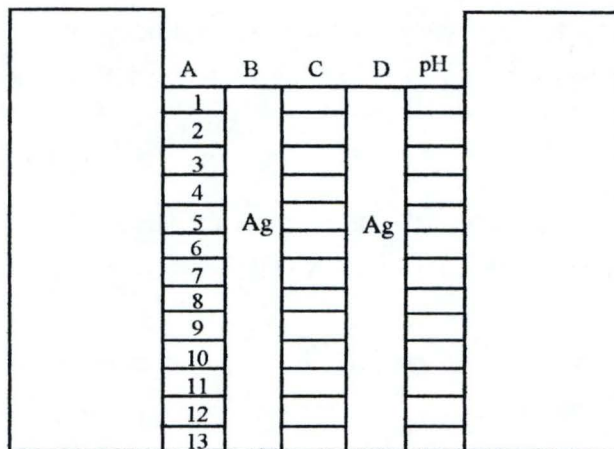
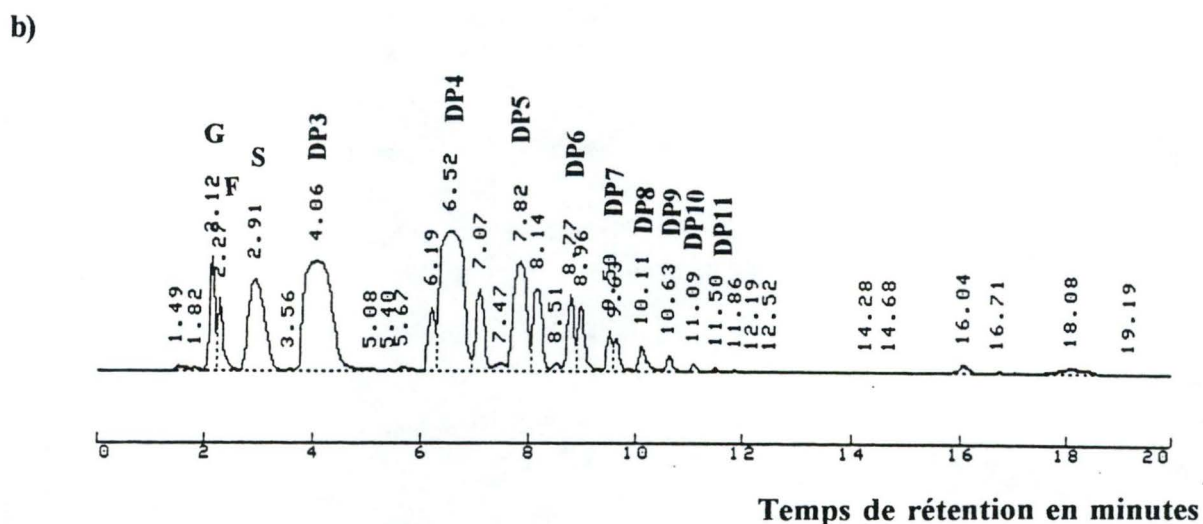
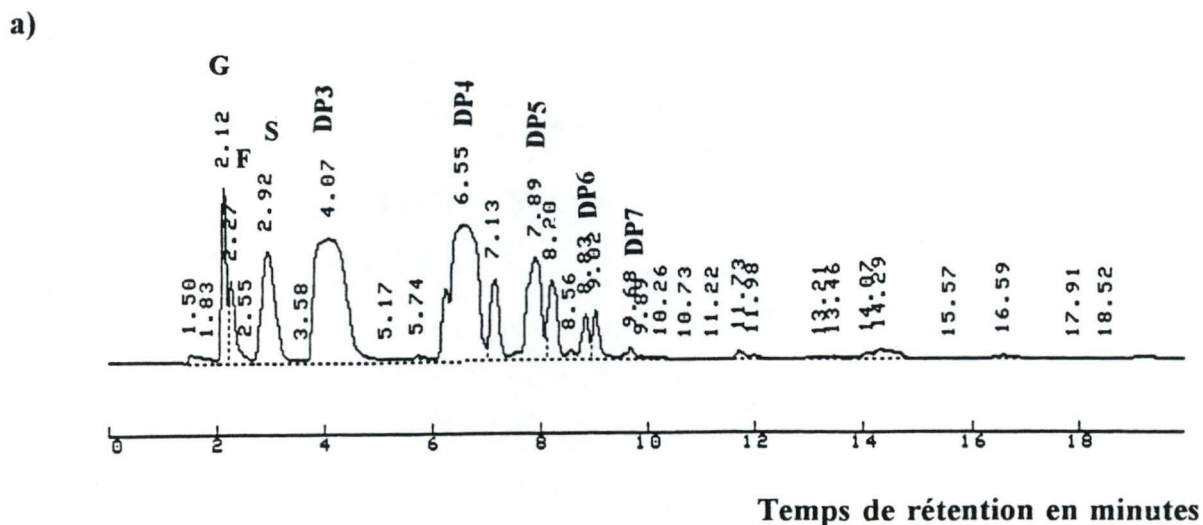


Figure III.19 : Schéma représentant la procédure de séparation sur gel natif et IEF.

Figure III.20 : Profil d'élution par HPLC des sucres produits par l'incubation des sections du gel IEF dans le *néosugar*.



a : La section 8 du gel IEF en présence du *néosugar* au temps 0.

b : La séparation des sucres résultant de l'action des protéines présentes dans la section 8 du gel IEF sur le *néosugar* pendant 72h00 à 30°C.

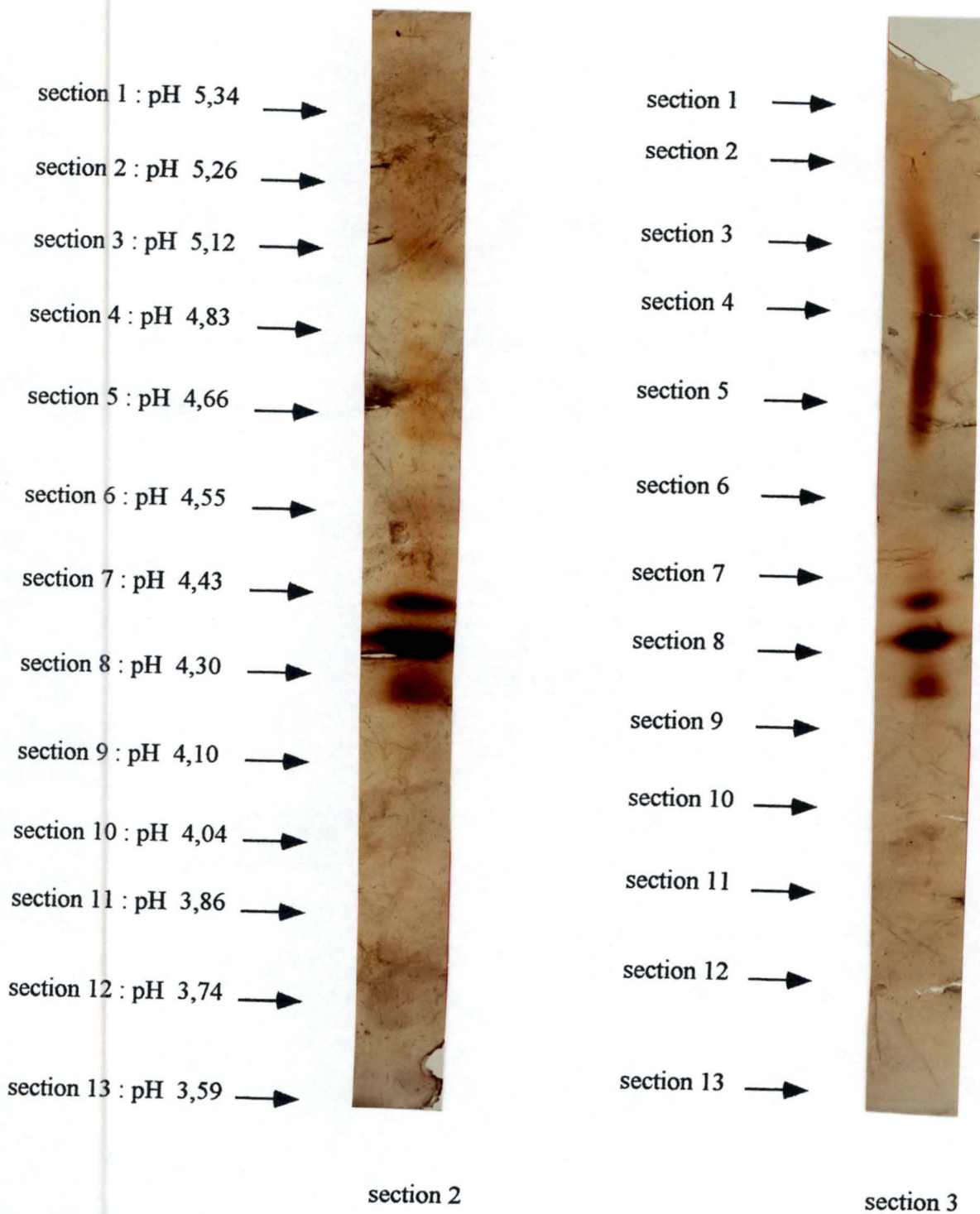


Figure III.21 : Les sections 2 et 3 du gel natif ont été séparées sur gel IEF colorées à l'argent. L'activité a été observée dans la section 8 du gel IEF à pH 4,30 de la section 2.

Avant de prendre connaissance des activités du gel natif, nous avons déposé anticipativement les sections 2 et 3 du gel natif sur gel IEF. Le gel IEF a été réalisé aussi avec de la riboflavine et du thioglycolate.

Un pré-run d'une nuit, à 15 mA, a été effectué avec du thioglycolate dans la cuve du côté cathodique.

Après migration, le gel IEF obtenu a été sectionné en 3 pistes parallèles :

- une piste (pour chacune des deux sections du gel natif) a été découpée en 13 sections horizontales afin de détecter l'activité FFT présente, suite à l'incubation dans le néosugar.

- une piste (pour chacune des deux sections du gel natif) a été colorée à l'argent.

- une piste a été découpée en 13 sections horizontales afin de vérifier si le gradient de pH s'était bien effectué.

La figure III.19 représente l'ensemble de la procédure de séparation sur gel natif et IEF.

Après 22h00 d'incubation pour les sections du gel natif, nous avons observé une activité détectable par HPLC dans les sections 1 et 2. Or ce sont les sections 2 et 3 qui ont été placées sur gel IEF, donc nous devons trouver normalement de l'activité dans les incubations des sections du gel IEF provenant de la migration de la section 2 du gel natif.

Après 72h00 d'incubation pour les sections du gel IEF, nous avons observé une activité détectable par HPLC dans la section 8 à pH 4,30 du gel provenant de la migration de la section 2 du gel natif (figure III.20).

Les photos de la figure III.21 montrent les protéines des sections 2 et 3 séparées sur gel IEF colorées à l'argent. La comparaison des deux profils au niveau de la section 8 à pH à 4,30 montre la présence des deux mêmes bandes. Or les unes possèdent de l'activité (celles de la section 2) et les autres pas (celles de la section 3). Cela nous laisse penser qu'il y aurait une ou plusieurs protéines présentes dans la bande plus importante.

IV. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Au cours de ce mémoire, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux enzymes synthétisant l'inuline chez la chicorée industrielle (*Chicorium Intybus L.*) : la SST, d'une part, synthétiserait de l'isokestose (DP₃) à partir de deux molécules de sucrose, la FFT, d'autre part, utiliserait le DP₃ comme donneur de fructosyls pour la synthèse de molécules de fructanes.

La synthèse enzymatique "de novo" d'inuline à partir de sucrose par l'association SST/FFT n'est toutefois pas encore clairement comprise. La purification de ces enzymes était une étape nécessaire pour mieux comprendre le métabolisme des fructanes.

Toutes les purifications des activités SST et FFT réalisées jusqu'il y a peu chez diverses espèces végétales n'avaient pas permis d'affirmer avec certitude la présence d'enzymes distinctes. On aurait pu imaginer qu'il y avait une seule enzyme responsable des deux activités.

Dans un récent article concernant la purification de la FFT, AJ Koops et HH Jonker sont parvenus à séparer les deux activités enzymatiques par une précipitation sélective au sulfate d'ammonium.

Les purifications de ces enzymes chez la chicorée industrielle, réalisées au laboratoire, ont confirmé la présence de deux protéines distinctes.

En effet, ces enzymes possèdent des points isoélectriques distincts, la SST à un pH proche de 5, la FFT à un pH proche de 4,5.

De plus, ces enzymes possèdent différentes sensibilités aux constituants d'un gel natif. La SST n'est pas sensible à la présence d'APS, alors que la FFT y est sensible : rappelons que l'APS peut former des radicaux libres, attaquant les groupements cystéines de la protéine, lors de la polymérisation avec l'acrylamide. Leurs activités enzymatiques sont aussi sensibles à des pH différents. Nous avons pu remarquer que l'activité FFT était inhibée à pH basique (8,3), alors que l'activité SST ne l'était pas.

Pour notre part, nous nous sommes principalement attachés à la purification biochimique de la FFT chez la chicorée.

Les différentes purifications de FFT réalisées chez diverses espèces végétales, comme le topinambour, le pissenlit, nous avaient donné des indications sur leurs caractéristiques biochimiques. Ces enzymes FFT sont solubles, glycosylées et ont un pI et pH d'activité acide (voir point I.3 de l'introduction).

Pour réaliser notre protocole de purification de la FFT chez la chicorée, nous nous sommes basés sur ces caractéristiques.

L'extraction par les deux précipitations successives (30 et 70 %) au sulfate d'ammonium nous a permis de récolter les protéines solubles. En effet, nous avons observé une augmentation de la quantité de polyfructoses au cours du temps, suite à l'incubation de ces protéines solubles dans le *néosugar*.

La chromatographie d'affinité impliquant une lectine, la concanavoline, a confirmé sa glycosylation. Effectivement, nous avons pu mettre en évidence l'activité FFT dans l'incubation des protéines glycosylées avec le *néosugar*.

La chromatographie échangeuse d'anions et la séparation sur gel IEF nous ont permis de certifier son point isoélectrique acide. En effet, nous avons observé une activité FFT présente dans une section du gel IEF à pH 4,30.

Notre résultat final a été l'obtention de deux bandes sur gel IEF coloré à l'argent correspondant à l'activité FFT.

Les objectifs à court terme

La suite du travail consistera à améliorer la séparation sur gel natif afin d'obtenir des bandes mieux séparées sur le gel IEF coloré à l'argent et correspondant à l'enzyme FFT. Cette amélioration de la séparation sur gel natif nécessitera :

- de changer le pourcentage d'acrylamide dans le gel
- de faire de plus longues migrations
- de réaliser un gel discontinu plutôt que continu

Les bandes obtenues après séparation sur gel IEF, correspondant à une ou des FFT, seront alors suffisamment pures pour envisager le microséquençage.

Les objectifs à long terme

La connaissance, même partielle de la séquence en acides aminés et en acides nucléiques permettra d'isoler le gène. La séquence codante de l'enzyme sera découverte :

- soit par PCR sur du cDNA
- soit par criblage de banque de cDNA ou de banque d'expression avec des anticorps.

Par la suite, ce cDNA permettra d'identifier le promoteur par PCR sur de l'ADN génomique ou par criblage de banque génomique.

Par ailleurs, on pourra mettre en évidence la localisation de cette enzyme. Effectivement, la séquence en acides aminés permettra de synthétiser un peptide et de l'utiliser pour immuniser un lapin. Le sérum ainsi obtenu servirait à faire du marquage immunocytochimique.

L'étude du promoteur par fusion GUS permettra alternativement d'étudier la régulation spatio-temporelle de l'enzyme.

V. BIBLIOGRAPHIE

Abid Malika, Palms Benoît, Derycke Riet, Tissier Jean-Pierre and Rambour Serge, (1995), " Transformation of chicory and expression of the bacterial uidA and nptII genes in transgenic regenerants ", Journal of Experimental Botany, Vol. 46, No. 284.

Cairns Andrew John, (1993), "Evidence for de *novo* synthesis of fructan by enzymes from higher plants : a reappraisal of the SST/FFT model", New Phytology 123:15-24.

Cairns Andrew John and Ashton J. A., (1991), " The interpretation of in vitro measurements of fructosyl transferase activity : an analysis of patterns of fructosyl transfer by fungal invertase ", New Phytology 118:23-34.

Cairns Andrew John, (1992), " A reconsideration of fructan biosynthesis in storage roots of *Asparagus officinalis* L. ", New Phytology 120:463-473.

Chevalier P.M. and Rupp R.A., (1993), " Inhibition of sucrose : sucrose fructosyl transferase by cations and ionic strength ", Plant Physiology 101:589-594.

Damerval Catherine, de Vienne Dominique, Zivy Michel, Tarroux Philippe et Vincens Pierre, (1993), " L'électrophorèse bidimensionnelle des protéines ", Le Technoscope de Biofutur n°123.

Delagoutte Emmanuelle, Marciset Olivier, Egly Jean-Marc et Damerval Thierry, (1991), " Le microséquencage des protéines : préparation de l'échantillon et utilisations ", Le Technoscope de Biofutur n°46.

De Leenheer Leen and Hoebregs Hubert, (1994), " Progress in the elucidation of the composition of chicory inulin ", Starch/Stärke 46, n°5, S., 193-196.

Delobette Hubert, Friry Aline, Plewniak Frédéric et Egly Jean-Marc, (1991), " Le dosage des protéines ", Le technoscope du futur, n°41.

Delzenne N.M and Roberfroid M.R, (1994), " Physiological Effects of Non-Digestible Oligosaccharides ", Lebensm.-Wiss. u.-Technol.,27, 1-6.

Dionex, (1989), " Analysis of carbohydrates by anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection ", Technical note.

Duchateau Nathalie, Bortlik Karlheinz, Simmen Urs, Wiemken Andres and Bancal Pierre, (1995), " Sucrose : fructan 6-fructosyltransferase, a key enzyme for diverting carbon from sucrose to fructan in barley leaves ", Plant Physiology 107: 1249-1255.

Duffus C.M.et Duffus J.M., (1984), Carbohydrate Metabolism in Plants, Longman Group Limited, 183 pp.

Frommer Wolf B. and Sonnewald Uwe, (1995), " Molecular analysis of carbon partitioning in solanaceous species ", Journal of Experimental Botany, Vol.46, n°287 : 587 : 603.

Fuchs A., (1993), Inulin and inulin-containing crops, Studies in Plant Science, 3, Elsevier.

Fuchs A., (1991), " Current and potential food and non-food applications of fructans ".

Gibson Glenn R. and Roberfroid Marcel B., (1995), " Dietary Modulation of Human Colonic Microbiota : Introducing the Concept of Prebiotics ", J. Nutr. 125 : 1401-1412.

Gifford Roger M.and Evans L.T., (1981), " Photosynthesis, carbon partitioning and yield ", Ann. Rev. Plant Physiology 32:485-509.

Goodwin and Mercer, (1983), Introduction to plant biochemistry, Second Edition, Pergamon Press, 677 pp.

Gupta Anil K., Mamta, Kaur Narinder and Singh Rangil, (1986), " Fructosan metabolism in *Cichorium intybus* roots ", Phytochemistry. Vol 25 N°12. pp.2765-2768.

Housley T.L., Gibeaut D.M., Carpita N.C., Sims I. and Pollock C.J., (1991), " Fructosyl transfer from sucrose and oligosaccharides during fructan synthesis in excised leaves of *Lolium temulentum* L. ", New Phytology 119: 491-497.

Kaur Narinder, Jain Harsh, Mann Parminder, Gupta Anil K. and Singh Rangil , (1992), " A comparison of properties of invertases and inulinase from chicory ", Plant Physiology Biochemistry 30:445-450.

Koops Andries J. and Jonkler Harry , (1994), , "Purification and characterization of the enzymes of fructan biosynthesis in tubers of *Helianthus tuberosus* Colombia ", Journal of Experimental Botany, Vol.45, n°280:1623-1631.

Laemmli U.K., (1970), " Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4 ", Nature Volume 227.

Lüscher M., Frehner M. and Ösdberger J., (1993), " Purification and some properties of fructan : fructan fructosyl transferase from dandelion (*Taraxacum officinale* Weber) ", New Phytology 123:437:442.

Lüscher M. and Nelson Curtis J., (1995), " Fructosyltransferase activities in the leaf growth zone of tall fescue ", Plant Physiology 107 : 1419-1425.

Ministère de l'Agriculture, (1994), La culture de la chicorée industrielle.

Pharmacia (Laboratory Separation Division), (1986-1988), " Affinity chromatography ".

Quilès Emmanuelle, Perbal Marie-Christine et Egly Jean-Marc, (1991), " Le contrôle de l'activité protéolytique en cours de purification ", Le technoscope de biofutur, n°42.

Remacle J., (1989), " Techniques biochimiques ", Syllabus, Département de Biologie, FUNDP, Namur.

Righetti P.G., (1988), Isoelectric focusing : theory, methodology and applications, Elsevier Biomedicals, 386 pp.

Roberfroid M.B., Bornet F., Bouley C., and Cummings J.H., (1995), "Colonic Microflora : Nutrition and Health", Nutrition Reviews, Vol.53, No.5.

Salisbury Frank B., Cleon W. Ross, (1992), Plant Physiology, Wadsworth, 682 pp.

Shiomi Norio, (1989), " Properties of fructosyltransferases involved in the synthesis of fructan liliaceous plants ", Journal Plant Physiology, Vol.134: 151-155.

Shiomi Norio, (1992), " Content of carbohydrate and activities of fructosyltransferase and invertase in asparagus roots during the fructo-oligosaccharide- and fructo-polysaccharide-accumulating season ", New Phytology 122:421-432.

Simmens Urs, Obenland David, Boller Thomas and Wiemken Andres, (1993), " Fructan synthesis in excised Barley leaves ", Plant Physiology 101:459-468.

Simpson R.J. , Walker R.P. and Pollock C.J., (1991), " Fructan exohydrolase activity in leaves of *Lolium temulentum* L. ", New Phytology 119: 499-507.

Smouter Henk and Simpson Richard J., (1991), " Fructan metabolism in leaves of *Lilium rigidum* Gaudin ", New Phytology 119:509-516.

Stitt Mark, (1994), " Manipulation of carbohydrate partitioning ", *Plant Biotechnology* 5:137-143.

Tessier Michel, Viollet Bernard et Egly Jean-Marc, (1992), " La précipitation des protéines ", *Le technoscope de biofutur*, n°54.

Tyssen P., (1988), *Practice and theory of enzyme immunoassays*, Elsevier, 549pp.

Van Cutsem Pierre, (1993-1994), " Syllabus de physiologie végétale et biologie cellulaire végétale ", première licence en sciences biologiques, FUNDP, Namur.

Van Cutsem Pierre, Goblet Jean-Pierre, Canon Laurence, (1994-1995), " Etude des facteurs génétiques responsables du degré de polymérisation de l'inuline et de son rendement chez la chicorée industrielle ", Rapport semestriel pour la Région Wallonne.

Walker Robert P. and Pollock Christopher J., (1993), " The purification and characterization of soluble acid invertase from coleoptiles of wheat (*Triticum aestivum* L. Cv. Avalon) ", *Journal of experimental Botany*, Vol. 44, N°263, pp.1029-1037.

Van den Ende Wim and Van Laere André, (1995), " Purification and properties of a neutral invertase from the roots of *Cichorium intybus* ", *Physiologia Plantarum* 93:241-248.

Van den Ende Wim, Van Laere André, (1993), " Purification and properties of an invertase with sucrose : sucrose fructosyltransferase (SST) activity from the roots of *Cichorium intybus* L. ", *New Phytology* 123:31-37.

VI. TABLE DES MATIERES

	page
<u>I. INTRODUCTION</u>	1
<u>I.1. LES FRUCTANES</u>	1
I.1.1 Introduction	1
I.1.2 Structure et localisation	2
I.1.3 Les applications des fructanes	2
I.1.3.1 La chicorée industrielle, matière première pour la production d'inuline et de fuctose	2
I.1.3.2 Les caractéristiques spécifiques	3
<u>I.2. LE METABOLISME DES SUCRES</u>	5
I.2.1 Le transport du sucrose	5
I.2.2 Les enzymes impliquées dans la synthèse de l'inuline	7
I.2.3 L'accumulation des fructanes	9
<u>I.3. PURIFICATION ET CARACTERISTIQUES DE LA FFT CHEZ DIFFERENTES ESPECES</u>	11
<u>I.4. BUT DU TRAVAIL</u>	13
<u>II. MATERIEL ET METHODES</u>	14
<u>II.1. EXTRACTION DES PROTEINES SOLUBLES DES RACINES DE CHICOREES</u>	14
II.1.1 Principe	14
II.1.2 Protocole	14
II.1.3 Dosage des protéines par la méthode de Folin modifiée par Lowry	15
II.1.3.1 Principe	15
II.1.3.2 Protocole	15

<u>II.2. DOSAGE DE L'ACTIVITE FFT</u>	17
<u>II.3. ANALYSE DES HYDRATES DE CARBONE PAR HPLC</u>	18
II.3.1 Mécanisme de séparation de la colonne Carbo Pac 100	18
II.3.2 Détection ampérométrique pulsée	18
<u>II.4. CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE</u>	20
II.4.1 Principe	20
II.4.2 Protocole	20
<u>II.5. CHROMATOGRAPHIE SUR ECHANGEURS D'ANIONS</u>	21
II.5.1 Principe	21
II.5.2 Protocole	21
<u>II.6. LES GELS DENATURANTS EN UNE DIMENSION</u>	22
<u>II.7. LES COLORATIONS DES GELS</u>	23
II.7.1 Coloration à l'argent (non ammoniacale)	23
II.7.2 Coloration au bleu de Coomassie	23
<u>II.8. LES GELS NON DENATURANTS CONTINUS</u>	24
<u>II.9. LES GELS IEF (ISOELECTIC FOCUSING)</u>	25
<u>III. RESULTATS</u>	26
<u>III.1. L'EXTRACTION DES PROTEINES SOLUBLES DES RACINES DE CHICOREES</u>	27
III.1.1 L'activité enzymatique FFT	27
III.1.2 La variation de la teneur en différents sucres	28
III.1.3 La composition des pics secondaires	29
<u>III.2. LA CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE</u>	30

<u>III.3. LA CHROMATOGRAPHIE ECHANGEUSE D'ANIONS</u>	31
<u>III.4. SEPARATION PAR ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE</u>	33
III.4.1 Les gels natifs continus	33
III.4.2 Les gels IEF (isoelectric focusing)	38
<u>IV CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</u>	41
<u>V BIBLIOGRAPHIE</u>	44
<u>VI TABLE DES MATIERES</u>	49