

REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE
Union-Discipline-Travail

Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITE DE COCODY-ABIDJAN



UFR BIOSCIENCES
22 BP : 582 Abidjan 22
Tél. /Fax : 22 44 44 73

Courriel : biosciences@univ-cocody.ci
ufrbiosciences@yahoo.fr

N° d'Ordre : 626 / 2009

LABORATOIRE DE BIOTECHNOLOGIES

THESE DE DOCTORAT UNIQUE

Présenté à l'UFR Biosciences pour obtenir le titre de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité Biochimie-Enzymologie

Par

BEDIKOU EHUIE MICAEL

THEME :

**LES α -MANNOSIDASES DU SUC DIGESTIF DE LA LARVE DU
CHARANÇON *Rhynchophorus palmarum* DU PALMIER A HUILE:**

PURIFICATION, CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE ET

APPLICATION POTENTIELLE

Soutenu publiquement, le 14 Novembre 2009 devant le jury composé de

M. DIOPHO K. Jacques	Professeur Titulaire	Université de Cocody	Président
M. NIAMKE L. Sébastien	Maître de Conférences	Université de Cocody	Directeur
M. AMANI N. Georges	Professeur Titulaire	Université d'Abobo-Adjamé	Rapporteur
M. N'GUESSAN J. David	Maître de Conférences	Université de Cocody	Rapporteur
M. KOUAME L. Patrice	Maître de Conférences	Université d'Abobo-Adjamé	Examineur

REMERCIEMENTS

L'ensemble des travaux présentés dans ce manuscrit a été réalisé grâce à la collaboration entre le Laboratoire de Biotechnologies de l'Unité de Formation et de Recherche en Biosciences (UFR BIOSCIENCES) de l'Université de Cocody et le Laboratoire de Biochimie de l'Unité de Formation et de Recherche des Sciences et Technologies des Aliments (UFR-STA) de l'Université d'Abobo-Adjamé.

Je me permets donc, au terme de ce travail de recherche, de regarder en arrière et voir le trajet parcouru pendant toutes ces années afin d'exprimer mes sincères remerciements à tous ceux qui, de près ou de loin, m'ont accompagné et soutenu pour mener à bien cette thèse.

Je pense tout d'abord à notre grand maître à tous, le Professeur Jacques Koré DIOPOH pour nous avoir légué par sa formation et sa vision de la recherche, des ressources humaines de qualité pour assurer et perpétuer l'encadrement des étudiants que nous sommes.

J'exprime ma gratitude au Professeur Sébastien Lamine NIAMKE, mon Directeur de thèse, Directeur du Laboratoire de Biotechnologies de l'Unité de Formation et de Recherche en Biosciences de l'Université de Cocody dont je fais partie. Vous avez suivi constamment et activement la progression de mon travail de thèse. Nos discussions parfois animées ont toujours été constructives et vraies. Vos connaissances, votre participation active, vos critiques et conseils, votre franchise, votre patience et votre disponibilité durant tout le temps passé ensemble ont énormément inspiré mon évolution professionnelle et humaine. Merci encore « Seb » comme on aime l'appeler affectueusement au laboratoire, pour m'avoir fait confiance et surtout cru en moi.

Je remercie toute l'équipe Biocatalyse avec à sa tête le Professeur Lucien Patrice KOUAME, Doyen de l'UFR-STA et Directeur du Laboratoire de Biochimie. Je ne vous remercierai jamais assez de m'avoir intégré dans votre équipe.

A sa suite, je remercie le Professeur Georges N'guessan AMANI, Enseignant-Chercheur à l'Université d'Abobo-Adjamé, sans qui je n'aurais jamais terminé cette thèse à temps. Merci « tonton » pour tes conseils et tes encouragements mais surtout de m'avoir intégré dans l'une des meilleures équipes de recherches de la Côte d'Ivoire.

J'adresse également mes remerciements au Professeur Jean David N'GUESSAN, Rapporteur de cette thèse qui a pris de son temps pour lire et formuler des suggestions pour l'amélioration du manuscrit.

Ce travail n'aurais pas atteint son ampleur sans la contribution de :

Tous les enseignant-chercheurs de l'équipe Biocatalyse en occurrence Pascal Amédée AHI, Tia Jean GONNETY, Betty Meuwiah FAULET, Parfait Kouakou KOUADIO, Ahipo DJUE et Soumaila DABONNE.

Je n'oublie pas l'ensemble des enseignant-chercheurs du Laboratoire de Biotechnologies. Je citerai les Docteurs Téhi SEA, Essoh AKPA, Séverin KRA, Rosemonde MEGNANOU, Suomion SAKI et Yadé SORO.

L'ensemble des doctorants de l'équipe Biocatalyse, Michel LIBRA, Hubert KOUAKOU, Bernard ASSIELOU, Sophie GNANGUI, Hortense SIKA; et ceux du Laboratoire de Biotechnologies, Arthur NIAMKE, Emmanuel COULIBALY, Moussa KONATE, Athanase OTCHOUMOU et Bernadette GOUALIE, pour le soutien quotidien et le vécu, jour après jour, pendant l'aventure de nos thèses. Vous m'avez permis de garder le moral dans les moments difficiles.

Merci à tous ceux qui contribuent à la bonne humeur dans cette équipe et à tous ceux que j'ai eu beaucoup de plaisir à côtoyer pendant ces années. Sans être exhaustif, je tiens à citer Eric, Bedel, Alain, Michel, Jocelin, Mélaine, Flavie, Florence, Chantale et Clarisse.

Ma reconnaissance va enfin à ma famille pour son soutien permanent, et pour avoir toujours respecté mes choix, pas forcément évidents. C'est le lieu de dire mille fois merci à Djidji Kadjo Adolphe et à Kacou Adangba Jacques, mes oncles, à N'guessan N'gatta Joël « Jobigo » et Kadjo Aimé Maixent, mes cousins et à Bédikou Diboh Gédéon « Don Bed » mon grand frère.

DEDICACES

Je dédie cette œuvre à :

A feu mon oncle KADJO N'GUESSAN ZAPATTA

A ma mère ADAMA N'GUESSAN PAULINE

A mon père YAO BEDIKOU DENIS

A mon fils BEDIKOU MICAEL JOEL

A ma chérie AUGOU CHRISTIANE ESTELLE

A mes frères et sœurs

A ma grande famille dont les représentants sont YAO KACOU GABRIEL, N'GUESSAN ISAAC, LOUIS N'GUESSAN, feu KADJO N'GUESSAN ZAPATA et à feu ANGAH GUEDE tous originaire du village de GOMON s/p de SIKENSI.

**LISTE DES UNITES, SIGLES ET
ABREVIATIONS**

%	: pour cent
°C	: degré Celsius
°K	: degré Kelvin
µg	: microgramme
µl	: microlitre
µM	: micromolaire
µm	: micromètre
CCM	: chromatographie sur couche mince
CLHP/HPLC	: chromatographie liquide haute performance
D.O.	: densité optique
Da	: Dalton
DEAE	: diéthylaminoéthyl
DIM	: didésoxyiminomannitol
DMNJ	: désoxymannojirimycine
DTNB	: acide dinitro-2,2 –dithio-5,5 –dibenzoïque
DTT	: dithiothréitol
Ea	: énergie d'activation
EC	: enzyme commission
EDTA	: éthylène diamine tétra acétate
g	: gramme
h	: heure
HTAB	: hexadecyl triméthyl ammonium bromide
k	: kilo
kDa	: kiloDalton
Kif	: kifunensine
kJ	: kilojoule
K_M	: constance de Michaelis-Menten
Log	: logarithme
M	: molaire
M1	: α-mannosidase 1
M2	: α-mannosidase 2
M3	: α-mannosidase 3
M4	: α-mannosidase 4
mg	: milligramme
min	: minute
ml	: millilitre
mM	: millimolaire
mm	: millimètre
mol	: mole
Mr	: masse moléculaire relative
NC-IUBMB	: Comité de Nomenclature-Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire
pCMB	: <i>para</i> -chloromercuribenzoate de sodium
PEG	: polyéthylène glycol
pH	: potentiel hydrogène
PM	: poids moléculaire
pNP	: <i>para</i> -nitrophénol
pNP-α-Man	: <i>para</i> -nitrophényl-alpha-D-mannopyranoside

p/v	: poids sur volume
R	: constante des gaz parfaits
R_f	: référence frontale
SAB	: sérum albumine bovine
SDS	: dodécyle sulfate de sodium
SDS-PAGE	: électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS
Sw	: swainsonine
T	: température
UE	: unité enzymatique
UI	: unité internationale
UIB	: union internationale de la biochimie
v/v	: volume sur volume
V_e	: volume d'élution
V_{max}	: vitesse maximale
α	: alpha
β	: bêta

TABLE DES MATIERES

	Pages
REMERCIEMENTS	i
DEDICACES	iv
LISTE DES UNITES, SIGLES ET ABREVIATIONS	vi
TABLE DES MATIERES	x
LISTE DES FIGURES	xv
LISTE DES TABLEAUX	xviii
LISTE DES PHOTOGRAPHIES	xx
INTRODUCTION	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	4
I. CHARANÇONS	5
1. Généralités	5
2. Systématique des charançons du genre <i>Rhynchophorus</i>	5
3. Cycle de vie des charançons	6
II. ENZYMES	7
1. Généralités	7
2. Glycosides hydrolases	9
2.1. Mécanismes d'action des glycosides hydrolases	9
2.1.1. Mécanisme d'inversion de configuration	10
2.1.2. Mécanisme de rétention de configuration	10
2.2. Réactions catalysées par les glycosides hydrolases	12
2.2.1. Réaction d'hydrolyse	12
2.2.2. Réaction de synthèse	12
2.2.3. Réaction de transglycosylation	13
2.2.4. Approche enzymatique et chimique en glycosylation	14

2.2.5. <i>Application des glycosidases en synthèse et synthèse de néoglycoconjugués</i>	16
3. α -mannosidases	17
3.1. Classification	17
3.1.1. <i>En fonction du type de liaison hydrolysé</i>	17
3.1.2. <i>En fonction de la localisation subcellulaire</i>	18
3.1.3. <i>En fonction de la sensibilité aux inhibiteurs spécifiques</i>	18
3.1.4. <i>En fonction de la similarité de séquences en acides aminés</i>	19
3.2. α -mannosidases particulières	20
3.3. Rôle physiologique des α -mannosidases	21
3.4. Impact de la glycosylation sur l'activité biologique des protéines	24
3.5. Troubles physiologiques liés au dysfonctionnement des α -mannosidases	24
3.6. Domaines d'application des α -mannosidases	25
MATERIEL ET METHODES	26
I. MATERIEL	27
1. Produits chimiques et réactifs	27
2. Matériel biologique	27
II. METHODES	28
1. Source enzymatique et obtention de l'extrait brut	28
2. Techniques de dosage	28
2.1. Conditions standard de mesure de l'activité enzymatique	28
2.2. Dosage des protéines	29
3. Techniques de purification	29
3.1. Précipitation au sulfate d'ammonium	30
3.2. Chromatographie d'exclusion moléculaire sur gel Sephacryl S-100 HR	30

3.3. Chromatographie échangeuse d'anions sur gel DEAE-Sepharose Fast Flow	30
3.4. Chromatographie d'interaction hydrophobe sur gel Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow	31
4. Critère de pureté	32
5. Détermination des propriétés moléculaires	33
5.1. Détermination de la masse moléculaire des α -mannosidases par SDS-PAGE	33
5.2. Détermination de la masse moléculaire des α -mannosidases par filtration sur gel Sephacryl S-200 HR	33
6. Influence du pH sur l'activité hydrolytique des α -mannosidases	34
6.1. pH optimum d'hydrolyse	34
6.2. Stabilité en fonction du pH	34
7. Influence de la température sur l'activité hydrolytique des α -mannosidases	34
7.1. Température optimale d'hydrolyse	34
7.2. Dénaturation en fonction de la température	35
7.3. Inactivation en fonction de la température	35
8. Spécificité de substrat et détermination des paramètres cinétiques	35
9. Spécificité d'hydrolyse des mannobioses	35
10. Influence des agents chimiques sur l'activité hydrolytique des α -mannosidases	36
11. Réaction de transmannosylation	36
11.1. Conditions opératoires standard	36
11.2. Analyse et quantification des produits de synthèse	37
11.3. Calcul du pourcentage de transmannosylation	37
11.4. Détermination du pH optimum de transmannosylation	37
11.5. Détermination de la quantité optimale en enzyme pour la transmannosylation	38
11.6. Détermination de la concentration optimale du donneur-accepteur	38

11.7. Détermination du temps optimum de transmannosylation	38
RESULTATS	39
I. PURIFICATION DES α -MANNOSIDASES DU SUC DIGESTIF DE LA LARVE DU CHARANÇON <i>Rhynchophorus palmarum</i>	40
1. Stratégie de purification	40
1.1. Précipitation au sulfate d'ammonium et chromatographie d'exclusion moléculaire sur gel Sephacryl S-100 HR	40
1.2. Chromatographie échangeuse d'anions sur gel DEAE-Sepharose Fast Flow	41
1.3. Chromatographie d'interaction hydrophobe sur gel Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow	42
2. Bilan de purification	46
3. Critère de pureté	46
II. CARCTERISATION MOLECULAIRE, PHYSICO-CHIMIQUE ET CINETIQUE	48
1. Caractérisation moléculaire	48
1.1. Masse moléculaire par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)	48
1.2. Masse moléculaire par filtration sur gel Sephacryl S-200 HR	49
2. Caractérisation physico-chimique et cinétique	50
2.1. pH optimum d'hydrolyse et de la zone de stabilité au pH	50
2.1.1. <i>pH optimum d'hydrolyse</i>	51
2.1.2. <i>Zone de stabilité au pH</i>	52
2.2. Température optimale d'hydrolyse	52
2.2.1. <i>Energie d'activation et Q_{10}</i>	53
2.2.2. <i>Thermostabilité</i>	54
2.2.2.1. <i>Dénaturation thermique</i>	54
2.2.2.2. <i>Inactivation thermique</i>	55
2.3. Spécificité des α -mannosidases	56
2.3.1. <i>Spécificité de groupe</i>	56

2.3.1.1. <i>Activité des α-mannosidases sur les substrats pNP-glycosides</i>	56
2.3.1.2. <i>Paramètres cinétiques</i>	57
2.3.2. <i>Spécificité de liaison</i>	59
2.4. Etude de l'influence de divers agents chimiques sur l'activité hydrolytique des α -mannosidases	60
2.4.1. <i>Effet de l'EDTA et des ions métalliques</i>	60
2.4.2. <i>Effet de réactifs spécifiques du groupement thiol et de composés chimiques à groupement sulfhydrile</i>	62
2.4.3. <i>Effet des détergents</i>	63
2.4.4. <i>Effet des inhibiteurs spécifiques de groupe</i>	65
III. REACTION DE TRANSMANNOSYLATION	67
1. pH optimum de transmannosylation	69
2. Quantité optimale en enzyme pour la transmannosylation	71
3. Concentration optimale du donneur-accepteur de résidus de mannose	72
4. Temps optimum de transmannosylation	73
5. Réaction de transmannosylation dans les conditions optimales	74
DISCUSSION	76
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	85
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	89
PUBLICATIONS DE LA THESE ISSUES DE JOURNAUX A FACTEUR D'IMPACT	

LISTE DES FIGURES

Figure 1:	Réaction d'hydrolyse catalysée par les glycosidases agissant par inversion de configuration	10
Figure 2:	Réaction d'hydrolyse catalysée par les glycosidases agissant par rétention de configuration	11
Figure 3:	Schéma général de la réaction d'hydrolyse catalysée par les glycosides hydrolases	12
Figure 4:	Schéma général de la réaction de synthèse catalysée par les glycosides hydrolases.	12
Figure 5:	Schéma général de la réaction de transglycosylation catalysée par les glycosides hydrolases.	13
Figure 6:	Structure des quatre inhibiteurs spécifiques des α -mannosidases.	20
Figure 7:	Processus d'hydrolyse des α -mannosidases de types exo et endo en présence du substrat GlcMan ₉ GlcNAc.	21
Figure 8:	Schéma simplifié de la biosynthèse des glycoprotéines chez les mammifères mettant en évidence quelques glycosidases et glycosyltransférases.	23
Figure 9:	Profil chromatographique de l'activité α -mannosidasique du suc digestif de la larve du charançon <i>Rhynchophorus palmarum</i> sur le gel Sephacryl S-100 HR.	41
Figure 10:	Profil chromatographique de l'activité α -mannosidasique du suc digestif de la larve du charançon <i>Rhynchophorus palmarum</i> sur le gel DEAE-Sepharose Fast Flow.	42
Figure 11:	Profil chromatographique de l'activité α -mannosidasique M2 du suc digestif de la larve du charançon <i>Rhynchophorus palmarum</i> sur le gel Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow.	43
Figure 12:	Profil chromatographique de l'activité α -mannosidasique M3 du suc digestif de la larve du charançon <i>Rhynchophorus palmarum</i> sur le gel Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow.	44
Figure 13:	Profil chromatographique de l'activité α -mannosidasique M4 du suc digestif de la larve du charançon <i>Rhynchophorus palmarum</i> sur le gel Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow.	45
Figure 14:	Détermination de la masse moléculaire relative des α -mannosidases du suc digestif de la larve du charançon <i>Rhynchophorus palmarum</i> par électrophorèse en conditions dénaturantes.	49
Figure 15:	Détermination de la masse moléculaire relative des α -mannosidases du suc digestif de la larve du charançon <i>Rhynchophorus palmarum</i> par filtration sur gel Sephacryl S-200 HR.	50

Figure 16:	pH optimum d'hydrolyse des α -mannosidases du suc digestif de la larve du charançon <i>Rhynchophorus palmarum</i> .	51
Figure 17:	Zone de stabilité au pH des α -mannosidases du suc digestif de la larve du charançon <i>Rhynchophorus palmarum</i> .	52
Figure 18:	Température optimale d'hydrolyse des α -mannosidases du suc digestif de la larve du charançon <i>Rhynchophorus palmarum</i> .	53
Figure 19:	Détermination de l'énergie d'activation des α -mannosidases du suc digestif de la larve du charançon <i>Rhynchophorus palmarum</i> .	54
Figure 20:	Dénaturation thermique des α -mannosidases du suc digestif de la larve du charançon <i>Rhynchophorus palmarum</i> .	55
Figure 21:	Inactivation thermique des α -mannosidases du suc digestif de la larve du charançon <i>Rhynchophorus palmarum</i> .	56
Figure 22:	Etude de l'activité hydrolytique des α -mannosidases du suc digestif de la larve du charançon <i>Rhynchophorus palmarum</i> en fonction de différentes concentrations du substrat pNP- α -Man.	58
Figure 23:	Mise en évidence par HPLC des produits standard issus des différentes réactions de transmannosylation catalysées par les α -mannosidases du suc digestif de la larve du charançon <i>Rhynchophorus palmarum</i> .	68
Figure 24:	Mise en évidence par HPLC du produit inconnu apparu à pH 4,5 lors de l'étude du pH optimum de transmannosylation à partir des α -mannosidases du suc digestif de la larve du charançon <i>Rhynchophorus palmarum</i> .	70
Figure 25:	Détermination de la quantité d'enzyme nécessaire à la réaction de transmannosylation catalysée par les α -mannosidases du suc digestif de la larve du charançon <i>Rhynchophorus palmarum</i> .	71
Figure 26:	Détermination de la concentration optimale du donneur-accepteur de résidus mannosyles lors de la réaction de transmannosylation catalysée par les α -mannosidases du suc digestif de la larve du charançon <i>Rhynchophorus palmarum</i> .	73
Figure 27:	Détermination du temps optimum de la réaction de transmannosylation catalysée par les α -mannosidases du suc digestif de la larve du charançon <i>Rhynchophorus palmarum</i> .	74

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I:	Bilan de purification des α -mannosidases du suc digestif de la larve du charançon <i>Rhynchophorus palmarum</i> .	46
Tableau II:	Activité des α -mannosidases du suc digestif de la larve du charançon <i>Rhynchophorus palmarum</i> sur les substrats synthétiques pNP-glycosides.	57
Tableau III:	Paramètres cinétiques des α -mannosidases du suc digestif de la larve du charançon <i>Rhynchophorus palmarum</i> .	58
Tableau IV:	Effet de l'EDTA et de quelques ions métalliques sur l'activité hydrolytique des α -mannosidases du suc digestif de la larve du charançon <i>Rhynchophorus palmarum</i> .	61
Tableau V:	Effet des réactifs spécifiques du groupement thiol et des composés chimiques à groupement sulfhydrile sur l'activité hydrolytique des α -mannosidases du suc digestif de la larve du charançon <i>Rhynchophorus palmarum</i> .	62
Tableau VI:	Effet de différents groupes de détergents sur l'activité hydrolytique des α -mannosidases du suc digestif de la larve du charançon <i>Rhynchophorus palmarum</i> .	64
Tableau VII:	Effet des différents inhibiteurs spécifiques sur l'activité hydrolytique des α -mannosidases du suc digestif de la larve du charançon <i>Rhynchophorus palmarum</i> .	66
Tableau VIII:	pH optimum de transmannosylation effectuée par les α -mannosidases du suc digestif de la larve du charançon <i>Rhynchophorus palmarum</i> .	69
Tableau IX:	Evolution du taux de transmannosylation dans les conditions optimales de pH, de quantité d'enzyme, de concentration de donneur-accepteur et de temps.	75

LISTE DES PHOTOGRAPHIES

Photographie 1:	Différents stades du cycle de développement des charançons.	6
Photographie 2:	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions natives des α -mannosidases du suc digestif de la larve du charançon <i>Rhynchophorus palmarum</i> .	47
Photographie 3:	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes des α -mannosidases du suc digestif de la larve du charançon <i>Rhynchophorus palmarum</i> .	48
Photographie 4:	Mise en évidence par chromatographie sur couche mince des produits d'hydrolyse des mannobioses par les α -mannosidases du suc digestif de la larve du charançon <i>Rhynchophorus palmarum</i> .	59

INTRODUCTION

Dans l'expression des molécules biologiques, les protéines hétérogènes sont d'une importance capitale. C'est le cas des glycoprotéines dont la bioactivité est fondamentalement liée à la présence de la fraction glycanique qui contribue au maintien de la conformation tridimensionnelle indispensable à l'activité biologique (**Cumming, 1991 ; Varki, 1993 ; Dwek, 1996 ; Sears et Wong, 1998**). De même cette fraction glycanique serait impliquée dans de nombreux systèmes biologiques essentiels, incluant de façon non exhaustive, la mobilité des glycoprotéines du sang (**Ashwell et Harford, 1982**), les interactions hôte-parasite (**Firon *et al.*, 1983**), la cible des enzymes lysosomales (**Ahern-Rindell *et al.*, 1988**), les mécanismes d'adhésion (**Rosen, 1989**), la communication cellule-cellule lors des réactions inflammatoires (**Kansas, 1996**) ainsi que dans de nombreux autres processus physiologiques (**Chrispeels et Faye, 1998**). L'importance de ces processus physiologiques impliquant des oligosaccharides est synonyme d'intérêt fondamental pour l'étude et la maîtrise des systèmes enzymatiques intervenant dans le mécanisme de glycosylation des protéines.

C'est dans cette ligne de recherche que **Liu *et al.* (1999)** ont montré le rôle essentiel des α -mannosidases dans ce processus post-traductionnel. Ces dernières années, vu l'importance et les nombreuses applications des α -mannosidases dans les processus biotechnologiques, plusieurs études approfondies ont porté sur ces enzymes. Ainsi, des α -mannosidases de diverses sources ont été purifiées et caractérisées (**Tatara *et al.*, 2003 ; Ahi *et al.*, 2007 ; Tremblay *et al.*, 2007**). Certaines ont été utilisées pour des applications biologiques et pharmaceutiques (**Sun *et al.*, 1999 ; Hirsch *et al.*, 2003 ; Shah *et al.*, 2008**), et dans des réactions de synthèse de néomannoconjugués (**Wongvithoonyaporn *et al.*, 1997**).

Bien que les α -mannosidases connaissent plusieurs applications biotechnologiques (hydrolyse de structures oligomannosidiques, traitement de mannosidoses, synthèse de mannoconjugués ...), très peu d'études traitent de l'utilisation de ces biocatalyseurs en synthèse (**Johansson *et al.*, 1989 ; Bojarova *et al.*, 2007**). De plus, les sources communément utilisées en transmannosylation sont pour la plupart d'origine végétale et les rendements obtenus sont généralement faibles (**Wongvithoonyaporn *et al.*, 1997**). Aussi, les travaux rapportés à ce jour sur les α -mannosidases d'insectes n'explorent-ils pas pour la plupart, le volet de l'application biotechnologique (**Rabouille *et al.*, 1999 ; Kawar**

et al., 2001 ; Erthal Jr. *et al.*, 2007). C'est donc dans l'objectif de rechercher de nouvelles sources d' α -mannosidases à activités originales et inédites et pouvant servir d'outils biotechnologiques, que nous nous sommes proposés au sein de notre laboratoire de nous intéresser à ces enzymes.

Notre travail a consisté d'abord à purifier à partir du suc digestif de la larve du charançon *Rhynchophorus palmarum*, les protéines enzymatiques responsables de la forte activité α -mannosidasique. Ensuite, de les caractériser sur les plans physico-chimique, cinétique et moléculaire afin de les comparer à d'autres α -mannosidases décrites dans la littérature et enfin, d'explorer leurs potentialités d'application en biotechnologie à travers des réactions de transmannosylation.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. CHARANÇONS

1. Généralités

Les insectes curculionidés ou charançons, avec plus de 200.000 espèces répertoriées sur le globe dont seulement 53.000 décrites, constituent l'une des plus importantes familles du règne animal (**Hawksworth et Mound, 1991**). Tous les curculionidés sont phytophages, et très peu d'entre eux constitue de redoutables prédateurs des grains, cultures et vergers. C'est le cas des charançons du genre *Rhynchophorus* qui, au stade larvaire, infestent principalement le cocotier, le palmier dattier et le palmier à huile. Les larves de charançons sont largement distribuées à travers les continents. Elles se retrouvent en Asie du sud, en Amérique et en Afrique et sont connues pour leur aptitude à s'alimenter des tissus mous et frais des stipes de palmiers et cocotiers causant ainsi leur destruction et la baisse du rendement de production (**Oehlschlager et al., 2002**).

2. Systématique des charançons du genre *Rhynchophorus*

Les charançons de palmiers du genre *Rhynchophorus* sont des polyphages de grande taille pouvant atteindre 3,5 cm de long. Ils appartiennent à l'ordre des Coléoptères et à la famille des Curculionidés à laquelle appartient la sous-famille des Rhynchophorinés (**Borrer et al., 1964**). Ils sont du genre *Rhynchophorus* et appartiennent au règne animal. Ils font partie de l'embranchement des arthropodes et de la classe des insectes. Ce sont des coléoptères (Ordre) de la famille des curculionidés.

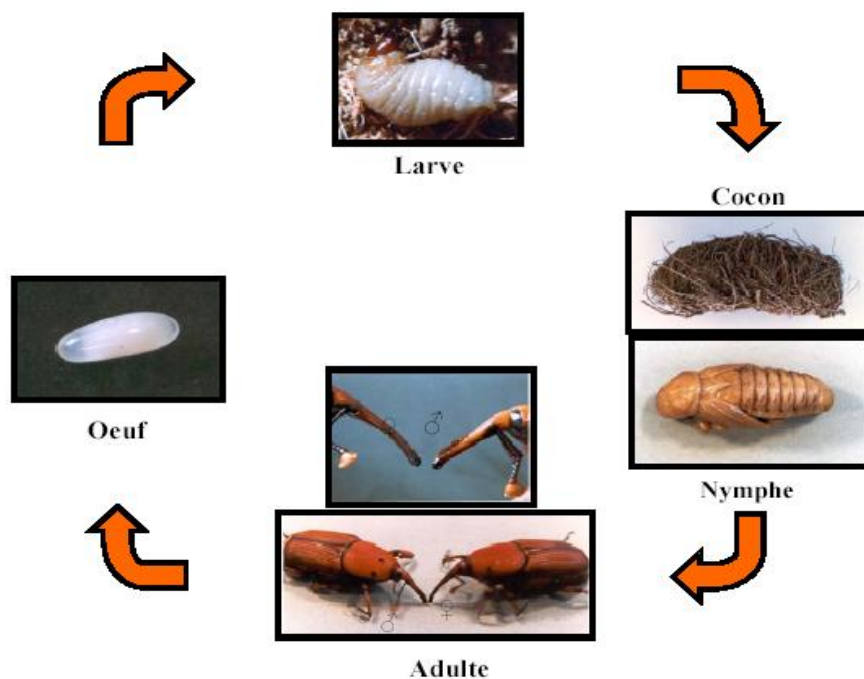
Une dizaine d'espèces appartenant au genre *Rhynchophorus* ont été répertoriées bien des années plus tard (**Wattanapongsiri, 1966**). Ce sont: *R. palmarum* (Linnaeus); *R. cruentatus* (Fabricius); *R. phoenicis* (Fabricius); *R. quadrangulus* (Quedenfeldt); *R. ferrugineus* (Olivier); *R. vulneratus* (Panzer); *R. bilineatus* (Montrouzier); *R. distinctus* (Wattanapongsiri); *R. lobatus* (Wattanapongsiri) et *R. papuanus* (Wattanapongsiri).

Il faut noter cependant que l'espèce *Rhynchophorus palmarum* (Linnaeus, 1758) est connue sous d'autres appellations. Ainsi, les synonymes rencontrés sont: *R. cycadis*, *R. depressus*, *R. longuinossis*, *Calandra palmarum*, *Cordyle barbirostris*, *Cordyle palmarum*, et *Curculio palmarum* (**Anonyme 1, 2007**).

La détermination du nom de l'espèce dépend de plusieurs paramètres notamment la localisation géographique, le type de plante hôte et les caractéristiques morphologiques. Cependant, elle est surtout fonction du type de phéromone synthétisé par l'insecte. Ainsi, le rhynchophorol I, le rhynchophorol II et le ferruginol sont synthétisés respectivement par *R. palmarum*, *R. phoenicis* et *R. ferrugineus*. (Rochat *et al.*, 1993 ; Hallett *et al.*, 1993a, 1993b).

3. Cycle de vie des charançons

On note quatre étapes importantes dans le cycle de développement des charançons de palmiers: l'œuf, l'étape larvaire, la nymphe et l'imago qui représente l'insecte (**Photographie 1**).



Photographie 1: Différents stades du cycle de développement des charançons. (Avand-Faghieh, 2004)

Les femelles pondent en moyenne 256 œufs tout au long de leur vie. Les œufs sont déposés seulement sur les palmiers et cocotiers dans les tissus frais et mous accessibles par blessures et à l'aisselle des rejets sur les stipes (Wattanapongsiri 1966 ; Avand-Faghieh,

1996 ; Muralidharan et al., 2000). La température maximale appropriée à l'éclosion des œufs serait de 40 °C (**El Ezaby, 1997**). Les larves issues des œufs qui éclosent après 3 jours se nourrissent des tissus sains et frais en creusant des galeries. Ces larves sont à l'origine des dégâts imputables à l'espèce. Elles entraînent la mort des arbres infestés quand le bourgeon terminal est touché. Les fortes infestations larvaires entraînent la formation de grandes cavités dans les stipes qui cèdent sous l'effet du vent (**Abraham et al., 1998**). Dans les cas moins extrêmes, les arbres sont affaiblis et sujets à la pourriture des tissus infestés. Les jeunes feuilles et les rejets s'étiolent en prenant une couleur blanchâtre puis se dessèchent. Le bruit produit par l'alimentation des larves et le suintement d'un liquide visqueux, brun et nauséabond au niveau des galeries sont considérés comme les symptômes d'une infestation et ne sont visibles que tardivement. Cependant, de récentes études ont montrées qu'il serait possible de déterminer des modifications physiologiques, notamment du palmier, dès le début de l'infestation et d'y palier (**Bokhari et Abuzuhairah, 1992**).

A la fin de la période larvaire qui dure entre 36 et 78 jours (55 jours en moyenne) selon **Nirula et al. (1953)**, la larve construit un cocon fibreux qui abritera tour à tour la nymphe et l'adulte immature. Ce sont respectivement les étapes pré-pupale et pupale qui s'étendent sur une période de 3 semaines (**Murphy et Briscoe, 1999**). Le charançon ou imago qui émerge quelques jours plus tard est apte à la reproduction. La durée du cycle de développement des charançons est d'environ 84 jours, l'imago pouvant vivre jusqu'à 60 jours (**Anonyme 2, 2005**). Des études menées en Egypte par **El Ezaby (1997)** ont montré que l'on pouvait retrouver 3 générations de charançons en une année.

II. ENZYMES

1. Généralités

Les enzymes sont des protéines douées d'activités catalytiques spécifiques. Elles permettent aux réactions chimiques nécessaires à la vie et à la multiplication cellulaire de s'effectuer. Ces réactions se déroulent à des vitesses très élevées, avec une spécificité qui élimine la formation de sous-produits. Les enzymes appartiennent en majorité, à la classe des protéines globulaires. Certaines sont des holoprotéines constituées uniquement d'un enchaînement d'acides aminés, d'autres par opposition sont des hétéroprotéines possédant une

partie non protéique. Dans ce dernier cas, le groupement prosthétique ou coenzyme, nécessaire à l'activité catalytique, est lié plus ou moins fortement à la protéine (apoenzyme).

Les enzymes hétéroprotéiques utilisent divers types de cofacteurs qui sont soit des ions métalliques (c'est le cas des métalloenzymes), soit des molécules organiques faiblement liés à la protéine enzymatique et peuvent s'en séparer aisément (cosubstrats). Dans certains cas par contre, la partie non protéique de l'enzyme est liée de façon covalente à l'enzyme et fait partie intégrante de l'apoenzyme; elle ne s'en sépare pas. C'est le cas particulier de la fraction glycanique des glycoprotéines (**Richard, 1998**).

La nomenclature et la classification des enzymes ont été normalisées par la commission des enzymes de l'Union Internationale de Biochimie (IUB) en 1990. Pour chaque enzyme, il est précisé la réaction catalysée, son nom systématique et surtout son numéro d'identification composé de quatre (4) chiffres ou nombres séparés par un point et dont chacun correspond aux éléments suivants par ordre respectif:

- ♠ le premier chiffre désigne la classe, correspondant à la nature générale de la réaction catalysée. On distingue six (6) classes à savoir 1-Oxydo-réductases, 2-Réductases, 3-Hydrolases, 4-Lyases, 5-Isomérase et 6-Ligases ou Synthétases;
- ♠ les second et troisième chiffres désignent respectivement la sous-classe et la sous sous-classe définies dans chaque classe;
- ♠ le quatrième chiffre donne le numéro d'ordre de l'enzyme dans la sous sous-classe considérée.

La règle générale adoptée pour désigner une enzyme en nomenclature systématique est que le nom d'une enzyme doit être formé de deux parties:

- ♠ la première comporte le nom du substrat;
- ♠ la seconde partie indique la classe à laquelle appartient l'enzyme, le nom de la classe pouvant être précédé d'un préfixe précisant le type exact de la réaction catalysée.

Exemple: **EC 3.2.1.113** correspond au 1,2- α -D-mannose hydrolase (**NC-IUBMB, 1992**).

2. Glycosides hydrolases

Les glycosides hydrolases, appelées plus généralement glycosidases, sont des enzymes qui effectuent *in vivo* l'hydrolyse des liaisons osidiques des polysaccharides ou glycoconjugués. On peut classer ces enzymes en α -glycosidases ou β -glycosidases suivant qu'elles hydrolysent des liaisons osidiques de type α ou β . Cette propriété est sans doute la plus caractéristique des glycosidases car si ces enzymes sont peu spécifiques de la partie aglycone du substrat, elles sont toutefois très spécifiques de l'anométrie de la liaison osidique. Parmi ces deux grands groupes, on distingue les exo- et endo-glycosidases. Les premières attaquent l'extrémité non réductrice de la chaîne polysaccharidique tandis que les dernières hydrolysent au hasard les liaisons osidiques à l'intérieur des chaînes de polysaccharides (Jordao et Terra, 1991).

2.1. Mécanisme d'action des glycosides hydrolases

Les premières études concernant le mécanisme d'action des glycosides hydrolases ont été effectuées par **Koshland** en **1953** et évoquaient la notion de système clé-serrure. Ces études, améliorées plus tard, ont montré que, chez les glycosidases (endo et exo), il existe deux mécanismes distincts pour décrire l'acte catalytique: la rétention et l'inversion de configuration (Sinnott, 1990; McCarter et Withers, 1994). Bien que ces deux mécanismes soient différents, de nombreuses similarités sont à relever. En effet, dans les deux cas, le site actif des glycosidases comporte une paire d'acides carboxyliques jouant un rôle essentiel dans la catalyse enzymatique. En dehors de ces deux acides carboxyliques, les sites actifs de ces deux grandes classes d'enzymes possèdent de nombreuses similarités structurales. De plus, chacun de ces mécanismes passe par un état de transition similaire et chacune des étapes considérées est réversible. En fait, la différence fondamentale entre ces deux mécanismes (inversion et rétention de configuration), est donnée par la distance établie entre les deux acides carboxyliques. Cette distance est de 10 Å pour les glycosidases effectuant l'acte catalytique par inversion de configuration et, de 5,5 Å pour celles procédant par rétention de configuration (McCarter et Withers, 1994).

2.1.1. Mécanisme d'inversion de configuration

La catalyse de l'hydrolyse des liaisons osidiques par les glycosidases agissant avec inversion de configuration fait appel à une seule étape (**Figure 1**). Deux acides carboxyliques sont impliqués dans la catalyse, le premier joue le rôle d'une base et le second celui d'un acide (**Withers, 1995**). Ces deux acides carboxyliques sont dans des positions telles que, en une étape, le nucléophile aide à déprotoner une molécule d'eau alors que l'acide protone l'oxygène du groupe partant O-R. C'est donc la séparation des deux acides carboxyliques d'environ 10 Å qui permettrait à une molécule d'eau et une molécule de substrat de se lier à l'enzyme simultanément.

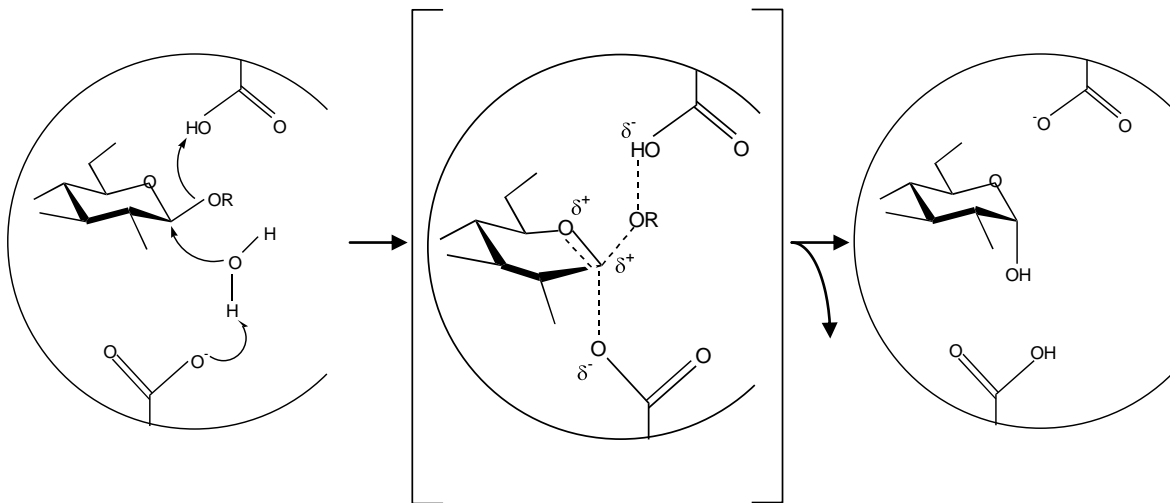


Figure 1: Réaction d'hydrolyse catalysée par les glycosidases agissant par inversion de configuration. (**Placier, 1999**)

2.1.2. Mécanisme de rétention de configuration

Comme dans le mécanisme d'inversion de configuration, le mécanisme catalytique des enzymes procédant par rétention de configuration impliquerait deux acides carboxyliques présents au niveau du site actif. Les acides aminés renfermant ces groupements carboxyliques diffèrent en fonction de la famille à laquelle appartient l'enzyme (Asp et Glu: famille 3; Glu et Glu: famille 1, respectivement base nucléophile et accepteur de proton dans le cas des β -D-galactosidases) selon **McCarter et al. (1997)**. L'hydrolyse enzymatique de la liaison osidique catalysée par les glycosidases agissant avec rétention de configuration fait appel à deux étapes

successives (**Figure 2**). La rétention de configuration passe en fait par une double inversion de configuration. Dans ce cas, les deux acides carboxyliques ont des rôles différents. L'une des deux fonctions carboxyliques joue le rôle de nucléophile permettant l'attaque du carbone anomérique du substrat et la formation d'un intermédiaire glycosyl-enzyme covalent. L'autre fonctionne à la fois comme un acide et comme une base (**Wang et Withers, 1995**). Lors de la première étape, par catalyse acide, le site catalytique acido-basique protone le groupe partant O-R pour donner l'alcool R-OH. Puis, dans la deuxième étape, il déprotone l'accepteur nucléophile qui vient attaquer le glycosyle. Les deux états de transition sont très semblables. Les preuves relatives à l'existence de ce mécanisme ont notamment été rapportées par les travaux de l'équipe de Withers (**McLeod et al., 1994; McIntosh et al., 1996**).

Pour les glycosidases procédant par rétention de configuration, c'est la distance plus courte entre les deux acides carboxyliques (5,5 Å) qui permettrait une attaque directe de l'acide carboxylique jouant le rôle de nucléophile sur le carbone anomérique du substrat. Le mécanisme de rétention de configuration fait donc appel à deux étapes successives appelées: l'étape de glycosylation (**1**), et l'étape de déglycosylation (**2**) (**Figure 2**).

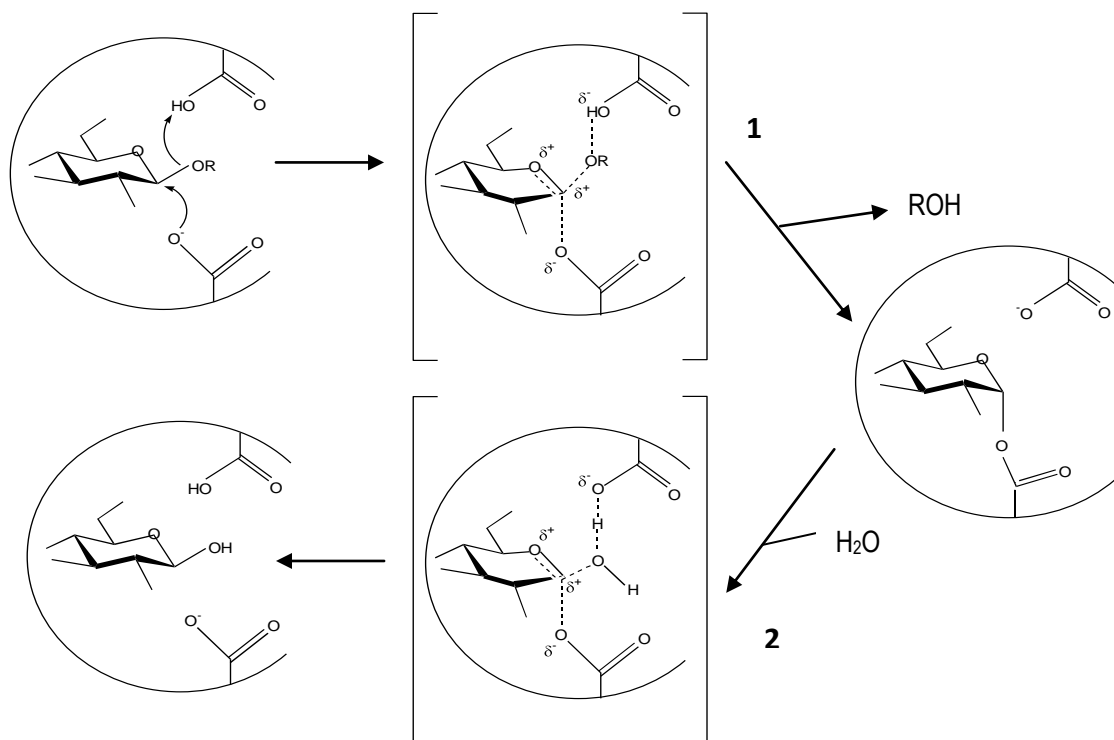


Figure 2: Réaction d'hydrolyse catalysée par les glycosidases agissant par rétention de configuration. (**Placier, 1999**)

2.2. Réactions catalysée par les glycosides hydrolases

2.2.1. Réaction d'hydrolyse

Le rôle *in vivo* des glycosidases est la catalyse des réactions d'hydrolyse d'oligosaccharides ou de glycoconjugués selon le schéma réactionnel présenté par la **figure 3**.

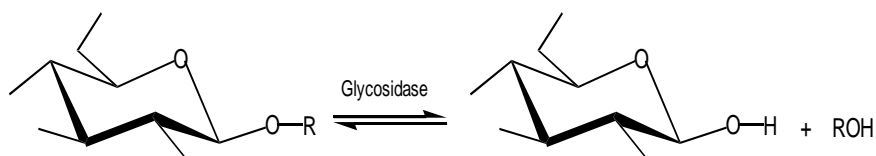


Figure 3: Schéma général de la réaction d'hydrolyse catalysée par les glycosides hydrolases. (Placier, 1999)

Etant donné que les étapes de la catalyse enzymatique sont toutes réversibles, il est possible d'utiliser les glycosidases pour catalyser la synthèse de la liaison osidique. Il existe deux approches dans la préparation de glycoconjugués par les glycosidases: la première est la réaction de synthèse, contrôlée thermodynamiquement et la seconde est la réaction de transglycosylation qui est contrôlée cinétiquement.

2.2.2. Réaction de synthèse

La réaction de synthèse est la réaction inverse de l'hydrolyse. Le monosaccharide libre obtenu devient le substrat pour l'enzyme (**Figure 4**).

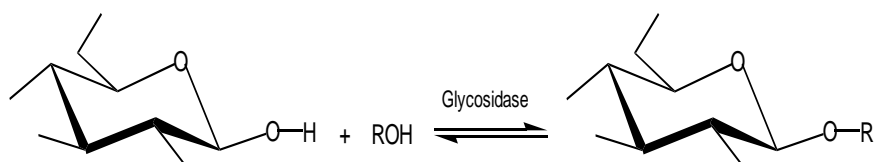


Figure 4: Schéma général de la réaction de synthèse catalysée par les glycosides hydrolases. (Placier, 1999)

L'équilibre de la réaction est largement en faveur de la réaction d'hydrolyse et donc les rendements de synthèse sont souvent très faibles. Cependant, en opérant sous certaines conditions expérimentales, on peut néanmoins déplacer l'équilibre vers la réaction de synthèse. Deux approches sont utilisées: la première consiste à éliminer le produit de la réaction au fur et à mesure que sa synthèse a lieu, et la deuxième, à réduire l'activité de l'eau (Ajisaka *et al.*, 1987). Malgré tout, les rendements restent faibles.

2.2.3. Réaction de transglycosylation

La transglycosylation constitue une approche cinétique de la synthèse enzymatique de la liaison osidique. Dans le cadre de la réaction de transglycosylation, le transfert du résidu glycosyle se fait sur une molécule accepteur nucléophile autre que l'eau (R'OH) (**Figure 5**).

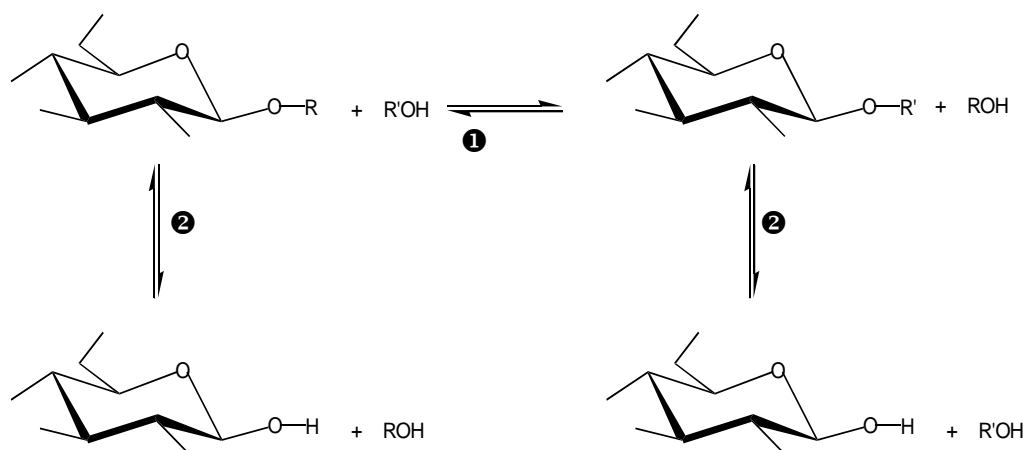


Figure 5: Schéma général de la réaction de transglycosylation catalysée par les glycosides hydrolases. (Placier, 1999)
Compétition entre transglycosylation ① et hydrolyse ②.

Il existe donc une compétition entre les réactions de transglycosylation et d'hydrolyse; l'enzyme pouvant à la fois catalyser l'hydrolyse du substrat mais aussi l'hydrolyse du produit de transglycosylation (**Figure 5**). Généralement, les rendements sont bien meilleurs en transglycosylation qu'en synthèse (de 30 à 50 %) et la réaction de transglycosylation constitue la méthode de choix pour la synthèse de la liaison osidique. Ces rendements peuvent être

améliorés soit en augmentant la vitesse de transglycosylation, soit en diminuant la vitesse d'hydrolyse. La vitesse de déglycosylation de l'intermédiaire glycosyl-enzyme, *via* la transglycosylation, est cinétiquement favorisée par rapport à celle de l'hydrolyse. Cependant, la transglycosylation dépend de l'accepteur nucléophile ajouté dans le milieu et donc du produit désiré. On ne peut donc pas agir de façon générale sur la vitesse de transglycosylation.

Pour diminuer la vitesse d'hydrolyse, il faut jouer sur la "réactivité" de l'eau en travaillant avec de faibles quantités d'eau et donc en diminuant son activité. De nombreuses études ont été menées dans ce sens, parmi elles, on peut citer les travaux de **Vic et Thomas (1992)**, qui ont utilisé une grande quantité de solvant organique dans le milieu réactionnel pour limiter l'apport en eau; la transglycosylation s'effectuant pour des teneurs en solvant organique allant de 50 à 95%. Une autre approche, est de travailler en milieu congelé (**Chiffolleau-Giraud et al., 1997**). Cette technique, couplée à l'utilisation d'un accepteur (vinyl- β -D-galactoside) a permis à ces auteurs d'obtenir une augmentation significative du pourcentage de transglycosylation.

Malgré les différentes approches utilisées, le rendement en transglycosylation ainsi que la régiosélectivité de la réaction dépendent essentiellement de la source enzymatique utilisée.

2.2.4. Approches enzymatique et chimique en glycosylation

Le choix de la glycosylation par voie enzymatique au détriment de la voie chimique est dicté par plusieurs facteurs (**Kren et Thiem, 1997**):

♠ d'abord, il n'existe pas de méthode chimique typique et fiable pour les réactions de glycosylation. Les conditions expérimentales drastiques entraînent souvent la détérioration de certains réactifs, à l'origine de la formation de produits indésirables. Les rendements obtenus sont généralement très faibles et très souvent, les réactions sont impraticables;

♠ ensuite, l'utilisation quasi inconditionnelle de métaux lourds comme catalyseurs dans les synthèses chimiques constitue également un facteur limitant majeur. Ces catalyseurs sont relativement chers et, du fait de leur toxicité, ne sont pas tolérés dans les cas de synthèses de produit à usage alimentaire ou thérapeutique. A l'opposé des catalyseurs chimiques, les enzymes (catalyseurs biologiques), du fait de leur nature protéique ne présentent pas

d'inconvénients au plan alimentaire. De plus, la catalyse enzymatique permet d'atteindre des vitesses réactionnelles de l'ordre 10^{23} fois plus rapides que celle des réactions non-catalysées;

♠ un autre facteur important est la spécificité de réaction des enzymes. Ce sont des molécules comportant des groupements fonctionnels variés. De ce fait, leurs sites actifs peuvent donc être chimio-, régio- ou stéréospécifiques. Cette propriété très intéressante permet de réduire considérablement les conditions à mettre en œuvre pour un meilleur rendement comparativement à la synthèse chimique où, la protection de certains résidus fonctionnels des réactifs (méthylation par exemple) est impérative à l'obtention du produit désiré. Cette spécificité d'action permet donc d'outrepasser les problèmes d'encombrement stérique rencontrés dans les réactions chimiques (**Kren et Thiem, 1997**);

♠ il existe également un système enzymatique adéquat pour les réactions de glycosylation et les substrats utilisés sont au moins partiellement solubles dans l'eau;

♠ Enfin, il faut relever que dans les deux cas de synthèse (enzymatique et chimique), les substrats (réactifs) sont rares et par conséquent excessivement chers. Cependant, dans les cas de glycosylation enzymatique, bien que les rendements soient faibles, le substrat non métabolisé peut être en partie récupéré.

Les glycosidases sont des enzymes faciles à obtenir et résistants à des traitements modérés et appropriés. Elles utilisent des réactifs assez bon marché et sont absolument recommandées dans des réactions stéréospécifiques. Cependant, les inconvénients majeurs de leur utilisation en synthèse sont les faibles rendements obtenus et généralement leur faible régiosélectivité. Pour améliorer ces rendements, diverses approches sont envisagées. Au nombre de celles-ci, soulignons la recherche de nouvelles sources de glycosidases plus régiosélectives mais également le contrôle des concentrations des différents réactifs utilisés (**Johansson et al., 1989 ; Hara et al., 1994**).

Les glycosyl transférases (plus régiosélectives) qui constituent les enzymes indiquées pour les réactions de synthèse présentent des limites. Elles sont difficilement accessibles et généralement instables *in vitro*. De plus, ces enzymes nécessitent des substrats comme les nucléotides-monosaccharides qui sont excessivement chers (**Johansson et al., 1989**). Les glycosidases constituent donc une bonne alternative de synthèse enzymatique.

2.2.5. Synthèse de néoglycoconjugués et applications des glycosidases en synthèse

La synthèse de néoglycoconjugués par catalyse enzymatique est l'une des applications les plus courantes de l'utilisation des enzymes (**Kren et Thiem, 1997**). Bien que les glycosidases catalysent essentiellement, *in vivo*, des réactions d'hydrolyse, il a été montré qu'elles pouvaient dans des conditions particulières catalyser des réactions de transglycosylation conduisant à la synthèse de liaisons osidiques (**Crout et Vic, 1998**). Différents composés, suivant le donneur et l'accepteur nucléophile utilisés, sont susceptibles d'être synthétisés par transglycosylation.

Certains oligosaccharides, qui n'existent pas naturellement, peuvent être préparés de cette manière. C'est ainsi que récemment l' α -D-mannopyranosyl azide a été synthétisé. Ce composé a servi par la suite comme donneur de mannose dans des réactions de synthèse en présence d' α -mannosidases avec des rendements très intéressants. Désormais, il constitue un substrat de choix comparativement au *para*-nitrophényl- α -D-mannopyranoside communément utilisé en routine (**Bojarova et al., 2007**).

De même, **Nunoura et al. (1996)** ont montré que le fucosylglucose, synthétisé par transglycosylation, était un disaccharide exclusivement assimilé par les Bifidobactéries et pouvait ainsi favoriser leur implantation dans la flore intestinale.

Un autre oligosaccharide faisant l'objet de nombreuses études est le Gal- β -1-3Gal- β -1-4GlcNAc. Ce trisaccharide est connu comme étant responsable du rejet hyper aigü de greffe lors de la transplantation d'un organe porcin à l'homme. En effet, environ 1% des IgG humaines sont capables de reconnaître ce motif trisaccharidique et sont responsables du rejet (**Nilsson, 1997**). Par ailleurs, il a été montré d'une part que, l'utilisation de colonne d'affinité où était fixé la partie terminale (Gal- β -1-3Gal- β -) du trisaccharide pour "filtrer" le sang du receveur, était une bonne approche pour diminuer le risque de rejet. D'autre part, le trisaccharide soluble est un excellent inhibiteur de la fixation des anticorps humains sur les cellules porcines. De nombreuses études en transglycosylation sont actuellement menées pour effectuer la synthèse de ce trisaccharide (**Nilsson, 1997**).

Dans de nombreuses études de synthèse par voie enzymatique, les alcools sont utilisés comme accepteur, notamment dans des réactions de transglycosylation. Par exemple, on peut noter la synthèse par transglycosylation du détergent octylglucoside lors des travaux réalisés

par **Vanderjagt *et al.* (1994)** où le rétinol est utilisé comme accepteur dans des réactions de transglycosylation catalysées par la glucocérébrosidase humaine.

Les nucléosides, les acides aminés hydroxylés et les oligopeptides sont également utilisés comme accepteurs dans des études de réactions de transglycosylation (**Nilsson et Scigelova, 1994 ; Binder *et al.*, 1995 ; Becker et Kuhl, 1999**).

Des rendements intéressants de néoglycoconjugués O-glycosylés ont été obtenus lors des réactions de transglycosylation catalysées par des glycosidases purifiées chez les insectes (**Kouamé *et al.*, 2001 ; Yapi *et al.*, 2007**), de même que lors de réaction de synthèse de mannobiose et de mannotriose à partir d'une α -1,6-mannosidase stricte isolée chez *Aspergillus phoenicis* (**Athanasopoulos *et al.*, 2004**).

Ainsi, l'utilisation des glycosidases dans la production de néoglycoconjugués constitue une excellente illustration des nouvelles applications que permettent les catalyseurs enzymatiques.

3. α -mannosidases

3.1. Classification

Plusieurs critères de classification des α -mannosidases sont utilisés. Tous sont indicatifs et ne permettent pas une répartition précise et stricte de ces enzymes. Cependant, il revient de façon récurrente que certains facteurs soient impératifs à cette classification. Il s'agit notamment du type de liaison hydrolysée, de la localisation subcellulaire, de la sensibilité ou non des enzymes aux inhibiteurs spécifiques, du site d'attaque et de l'homologie de séquences en acides aminés.

3.1.1. En fonction du type de liaison hydrolysée

La convention de nomenclature internationale des enzymes (**NC-IUBMB, 1992**) définit cinq groupes d' α -mannosidases en fonction du type de liaison hydrolysée. Ce sont:

- ♣ **EC 3.2.1.24:** Mannosidases à spécificité large hydrolysant les liaisons α -1,2; α -1,3 et α -1,6;
- ♣ **EC 3.2.1.77:** Mannosidases spécifiques des liaisons α -1,2 et α -1,3;
- ♣ **EC 3.2.1.113:** Mannosidases à spécificité stricte de la liaison α -1,2;
- ♣ **EC 3.2.1.114:** Mannosidases spécifiques des liaisons α -1,3 et α -1,6;
- ♣ **EC 3.2.1.137:** Mannosidases spécifiques des liaisons α -1,2 et α -1,6.

Les α -mannosidases à spécificité strict α -1,6 n'ont pas encore fait l'objet de classification eu égard à leur récente découverte (**Athanasopoulos et al., 2004**). De plus, il n'existe pas à ce jour de travaux mettant en évidence une activité α -mannosidasique stricte de la liaison α -1,3.

3.1.2. En fonction de la localisation subcellulaire

Les α -mannosidases diffèrent principalement par leur localisation cellulaire et par leur intervention dans le métabolisme cellulaire des chaînes glycaniques des N-glycoprotéines. Ainsi, on distingue d'une part, les enzymes impliquées dans la biosynthèse et la maturation des N-glycoprotéines localisées dans le réticulum endoplasmique et dans l'appareil de Golgi et d'autre part, celles qui interviennent dans les réactions de dégradation des N-glycannes qui se retrouvent aussi bien dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, que dans le cytosol et le lysosome (**Winchester, 1984; Moremen et Touster, 1988; Moremen, 2000**).

3.1.3. En fonction de la sensibilité aux inhibiteurs spécifiques

Nous pouvons regrouper les α -mannosidases en deux classes en fonction de leur sensibilité ou non aux inhibiteurs spécifiques. La classe 1 renferme des enzymes inhibées de façon spécifique par les analogues de mannose sous forme pyranique tels que la désoxymannojirimycine (DMNJ) et la Kifunensine (Kif) (**Bischoff et Kornfeld, 1984; Schweden et Bause, 1989**) tandis que celles de la classe 2 sont inhibées par les analogues de type furanique tels que la swainsonine (Sw) et la didésoxyiminomannitol (DIM) (**Cenci di Bello et al., 1989 ; Shah et al., 2008**).

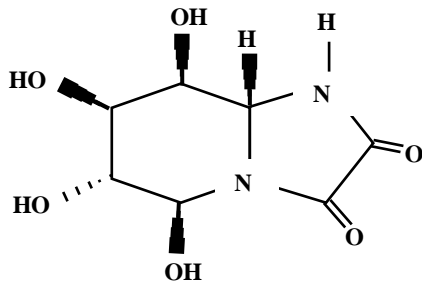
3.1.4. En fonction de la similarité de séquences en acides aminés

Les travaux réalisés par **Henrissat et Bairoch (1993 ; 1996)** ont montrés que les α -mannosidases peuvent être regroupées en deux grandes familles sur la base des similarités de séquences en acides aminés. On distingue ainsi les familles 38 et 47.

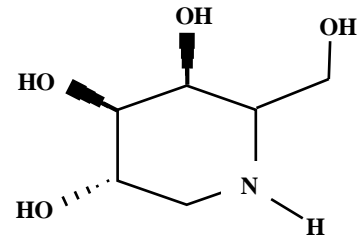
La classification des α -mannosidases, en fonction des caractéristiques biochimiques définies par **Moremen en 2000**, se présente comme la plus explicite car elle prend en compte, en plus des paramètres ci-dessus énumérés, d'autres considérations. Nous distinguons donc selon cet auteur deux classes:

♠ **la classe 1** qui appartient à la famille 47 des glycosyl hydrolases. Ce sont des exoglycosidases dont le domaine catalytique constitué d'environ 70 acides aminés est conservé. Ces enzymes interviennent surtout au niveau de la biosynthèse et la maturation des glycoprotéines et sont donc localisées au niveau du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi. Elles sont spécifiques des liaisons α -1,2 entre deux molécules de mannose et procèdent par un mécanisme de type inversion de configuration de l'anomérie du mannose libéré. L'ion calcium (Ca^{2+}) est le plus souvent indispensable à la réalisation de l'acte catalytique de ces enzymes, qui sont sensibles aux inhibiteurs de type pyranique tels la kifunensine et la désoxymannojirimycine (**Figure 6**). Cette classe présente des caractéristiques différentes et globalement opposées à celles de la classe 2;

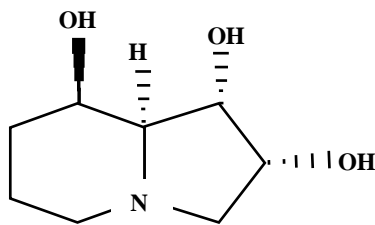
♠ les α -mannosidases de la **classe 2** font partie du groupe des glycosyl hydrolases de la famille 38. A l'instar de celles de la classe 1, ce sont également des exoglycosidases. C'est la classe la plus hétérogène, renfermant les α -mannosidases intervenant aussi bien dans le processus de biosynthèse que dans le catabolisme des chaînes glycaniques des N-glycoprotéines. En effet, elle renferme des enzymes qui se retrouvent à la fois au niveau du réticulum endoplasmique, de l'appareil de Golgi, du cytosol et du lysosome des cellules d'animaux, de végétaux et de microorganismes. Cette classe renferme généralement des enzymes de haut poids moléculaires et qui ne requièrent généralement pas de cations pour l'acte catalytique (**Moremen, 2000**). Elles présentent une spécificité large et procèdent par un mécanisme d'hydrolyse par rétention de configuration de l'anomérie du produit libéré. Cette classe est plus sensible au inhibiteur de type furanique tels que la swainsonine et la Didésoxyiminomannitol (**Figure 6**) (**Cenci di Bello et al., 1989 ; Shah et al., 2008**).



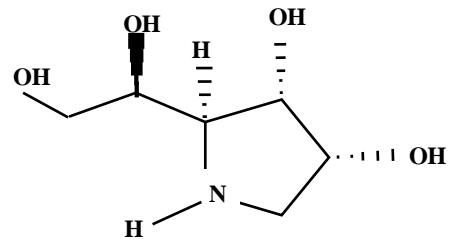
1: Kifunensine



2: Désoxymannojirimycine



3: Swainsonine



4: Didésoxyiminomannitol

Figure 6: Structures des quatre inhibiteurs spécifiques des α -mannosidases.

1 et 2: types pyraniques; 3 et 4: types furaniques. (Bédikou)

3.2. α -mannosidases particulières

Bien que la plupart des α -mannosidases soient des exoglycosidases, il existe des α -mannosidases de type endo- (Lubas et Spiro, 1988 ; Moore et Spiro, 1990). Ces enzymes se retrouvent généralement aussi bien dans le réticulum endoplasmique que dans l'appareil de Golgi. Cependant, leur activité spécifique est environ 70 fois plus élevée dans l'appareil de Golgi (Lubas et Spiro, 1987). Les endo-mannosidases sont spécifiques du substrat $\text{GlcMan}_9\text{GlcNAc}$ dont l'hydrolyse permet de libérer le résidu $\text{Man}_8\text{GlcNAc}$. Ces enzymes seraient à l'origine d'une voie de biosynthèse des N-glycoprotéines indépendante de l'intervention de l' α -glucosidase II du réticulum endoplasmique (Moore et Spiro, 1990). La figure 7 présente de façon schématique, le processus d'hydrolyse par les α -mannosidases de types exo et endo en présence du substrat $\text{GlcMan}_9\text{GlcNAc}$.

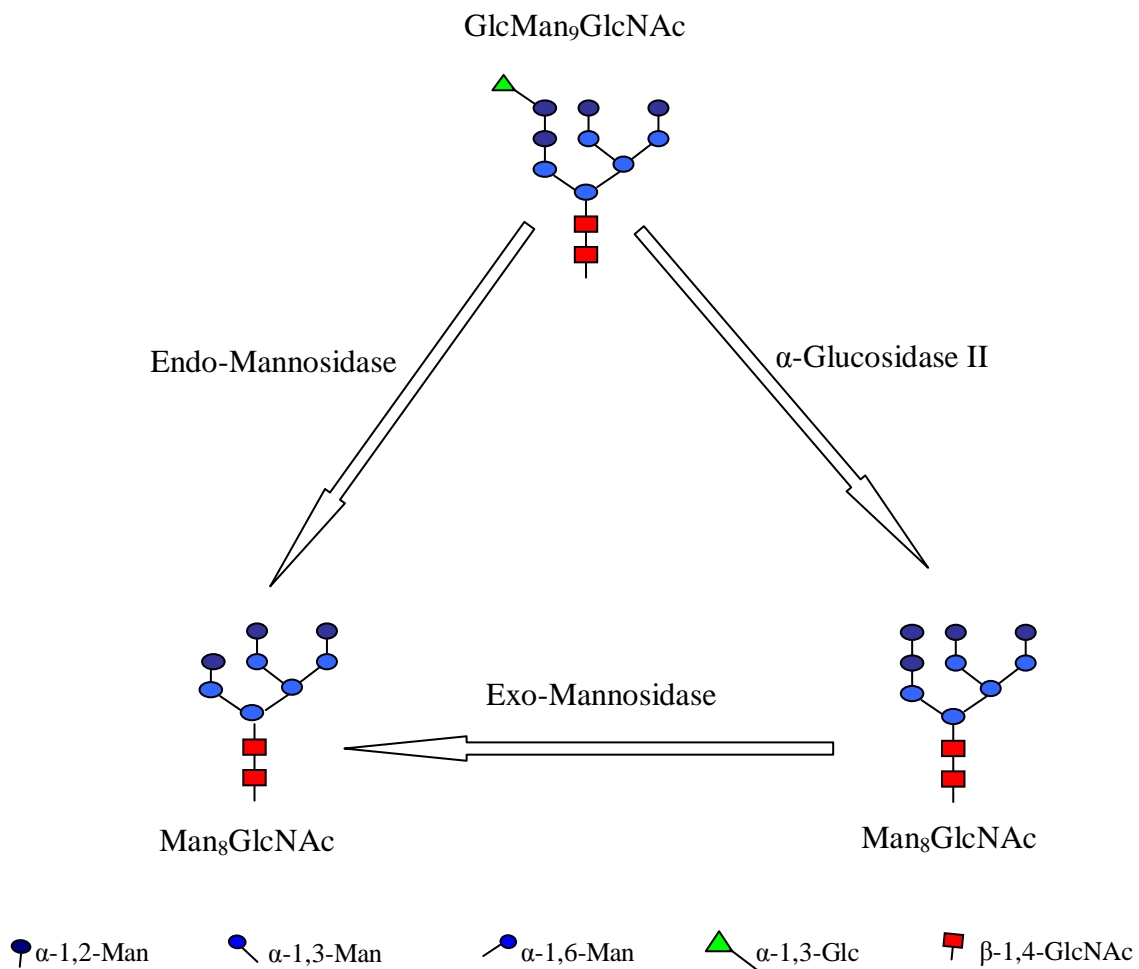


Figure 7: Processus d'hydrolyse des α -mannosidases de types exo et endo en présence du substrat GlcMan₉GlcNAc. (Bédikou)

3.3. Rôle physiologique des α -mannosidases

Les α -mannosidases sont des glycosidases spécifiques de l'hydrolyse du résidu de mannose en position α . Elles sont essentiellement impliquées dans le métabolisme de la fraction glycannique des N-glycoprotéines, influençant ainsi les propriétés bio-activités de ces derniers (Varki, 1993).

La biosynthèse des N-glycannes comporte trois principales étapes (Figure 8). La première concerne la synthèse du glycanne sous forme d'un intermédiaire lipidique, le dolicholpyrophospho-oligosaccharide. La seconde étape permet le transfert en bloc, dans le

réticulum endoplasmique rugueux (RER), du glycanne sur un résidu asparagine (N) de la protéine en cours d'élongation. Enfin, la troisième étape concerne la maturation du glycanne. Cette maturation s'effectue tout au long de la migration du glycanne dans le RER puis dans l'appareil de Golgi avant la sécrétion ou encore l'intégration de la protéine dans la structure cellulaire appropriée (**Tulsiani *et al.*, 1982 ; Kornfeld et Kornfeld, 1985**).

Notons que tous les résidus d'asparagine ne sont pas glycosylés. En effet, à la deuxième étape, le transfert de l'oligosaccharide n'est possible que si l'asparagine (N) est présente dans une séquence consensus appelée «séquen» de type N-X-S ou N-X-T (dans laquelle X représente tout acide aminé sauf la proline, S la sérine et T la thréonine). Cependant, toutes les asparagines comprises dans un tel consensus ne sont pas non plus obligatoirement glycosylées. La structure de la protéine est aussi responsable de l'accessibilité du site (**Kukuruzinska et Lennon, 1998**).

Il existe trois types de structures glycaniques: le type oligomannosidique, le type N-acétyl lactosaminique et le type complexe (**Figure 8**). Au niveau de la flore fongique, il existe deux formes de structure de type mannosidique. Ce sont le type oligomannosidique retrouvé également chez les mammifères et les invertébrés et le type mannane ou polymannosidique dont la synthèse est catalysée par une transférase particulière (l' α -1,6-mannosyltransférase fongique) qui admet la $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2\text{-Asn}$ comme substrat spécifique. Cette structure très ramifiée entre dans la constitution de la paroi de la plupart de ces microorganismes (**Tanner et Lehle, 1987 ; Ballou, 1990 ; Sears et Wong, 1998**).

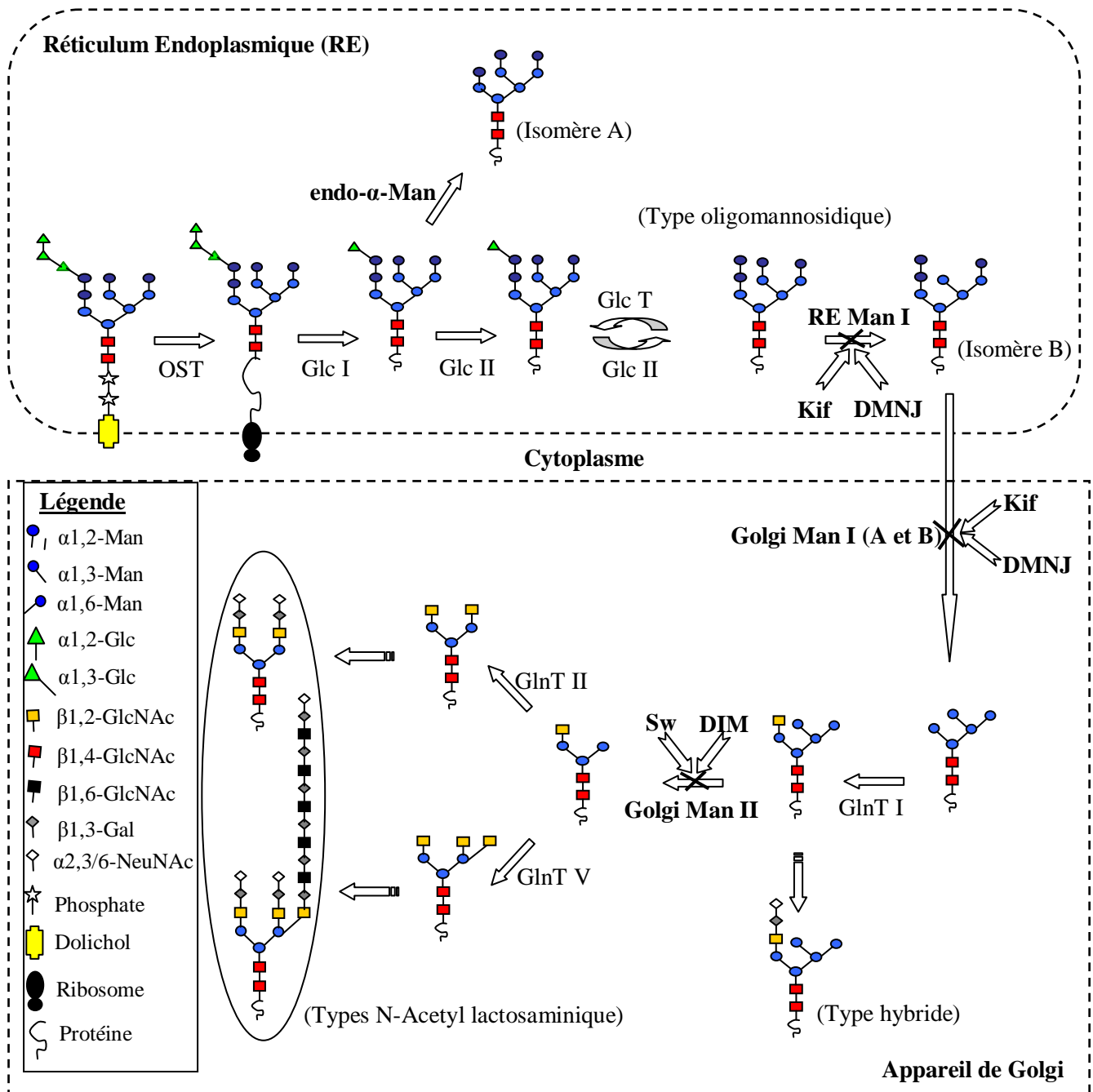


Figure 8: Schéma simplifié de la biosynthèse des glycoprotéines chez les mammifères mettant en évidence quelques glycosidases et glycosyltransférases. (Bédikou)

Les enzymes: OST, oligosaccharide transférase; Glc I, glucosidase I; Glc II, glucosidase II; endo- α -Man, Mannosidase de type endo; GlnT, UDP-Glc glycoprotéine glycosyl-transférase; RE Man I, RE Mannosidase I; Golgi Man I (A et B), Mannosidase golgienne IA et IB. Inhibiteurs spécifiques: Kif, Kifunensine; DMNJ, déoxymannojirimicin; Sw, Swainsonine; DIM, Didéoxymimomannitol. La structuration de la glycoprotéine est indiquée par la légende.

3.4. Impact de la glycosylation sur l'activité biologique des protéines

Les oligosaccharides se retrouvent dans la nature associés à des structures moléculaires diverses. Pour exemple, la plupart des enzymes, des récepteurs cellulaires, des protéines constitutives et sécrétées, des immunoglobulines et des antigènes viraux sont des glycoprotéines (Varki, 1993).

A l'heure de l'expression de protéines recombinantes à usage thérapeutique, il n'est plus concevable de croire que l'activité biologique d'une protéine est uniquement fonction de sa séquence en acides aminés. Il est important maintenant de se soucier des glycannes qui, par leurs propriétés physico-chimiques et biologiques, pourraient moduler l'activité des glycoprotéines (Cumming, 1991; Kobata, 1992; Lis et Sharon, 1993 ; Wang *et al.*, 1996). Selon ces auteurs, la présence de glycannes contribue au repliement du polypeptide en cours d'élongation et stabilise sa conformation tridimensionnelle. Aussi, en recouvrant la protéine, les glycannes protègent-elles la glycoprotéine de l'action des protéases. D'autres études ont montré que les oligosaccharides des glycoprotéines sont également impliqués dans les mécanismes d'invasion tumorale (Stroud *et al.*, 1994; Muller *et al.*, 1999).

D'autre part, les O-glycannes sont responsables de propriétés immunologiques. Un des exemples le plus parlant est sans doute le système de groupe sanguin ABO. La présence d'épitopes immunogènes à la surface des cellules en particulier des globules rouges a permis de les classer en trois familles, chacune représentant une structure glycanique particulière. La présence de glycannes peut aussi moduler l'activité biologique d'une glycoprotéine par masquage d'épitopes, par exemple. La demi-vie d'une glycoprotéine est fortement diminuée par l'absence d'acide sialique (Cumming, 1991; Wang *et al.*, 1996).

La présence de chaînes oligosaccharidiques à la surface des cellules indique qu'elles jouent un rôle dans les phénomènes de reconnaissance, d'interaction cellule-cellule, cellule-pathogène ou cellule-symbiote (Rosen, 1989 ; Kansas, 1996).

3.5. Troubles physiologiques liés au dysfonctionnement des α -mannosidases

Chez l'homme comme chez plusieurs autres espèces, un certain nombre de pathologies sont liés à des altérations de la glycosylation. Ces maladies, connues sous le nom de *carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome* (CDGS) (Jaeken et Carchon, 1993 ;

Panneerselvam et Freeze, 1996 ; Seta et al., 1999) sont rapportées dans plusieurs revues de médecine (**Lowe et Marth, 2003**). Dans les cas de déficit fonctionnel en α -mannosidases, on parle de mannosidoses. Les mannosidoses sont des troubles congénitaux dus à une accumulation intralysosomale des glycoprotéines riches en résidus de mannose. Les signes cliniques observés sont variés, allant des troubles nerveux aux anomalies du squelette et dans les cas les plus sévères, à une hypertrophie du foie et de la rate qui évoluent progressivement vers une issue fatale pour le sujet atteint (**Bellier, 2001 ; Dupré et al., 2004**).

3.6. Domaines d'application des α -mannosidases

Les α -mannosidases constituent depuis quelques années, un outil biotechnologique non négligeable du fait de leurs différents domaines d'application. En effet, dans l'industrie pharmaceutique, les α -mannosidases à spécificité large (α -mannosidases lysosomales) sont couramment utilisées dans le traitement des mannosidoses (**Sun et al., 1999 ; Hirsch et al., 2003**).

Des études préliminaires réalisées sur les α -mannosidases de latex du papayer ont montré que ces enzymes pourraient être utilisées en association avec des antifongiques déjà connues (la N-Acéthyl- β -D-hexosaminidase par exemple) pour accroître leur efficacité (**Giordani et al., 1991**).

In vitro, les α -mannosidases sont utilisées pour l'analyse des structures oligomannosidiques généralement rencontrées au niveau des glycoprotéines (**Maruyama et al., 1994 ; Misaki et al., 2003**). Notons également, toujours dans les conditions expérimentales, que les α -mannosidases sont utilisées dans les réactions de synthèse de néomannoconjugués à travers des réactions de transmannosylation (**Michalski et al., 1990 ; Wongvithoonyaporn et al., 1997 ; Athanasopolous et al., 2004**). Chez les insectes, la structure de certaines α -mannosidases fortement inhibées par la swainsonine (agent anticancérigène) ont servi de modèle d'étude dans la lutte contre le cancer (**Van den Elsen et al., 2001**).

MATERIEL ET METHODES

I. MATERIEL

1. Produits chimiques et réactifs

Les substrats chromogéniques *para*-nitrophényles (*p*NP): *p*NP- α -D-Mannopyranoside, *p*NP- α -D-Glucopyranoside, *p*NP- α -L-Fucopyranoside, *p*NP- α -D-Galactopyranoside, *p*NP- α -L-Arabinopyranoside, *p*NP- β -D-Fucopyranoside, *p*NP- β -D-Glucopyranoside, *p*NP- β -D-Galactopyranoside et *p*NP- β -D-Xylopyranoside proviennent de chez SIGMA-Aldrich. De même, les mannobioses: 2-O- α -D-mannopyranosyl-D-mannopyranoside (Man- α -1,2-Man), 3-O- α -D-mannopyranosyl-D-mannopyranoside (Man- α -1,3-Man) et 6-O- α -D-mannopyranosyl-D-mannopyranoside (Man- α -1,6-Man) sont de chez SIGMA-Aldrich.

Les inhibiteurs spécifiques des α -mannosidases que sont la swainsonine (Sw), le 1,4-didésoxy-1,4-iminomannitol (DIM) et le 1-désoxymannojirimycine (DMNJ) proviennent également de chez SIGMA-Aldrich tandis que la kifunensine (*Kitasatosporia kifunense*) (Kif) est un produit de chez Calbiochem.

Le D (+) Mannose ayant servi de témoin à la révélation des produits d'hydrolyse sur plaques de chromatographie sur couche mince (CCM) provient de PANREAC Quimica.

Les gels: Sephacryl S-100 HR, Sephacryl S-200 HR, DEAE-Sepharose Fast Flow et Phényl-Sepharose 6 Fast Flow sont des produits de PHARMACIA-LKB Biotech.

Les plaques en verre de gel de silice (plaques TLC) sont de chez MERCK.

Les protéines standards utilisées pour la détermination des masses moléculaires et les produits chimiques ayant servis aux électrophorèses sur gel de polyacrylamide sont de chez BIO-RAD.

Tous les autres produits chimiques et réactifs utilisés sont de qualité analytique.

2. Matériel biologique

Les larves du charançon *Rhynchophorus palmarum* utilisées dans ce travail, proviennent du palmier à huile (*Elaeis guineensis*) en putréfaction, ayant servi à la production

de vin de palme communément appelé «Bandji ou Bangui». Ces palmiers sont localisés dans la zone forestière humide, au Sud de la Côte d'Ivoire, dans le district d'Abidjan.

II. METHODES

1. Source et obtention de l'extrait brut enzymatique

La source enzymatique utilisée dans ce travail est le suc digestif de la larve du charançon *Rhynchophorus palmarum*. La section de la tête de la larve laisse apparaître les organes internes. Le tube digestif, coloré en brun, est repéré, isolé, puis vidé de son contenu par ponction à l'aide d'une seringue stérile. Le suc digestif ainsi obtenu est filtré à l'aide de coton stérile puis, centrifugé à 10.000 trs/min pendant 15 min au moyen d'une centrifugeuse de marque HERMLE Z300K réfrigérée à 4 °C. Le surnageant contenant les protéines solubles (solution enzymatique ou extrait brut) est fractionné en aliquotes de 1 ml et congelé.

2. Techniques de dosage

2.1. Conditions standard de mesure de l'activité enzymatique

L'activité enzymatique des différents isoformes d' α -mannosidase est mesurée à 37 °C pour différents temps de réaction, dans un tampon acétate de sodium 100 mM (pH 4,5 ou 5,0) et en présence de 0,8 mM du substrat *para*-nitrophényl- α -D-mannopyranoside (*p*NP- α -Man). Après la préincubation du mélange enzyme-tampon à 37 °C pendant 5 min, la réaction est déclenchée par ajout de 50 μ l de substrat préparé à 2,5 mM. Le volume final de la réaction est de 150 μ l. L'arrêt de la réaction se fait par ajout de 2 ml de carbonate de sodium (2 % (p/v) ; pH 10,5). Le *para*-nitrophénol (*p*NP) libéré lors de l'hydrolyse du substrat est dosé au spectrophotomètre (Spectronic Genesys 5) à 410 nm et quantifié à l'aide d'une droite d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions que les essais. L'unité enzymatique (UI) est définie comme étant la quantité d'enzyme qui catalyse l'hydrolyse de 1 μ mol de *p*NP par min à 37 °C dans les conditions décrites ci-dessus. L'activité spécifique est exprimée en unité enzymatique (UI) par mg de protéines.

2.2. Dosage des protéines

La teneur en protéines est déterminée par la méthode de **Lowry *et al.* (1951)**, utilisant le réactif de Folin ciocalteus. Celui-ci permet le dosage des composés phénoliques par la formation d'un complexe coloré (bleu-violacé) avec un sel de cuivre. L'échantillon de protéine à doser est mélangé à une solution alcaline de folin et de Cu_2SO_4 de coloration bleu clair. Les ions cuivriques Cu^{2+} sont oxydés par les noyaux aromatiques en ion Cu^+ (ions cuivreux). L'intensité de la coloration obtenue après incubation à l'obscurité à la température ambiante est directement proportionnelle à la concentration en protéines de l'échantillon. La mesure de la densité optique s'effectue à 660 nm et la teneur en protéines est estimée par référence à une courbe étalon obtenue dans les mêmes conditions que l'essai avec du sérum albumine de bœuf (SAB).

3. Techniques de purification

La stratégie de purification élaborée dans ce travail s'est appuyée sur des gels aux propriétés physico-chimiques stables et aisés d'utilisation. Cette stratégie a concilié efficacité et reproductibilité.

Le protocole de purification des α -mannosidases du suc digestif de la larve du charançon *Rhynchophorus palmarum* comporte au plus quatre étapes chromatographiques. Une précipitation au sulfate d'ammonium à 80 % suivie de deux ou trois étapes chromatographiques sur gel ont été utilisés pour mener à bien ce protocole. La première étape chromatographique est une filtration sur gel, suivie d'une chromatographie sur échangeur anionique. La dernière étape qui a été nécessaire pour trois des quatre isoformes purifiés est une chromatographie à interaction hydrophobe.

La précipitation est faite à 4 °C et les chromatographies sont toutes réalisées à 20 °C. Les conditions opératoires particulières pour chaque étape sont rapportées ci-dessous.

3.1. Précipitation au sulfate d'ammonium

Cette technique utilise la solubilité différentielle des protéines. Comme chaque protéine est plus ou moins soluble en solution selon sa composition, on peut en séparer plusieurs en fonction de leur tendance à précipiter plus ou moins vite quand on change la force ionique de la solution qui les contient.

La précipitation au sulfate d'ammonium a été réalisée à 4 °C à partir de 2,5 ml de l'extrait brut enzymatique. Ce volume est saturé à 80 % (p/v) de sel puis homogénéisé pendant au moins 8 h. La solution qui en résulte est centrifugée à 10.000 trs/min pendant 15 min et le culot obtenu est resuspendu dans 1 ml du tampon de chromatographie (tampon acétate de sodium 20 mM, pH 5,0).

3.2. Chromatographie d'exclusion moléculaire sur gel Sephacryl S-100 HR

Cette chromatographie permet de séparer les molécules en fonction de leur volume hydrodynamique et leur poids moléculaire. Le gel Sephacryl S-100 HR (PHARMACIA Biotech.) permet de fractionner les protéines globulaires qui ont une masse comprise entre 1 et 100 kiloDaltons.

Ce gel est coulé dans une colonne en verre (1,5 cm x 67 cm) et est équilibré avec du tampon acétate de sodium 20 mM (pH 5,0). Après le dépôt de l'extrait enzymatique (1 ml) précipité au sulfate d'ammonium à 80 % de saturation, les protéines sont éluées avec le tampon d'équilibrage à un débit constant de 0,2 ml/min et des fractions de 1 ml sont collectées. Les fractions actives contenant les activités α -mannosidasiques sont rassemblées pour la prochaine étape chromatographique sur gel.

3.3. Chromatographie échangeuse d'anions sur gel DEAE-Sepharose Fast Flow

La chromatographie d'échange d'ions permet de séparer les molécules essentiellement en fonction de leurs charges. Son principe repose sur l'interaction électrostatique entre les molécules et un ligand fixé à la matrice. Ce ligand chargé est associé à un contre-ion. Les

protéines qui sont des polyélectrolytes dont la charge globale dépend du pH du milieu, se prêtent bien à ce type de chromatographie. L'élution des protéines retenues par le gel est généralement réalisé par un gradient de NaCl ou parfois par une variation du pH.

Ce gel DEAE-Sepharose Fast Flow est coulé dans une colonne en verre (2,5 cm x 4,5 cm) et équilibré avec le tampon acétate 20 mM (pH 5,0). Le débit est fixé à 3 ml/min et des fractions de 1 ml sont collectées.

Les fractions actives obtenues après la première étape chromatographique sont appliquées sur ce gel et, la colonne est lavée avec deux équivalents volume du gel avec le tampon d'équilibrage pour éliminer les protéines non adsorbées. Les protéines retenues par le gel sont éluées en augmentant la force ionique du milieu. Des gradients croissants de NaCl comprenant: 0,10 M, 0,20 M, 0,25 M, 0,30 M et 1 M préparés chacun dans 40 ml du tampon acétate pH 5,0, sont appliqués pour décrocher les protéines retenues. Les fractions contenant les différents isoformes d' α -mannosidase sont rassemblées puis dialysées contre le tampon acétate de sodium 20 mM (pH 5,0) pour éliminer l'excès de NaCl.

3.4. Chromatographie d'interaction hydrophobe sur gel Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow

La chromatographie d'interaction hydrophobe permet de séparer les molécules en fonction de leur hydrophobie et leur caractère amphiphile. L'hydrophobie se définit comme étant la répulsion s'établissant entre une molécule non polaire et un environnement polaire tel que l'eau. La fixation des protéines sur la colonne est influencée principalement par le type de ligand, la force ionique du milieu et la variation de la température (25 à 30 % de réduction de la fixation lorsque l'on fait varier la température de 20 à 4 °C). Ainsi, l'augmentation de la force ionique renforce les interactions hydrophobes.

Dans cette chromatographie, la matrice hydrophobe porte de courtes chaînes phényles et la phase mobile est généralement une solution aqueuse saline. Les protéines fixées à la matrice en condition de force ionique élevée sont éluées en diminuant la salinité du milieu (gradient négatif). Outre cette méthode d'élution, l'on peut recourir à une variation du pH ou de la température.

Le gel Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow (PHARMACIA Biochem) est coulé dans une colonne en verre (1,5 cm x 3,2 cm) et équilibrée avec 1 M d'une solution de sulfate d'ammonium préparée dans 20 mM de tampon acétate de sodium (pH 5,0). Le débit d'élution est fixé à 1,5 ml/min et des fractions de 1 ml sont collectées. Chaque solution enzymatique hétérogène des isoformes issues de la dialyse contre le tampon après chromatographie sur gel DEAE-Sepharose Fast Flow est saturée à 1 M de sulfate d'ammonium en ajustant le pH du milieu à 5,0. Les échantillons sont ensuite déposés séparément sur la colonne. Pour chaque chromatographie, les protéines sont éluées avec trois équivalent volume de colonne (12 ml) de gradient en escalier décroissant de sulfate d'ammonium partant de 1 à 0 M et préparé à pH 5,0 dans 20 mM de tampon acétate de sodium. Les fractions les plus actives de cette chromatographie sont rassemblées et dialysées contre le tampon d'élution. La solution enzymatique obtenue après dialyse a servi pour les tests de routine pour chaque isoforme.

4. Critère de pureté

La pureté des enzymes a été vérifiée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions natives c'est-à-dire en absence d'agents dénaturants tels que le SDS et le β -mercaptoéthanol.

Le gel de polyacrylamide résulte de la polymérisation d'acrylamide ($\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CO} - \text{NH}_2$) en présence d'une faible quantité d'agent réticulant: le N,N'-méthylène bisacrylamide ($(\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CO} - \text{NH}_2)_2 - \text{CH}_2$). Cette polymérisation est amorcée par des radicaux libres résultant de la composition chimique du persulfate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_2 \text{S}_2\text{O}_8$) et accélérée par l'addition du TEMED (N,N,N',N' tétraméthyléthylènediamine). La réticulation dépend des quantités d'acrylamide et de bisacrylamide ainsi que de leur rapport. La migration des protéines se fait selon leur charge et leur taille.

5. Détermination des propriétés moléculaires

5.1. Détermination de la masse moléculaire des α -mannosidases par SDS-PAGE

Le dodécyl sulfate de sodium (SDS) de formule ($\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{10} - \text{CH}_2 - \text{O} - \text{SO}_3 \text{Na}$) est un détergent anionique très puissant capable de rompre les interactions non covalentes d'une protéine et de la débobiner. Le β -mercaptoéthanol ($\text{HS} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{OH}$), également utilisé dans cette technique, rompt les ponts dissulfures et libère les sous-unités de la protéine.

Les échantillons protéiques sont dénaturés par un traitement de 5 min à 100 °C dans un tampon Tris- HCl 125 mM (pH 6,8) contenant du SDS 4 % (p/v), du β -mercaptoéthanol 1% (v/v), du glycerol 20 % (v/v) et du bleu de bromophénol 0,025 % (p/v). Dans ces conditions, les protéines se dissocient en leurs sous-unités qui fixent de grandes quantités de détergents; ce qui masque complètement la charge naturelle de la sous-unité protéique et lui confère une charge négative constante par unité de masse. Plus les molécules sont volumineuses, plus elles comporteront de charge. Toutefois, dans un gel, les forces de friction prédominent et les grosses molécules malgré leur grand nombre de charge ont une faible mobilité.

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide, en absence ou en présence de SDS, a été réalisée selon la méthode de **Laemmli (1970)**. Des protéines de masses moléculaires connues (BIO-RAD) ont été utilisées comme marqueurs. Après migration, les bandes protéiques sont révélées au nitrate d'argent par la méthode de **Blum *et al.* (1987)**.

5.2. Détermination de la masse moléculaire des α -mannosidases par filtration sur gel Sephacryl S-200 HR

La détermination des masses moléculaires natives des α -mannosidases purifiées a été réalisée par gel filtration sur une colonne de type Sephacryl S-200 HR (0,8 cm x 35 cm), équilibrée avec un tampon acétate de sodium 20 mM (pH 5,0). Cette chromatographie permet de fractionner les protéines globulaires ayant une masse comprise entre 10 et 250 kiloDaltons (kDa). Le volume mort et le volume total de la colonne ont été déterminés respectivement avec le bleu dextran (1000 kDa) et le ferricyanure de potassium (0,33 kDa). Les marqueurs de masse moléculaire utilisés pour étalonner la colonne sont: la cellulase d'*Aspergillus niger*

(26 kDa), l'ovalbumine du blanc d'œuf (45 kDa), le sérum albumine de bœuf (SAB, 66 kDa) et la β -amylase de la patate douce (206 kDa).

6. Influence du pH sur l'activité hydrolytique des α -mannosidases

6.1. pH optimum d'hydrolyse

Le pH optimum de chaque α -mannosidase a été déterminé dans les tampons: acétate de sodium 100 mM (pH 3,6 à 5,6), phosphate de sodium 100 mM (pH 5,6 à 8,0) et citrate de sodium 100 mM (pH 3,0 à 6,0). L'activité hydrolytique des enzymes a été mesurée dans les conditions standard.

6.2. Stabilité en fonction du pH

La stabilité en fonction du pH a été étudiée en mesurant l'activité résiduelle de chaque enzyme après une préincubation à 37 °C pendant 2 h à différents pH (3,5 à 5,5) dans le tampon acétate de sodium préparé à 100 mM. L'activité résiduelle de chaque enzyme a été mesurée dans les conditions standard.

7. Influence de la température sur l'activité hydrolytique des α -mannosidases

7.1. Température optimale d'hydrolyse

L'effet de la température sur l'activité hydrolytique des quatre α -mannosidases a été mesuré dans les conditions standard d'essai en tenant compte des différents pH optimum d'hydrolyse. Cette étude a été menée à des températures variant de 30 à 80 °C après 5 min de préincubation et pendant 20 min d'incubation.

7.2. Dénaturation en fonction de la température

La dénaturation thermique a été étudiée en mesurant dans les conditions standard, l'activité résiduelle de chaque enzyme préincubée pendant 25 min à des températures comprises entre 30 et 80 °C.

7.3. Inactivation en fonction de la température

L'inactivation thermique des α -mannosidases a été étudiée en préincubant les enzymes purifiées à 37 °C et aux différentes températures optimales préalablement déterminées, pendant 180 min. A intervalles de temps définis, une quantité aliquote du milieu réactionnel est prélevée pour le dosage de l'activité résiduelle dans les conditions standard.

8. Spécificité de substrat et détermination des paramètres cinétiques

L'étude de la spécificité de substrat a été réalisée en soumettant aux enzymes purifiées plusieurs substrats synthétiques de type *para*-nitrophényl-glycosides préparés à 2,5 mM. Les milieux réactionnels (150 μ l) sont préparés dans les conditions de pH d'activités optimales et incubés à 37°C pendant 20 min. La réaction est arrêtée par ajout de 2 ml d'une solution de carbonate de sodium (2 % ; p/v). Le dosage des activités enzymatiques est réalisé dans les conditions standard. Les paramètres cinétiques (K_M et V_{max}) sont déterminés à l'aide de la représentation de **Lineweaver et Burk (1934)** obtenue à partir de concentrations de substrat (*p*NP- α -Man) variant de 0 à 6 mM. L'activité est déterminée par rapport à un témoin réalisé dans les mêmes conditions mais ne contenant pas de solution enzymatique.

9. Spécificité d'hydrolyse des mannobioses

Les produits issus de la digestion des mannobioses par les enzymes sont mis en évidence par chromatographie sur couche mince, sur des plaques en verre de gel de silice (TLC). Une quantité de 0,45 μ g d'enzyme purifiée introduite dans 100 mM de tampon acétate de sodium (pH 4,5 ou 5,0) est incubée à 37 °C pendant 24 h en présence de 1 mM de chaque mannobiose (Man- α -1,2-Man, Man- α -1,3-Man ou Man- α -1,6-Man). A des intervalles de

temps définis, une aliquote (5 μ l) du milieu réactionnel est prélevée pour l'analyse des produits d'hydrolyse. La migration se fait dans une enceinte close, saturée de vapeurs du mélange butanol/acide acétique/eau en proportions respectives de 9:3,75:2,25 (v/v/v). La révélation des produits d'hydrolyse après migration se fait par pulvérisation d'une solution de naphtho-résorcinol (1:1) préparée dans de l'éthanol et de l'acide sulfurique (20 %). Ensuite, les plaques sont séchées au sèche-cheveux et chauffées à l'étuve à 110 °C pendant 5 min. Les produits obtenus sont identifiés par rapport à des témoins et aux calculs des différentes références frontales (R_f).

10. Influence des agents chimiques sur l'activité hydrolytique des α -mannosidases

L'effet de divers agents chimiques sur l'activité des α -mannosidases, responsables de l'hydrolyse du substrat *p*NP- α -Man, a été déterminé en préincubant les enzymes en présence des agents chimiques pendant 30 min à la température ambiante. La réaction est déclenchée à 37 °C par l'ajout du substrat au milieu. Un essai témoin sans agent chimique est réalisé dans les mêmes conditions. Les activités résiduelles sont mesurées dans les conditions standard.

11. Réaction de transmannosylation

Les α -mannosidases purifiées à partir du suc digestif des larves du charançon *Rhynchophorus palmarum* ont été utilisées dans des réactions de synthèse d'oligomannosides en réduisant au maximum l'activité de l'eau dans le milieu réactionnel. Ainsi, pour optimiser le pourcentage de synthèse, plusieurs paramètres ont été étudiés. Il s'agit du pH, de la quantité en enzyme, de la concentration du donneur-accepteur et du temps de réaction.

11.1. Conditions opératoires standard

Cette étude a été réalisée à 37 °C en incubant dans 400 mM du tampon citrate-phosphate, l'enzyme et le substrat *p*NP- α -Man pendant 1 h. Le volume total du milieu réactionnel est de 80 μ l et la réaction est arrêtée par chauffage du milieu réactionnel pendant 3

min au bain-marie bouillant. La méthode d'analyse et de quantification des produits issus des différentes réactions, ainsi que les conditions opératoires particulières pour la détermination des différents paramètres étudiés sont rapportées ci-dessous.

11.2. Analyse et quantification des produits de synthèse

L'analyse et la quantification des différents produits de réaction ont été réalisées par chromatographie liquide à haute performance (CLHP), à la température ambiante (25 °C) et à partir de 10 µl de milieu réactionnel. Le phénol a été utilisé comme étalon interne pour chaque injection. La détection des produits est réalisée dans l'UV à une longueur d'onde de 254 nm à l'aide d'un détecteur de type SPECTRA SYSTEM UV 1000 et, leur séparation est faite grâce à une colonne de composés phénoliques (Phenomenex) de type SPHERECLONE 5µ ODS (2) de dimensions 250 mm × 4,60 mm. La phase mobile utilisée dans cette étude est un mélange méthanol/eau en proportion 35:65 (v/v). Le débit d'élution fixé à 1 ml/min est généré par une pompe à haute pression de type BECKMAN 114 M. Les chromatogrammes obtenus sont visualisés grâce à un intégrateur de model SHIMADZU C-R8A CHROMATOPAC V1.04.

11.3. Calcul du pourcentage de transmannosylation

L'hydrolyse d'une mole de substrat *p*NP- α -Man libère une mole de *p*NP et une mole de mannose. Par conséquent, l'aire chromatographique du *p*NP correspond parfaitement à celle du mannose libéré. Après la correction des aires par celle de l'étalon interne, les pourcentages de transmannosylation (pourcentage de mannose transféré) sont donnés par le rapport des aires du produit de synthèse et du *para*-nitrophénol (*p*NP) libéré.

11.4. Détermination du pH optimum de transmannosylation

La détermination du pH optimum de transmannosylation a été réalisée à 37 °C pendant 1 h. Une quantité de 20 µl de chaque solution enzymatique est mise à incuber en présence de

60 µl de substrat *p*NP- α -Man (10,5 mM) préparé dans 400 mM d'une gamme de pH (3,5 à 7,0) du tampon citrate-phosphate.

11.5. Détermination de la quantité optimale en enzyme pour la transmannosylation

La concentration optimale en enzyme a été déterminée à 37 °C pendant 1 h en utilisant des quantités variables de chaque solution enzymatique. Les milieux réactionnels sont préparés aux différents pH optima précédemment déterminés pour chaque enzyme.

11.6. Détermination de la concentration optimale du donneur-accepteur

La détermination de la concentration optimale du donneur-accepteur est faite à 37 °C pendant 1 h. Cette étude est réalisée dans les conditions optimales de pH et de concentration en enzyme, en faisant varier la concentration du substrat *p*NP- α -Man.

11.7. Détermination du temps optimum de transmannosylation

Le temps optimum de synthèse a été déterminé à 37 °C, dans un intervalle de temps variant entre 0 et 300 min (0 et 5 h). Cette étude prend en compte toutes les conditions optimales (pH, quantité d'enzyme et concentration de donneur/accepteur) précédemment déterminées.

RESULTATS

I. PURIFICATION DES α -MANNOSIDASES DU SUC DIGESTIF DE LA LARVE DU CHARANÇON *Rhynchophorus palmarum*

1. Stratégie de purification

Quatre (4) α -mannosidases nommées M1, M2, M3 et M4 ont été purifiées à partir du suc digestif de la larve du charançon *Rhynchophorus palmarum*. La stratégie de purification a nécessité trois étapes pour l'une des formes (M1) et quatre étapes pour les trois autres.

Ainsi, pour la purification de l' α -mannosidase M1, nous avons utilisé successivement la précipitation au sulfate d'ammonium (80 %) de l'extrait brut enzymatique, la chromatographie d'exclusion moléculaire sur gel Sephacryl S-100 HR et la chromatographie d'échange d'anions sur gel DEAE-Sepharose Fast Flow.

En ce qui concerne les enzymes M2, M3 et M4, leur purification a nécessité en plus des trois techniques utilisées pour M1, une dernière étape utilisant une chromatographie d'interaction hydrophobe sur gel Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow.

1.1. Précipitation au sulfate d'ammonium et chromatographie d'exclusion moléculaire sur gel Sephacryl S-100 HR

Les résultats obtenus à la suite de ces deux techniques de séparation sont présentés par le profil d'élution de la **figure 9**. L'analyse de ce profil montre quatre pics non-différenciés de l'activité enzymatique d'intérêt (fractions 82 à 120). La succession de ces deux techniques est nécessaire dans ce protocole de purification parce qu'elle permet d'éliminer la majorité des pigments contenus dans le suc digestif de la larve du charançon *Rhynchophorus palmarum*. De plus, elle débarrasse les fractions enzymatiques d'intérêts d'environ 80 % d'impuretés, augmentant ainsi le facteur de purification de 2,08 (**Tableau I, p.46**).

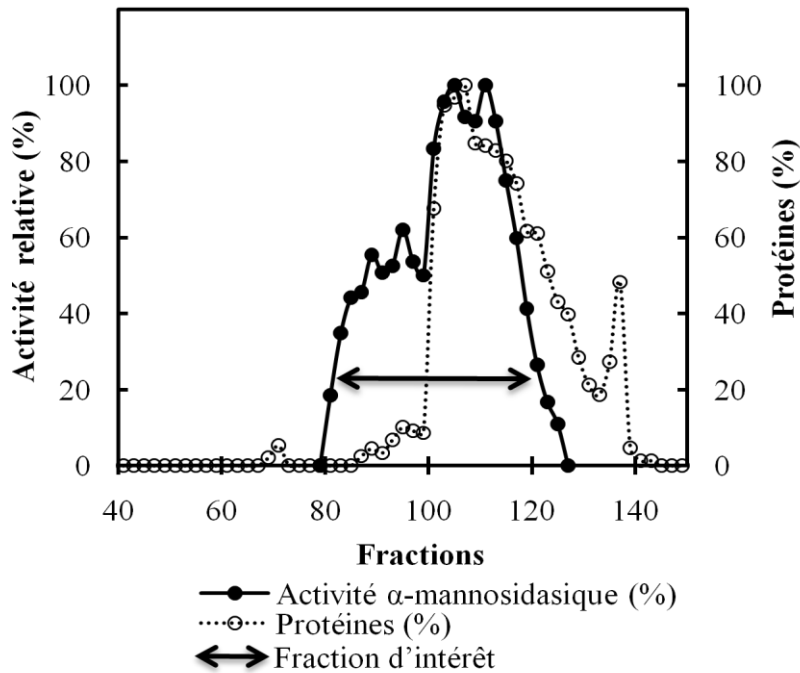


Figure 9: Profil chromatographique de l'activité α -mannosidasique du suc digestif de la larve du charançon *Rhynchophorus palmarum* sur le gel Sephacryl S-100 HR.

La purification est réalisée sur une colonne (1,5 cm \times 67 cm) équilibrée avec du tampon acétate de sodium 0,2 M pH 5,0. L'activité hydrolytique du *pNP- α -Man* est mesurée à pH 5,0 et le *pNP* libéré est quantifié à 410 nm; Les protéines sont dosées selon la méthode de **Lowry et al. (1951)**; Le débit d'élution est de 0,2 ml/min et le volume des fractions collectées est de 1 ml.

1.2. Chromatographie échangeuse d'anions sur le gel DEAE-Sepharose Fast Flow

Le profil d'élution (**Figure 10**) indique quatre pics d'activités retenus par le gel et élués respectivement aux concentrations de 0,10; 0,20; 0,25 et 0,30 M de NaCl. Ce résultat confirme bien les quatre pics non-différenciés observés sur le profil de la **figure 9**. En fonction de l'ordre croissant d'élution, ces activités α -mannosidasiques ont été nommées M1, M2, M3 et M4. Cette étape de chromatographie permet de purifier à homogénéité électrophorétique l' α -mannosidase M1 avec un facteur de purification d'environ 3,6 (**Tableau I, p.46**).

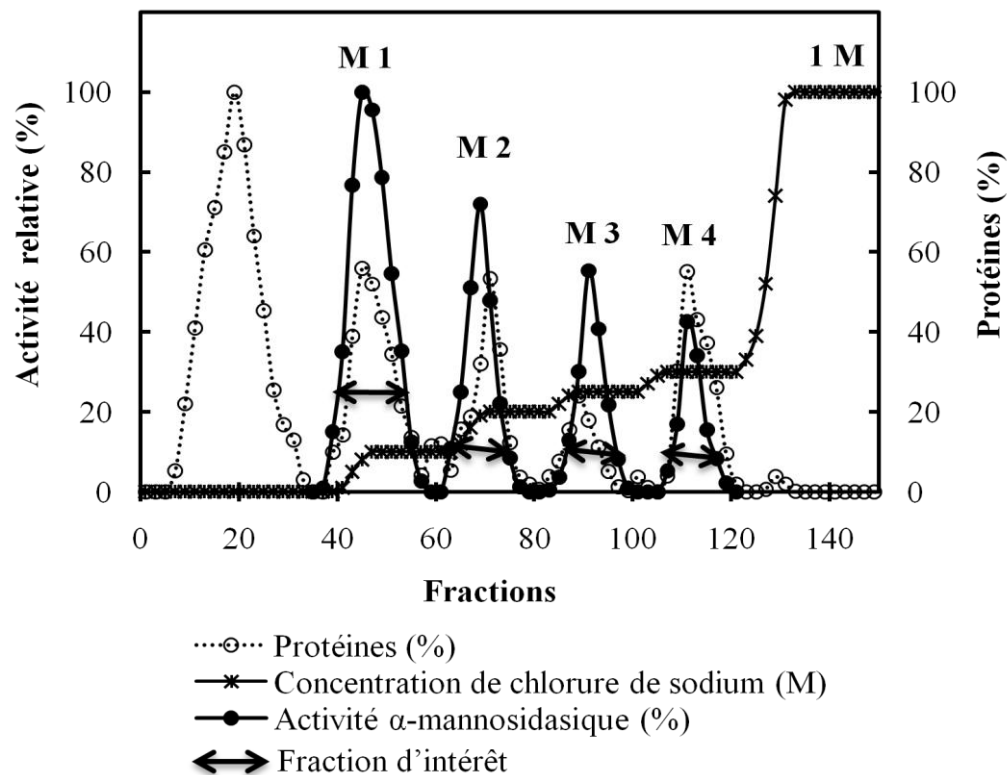


Figure 10: Profil chromatographique de l'activité α -mannosidasique du suc digestif de la larve du charançon *Rhynchophorus palmarum* sur le gel DEAE-Sepharose Fast Flow.

La purification est réalisée sur une colonne (2,5 cm \times 4,5 cm) équilibrée avec du tampon acétate de sodium 0,2 M pH 5,0. L'activité hydrolytique du *pNP- α -Man* est mesurée à pH 5,0 et le *pNP* libéré est quantifié à 410 nm. Les protéines retenues sont éluées par un gradient discontinu croissant de concentrations de NaCl variant de 0 à 1 M et dosées selon la méthode de **Lowry et al. (1951)**. Le débit d'élué est de 3 ml/min et le volume des fractions est de 1 ml. Les fractions M1, M2, M3 et M4 sont éluées aux concentrations respectives de 0,1; 0,2; 0,25 et 0,3 M.

1.3. Chromatographie d'interaction hydrophobe sur gel Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow

Les **Figures 11, 12 et 13** illustrent l'élué des protéines par un gradient discontinu décroissant de concentrations de sulfate d'ammonium. Les trois formes d' α -mannosidases sont éluées aux concentrations respectives de 0,61; 0,02 et 0,41 M de sulfate d'ammonium. A la suite de cette étape, les facteurs de purification ont été améliorés environ 26, 24 et 7 fois respectivement pour les α -mannosidases M2, M3 et M4 (**Tableau I, p. 46**).

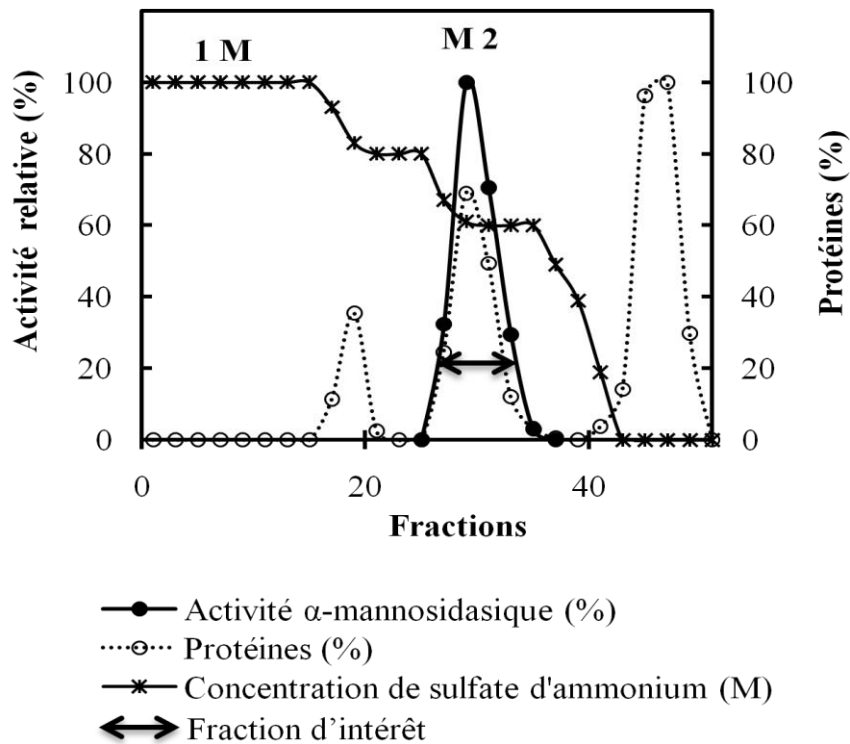


Figure 11: Profil chromatographique de l'activité α -mannosidasiqne M2 du suc digestif de la larve du charançon *Rhynchophorus palmarum* sur le gel Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow.

La purification est réalisée sur une colonne (1,5 cm \times 3,2 cm) équilibrée avec 1 M de sulfate d'ammonium préparé à partir du tampon acétate de sodium 0,2 M pH 5,0. L'activité hydrolytique du *pNP*- α -Man est mesurée à pH 5,0 et le *pNP* libéré est quantifié à 410 nm. Les protéines retenues sont éluées par un gradient discontinu décroissant de concentrations de sulfate d'ammonium allant de 1 à 0 M et dosées selon la méthode de **Lowry et al. (1951)**. Le débit d'éluion est de 1,5 ml/min et le volume des fractions recueillies est de 1 ml. L' α -mannosidase M2 est éluée à la concentration de 0,61 M.

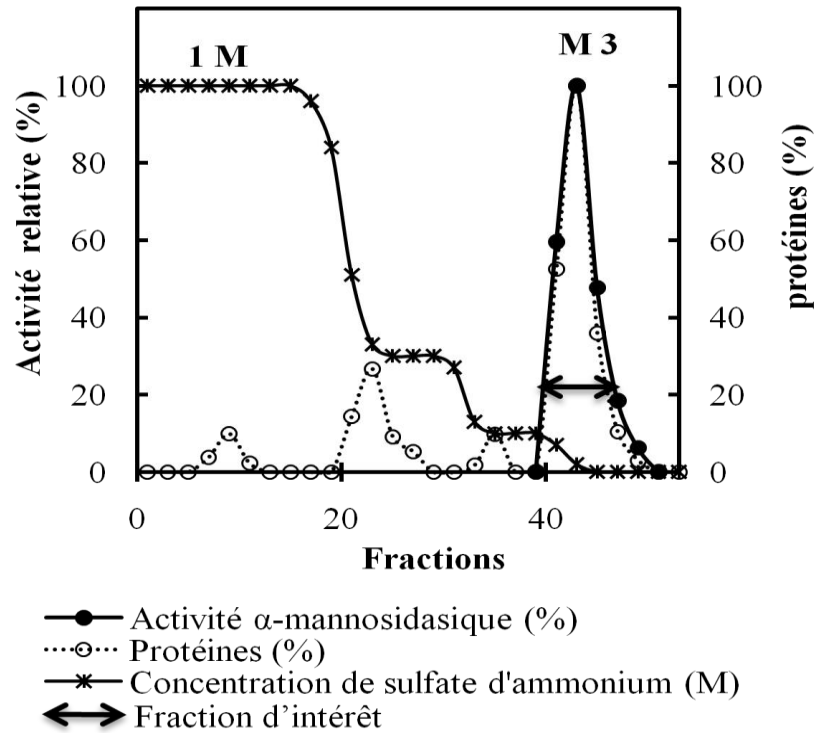


Figure 12: Profil chromatographique de l'activité α -mannosidase M3 du suc digestif de la larve du charançon *Rhynchophorus palmarum* sur le gel Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow.

La purification est réalisée sur une colonne (1,5 cm \times 3,2 cm) équilibrée avec 1 M de sulfate d'ammonium préparé à partir du tampon acétate de sodium 0,2 M pH 5,0. L'activité hydrolytique du *p*NP- α -Man est mesurée à pH 5,0 et le *p*NP libéré est quantifié à 410 nm. Les protéines retenues sont éluées par un gradient discontinu décroissant de concentrations de sulfate d'ammonium allant de 1 à 0 M et dosées selon la méthode de **Lowry et al. (1951)**. Le débit d'éluion est de 1,5 ml/min et le volume des fractions collectées est de 1 ml. L' α -mannosidase M3 est éluee à la concentration de 0,02 M.

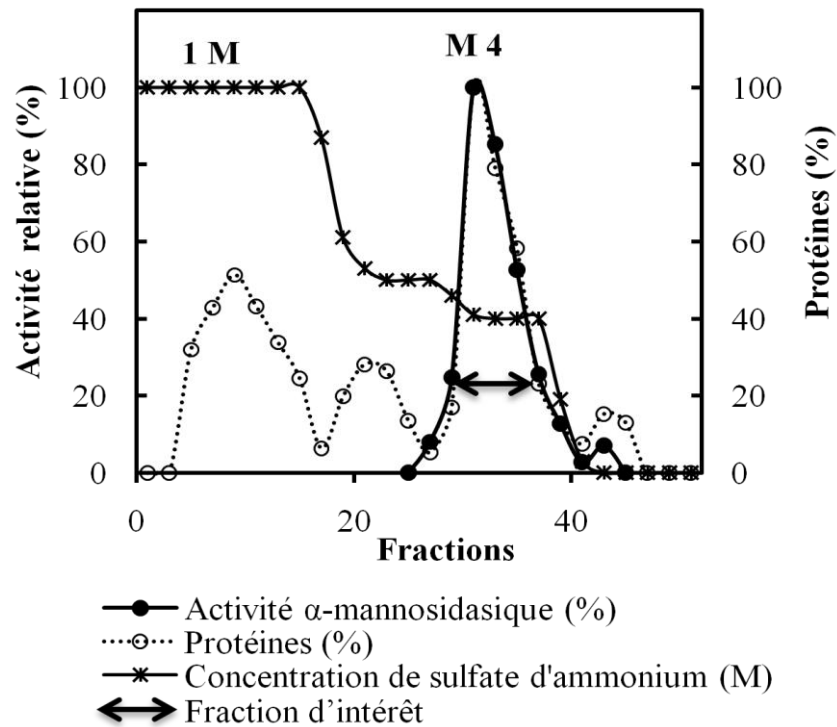


Figure 13: Profil chromatographique de l'activité α -mannosidase M4 du suc digestif de la larve du charançon *Rhynchophorus palmarum* sur le gel Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow.

La purification est réalisée sur une colonne (1,5 cm \times 3,2 cm) équilibrée avec 1 M de sulfate d'ammonium préparé à partir du tampon acétate de sodium 0,2 M pH 5,0. L'activité hydrolytique du *p*NP- α -Man est mesurée à pH 5,0 et le *p*NP libéré est quantifié à 410 nm. Les protéines retenues sont éluées par un gradient discontinu décroissant de concentrations de sulfate d'ammonium allant de 1 à 0 M et dosées selon la méthode de **Lowry et al. (1951)**. Le débit d'élution est de 1,5 ml/min et le volume des fractions collectées est de 1 ml. L' α -mannosidase M4 est éluee à la concentration de 0,41 M.

2. Bilan de purification

Le **tableau I** présente les données obtenues au cours des différentes étapes de purification. Avec une quantité de protéine initiale de 86,03 mg, les α -mannosidases M1, M2, M3 et M4 ont été purifiées respectivement environ 4, 26, 24 et 7 fois avec des quantités finales en protéines comprises entre 30 et 920 μ g.

Tableau I: Bilan de purification des α -mannosidases du suc digestif de la larve du charançon *Rhynchophorus palmarum*.

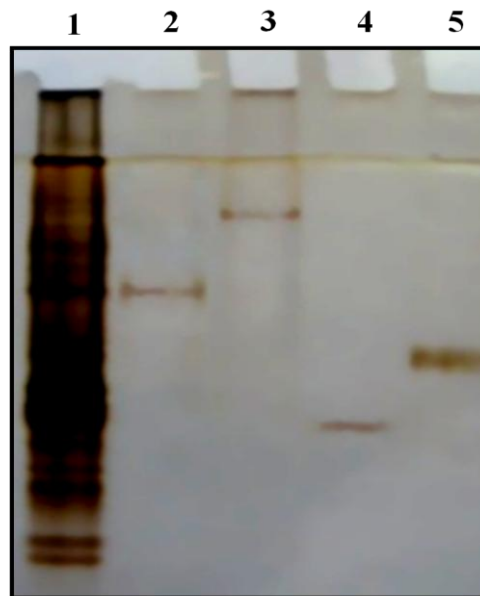
Etapes	Protéine totale (mg)	Activité totale (UI ^a)	Activité spécifique (UI/mg)	Facteur de purification	Rendement (%)
Extrait brut	86,03	42,24	0,48	1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ (80%)	72,35	36,64	0,51	1,06	88,80
Sephacryl S-100 HR	17,89	26,43	1,48	3,08	64,00
DEAE-Sepharose Fast Flow					
M1	0,92	1,57	1,71	3,56	3,80
M2	0,93	1,25	1,34	2,79	3,00
M3	0,33	0,64	1,94	4,04	1,60
M4	1,02	0,69	0,68	1,42	1,70
Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow					
M2	0,03	0,33	12,22	25,46	0,80
M3	0,04	0,41	11,39	23,73	1,00
M4	0,04	0,13	3,17	6,61	0,30

^aUnité International, c'est la quantité d'enzyme qui réalise l'hydrolyse de 1 μ mol de pNP- α -Man par minute. M1, M2, M3 et M4 en gras désignent l'étape ultime de leur purification.

3. Critère de pureté

La pureté des α -mannosidases a été vérifiée en réalisant une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions non dénaturantes c'est-à-dire en absence de SDS et de β -mercaptoéthanol. Une seule bande protéique apparaît pour chaque enzyme après révélation au

nitrate d'argent (**Photographie 2**). De plus, la présence d'activités glycosidasiques contaminantes a été recherchée et, contrairement à l'extrait brut enzymatique, aucune activité autre que celle de l' α -mannosidase n'est détectée dans chaque solution enzymatique obtenue après la dernière étape de chromatographie. Ces résultats traduisent donc une pureté satisfaisante de nos enzymes.



Photographie 2: Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions natives des α -mannosidases du suc digestif de la larve du charançon *Rhynchophorus palmarum*.

Gel homogène à 10 % d'acrylamide avec 1 mm d'épaisseur. **Puits 1:** Extrait brut; **Puits 2:** α -mannosidase M1; **Puits 3:** α -mannosidase M2; **Puits 4:** α -mannosidase M3; **Puits 5:** α -mannosidase M4.

Conclusion partielle

La stratégie de purification ci-dessus décrite nous a permis de purifier à homogénéité électrophorétique, à partir du suc digestif de la larve du charançon *Rhynchophorus palmarum* issues du palmier *Elaeis guineensis*, quatre (4) α -mannosidases nommées M1, M2, M3 et M4. Cette purification a été réalisée à partir de 2,5 ml de suc renfermant environ 86 mg de protéines. Ce protocole de purification nous a permis de disposer de quantités suffisantes d'extraits enzymatiques purifiées pour l'étude des caractéristiques physico-chimiques, cinétiques et moléculaires qui feront l'objet du prochain chapitre de ce mémoire.

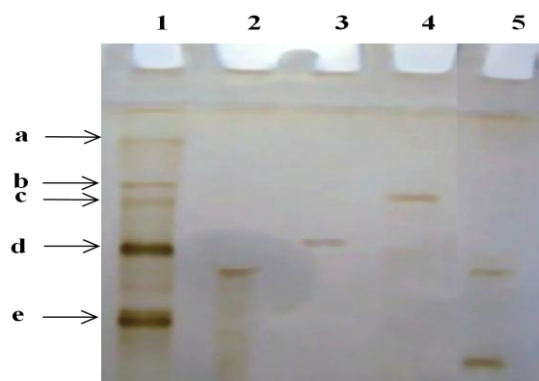
II. CARACTERISATION MOLECULAIRE, PHYSICO-CHIMIQUE ET CINETIQUE

1. Caractérisation moléculaire

Deux techniques permettant une interprétation aisée des résultats ont été utilisées. La première, est une électrophorèse en conditions dénaturantes réalisée sur un gel de polyacrylamide (SDS-PAGE). La deuxième technique qui utilise l'enzyme sous sa forme native purifiée, est une chromatographie par tamisage moléculaire sur le gel Sephacryl S-200 HR.

1.1. Masse moléculaire par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

Cette électrophorèse est réalisée avec la protéine enzymatique sous sa forme dénaturée, c'est-à-dire en présence de SDS et de β -mercaptoéthanol. Les résultats obtenus sont présentés par la **photographie 3**. Par référence aux masses moléculaires des marqueurs protéiques (**Puits 1**), deux bandes correspondant à des sous-unités de masses moléculaires apparentes de 66 et 42 kDa sont obtenues pour l' α -mannosidase M1 tandis que les enzymes M2, M3 et M4 migrent sous forme d'une seule bande protéique de masses moléculaires relatives respectives estimées à 62, 76 et 105 kDa (**Photographie 3 et Figure 14**).



Photographie 3: Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes des α -mannosidases du suc digestif de la larve du charançon *Rhynchophorus palmarum*.

Gel homogène à 7,5 % d'acrylamide avec 1 mm d'épaisseur. **Puits 1:** Marqueurs protéiques de masses moléculaires en kDa (**a**): Myosine, 200; (**b**): β -Galactosidase, 116,25; (**c**): Phosphorylase b, 97,4; (**d**): SAB, 66,2; (**e**): Ovalbumine, 45; **Puits 2:** α -mannosidase **M2**; **Puits 3:** α -mannosidase **M3**; **Puits 4:** α -mannosidase **M4**; **Puits 5:** α -mannosidase **M1**.

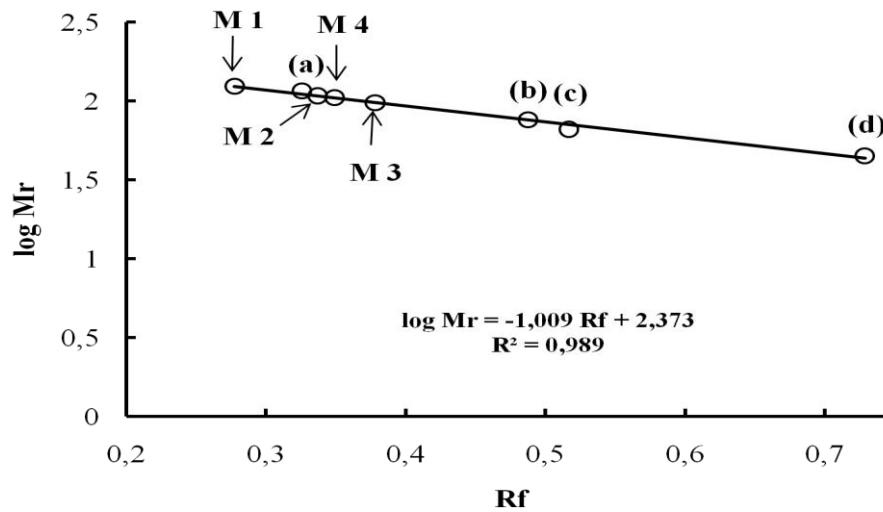


Figure 14: Détermination de la masse moléculaire relative des α -mannosidases du suc digestif de la larve du charançon *Rhynchophorus palmarum* par électrophorèse en conditions dénaturantes.

Les masses moléculaires des marqueurs protéiques utilisés sont exprimées en kDa: (a) β -Galactosidase, 116,25; (b) Phosphorylase b, 97,6; (c) SAB, 66,2; (d) Ovalbumine, 45; **Rf** représente la référence frontale de la protéine. **M1**, **M2**, **M3** et **M4** représentent les α -mannosidases purifiées. Les masses moléculaires relatives sont déterminées à partir de l'équation $\text{Log Mr} = -1,009 \text{ Rf} + 2,373$.

1.2. Masse moléculaire par filtration sur gel Sephacryl S-200 HR

La filtration sur le gel Sephacryl S-200 HR calibré à l'aide de protéines de masses moléculaires connues a permis d'estimer les masses moléculaires relatives (M_r) de M1, M2, M3 et M4 qui sont respectivement de 112, 125, 72 et 111 kDa (**Figure 15**).

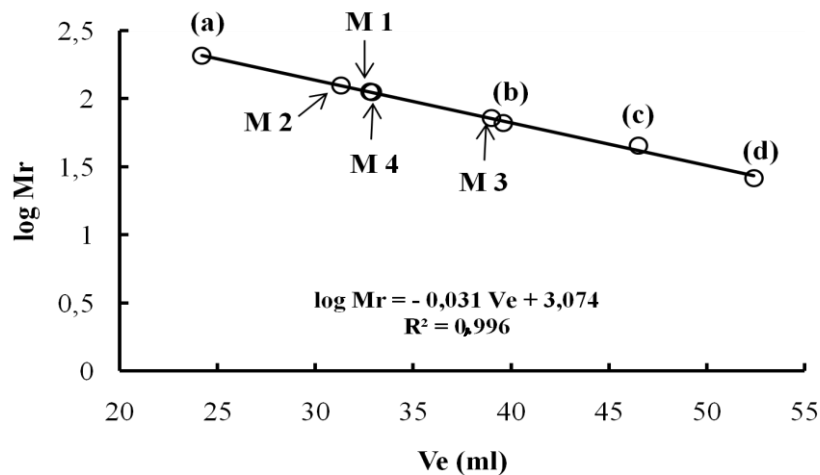


Figure 15: Détermination de la masse moléculaire relative des α -mannosidases du suc digestif de la larve du charançon *Rhynchophorus palmarum* par filtration sur gel Sephacryl S-200 HR.

Les masses moléculaires des marqueurs protéiques utilisés sont exprimées en kDa: (a) β -amylase, 206; (b) SAB, 66; (c) Ovalbumine, 45; (d) Cellulase, 26; V_e représente le volume d'éluion de la protéine. M1, M2, M3 et M4 représentent les α -mannosidases purifiées. Les masses moléculaires relatives sont déterminées à partir de l'équation $\log Mr = -0,031Ve + 3,074$.

Les résultats des deux méthodes utilisées pour la détermination des masses moléculaires pris ensemble montrent que les α -mannosidases M1 et M2 sont dimériques avec des masses moléculaires respectives de 108-112 kDa et 124-125 kDa. Quant aux enzymes M3 et M4, elles sont toutes deux monomériques avec des masses moléculaires de 72-76 kDa pour M3 et 105-111 kDa pour M4.

2. Caractérisation physico-chimique et cinétique

2.1. pH optimum d'hydrolyse et de la zone de stabilité au pH

C'est la détermination du pH pour lequel l'activité enzymatique est maximale. Toutes les enzymes sont sensibles aux variations du pH du milieu dans lequel elles se retrouvent. Ces variations entraînent des modifications du degré d'ionisation des groupements fonctionnels dont la charge est nécessaire, soit à la formation du complexe enzyme-substrat, soit au

maintient de la conformation tridimensionnelle native de la protéine enzymatique indispensable à l'acte catalytique.

2.1.1. pH optimum d'hydrolyse

L'influence du pH sur l'activité hydrolytique des α -mannosidases est présentée par la **figure 16**. L'activité catalytique des enzymes M1 et M4 est maximale à pH 4,5 dans le tampon acétate de sodium 100 mM, alors que les α -mannosidases M2 et M3 expriment une meilleure activité dans le même tampon mais à pH 5,0.

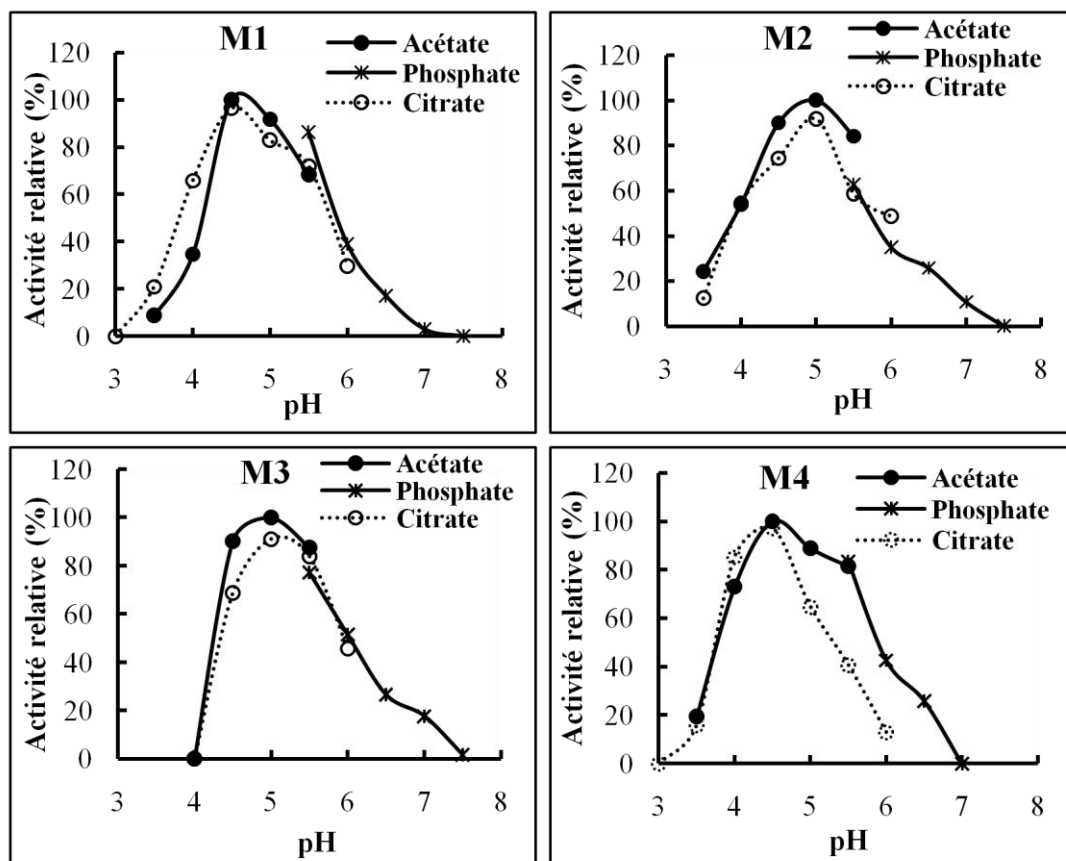


Figure 16: pH optimum d'hydrolyse des α -mannosidases du suc digestif de la larve du charançon *Rhynchophorus palmarum*.

Les enzymes dans différents tampons de gamme de pH compris entre 3,5 et 7,5 sont préincubées pendant 5 min et ensuite incubées au bain-marie à 37 °C pendant 20 min en présence de 0,8 mM du substrat *pNP- α -Man*. La réaction est arrêtée par ajout de 2 ml de carbonate de sodium préparé à 2 % (p/v). Les tampons utilisés sont tous préparés à 100 mM et à 25 °C. Ce sont: le tampon acétate de sodium (pH 3,5 à 5,5), le tampon phosphate de sodium (pH 5,6 à 7,5) et le tampon citrate de sodium (pH 3,0 à 6,0). **M1**, **M2**, **M3** et **M4** représentent les α -mannosidases purifiées.

2.1.2. Zone de stabilité au pH

La **figure 17** présente les résultats de l'étude de la stabilité au pH des quatre enzymes. Les α -mannosidases M1, M2, M3 et M4 ont une meilleure stabilité dans la zone de pH comprise entre 4,1 et 5,4, correspondant à 80 % de conservation de l'activité (zone de compromis intéressante entre l'activité et la stabilité), avec un maximum de celle-ci aux alentours du pH 4,7.

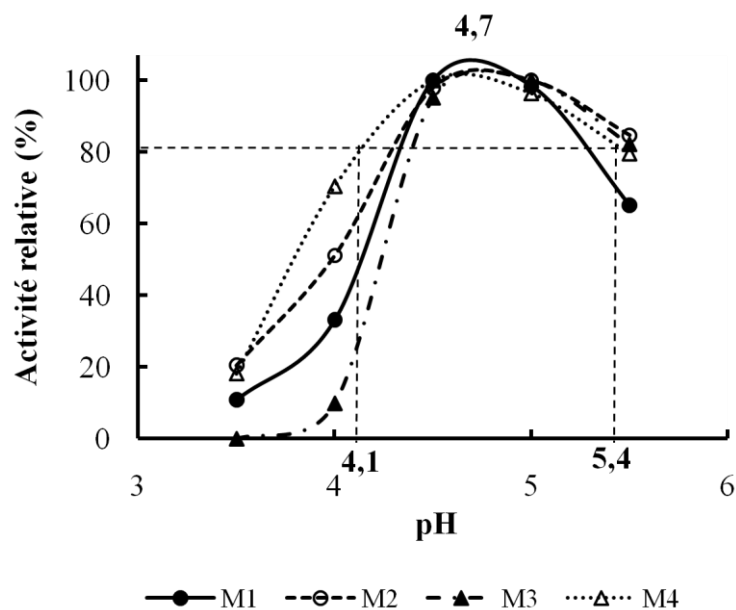


Figure 17: Zone de stabilité au pH des α -mannosidases du suc digestif de la larve du charançon *Rhynchophorus palmarum*.

Les enzymes sont mises pendant 2 h à la température ambiante en présence de différents pH du tampon acétate de sodium (100 mM) ayant servi à l'étude du pH optimum. L'ensemble est préincubé pendant 5 min et ensuite incubé pendant 20 min à 37 °C en présence de 0,8 mM du substrat *pNP- α -Man*. La réaction est arrêtée par ajout de 2 ml de carbonate de sodium préparé à 2 % (p/v) et les activités mesurées à 410 nm. **M1**, **M2**, **M3** et **M4** représentent les α -mannosidases purifiées.

2.2. Température optimale d'hydrolyse

L'étude de l'influence de la température sur l'activité hydrolytique des α -mannosidases a été réalisée pour des températures comprises entre 30 et 80 °C et les résultats obtenus sont présentés par la **figure 18**. Les α -mannosidases M1, M2, M3 et M4 présentent respectivement une température optimale d'hydrolyse de 65, 55, 50 et 60 °C.

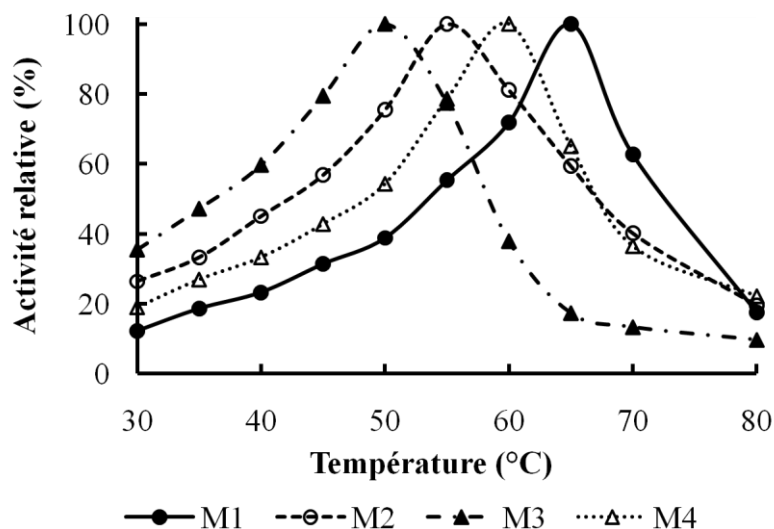


Figure 18: Température optimale d'hydrolyse des α -mannosidases du suc digestif de la larve du charançon *Rhynchophorus palmarum*.

L'activité des enzymes est mesurée à différentes températures (entre 30 et 80 °C) après 5 min de préincubation et 20 min d'incubation en présence de 0,8 mM du substrat *pNP- α -Man*. Les réactions sont réalisées dans le tampon acétate de sodium (100 mM) aux différents pH optima définis pour chaque enzyme. La réaction est arrêtée par ajout de 2 ml de carbonate de sodium préparé à 2 % (p/v). **M1**, **M2**, **M3** et **M4** représentent les α -mannosidases purifiées.

2.2.1. Energie d'activation et Q_{10}

La **figure 18** indique que l'activité relative de chaque enzyme augmente régulièrement entre 30 °C et sa température optimale. Cette zone d'activité croissante a été utilisée pour déterminer le Q_{10} et l'énergie d'activation (E_a) de chaque enzyme. Une valeur approximative d'un Q_{10} de 1,8 a été obtenue pour toutes les enzymes. L'énergie d'activation est déterminée à partir de la représentation d'Arrhenius; exprimée par le logarithme de l'activité en fonction de l'inverse des températures (en degré Kelvin) de la zone d'activité croissante. Cette énergie d'activation en kJ/mol pour chaque enzyme est de 46,5; 47; 42,9 et 50,4 respectivement pour **M1**, **M2**, **M3** et **M4** (**Figure 19**).

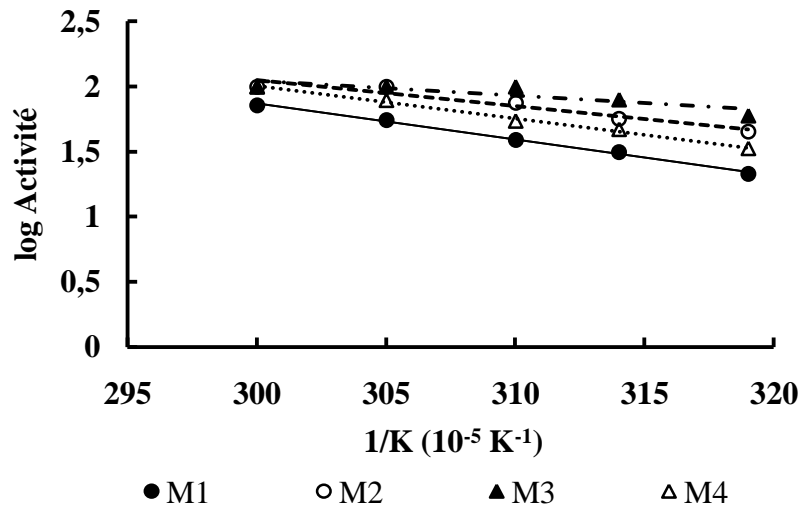


Figure 19: Détermination de l'énergie d'activation des α -mannosidases du suc digestif de la larve du charançon *Rhynchophorus palmarum*.

Les énergies d'activation (E_a) sont déterminées à partir de l'équation $E_a = -2,303aR$ ou a et R représentent respectivement la pente des différentes équations de droites et la constante des gaz parfaits 8,315 J/mol/K. **M1**, **M2**, **M3** et **M4** représentent les α -mannosidases purifiées.

2.2.2. Thermostabilité

L'étude de la stabilité en fonction de la température revêt deux aspects: la dénaturation et l'inactivation.

2.2.2.1. Dénaturation thermique

L'étude de la dénaturation en fonction de la température révèle que pour des températures inférieures aux températures optimales d'hydrolyse des quatre α -mannosidases, ces enzymes conservent la quasi-totalité de leur activité. Au-delà, on note une baisse progressive de cette activité (perte d'environ 90 % de l'activité initiale) liée à l'augmentation de la température qui traduirait la dénaturation thermique de ces enzymes (**Figure 20**).

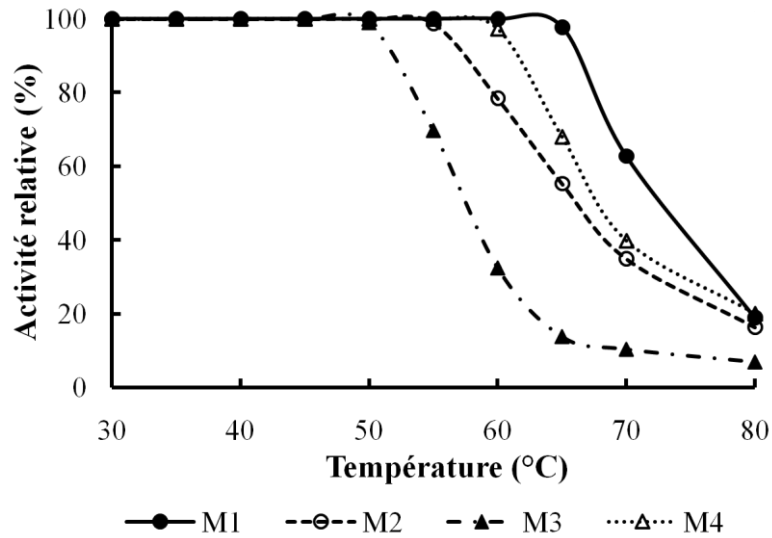


Figure 20: Dénaturation thermique des α -mannosidases du suc digestif de la larve du charançon *Rhynchophorus palmarum*.

L'activité résiduelle des enzymes est mesurée à 37 °C dans les conditions standard de dosage après pré-incubation pendant 25 min à des températures croissantes entre 30 et 80°C. **M1**, **M2**, **M3** et **M4** représentent les α -mannosidases purifiées.

2.2.2.1. Inactivation thermique

L'étude de l'inactivation thermique a quant à elle révélé que les α -mannosidases M1, M2, M3 et M4 sont stables pendant 180 min de préincubation à 37 °C. Elles sont cependant moins stables à leurs températures optimales d'hydrolyse respectives: 25 min pour M1 et 30 min pour les enzymes M2, M3 et M4. Les demi-vies des enzymes à leurs différentes températures optimales d'hydrolyse sont estimées à environ 120, 170, 180 et 145 min de temps de pré-incubation respectivement pour les α -mannosidases M1, M2, M3 et M4 (**Figure 21**).

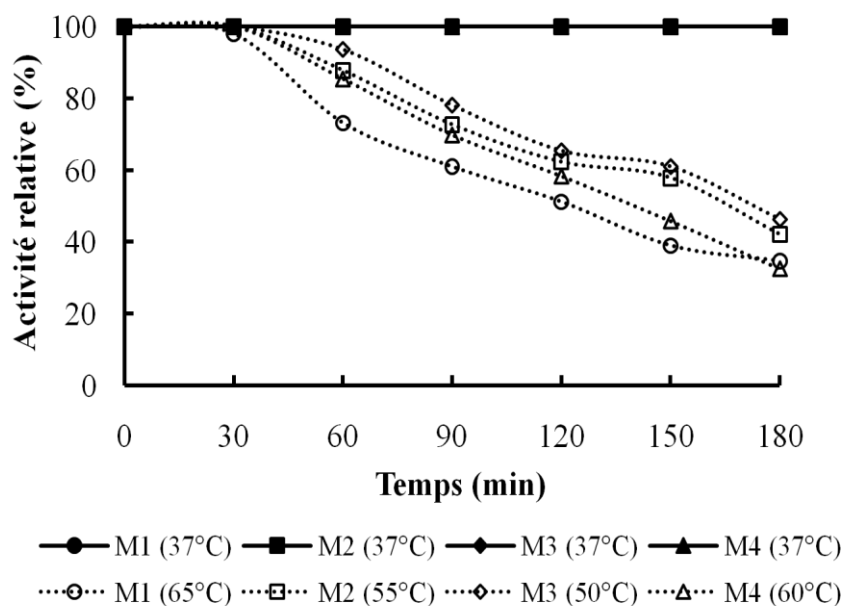


Figure 21: Inactivation thermique des α -mannosidases du suc digestif de la larve du charançon *Rhynchophorus palmarum*.

Chaque enzyme est préincubée à 37 °C et à sa température optimale d'hydrolyse pendant des temps croissants (entre de 0 et 180 min) et l'activité résiduelle est mesurée à 37 °C dans les conditions habituelles de dosage en effectuant des prélèvements à intervalles de temps réguliers de 30 min. **M1**, **M2**, **M3** et **M4** représentent les α -mannosidases purifiées.

2.3. Spécificité des α -mannosidases

2.3.1. Spécificité de groupe

2.3.1.1. Activité des α -mannosidases sur les substrats pNP-glycosides

Le **tableau II** présente les résultats de l'étude de la spécificité de substrat. Ces résultats indiquent que, de tous les substrats utilisés, seul le pNP- α -Man est hydrolysé par les quatre α -mannosidases.

Tableau II: Activité des α -mannosidases du suc digestif de la larve du charançon *Rhynchophorus palmarum* sur les substrats synthétiques *p*NP-glycosides.

Substrats ^a	Activité relative (%)			
	M1	M2	M3	M4
<i>p</i> NP- α -D-Mannopyranoside	100	100	100	100
<i>p</i> NP- α -D-Glucopyranoside	0	0	0	0
<i>p</i> NP- α -D-Galactopyranoside	0	0	0	0
<i>p</i> NP- α -L-Fucopyranoside	0	0	0	0
<i>p</i> NP- α -L-Arabinopyranoside	0	0	0	0
<i>p</i> NP- β -D-Glucopyranoside	0	0	0	0
<i>p</i> NP- β -D-Galactopyranoside	0	0	0	0
<i>p</i> NP- α -L-Fucopyranoside	0	0	0	0
<i>p</i> NP- β -D-Xylopyranoside	0	0	0	0

Chaque enzyme est incubée dans les conditions optimales d'hydrolyse à 37 °C pendant 20 min en présence de 5 mM de chaque substrat. La réaction est arrêtée par ajout de 2 ml de carbonate de sodium 2 % (p/v) au milieu réactionnel. La lecture de la densité optique est faite au spectrophotomètre à 410 nm contre un témoin préparé dans les mêmes conditions pour chaque substrat mais ne contenant pas d'extrait enzymatique. ^aAbbréviation: *p*NP, *para*-nitrophényl ; **M1**, **M2**, **M3** et **M4** représentent les α -mannosidases purifiées.

2.3.1.2. Paramètres cinétiques

Parmi les substrats testés, seul le *p*NP- α -D-Man est hydrolysé par les quatre α -mannosidases purifiées. En présence de ce substrat, ces enzymes obéissent à une cinétique d'hydrolyse de type michaelien (**Figure 22**). A partir de la représentation en coordonnées inverses (**Lineweaver et Burk, 1934**), les constantes de Michaelis-Menten (K_M), les vitesses maximales (V_{max}) et les efficacités catalytiques (V_{max}/K_M) de ces α -mannosidases ont été déterminés (**Tableau III**).

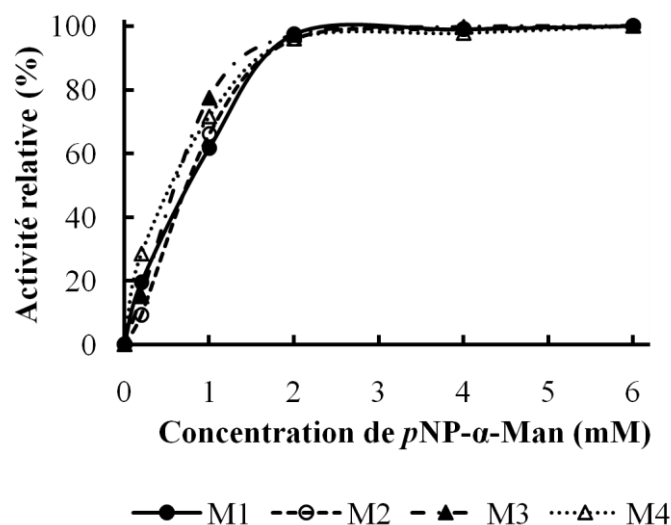


Figure 22: Activité hydrolytique des α -mannosidases du suc digestif de la larve du charançon *Rhynchophorus palmarum* en fonction de différentes concentrations du substrat pNP- α -Man.

L'activité des enzymes est mesurée à 37 °C pendant 20 min en présence de concentrations variables et croissantes de pNP- α -Man allant de 0 à 6 mM. La réaction est arrêtée par ajout de 2 ml de carbonate de sodium préparé à 2 % (p/v) et le pNP libéré est quantifié au spectrophotomètre à 410 nm par rapport à un témoin sans extrait enzymatique préparé dans les mêmes conditions. M1, M2, M3 et M4 représentent les α -mannosidases purifiées.

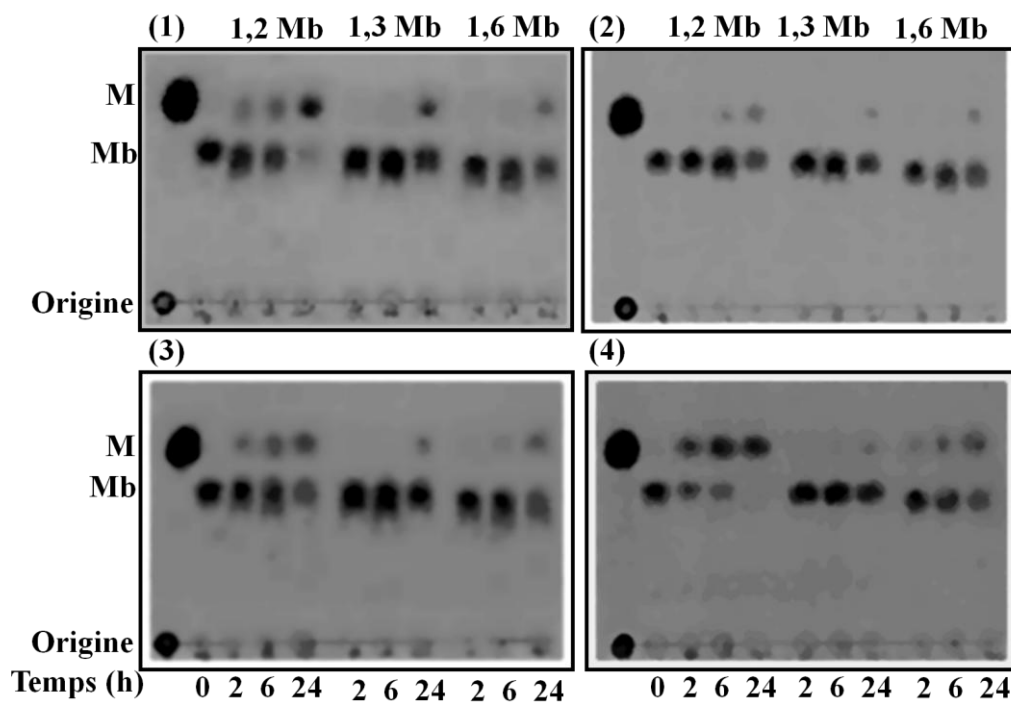
Tableau III: Paramètres cinétiques des α -mannosidases du suc digestif de la larve du charançon *Rhynchophorus palmarum*

	K_M (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	V_{max}/K_M (ml/min/mg)
M1	0,36	1,29	3,58
M2	0,13	0,73	5,62
M3	0,22	2,46	11,18
M4	0,16	1,32	8,25

para-nitrophenyl- α -D-Mannopyranoside est le substrat ayant servi à l'étude. K_M , constante de Michaelis-Menten ; V_{max} , vitesse maximale ; V_{max}/K_M , efficacité catalytique. M1, M2, M3 et M4 représentent les α -mannosidases purifiées.

2.3.2. Spécificité de liaison

L'étude de la spécificité de liaison a été réalisée en utilisant trois mannobioses qui se distinguent par le type de liaison entre les deux résidus de mannose liés. Il s'agit de l' α -1,2-mannobiose, de l' α -1,3-mannobiose et de l' α -1,6-mannobiose, qui représentent les principales liaisons rencontrées dans la nature. Les produits d'hydrolyse, analysés par chromatographie sur couche mince indiquent que les quatre enzymes possèdent une spécificité large vis-à-vis des différentes liaisons. En effet, elles hydrolysent les trois liaisons α -1,2 ; α -1,3 et α -1,6. Par ailleurs, on note une spécificité d'hydrolyse plus prononcée pour les différentes α -mannosidases lorsqu'il s'agit de la liaison α -1,2 et ce, au bout de 24 h d'incubation (**Photographie 4**).



Photographie 4: Mise en évidence par chromatographie sur couche mince des produits d'hydrolyse des mannobioses par les α -mannosidases du suc digestif de la larve du charançon *Rhynchophorus palmarum*.

Une quantité de 0,45 μ g d'enzyme est incubée en présence de chaque mannobiose à 37 °C pendant 24 h, aux pH optima d'hydrolyse préalablement définis et dans les conditions standard d'hydrolyse. A intervalles de temps définis, une aliquote de 5 μ l du milieu réactionnel est déposée sur une plaque CCM. La migration est faite à l'aide d'un mélange butanol-acide acétique-eau (9:3,75:2,25 v/v/v) et les produits d'hydrolyse sont révélés par pulvérisation de la plaque d'un mélange éthanol-acide sulfurique contenant du naphtho-résorcinol (v/v) et, visualisés par chauffage à 110 °C pendant 5 min. **M** (Témoin) représente la tache de mannose, **Mb** représente la tache de mannobiose, α -1,2; α -1,3 et α -1,6 représentent les types de liaisons, (1), (2), (3) et (4) représentent les plaques CCM sur lesquelles les études respectives des α -mannosidases M1, M2, M3 et M4 ont été réalisées.

2.4. Etude de l'influence de divers agents chimiques sur l'activité hydrolytique des α -mannosidases

2.4.1. Effet de l'EDTA et des ions métalliques

Le **tableau IV** présente les données relatives à l'étude de l'effet de quelques ions divalents et de l'EDTA sur les quatre α -mannosidases purifiées. Ces résultats montrent qu'aux faibles concentrations (1 mM), hormis l'ion cuivre Cu^{2+} qui a un effet inhibiteur très prononcé (99 à 100 % d'inhibition), l'EDTA et les ions Ba^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} et Zn^{2+} n'affectent pas de façon significative l'activité des quatre α -mannosidases. Cependant, il est important de noter que, l'ion Zn^{2+} est légèrement activateur à 5 mM, des α -mannosidases M1 et M2 (respectivement de 119 % et 112 % d'activation).

Tableau IV: Effet de l'EDTA et de quelques ions métalliques sur l'activité hydrolytique des α -mannosidases du suc digestif de la larve du charançon *Rhynchophorus palmarum*.

Agent chimique	Concentration (mM)	Activité relative (%)			
		M1	M2	M3	M4
Témoin	0	100	100	100	100
EDTA^a	1	100	100	98	100
	5	98	100	95	97
Ba²⁺	1	94	100	92	100
	5	84	98	90	98
Ca²⁺	1	97	100	100	100
	5	95	98	97	98
Cu²⁺	1	0	1	0	0
	5	0	0	0	0
Mg²⁺	1	95	100	100	92
	5	93	100	86	83
Zn²⁺	1	104	106	100	100
	5	119	112	102	104

Les enzymes sont pré-incubées pendant 30 min à la température ambiante, en présence de deux concentrations différentes de l'agent chimique. La réaction est déclenchée à 37 °C par ajout du substrat au milieu. Un essai témoin sans agent chimique est réalisé dans les mêmes conditions. Les activités résiduelles sont mesurées dans les conditions standards. ^aAcide diamine tétra acétique. **M1**, **M2**, **M3** et **M4** représentent les α -mannosidases purifiées.

2.4.2. Effet de réactifs spécifiques du groupement thiol et de composés chimiques à groupement sulfhydrile

Afin d'avoir des informations supplémentaires sur le fonctionnement de nos enzymes, divers réactifs spécifiques du groupement thiol (*p*CMB et DTNB) et des composés chimiques à groupement sulfhydrile (L-cystéine et β -mercaptoéthanol) ont été testés sur l'activité des α -mannosidases purifiées. Les résultats de cette étude sont présentés dans le **tableau V**. Cette étude montre qu'aux faibles concentrations (0,1 %), mis à part le β -mercaptoéthanol qui améliore l'activité de l' α -mannosidases M2 (137 % d'activation), les autres réactifs sont globalement sans effet sur l'activité des enzymes. Par contre, aux fortes concentrations (1 %), les agents chimiques *p*CMB, DTNB et L-cystéine sont inhibiteurs de l'activité hydrolytique des quatre α -mannosidases avec des pourcentages d'inhibition comprises entre 17 et 100 %.

Tableau V: Effet des réactifs spécifiques du groupement thiol et des composés chimiques à groupement sulfhydrile sur l'activité hydrolytique des α -mannosidases du suc digestif de la larve du charançon *Rhynchophorus palmarum*.

	Réactif	Concentration (%, p/v)	Activité relative (%)			
			M1	M2	M3	M4
	Témoin	0	100	100	100	100
Composés chimiques spécifiques du groupement thiol	<i>p</i>CMB^a	0,1	100	92	80	100
		1	80	83	30	76
	DTNB^b	0,1	101	100	100	100
		1	81	40	20	0
Composés chimiques à groupement sulfhydrile	L-cystéine	0,1	98	100	100	99
		1	52	4	0	0
	β-mercaptoéthanol	0,1 (v/v)	103	137	100	91
		1 (v/v)	109	110	107	91

Les enzymes sont préincubées pendant 30 min à la température ambiante, en présence de deux concentrations différentes de l'agent chimique. La réaction est déclenchée à 37 °C par ajout du substrat au milieu. Un essai témoin sans agent chimique est réalisé dans les mêmes conditions. Les activités résiduelles sont mesurées dans les conditions standard. ^aacide *para*-chloromercuribenzoïque ; ^bacide 5,5'-dithio-2,2'-dinitrobenzoïque. **M1**, **M2**, **M3** et **M4** représentent les mannosidases purifiées.

2.4.3. Effet des détergents

Différents groupes de détergents communément utilisés ont été testés pour évaluer leur effet sur l'activité hydrolytique des α -mannosidases purifiées à partir du suc digestif de la larve du charançon *Rhynchophorus palmarum*. Les résultats présentés dans le **tableau VI** montrent que la plupart des détergents anioniques et non-ioniques n'ont pratiquement pas d'effet sur les α -mannosidases étudiées. Seul le SDS, connu pour ses propriétés de détergent anionique puissant, inhibe fortement (45 à 94 % d'inhibition) les quatre α -mannosidases lorsqu'il est utilisé à la concentration de 0,1 % (p/v) dans le milieu réactionnel. En ce qui concerne les détergents cationiques (TTAB et HTAB), ils sont inhibiteurs des quatre enzymes. Toutefois, l' α -mannosidase M1 reste insensible lorsque ces détergents cationiques sont utilisés à faibles concentrations (0,1 % ; p/v) (**Tableau VI**).

Tableau VI: Effet de différents groupes de détergents sur l'activité hydrolytique des α -mannosidases du suc digestif de la larve du charançon *Rhynchophorus palmarum*.

Groupe	Type de détergent	Concentration (% ; p/v)	Activité relative (%)			
			M1	M2	M3	M4
	Témoin	0	100	100	100	100
Anioniques	SDS^a	0,1	6	17	42	55
		1	0	7	22	10
	P9LE^b	0,1	100	98	96	100
		1	97	92	92	98
	P10OE^c	0,1	100	94	96	99
		1	100	91	90	92
Cationiques	TTAB^d	0,1	100	93	31	73
		1	92	79	21	64
	HTAB^e	0,1	100	84	13	76
		1	86	80	12	59
	Nonidet P-40	0,1	106	100	96	100
		1	108	95	94	66
Non-ioniques	Triton X-100	0,1	100	100	100	100
		1	109	98	99	91
	Lubrol WX	0,1	100	95	93	98
		1	95	90	89	96
	Tween 80	0,1	98	104	90	102
		1	95	104	89	105

Les enzymes sont préincubées pendant 30 min à la température ambiante, en présence de deux concentrations différentes du type de détergent. La réaction est déclenchée à 37 °C par ajout du substrat au milieu. Un essai témoin sans détergent est réalisé dans les mêmes conditions. Les activités résiduelles sont mesurées dans les conditions standard. ^aDodecyl sulfate de sodium ; ^bPolyoxyéthylène-9-lauryl ether ; ^cPolyoxyéthylène-10-Oleyl ether ; ^dTétradécyl triméthyl ammonium bromide ; ^eHexadécyl triméthyl ammonium bromide. **M1**, **M2**, **M3** et **M4** représentent les α -mannosidases purifiées.

2.4.4. Effet des inhibiteurs spécifiques des α -mannosidases

Dans cette étude, quatre inhibiteurs spécifiques appartenant à deux groupes ont été évalués. D'une part, les azafuranoses constitués de la swainsonine (Sw) et de la didésoxyiminomannitol (DIM) et d'autre part, le groupe des azapyranoses renfermant la kifunensine (Kif) et la désoxymannojirimycine (DMNJ). Les résultats présentés dans le **tableau VII** indiquent clairement que l'inhibition est accentuée avec l'augmentation de la concentration des inhibiteurs spécifiques. Toutefois, les quatre α -mannosidases sont plus sensibles aux inhibiteurs de type furanique qu'à ceux de type pyranique. Aussi, dans le groupe des azafuranoses, l'inhibition par la Sw est plus prononcée que celle réalisée par la DIM pour chaque concentration étudiée. Ainsi, à 0,5 μ M par exemple, on constate une inhibition comprise entre 43 et 85 % pour la Sw contre 7 à 29 % d'inhibition pour la DIM. A cette même concentration, la Kif et la DMNJ n'ont pratiquement pas d'effet sur l'activité des enzymes (le taux d'inhibition observé se situe entre 0 et 3 %).

Tableau VII: Effet des différents inhibiteurs spécifiques sur l'activité hydrolytique des α -mannosidases du suc digestif de la larve du charançon *Rhynchophorus palmarum*.

Groupe	Inhibiteur spécifique	Concentration (μ M)	Activité relative (%)			
			M1	M2	M3	M4
Témoin		0	100	100	100	100
Sw^a		0,05	87	91	77	97
		0,5	29	29	15	57
		10	8	0	2	5
		20	3	0	0	2
		Azafuranoses		0,05	94	100
DIM^b		0,5	86	91	71	93
		10	37	39	15	43
		20	25	23	10	10
		Kif^c		0,05	100	100
0,5	100			97	99	100
10	100			92	99	100
20	91			88	86	96
Azapyranoses		0,05	100	100	98	100
DMNJ^d		0,5	98	100	98	100
		10	94	100	95	100
		20	93	80	93	100

Les enzymes sont préincubées pendant 30 min à la température ambiante, en présence de quatre concentrations de l'agent inhibiteur. La réaction est déclenchée à 37 °C par ajout du substrat au milieu. Un essai témoin sans agent inhibiteur est réalisé dans les mêmes conditions. Les activités résiduelles sont mesurées dans les conditions standard. ^aSwainsonine ; ^bDidésoxyiminomannitol ; ^cKifunensine ; ^dDésoxymannojirimycine. **M1**, **M2**, **M3** et **M4** représentent les mannosidases purifiées.

Conclusion partielle

Après avoir purifié à homogénéité électrophorétique nos α -mannosidases et étudié certaines de leurs caractéristiques moléculaires, physico-chimiques et cinétiques, nous nous sommes posé la question de savoir si ces enzymes, en plus de leurs propriétés hydrolasiques intéressantes, pourraient constituer des outils majeurs de synthèse de dérivés mannosylés à travers des réactions de transmannosylation? Cette étude est l'objet du prochain chapitre.

III. REACTION DE TRANSMANNOSYLATION

Plusieurs paramètres influençant les rendements de transmannosylation ont été étudiés afin de définir les conditions optimales permettant aux α -mannosidases purifiées à partir du suc digestif de la larve du charançon *Rhynchophorus palmarum*, de réaliser la synthèse d'oligomannosides. Ce sont: le pH optimum de transfert, les concentrations optimales en enzyme, donneur et en accepteur du milieu et le temps optimum de synthèse. La **figure 23** met en évidence le profil général des chromatogrammes obtenus lors de l'analyse des produits de réaction par CLHP. Ce profil met en évidence l'artéfact (signal de réponse), le phénol (étalon interne) et les composées phénoliques observés dans le milieu réactionnel standard de transmannosylation. Les résultats détaillés pour chaque étude sont donnés par la suite.

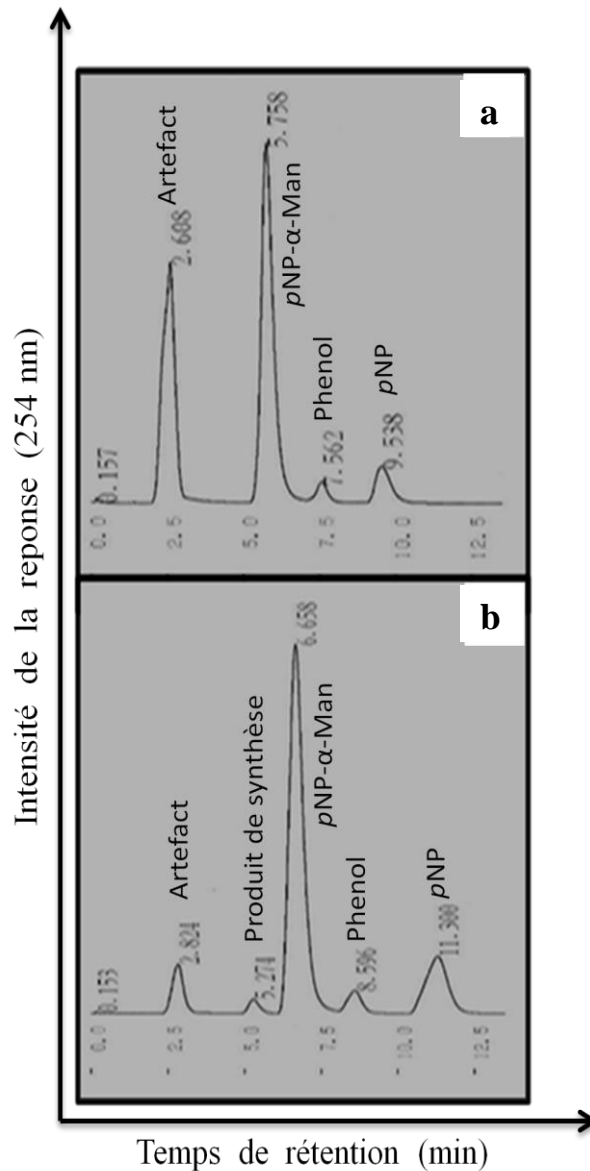


Figure 23: Mise en évidence par HPLC des produits standard issus des différentes réactions de transmannosylation catalysées par les α -mannosidases du suc digestif de la larve du charançon *Rhynchophorus palmarum*.

Cette étude a été réalisée à 37 °C pendant 1 h. L'enzyme est incubée dans 400 mM du tampon citrate-phosphate (pH 4,0) en présence de 21,5 mM du substrat pNP- α -Man. La réaction est arrêtée par chauffage du milieu pendant 3 min au bain-marie bouillant. Le pic de phénol représente l'étalon interne. (a) Témoin; (b) Essai.

1. pH optimum de transmannosylation

Les résultats de l'étude du pH optimum de transmannosylation sont présentés dans le **tableau VIII**. Ces résultats indiquent que toutes les α -mannosidases purifiées ont un pourcentage de transmannosylation plus élevé à pH 4,0. Il faut cependant noter que bien que le produit de synthèse ait été obtenu aux pH compris entre 4,5 et 6,0, la détermination des pourcentages de transfert était impossible en raison du pic non différencié du *p*NP (**Figure 24b**) servant au calcul comme dans le cas de la **figure 24a**. le pH 4,0 a donc été retenu pour la suite des études.

Tableau VIII: pH optimum de transmannosylation effectuée par les α -mannosidases du suc digestif de la larve du charançon *Rhynchophorus palmarum*.

pH	Mannose transféré (%)			
	M1	M2	M3	M4
3,5	3,81	5,92	0	0
4,0	5,87	6,15	4,18	4,99

Une quantité de 20 μ l de solution enzymatique est incubée à 37 °C pendant 1 h en présence de 10,5 mM de *p*NP- α -Man préparé à différents pH (3,5 à 7,0) dans 400 mM de tampon citrate-phosphate. La réaction est arrêtée par chauffage du milieu pendant 3 min au bain-marie bouillant. Les produits de la réaction (10 μ l) sont quantifiés par HPLC. **M1**, **M2**, **M3** et **M4** représentent les α -mannosidases purifiées.

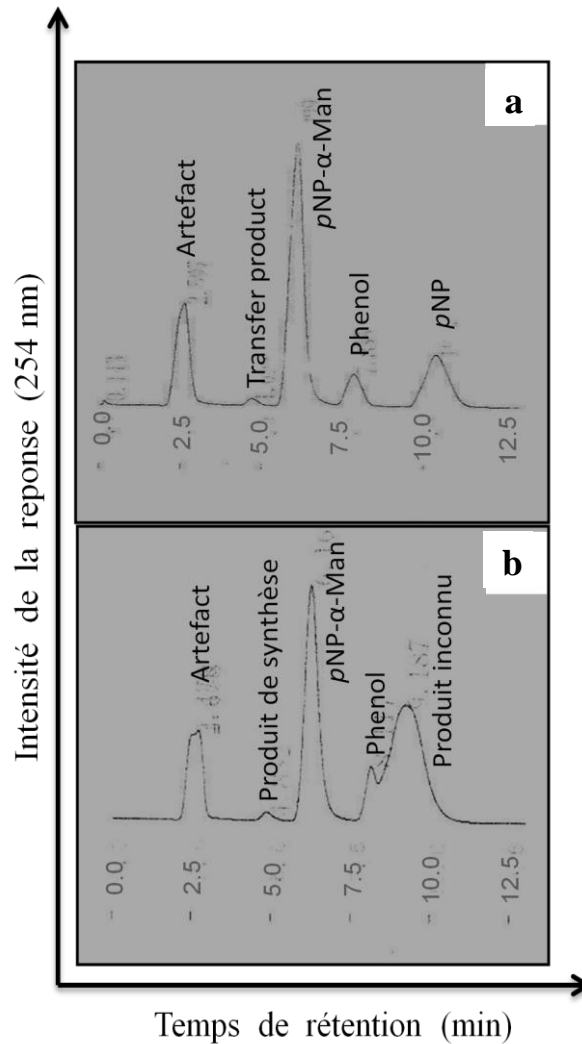


Figure 24: Mise en évidence par HPLC du produit inconnu apparu à pH 4,5 lors de l'étude du pH optimum de transmannosylation à partir des α -mannosidases du suc digestif de la larve du charançon *Rhynchophorus palmarum*.

Une quantité de 20 μ l de solution enzymatique est incubée à 37 °C pendant 1 h en présence de 10,5 mM de pNP- α -Man préparé à différents pH (3,5 à 7,0) dans 400 mM de tampon citrate-phosphate. La réaction est arrêtée par chauffage du milieu pendant 3 min au bain-marie bouillant. Les produits de la réaction (10 μ l) sont quantifiés par HPLC. Le pic de phénol représente l'étalon interne. (a) Témoin à pH 4,0; (b) Essai à pH 4,5.

2. Quantité optimale en enzyme pour la transmannosylation

La **figure 25** présente les différents taux de transfert obtenus en fonction des différentes quantités d'enzyme utilisées. Les courbes de tendance en forme de cloche indiquent qu'il existe des quantités maximales en enzyme pour lesquelles les taux de transfert sont meilleurs. Ce sont: 3,63 μg (6,06 %) pour M1, 4,40 μg (6,32 %) pour M2, 9,08 μg (4,61 %) pour M3 et 7,04 μg (5,21 %) pour M4. Ces différentes quantités ont servi à l'étude de la détermination de la concentration optimale du donneur-accepteur de résidu de mannose.

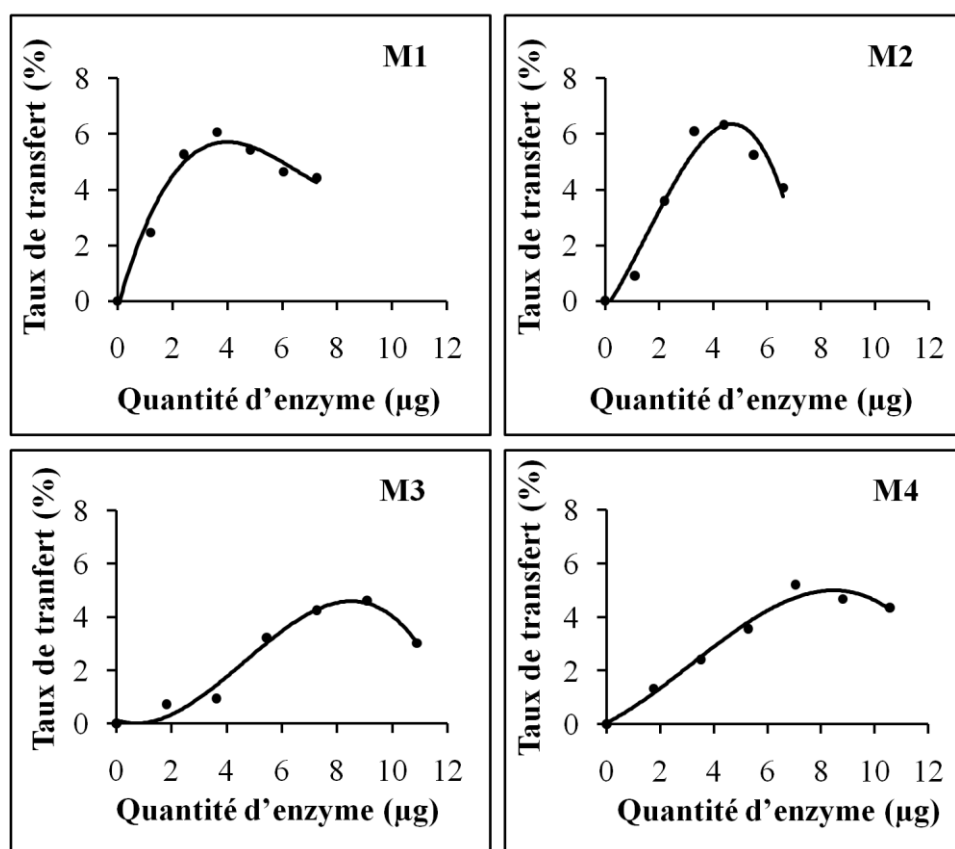


Figure 25: Détermination de la quantité d'enzyme nécessaire à la réaction de transmannosylation catalysée par les α -mannosidases du suc digestif de la larve du charançon *Rhynchophorus palmarum*.

Des quantités variables de chaque enzyme sont incubées à 37 °C pendant 1 h en présence de 10,5 mM du substrat *pNP- α -Man* préparé dans 400 mM de tampon citrate-phosphate pH 4,0. Les réactions sont arrêtées par chauffage au bain-marie bouillant pendant 3 min. Les produits de réaction (10 μl) sont quantifiés par HPLC. **M1**, **M2**, **M3** et **M4** représentent les α -mannosidases purifiées.

3. Concentration optimale du donneur-accepteur de résidus de mannose

Dans cette étude, le *pNP- α -Man* est à la fois donneur et accepteur de résidus de mannose. Dans ces conditions, les pourcentages de transfert calculés à partir des chromatogrammes obtenus par HPLC sont donnés en fonction des différentes concentrations du donneur-accepteur (**Figure 28**). Ces graphes présentent des taux de transfert qui augmentent progressivement avec la concentration. Le maximum de transfert est obtenu à la concentration de 21 mM de *pNP- α -Man* (donneur et accepteur de résidus de mannose) pour toutes les enzymes. Les taux de transfert calculés à cette concentration sont de 9,80; 10,09; 5,64 et 6,57 % respectivement pour M1, M2, M3 et M4. Il faut noter à ce niveau qu'il nous a été impossible d'aller au-delà de cette concentration car le substrat *pNP- α -Man* devenait insoluble dans le tampon du milieu réactionnel.

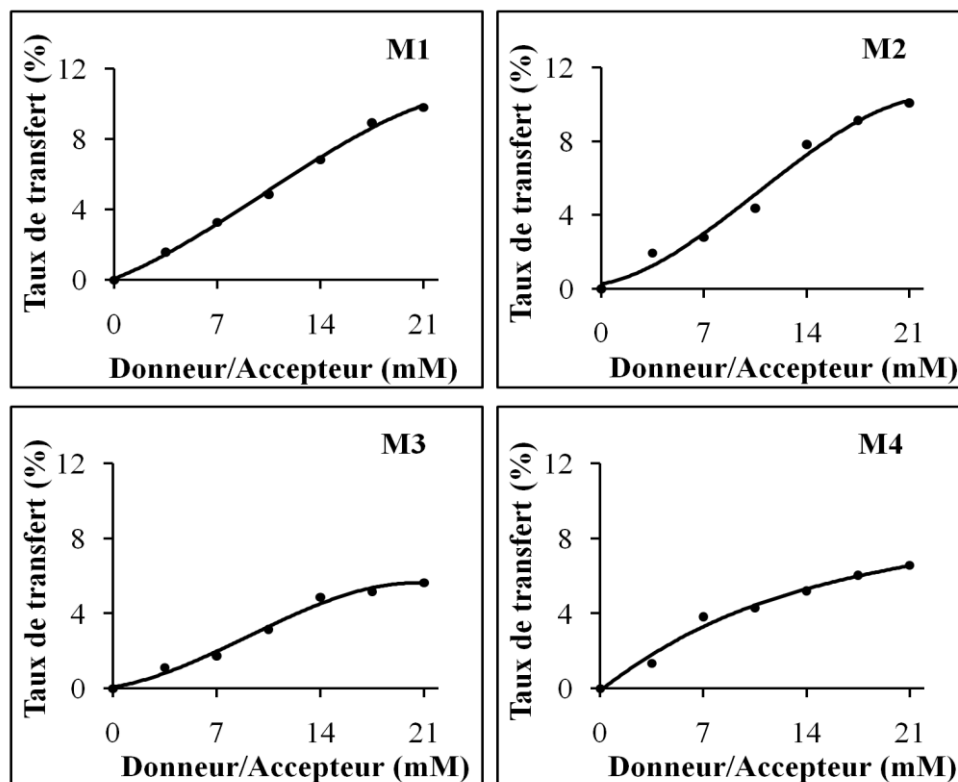


Figure 26: Détermination de la concentration optimale du donneur-accepteur de résidus mannosyles lors de la réaction de transmannosylation catalysée par les α -mannosidases du suc digestif de la larve du charançon *Rhynchophorus palmarum*.

Les quantités optimales en enzyme définies pour chaque α -mannosidase sont incubées à 37 °C pendant 1 h en présence de concentrations variables et croissantes du substrat *pNP- α -Man* (donneur/accepteur) préparé dans 400 mM de tampon citrate-phosphate pH 4,0. Les réactions sont arrêtées par chauffage au bain-marie bouillant pendant 3 min. Les produits de réaction (10 μ l) sont quantifiés par HPLC. **M1**, **M2**, **M3** et **M4** représentent les α -mannosidases purifiées.

4. Temps optimum de transmannosylation

Cette étude a été réalisée en conservant toutes les conditions optimales précédemment déterminées pour chaque enzyme à savoir le pH, la quantité d'enzyme, la concentration du donneur-accepteur et fait varier uniquement le temps de réaction entre 0 et 300 min. Les résultats obtenus sont présentés dans la **figure 29**. Ces résultats montrent que les α -mannosidases M1, M2 et M4 présentent les meilleurs taux de transfert, respectivement de 13,08; 12,94 et 8,43 % en 120 min. Quant à l' α -mannosidases M3, son temps optimum de transmannosylation est de 45 min avec un taux de 5,59 %.

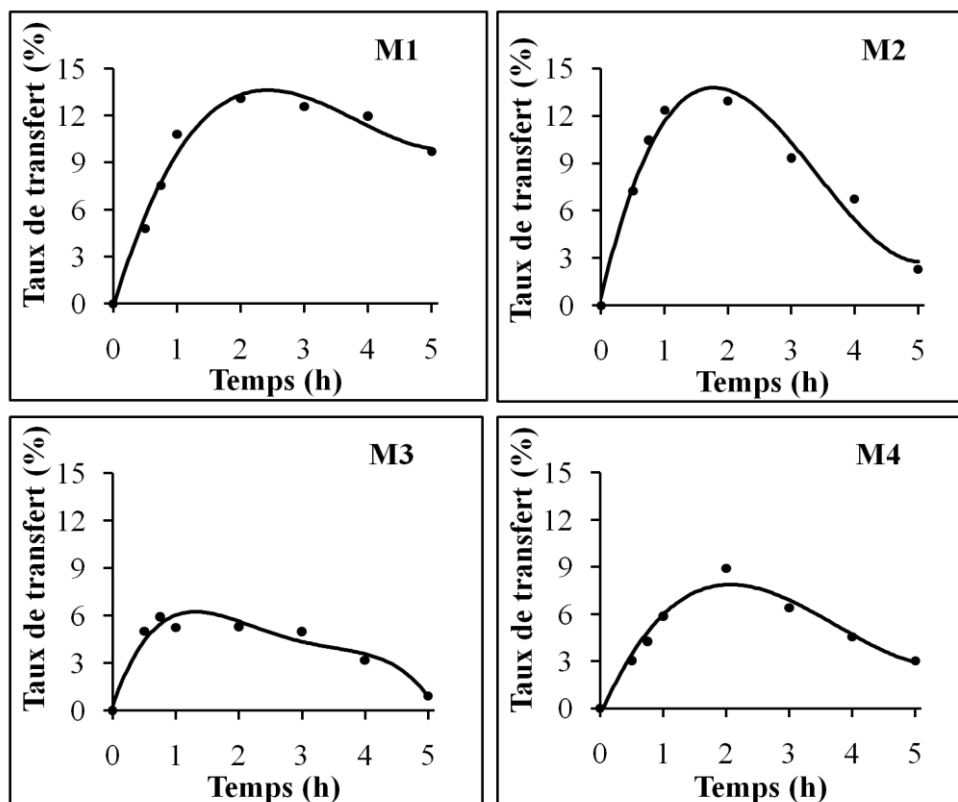


Figure 27: Détermination du temps optimum de la réaction de transmannosylation catalysée par les α -mannosidases du suc digestif de la larve du charançon *Rhynchophorus palmarum*.

Chaque enzyme est incubée à 37 °C pendant 5 h dans les conditions optimales de pH, quantité d'enzyme et de concentration de donneur/accepteur. A intervalles de temps définis, une aliquote du milieu réactionnel est prélevée, chauffée au bain-marie bouillant pendant 3 min et les produits de réaction (10 μ l) sont quantifiés par HPLC. M1, M2, M3 et M4 représentent les α -mannosidases purifiées.

5. Réaction de transmannosylation dans les conditions optimales

Tous les paramètres permettant d'optimiser la réaction de transmannosylation ont été réunis pour une ultime réaction de synthèse. Pour cette réaction uniquement, trois essais ont été réalisés par enzyme. Le **tableau IX** résume l'évolution des différents taux de transfert en fonction des paramètres étudiés et donne les pourcentages moyens de transmannosylation de l'ultime réaction. Aussi, nous constatons selon les données du tableau que chaque paramètre étudié influence significativement le pourcentage de transmannosylation. En effet, le pH, la quantité d'enzyme, la concentration du donneur-accepteur et le temps font varier le rendement de synthèse en l'améliorant. Ainsi, pour chaque enzyme, en partant du taux obtenu avec l'étude du pH à celui obtenu avec le temps de réaction, les intervalles suivants se dégagent:

- M1: 5,87 à 12,34 % soit une amélioration du taux d'environ 55%;
- M2: 6,15 à 12,15 % soit une amélioration du taux d'environ 49%;
- M3: 4,18 à 5,59 % soit une amélioration du taux d'environ 25%;
- M4: 4,99 à 8,43 % soit une amélioration du taux d'environ 41%.

Tableau IX: Evolution du taux de transmannosylation dans les conditions optimales de pH, de quantité d'enzyme, de concentration de donneur-accepteur et du temps.

Paramètres	Taux de transfert (%)			
	M1	M2	M3	M4
pH	5,87	6,15	4,18	4,99
Quantité d'enzyme	6,06	6,32	4,61	5,21
Donneur-Accepteur	9,80	10,09	5,64	6,57
Temps	13,08	12,94	5,93	8,92
Taux moyen (ultime réaction)	12,34 ± 0,75	12,15 ± 0,79	5,59 ± 0,35	8,43 ± 0,50

Les enzymes sont incubées à 37 °C dans les conditions optimales de transmannosylation préalablement déterminées. Les réactions sont arrêtées par chauffage au bain-marie bouillant pendant 3 min. Les produits de réaction (10 µl) sont quantifiés par HPLC. **M1**, **M2**, **M3** et **M4** représentent les α -mannosidases purifiées.

DISCUSSION

Quatre protéines enzymatiques responsables de l'activité α -mannosidase du suc digestif brut de la larve du charançon *Rhynchophorus palmarum* ont été purifiées. La stratégie de purification mise en place a consisté en l'utilisation de techniques standards de séparation de protéines. Ce sont: la précipitation au sulfate d'ammonium et les techniques chromatographiques sur gel à savoir: la chromatographie d'exclusion moléculaire, la chromatographie échangeuse d'anions et la chromatographie d'interaction hydrophobe. Ces techniques, assez aisées d'utilisation, ont également servi lors de la purification d'autres α -mannosidases (Ahi *et al.*, 2007). La chromatographie d'interaction hydrophobe, utilisée en dernière étape de purification, a été déterminante pour la pureté des α -mannosidases M2, M3 et M4. Elle demeure donc une technique de choix pour la purification des protéines enzymatiques. Selon Ibrahima-Granet et Bertrand (1996), c'est une technique idéale de séparation de protéines et le gel Phenyl-Sepharose semble être le meilleur support. D'ailleurs, plusieurs glycosidases provenant d'insectes ont été purifiées en utilisant des techniques similaires (Kouamé *et al.*, 2005 ; Faulet *et al.*, 2006a, b ; Yapi *et al.*, 2007). Il faut cependant souligner que les rendements de purification obtenus pour nos α -mannosidases sont inférieurs à ceux d'autres rapportées dans la littérature (De Prijcker *et al.*, 1974 ; Athanasopoulos *et al.*, 2005). Ces faibles taux de rendement pourraient s'expliquer par la présence de plusieurs isoformes. En effet, des rendements similaires ont déjà été observés chez *Candida albicans* pour différentes isoformes d' α -mannosidases (Reyna *et al.*, 1999). Aussi, soulignons que les différentes techniques de purification utilisées dans notre étude ont non seulement permis de séparer les α -mannosidases les unes des autres mais également de les isoler des autres glycosidases qui représentent la majorité des enzymes digestives chez les insectes (Ferreira *et al.*, 1988 ; Terra et Ferreira, 1994).

L'analyse comparée des résultats obtenus à partir des deux techniques chromatographique et électrophorétique pour la détermination des poids moléculaires (gel filtration et SDS-PAGE) permet de constater que, les α -mannosidases M1 et M2 sont dimériques tandis que M3 et M4 sont monomériques. De plus, l' α -mannosidase M1 présente des sous-unités de masses moléculaires différentes. C'est donc une molécule hétéro-dimérique contrairement à l' α -mannosidase M2 qui est homo-dimérique avec des sous-unités de masses moléculaires identiques et indifférenciées sur le gel de polyacrylamide (SDS-PAGE). Exceptées les α -mannosidases du foie de rat (Tulsiani *et al.*, 1982), des graines du jaquier (Kimura *et al.*, 1999) et des noix de l'amandier (Misaki *et al.*, 2003) qui présentent une structure tétramérique et, à la différence de l' α -mannosidase de la souche GL1 de *Bacillus sp.*

qui est trimérique (Nankai *et al.*, 2002), la majorité des α -mannosidases décrites dans la littérature sont monomériques tout comme les α -mannosidases M3 et M4. Ainsi, la structure dimérique des α -mannosidases M1 et M2 est une caractéristique particulière et spécifique à ces enzymes. Les α -mannosidases purifiées à partir du suc digestif brut de la larve du charançon *Rhynchophorus palmarum* possèdent des poids moléculaires élevés. Ces masses moléculaires élevées comparées à celles de bien d'autres α -mannosidases décrites dans la littérature, suggèrent leur appartenance à la classe 2 des α -mannosidases. Ces enzymes sont donc différentes de celles de la classe 1 qui possèdent des masses moléculaires relativement plus faibles (inférieures ou égales à 65 kDa) (Moremen, 2000).

Les α -mannosidases étudiées sont toutes acides et s'expriment mieux dans le tampon acétate de sodium. Ce comportement, bien commun à plusieurs α -mannosidases (De Prijcker *et al.*, 1974 ; Athanasopoulos *et al.*, 2005) a été également observé chez des glycosidases du termite *Macrotermes subhyalinus* (Kouamé *et al.*, 2005 ; Faulet *et al.*, 2006a). La valeur maximale de pH observée (pH 4,7) après l'étude de la stabilité au pH, est très proche de celle du suc digestif brut ($4,73 \pm 0,16$). Ces résultats démontrent que ces enzymes sont plus stables et plus actives à leur pH d'expression physiologique. Ce pH est donc un bon compromis entre l'activité et la stabilité de ces enzymes. Le caractère acide de ces enzymes est identique d'une part, à celui d'autres α -mannosidases digestives d'insectes décrites dans la littérature (Chipoulet et Chararas, 1985 ; Terra et Ferreira, 1994) et d'autre part, ces enzymes extracellulaires s'apparentent mieux aux α -mannosidases lysosomales, et par conséquent à celles de la classe 2 (Shah *et al.*, 2008). Il faut cependant noter que, le comportement de ces enzymes vis-à-vis du pH est complètement différent de celui observé chez certaines α -mannosidases d'insectes notamment, celles de *Spodoptera frugiperda* (Jarvis *et al.*, 1997) et de *Drosophila melanogaster* (Rabouille *et al.*, 1999). Ces dernières ont des activités hydrolytiques plus stables aux pHs proches de la neutralité (6,0 - 6,6) tout comme celle de l' α -mannosidase commerciale des noix de l'amandier (Misaki *et al.*, 2003).

Les courbes de l'influence de la température sur l'activité des α -mannosidases étudiées indiquent des températures optimales de 55, 50 et 60 °C respectivement pour les enzymes M2, M3 et M4. Ces températures traduisent le caractère mésophile de ces enzymes. Cette caractéristique est commune à la plupart des α -mannosidases décrites tant chez les organismes supérieurs (Misaki *et al.*, 2003 ; Ahi *et al.*, 2007) que chez les micro-organismes (Gaikwad *et al.*, 1995 ; Nankai *et al.*, 2002). Contrairement aux trois premières, l' α -mannosidase M1 est thermophile (65 °C). Il est important de noter que les données bibliographiques disponibles à

ce jour ne soulignent pas la présence d' α -mannosidases thermophiles chez les insectes en particulier et chez les organismes supérieurs en général. Par conséquent, cette résistance de l' α -mannosidase M1 à la température est un résultat d'un intérêt particulier. D'ailleurs, les résultats obtenus lors de l'étude des propriétés physico-chimiques de cette enzyme ont montré ses potentialités d'utilisation en biotechnologie, et fait l'objet de publication (**Bédikou *et al.*, 2009**). Le caractère thermophile d'une enzyme est très intéressant lors de son utilisation en biotechnologie. En effet, l'élévation de la température lors d'une réaction chimique en général influence de façon significative la solubilité des réactifs favorisant leur réactivité. De plus, elle permet de diminuer la viscosité du milieu et d'augmenter le coefficient de diffusion des molécules en solution, améliorant ainsi le rendement du produit attendu (**Becker *et al.*, 1997**, **Niehaus *et al.*, 1999**).

En plus de son caractère thermophile, l' α -mannosidase M1 est stable à sa température optimale pendant 25 min ce qui traduit sa thermostabilité. La combinaison de ces deux propriétés (thermophilie et thermostabilité) couplée à sa stabilité au pH, constitue un atout considérable à l'utilisation de cette enzyme en biotechnologie. En effet, les biocatalyseurs présentant une bonne stabilité sont recherchés et très utilisés en bioindustrie (**Ng et Kanealy, 1986** ; **Zamost *et al.* 1991**).

L'étude de l'inactivation thermique réalisée à 37 °C sur les quatre α -mannosidases montre que ces enzymes conservent la quasi-totalité de leurs activités hydrolytiques après 6 h de préincubation. Ces α -mannosidases présentent une meilleure stabilité comparativement à la plupart des α -mannosidases décrites dans la littérature (**Yoshida *et al.*, 1993**; **Ahi *et al.*, 2007**). Par ailleurs, la majorité des études réalisées sur la stabilité des α -mannosidases s'est faite dans un intervalle de temps relativement court (10 min à 1 h) (**Ichishima *et al.*, 1981** ; **Yoshida *et al.*, 1993**).

L'étude de la spécificité d'hydrolyse de substrat a montré que les enzymes purifiées hydrolysent uniquement le substrat *pNP- α -Man*. Elles sont donc spécifiques de l'anométrie α et du résidu de mannose. Ainsi, ces enzymes seraient appropriées pour l'élucidation de structures oligomannosylées renfermant des résidus de mannose associés en α . En général, les enzymes sont choisies pour leur spécificité stricte vis-à-vis d'un résidu monosaccharidique donné et sa configuration anomérique. Ainsi, dans l'étude de la copule glucidique des glycoprotéines, glycolipides et autres substances glycosylées dans les systèmes biologiques,

les glycosidases avec une haute spécificité de substrat sont utilisées pour élucider la structure des complexes des carbohydrates (**York et al., 1993 ; Misaki et al., 2003**).

Les α -mannosidases extracellulaires purifiées à partir du suc digestif brut de la larve du charançon *Rhynchophorus palmarum* hydrolysent les trois types de liaisons α rencontrés dans la nature entre deux résidus de mannose liés. Il s'agit des liaisons α -1,2 ; α -1,3 et α -1,6. Ces enzymes possèdent donc une spécificité d'hydrolyse large. Cette aptitude à hydrolyser ces liaisons est la même que celle observée chez les α -mannosidases du lysosome (EC 3.2.1.24) qui sont impliquées dans le catabolisme des N-glycannes des N-glycoprotéines (**Howard et al., 1997**) et couramment utilisées dans le traitement de mannosidoses. De ce qui précède, les enzymes étudiées pourraient appartenir à la classe 2 des α -mannosidases qui ont une spécificité d'hydrolyse plus large (**Shah et al., 2008**). Des propriétés similaires entre des enzymes extracellulaires et lysosomales avaient déjà été observées par **Forestier en 1992**. En effet, cet auteur a constaté à l'issue de ses travaux que, comme les enzymes lysosomales, les enzymes extracellulaires avaient une spécificité large. Cette similitude (large spectre d'hydrolyse) suggère qu'à l'instar des α -mannosidases lysosomales, les α -mannosidases du suc digestif de la larve du charançon *Rhynchophorus palmarum* participeraient à la dégradation de structures oligomannosylées contenus dans l'alimentation de cette larve, facilitant ainsi sa digestion. Par ailleurs, ces enzymes pourraient, comme celles du lysosome, être utilisées dans la formulation de solutions enzymatiques pour le traitement des mannosidoses (**Sun et al., 1999 ; Hirsch et al., 2003**).

Les α -mannosidases M1, M2, M3 et M4 sont insensibles à la plupart des agents chimiques testées en utilisant le substrat *pNP- α -Man*. Ainsi, l'activité des enzymes n'est nullement affectée par la présence du chélateur d'ions (EDTA, 1 mM). Ce résultat suggère que ces α -mannosidases ne requièrent pas d'ions essentiels à leur acte catalytique. Ce ne sont donc pas des métalloenzymes au sens strict du terme. En effet, la concentration de 1 mM d'EDTA est suffisante pour permettre l'inhibition de l'activité d'une métalloenzyme comme décrit chez l'endoprotéase Thr-N du suc digestif d'Achatine (**Niamké et al., 1999**). Les α -mannosidases étudiées sont insensibles à la plupart des ions métalliques testés toutefois, l'ion cuivre (Cu^{2+}) les inhibe fortement. L'inhibition d'autres glycosidases d'insectes par l'ion Cu^{2+} a été déjà rapportée dans la littérature (**Altmann et März, 1995 ; Faulet et al., 2006a**). Contrairement à l'ion cuivre, l'ion zinc (Zn^{2+}) est légèrement activateur des α -mannosidases M1 et M2 à 5 mM. Un tel comportement similaire de l'ion zinc a été rapporté chez certaines α -mannosidases de la classe 2. Il s'agit notamment des α -mannosidases lysosomales (**Daniel**

et al., 1994) et de l' α -mannosidase golgienne de l'insecte *Drosophila melanogaster* (Van den Elsen *et al.*, 2001).

L'inhibition plus ou moins prononcée des quatre α -mannosidases par le pCMB et le DTNB, qui sont essentiellement des réactifs spécifiques des groupements thiols, laisse présager l'importance de ces groupements dans l'activité catalytique ou dans la structure tridimensionnelle de ces enzymes (Johansson *et al.*, 1986 ; Yoshiki *et al.*, 2005). En effet, il est possible que les effets inhibiteurs observés soient la conséquence d'une substitution des thiols au niveau des centres actifs des α -mannosidases. Cependant, ces effets inhibiteurs peuvent aussi s'expliquer, surtout relativement aux concentrations importantes de réactifs utilisés, par une substitution abusive par ces composés, des thiols même non essentiels, conduisant à une déstructuration dénaturante des conformations ou à un encombrement stérique, rendant inefficace toute fixation de substrats (Taniguchi et Takano, 2004). Les composés à groupement sulfhydryle, ajoutés à des solutions protéiques, ont généralement pour rôle de protéger les groupements thiols de ces protéines contre d'éventuelles oxydations. L'action presque activatrice du β -mercaptoéthanol pourrait relever de cet effet de protection des thiols dans les α -mannosidases. Contrairement au β -mercaptoéthanol, la L-cystéine développe une action inhibitrice importante, particulièrement sur les α -mannosidases M2, M3 et M4. Cet effet inhibiteur pourrait être le résultat d'une rupture de liaisons dissulfures dans la structure de ces enzymes par une action de transdissulfuration, probablement facilitée par une liaison ionique spécifique de la cystéine, par une de ses fonctions chargées, à proximité des ponts dissulfures.

Les détergents sont des agents chimiques utilisés généralement pour nettoyer et désinfecter les surfaces. Leur usage en industrie est fréquent. Ainsi, la résistance des α -mannosidases du suc digestif de la larve du charançon *Rhynchophorus palmarum* aux détergents de groupes étudiés est un avantage considérable quant à leur utilisation potentielle en biotechnologie. De tels résultats similaires en présence de détergents a déjà fait l'objet d'étude chez les α -mannosidases purifiées à partir du foie du rat (Bonay *et al.*, 1992).

La sensibilité des α -mannosidases M1, M2, M3 et M4 aux inhibiteurs de type furanique et plus particulièrement à la swainsonine, nous permet de dire que ces enzymes ont un comportement similaire à celui des α -mannosidases du lysosome. Par conséquent, nous sommes confortés dans l'hypothèse selon laquelle ces enzymes appartiendraient à la classe 2 des α -mannosidases (Shah *et al.*, 2008). Cette hypothèse est soutenue par le comportement de

ces enzymes en présence de la kifunensine et de la désoxymannojirimycine. En effet, ces analogues de substrat de type pyranique sont connues pour leur effet inhibiteur spécifique des α -mannosidases de la classe 1 (Daniel *et al.*, 1994 ; Moremen *et al.*, 1994). Par ailleurs, l'effet inhibiteur plus modéré de la DIM ayant une analogie structurale proche de celle de la Sw, pourrait s'expliquer par son accessibilité au site de fixation du substrat, lié probablement à son degré d'ionisation. En effet, des travaux antérieurs ont montré que contrairement à la DIM, la swainsonine présentait aux alentours du pH 5,0, un degré d'ionisation plus élevé. Ainsi, sa fixation au site actif est favorisée et par conséquent, son degré d'inhibition augmenté (Dorling *et al.*, 1980). La forte inhibition des α -mannosidases en présence de faibles concentrations de swainsonine, ouvre des voies quant à l'exploitation de la structure de ces enzymes comme un modèle d'étude dans l'élucidation des thérapies contre le cancer. Car la swainsonine est un agent anti-cancerigène (Dennis *et al.*, 1990). Il a été rapporté dans la littérature que la structure d'une α -mannosidases d'insecte (*Drosophila melanogaster*) a même servi de modèle pour ce genre d'études (Van den Elsen *et al.*, 2001).

L'aptitude des α -mannosidases purifiées à partir du suc digestif brut de la larve du charançon *Rhynchophorus palmarum* à catalyser la synthèse de néomannoconjugués a été évaluée en utilisant le *p*NP- α -Man comme donneur et un certain nombre de composés phénoliques comme accepteurs. Le choix de ces composés a été motivé par diverses raisons. Soit parce qu'ils ont été utilisés dans d'autres études d'activités mannotransférasiques comme rapporté dans la littérature (Michalski *et al.*, 1990 ; Hara *et al.*, 1994 ; Wongvithoonyaporn *et al.*, 1997 ; Athanasopoulos *et al.*, 2004). Soit parce que ces composés ont déjà servi dans des réactions de transglycosylation et sont surtout disponibles. En ce qui concerne le substrat *p*NP- α -Man, il a été choisi parce qu'il est bien hydrolysé par les différentes enzymes. De plus, nous disposons, pour l'analyse des produits de réaction, d'une colonne de séparation de composés phénoliques.

Dans le but d'optimiser le taux de transmannosylation, des paramètres susceptibles d'influencer la réaction ont été étudiés. La démarche générale a consisté à réduire au maximum l'activité de l'eau dans les réactions d'hydrolyse en augmentant la concentration des différents réactifs de sorte à favoriser la synthèse (Ajisaka *et al.*, 1987 ; Vic et Thomas, 1992). Par cette démarche, nous avons montré que les α -mannosidases M1, M2, M3 et M4 sont capables de catalyser en milieu acide la synthèse de néomannoconjugués par transmannosylation. Dans les conditions expérimentales de réaction, le produit de synthèse obtenu pourrait bien être le *p*NP-dimannose. En effet, ce produit a déjà été obtenu dans des

conditions similaires à partir de l' α -mannosidase commerciale du fruit du jaquier (**Wongvithoonyaporn et al., 1997**).

Dans la présente étude, les réactions de transmannosylation sont favorisées entre les pH 3,5 et 6,5. Cependant, le calcul des pourcentages de transfert s'est effectué seulement aux pH 3,5 et 4,0, et le maximum de transfert est observé à pH 4,0. Au-delà de ce pH, il était impossible de déterminer l'aire correspondant au *para*-nitrophénol (*p*NP) libéré et servant au calcul des différents pourcentages. Ce phénomène observé pourrait s'expliquer par une réaction secondaire dans le milieu réactionnel. Des réactions de synthèse réalisées à pH acide en présence de glycosidases sont fréquentes (**Hara et al., 1994 ; Ferrer et al., 2005**). Toutefois, il faut noter que le pH optimum de transmannosylation des α -mannosidases M1, M2, M3 et M4 (pH 4,0) est différent des pH d'hydrolyse précédemment déterminés (4,5 et 5,0). Cette différence, bien que légère, pourrait s'expliquer par le fait que, la capacité d'hydrolyse des enzymes est affectée par l'abaissement du pH et ceci, au profit de leurs aptitudes à transférer les faibles quantités de mannose libéré. Des résultats similaires ont été rapportés par certains auteurs (**Huber et al., 1983 ; Yapi et al., 2007**). Selon **Huber et al. (1983)**, cette différence de pH serait le fait de la présence au niveau du site actif, d'un groupement fonctionnel à forte valeur de pKa dont l'état d'ionisation affecterait l'hydrolyse mais, pas la synthèse.

Il ressort de l'étude en fonction des paramètres que les taux de transfert varient en fonction des paramètres étudiés. Ce qui traduit leur influence sur les réactions. Toutefois, il est important de noter que lors de la détermination de la concentration optimale d'accepteur, trois accepteurs phénoliques ont été testés. Il s'agit du phénol, du phényl-phosphate et du *p*NP- α -Man. Les résultats ont montré que le transfert du mannose se fait préférentiellement sur le *p*NP- α -Man. Ce composé fait donc office de donneur et d'accepteur dans cette réaction. Cette observation traduit l'influence de la structure de l'accepteur dans les réactions de transmannosylation. Des résultats similaires ont été rapportés par **Hara et al. (1994)** lors de réactions de transmannosylation catalysées par des α -mannosidases commerciales. En effet, en utilisant le D-fructose, le D-fucose et le sucrose comme accepteurs, ces auteurs ont constaté que le transfert du mannose se faisait sur le D-fructose et le sucrose mais pas sur le D-fucose. D'autres études rapportées dans la littérature ont également montré l'influence des accepteurs hydroxylés sur les taux de transglycosylation (**Leparoux et Colas, 1994 ; Crout et Vic, 1998**).

Dans les conditions optimales de transmannosylation, des pourcentages moyens de $12,34 \pm 0,75$ %; $12,15 \pm 0,79$ %; $5,59 \pm 0,35$ % et $8,43 \pm 0,50$ % ont été obtenus respectivement pour les α -mannosidases M1, M2, M3 et M4. En tenant compte des taux de transfert de ces enzymes, relatif à la quantité d'enzyme utilisée, nous pouvons dire que l' α -mannosidase M1 est l'enzyme la plus efficace en synthèse. Ensuite suivent successivement M2, M3 et M4. En effet, des quantités d'enzyme relativement faibles pour les deux premières enzymes sont nécessaires à l'obtention des meilleurs pourcentages de transmannosylation (12,34 % et 12,15 %). Les taux de transfert obtenus dans cette étude sont faibles par rapport à ceux de la plupart des glycosidases utilisées en transglycosylation et décrites dans la littérature (**Leparoux et Colas, 1994** ; **Athanasopoulos et al., 2004** ; **Yapi et al., 2007**). Cependant, ils sont largement supérieurs à ceux d' α -mannosidases ayant servi à des réactions de transmannosylation dans des conditions similaires (**Wongvithoonyaporn et al., 1997**). De plus, le temps optimum de transmannosylation (45 min à 2 h) des α -mannosidases du suc digestif de la larve de *Rhynchophorus palmarum* est nettement supérieur comparativement à celui de la plupart des α -mannosidases décrites dans la littérature et qui varient de 5 à 10 h (**Wongvithoonyaporn et al., 1997**). Cet atout constitue un avantage majeur quant à l'utilisation potentielle de ces α -mannosidases comme outil biotechnologique en synthèse de néomannoconjugués.

**CONCLUSION GENERALE
ET PERSPECTIVES**

L'intérêt scientifique et biotechnologique des glycosides hydrolases ne cesse de s'accroître à cause de leurs différents domaines d'application. De nombreuses études sont toujours réalisées dans le but de trouver de nouvelles enzymes plus actives ou présentant de nouvelles activités d'intérêt.

L'objectif de cette étude était de purifier et de caractériser les protéines enzymatiques responsables de la forte activité α -mannosidase exprimée dans le suc digestif brut de la larve du charançon *Rhynchophorus palmarum* afin de comprendre dans un premier temps leurs rôles physiologiques et ensuite, au vue de leur caractérisation, d'en faire des outils potentiels pour des applications biotechnologiques.

Au terme de nos travaux, il ressort que la stratégie de purification adoptée, assez aisée de réalisation, a permis d'isoler quatre α -mannosidases nommés M1, M2, M3 et M4. Ces enzymes réalisent l'hydrolyse du substrat *para*-nitrophényl- α -D-mannopyranoside et présentent une spécificité stricte du résidu mannosyle.

La caractérisation de ces enzymes aux plans physico-chimique, cinétique et moléculaire a permis de révéler quelques propriétés particulières, et souvent différentes de celles des autres α -mannosidases décrites dans la littérature. En effet, l'étude des structures moléculaires a révélé que M3 et M4 sont monomériques à l'instar de la plupart des α -mannosidases tandis que M1 et M2 sont dimériques.

Les tests d'activité hydrolytique réalisés en fonction du pH et de la température ont montré que ces enzymes sont acides et mésophiles, excepté l' α -mannosidase M1 qui est thermophile et présente une stabilité de 25 minutes à sa température optimale (65 °C) avant de connaître une baisse d'activité.

L'activité de ces enzymes n'est pas affectée par la majorité des ions métalliques, détergents et par l'EDTA. Par contre, les agents chimiques tels que le *p*CMB et le DTNB ont des effets inhibiteurs plus ou moins prononcés, suggérant l'implication éventuelle de groupements thiols dans l'activité de ces enzymes. L'importante action inhibitrice de la L-cystéine sur la plupart des α -mannosidases fait penser plutôt à une action de rupture de ponts dissulfures par transdissulfuration spécifique effectuée par le thiol de la cystéine.

L'étude des inhibiteurs spécifiques et l'analyse des produits d'hydrolyse des différents mannobioses ont montré que M1, M2, M3 et M4 sont sensibles à faibles concentrations aux

inhibiteurs de type furanique que sont la Swainsonine (Sw) et la Désoxyiminomannitol (DIM). Elles hydrolysent les trois liaisons α -1,2 ; α -1,3 et α -1,6 rencontrées dans la nature. Elles présentent donc une large spécificité d'hydrolyse de liaisons. Ces α -mannosidases du suc digestif brut de la larve du charançon *Rhynchophorus palmarum* joueraient probablement un rôle très important dans la dégradation des résidus oligomannosylés contenus dans l'alimentation de ces larves, facilitant ainsi leur digestion. Elles pourraient également servir de par leur spécificité large à des fins biotechnologiques notamment dans l'hydrolyse de structures oligomannosidiques et dans l'analyse de l'alignement des sucres des copules glucidiques de certaines macromolécules.

L'utilisation de ces enzymes en synthèse de néomannoconjugués à travers des réactions de transmannosylation a révélé qu'en plus de leurs propriétés hydrolasiques, les α -mannosidases de la larve du charançon *Rhynchophorus palmarum* possèdent des propriétés transférasiques. En effet, elles sont toutes capables de transférer le résidu de mannose hydrolysé à partir du substrat *pNP- α -Man* sur ce même substrat qui fait à la fois office de donneur et d'accepteur de mannose, avec des taux de transfert moyens variant de $5,59 \pm 0,35$ % à $12,34 \pm 0,75$ %.

De tout ce qui précède, il ressort que les α -mannosidases acides M1, M2, M3 et M4 du suc digestif de la larve du charançon *Rhynchophorus palmarum* sont facile à obtenir. Elles présentent un intérêt fondamental au plan physiologique en aidant à la digestion des aliments. *In vitro*, ces enzymes se présentent comme des outils potentiels dans l'hydrolyse des structures oligomannosylées et dans la synthèse par transmannosylation de néomannoconjugués. Ce sont donc des outils enzymatiques de choix, facilement accessibles, pour des applications biotechnologiques en glycobiochimie.

Nous envisageons poursuivre les études de la caractérisation moléculaire de ces enzymes en vue de les identifier à une classe bien précise d' α -mannosidase par la détermination des séquences en acides aminés constitutifs et la comparaison de celles-ci aux bases de données déjà existantes. Au moyen d'une colonne de mise en évidence de molécules glucidiques, nous envisageons déterminer l'aptitude des α -mannosidases étudiées à synthétiser des di-, tri-, tétra- et penta-mannosides. Ces molécules sont d'une importance capitale car utilisées à des fins thérapeutique dans la lutte antivirale. Nous comptons également utiliser les propriétés transférasiques de ces enzymes pour transférer des résidus de mannose (mannosylation) sur d'autres molécules (peptides, protéines) aux propriétés connues

en vue d'étudier l'influence de la glycosylation sur les propriétés originelles. En effet, la plupart des protéines à activité biologiques (antigènes, hormones, récepteurs cellulaires...) sont des glycoprotéines.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abraham V.A., Al Shuaibi M.A., Faleiro J.R., Abuzuhairah R.A. and Vidyasagar P.S.P.V. (1998).** An integrated management approach for red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* Oliv., a key pest of date palm in middle east. *Sultan Qabus Univ. J. Sci. Res., Agric. Sciences.* **3**: 77-84.
- Ahern-Rindell A.J., Prieur D.J., Murnane R.D., Raghavan S.S., Daniel P.F., McCluer R.H., Walkley S.U. and Parish S.M. (1988).** Inherited lysosomal storage disease associated with deficiencies of beta-galactosidase and alpha-neuraminidase in sheep. *Am. J. Med. Genet.*, **31**: 39-56.
- Ahi A.P., Gonnetty T.J., Faulet B.M., Kouamé L.P. and Niamké S.L. (2007).** Biochemical characterization of two α -mannosidases from breadfruit (*Artocarpus communis*) seeds. *Afr. J. Biochem. Res.*, **1**: 106-116.
- Ajisaka K., Nishida H. and Fujimoto H. (1987).** Use of an activated carbon column for the synthesis of disaccharides by use of reversed hydrolysis activity of β -galactosidase. *Biotechnol. Lett.*, **9**: 387-392.
- Altmann F. and März L. (1995).** Processing of asparagines-linked oligosaccharides in insect cells: evidence for α -mannosidase II. *Glycoconj. J.*, **12**: 150–155.
- Anonyme 1 (2007).** *Rhynchophorus ferrugineus* and *Rhynchophorus palmarum*. *Bull. EOPP/EPPO Bull.*, **37**: 571-579.
- Anonyme 2 (2005).** Data sheets on quarantine pests, *Rhynchophorus palmarum*. *Bull. EOPP/EPPO Bull.*, **35**: 468-471.
- Ashwell G. and Harford J. (1982).** Carbohydrate-specific receptors of the liver. *Annu. Rev. Biochem.*, **51**: 531-554.
- Athanasopoulos V.I., Niranjan K. and Rastall R.A. (2004).** Regioselective synthesis of mannobiose and mannotriose by reverse hydrolysis using a novel 1,6- α -D-mannosidase from *Aspergillus phoenicis*. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **27**: 215-219.
- Athanasopoulos V.I., Niranjan K. and Rastall R.A. (2005).** The production, purification and characterization of two novel α -mannosidases from *Aspergillus phoenicis*. *Carbohydr. Res.*, **340**: 609-617.
- Avand-Faghieh A. (1996).** The biology of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* Oliv. in Saravan region (Sistan & Balouchestan province, Iran). *Appl. Entomol. Phytopathol.* **63**: 61-89.
- Avand-Faghieh A. (2004).** Identification et application agronomique de synergistes végétaux de la phéromone du charançon *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) 1790. Thèse de Doctorat, INAPG, France. p. 181.

- Ballou C.E. (1990).** Isolation, characterization, and properties of *Saccharomyces cerevisiae* mnn mutants with nonconditional protein glycosylation defects. *Methods Enzymol.*, **185**: 440-470.
- Becker B., Ramakrishnan S., Menovsky A.A., Nieuwenhuys G.J. and Mydosh J.A. (1997).** Unusual ordering behaviour single-crystal $U_2Rh_3Si_5$. *Phys. Rev. Lett.*, **78**: 1347-1350.
- Becker K.C. and Kuhl P. (1999).** Synthesis of O- β -galactopyranosyl-L-serine derivatives using β -galactosidase in aqueous-organic reaction systems. *J. Carbohydr. Chem.*, **18**: 121-129.
- Bédikou M., Ahi P., Koné M., Faulet B., Gonnety J., Kouamé P. and Niamké S. (2009).** Purification and characterization of a novel thermoacidophilic and thermostable α -mannosidase from the digestive fluid of oil palm weevil *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Curculionidae) larvae. *Eur. J. Entomol.*, **106**: 185-191.
- Bellier S. (2001).** Les maladies lysosomales de l'homme et des animaux domestiques. *Rev. Med. Vet.*, **152**: 435-446.
- Binate S., N'dri D., Toka M. and Kouamé L.P. (2008).** Purification and characterization of two beta-glucosidases from termite workers *Macrotermes bellicosus* (Termitidae: Macrotermitinae). *J. Appl. Biosci.*, **10**: 461-470.
- Binder W.H., Kählig H. and Schmid W. (1995).** Galactosylation by use of β -galactosidase: Enzymatic synthesis of disaccharide nucleosides. *Tetrahedron Asymm.*, **6**: 1703-1710.
- Bischoff J. and Kornfeld R. (1984).** The effect of 1-deoxymannojirimycin on rat liver α -mannosidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **25**: 324-331.
- Blum H., Beier H. and Gross B. (1987).** Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, **8**: 93-99.
- Bojarova P., Petraskova L., ferrandi E.E., Monti D., Pelantova H., Kuzma M., Simerska P. and Kren V. (2007).** Glycosyl azides – An alternative way to disaccharides. *Adv. Synth. Catal.*, **349**: 1514-1520.
- Bokhari U.G. and Abuzuhairah R.A. (1992).** Diagnostic tests for red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* infested date palm trees. *Arab J. Sci. Res.*, **10**: 93-104.
- Bonay P., Roth J. and Huggues C.R. (1992).** Subcellular distribution in rat liver of a novel broad-specificity (α -1,2; α -1,3 and α -1,6) mannosidase active on oligomannose glycans. *Eur. J. Biochem.*, **205**: 399-407.
- Borrer D.J., Belong D.J. and Triplehorn C.A. (1964).** An introduction to the study of insects, 4th edition. New York, Holt, Rinehart & Winston, 852 pp.

- Cenci di Bello I., Fleet G., Namgoong S.K., Tandano K.I. and Winchester B. (1989).** Structure-activity-relationship of swainsonine. Inhibition of human α -mannosidases by swainsonine analogs. *Biochem. J.*, **159**: 855-861.
- Chiffolleau-Giraud V., Spangenberg P. and Rabiller C. (1997).** β -Galactosidase transferase activity in ice and use of vinyl- β -D-galactoside as donor. *Tetrahedron Asymm.*, **8**: 1703-1710.
- Chipoulet J.M. and Chararas C. (1985).** Survey and electrophoretical separation of the glycosidases of *Rhagium inquisitor* (Coleoptera: Cerambycidae) larvae. *Comp. Biochem. Physiol.*, **80B**: 241-246.
- Chrispeels M.J. et Faye L. (1998).** Rien ne sert de produire, il faut glycosyler. *Biofutur*, **184**: 53-57.
- Crout D.H.G. and Vic G. (1998).** Glycosidases and glycosyl transferases in glycoside and oligosaccharide synthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2**: 98-111.
- Cumming D.A. (1991).** Glycosylation of recombinant protein therapeutics: control and functional implication. *Glycobiology*, **1**: 115-130.
- Daniel P.F., Winchester B. and Warren C.D. (1994).** Mammalian α -mannosidase: multiple forms but a common purpose. *Glycobiology*, **4**: 551-566.
- De Prijcker J., Vervoort A. and De Bruyne C. (1974).** Purification and properties of α -D-mannosidase from *Medicago sativa*. *Eur. J. Biochem.*, **47**: 561-566.
- Dennis J.W., Koch K., Yousefi S. and VanderElst I. (1990).** Growth inhibition of human melanoma tumor xenografts in athymic nude mice by swainsonine. *Cancer Res.*, **50**: 1867-1872.
- Dorling P.R., Huxtable C.R. and Colegate S.M. (1980).** Inhibition of lysosomal α -mannosidase by swainsonine, an indolizidine alkaloid isolated from *Swainsona canescens*. *Biochem. J.*, **191**: 649-665.
- Dupré T., Lavieu G., Moore S. and Seta N. (2004).** Les anomalies congénitales de glycosylation des N-glycoprotéines. *Medecine/Sciences*, **20**: 331-338.
- Dwek R.A. (1996).** Glycobiology: toward understanding the function of sugars. *Chem. Rev.*, **96**: 683-720.
- El Ezaby H. (1997).** Injection as a method to control *Rhynchophorus ferrugineus*. *Arab J. Plant Protect.* **15**, 31-38.
- Erthal Jr. M., Silva C.P. and Samuels R.I. (2007).** Digestive enzymes in larvae of the leaf cutting ant, *Acromyrmex subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae: Attini). *J. Insect Physiol.*, **53**: 1101-1111.

- Faulet B.M., Niamké S., Gonnety J.T. and Kouamé L.P. (2006b).** Purification and biochemical properties of a new thermostable xylanase from symbiotic fungus, *Termitomyces sp.* *Afr. J. Biochem.*, **5**: 273-282.
- Faulet B.M., Niamké S., Gonnety T.J. and Kouamé L.P. (2006a).** Purification and biochemical characterization of a new strictly specific endoxylanase from termite *Macrotermes subhyalinus* workers (Macrotermitinae-Termitidae). *Bull. Insectol.*, **59**: 17-26.
- Ferreira C., Ribeiro A.F., Garcia E.S. and Terra W.R. (1988).** Digestive enzymes trapped between and associated with the double plasma membranes of *Rhodnius prolixus* posterior midgut cells. *Insect Biochem.*, **18**: 521-530.
- Ferrer M., Golishina O.V., Plou F.J., Timmis K.N. and Golyshin P.N. (2005).** A novel α -glucosidase from the acidophilic archaeon *Ferroplasma acidiphilum* strain Y with high transglycosylation activity and an unusual catalytic nucleophile. *Biochem. J.*, **391**: 269-276.
- Firon N., Ofek I. and Sharon N. (1983).** Carbohydrate specificity of the surface lectins of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Salmonella typhimurium*. *Carbohydr. Res.*, **120**: 235-249.
- Forestier J.P. (1992).** Les enzymes de l'espace extra-cellulaire du stratum corneum. *Int. J. Cosmet. Sci.*, **14**: 47-63.
- Gaikwad S.M., Keskar S.S. and Khan M.I. (1995).** Purification and characterization of α -mannosidase from *Aspergillus sp.* *Biochem. Biophys. Acta*, **1250**: 144-148
- Giordani R., Seipao M., Moulin T.J. and Regli P. (1991).** Antifungal action of Carica papaya latex: isolation of fungal cell wall hydrolyzing enzymes. *Mycoses*, **34**: 469-477.
- Hallett R.H., Gries G., Gries R. and Borden J.H. (1993a).** Aggregation pheromones of two Asian palm weevils, *Rhynchophorus ferrugineus* and *R. vulneratus*. *Naturwissenschaften*, **80**: 328-331.
- Hallett R.H., Oehlschlager A.C., Gries G., Angerilli N.P.D., Al Shareqi R.K., Gassouma M.S. and Borden J.H. (1993b).** Field testing of aggregation pheromones of two Asian palm weevils. *PORIM International Palm Oil Congress*, 20-25 September, Palm Oil Research Institute of Malaysia (PORIM), 325 pp.
- Hara K., Fujita K., Nakano H., Kuwahara N., Tanimoto T., Hashimoto H., Koizumi K. and Kitahara S. (1994).** Acceptor specificities of α -mannosidases from jack bean and almond, and transmannosylation of branched cyclodextrins. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**: 60-63.
- Hawksworth D.L. and Mound D. (1991).** Biodiversity databases: the crucial significance of selections. In *The biodiversity of microorganisms and invertebrates: Its role in sustainable agriculture*. (Hawksworth D.L. Ed.), CAB International, Wallingford, UK, pp.17-29.

- Henrissat B. and Bairoch A. (1993).** New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.*, **293**: 781-788.
- Henrissat B. and Bairoch A. (1996).** Updating the sequence based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.*, **316**: 695-696.
- Hirsh C., Blom D. and Ploegh H.L. (2003).** A role for N-glycanase in the cytosolic turnover of glycoproteins. *EMBO J.*, **22**: 1036-1046.
- Howard S., Braun C., McCarter J., Moremen K.W., Liao Y.Y. and Withers S.G. (1997).** Human lysosomal and Jack bean α -mannosidases are retaining glycosidases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **238**: 896–898.
- Huber R.E., Gaunt M.T., Sept R.L. and Babiak M.J. (1983).** Differences in the effects of pH on the hydrolytic and transgalactosyl reactions of beta-galactosidases (*Escherichia coli*). *Can. J. Biochem. Cell. Biol.* **61**: 198-206.
- Ibrahima-Granet O. and Bertrand O. (1996).** Separation of proteases: Old and new approach. *J. Chromato.*, **684**: 239-263.
- Ichishima E., Arai M., Shigematsu Y., Kumagai H. and Sumida-Tanaka R. (1981).** Purification of an acidic alpha-D-mannosidase from *Aspergillus saitoi* and specific cleavage of 1,2-alpha-D-mannosidic linkage in yeast mannan. *Biochem. Biophys. Acta*, **658**: 45-53.
- Jaeken J. and Carchon H. (1993).** The carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes: an over-view. *J. Inher. Metab. Dis.*, **16**: 813-820.
- Jarvis D.L., Bohlmeyer D.A., Liao Y.F., Lomax K.K., Merkel R.K., Weinkauff C. and Moremen K.W. (1997).** Isolation and characterization of a class II alpha-mannosidase cDNA from lepidopteran insect cells. *Glycobiology*, **7**: 113-127.
- Johansson E., Hedbys L., Mosbach K. and Larsson, P.O. (1989).** Studies of the reversed α -mannosidase reaction in high concentrations of mannose. *Enzyme Microb. Technol.*, **11**: 347-352.
- Johansson J., Tore C.V. and Hans J. (1986).** Surfactant protein B: Disulfide bridges, structural properties, and kringle similarities. *Biochemistry*, **30**: 6917-6921.
- Jordao B.P. and Terra W.R. (1991).** Regional distribution and substrate specificity of digestive enzymes involved in terminal digestion in *Musa domestica* hind-midguts. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, **17**: 157-168.
- Kansas G.S. (1996).** Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood*, **88**: 3259-3287.
- Kawar Z.S., Moremen K.W. and Jarvis D.L. (2001).** Insect cells encode a class II alpha-mannosidase with unique properties. *J. Biol. Chem.*, **276**: 16335-16340.

- Kimura Y., Hess D. and Sturm A. (1999).** The N-glycans of jack bean α -mannosidase structure, topology and function. *Eur. J. Biochem.*, **264**: 168-175.
- Kobata A. (1992).** Structures and functions of the sugar chains of glycol-proteins. *Eur. J. Biochem.*, **209**: 483-501.
- Kornfeld R. and Kornfeld S. (1985).** Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Ann. Rev. Biochem.*, **54**: 631-664.
- Koshland D.E. (1953).** Stereochemistry and the Mechanism of Enzymatic Reactions. *Biol. Rev.*, **90**: 1171-1202.
- Kouamé L.P., Kouamé F.A., Niamké S.L., Faulet B.M. and Kamenan A. (2005).** Biochemical and catalytic properties of two β -glycosidases purified from workers of the termite *Macrotermes subhyalinus* (Isoptera: Termitidae). *Int. J Trop. Insect Sci.*, **25**: 103-113.
- Kouamé L.P., Niamke S., Diopoh J. and Colas B. (2001).** Transglycosylation reactions by exoglycosidases from the termite *Macrotermes subhyalinus*. *Biotech. Lett.*, **23**: 1575–1581.
- Kren V. and Thiem J. (1997).** Glycosylation employing bio-systems: from enzymes to whole cells. *Chem. Soc. Rev.*, **26**: 463-473.
- Kukuruzinska M.A. and Lennon K. (1998).** Protein N-glycosylation: molecular genetics and functional significance. *Oral Biol. Med.*, **9**: 415-448.
- Laemmli U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 658-685.
- Leparoux S. and Colas B. (1994).** Digestive juice of *Achatina achatina* as a potential source of transglycosylation enzymes. *Int. J. Biochem.*, **26**: 247-254.
- Lineweaver H. and Burk D. (1934).** The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.*, **56**: 658-666.
- Lis H. and Sharon N. (1993).** Protein glycosylation: Structural and functional aspects. *Eur. J. Biochem.*, **218**: 1-27.
- Liu Y., Choudhury P., Cabral C.M. and Sifers R.N. (1999).** Oligosaccharide modification in the early secretory pathway directs the selection of a misfolded glycoprotein for degradation by the proteasome. *J. Biol. Chem.*, **274**: 5861-5867.
- Lowe J.B. and Marth J.D. (2003).** A genetic approach to mammalian glycans function. *Ann. Rev. Biochem.*, **72**: 643-691.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farra L. and randall R.J. (1951).** Protein measurement with folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275.

- Lubas W.A. and Spiro R.G. (1988).** Evaluation of the role of rat liver Golgi endo- α -D-mannosidase in processing of N-linked oligosaccharides. *J. Biol. Chem.*, **263**: 3990-3998.
- Maruyama Y., Nakajima T. and Ichishima E. (1994).** A 1,2- α -D-mannosidase from a *Bacillus sp.*: purification, characterization and mode of action. *Carbohydr. Res.*, **251**: 89-98.
- McCarter J.D. and Withers S.G. (1994).** Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**: 885-892.
- McCarter J.D., Burgoyne D.L., Miao S., Zhang S., Callahan J.W. and Withers S.G. (1997).** Identification of Glu-268 as the catalytic nucleophile of human lysosomal β -galactosidase precursor by mass spectrometry. *J. Biol. Chem.*, **272**: 396-400.
- McIntosh L.P., Hand G., Johnson P.E., Joshi M.D., Körner M., Plesniak L.A., Ziser L., Wakarchuk W.W. and Withers S.G. (1996).** The pKa of the general acid/base carboxyl group of a glycosidase cycles during catalysis: a ^{13}C -NMR study of *Bacillus circulans* xylanase. *Biochemistry*, **35**: 9958-9966.
- McLeod A.M., Lindhorst T., Withers S.G. and Warren R.A.J. (1994).** The acid/base catalyst in the exoglucanase/xylanase from *Cellulomonas fimi* is glutamic acid 127: evidence from detailed kinetic studies of mutants. *Biochemistry*, **33**: 6371-6376.
- Michalski J.C., Haeuw J.F., Wieruszkeski J.M. Montreuil J. and Strecker G. (1990).** In vitro hydrolysis of oligomannosyl oligosaccharides by the lysosomal α -D-mannosidase. *Eur. J. Biochem.*, **189**: 369-379.
- Misaki R., Fujiyama K., Yokoyama H., Ido Y., Miyauchi K., Yoshida T. and Seki T. (2003).** Characterization of Almond α -Mannosidase and its application for structure analysis of sugar chain. *J. Biosci. Bioeng.*, **96**: 187-192.
- Moore S.E. and Spiro R.G. (1990).** Demonstration that Golgi endo- α -D-mannosidase provide a glucosidase independent pathway for the formation of complex N-linked oligosaccharide of glycoproteins. *J. Biol. Chem.*, **256**: 13104-13112.
- Moremen K.W. (2000).** α -Mannosidases in asparagine-linked oligosaccharide processing and catabolism. In *Oligosaccharides in chemistry and biology: a comprehensive handbook* (Ernst B., Hart G. and Sinay P. eds.), Vol. 2. Wiley, New York, pp. 81-117.
- Moremen K.W. and Touster O. (1988).** Mannosidases in mammalian glycoprotein processing. In *Protein Transfer and Organelle Biosynthesis*. (R. Das R. and Robbins P. ed.), San Diego, Academic Press, 209-240.
- Moremen K.W., Trimble R.B. and Herscovics A. (1994).** Glycosidases of the asparagine-linked oligosaccharide processing pathway. *Glycobiology*, **4**: 113-125.

- Muller S., Alving K., Peter-Katalinic J., Zachara N., Gooley A.A. and Hanisch F.G. (1999).** High density O-glycosylation on tandem repeat peptide from secretory MUC1 of T47D breast cancer cells. *J. Biol. Chem.*, **274**:18165-18172.
- Muralidharan C.M., Sodagar N.N. and Vaghasia U.R. (2000).** Survey, distribution, extent of damage, field behaviour and biology of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* Oliv. on date groves of Kachchh (Gujarat). *Gujarat Agric. Univ. Res. J.*, **25**: 9-14.
- Murphy S.T. and Briscoe B.R. (1999).** The red palm weevil as an alien invasive: biology and the prospects for biological control as a component of IPM. *Bioc. News Info.*, **20**: 35N-46N.
- Nankai H., Hashimoto W. and Murata K. (2002).** Molecular identification of family 38 α -mannosidase of *Bacillus* sp strain GL1, responsible for complete depolymerisation of xanthan. *Appl. Environ. Microb.*, **68**: 2731-2736.
- NC-IUBMB (1992).** Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology. In *Enzyme Nomenclature*. (Webb E.C. Ed.), Academic Press, San Diego, California. p. 729.
- Ng T.K. and Kenealy W.R. (1986).** Industrial application of thermostable enzymes. In *Thermophiles General, Molecular and Applied Microbiology*. (Brock T.D. ed.), John Wiley, New York, pp. 197–205.
- Niamké S., Sine J-P., Guionie O. And Colas B. (1999).** A novel endopeptidase with a strict specificity for threonine residues at the P1' position. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **256**: 307-312.
- Niehaus F., Bertoldo C., Kähler M. and Antranikian G. (1999).** Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51**: 711–729.
- Nilsson K.G.I. (1997).** Glycosidase-catalysed synthesis of di- and trisaccharide derivatives related to antigens involved in the hyperacute rejection of xenotransplants. *Tetrahedron Lett.*, **38**: 133-136.
- Nilsson K.G.I. and Scigelova M. (1994).** Synthesis of glycosylated serine and threonine derivatives employing glycosidases. *Biotechnol. Lett.*, **16**: 671-676.
- Nirula K.K., Anthony J. and Menon K.P.V. (1953).** The red palm weevil and its control. *Proc. 40th Session Indian Sci. Cong.* 147-148.
- Nunoura N., Ohdan K., Yano T., Yamamoto K. and Kumagai H. (1996).** Purification and characterization of β -glucosidase (β -fucosidase) from *Bifidobacterium breve* clb acclimated to cellobiose. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **60**: 188-193.

- Oehlschlager A., Chinchilla C., Castillo G. and Gonzalez L. (2002).** Control of red ring disease by mass trapping of *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Curculionidae). *Fla. Entomol.*, **85**: 507-513.
- Panneerselvam K. and Freeze H.H. (1996).** Mannose corrects altered N-glycosylation in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome in fibroblasts. *J. Clin. Invest.*, **97**: 1478-1487.
- Placier G. (1999).** Caractérisation d'une β -D-galactosidase acide d'Achatine strictement spécifique du seul résidu β -D-Galactosyle. Applications potentielles. Thèse de doctorat, Université de Nantes, France. 107 p.
- Rabouille G., Kuntz D.A., Lockyer A.E., Watson R., Signorelli T., Rose D.R., Van Der Heuvel M. and Roberts D.B. (1999).** The *Drosophila* GMII gene encodes a Golgi α -mannosidase II. *J. Cell Sci.*, **112**: 3319-3330.
- Reyna A.B.V., Noyola P.P., Mendez C.C., Romero E.L. and Carreon A.F. (1999).** Purification and biochemical characterization of two soluble α -mannosidases from *Candida albicans*. *Glycobiology*, **9**: 533-537.
- Richard H. (1998).** Enzymologie et biocatalyse. In *Biotechnologie*. René Scriban coordonnateur, Techniques et Documentation (TEC et DOC). 4^e édition, Chapitre 1, pp 323-350.
- Rochat D., Malosse C., Lettere M., Ramirez-Lucas P., Einhorn J. and Zagatti P. (1993).** Identification of new pheromone-related compounds from volatiles produced by males of four Rhynchophorinae weevils (Coleoptera : Curculionidae). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris, Série II*, **316**: 1737-1742.
- Rosen S.D. (1989).** Lymphocyte homing : progress and prospects. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **1**: 913-919.
- Schweden J. and Bause E. (1989).** Characterization of trimming Man₉-mannosidase from pig liver: purification of a catalytically active fragment and evidence for the transmembrane nature of the intact 65 kDa enzyme. *Biochem. J.*, **264**: 347-355.
- Sears P. and Wong C.H. (1998).** Enzyme action in glycoprotein synthesis. *Cell. Mol. Life Sci.*, **54**: 223-252.
- Seta N., Dupré T., Cormier-Daire V., De Lonlay P., Moore S., Durand G. and Codogno P. (1999).** Le carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome de type I: un nouvel éclairage sur le métabolisme du mannose. *Médecine/Sciences*, **15**: 1202-1210.
- Shah N., Kuntz D.A. and Rose D.R. (2008).** Golgi alpha-mannosidase II cleaves two sugars sequentially in the same catalytic site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**: 9570-9575.
- Sinnott M.L. (1990).** Catalytic mechanisms of enzymic glycosyl transfer. *Chem. Rev.*, **90**: 1171-1202.

- Stroud M.R., Lavery S.B., Martensson S., Salyan M.E., Clausen H. and Hakomori S. (1994).** Human tumor-associated Le(a)-Le(x) hybrid carbohydrate antigen IV3 (Gal beta1→3 [Fuc alpha 1→4] GlcNAc) III3 FucnLc4 defined by monoclonal antibody 43-9F: enzymatic synthesis, structural characterization, and comparative reactivity with various antibodies. *Biochemistry*, **33**: 10672-10680.
- Sun H., Yang H. and Askins M.E. (1999).** Retrovirus vector mediated correction and cross correlation of lysosomal α -mannosidase deficiency in human and feline fibroblasts. *Hum. Gene Ther.*, **10**: 1311-1319.
- Taniguchi A.Y. and Takano K. (2004).** Purification and properties of beta-galactosidases from *Tilapia* intestine: Digestive enzyme of *Tilapia*-X. *Fisheries Sci.*, **70**: 688-694.
- Tanner W. and Lehle L. (1987).** Protein glycosylation in yeast. *Biochem. Biophys. Acta*, **906**: 81-99.
- Tatara Y., Lee B.R., Yoshida T., Takahashi K. and Ichishima E. (2003).** Identification of catalytic residues of Ca^{2+} independent 1,2- α -D-mannosidase from *Aspergillus saitoi* by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.*, **278**: 25289-25294.
- Terra W.R. and Ferreira C. (1994).** Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.*, **109B**: 1-62.
- Tremblay L.O., Kovacs E.N., Daniels E., Wong N.K., Sutton-Smith M., Morris H.R., Dell A., Marcinkiewicz E., Seidah N.G., McKerlie C. and Herscovics A. (2007).** Respiratory distress and neonatal lethality in mice lacking Golgi α -1,2-mannosidase IB involved in N-glycan maturation. *J. Biol. Chem.*, **282**: 2558-2566.
- Tulsiani D.R.P., Hubbard S.C., Robbins P.W. and Touster O. (1982).** α -mannosidases of rat liver Golgi membranes: mannosidase II is the GlcNAcMan₅-cleaving enzyme in glycoprotein biosynthesis and mannosidases IA and IB are the enzymes converting Man₉ precursor to Man₅ intermediate. *J. Biol. Chem.*, **257**: 3660-3668.
- Van Den Elsen J.M., Kuntz D.A. and Rose D.R. (2001).** Structure of Golgi alpha-mannosidase II: a target for inhibition of growth and metastasis of cancer cells. *EMBO J.*, **20**: 3008-3017.
- Vanderjagt D.J., Fry D.E. and Glew R.H. (1994).** Human glucocerebrosidase catalyses transesterification between glucocerebroside and retinol. *Biochem J.*, **300**: 309-315.
- Varki A. (1993).** Biological roles of oligosaccharides-All of the theories are correct. *Glycobiology*, **3**: 97-130.
- Vic G. and Thomas D. (1992).** Enzyme-catalysed synthesis of alkyl β -D-glucosides in organic media. *Tetrahedron Lett.*, **33**: 4567-4570.

- Wang C., Eufemi M., Turano C. and Giartosio A. (1996).** Influence of the carbohydrate moiety on the stability of glycoproteins. *Biochemistry*, **35**: 7299-7307.
- Wang Q. and Withers S.G. (1995).** Substrate-assisted catalysis in glycosidases. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**: 10137-10138.
- Wattanapongsiri A. (1966).** A revision of the genera *Rhynchophorus* and *Dynamis* (Coleoptera: Curculionidae). Bangkok, Thailand. *Dept. Agr. Sci. Bull.* **1**, 328 pp.
- Winchester B.G. (1984).** Role of alpha-D-mannosidases in the biosynthesis and catabolism of glycoproteins. *Biochem. Soc. Trans.*, **12**: 522-524.
- Withers S.G. (1995).** Enzymatic cleavage of glycoside : how does it happen ? *Pure and Appl. Chem.*, **67**: 1673-1682.
- Wongvithoonyaporn P., Perry D., Surarit R., Bucke C. and Svasti M.R.J. (1997).** Oligosaccharides synthesis by α -D-mannosidases from Thai Beans. In *Proceedings Conference on Biotechnology Research and Applications for Sustainable Development*. (Mongkolsuk S., Loprasert S. and Srifah P. eds), Bangkok, Thailand, pp. 9-15.
- Yapi D.Y.A., Niamké S.L. and Kouamé L.P. (2007).** Biochemical characterization of a strictly specific beta-galactosidase from the digestive juice of the palm weevil *Rhynchophorus palmarum* larvae. *Entomol. Sci.*, **10**: 343-352.
- York W.S., Harvey L.K., Guillen R., Albersheim P. and Darvill A.G. (1993).** Structural analysis of tamarind seed xyloglucan oligosaccharides using beta-galactosidase digestion and spectroscopic methods. *Carbohydr. Res.*, **248**: 285-301.
- Yoshida T., Inoue T. and Ichishima E. (1993).** 1,2- α -D-mannosidase from *Penicillium citrinum*: molecular and enzymic properties of two isoenzymes. *Biochem. J.*, **290**: 349-354.
- Yoshiki Y., Mikio F., Junji K. and Haruyoshi K. (2005).** Purification and characterization of an alpha-glucosidase from germinating millet seeds. *Ethnob. Phytochem. Pharmacol. Uncaria*, **66**: 851-859.
- Zamost L.B., Nielsen K.H. and Starnes L.R. (1991).** Thermostable enzymes for industrial applications. *J. Ind. Microbiol.*, **8**: 71-82.

Purification and characterization of a novel thermoacidophilic and thermostable α -mannosidase from the digestive fluid of oil palm weevil *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Curculionidae) larvae

MICAËL BÉDIKOU¹, PASCAL AHI², MARTIAL KONÉ³, BETTY FAULET², JEAN GONNETY², PATRICE KOUAMÉ²
and SÉBASTIEN NIAMKÉ*^{1,2}

¹Laboratoire de Biotechnologies, Filière Biochimie-Microbiologie de l'Unité de Formation et de Recherche en Biosciences de l'Université de Cocody-Abidjan, 22 BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire

²Laboratoire de Biochimie et Technologie des Aliments de l'Unité de Formation et de Recherche en Sciences et Technologie des Aliments de l'Université d'Abobo-Adjamé, 02 BP 801 Abidjan 02, Côte d'Ivoire

³Unité de Biotechnologie, Biocatalyse et Biorégulation, CNRS-UMR 6204, Laboratoire de Biochimie, Faculté des Sciences et Techniques, 2 Rue de la Houssinière, BP 92208, F-44322 Nantes Cedex 3, France

Key words. α -mannosidase, thermoacidophilic, thermostable, oil palm weevil, *Rhynchophorus palmarum*, Curculionidae

Abstract. An extracellular α -mannosidase with unusual properties was purified from the digestive fluid of oil palm weevil (*Rhynchophorus palmarum* Linnaeus) larvae using ammonium sulphate saturation, size exclusion and anion-exchange chromatography. The enzyme named *RplM* is thermoacidophilic, thermostable and behaves like lysosomal α -mannosidase (EC 3.2.1.24). The molecular weight, K_m value, optimum reaction temperature and pH are 108–112 kDa, 0.36 mM, 65°C and 4.5, respectively. Zn^{2+} enhanced whereas Cu^{2+} , Sodium dodecyl sulphate, swainsonine and 1,4-dideoxy-1,4-iminomannitol strongly inhibited its hydrolytic activity. The enzyme was stable for 25 min at 65°C and retained 70% of its initial activity after 60 min. At 70°C, around 60% of this activity was conserved after 25 min. *RplM* retained more than 90% of its activity over a pH range of 4.2 to 5.0 and remained fully active in the presence of detergents such as nonidet P-40, triton X-100, polyoxyethylen-10-oleyl ether (up to 1%, w/v), dithiothreitol and β -mercaptoethanol. The stability under these conditions is also better than that reported for other insect α -mannosidases. Thus, *RplM* could be used as an important bioindustrial tool for removing mannose residues from oligosaccharides.

INTRODUCTION

α -mannosidases are glycosyl hydrolases (GHs) that cleave specific α -linked mannose residues. They fall into two distinct classes with different substrate specificities, intracellular locations, sizes, cation requirements, sensitivities to plant alkaloid inhibitors and amino acid sequence alignments (Moremen et al., 1994; Moremen, 2000).

The first group termed class I α -mannosidases are located in the endoplasmic reticulum (ER) and Golgi complex and are strictly specific to α -1,2 linked mannose residues of $Man_9GlcNAc_2$, converting this substrate to $Man_3GlcNAc_2$. Class I α -mannosidases are sensitive to specific inhibitors such as kifunensine (Kif) and 1-deoxymannojirimycin (DMNJ) and belong to family 47 in the GHs classification (Henrissat & Bairoch, 1996).

Class I mannosidases contrast with the more heterogeneous collection of processing and catabolic enzymes termed class II mannosidases that are present in the ER, Golgi, Lysosome and Cytosol. Golgi mannosidase II is a well known class II enzyme involved in N-glycan processing. This enzyme is specific to $GlcNAcMan_3GlcNAc_2$, cleaving the terminal α -1,3 and α -1,6-linked mannose

residues from this substrate to produce $GlcNAcMan_3GlcNAc_2$ (Henrissat & Bairoch, 1993; Shah et al., 2008).

Lysosomal and cytosolic α -mannosidases (EC 3.2.1.24) belong also to class II mannosidases and are involved in the catabolism of the Asn-linked carbohydrates of glycoproteins. These enzymes display a broad substrate specificity by cleaving all three α -1,2; α -1,3 and α -1,6 mannosyl linkages in high mannose and hybrid type glycans (Howard et al., 1997). A deficiency of the first enzyme leads to the genetic lysosomal disease α -mannosidosis (Thomas et al., 2001; Heikinheimo et al., 2003).

Class II α -mannosidases belong to GHs family 38 (Henrissat & Bairoch, 1993) and are sensitive to the azafuranose analogues of mannose, swainsonine (Sw) and 1,4-dideoxyiminomannitol (DIM) (Cenci di Bello et al., 1989; Shah et al., 2008).

The mannosidases are enzymes of great importance because of their physiological role and wide application. α -mannosidases are key enzymes, widespread in nature and found in all eukaryotes from yeast to man (Liao et al., 1996; Tataru et al., 2003; Ahi et al., 2007; Tremblay et al., 2007). They are involved in the processing of newly formed N-glycans by modifying oligosaccharide structures linked to appropriate asparagine residues of proteins

* Corresponding author; e-mail: niamkes@yahoo.fr

and thus influence their properties and bioactivity (Varki, 1993; Moremen, 2000; Akama et al., 2006). In the pharmaceutical industry, α -mannosidases are currently used for treatment of mannosidosis, a congenital disorder of glycosides (CDG), by enzyme replacement therapy (Sun et al., 1999; Hirsch et al., 2003). Furthermore, it is suggested that α -mannosidases be used synergistically with N-acetyl- β -hexosaminidase in the medical treatment of fungal diseases (Giordani et al., 1991). In vitro, α -mannosidases are useful tools for enzymatic analysis of high mannose oligosaccharide structures (Maruyama et al., 1994; Misaki et al., 2003) and for oligosaccharide synthesis (Michalski et al., 1990; Athanasopoulos et al., 2004).

Although α -mannosidases (α -mannoside mannohydrolase EC 3.2.1.24) are widely distributed, and have been isolated from plants, fungi and animal tissues (Kornfeld & Kornfeld, 1985), the majority are identified as mesophilic enzymes. Thus, this first record of thermophilic α -mannosidase activity in an insect attracted our attention.

This paper describes the purification and characterization of α -mannosidase *Rp1tM* from *Rhynchophorus palmarum* larvae and explores its potential use in biotechnological oligomannosyl degradation.

MATERIAL AND METHODS

Enzymatic source and preparation of crude extract

Oil palm weevil (*Rhynchophorus palmarum* Linnaeus) larvae were collected locally in Côte d'Ivoire from their host trees (oil palm, *Elaeis guineensis* Jacquin). The digestive fluid was collected with a syringe, filtered through cotton wool and then centrifuged at $10,000 \times g$ for 30 min at 4°C. The supernatant constituted the crude extract.

Chemicals

Para-nitrophenyl- α -D-Mannopyranoside (*pNP*- α -Man) and the other synthetic aryl-glycoside substrates, Mannobioses (2-O- α -D-mannopyranosyl-D-mannopyranoside, 3-O- α -D-mannopyranosyl-D-mannopyranoside and 6-O- α -D-mannopyranosyl-D-mannopyranoside), swainsonine (Sw), 1,4-dideoxy-1,4-iminomannitol (DIM) and 1-deoxymannojirimycin (DMNJ) were purchased from Sigma-Aldrich. D (+) Mannose was purchased from Panreac Quimica, Kifunensine (*Kitasatosporia kifunense*) (Kif) from Calbiochem, Sephacryl S-100 HR, Sephacryl S-200 HR and DEAE-Sephacryl Fast Flow from Pharmacia-LKB Biotech, Bovine Serum Albumin (BSA) from Fluka Biochemika, and Silicate gel 60 F₂₅₄ for thin-layer chromatography (TLC) from Merck. Protein Standards used for molecular mass determination on polyacrylamide gel electrophoresis were provided by Bio-Rad. All other chemicals and reagents were of analytical grade.

Purification procedure

All steps in the purification procedure were performed at 4°C. The crude extract was submitted to ammonium sulphate precipitation at 80% saturation. After centrifugation at $10,000 g$ for 30 min, the precipitate was dissolved in 1 ml of 20 mM acetate buffer (pH 4.5) and the resulting solution loaded onto a Sephacryl S-100 HR column (capacity, 1.5 cm \times 67 cm; flow rate, 0.2 ml/min; fractions, 1 ml) previously equilibrated with the same buffer. The active fractions were pooled and adsorbed on a DEAE-Sephacryl Fast Flow column (2.5 cm \times 4.5 cm)

equilibrated with 20 mM acetate buffer (pH 4.5). After washing the column (flow rate, 3 ml/min; fractions, 1 ml) with the same buffer, a 40 ml increasing discontinuous gradient (0; 0.1; 0.15; 0.4 and 1.0 M) of NaCl dissolved in 20 mM acetate buffer (pH 4.5) was applied to the column. Finally, the active fractions were pooled, dialyzed against 20 mM acetate buffer (pH 4.5) and stored at 4°C.

Enzyme assay

The α -mannosidase assay was performed by incubating 100 μ l of *pNP*- α -Man (2.5 mM) in 100 mM sodium acetate buffer (pH 4.5) with 50 μ l of the enzyme solution at 37°C for 20 min. Reactions were stopped by adding 2 ml of sodium carbonate 2% (w/v). The released *para*-nitrophenol (*pNP*) was quantified at 410 nm. One unit of activity (UI) was defined as the amount of enzyme that hydrolyzes 1 μ mol of substrate per min under the assay conditions.

Estimation of protein concentration

Protein concentration was measured using the Folin ciocalteus method (Lowry et al., 1951). BSA was used as the standard protein.

Determination of molecular mass

The molecular mass of the α -mannosidase was determined by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel (7.5%, w/v) electrophoresis (SDS-PAGE) under denaturing conditions (Laemmli, 1970). Just before running, samples (5 μ g) were incubated for 5 min at 100°C in SDS-PAGE sample buffer containing β -mercaptoethanol. Proteins were located on the gel using silver staining (Blum et al., 1987). Electrophoresis of the native enzyme was performed using essentially the same method, but without SDS and β -mercaptoethanol. The molecular mass of the native α -mannosidase was estimated by gel filtration on a Sephacryl S-200 HR column (capacity, 0.8 cm \times 35 cm; flow rate, 0.2 ml/min; fractions, 0.5 ml) equilibrated with 20 mM acetate buffer (pH 4.5). The standard proteins (SIGMA) used for calibration were β -amylase from sweet potato (206 kDa), BSA (66 kDa), ovalbumin from egg white (45 kDa) and cellulase from *Aspergillus niger* (26 kDa). Blue dextran (1000 kDa) and potassium ferricyanide (0.33 kDa) were used to determine the void and the total volume, respectively.

pH and temperature optima

In these experiments, the pH values were determined at 25°C. For determination of the optimum pH, the α -mannosidase activity was measured by performing the assays at 37°C and various pH values in the following 100 mM buffer systems: sodium acetate buffer from pH 3.6 to 5.5; sodium phosphate buffer from pH 5.6 to 7.5 and sodium citrate buffer from pH 3.0 to 6.0. For determining the optimum temperature, the incubations were performed at temperatures ranging from 30 to 80°C.

pH and temperature stabilities

For the pH stability study, the enzyme solution was pre-incubated for 2 h at room temperature at various pH values between 3.0 to 7.5 (buffer systems above). After adjusting the mixture to pH 4.5, the residual activity was measured under the assay conditions. The thermal denaturation of the α -mannosidase *Rp1tM* was investigated by preheating aliquots for 25 min at temperatures between 30 and 80°C. For the thermal inactivation, experiments were performed at 37 and 65°C by pre-warming the enzyme solution for from 0 to 150 min in 100 mM acetate buffer (pH 4.5). Aliquots were removed at different times and the residual activity measured at 37°C.

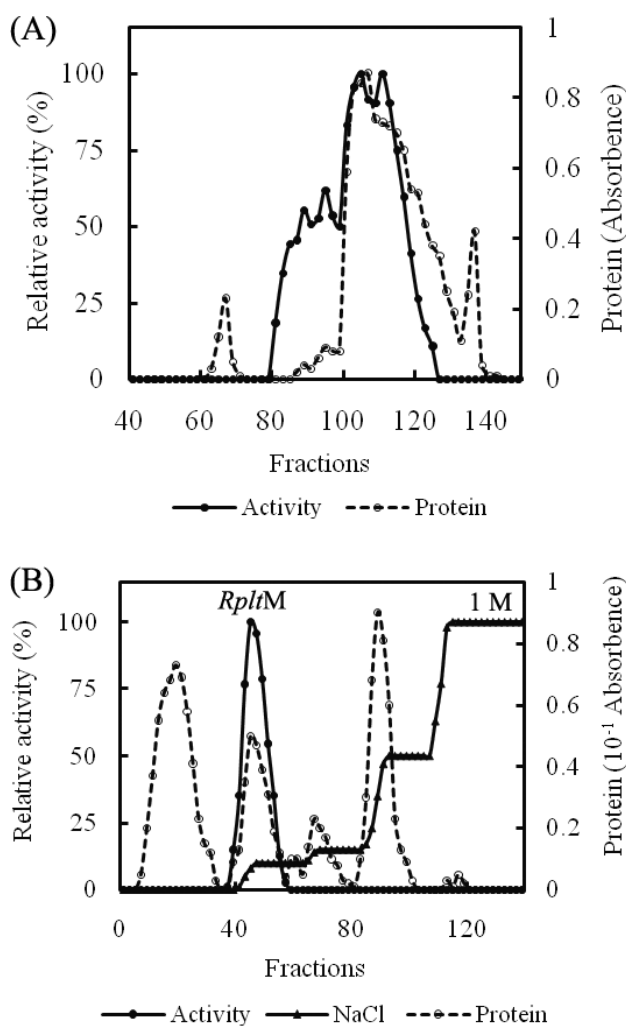


Fig. 1. Chromatographic profiles of α -mannosidase *Rpl1M* from the digestive fluid of oil palm weevil (*Rhynchophorus palmarum*) larvae. The enzyme activity was measured in 100 mM sodium acetate buffer pH 4.5 at 37°C using *pNP*- α -Man as the substrate. (A) Gel filtration chromatography on a Sephacryl S-100 HR column. (B) Anion-exchange chromatography on a DEAE-Sephacryl S-100 HR column. For further details, see "Material and methods".

Effect of chemical agents

Metal ions, detergents, reducing agents and specific inhibitors were mixed with the enzyme for 30 min at room temperature. Then, the α -mannosidase activity was measured. The residual activity was expressed as a percentage of the control without the chemical agent.

Substrate specificity and kinetic parameters determinations

The study of substrate specificity was performed with a variety of synthetic substrates (*para*-nitrophenyl-glycosides, 2.5 mM) incubated at 37°C for 20 min, in 100 mM sodium acetate buffer (pH 4.5). The reactions were stopped and quantified under standard assay conditions. The kinetic parameters (K_m and V_{max}) were determined from a Lineweaver-Burk plot using different concentrations (0 to 6 mM) of the substrate *pNP*- α -Man.

Analysis of the degradation products

The eventual hydrolysis of mannobiose substrates (1 mM) by α -mannosidase *Rpl1M* was tested with 0.45 μ g of enzyme mixed in 100 mM sodium acetate buffer (pH 4.5) at 37°C for up to 24 h. Aliquots (5 μ l) were removed at intervals and spotted onto a TLC plate to monitor the hydrolysis of different linked disaccharides. The plate was run with butanol-acetic acid-water (9:3.75:2.25, v/v/v) and developed with naphto-resorcinol in ethanol and H₂SO₄ 20% (v/v). The sugars spots were visualized keeping the plate at 110°C for 5 min.

RESULTS

Enzyme purification

Purification results for the α -mannosidase *Rpl1M* from the digestive fluid of oil palm weevil (*Rhynchophorus palmarum*) larvae are summarized in Table 1. The protocol involved two chromatographic steps (Fig. 1).

After precipitation in 80% ammonium sulphate, the α -mannosidase activity resolved on a Sephacryl S-100 HR column (pooled fractions: 98 to 117; i.e. 20 ml) (Fig. 1A) was ultimately purified by subjecting it to anion-exchange chromatography on a DEAE-Sephacryl S-100 HR column. The α -mannosidase was eluted (sharp peak) with 0.1 M of NaCl (Fig. 1B) and seven ml fractions were pooled (fractions: 43 to 49). The enzyme was purified with an overall yield of 3.8% and enriched about 3.5-fold (Table 1). A single protein band was revealed by silver staining on native-PAGE (Fig. 2A).

Molecular properties

After SDS-PAGE analysis under reducing conditions, the α -mannosidase *Rpl1M* showed two protein bands estimated to be 66 and 42 kDa, respectively (Fig. 2B). The relative molecular mass of the native enzyme, as determined by gel filtration, was approximately 112 kDa.

pH and temperature dependences

The optimum values of pH and temperature for studying α -mannosidase activity are presented in Table 2. The enzyme activity was maximal at 65°C and a pH of 4.5. The best stability was observed in sodium acetate and

TABLE 1. Procedure for purifying the α -mannosidase *Rpl1M* from the digestive fluid of the larvae of the oil palm weevil (*Rhynchophorus palmarum*).

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (UI) ^a	Specific activity (UI/mg)	Yield (%)	Purification fold
Crude extract	86.03	42.24	0.48	100	1
Ammonium sulphate (80%)	72.35	36.64	0.51	88.80	1.06
Sephacryl S-100 HR	17.89	26.43	1.48	64.00	3.08
DEAE-Sephacryl S-100 HR	0.92	1.57	1.71	3.80	3.56

^aOne unit (UI) of *Rpl1M* is the amount needed to catalyze the hydrolysis of 1 μ mol of *pNP* per minute.

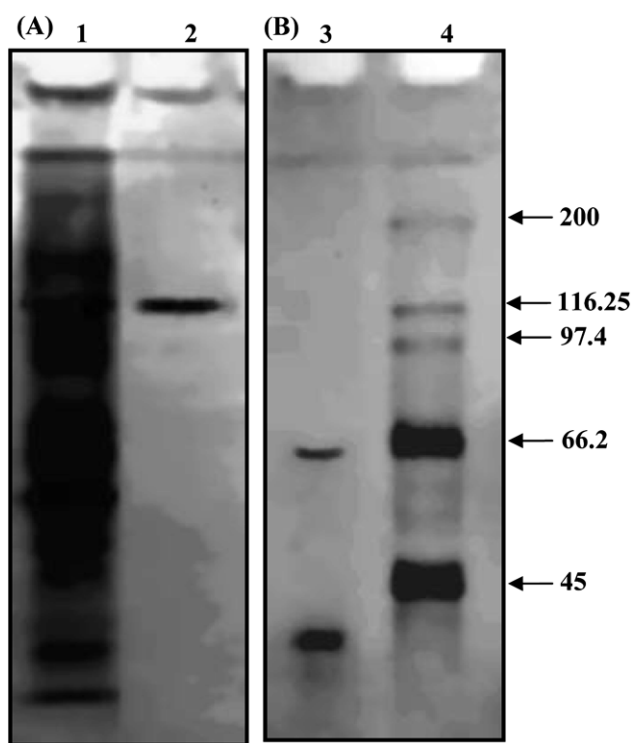


Fig. 2. PAGE analysis of α -mannosidase *RpltM* from the digestive fluid of oil palm weevil (*Rhynchophorus palmaris*) larvae. (A) Purified enzyme PAGE. (B) Purified enzyme SDS-PAGE. Samples were loaded onto 7.5% gels. Lane 1, crude extract; Lanes 2 and 3, *RpltM*; Lane 4, standard protein molecular weight markers (values in kDa are indicated on the right).

sodium citrate buffers (data not shown) at a pH range of 4.2 to 5.0

The thermal denaturation shows that *RpltM* was fairly stable at temperatures up to 65°C. At higher temperatures, thermostability decreased rapidly. However, the enzyme was not completely inactivated at 80°C (Fig. 3A).

The thermal inactivation study indicated that at 37 and 65°C, in acetate buffer (pH 4.5), the α -mannosidase remained fully stable for 150 and 25 min, respectively (Fig. 3B). At 37°C, the enzyme retained total activity for more than 6 h (data not shown). However, after 1 h at 65°C, the enzyme retained 73% of its activity. After longer periods of preheating, *RpltM* was less stable with a half-life of around 2 h. Nevertheless, it retained almost 40% of its activity after 150 min (Fig. 3B).

The temperature coefficient (Q_{10}), calculated between 50 and 60°C, was found to be 1.8. From a Arrhenius plot, a value of 46.5 kJ/mol/K was obtained for the activation energy (Table 2).

Effect of metal ions, chelating and reducing agents and detergents

The effect of some chemicals on the α -mannosidase *RpltM* from the digestive fluid of *R. palmarum* larvae was examined. Most of the chemicals tested did not affect the activity of the enzyme. However, Zn^{2+} (5 mM), DTT (1%, w/v) and β -mercaptoethanol (1%, v/v) had a slight stimulatory effect, enhancing the activity by about 119%,

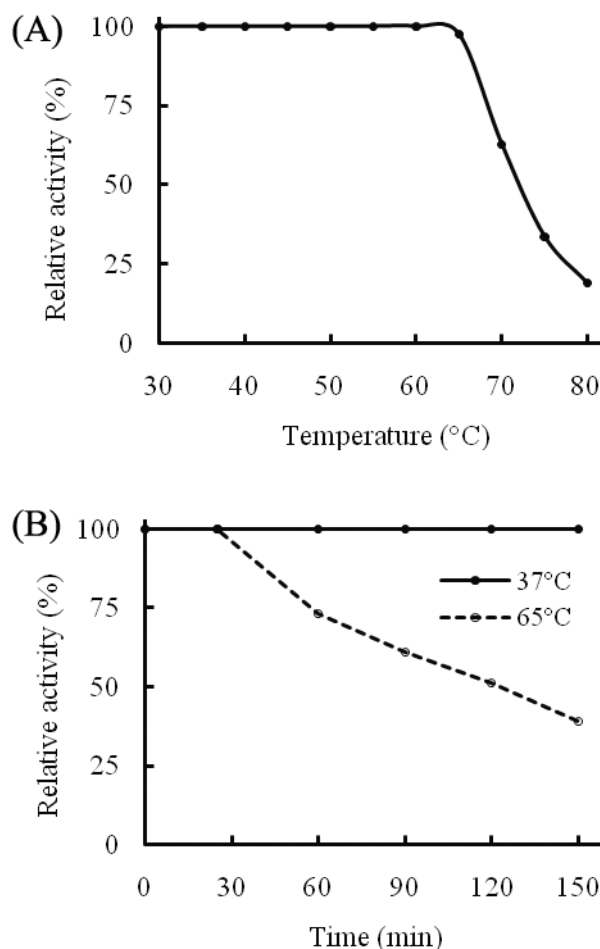


Fig. 3. Thermal stability of α -mannosidase *RpltM* from the digestive fluid of oil palm weevil (*Rhynchophorus palmaris*) larvae. (A) Thermal denaturation, the enzyme was maintained for 25 min at the indicated temperatures in 100 mM sodium acetate buffer (pH 4.5). The residual activity was then measured at 37°C under standard assay conditions. (B) Thermal inactivation, *RpltM* was pre-incubated at 37 and 65°C. At the time intervals indicated, aliquots were withdrawn and the residual activity measured at 37°C under standard assay conditions. The residual activity is expressed as percentage activity of zero-time control of untreated enzyme.

109% and 110%, respectively. In contrast, Cu^{2+} , SDS and *pCMB* acted as inhibitors (Table 2). Cu^{2+} (1 mM) and SDS (1%, w/v) completely inhibited *RpltM* activity while *pCMB* resulted in 20% inhibition at a concentration of 1% (w/v).

Substrate specificity and kinetic properties

A variety of *pNP*-glycosides (*pNP*- α -D-Mannopyranoside, *pNP*- α -D-Glucopyranoside, *pNP*- α -L-Fucopyranoside, *pNP*- α -D-Galactopyranoside, *pNP*- α -L-Arabinopyranoside, *pNP*- β -D-Fucopyranoside, *pNP*- β -D-Glucopyranoside, *pNP*- β -D-Galactopyranoside, *pNP*- β -D-Xylopyranoside) were tested for their suitability as substrates. The α -mannosidase *RpltM* had high specificity for *pNP*- α -Man but no activity was recorded when provided with the other *pNP*-glycosides as substrates. With this substrate, the activity of the enzyme was as predicted

TABLE 2. Physicochemical properties of α -mannosidase *RpltM* from the digestive fluid of oil palm weevil (*Rhynchophorus palmarum*) larvae. DTT, SDS and *p*CMB are the abbreviations for dithiothreitol, sodium dodecyl sulphate and para-chloro-mercuribenzoic acid, respectively.

Physicochemical properties	α -mannosidase <i>RpltM</i>
Optimum temperature (°C)	65
Q ₁₀	1.8
Activation energy (kJ/mol/K)	46.5
Optimum pH	4.5
pH stability	4.2–5.0
Molecular mass/SDS-PAGE	108
Molecular mass/Gel filtration	112
K _m (mM)	0.36
V _{max} (UI/mg)	1.29
Activator agents	Zn ²⁺ , DTT, β -mercaptoethanol
Inhibitor agents	Cu ²⁺ , SDS, <i>p</i> CMB
Broad linkage specificity	α -1,2; α -1,3 and α -1,6 Mannobiose

by the Michaelis-Menten equation. The K_m and V_{max} values obtained using a Lineweaver-Burk plot in the range of concentrations of 0–6.0 mM, were 0.36 mM and 1.29 UI/mg of protein, respectively (Table 2).

On the other hand, the linkage specificity was investigated using different linked mannobioses (2-O- α -D-mannopyranosyl-D-mannopyranoside, 3-O- α -D-mannopyranosyl-D-mannopyranoside and 6-O- α -D-mannopyranosyl-D-mannopyranoside). The enzyme showed broad specificity under acidic condition, cleaving the α -1,2; α -1,3 and α -1,6 Mannobioses at different rates (Fig. 4). However, its hydrolytic activity on α -1,2 Mannobiose was greater than on α -1,3 or α -1,6 Mannobiose after 24 h.

Effect of α -mannosidase specific inhibitors

The specific inhibitory effects of the azafuranose (Sw and DIM) and azapyranose (Kif and DMNJ) analogues of mannose were assayed. *RpltM* activity was strongly inhibited by Sw and DIM at a concentration of 10 μ M, but both Kif and DMNJ had no inhibitory effect at the same concentration (Table 3).

TABLE 3. The effect of specific inhibitors on the activity of the α -mannosidase *RpltM* from the digestive fluid of oil palm weevil (*Rhynchophorus palmarum*) larvae. The relative activity is expressed as a percentage of the control without the specific inhibitor.

Final concentration (μ M)	Relative activity (% of control)			
	Sw	DIM	Kif	DMNJ
0 (control)	100	100	100	100
0.005	87	94	100	100
0.05	29	86	100	98
10	8	37	100	94
20	3	25	91	93

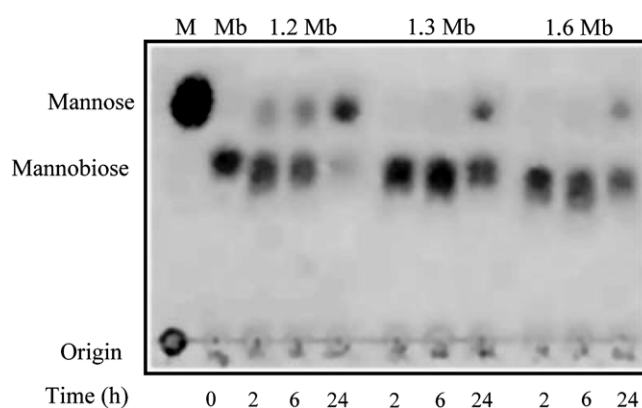


Fig. 4. TLC patterns and product distributions obtained using α -mannosidase *RpltM* from the digestive fluid of oil palm weevil (*Rhynchophorus palmarum*) larvae to catalyze different linked mannobioses. These experiments were carried out at 37°C for 24 h using an acetate buffer (100 mM; pH 4.5). At the indicated times, aliquots were removed and spotted onto the plate. Hydrolyzed products were separated using butanol-acetic acid-water 9 : 3.75 : 2.25 (v/v/v) and developed using naphto-resorcinol in ethanol and H₂SO₄ 20% (v/v). The sugar spots were visualized at 110°C for 5 min. 1,2 Mb, α -D-Manp(1,2)-D-Manp; 1,3 Mb, α -D-Manp(1,3)-D-Manp; 1,6 Mb, α -D-Manp(1,6)-D-Manp; M, mannose; Mb, mannobiose.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

In order to understand their physiological functions there has been a tendency to study mainly the hydrolytic activities and other properties of the digestive enzymes of insects (Ferreira et al., 1988; Terra & Ferreira, 1994). However, no studies have been made of the α -mannosidases of the oil palm weevil (*Rhynchophorus palmarum*). In this report, we describe a novel α -mannosidase from the digestive fluid of oil palm weevil larvae, which has unusual properties. The enzyme was easily purified using the standard techniques of ammonium sulphate saturation, gel filtration and anion-exchange chromatography. Using gel filtration chromatography over a Sephacryl S-100 column enabled us to separate the α -mannosidase from other proteins, and anion-exchange chromatography on a DEAE-Sepharose Fast Flow column to remove all residual impurities. These three standard techniques were previously used to purify two α -mannosidases from *Artocarpus communis* seeds (Ahi et al., 2007).

The purified enzyme has a dimeric structure with a relative molecular mass (M_r) similar to those of class II α -mannosidases, which have been assigned to the category of larger-M_r rather than lower-M_r (Moremen, 2000).

The α -mannosidase *RpltM* is not strictly specific since it released mannose from α -1,2; α -1,3 and α -1,6 mannobioses. So, this enzyme is expected to be of limited interest for use in selective removal and synthesis. However, this broad spectrum α -mannosidase would allow larvae of the palm weevil to digest oligomannosyl oligosaccharides and mannose-rich glycoproteins.

The enzyme is highly active at pH 4.5–5.0, but is more stable at a pH range of 4.2–5.0. At pH 4.5 this enzyme

remains active and stable long enough to hydrolyze high mannose substrates. That an acidic optimum pH value is also reported for other α -mannosidases from insect larvae e.g. *Rhagium inquisitor* and *Rhynchosciara americana* (Chipoulet & Chararas, 1985; Terra & Ferreira, 1994), which are unlike the α -mannosidases from *Drosophila melanogaster* (Rabouille et al., 1999) and *Spodoptera frugiperda* (Jarvis et al., 1997) that require a near neutral pH.

RpltM was thermophilic being optimally active at 65°C. Running biotechnological processes at a high temperature has many advantages. High temperature has a significant effect on bioavailability and solubility, and is accompanied by a decrease in viscosity and an increase in the diffusion coefficient of organic compounds. Consequently, higher reaction rates due to smaller boundary layers are expected (Becker et al., 1997; Niehaus et al., 1999). To the best of our knowledge, except for a few microorganisms that produce such thermophilic enzymes (Angelov et al., 2006), microbial, animal and vegetable kingdom α -mannosidases are mostly mesophilic (Nankai et al., 2002; Misaki et al., 2003; Ahi et al., 2007). In addition, *RpltM* remains fully active at 37 and 65°C for a long time (more than 6 h and 25 min, respectively) and the half-life at 65°C was approximately 2 h when the pH is optimum. The stability of the α -mannosidase *RpltM* (pH stability and thermostability) means it is suitable for use as an industrial biocatalyst (Ng & Kenealy, 1986; Zamost et al., 1991).

The broad specificity and sensitivity to Sw and DIM largely matches the characteristics of lysosomal α -mannosidases and bears out the link with class II α -mannosidases (Shah et al., 2008). Due to the sensitivity of *RpltM* to swainsonine, an anti-cancer agent, the structure of this α -mannosidase could serve as a new model for cancer therapy development (Van den Elsen et al., 2001). The metal ion Zn^{2+} enhanced the activity of *RpltM* to about 119%. Thus, this metal ion appears to be essential for this enzyme's activity. This metal ion is present at the active site of *Drosophila melanogaster* class II Golgi α -mannosidase (Van den Elsen et al., 2001) and other lysosomal α -mannosidases (Daniel et al., 1994).

In contrast, the other chemicals tested mostly had no effect, whereas Cu^{2+} , SDS and *p*CMB completely inhibited the enzyme's activity. So, these agents should not be used in this enzyme mixture. The Cu^{2+} sensitivity of insect cell class II α -mannosidases has previously been reported (Altmann & März, 1995) as has the inhibition of other hydrolases (Faulet et al., 2006).

Finally, the present study shows that the extracellular α -mannosidase *RpltM* from the digestive fluid of oil palm weevil (*Rhynchophorus palmarum*) larvae behaved like lysosomal and class II α -mannosidases. This enzyme is thermoacidophilic, thermostable and has a broad specific spectrum. Hence, *RpltM* although important for digestion of food by larvae of the oil palm weevil nutrition is likely to have only qualified use in biotechnology.

ACKNOWLEDGEMENTS. This work was supported by a Ph.D. grant to the first author. The authors are grateful to Prof. J.-P. Sine (Université de Nantes, France) for his assistance.

REFERENCES

- AHI A.P., GONNETY T.J., FAULET B.M., KOUAMÉ L.P. & NIAMKÉ S.L. 2007: Biochemical characterization of two α -mannosidases from breadfruit (*Artocarpus communis*) seeds. *Afr. J. Biochem. Res.* **1**: 106–116.
- AKAMA T.O., NAKAGAWA H., WONG N.K., SUTTON-SMITH M., DELL A., NAKAYAMA J., NISHIMURA S., PAI A., MOREMEN K.W., MARTH J.D. & FUKUDA M.N. 2006: Essential and mutually compensatory roles of α -mannosidase II and α -mannosidase IIx in *N*-glycan processing in vivo in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**: 8983–8988.
- ALTMANN F. & MÄRZ L. 1995: Processing of asparagine-linked oligosaccharides in insect cells: evidence for α -mannosidase II. *Glycoconj. J.* **12**: 150–155.
- ANGELOV A., PUTYRSKI M. & LIEBL W. 2006: Molecular and biochemical characterization of α -glucosidase and α -mannosidase and their clustered genes from the thermoacidophilic archaeon, *Picrophilus torridus*. *J. Bacteriol.* **188**: 7123–7131.
- ATHANASOPOULOS V.I., NIRANJAN K. & RASTALL R.A. 2004: Regioselective synthesis of mannobiose and mannotriose by reverse hydrolysis using a novel 1,6- α -mannosidase from *Aspergillus phoenicis*. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **27**: 215–219.
- BECKER B., RAMAKRISHNAN S., MENOVSKY A.A., NIEUWENHUIS G.J. & MYDOSH J.A. 1997: Unusual ordering behaviour single-crystal $U_2Rh_3Si_5$. *Phys. Rev. Lett.* **78**: 1347–1350.
- BLUM H., BEIER H. & GROSS B. 1987: Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**: 93–99.
- CENCI DI BELLO I., FLEET G., NAMGOONG S.K., TANDANO K.I. & WINCHESTER B. 1989: Structure-activity relationship of swainsonine. Inhibition of human α -mannosidases by swainsonine analogs. *Biochem. J.* **159**: 855–861.
- CHIPOULET J.M. & CHARARAS C. 1985: Survey and electrophoretic separation of the glycosidases of *Rhagium inquisitor* (Coleoptera: Cerambycidae) larvae. *Comp. Biochem. Physiol. (B)* **80**: 241–246.
- DANIEL P.F., WINCHESTER B. & WARREN C.D. 1994: Mammalian alpha-mannosidases: multiple forms but a common purpose? *Glycobiology* **4**: 551–566.
- FAULET M.B., NIAMKÉ S., GONNETY T.J. & KOUAMÉ L.P. 2006: Purification and biochemical characteristics of a new strictly specific endoxylanase from termite *Macrotermes subhyalinus* workers (Macrotermitinae – Termitidae). *Bull. Insectol.* **59**: 17–26.
- FERREIRA C., RIBEIRO A.F., GARCIA E.S. & TERRA W.R. 1988: Digestive enzymes trapped between and associated with the double plasma membranes of *Rhodnius prolixus* posterior midgut cells. *Insect Biochem.* **18**: 521–530.
- GIORDANI R., SEIPAI M., MOULIN T.J. & REGLI P. 1991: Antifungal action of *Carica papaya* latex: isolation of fungal cell wall hydrolysing enzymes. *Mycoses* **34**: 469–477.
- HEIKINHEIMO P., HELLAND R., LEIROS H.K., LEIROS I., KARLSEN S., EVJEN G., RAVELLI R., SCHOEHN G., RUIGROK R., TOLLERSRUD O.K., MCSWEENEY S. & HOUGH E. 2003: The structure of bovine lysosomal α -mannosidase suggests a novel mechanism for low-pH activation. *J. Mol. Biol.* **327**: 631–644.
- HENRISSAT B. & BAIROCH A. 1993: New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* **293**: 781–788.

- HENRISSAT B. & BAIROCH A. 1996: Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* **316**: 695–696.
- HIRSCH C., BLOM D. & PLOEGH H.L. 2003: A role for N-glycanase in the cytosolic turnover of glycoproteins. *EMBO J.* **22**: 1036–1046.
- HOWARD S., BRAUN C., MCCARTER J., MOREMEN K.W., LIAO Y.Y. & WITHERS S.G. 1997: Human lysosomal and Jack bean α -mannosidases are retaining glycosidases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **238**: 896–898.
- JARVIS D.L., BOHLMAYER D.A., LIAO Y.F., LOMAX K.K., MERKEL R.K., WEINKAUF C. & MOREMEN K.W. 1997: Isolation and characterization of a class II alpha-mannosidase cDNA from lepidopteran insect cells. *Glycobiology* **7**: 113–127.
- KORNFELD R. & KORNFELD S. 1985: Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* **54**: 631–664.
- LAEMMLI U.K. 1970: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 658–685.
- LIAO Y.F., LAL A. & MOREMEN K.W. 1996: Cloning, expression, purification and characterization of the human broad specificity lysosomal acid α -mannosidase. *J. Biol. Chem.* **271**: 28348–28358.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARRA L. & RANDALL R.J. 1951: Protein measurement with Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265–275.
- MARUYAMA Y., NAKAJIMA T. & ICHISHIMA E. 1994: A 1,2-alpha-D-mannosidase from a *Bacillus* sp.: purification, characterization and mode of action. *Carbohydr. Res.* **251**: 89–98.
- MICHALSKI J.C., HAEUW J.F., WIERUSZESKI J.M., MONTREUIL J. & STRECKER G. 1990: In vitro hydrolysis of oligomannosyl oligosaccharides by the lysosomal alpha-D-mannosidases. *Eur. J. Biochem.* **189**: 369–379.
- MISAKI R., FUJIYAMA K., YOKOYAMA H., IDO Y., MIYAUCHI K., YOSHIDA T. & SEKI T. 2003: Characterization of almond α -mannosidase and its application for structure analysis of sugar chain. *J. Biosci. Bioeng.* **96**: 187–192.
- MOREMEN K.W. 2000: α -Mannosidases in asparagine-linked oligosaccharide processing and catabolism. In Ernst B., Hart G. & Sinay P. (eds): *Oligosaccharides in Chemistry and Biology: A Comprehensive Handbook*. Wiley & Sons, New York, pp. 81–117.
- MOREMEN K.W., TRIMBLE R.B. & HERSCOVICS A. 1994: Glycosidases of the asparagine-linked oligosaccharide processing pathway. *Glycobiology* **4**: 113–125.
- NANKAI H., HASHIMOTO W. & MURATA K. 2002: Molecular identification of family 38 α -mannosidase of *Bacillus* sp. strain GL1, responsible for complete depolymerisation of xanthan. *Appl. Environ. Microb.* **68**: 2731–2736.
- NG T.K. & KENEALY W.R. 1986: Industrial application of thermostable enzymes. In Brock T.D. (ed.): *Thermophiles General, Molecular and Applied Microbiology*. John Wiley, New York, pp. 197–205.
- NIEHAUS F., BERTOLDO C., KÄHLER M. & ANTRANIKIAN G. 1999: Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**: 711–729.
- RABOUILLE G., KUNTZ D.A., LOCKYER A.E., WATSON R., SIGNORELLI T., ROSE D.R., VAN DER HEUVEL M. & ROBERTS D.B. 1999: The *Drosophila* GMII gene encodes a Golgi α -mannosidase II. *J. Cell Sci.* **112**: 3319–3330.
- SHAH N., KUNTZ D.A. & ROSE D.R. 2008: Golgi alpha-mannosidase II cleaves two sugars sequentially in the same catalytic site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**: 9570–9575.
- SUN H., YANG H. & ASKINS M.E. 1999: Retrovirus vector mediated correction and cross correlation of lysosomal α -mannosidase deficiency in human and feline fibroblasts. *Hum. Gen. Ther.* **10**: 1311–1319.
- TATARA Y., LEE B.R., YOSHIDA T., TAKAHASHI K. & ICHISHIMA E. 2003: Identification of catalytic residues of Ca^{2+} independent 1,2- α -D-mannosidase from *Aspergillus saitoi* by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **278**: 25289–25294.
- TERRA W.R. & FERREIRA C. 1994: Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol. (B)* **109**: 1–62.
- THOMAS B., BARBARA K., PETER J.M., ØIVIND N., OLE K.T. & JOHN J.H. 2001: Purification and characterization of recombinant human lysosomal α -mannosidase. *Mol. Genet. Metab.* **73**: 18–29.
- TREMBLAY L.O., KOVACS E.N., DANIELS E., WONG N.K., SUTTON-SMITH M., MORRIS H.R., DELL A., MARCINKIEWICZ E., SEIDAH N.G., MCKERLIE C. & HERSCOVICS A. 2007: Respiratory distress and neonatal lethality in mice lacking Golgi α -1,2-mannosidase IB involved in N-glycan maturation. *J. Biol. Chem.* **282**: 2558–2566.
- VAN DEN ELSSEN J.M., KUNTZ D.A. & ROSE D.R. 2001: Structure of Golgi alpha-mannosidase II: a target for inhibition of growth and metastasis of cancer cells. *EMBO J.* **20**: 3008–3017.
- VARKI A. 1993: Biological roles of oligosaccharides: all the theories are correct. *Glycobiology* **3**: 97–130.
- ZAMOST L.B., NIELSEN K.H. & STARNES L.R. 1991: Thermostable enzymes for industrial applications. *J. Ind. Microbiol.* **8**: 71–82.

Received October 17, 2008; revised and accepted January 5, 2009

Biochemical properties of extracellular α -mannosidases from the digestive fluid of *Rhynchophorus palmarum* larvae

Ehuié M. BÉDIKOU¹, Amédée P. AHI², Fankroma M. KONÉ³, Jean T. GONNETY², Betty M. FAULET², Lucien P. KOUAMÉ², Sébastien L. NIAMKÉ^{1,2}

¹Laboratoire de Biotechnologies, Filière Biochimie-Microbiologie de l'Unité de Formation et de Recherche en Biosciences de l'Université de Cocody-Abidjan, Côte d'Ivoire

²Laboratoire de Biochimie et Technologie des Aliments de l'Unité de Formation et de Recherche en Sciences et Technologie des Aliments de l'Université d'Abobo-Adjamé, Côte d'Ivoire

³Unité de Biotechnologie, Biocatalyse et Biorégulation, CNRS-UMR 6204, Laboratoire de Biochimie, Faculté des Sciences et Techniques, Université de Nantes, France

Abstract

Three extracellular α -mannosidases (EC 3.2.1.24) were purified from the digestive fluid of oil palm weevil larvae, *Rhynchophorus palmarum* (L.) and characterized in order to explore their potential for biotechnological application. Three steps procedure including size exclusion, anion exchange and hydrophobic interaction chromatography were used. The enzymes named *RpIM1*, *RpIM2* and *RpIM3* had native molecular weights of approximately 125, 72 and 111 kDa, respectively and functioned as dimeric (*RpIM1*) and monomeric (*RpIM2* and *RpIM3*) structures. The three α -mannosidases displayed acidic and mesophilic activities by using *para*-nitrophenyl- α -D-Mannopyranoside as substrate. Apparent K_M values were found to be 0.13, 0.22 and 0.16 mM for *RpIM1*, *RpIM2* and *RpIM3*, respectively. Ba^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} and ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) had no effect on the three enzyme activities whereas detergents and reducing agents were inhibitors. *RpIM1*, *RpIM2* and *RpIM3* were more sensitive to swainsonine and cleaved α -1,2; α -1,3 and α -1,6 linked mannobioses. These characteristics prompted us to categorize them as catabolic α -mannosidases. Thus, they would help in the larval oil palm weevil nutrition allowing digestion by the removal of mannose residues in the beetle's diet. Also, these enzymes could find potential application in biological, biochemical and pharmaceutical area.

Key words: extracellular α -mannosidases, characterization, oil palm weevil, *Rhynchophorus palmarum*, Coleoptera, Curculionidae.

Introduction

The α -mannosidases play an essential role in the processing of N-glycans to complex and hybrid oligosaccharides. The α -mannosidases involved in N-glycans processing are categorized as class I and class II, with different substrate specificities, intracellular locations, sizes, cations requirements, amino acid sequences and sensitivities to plant alkaloid inhibitors (Moremen *et al.*, 1994; Herscovics, 1999; Moremen, 2000). According to the sensitivity of α -mannosidases to plant alkaloid inhibitors, the enzymes are categorized into two distinctive classes. The azapyranose analogues, such as kifunensine (Kif) and 1-deoxymannojirimycin (DMNJ), are potent inhibitors of class I α -mannosidases (Bischoff and Kornfeld, 1984; Elbein *et al.*, 1990). In contrast, those sensitive to swainsonine (Sw) and 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-mannitol (DIM) which are azafuranose analogues belong to class II α -mannosidases (Tulsiani *et al.*, 1982a; Cenci di Bello *et al.*, 1989). Based on the amino acid sequence alignments, class I and class II α -mannosidases belong to family 47 and family 38, respectively in Henrissat's glycosidases classification (Moremen *et al.*, 1994; Henrissat and Bairoch, 1996). On the other hand, microbial α -mannosidases have been widely studied (Keskar *et al.*, 1996) and fallen into two groups. In group A, the enzymes hydrolyse non-reducing terminal α -mannosidic linkages regardless of the aglycon moiety. It includes those enzymes which act

on *para*-nitrophenyl- α -D-Mannopyranoside (*pNP*- α -Man) and do not have strict linkage specificity. In group B, the enzymes hydrolyse specifically linked α -D-mannosidic bonds.

Apart from the vital role in glycoproteins synthesis and degradation, α -mannosidases are currently an important therapeutic target for the development of anti-cancer agents (Goss *et al.*, 1995, 1997). The major potential application of α -mannosidases involves the strategies for treating the lysosomal storage disorder α -mannosidosis by enzyme replacement therapy. Indeed, α -mannosidosis results from deficient activity of α -mannosidase. The disease is characterized by massive intracellular accumulation of mannose-rich oligosaccharide, that is oligosaccharides carrying α -1,2; α -1,3 and α -1,6 mannosyl residues at the non-reducing termini (Saint-Pol *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 1999; Hirsch *et al.*, 2003). In this respect, the broad specific α -mannosidases become useful for application requiring removal of all α -mannosyl linkages. It is suggested that α -mannosidase and N-acetyl- β -hexosaminidase (isolated from latex) be used synergistically in the medical treatment of fungal diseases in the most severe cases to boost the known β -hexosaminidase antifungal action (Giordani *et al.*, 1991).

α -mannosidases have been reported from various sources, *e.g.* plants (Woo *et al.*, 2004; Ahi *et al.*, 2007), fungi (Reyna *et al.*, 2000; Tatara *et al.*, 2003), yeast (Kelly and Herscovics, 1998), animals (Weng and

Spiro, 1993; Tremblay *et al.*, 2007) and human cells (Winchester *et al.*, 1993; Liao *et al.*, 1996). Concerning insects, high α -mannosidase activities have been well characterized in *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Jarvis *et al.*, 1997; Kawar *et al.*, 2001) and in *Drosophila melanogaster* Meigen cells (Foster *et al.*, 1995; Rabouille *et al.*, 1999). Elsewhere, this enzyme has also been detected in the leaf cutting ant [*Acromyrmex subterraneus* (Forel)] larvae (Erthal Jr. *et al.*, 2007). Although insect α -mannosidases have been subjected to previous studies, any work relative to extracellular α -mannosidases from *Rhynchophorus palmarum* (L.) (Coleoptera Curculionidae) larvae has received the same attention to date. The weevil larvae are widely found in southern Asia, America, Melanesia and Africa, where they feed on broad range of palms including coconut, sago, date and oil palm. In some areas within these regions, it has been recorded as a serious pest of introduced palms (Oehlschlager *et al.*, 2002).

In this study, different chromatographic and biochemical methods were employed to purify and characterize three swainsonine sensitive α -mannosidases from the digestive fluid of oil palm weevil larvae. The present paper will help on these enzymes categorization, their real importance in food digestion in order to explore their potential for biotechnological application.

Materials and methods

Insects

Oil palm weevil larvae were collected locally from their host trees (oil palm *Elaeis guineensis* Jacquin) in Côte d'Ivoire.

Chemicals

para-nitrophenyl- α -D-Mannopyranoside (*p*NP- α -Man) and the other synthetic aryl-glycoside substrates, Mannobioses containing disaccharides linked (2-O- α -D-mannopyranosyl-D-mannopyranoside, 3-O- α -D-mannopyranosyl-D-mannopyranoside and 6-O- α -D-mannopyranosyl-D-mannopyranoside), swainsonine (Sw), 1,4-dideoxy-1,4-iminomannitol (DIM) and 1-deoxymannojirimycin (DMNJ) were purchased from Sigma-Aldrich. D (+) Mannose was from Panreac Quimica. Kifunensine (*Kitasatosporia kifunense*) (Kif) was obtained from Calbiochem. Sephacryl S-100 HR, Sephacryl S-200 HR, DEAE-Sepharose Fast Flow and Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow gels were provided from Pharmacia Biotech. Bovine Serum Albumin (BSA) was obtained from Fluka Biochemika. Standard molecular weights proteins were provided from Bio Rad. Silicate gel 60 for thin-layer chromatography (TLC) was purchased from Merck. All the other reagents used were of analytical grade.

Enzymes extraction

Oil palm weevil larvae digestive fluid was collected with a syringe, filtered through cotton wool and then centrifuged at 10,000 g for 30 min. The supernatant was used as the crude extract and stored at 4 °C.

Enzymes purification

All the purification procedure was carried out in cold room. To the crude extract was added solid ammonium sulphate to 80% saturation. The mixture was stirred for at least eight hours and centrifuged at 10,000 g for 15 min. The pellet was suspended in 20 mM sodium acetate buffer pH 5.0 and loaded onto a Sephacryl S-100 HR column (1.5 cm \times 67 cm) equilibrated with the same buffer. Fractions of 1 ml were collected at a flow rate of 0.2 ml/min and, those containing the α -mannosidase activity were pooled.

The pooled fractions were applied to the following chromatography, a DEAE Sepharose Fast Flow column (2.5 cm \times 4.5 cm) equilibrated with 20 mM sodium acetate buffer pH 5.0. The column was washed at a flow rate of 3 ml/min with two bed volumes of equilibration buffer to remove unbound proteins. Bound proteins were then eluted with a stepwise salt gradient (0.1, 0.2, 0.25, 0.3 and 1 M) of NaCl in 20 mM sodium acetate buffer pH 5.0 and fractions of 1 ml were collected. Three peaks of α -mannosidase activity were obtained. To each pooled active fractions, solid ammonium sulphate was slowly added to give a final concentration of 1 M and the resulted enzyme solution was applied on a Phenyl Sepharose 6 Fast Flow column (1.5 cm \times 3.2 cm) previously equilibrated with 20 mM sodium acetate buffer pH 5.0 containing 1 M ammonium sulphate. The column was washed with a reverse stepwise gradient of ammonium sulphate concentration (from 1 to 0 M) in the same sodium acetate buffer at a flow rate of 1 ml/min and fractions of 1 ml were collected.

The active fractions of each isoform were pooled, dialyzed overnight at 4 °C against 20 mM sodium acetate buffer pH 5.0 and constituted the purified enzymes.

Enzymes assay

All enzyme reactions were performed at 37 °C for 20 min in appropriate 100 mM sodium acetate buffer pHs containing 0.8 mM of *p*NP- α -Man. After prewarming the mixture at 37 °C for 5 min, the reactions were initiated by adding enzyme solution. The final volume was 150 μ l and the reactions were stopped with 2 ml of sodium carbonate 2% (w/v). Enzymes activities towards 0.8 mM of *p*NP- α -Man were determined by measuring the released *para*-nitrophenol (*p*NP) at 410 nm using a spectrophotometer GENESIS 5. *p*NP was used as standard.

One unit of activity was defined as the amount of enzyme that hydrolyzes 1 μ mol of substrate per min under the assay conditions. The specific activity was expressed as unit of activity per mg of protein.

Proteins estimation

Protein concentrations and elution profiles from chromatographic columns were determined by the Folin method (Lowry *et al.*, 1951). Bovine serum albumin (BSA) was used as the standard protein.

Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

Electrophoresis was carried out by the method of Laemmli (1970) on 7.5% and 10% (w/v) acrylamide gels under denaturing and non-denaturing conditions,

respectively. In denaturing conditions, samples were incubated for 5 min at 100 °C with SDS-PAGE sample buffer containing 2-mercaptoethanol. Concerning non-denaturing conditions, samples were mixed just before running in sample buffer without 2-mercaptoethanol and SDS. Silver staining was used to localize protein bands (Blum *et al.*, 1987). The standard molecular weights (Bio-Rad) comprising myosin (200 kDa), β -galactosidase (116.25 kDa), phosphorylase b (97.4 kDa), BSA (66.2 kDa) and ovalbumin (45.0 kDa) were used.

Native molecular weights determination

The purified enzymes were applied to gel filtration on Sephacryl S-200 HR column (0.8 cm \times 35 cm) equilibrated with 20 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) to estimate the native molecular weights. Elution was done at a flow rate of 0.2 ml/min and fractions of 0.5 ml were collected. Standard molecular weights (SIGMA) used for calibration were β -amylase from sweet potato (206 kDa), BSA (66 kDa), ovalbumin from egg white (45 kDa) and cellulase from *Aspergillus niger* (26 kDa).

pH and temperature optima

The effect of pH on the enzyme activities was determined by performing the hydrolysis of *para*-nitrophenyl- α -D-Mannopyranoside in a series of buffers (100 mM) at various pH values ranging from 3.0 to 8.0. The buffers used were sodium acetate buffer from pH 3.6 to 5.5; sodium phosphate buffer from pH 5.6 to 8.0 and sodium citrate buffer from pH 3.0 to 6.0. The pH values of each buffer were determined at 25 °C.

The effect of temperature on α -mannosidase activities was performed in 100 mM acetate buffer (appropriate pHs) over a temperature range of 30 to 80 °C using *pNP*- α -Man (2.5 mM) under the enzyme assay conditions.

pH and temperature stabilities

The pH stability of each α -mannosidase was studied in pH range of 3.0 to 8.0 with 100 mM buffers. The buffers were the same as in pH and temperature optima study (above). After 2 h preincubation at room temperature, residual α -mannosidase activities were measured at 37 °C for 20 min by adding substrate *para*-nitrophenyl- α -D-Mannopyranoside.

The thermal inactivation was determined at 37 °C and at each enzyme optimum temperature. Enzymes in appropriate buffers (pHs) were exposed to each temperature for 0 to 180 min. Aliquots were withdrawn at intervals (30 min) and immediately cooled.

Concerning thermal denaturation tests, the aliquots of each enzyme were preheated at different temperatures ranging from 30 to 80 °C for 25 min.

Residual activities, determined in the three cases at 37 °C under the enzyme assay conditions, were expressed as percentage activity of zero-time control of untreated enzymes.

Effect of some chemical agents

To determine the effect of various compounds (metal ions, detergents, reducing agents and α -mannosidase

specific inhibitors) as possible activators or inhibitors of the purified α -mannosidases, each enzyme solution was preincubated at 37 °C for 30 min with the compounds and then the activity was assayed under the enzyme assay conditions. The residual activities were expressed as percentage refers to a control without chemical agents.

Substrate specificity and kinetic parameters determinations

The substrate specificity was determined by incubating each purified enzyme with substrates *para*-nitrophenyl- α -D-Mannopyranoside, *para*-nitrophenyl- α -D-Glucopyranoside, *para*-nitrophenyl- α -L-Fucopyranoside, *para*-nitrophenyl- α -D-Galactopyranoside, *para*-nitrophenyl- α -L-Arabinopyranoside, *para*-nitrophenyl- β -D-Fucopyranoside, *para*-nitrophenyl- β -D-Glucopyranoside, *para*-nitrophenyl- β -D-Galactopyranoside, *para*-nitrophenyl- β -D-Xylopyranoside (2.5 mM) at 37 °C for 20 min in 100 mM sodium acetate buffer with appropriate pHs.

The kinetic parameters (K_M , V_{max} and V_{max}/K_M) were determined at 37 °C in 100 mM sodium acetate buffer with appropriate pHs. The hydrolysis of synthetic aryl substrates was quantified on the basis of released *pNP*, as the standard enzymes assay. K_M and V_{max} were determined from a Lineweaver-Burk plot using seven concentrations varying between 0 and 6 mM of the substrate *pNP*- α -Man.

Characterization of hydrolytic specificity

The hydrolytic specificity was determined at 37 °C by incubating 0.45 μ g of each purified enzyme preparation with 1 mM of 2-O- α -D-mannopyranosyl-D-mannopyranoside, 3-O- α -D-mannopyranosyl-D-mannopyranoside or 6-O- α -D-mannopyranosyl-D-mannopyranoside, in 100 mM sodium acetate buffer (at appropriate pHs) for up to 24 h. Samples (5 μ l) were removed at regular time intervals and applied to TLC plates to monitor the hydrolysis of different linked disaccharides. The TLC plates were run with butanol-acetic acid-water (9:3.75:2.25, v/v/v) and developed with naphto-resorcinol in ethanol and H₂SO₄ 20% (v/v). The sugar spots were visualized at 110 °C for 5 min.

Results

Enzymes purification

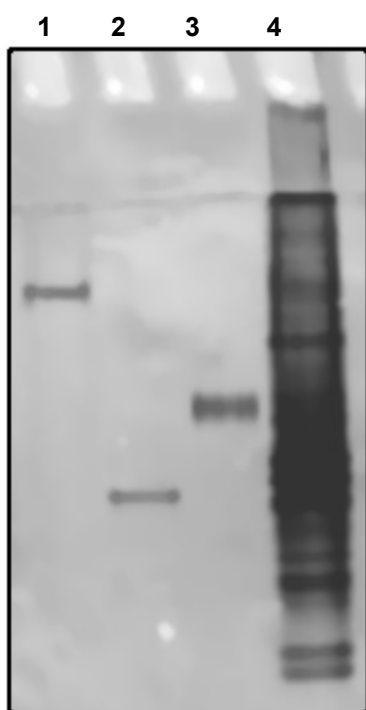
Purification results of digestive α -mannosidases from the oil palm weevil larvae are summarized in table 1. Three isoenzymes were purified from the crude extract and the purification procedure involved three chromatographic steps for each enzyme.

The peak of α -mannosidase activity resolved on gel filtration (Sephacryl S-100 HR) as first step was designated *RpIM*. Pooled fractions were collected and then applied onto DEAE-Sepharose Fast Flow, an anion exchange chromatography. Three peaks showing bounded α -mannosidase activities were eluted with 0.20, 0.25 and 0.30 M of NaCl, respectively. The three isoforms were termed *RpIM1*, *RpIM2* and *RpIM3* based on their elution order (data not shown).

Table 1. Purification procedure of α -mannosidases from the digestive fluid of *R. palmarum* larvae.

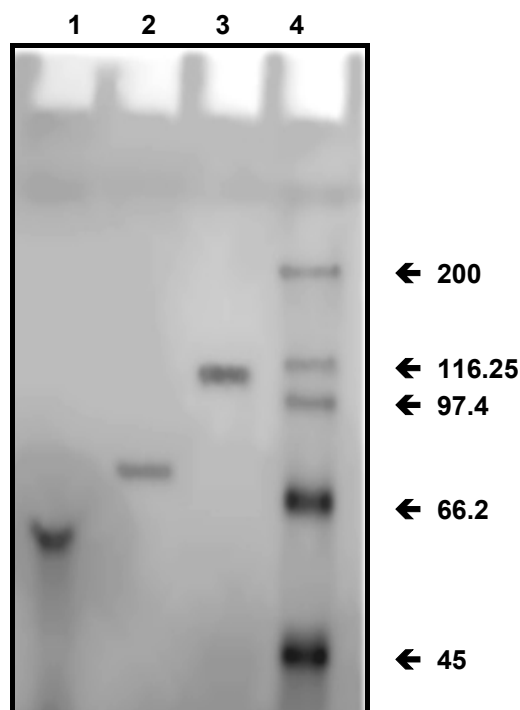
Purification steps	Total protein (mg)	Total activity (UI)	Specific activity (UI/mg)	Purification fold	Yield (%)
Crude extract	86.03	42.24	0.48	1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ (80%)	72.35	36.64	0.51	1.06	88.80
Sephacryl S-100 HR					
<i>RpIM</i>	17.89	26.43	1.48	3.08	64.00
DEAE-Sephacryl Fast Flow					
<i>RpIM1</i>	0.93	1.25	1.34	2.79	3.00
<i>RpIM2</i>	0.33	0.64	1.94	4.04	1.60
<i>RpIM3</i>	1.02	0.69	0.68	1.42	1.70
Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow					
<i>RpIM1</i>	0.03	0.33	12.22	25.46	0.80
<i>RpIM2</i>	0.04	0.41	11.39	23.73	1.00
<i>RpIM3</i>	0.04	0.13	3.17	6.61	0.30

UI = 1 μ mol of *p*NP per min.

**Figure 1.** Native-PAGE analysis of purified α -mannosidases from the digestive fluid of *R. palmarum* larvae. The samples were loaded onto a 10% gel. Lane 1, *RpIM1*; Lane 2, *RpIM2*; Lane 3, *RpIM3*; Lane 4, crude extract.

An ultimate hydrophobic interaction chromatography on a Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow column as third step was necessary to each isoform for purification. The purified enzymes named *RpIM1*, *RpIM2* and *RpIM3* were eluted with 0.61, 0.02 and 0.41 M of ammonium sulphate, and were enriched about 26, 24 and 7-fold, respectively (table 1).

Each isoenzyme showed a single protein band by silver staining on native polyacrylamide gel electrophoresis (figure 1).

**Figure 2.** SDS-PAGE analysis of purified α -mannosidases from the digestive fluid of *R. palmarum* larvae. The samples were loaded onto a 7.5% gel. Lane 1, *RpIM1*; Lane 2, *RpIM2*; Lane 3, *RpIM3*; Lane 4, Markers. Numbers on the right indicate the molecular weight (kDa) of the markers.

Molecular weights estimation

After SDS-PAGE analysis under reducing conditions, each α -mannosidase (*RpIM1*, *RpIM2* and *RpIM3*) showed a single protein band. Their relative molecular weights were estimated to be 62, 76 and 105 kDa, respectively (figure 2).

Molecular weights of the native enzymes, as determined by gel filtration, were approximately 125 kDa (*RpIM1*), 72 kDa (*RpIM2*) and 111 kDa (*RpIM3*) (table 2).

Table 2. Physicochemical properties of α -mannosidases from the digestive fluid of oil palm weevil larvae.

Physicochemical properties	<i>RpIM1</i>	<i>RpIM2</i>	<i>RpIM3</i>
Optimum temperature ($^{\circ}\text{C}$)	55	50	60
Optimum pH	5.0	5.0	4.5
pH stability	4.4 - 5.2	4.6 - 5.2	4.3 - 4.8
Q_{10}	1.8	1.7	1.8
Activation energy (kJ/mol)	47.0	42.9	50.4
Molecular weights (kDa)			
SDS-PAGE	62	76	105
Gel filtration	125	72	111

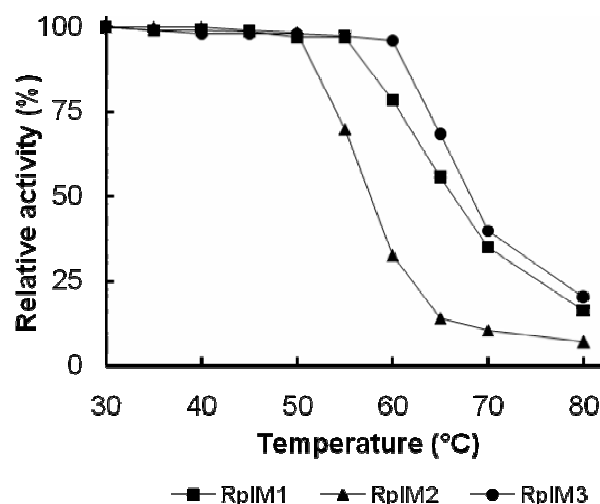


Figure 3. Thermal denaturation of α -mannosidases from the digestive fluid of *R. palmarum* larvae. The experiments were carried out at temperatures ranging from 30 to 80 $^{\circ}\text{C}$. The enzymes were preincubated at each temperature for 25 min and the remaining activity measured at 37 $^{\circ}\text{C}$ under the enzyme assay conditions.

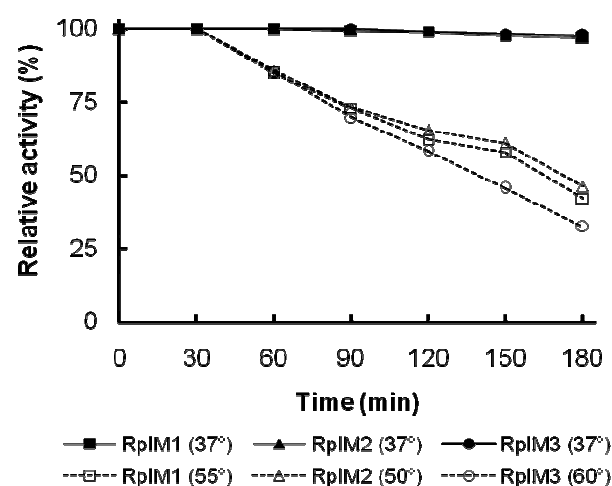


Figure 4. Thermal inactivation of α -mannosidases from the digestive fluid of *R. palmarum* larvae. Each enzyme was separately preincubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ and its optimum temperature, in 100 mM sodium acetate buffers (pH 4.5 or 5.0). At the indicated times, aliquots were withdrawn and the residual activity measured at 37 $^{\circ}\text{C}$ under the enzyme assay conditions.

Effect of pH and temperature

The effect of pH and temperature on the three α -mannosidase activities is shown in table 2. The three isoenzymes were found to be acidic and mesophilic. At 37 $^{\circ}\text{C}$, the purified enzymes showed best stability over pH values ranging from 4.3 to 5.2, conserving at least more than 90% of total activities. Their maxima activities were observed at 55, 50 and 60 $^{\circ}\text{C}$ for *RpIM1*, *RpIM2* and *RpIM3*, respectively. Values of temperature coefficients (Q_{10}) calculated were found to be around 1.8 for the three α -mannosidases. From Arrhenius plot, values of 47, 42.9 and 50.4 kJ/mol were calculated for the activation energy of *RpIM1*, *RpIM2* and *RpIM3*, respectively (table 2).

The thermal stability was investigated by incubating each enzyme at various temperatures for 25 min. The three α -mannosidases retained 100% of their activities to temperatures up to their optima. Above, their activities declined rapidly as the temperature increased. Nevertheless, the enzymes were not completely inactivated even at 80 $^{\circ}\text{C}$ (figure 3).

A long-term stability study indicated that at 37 $^{\circ}\text{C}$ and in appropriate optimum pHs, the three α -mannosidases remained stable for 180 min. However, at their optimum temperatures, each enzyme is stable for 30 min and retained about 75% of its activity after 80 min preincubation. Above this preheating time, α -mannosidases were less stable showing half-life (50% of activity) nearby 150 min for *RpIM3* and 180 min for *RpIM1* and *RpIM2* (figure 4).

Effect of some metal ions, chelating and reducing agents and detergents

The effect of some chemical agents on α -mannosidases from oil palm weevil larvae digestive fluid using *para*-nitrophenyl- α -D-Mannopyranoside as substrate was examined.

Most of chemicals tested (Ba^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , EDTA, dithiothreitol, polyoxyethylen-9-lauryl ether and polyoxyethylen-10-oleyl ether) were without effect on the enzymes activity. Nevertheless, Cu^{2+} , 5,5'-dithio-2,2'-dinitro-dibenzoic acid (DTNB), L-cysteine and SDS were found to be the common inhibitors (60-100% inhibition observed on the three α -mannosidase activities), while *para*-chloromercuribenzoic acid (*pCMB*), tetradecyl trimethyl ammonium bromide and hexadecyl trimethyl ammonium bromide displayed 70 to 80% of inhibition on *RpIM2* and *RpIM3*. Nonidet-P40, a non-ionic detergent, showed 34% of inhibition on *RpIM3* activity at the concentration of 1% (w/v). Only 2-mercaptoethanol displayed a particular stimulatory effect on *RpIM1* (137%) at the concentration of 0.1% (v/v).

Effect of α -mannosidase specific inhibitors

The influence of α -mannosidase specific inhibitors such as 1-deoxymannojirimycin (DMNJ), kifunensine (Kif), swainsonine (Sw) and 1,4-dideoxy-1,4-imino-mannitol (DIM) on the enzymes activities is presented in table 3.

Hydrolysis of *pNP*- α -Man by *RpIM1*, *RpIM2* and *RpIM3* was strongly inhibited by the azafuranose ana-

Table 3. Effect of specific inhibitors on the activity of the α -mannosidases from the digestive fluid of *R. palmarum* larvae.

Specific inhibitors	Concentration (μ M)	Relative activity (% of blank)		
		<i>Rp/M1</i>	<i>Rp/M2</i>	<i>Rp/M3</i>
Blank	0	100	100	100
Swainsonine	0.05	91	77	97
"	0.5	29	15	57
"	10	0	2	5
"	20	0	0	2
1,4-dideoxy-1,4-iminomannitol	0.05	100	99	100
"	0.5	91	71	93
"	10	39	15	43
"	20	23	10	10
Kifunensine	0.05	100	99	100
"	0.5	97	99	100
"	10	92	99	100
"	20	88	86	96
1-deoxymannojirimycin	0.05	100	98	100
"	0.5	100	98	100
"	10	100	95	100
"	20	80	93	100

Table 4. Kinetic parameters of α -mannosidases from the digestive fluid of *R. palmarum* larvae towards *pNP- α -Man*. The Michaelis-Menten constant (K_M) and the maximum velocity (V_{max}) are expressed as mM and units/mg of protein, respectively.

α -mannosidases	K_M (mM)	V_{max} (μ mol/min/mg)	V_{max}/K_M (ml/min/mg)
<i>Rp/M1</i>	0.13	0.73	5.62
<i>Rp/M2</i>	0.22	2.46	11.18
<i>Rp/M3</i>	0.16	1.32	8.25

logues of mannose such as Sw and DIM when used in the reaction mixture at 20 μ M. These inhibitions vary from 77 to 100%. In contrast, the azapyranose analogues as Kif and DMNJ had not such effect at the same concentration (0-20% of inhibition observed).

Substrate specificity and kinetic parameters

Purified α -mannosidases were assayed for hydrolytic activities towards a variety of synthetic and natural substrates. No detectable activities towards *para*-nitrophenyl glycopyranosides (*para*-nitrophenyl- α -D-Glucopyranoside, *para*-nitrophenyl- α -L-Fucopyranoside, *para*-nitrophenyl- α -D-Galactopyranoside, *para*-nitrophenyl- α -L-Arabinopyranoside, *para*-nitrophenyl- β -D-Fucopyranoside, *para*-nitrophenyl- β -D-Glucopyranoside, *para*-nitrophenyl- β -D-Galactopyranoside, *para*-nitrophenyl- β -D-Xylopyranoside) were observed except *para*-nitrophenyl- α -D-Mannopyranoside (data not shown) on which Lineweaver-Burk-plot in range of concentrations 0 to 6 mM showed K_M and V_{max} values of the α -mannosidases (table 4). The K_M values were 0.13, 0.22 and 0.16 mM for isoforms *Rp/M1*, *Rp/M2* and *Rp/M3*, respectively.

On the other hand, the linkage specificity was investigated using natural substrates such as disaccharides

2-O- α -D-mannopyranosyl-D-mannopyranoside (Man- α -1,2-Man), 3-O- α -D-mannopyranosyl-D-mannopyranoside (Man- α -1,3-Man) and 6-O- α -D-mannopyranosyl-D-mannopyranoside (Man- α -1,6-Man). Following incubation with *Rp/M1*, *Rp/M2* and *Rp/M3*, released mannose was separated by TLC (figure 5). All the α -mannosidases (*Rp/M1*, *Rp/M2* and *Rp/M3*) showed broad specificity under acidic conditions by cleaving α -1,2; α -1,3 and α -1,6 Mannobioses at different rates. However, their hydrolytic on α -1,2 Mannobiose was greater than on α -1,3 or α -1,6 Mannobioses after 24 h (figure 5).

Discussion

α -mannosidases from insects have been largely studied physiologically with regard to their hydrolytic activities in crude extracts and many other properties (Ferreira *et al.*, 1988; Silva and Terra, 1994; Francis *et al.*, 2002; Erthal Jr. *et al.*, 2007) to understand their importance in protein glycosylation, both in N-glycans elongation and in catabolism of mannose oligosaccharides (Moremen *et al.*, 1994). However, few enzymatic studies have been realized and no work relative to oil palm weevil α -mannosidase has been so far reported. In this respect, three extracellular α -mannosidases were purified from the larvae of oil palm weevil and their properties were examined. The purification procedure of these enzymes involved three steps including size exclusion, anion exchange and hydrophobic interaction chromatography. The two latter chromatographies were crucial to purify the digestive α -mannosidases. Indeed, the anion-exchange chromatography on a DEAE-Sepharose Fast Flow column enabled the enzyme activity to be separated into three different isoforms (*Rp/M1*, *Rp/M2* and *Rp/M3*), while hydrophobic interaction chromatography on Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow led to separate each

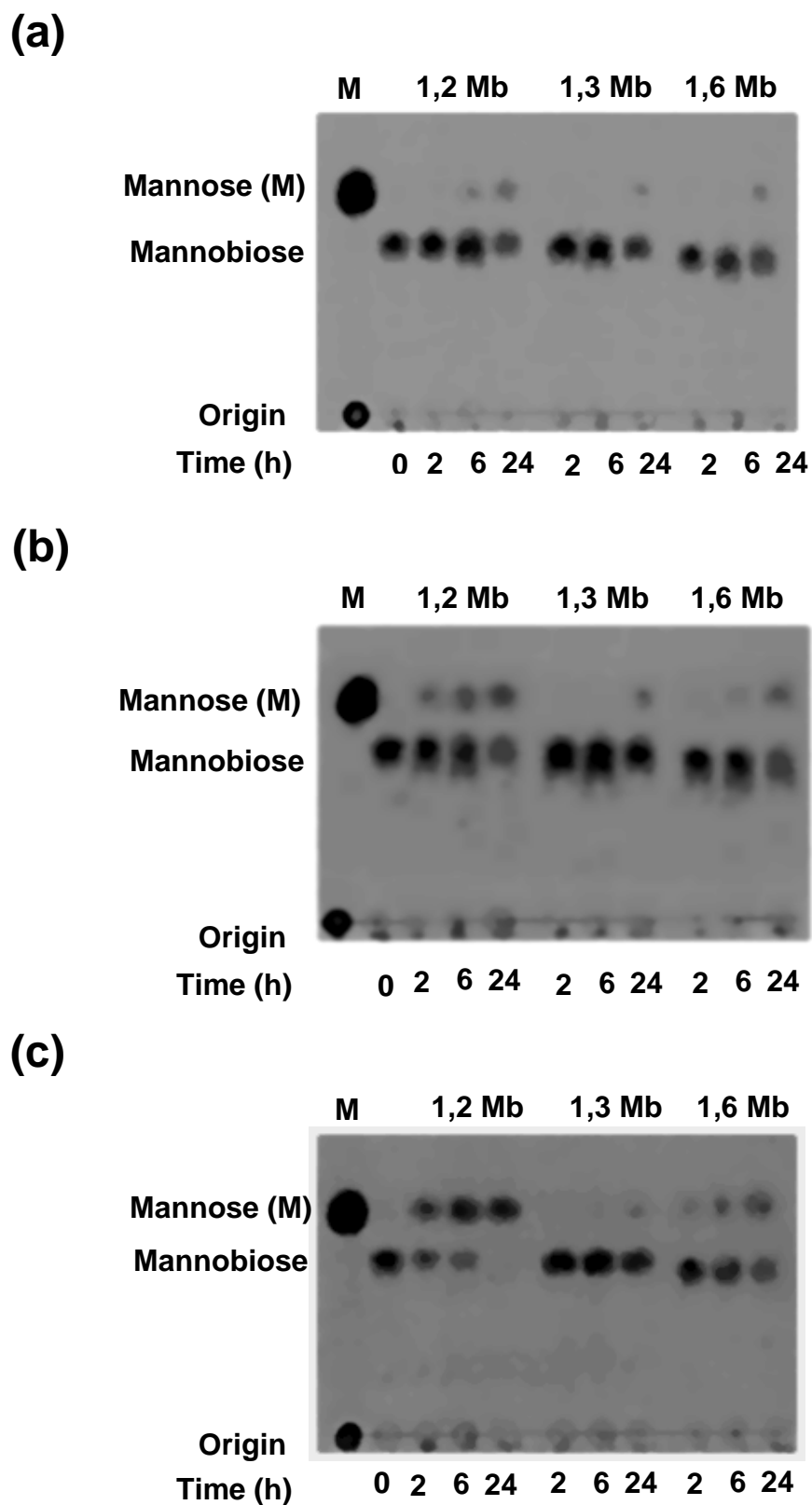


Figure 5. TLC plates showing the hydrolytic activity of the purified α -mannosidases from the digestive fluid of *R. palmarum* larvae towards different linked disaccharides. Experiments were monitored with 45 μ g of each enzyme, over 24 h incubation time at 37 °C in appropriate pHs. Separation of hydrolysed products was realized with butanol-acetic acid-water 9:3.75:2.25 (v/v/v). The plates were developed with naphto-resorcinol in ethanol and H₂SO₄ 20% (v/v). The sugar spots were visualized at 110 °C for 5 min. (a), *RpIM1* activity; (b), *RpIM2* activity; (c), *RpIM3* activity. 1,2 Mb, α -D-Manp(1,2)-D-Manp; 1,3 Mb, α -D-Manp(1,3)-D-Manp; 1,6 Mb, α -D-Manp(1,6)-D-Manp; M, mannose.

digestive α -mannosidase from the other proteins and impurities. Similar results concerning Phenyl-Sepharose gel has been reported for purification of the endopeptidase Thr-N from *Archachatina ventricosa* (Gould) digestive fluid (Niamké *et al.*, 1999), endoxylanase and other glycosidases of *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) workers (Kouamé *et al.*, 2005; Faulet *et al.*, 2006) and digestive β -galactosidase from *R. palmarum* larvae (Yapi *et al.*, 2007).

Regarding molecular properties of the purified enzymes, α -mannosidases *Rp/M2* and *Rp/M3* have monomeric structures. Except rat liver α -mannosidase I and jack bean α -mannosidase which are tetrameric polypeptides with different subunits (Tulsiani *et al.*, 1982b; Kimura *et al.*, 1999), most of α -mannosidases are monomeric (Bischoff and Kornfeld, 1986). As for α -mannosidase *Rp/M1*, it functions as a dimeric structure.

The purified α -mannosidase activities on *pNP- α -Man* were maximal in acidic region. This behaviour is in accordance with the majority of insect larvae α -mannosidases e.g. *Rhagium inquisitor* (L.) (Coleoptera) and *Rhynchosciara americana* (Wiedemann) (Diptera) (Chipoulet and Chararas, 1985; Terra and Ferreira, 1994). In contrast, only few insect α -mannosidases such as those from *D. melanogaster* and *S. frugiperda* which are both localized in Golgi apparatus have been reported to perform maximal activity near neutral pH region.

Since the enzymes behaved like lysosomal α -mannosidases and, also retained more than half of their hydrolytic activities near neutral pH region (data not shown), they would be advantageous for treating the lysosomal storage disorder α -mannosidosis by enzyme replacement. Indeed, the enzyme replacement therapy consists of a lysosomal α -mannosidase, which is formulated in an isotonic solution (Neufeld, 2004).

The optimum temperatures of these enzymes are in good agreement with those of the majority of α -mannosidases and other glycosidases purified from plants (Jagadeesh *et al.*, 2004; Ahi *et al.*, 2007), microbials (Yoshida *et al.*, 1993; Gaikwad *et al.*, 1995) and insects (Faulet *et al.*, 2006; Yapi *et al.*, 2007) which are most of the time mesophilic enzymes. The digestive α -mannosidase activities from the oil palm weevil larvae were tested after a long time of pre-warming (150-180 min). Most published reports determine thermal stability over a very short incubation time, usually 10 min (Ichishima *et al.*, 1981; Yoshida *et al.*, 1993; Maruyama *et al.*, 1994), but a long-term stability study gives more meaningful results, especially useful when lengthy concentration or purification steps (polyethylene glycol concentration or gel filtration) have to be employed.

The behaviour of the enzymes in presence of divalent cations tested and cation chelator (EDTA) is tempting to speculate that the concerning divalent cations are not necessary for enzyme catalytic activities. However, the sensitivity of the enzymes to *pCMB* and *DTNB* leads to assume that $-SH$ groups participate probably in the enzymic reaction. This assumption is supported by the fact that L-cysteine, an amino acid containing $-SH$ group, inhibited the concerning enzymes activity. In contrast, the particular enhanced effect of 2-mercaptoethanol on *Rp/M1* activity suggests that, hydroxyl group of this molecule participate in this enzyme reaction compare to

L-cystein which is also a small molecule as opposed to *pCMB* and *DTNB*.

Inhibitory effect is also noticed when detergents were tested on the three enzymes activities. These results contrast with those reported for rat liver α -mannosidases (Bonay *et al.*, 1992). So, the concerning detergents should be avoid in these enzymes preparations. Nevertheless, the particular inhibitory effect (34%) that displays a non-ionic detergent (nonidet-P40) on *Rp/M3* activity attracted our attention. This could be probably due to the enzyme's structure. Indeed, it is possible that the active site of the enzyme contains sites for non-ionic ligands as in bovine serum albumin structure (Wasylewski and Kozik, 1979). Thus, nonidet-P40 may affect the activity of *Rp/M3* by modifying its catalytic environment. Inhibition by this neutral detergent at extremely lower concentration (0.005%) had previously been reported on a rat calcium-activated ATPase (Batchelor and Stanworth, 1981).

The sensitivity of digestive α -mannosidases from *R. palmarum* larvae to *Sw* and *DIM* (specific inhibitors of α -mannosidases) largely matches the inhibition profile of lysosomal α -mannosidases previously characterized.

It is well known that *pKa* of *Sw* is 7.4 and thus, it would be fully ionized at pH 5.0 (Dorling *et al.*, 1980). This may account for the apparent specificity of *Sw* for *R. palmarum* larvae α -mannosidases which show maximum activity at pH 4.5 and 5.0. Indeed, the ionization of *Sw* could improve its fixation in the catalytic centre of the enzymes. Using molecular models, it can be seen that the configuration of secondary hydroxyl groups of *Sw* is identical to that in *DIM* (Cenci di Bello *et al.*, 1989). This observation supports the similar effect of *DIM* on the three digestive enzymes. However, the moderate effect of *DIM* may be explained by the accessibility of these compounds to the catalytic centre. *DMNJ* and *Kif*, both pyranose analogues, are normally not known to inhibit class II α -mannosidases (Daniel *et al.*, 1994; Moremen *et al.*, 1994). Taken together, these results suggest that the three α -mannosidases from the digestive fluid of oil palm weevil larvae belong to the catabolic group of α -mannosidases with close resemblance to lysosomale α -mannosidases.

α -mannosidases *Rp/M1*, *Rp/M2* and *Rp/M3* are restricted towards the synthetic aryl-substrate (*pNP- α -Man*) normally acted upon by α -mannosidase, since they did not possess any other tested glycosidase activities. Based on their substrate specificity and their high activities in acidic regions (pH 4.5; 5.0), these enzymes behaved like lysosomal α -mannosidases. This hypothesis is supported by the fact that other extracellular enzymes are hydrolases and one finds glycosidase, phosphatase and protease activity. As for the lysosome hydrolases to which they bear a close resemblance, they are not very specific (Forestier, 1992). Indeed, these α -mannosidases display a broad natural substrate specificity by hydrolysing α -1,2; α -1,3 and α -1,6 mannobioses linkages. Lysosomal α -mannosidases with these characteristics have previously been identified and purified from several sources as *Dictyostelium discoideum* (Schatzle *et al.*, 1992) and a variety of mammalian tissues (Opheim and Touster, 1978; De Gasperi *et al.*, 1991).

The three broad specific α -mannosidases are thought to

be very important and are presumably involved in cleaving the carbohydrate moieties of glycoproteins and in finishing the digestion of α -mannosylated compounds contained in *R. palmarum* larvae's feeding habits and diets.

This study showed that the three α -mannosidases (*RpIM1*, *RpIM2* and *RpIM3*) purified from the digestive fluid of oil palm weevil larvae behaved like lysosomal α -mannosidases by combination of a low pH optimum, broad natural substrate specificity, activity towards the synthetic aryl-substrate *pNP- α -Man* and a sensitivity to Sw. These enzymes due to their characteristics above could be useful for bioindustrial mannose removal by recycling glycoproteins and mannosylated compounds. They could also find application in pharmaceutical industries since they expressed lysosomal α -mannosidase activity. In addition, the inhibition profile of these enzymes should much contribute to the *R. palmarum* larvae's control.

Acknowledgements

This work was supported by a Ph.D. grant to the first author. The authors are grateful to Professor Jean-Pierre Sine (Unité de Biotechnologie, Biocatalyse et Biorégulation, CNRS-UMR 6204, Université de Nantes, France) for his assistance.

References

- AHI A. P., GONNETY T. J., FAULET B. M., KOUAMÉ L. P., NIAMKÉ S. L., 2007.- Biochemical characterization of two α -mannosidases from breadfruit (*Artocarpus communis*) seeds.- *African Journal of Biochemistry Research*, 1: 106-116.
- BATCHELOR K. W., STANWORTH D. R., 1981.- The effect of nonidet P40 on the function of rat peritoneal mast cells in vitro.- *British Journal of Pharmacology*, 72: 95-100.
- BISCHOFF J., KORNFELD R., 1984.- The effect of 1-deoxymannojirimycin on rat liver α -mannosidases.- *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 25: 324-331.
- BISCHOFF J., KORNFELD R., 1986.- The soluble form of rat liver α -mannosidase is immunologically related to endoplasmic reticulum membrane α -mannosidase.- *Journal of Biological Chemistry*, 261: 4758-4765.
- BLUM H., BEIER H., GROSS B., 1987.- Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels.- *Electrophoresis*, 8: 93-99.
- BONAY P., ROTH J., HUGGUES C. R., 1992.- Subcellular distribution in rat liver of a novel broad-specificity (α -1,2; α -1,3 and α -1,6) mannosidase active on oligomannose glycans.- *European Journal of Biochemistry*, 205: 399-407.
- CENCI DI BELLO I., FLEET G., NAMGOONG S. K., TANDANO K. I., WINCHESTER B., 1989.- Structure-activity relationship of swainsonine. Inhibition of human α -mannosidases by swainsonine analogs.- *Biochemical Journal*, 159: 855-861.
- CHIPOULET J. M., CHARARAS C., 1985.- Survey and electrophoretic separation of the glycosidases of *Rhagium inquisitor* (Coleoptera: Cerambycidae) larvae.- *Comparative Biochemistry and Physiology*, 80B: 241-246.
- DANIEL P. F., WINCHESTER B., WARREN C. D., 1994.- Mammalian α -mannosidase: multiple forms but a common purpose.- *Glycobiology*, 4: 551-566.
- DE GASPERI R., AL-DAHER S., DANIEL P. F., WINCHESTER B. G., JEANLOZ R. W., WARREN C. D., 1991.- The substrate specificity of the bovine and feline lysosomal α -D-mannosidases in relation to mannosidosis.- *Journal of Biological Chemistry*, 266: 16556-16563.
- DORLING P. R., HUXTABLE C. R., COLEGATE S. M., 1980.- Inhibition of lysosomal α -mannosidase by swainsonine, an indolizidine alkaloid isolated from *Swainsona canescens*.- *Biochemical Journal*, 191: 649-665.
- ELBEIN A. D., TROPEA J. E., MITCHELL M., KAUSHAL G. P., 1990.- Kifunensine, a potent inhibitor of the glycoprotein processing mannosidase I.- *Journal of Biological Chemistry*, 265: 15599-15605.
- ERTHAL JR. M., SILVA C. P., SAMUELS R. I., 2007.- Digestive enzymes in larvae of the leaf cutting ant, *Acromyrmex subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae: Attini).- *Journal of Insect Physiology*, 53: 1101-1111.
- FAULET M. B., NIAMKÉ S., GONNETY T. J., KOUAMÉ L. P., 2006.- Purification and biochemical characteristics of a new strictly specific endoxylanase from termite *Macrotermes subhyalinus* workers.- *Bulletin of Insectology*, 59: 17-26.
- FERREIRA C., RIBEIRO A. F., GARCIA E. S., TERRA W. R., 1988.- Digestive enzymes trapped between and associated with the double plasma membranes of *Rhodnius prolixus* posterior midgut cells.- *Insect Biochemistry*, 18: 521-530.
- FORESTIER J. P., 1992.- Les enzymes de l'espace extracellulaire du stratum corneum.- *International Journal of Cosmetic Science*, 14: 47-63.
- FOSTER J. M., YUDKIN B., LOCKYER A. E., ROBERTS D. B., 1995.- Cloning and sequence analysis of GMII, a *Drosophila melanogaster* homologue of cDNA encoding murine Golgi alpha mannosidase II.- *Gene*, 154: 183-186.
- FRANCIS B. R., PAQUIN L., WEINKAUF C., JARVIS D. L., 2002.- Biosynthesis and processing of *Spodoptera frugiperda* α -mannosidase III.- *Glycobiology*, 12: 369-377.
- GAIKWAD S. M., KESKAR S. S., KHAN M. I., 1995.- Purification and characterization of α -mannosidase from *Aspergillus sp.*- *Biochimica Biophysica Acta*, 1250: 144-148.
- GIORDANI R., SEIPAIÒ M., MOULIN T. J., REGLI P., 1991.- Antifungal action of *Carica papaya* latex: isolation of fungal cell wall hydrolysing enzymes.- *Mycoses*, 34: 469-477.
- GOSS P. E., BAKER M. A., CARVER J. P., DENNIS J. W., 1995.- Inhibitors of carbohydrate processing: a new class of anticancer agents.- *Clinical Cancer Research*, 1: 935-944.
- GOSS P. E., REID C. L., BAILEY D., DENNIS J. W., 1997.- Phase IB clinical trial of the oligosaccharide processing inhibitor swainsonine in patients with advanced malignancies.- *Clinical Cancer Research*, 3: 1077-1086.
- HENRISSAT B., BAIROCH A., 1996.- Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases.- *Biochemical Journal*, 316: 695-696.
- HERSCOVICS A., 1999.- Importance of glycosidases in mammalian glycoprotein biosynthesis.- *Biochimica Biophysica Acta*, 1473: 96-107.
- HIRSCH C., BLOM D., PLOEGH H. L., 2003.- A role for N-glycanase in the cytosolic turnover of glycoproteins.- *The EMBO Journal*, 22: 1036-1046.
- ICHISHIMA E., ARAI M., SHIGEMATSU Y., KUMAGAI H., SUMIDA-TANAKA R., 1981.- Purification of an acidic alpha-D-mannosidase from *Aspergillus saitoi* and specific cleavage of 1,2-alpha-D-mannosidic linkage in yeast mannan.- *Biochimica Biophysica Acta*, 658: 45-53.
- JACOB Q. S., SCUDDER P., 1994.- Glycosidases in structural analysis.- *Methods in Enzymology*, 230: 280-299.
- JAGADEESH B. H., PRABHA T. N., SRINIVASAN K., 2004.- Activities of glycosidases during fruit development and ripening of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.): implication in fruit ripening.- *Plant Science*, 166: 1451-1459.
- JARVIS D. L., BOHLMAYER D. A., LIAO Y. F., LOMAX K. K., MERKEL R. K., WEINKAUF C., MOREMEN K. W., 1997.- Isolation and characterization of a class II alpha-mannosidase cDNA from lepidopteran insect cells.- *Glycobiology*, 7: 113-127.
- KAWAR Z. S., MOREMEN K. W., JARVIS D. L., 2001.- Insect cells encode a class II alpha-mannosidase with unique properties.- *Journal of Biological Chemistry*, 276: 16335-16340.

- KELLY S. J., HERSCOVICS A., 1998.- Glycoprotein biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Purification of the alpha-mannosidase which removes one specific mannose residue from Man₉GlcNAc.- *Journal of Biological Chemistry*, 263: 14757-14763.
- KESKAR S. S., GAIKWAD S. M., KHAN M. I., 1996.- Microbial alpha-mannosidases.- *Enzyme and Microbial Technology*, 18: 602-604.
- KIMURA Y., HESS D., STURM A., 1999.- The N-glycans of jack bean alpha-mannosidase structure, topology and function.- *European Journal of Biochemistry*, 264: 168-175.
- KOUAMÉ L. P., KOUAMÉ F. A., NIAMKÉ S. L., FAULET B. M., KAMENAN A., 2005.- Biochemical and catalytic properties of two beta-glycosidases purified from workers of the termite *Macrotermes subhyalinus* (Isoptera: Termitidae).- *International Journal of Tropical Insect Science*, 25: 103-113.
- LAEMMLI U. K., 1970.- Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 658-685.
- LIAO Y. F., LAL A., MOREMEN K. W., 1996.- Cloning, expression, purification and characterization of the human broad specificity lysosomal acid alpha-mannosidase.- *Journal of Biological Chemistry*, 271: 28348-28358.
- LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARRA L., RANDALL R. J., 1951.- Protein measurement with Folin-phenol reagent.- *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.
- MARUYAMA Y., NAKAJIMA T., ICHISHIMA E., 1994.- A 1,2-alpha-D-mannosidase from a *Bacillus sp.*: purification, characterization and mode of action.- *Carbohydrate Research*, 251: 89-98.
- MOREMEN K. W., 2000.- alpha-mannosidases in asparagine-linked oligosaccharide processing and catabolism, pp. 81-117. In: *Oligosaccharides in chemistry and biology: a comprehensive handbook* (Ernst B., Hart G., Sinay P., Ed.).- Academic Press, New York, USA.
- MOREMEN K. W., TRIMBLE R. B., HERSCOVICS A., 1994.- Glycosidases of the asparagine-linked oligosaccharide processing pathway.- *Glycobiology*, 4: 113-125.
- NEUFELD E. F., 2004.- Enzyme replacement therapy, pp. 327-338. In: *Lysosomal disorders of the brain* (Platt F. M., Walkley S. V., Ed.).- Oxford University Press, Oxford, UK.
- NIAMKÉ S., SINE J-P., GUIONIE O., COLAS B., 1999.- A novel endopeptidase with a strict specificity for threonine residues at the P1' position.- *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 256: 307-312.
- OEHLSCHLAGER A., CHINCHILLA C., CASTILLO G., GONZALEZ L., 2002.- Control of red ring disease by mass trapping of *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Curculionidae).- *Florida Entomologist*, 85: 507-513.
- OPHEIM D. J., TOUSTER O., 1978.- Lysosomal alpha-D-mannosidase of rat liver. Purification and comparison with the golgi and cytosolic alpha-D-mannosidases.- *Journal of Biological Chemistry*, 253: 1017-1023.
- RABOUILLE G., KUNTZ D. A., LOCKYER A. E., WATSON R., SIGNORELLI T., ROSE D. R., VAN DER HEUVEL M., ROBERTS D. B., 1999.- The *Drosophila* GMII gene encodes a Golgi alpha-mannosidase II.- *Journal of Cell Science*, 112: 3319-3330.
- REYNA A. B. V., OROZCO R. B., MÉNDEZ C. C., ROMERO E. L., CARREON A. F., 2000.- Processing of the Man₁₀GlcNAc (M₁₀) oligosaccharide by alpha-mannosidases from *Candida albicans*.- *FEMS Microbiology Letters*, 185: 37-41.
- SAINT-POL A., CODOGNO P., MOORE S. E. H., 1999.- Cytosol to lysosome transfer of free polymannose-type oligosaccharides, kinetic and specificity studies using rat liver lysosomes.- *Journal of Biological Chemistry*, 274: 13547-13555.
- SCHATZLE J., BUSH J., CARDELLI J., 1992.- Molecular cloning and characterization of the structural gene coding for the developmentally regulated lysosomal enzyme, alpha-mannosidase, in *Dictyostelium discoideum*.- *Journal of Biological Chemistry*, 267: 4000-4007.
- SILVA C. P., TERRA W. R., 1994.- Digestive and absorptive sites along the midgut of the cotton seed sucker bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae).- *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 24: 493-505.
- SUN H., YANG H., ASKINS M. E., 1999.- Retrovirus vector mediated correction and cross correlation of lysosomal alpha-mannosidase deficiency in human and feline fibroblasts.- *Human Gene Therapy*, 10 (1999), 1311-1319.
- TATARA Y., LEE B. R., YOSHIDA T., TAKAHASHI K., ICHISHIMA E., 2003.- Identification of catalytic residues of Ca²⁺ independent 1,2-alpha-D-mannosidase from *Aspergillus saitoi* by site-directed mutagenesis.- *Journal of Biological Chemistry*, 278: 25289-25294.
- TERRA W. R., FERREIRA C., 1994.- Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function.- *Comparative Biochemistry and Physiology*, 109B: 1-62.
- TREMBLAY L. O., KOVACS E. N., DANIELS E., WONG N. K., SUTTON-SMITH M., MORRIS H. R., DELL A., MARCINKIEWICZ E., SEIDAH N. G., C. MCKERLIE C., HERSCOVICS A., 2007.- Respiratory distress and neonatal lethality in mice lacking Golgi alpha-1,2-mannosidase IB involved in N-glycan maturation.- *Journal of Biological Chemistry*, 282: 2558-2566.
- TULSIANI D. R. P., HARRIS T. M., TOUSTER O., 1982a.- Novel mannosidase inhibitor blocking conversion of high mannose to complex oligosaccharides.- *Journal of Biological Chemistry*, 257: 7936-7939.
- TULSIANI D. R. P., HUBBARD S. C., ROBBINS P. W., TOUSTER O., 1982b.- alpha-mannosidases of rat liver Golgi membranes.- *Journal of Biological Chemistry*, 257: 3660-3668.
- WASYLEWSKI Z., KOZIK A., 1979.- Interaction of bovine serum albumin with alkyl glucosides studies by equilibrium dialysis and infrared spectroscopy.- *European Journal of Biochemistry*, 95: 121-126.
- WENG S., SPIRO R. G., 1993.- Demonstration that a kifunensine-resistant alpha-mannosidase with a unique processing action on N-linked oligosaccharides occurs in rat liver endoplasmic reticulum and various cultured cells.- *Journal of Biological Chemistry*, 268: 25656-25663.
- WINCHESTER B., AL-DAHER S., CARPENTER C., CENCI DI BELLO I., CHOI S. S., FAIRBANKS A. J., FLEET G. W. J., 1993.- The structural basis of the inhibition of human alpha-mannosidase by azafuranose analogues of mannose.- *Biochemical Journal*, 290: 743-749.
- WOO K. K., KIMURA Y., SHINTARO H., YOSHINOBU K., 2004.- Purification of a Co (II)-sensitive alpha-mannosidase from *Ginkgo biloba* Seeds.- *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 68: 2547-2556.
- YAPI D. Y. A., NIAMKÉ S. L., KOUAMÉ L. P., 2007.- Biochemical characterization of a strictly specific beta-galactosidase from the digestive juice of the palm weevil *Rhynchophorus palmarum* larvae.- *Entomological Science*, 10: 343-352.
- YOSHIDA T., INOUE T., ICHISHIMA E., 1993.- 1,2-alpha-D-mannosidase from *Penicillium citrinum*: molecular and enzymic properties of two isoenzymes.- *Biochemical Journal*, 290: 349-354.

Authors' addresses: Ehuié M. BÉDIKOU, Sébastien NIAMKÉ (corresponding author: niamkes@yahoo.fr) Laboratoire de Biotechnologies, Filière Biochimie-Microbiologie de l'Unité de Formation et de Recherche en Biosciences de l'Université de Cocody-Abidjan, 22 BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire; Amédée P. AHI, Jean T. GONNETY, Betty M. FAULET, Lucien P. KOUAMÉ, Laboratoire de Biochimie et Technologie des Aliments de l'Unité de Formation et de Recherche en Sciences et Technologie des Aliments de l'Université d'Abobo-Adjamé, 02 BP 801 Abidjan 02, Côte d'Ivoire; Fankroma M. KONÉ, Unité de Biotechnologie, Biocatalyse et Biorégulation, CNRS-UMR 6204, Laboratoire de Biochimie, Faculté des Sciences et Techniques, 2 Rue de la Houssinière, BP 92208, F44322 Nantes Cedex 3, France.

Received October 7, 2008. Accepted March 9, 2009.

α -Mannosidases from the Digestive Fluid of *Rhynchophorus Palmarum* Larvae as Novel Biocatalysts for Transmannosylation Reactions

Ehuié M. Bédikou · Martial F. Koné · Amédée P. Ahi · Jean T. Gonnety · Betty M. Faulet · Lucien P. Kouamé · Sébastien L. Niamké

Received: 26 May 2009 / Accepted: 2 December 2009
© Springer Science+Business Media, LLC 2009

Abstract Two biological fluids, namely hemolymph and digestive fluid from the larval stage of *Rhynchophorus palmarum* Linnaeus, a serious pest in agroecosystem exploiting oil palm, were screened for hydrolytic activities, by the use of synthetic and natural glycoside substrates. Several exo and endoglycosidase activities were observed but, the interesting α -mannosidase activity (0.41 ± 0.04 UI) had attracted our attention. So, we have previously demonstrated that this activity harbours four distinctive α -mannosidase isoforms named *RplM*, *RplM1*, *RplM2* and *RplM3*. We have extended this work to determine the ability of these enzymes to catalyze synthesis reactions. Finally, we have revealed that, α -mannosidases from the digestive fluid of *R. palmarum* larvae catalyze transmannosylation reactions. The stability of the enzymes and the optimization of the transfer product yield were studied as functions of pH, enzyme unit, starting concentration of donor or acceptor and time. It was shown that, in experimental optimum conditions, average yields of 12.34 ± 0.75 , 12.15 ± 0.79 , 5.59 ± 0.35 and $8.43 \pm 0.50\%$ were obtained for the α -mannosidases *RplM*, *RplM1*, *RplM2* and *RplM3*, respectively. On the basis of this work, α -mannosidases from the digestive fluid of *Rhynchophorus palmarum* larvae appear to be a valuable tool for the preparation of neoglycoconjugates.

Keywords α -Mannosidases · Transmannosylation reactions · Oil palm weevil larvae · *Rhynchophorus palmarum* · Coleoptera

E. M. Bédikou · S. L. Niamké (✉)

Laboratoire de Biotechnologies, Filière Biochimie-Microbiologie de l'Unité de Formation et de Recherche en Biosciences de l'Université de Cocody-Abidjan, 22 BP 582 Abidjan, Côte d'Ivoire
e-mail: niamkes@yahoo.fr

M. F. Koné

Unité de Biotechnologie, Biocatalyse et Biorégulation, CNRS-UMR 6204, Laboratoire de Biochimie, Faculté des Sciences et Techniques, Université de Nantes, Nantes, France

A. P. Ahi · J. T. Gonnety · B. M. Faulet · L. P. Kouamé

Laboratoire de Biochimie et Technologie des Aliments de l'Unité de Formation et de Recherche en Sciences et Technologie des Aliments de l'Université d'Abobo-Adjamé, 22 BP 582 Abidjan, Côte d'Ivoire

Introduction

The recent increase in papers dealing with all aspects of insect digestive enzymes seems to have two major causes. One is the finding that insects provide excellent model for studying digestive enzymes, particularly because there are species adapted to almost all kinds of habitats and feeding habits. The second is the realization that the digestive tract is the major interface between the insect and its environment. In this respect, insect enzymes involved in digestion of lipids (lipases), proteins (proteases) and carbohydrates (carbohydrases) have been extensively reviewed [1, 2]. Since that time, there has been significant progress in insect digestive enzymology.

Carbohydrates digestive enzymes are glycosidases and although their originated function is the cleavage of glycosidic linkages, glycosidases can also be induced to serve as glycosidic-bond forming catalysts [3]. The pivotal roles of glycostructures in biological processes have become increasingly evident [4, 5]. So, efforts to understand and control the bioprocessing of carbohydrates are contributing much to glycobiology and for the development of new therapeutic strategies [6, 7]. In this respect, enzyme-based strategies for the synthesis of oligosaccharides represent emerging technologies that have the potential to greatly simplify glycan assembly to the detriment of chemical methods. Furthermore, the recent dynamic development of glycosciences has brought about the increasing need for new glycostructures, and glycosidases are widely used for this aim [8]. These enzymes are advantageous because they tolerate environmental stress and thanks to their broad substrate specificity, they are able to accept a wide range of cheap donors with different aglycon moieties and acceptors [9, 10]. These attractive characteristics have aroused a tendency to search cheap glycosidases, quite robust to handle with interesting transglycosylation capabilities. Thus, although they often exhibit a poor regioselectivity and sometimes low yields, they are readily available from different sources. Thus, glycosidases from several sources have been largely explored in transglycosylation reactions [11–13]. Concerning α -mannosidases, they have already served in oligomannosides synthesis reactions. However, the major sources originated from plants, usually Jack bean and almond α -mannosidases [14–17].

Our contribution in pursuit of new glycosidases (easy to obtain and purify, robust to handle and able to catalyze transglycosylation reactions) comes from the observation of a particular behaviour in nature. Indeed, *Rhynchophorus palmarum* larvae are known to feed exclusively on live vegetative tissue within the trunk of palms, often destroying the apical growth area and causing eventual death of the palm [18]. Therefore, it was suggested that this bug borer would certainly have enzymatic system that enabled it to hydrolyze polysaccharides as celluloses and hemicelluloses, which are the major constituents of plant cell walls [19]. In this respect, we have screened the hemolymph and the digestive fluid from the larval stage of *R. palmarum* for several glycosidase activities in order to explore the best one for biotechnological application. α -mannosidase activity from the digestive fluid was interesting than most of the other tested glycosidases. So, in previous studies, we have purified and characterized four isoforms of α -mannosidases namely *RplM*, *RplM1*, *RplM2* and *RplM3* [20, 21]. Through extensive biochemical characterizations, these α -mannosidases were distinguished on the basis of their size, physicochemical and kinetic properties. In the current study, data on screening are discussed, and the purified α -mannosidases are explored for their potential to catalyze transmannosylation reactions. This is the first report on an insect larva α -mannosidases with transmannosylation activities.

Materials and Methods

Enzymatic Source and Biological Fluids Extraction

Oil palm weevil *R. palmarum* larvae were collected locally in Côte d'Ivoire from their host trees (oil palm *Elaeis guineensis*). The biological fluids (hemolymph and digestive fluid) were extracted in an ice bath after clipping the head of the larva. Hemolymph (H) and digestive fluid (DF) were obtained by drawing fluids into syringes. The two solutions were filtered through cotton wool and then centrifuged for 30 min at $10,000\times g$ ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) to remove particulates. The resulted supernatants constituted the enzymatic sources (H or DF).

Chemicals

para-Nitrophenyl- (*p*NP-) glycopyranoside substrates (*p*NP- α -D-mannopyranoside, *p*NP- α -D-glucopyranoside, *p*NP- β -D-glucopyranoside, *p*NP- α -D-galactopyranoside, *p*NP- β -D-galactopyranoside, *p*NP- α -L-fucopyranoside, *p*NP- α -L-arabinopyranoside, *p*NP- β -D-xylopyranoside), *para*-nitrophenol (*p*NP), sucrose, starch, carboxymethylcellulose, Inulin, xylan and glucose were purchased from Sigma Aldrich. Bovine serum albumin (BSA) was from Fluka Biochemika. The α -mannosidases *Rpl*M, *Rpl*M1, *Rpl*M2 and *Rpl*M3 (EC 3.2.1.24) used for transmannosylation reactions originated from the purified enzymes collection of "Laboratoire de Biotechnologies, UFR Biosciences, Université de Cocody (Abidjan, Côte d'Ivoire)". The α -mannosidases were purified as described previously [20, 21]. Their purification procedures involved at least three steps including ammonium sulphate saturation, size exclusion, anion exchange and hydrophobic interaction chromatography. All other chemicals and reagents are commercially available and of analytical grade.

Hydrolytic Screening of Synthetic and Natural Substrates by Biological Fluids

For synthetic aryl-glycoside hydrolytic activities, each enzymatic source (H, DF or hemolymph and digestive fluid (H+DF) in a ratio of one to one (v/v)) was mixed in a total volume of 150 μl composed of *para*-nitrophenyl-glycoside substrate (2.5 mM, final concentration), in 100 mM starting concentration of sodium acetate buffer pH 5.0. The reaction mixture was incubated with shaking at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 10 min. The liberated *p*NP was quantified spectrophotometrically at 410 nm under alkaline conditions (2% w/v, Na_2CO_3) referred to a standard *p*NP (absorbance as a function of concentration) curve obtained in similar conditions.

For the natural substrates hydrolysis, the total volume was 250 μl , composed of 50 μl of the enzymatic source (H, DF or H+DF), 100 μl of substrate (0.25% w/v, final concentration) in 100 mM starting concentration of sodium acetate buffer pH 5.0. The reaction mixture was incubated with shaking at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 min and, the reactions were stopped by adding 150 μl of dinitro salicylic acid (DNS) and heating the resulted solution at $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 5 min [22]. The liberated reducing sugars were quantified spectrophotometrically at 540 nm referred to a standard glucose (absorbance as a function of concentration) curve obtained in similar conditions.

All values were determined in triplicate and corrected for auto-hydrolysis of the substrate. One unit of enzymatic activities in the two cases (synthetic and natural substrates) released 1 μmol of liberated product (*p*NP or reducing sugar) per min under the above conditions, respectively. The activity was expressed as micromole per min per mg of protein (UI).

Estimation of Proteins Concentration

The concentration of the proteins was measured using the Folin ciocalteus method [23]. BSA was used as the standard protein.

Transmannosylation Reactions

The ability of α -mannosidases *RplIM*, *RplIM1*, *RplIM2* and *RplIM3* from the digestive fluid of oil palm weevil *R. palmarum* larvae [20, 21] to catalyze transmannosylation reactions was tested with *pNP*- α -D-mannopyranoside (*pNP*- α -Man) used either as the mannosyl donor and acceptor.

In typical experiment, the transmannosylation reactions were carried out at 37 °C in a total reaction mixture of 60 μ l containing 400 mM of citrate/phosphate buffer pH 4.0. The reactions were stopped by immersion in boiling water for 3 min followed by cooling in ice bath. Prior to each HPLC analysis, the reaction mixtures were filtered using Ultrafree-MC filter (0.45 μ m) devices (Millipore). Phenol was used as the internal standard to correct chromatographic product areas. Ten microliters (10 μ l) aliquots of each reaction mixture always containing the internal standard (10 mM final concentration) were analyzed quantitatively by HPLC at room temperature. The column used was SPHERECLONE 5 μ ODS (2) (250 mm \times 4.60 mm; Phenomenex) and phenolic compounds were detected at 254 nm with a SPECTRA SYSTEM UV 1000 detector. The elution was done with a BECKMAN 114 M solvent delivery module pump, at a flow rate of 1 ml/min using degassed methanol/water in the ratio 35:65 (v/v) as eluent. The chromatograms were obtained with a SHIMADZU C-R8A CHROMATOPAC V1.04 integrator.

The detailed experimental conditions for studying parameters likely to affect the transmannosylation reactions (pH, enzyme unit, donor or acceptor concentration and time) are given below.

Determination of Optimum pH The pH values were determined at 25 °C. For determination of optimum pH, the transmannosylation reactions were performed by incubating at 37 °C for 1 h each α -mannosidase (20 μ l) in a pH range of 3.5 to 7.0 (citrate/phosphate buffer, 400 mM), with 10.5 mM final concentration of *pNP*- α -Man. The reactions were stopped by heating (3 min in boiling water), and the mixed products analyzed by HPLC as described in the typical transmannosylation reaction above.

Determination of Enzyme Unit For this study, the optimum pH determined for each enzyme was fixed. A amount of each α -mannosidase (0 to 11 μ g) was mixed with 10.5 mM of *pNP*- α -Man, in 400 mM citrate/phosphate buffer at appropriate optimum pH. The transmannosylation reactions were performed at 37 °C for 1 h. The reactions were stopped by immersion in boiling water for 3 min and the products quantified by HPLC as described in the typical transmannosylation reaction above.

Determination of Mannosyl Donor or Acceptor Concentrations The influence of mannosyl donor or acceptor concentrations (0 to 21 mM) on the transmannosylation reactions was determined by using *pNP*- α -Man either as donor and acceptor of the mannosyl residue. Under the optimum conditions of pH and enzyme unit, α -mannosidases *RplIM*, *RplIM1*, *RplIM2* and *RplIM3* were separately incubated at 37 °C for 1 h with different concentrations of the aryl substrate (*pNP*- α -Man). The reactions were stopped by immersion in boiling

water for 3 min and the products quantified by HPLC as described in the typical transmannosylation reaction above.

Determination of Optimum Time To determine the optimum time of transmannosylation, the optima conditions of pH, enzyme unit and donor or acceptor concentrations were kept. Only the times of transmannosylation reactions varied from 0 to 5 h. At regular time interval, aliquots of the reaction mixture were withdrawn, heated in boiling water for 3 min to stop the reaction and the resulted products quantified by HPLC as above.

Transmannosylation in Optimum Conditions Ultimately, the optimum conditions of pH, enzyme unit, donor or acceptor concentrations and time reaction were fulfilled to perform a unique transmannosylation reaction with α -mannosidases *Rp1tM*, *Rp1M1*, *Rp1M2* and *Rp1M3* purified from the digestive fluid of oil palm weevil *R. palmarum* larvae. These reactions were conducted in triplicate with regard to the typical conditions described in the other experiments, and the products were quantified as described previously (HPLC).

Estimation of the Yield of Transmannosylation

The hydrolysis of 1 mol of *pNP*- α -Man liberates 1 mol of *pNP* and 1 mol of mannose. Consequently, the area of the released *pNP* correspond with that of the mannosyl residue. After adjusting areas with the internal standard (phenol), the yield of transmannosylation was calculated as follow: area of transfer product/area of released *para*-nitrophenol \times 100 (%).

Results

Screening for Glycosidases Hydrolytic Activities

The potential of synthetic and natural glycoside derivatives to act as substrates for the biological fluids (H, DF and H+DF) of *R. palmarum* larvae was assayed and the results are shown in Table 1. We noticed that the hemolymph and the digestive fluid of the larval stage of the insect are able to hydrolyze all the substrates with varying degrees. However, the hydrolysis of each substrate observed from the usage of the digestive fluid is better than that showed in the presence of either the hemolymph or the mixture (*v/v*) of the two biological fluids (H+DF), suggesting that digestive fluid is the best enzymatic source (Table 1).

As regards *pNP*-glycoside substrates hydrolysis by the digestive fluid, the α -mannosidase activity was the highest (0.41 ± 0.04 UI). Apart from this activity, β -glucosidase, β -galactosidase, α -glucosidase and α -fucosidase activities are also interesting with specific activity values of 0.36 ± 0.03 , 0.29 ± 0.02 , 0.24 ± 0.02 and 0.10 ± 0.01 UI, respectively. The other glycoside (α -galactoside, α -arabinoside and β -xyloside) activities are less interesting (activity values inferior to 0.02 UI; Table 1).

Concerning natural substrates hydrolysis, we noticed as in synthetic substrates (*pNP*-glycosides) the tendency of the digestive fluid to hydrolyze these substrates efficiently. The α -amylase activity in this biological fluid was extremely higher (17.10 ± 2.81 UI). Compared with it, there are virtually no sucrose, carboxymethylcellulose, inulin and xylan hydrolyzing activity. These activities were less than 1 UI (Table 1).

Table 1 Screening of biological fluids from the larval stage of the oil palm weevil *Rhynchophorus palmarum* for glycosidase activities over synthetic and natural substrates.

Substrates	Specific activity ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)		
	DF	H	H+DF (v/v)
Synthetic			
<i>p</i> NP- α -D-mannopyranoside	0.41 \pm 0.04	0.07 \pm 0.02	0.17 \pm 0.02
<i>p</i> NP- β -D-glucopyranoside	0.36 \pm 0.03	0.03 \pm 0.01	0.15 \pm 0.03
<i>p</i> NP- β -D-galactopyranoside	0.29 \pm 0.02	0.04 \pm 0.01	0.13 \pm 0.01
<i>p</i> NP- α -D-glucopyranoside	0.24 \pm 0.02	0.03 \pm 0.01	0.11 \pm 0.02
<i>p</i> NP- α -L-fucopyranoside	0.10 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01
<i>p</i> NP- α -D-galactopyranoside	0.01 \pm 0.01	\leq 0.01	\leq 0.01
<i>p</i> NP- α -L-arabinopyranoside	0.01 \pm 0.01	\leq 0.01	\leq 0.01
<i>p</i> NP- β -D-xylopyranoside	0.01 \pm 0.01	\leq 0.01	\leq 0.01
Natural			
Starch	17.10 \pm 2.81	6.06 \pm 0.94	5.78 \pm 1.01
Sucrose	0.59 \pm 0.05	0.12 \pm 0.02	0.16 \pm 0.02
Carboxymethyl cellulose	0.46 \pm 0.03	0.10 \pm 0.02	0.24 \pm 0.03
Inulin	0.24 \pm 0.04	0.04 \pm 0.01	0.21 \pm 0.03
Xylan	0.21 \pm 0.02	0.07 \pm 0.01	0.11 \pm 0.01

DF digestive fluid, H hemolymph, H+DF (v/v) mixture of digestive fluid and hemolymph (volume per volume)

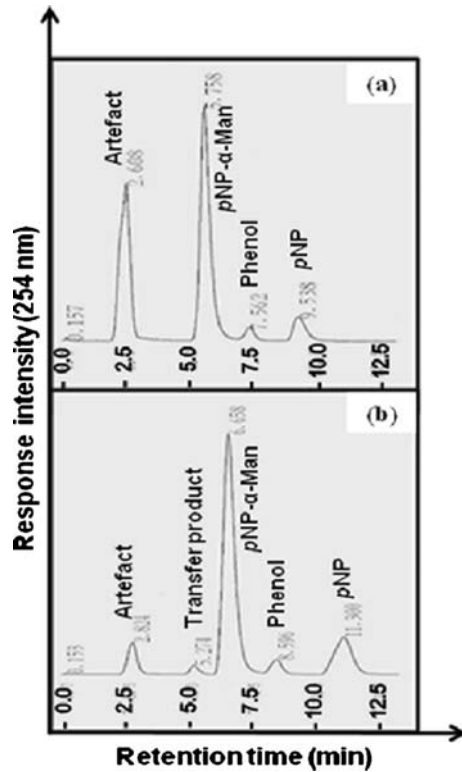
Potentiality of the α -mannosidases to Catalyze Transmannosylation

α -mannosidases *RplM*, *RplM1*, *RplM2* and *RplM3* from the digestive fluid of *R. palmarum* larvae were assayed for their ability to catalyze transmannosylation by increasing *p*NP- α -Man concentration (10.5 mM, final concentration). Analysis of the reaction mixture by high-performance liquid chromatography (Fig. 1) has confirmed this ability. The chromatogram (Fig. 1b) shows a fifth pic of newly synthesized product (transfer product) with a retention time of 5.274 min, sited between these of the artefact (2.824 min) and the *p*NP- α -Man substrate (6.658 min). In this context, some physicochemical parameters usually determined to optimize the experimental conditions of transglycosylation reactions were studied.

Influence of pH

Different pHs varying from 3.5 to 7.0 of a citrate/phosphate buffer (400 mM) were tested for their susceptibility to influence transmannosylation reaction catalyzed by α -mannosidases *RplM*, *RplM1*, *RplM2* and *RplM3*. Maximum transfer yields of 5.87%, 6.15%, 4.18% and 4.99% were obtained at pH 4.0 for α -mannosidases *RplM*, *RplM1*, *RplM2* and *RplM3*, respectively (Table 2). Calculation of the yield of transmannosylation was possible only at pH 3.5 and 4.0. From pH 4.0 to 6.0, although the synthesized product was observed, it was impossible to calculate the yields because of missing area of liberated *para*-nitrophenol useful for doing calculation (Table 2, Fig. 2b). However, above pH 6.0, the transmannosylation product was not observed (Table 2).

Fig. 1 HPLC chromatograms of the typical transmannosylation assay catalyzed by α -mannosidases *RplM*, *RplM1*, *RplM2* and *RplM3* from the digestive fluid of *Rhynchophorus palmarum* larvae. The experiments were monitored at 37 °C for 1 h by incubating appropriate amount of each α -mannosidase with *pNP*- α -Man (10.5 mM) substrate used either as the donor or the acceptor of the mannosyl residue, in 400 mM citrate/phosphate buffer pH 4.0. Ten microliters (10 μ l) aliquots of the reaction mixture were quantified. Phenol was used as the internal standard. **a** control, **b** assay



Influence of Enzyme Unit

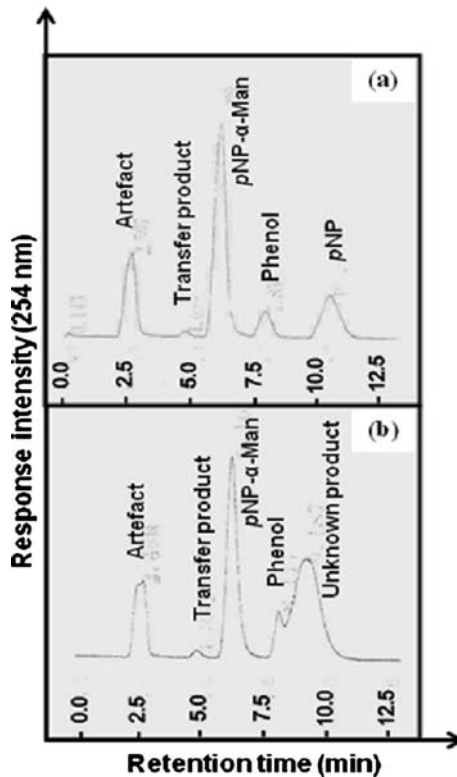
The efficiency of the α -mannosidases from *R. palmarum* larvae in catalysis of transmannosylation reactions was also largely dependent on the respective enzyme units (Fig. 3). The best yields (6.06%, 6.32%, 4.61% and 5.21%) were obtained with enzyme

Table 2 Influence of pH on the yields of transmannosylation reaction catalyzed by α -mannosidases *RplM*, *RplM1*, *RplM2* and *RplM3* from the digestive fluid of *Rhynchophorus palmarum* larvae.

pH values	Transfer product area	<i>pNP</i> area	Yield of transmannosylation (%)			
			<i>RplM</i>	<i>RplM1</i>	<i>RplM2</i>	<i>RplM3</i>
3.5	+ or –	+	3.81	5.92	0	0
4.0	+	+	5.87	6.15	4.18	4.99
4.5	+	–	nd	nd	nd	nd
5.0	+	–	nd	nd	nd	nd
5.5	+	–	nd	nd	nd	nd
6.0	+	–	nd	nd	nd	nd
6.5	–	–	0	0	0	0
7.0	–	–	0	0	0	0

– Absent, + present; *nd* not determined

Fig. 2 HPLC chromatograms of the effect of pH on the liberated *para*-nitrophenol in transmannosylation assay catalyzed by α -mannosidases *Rpl1M*, *Rpl1M1*, *Rpl1M2* and *Rpl1M3* from the digestive fluid of *Rhynchophorus palmarum* larvae. The experiments were performed at 37 °C for 1 h by incubating appropriate amount of each α -mannosidase with 10.5 mM of *pNP*- α -Man in 400 mM citrate/phosphate buffer ranging from pH 3.5 to 7.0. The *pNP*- α -Man substrate was used either as the donor or the acceptor of the mannosyl residue. Ten microliters (10 μ l) aliquots of the reaction mixture were quantified. Phenol was used as the internal standard. **a** pH 4.0; **b** pH 4.5



units of around 3.63 μ g (*Rpl1M*), 4.40 μ g (*Rpl1M1*), 9.08 μ g (*Rpl1M2*) and 7.04 μ g (*Rpl1M3*), respectively. On both sides of these enzyme unit values, the ability to catalyze the transmannosylation reactions was affected.

Donor or Acceptor Concentrations Dependence

Transmannosylation yields were considerably influenced by variation in donor or acceptor (*pNP*- α -Man) concentrations (Fig. 4). Maximum transmannosylation was observed for each α -mannosidase in the presence of 21 mM of donor or acceptor. At this concentration, optimum yields of 9.80%, 10.09%, 5.64% and 6.57% were obtained for α -mannosidases *Rpl1M*, *Rpl1M1*, *Rpl1M2* and *Rpl1M3*, respectively. Above this concentration (21 mM) the substrate *pNP*- α -Man was not soluble in the citrate/phosphate buffer (400 mM).

Kinetically-Controlled Reactions

Transmannosylation kinetics were also studied as a function of incubation time. The yields (%) of the transfer products obtained at various times (min) are shown in Fig. 5. In the initial stage of the reaction, much oligomannosides were synthesized by the transmannosylation activity of the enzymes. However, as the reaction proceeded, the transmannosylation product was gradually reduced (Fig. 5). The optimum times of transmannosylation were 45 min with a yield of 5.93% for *Rpl1M2* and 2 h for *Rpl1M*, *Rpl1M1* and *Rpl1M3*. At 2 h, yields of 13.08%, 12.94% and 8.92% were obtained, respectively for the latter three.

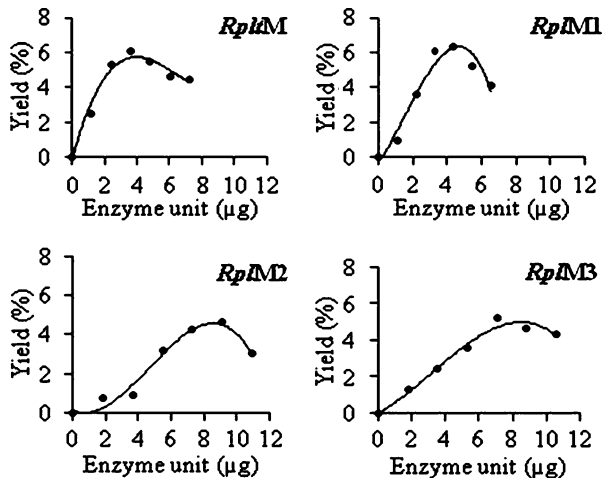


Fig. 3 Effect of enzyme unit on transmannosylation activity of α -mannosidases *RplM*, *RplM1*, *RplM2* and *RplM3* from the digestive fluid of *Rhynchophorus palmarum* larvae. The optimum enzyme units were measured using different concentrations (μg) of each enzyme. Reactions were performed at 37°C for 1 h by incubating enzymes with 10.5 mM of *pNP*- α -Man in 400 mM citrate/phosphate pH 4.0. The *pNP*- α -Man substrate was used as the donor and the acceptor of the mannosyl residue. Ten microliters (10 μl) aliquots of the reaction mixture were quantified by HPLC. Phenol was used as the internal standard

Progress of Yields and Transmannosylation in Optimum Conditions

Following the study of each parameter below (pH, enzyme unit, donor or acceptor concentrations and time), we have noted in optimum conditions, an improvement of transmannosylation yields as the studies went along. The yields (%) increased cumulatively

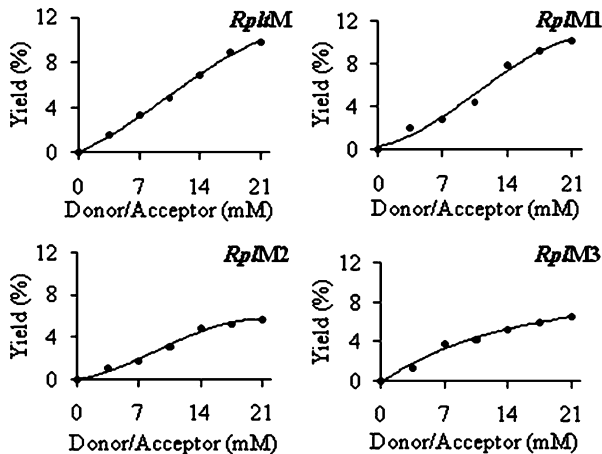


Fig. 4 Effect of donor or acceptor concentrations on transmannosylation activity of α -mannosidases *RplM*, *RplM1*, *RplM2* and *RplM3* from the digestive fluid of *Rhynchophorus palmarum* larvae. The optimum concentrations were measured using various soluble concentrations (mM) of *pNP*- α -Man as the donor and the acceptor of the mannosyl residue. Reactions were performed at 37°C for 1 h by incubating the optimum enzyme units of each α -mannosidase at different concentrations of *pNP*- α -Man, in 400 mM citrate/phosphate pH 4.0. Ten microliters (10 μl) aliquots of the reaction mixture were quantified by HPLC. Phenol was used as the internal standard

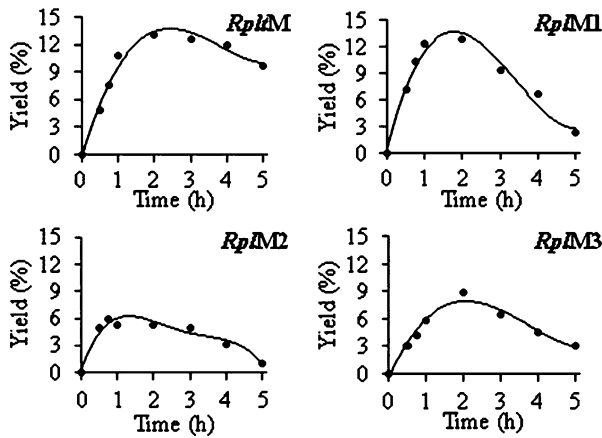


Fig. 5 Time course of transmannosylation reaction catalyzed by α -mannosidases *RplIM*, *RplIM1*, *RplIM2* and *RplIM3* from the digestive fluid of *Rhynchophorus palmarum* larvae. The experiments were performed at 37 °C for different times (0 to 5 h). The optima conditions of enzyme units and donor or acceptor concentrations were fulfilled to incubate the α -mannosidases in 400 mM citrate/phosphate buffer pH 4.0. The *p*NP- α -Man substrate (21 mM) was used as the donor and the acceptor of the mannosyl residue. Ten microliters (10 μ l) aliquots of the reaction mixture were quantified by HPLC. Phenol was used as the internal standard

from optimum pH to optimum time as follow: from 5.87% to 13.08% for *RplIM*, from 6.15% to 12.94% for *RplIM1*, from 4.18% to 5.93% for *RplIM2* and from 4.99% to 8.92% for *RplIM3* (Table 3). When the optimum conditions were fulfilled to perform a unique transmannosylation reaction (assay in triplicate), average yields of around $12.34 \pm 0.75\%$, $12.15 \pm 0.79\%$, $5.59 \pm 0.35\%$ and $8.43 \pm 0.50\%$ were obtained for α -mannosidases *RplIM*, *RplIM1*, *RplIM2* and *RplIM3*, respectively.

Discussion

Enzymes are essential biocatalysts to living organisms. Indeed, different aspects of biological functions have been resolved by studying physiological enzymes [2, 24]. With the aim of diversifying sources of cheap glycosidases for potential biotechnological applications, the hemolymph and the digestive fluid of the larval stage of *R. palmarum*,

Table 3 Yields of transfer product in optimized conditions of the transmannosylation reaction catalyzed by α -mannosidases *RplIM*, *RplIM1*, *RplIM2* and *RplIM3* from the digestive fluid of *Rhynchophorus palmarum* larvae.

Optimum condition	Yield of transmannosylation (%)			
	<i>RplIM</i>	<i>RplIM1</i>	<i>RplIM2</i>	<i>RplIM3</i>
pH	5.87	6.15	4.18	4.99
Enzyme unit	6.06	6.32	4.61	5.21
Donor/acceptor	9.80	10.09	5.64	6.57
Time	13.08	12.94	5.93	8.92
All parameters fulfilled (assay in triplicate)	12.34 ± 0.75	12.15 ± 0.79	5.59 ± 0.35	8.43 ± 0.50

RplIM, *RplIM1*, *RplIM2* and *RplIM3* are α -mannosidases

were screened for glycosidase activities over synthetic and natural substrates. These studies led to the assertion that the biological fluids contain several hydrolytic enzymes and one finds exo and endoglycosidase activities. These hydrolytic activities were better in the digestive fluid suggesting that it would be directly implicated in digestion. However, the lower hydrolytic yields observed by mixing the hemolymph and the digestive fluid suggests that physiologically, the two fluids would not function synergistically. Albeit overall patterns of digestion and digestive enzyme properties correlate well with the phylogenetic position of the insect, each biological fluid displayed an originated physiological function [2]. Those of the digestive fluids were particularly to allow digestion [25, 26].

The glycosidase activity from the digestive fluid of the oil palm weevil (*R. palmarum*) larvae catalyzes predominantly hydrolysis of starch, α -D-mannoside, β -D-glucoside, β -D-galactoside, α -D-glucoside and even α -L-fucoside. The highest α -mannosidase activity may suggest the presence of mannose-rich derivatives in the beetle's diets. As cellulose and hemicelluloses (the major plant cell wall structure, [19]), made up of complex β -linked structures, the cellulase, β -glucosidase and β -galactosidase activities observed were not surprising. However, the lower cellulase activity may be discussed. Indeed, cellulose digestion in insects is rare, because the dietary factor that usually limits growth in plant feeders would be protein quality and not the type of carbohydrate present [2]. Only few insects secrete enzymes able to hydrolyse crystalline cellulose [27, 28] because, insects were generally dependent on symbionts for cellulose digestion [29, 30]. Furthermore, earlier studies have revealed the presence of symbiotic microorganisms in the gut of another pest, namely red palm weevil of the genus *Rhynchophorus* [31].

The efficient degradation of starch may result from the concomitant action of different enzymes. Indeed, three enzymes are known to act specifically on long α -glucan chains such as native starch. α -amylase (EC 3.2.1.1) that catalyses the endohydrolysis of linkages in a random manner, followed by β -amylase (EC 3.2.1.2) that removes successive maltose units, and glucoamylase (EC 3.2.1.3), successive glucose units from the non-reducing ends of the chains. Similar results were reported when studying the α -amylase activity in *Musa domestica* larval midgut [32].

Screening for enzyme activity is a practical approach in enzymology to explore biocatalysts. This approach enabled us to reveal the interesting α -mannosidase activity from the digestive fluid of *R. palmarum* larvae. Our recent investigations have shown that this activity originated from four isoforms of α -mannosidase (EC 3.2.1.24), namely *RplM*, *RplM1*, *RplM2* and *RplM3* [20, 21]. The present study extends the previous one by determining the potentiality of these enzymes to catalyze transmannosylation reactions. Preliminary tests have shown that these α -mannosidases are able to synthesize oligomannosides by reverse hydrolysis reaction using *p*NP- α -Man either as the donor or the acceptor of mannosyl residue. The ability of other sources of α -D-mannoside mannohydrolases (EC 3.2.1.24) to synthesize mannoconjugates had previously been reported [15, 17, 33]. It seems that the transfer product formed in this study is the *para*-nitrophenyl- α -dimannose. Indeed, similar product was previously obtained by performing assays with Thai and commercial Jack beans α -mannosidases using *p*NP- α -Man as substrate [16].

The experimental conditions were optimized in relation to those factors able to have an influence on the rate of transmannosylation. It must be noted that all the α -mannosidases purified from the digestive fluid of *R. palmarum* larvae operate at an optimum pH for transmannosylation reaction of 4.0. From pH 4.5 the unknown product observed (Fig. 2b) may be a *p*NP derivative due to the nearness of the two retention times. The optimum pHs of transmannosylation (pH 4.0) were different to those of the hydrolysis reactions (pHs 4.5

and 5.0) [20, 21] suggesting that pH 4.0 is favourable to the transmannosylation reactions. These differences could be due to the ionized groups in the active site of the enzymes that enabled hydrolysis and transmannosylation at once [34]. Thus, at pH 4.0, transmannosylation reactions were favoured but not hydrolysis. Dissimilarities between optimum pH of hydrolysis and transglycosylation reactions have also been reported for other glycosidases [13, 34].

Enzyme unit, donor/acceptor concentrations and time course of the reactions were also important parameters in the transmannosylation reactions. Indeed, there are optimum values for each parameter optimizing the yields of synthesis. On both sides of these values, the transmannosylation reactions were affected. The time course of the reactions is particularly important given that the product formed during the transmannosylation reaction decrease gradually as the reaction proceed. It seemed that the transfer product be used as substrate by the same enzyme and progressively hydrolyzed. Due to the possible kind of product formed (*para*-nitrophenyl- α -dimannose), we can suggest that α -mannosidases *Rp1tM*, *Rp1M1*, *Rp1M2* and *Rp1M3* catalyze the splitting of α -mannosyl residue from non-reducing terminal to liberate α -mannose. This comportment indicates that these enzymes operated by a mechanism involving the retention of the anomeric configuration [35].

In optimal conditions, transmannosylation yields varying from 5.59 ± 0.35 to $12.34 \pm 0.75\%$ were obtained at least within 45 min and 2 h. By the use of *pNP*- α -Man either as the donor and the acceptor of mannosyl residue, these yields were much higher than those reported to date with conventional and commercial sources (Jack bean) of α -mannosidases [16]. The ability of these α -mannosidases to catalyze efficiently synthesis reactions is of great interest because glycosylation is considered to be an important method for the structural modification of compounds with useful biological activities [4].

Several inventions relate to synthetic oligomannosides which replicate the biological properties of natural sugars, their preparation and their use for detecting antibodies and preventing infections [36]. It was from this perspective that mimicking of the high glycan (oligomannose) density on the virus surface has brought a new generation of synthetic Man₉ structure used as a potential immunogen for HIV vaccine development, and as a potential antiviral agent [37]. Elsewhere, it has been reported on the effectiveness recognition of a synthetic trimannoside derivative by a T7 phage peptides, suggesting an alternative issue for the development of inhibitors or drug delivery systems targeting oligosaccharides, as well as further investigations into the function of carbohydrates in vivo [38]. Furthermore, it had been demonstrated the antigenic reactivity of synthetic mannotetraose in relation to antigenic factor from serum of patients with Crohn's disease [39]. Glycosylation also allows conversion of lipophylic compounds into hydrophilic ones, thus improving their pharmacokinetics properties. Sometimes, by attaching a sugar, pharmacodynamic properties are also changed or novel and more effective drug delivery systems obtained [8]. With regard to these considerations above, the ability of the α -mannosidases from the digestive fluid of *R. palmarum* larvae to fasten together mannosyl residues, could serve in the preparation of neomannoconjugates.

To sum up this report, we can note that, screening for enzymatic activity is a practical approach in enzymology to explore new biocatalysts. Furthermore, the interesting transmannosylation properties could suggest the usage of the α -mannosidases *Rp1tM*, *Rp1M1*, *Rp1M2* and *Rp1M3* from the digestive fluid of the oil palm weevil (*Rynchophorus palmarum*) larvae as an alternative source of synthesizing biocatalysts compared with conventional and commercial α -mannosidases.

Acknowledgements This work was supported by a Ph.D. grant to the first author. The authors are grateful to Professor Jean-Pierre SINE (Université de Nantes (France), Unité de Biotechnologie, Biocatalyse et Biorégulation, CNRS-UMR 6204) and Doctor Karim Sory TRAORE (Université d'Abobo-Adjamé (Côte d'Ivoire), Laboratoire des Sciences de l'Environnement, Unité des Micropolluants) for their assistance.

References

1. Turunen, S. (1985). Absorption. In G. A. Kerkut & L. I. Gilbert (Eds.), *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*, vol. 4 (pp. 241–277). New York: Pergamon Press.
2. Terra, W. R., & Ferreira, C. (1994). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology*, 109, 1–62.
3. Crout, D. H. G., & Vic, G. (1998). *Current Opinion in Chemical Biology*, 2, 98–111.
4. Varki, A. (1993). *Glycobiology*, 3, 97–130.
5. Sears, P., & Wong, C. H. (1998). *Cellular and Molecular Life Sciences*, 54, 223–252.
6. Winchester, B., & Fleet, G. W. J. (1992). *Glycobiology*, 2, 190–210.
7. Sears, P., & Wong, C. H. (1999). *Angewandte Chemie. International Edition*, 38, 2300–2324.
8. Kren, V., & Thiem, J. (1997). *Chemical Society Reviews*, 26, 463–473.
9. Bucke, C. (1996). *Journal of Chemistry Technology and Biotechnology*, 67, 217–220.
10. Scigelova, M., Singh, S., & Crout, D. H. G. (1999). *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic*, 6, 483–494.
11. Kouamé, L. P., Niamke, S., Diopoh, J., & Colas, B. (2001). *Biotechnological Letters*, 23, 1575–1581.
12. Ferrer, M., Golishina, O. V., Plou, F. J., Timmis, K. N., & Golyshin, P. N. (2005). *Biochemical Journal*, 391, 269–276.
13. Yapi, D. Y. A., Niamké, S. L., & Kouamé, L. P. (2007). *Entomological Science*, 10, 343–352.
14. Johansson, E., Hedbys, L., Mosbach, K., Larsson, P. O., Gunnarsson, A., & Svensson, S. (1989). *Enzyme and Microbial Technology*, 11, 347–352.
15. Hara, K., Fujita, K., Nakano, H., Kuwahara, N., Tanimoto, T., Hashimoto, H., et al. (1994). *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 58, 60–63.
16. Wongvithoonyaporn, P., Perry, D., Surarit, R., Bucke, C., Svasti, M. R. J. (1997). In S. Mongkolsuk, S. Loprasert, P. Srifah (Eds.), *Biotechnology research and applications for sustainable development in proceedings conference: oligosaccharides synthesis by α -D-mannosidases from Thai Beans* (pp. 9–15). Thailand: Bangkok.
17. Bojarova, P., Petraskova, L., Ferrandi, E. E., Monti, D., Pelantova, H., Kuzma, M., et al. (2007). *Advanced Synthesis & Catalysis*, 349, 1514–1520.
18. Sanchez, P., Jaffé, K., Hernandez, J. V., & Cerda, H. (1993). *Boletín de entomología venezolana*, 8, 83–93.
19. Bacic, A., Harris, P. J., & Stone, B. A. (1988). Structure and function of plant cell walls. In P. K. Stumpf & E. E. Conn (Eds.), *The biochemistry of plants*, vol. 14 (pp. 297–371). New York: Academic Press.
20. Bédikou, M., Ahi, P., Koné, M., Faulet, B., Gonnety, J., Kouamé, P., et al. (2009). *European Journal of Entomology*, 106, 185–191.
21. Bédikou, E. M., Ahi, A. P., Koné, M. F., Gonnety, T. J., Faulet, M. B., Kouamé, L. P., et al. (2009). *Bulletin of Insectology*, 62, 75–84.
22. Bernfeld, D. (1955). Amylase α and β . In S. P. Colswick & N. O. Kaplan (Eds.), *Methods in enzymology* (pp. 149–154). New York: Academic Press Inc.
23. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farrar, L., & Randall, R. J. (1951). *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265–275.
24. Ribeiro, A. F., Ferreira, C., & Terra, W. R. (1990). Morphological basis of insect digestion. In J. Mellinger (Ed.), *Animal nutrition and transport processes in vol. 1* (pp. 96–105). Basel: Karger.
25. Terra, W. R., Ferreira, C., & Garcia, E. S. (1988). *Insect Biochemistry*, 18, 423–434.
26. Schumaker, T. T. S., Cristofaletti, P. T., & Terra, W. R. (1993). *Apidologie*, 16, 3–17.
27. Chararas, C., Eberhard, R., Courtois, J. E., & Petek, F. (1983). *Insect Biochemistry*, 13, 213–218.
28. Slaytor, M. (1992). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology*, 103, 775–784.
29. Martin, M. M. (1991). *Philosophical Transaction of the Royal Society London Series B*, 333, 281–288.
30. Harazono, K., Yamashita, N., Shinzato, N., Watanabe, Y., Fukatsu, T., & Kurane, R. (2003). *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 67, 889–929.

31. Khiyami, M., & Alyamani, E. (2008). *African Journal of Biotechnology*, 7, 1432–1437.
32. Jordão, B. P., & Terra, W. R. (1991). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 17, 157–168.
33. Athanasopoulos, V. I., Niranjana, K., & Rastall, R. A. (2004). *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic*, 27, 215–219.
34. Huber, R. E., Gaunt, M. T., Sept, R. L., & Babiak, M. J. (1983). *Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 61, 198–206.
35. Moremen, K. W. (2000). α -Mannosidases in asparagine-linked oligosaccharide processing and catabolism. In B. Ernst, G. Hart, & P. Sinay (Eds.), *Oligosaccharides in Chemistry and biology: a comprehensive handbook* (pp. 81–117). New York: Wiley.
36. WIPO, (2001), Brevet PCT/FR00/03265, WO 01/38338 A1.
37. Wang, S. K., Liang, P. H., Astronomo, R. D., Hsu, T. L., Hsieh, S. L., Dennis, R., et al. (2008). *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, 105, 3690–3695.
38. Nishiyama, K., Takakusagi, Y., Kusayanagi, T., Matsumoto, Y., Habu, S., Kuramochi, K., et al. (2009). *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17, 195–202.
39. Sendid, B., Colombel, J. F., Jacquinet, M., Faille, C., Fruit, J., Cortot, A., et al. (1996). *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 3, 219–226.

Résumé : Les α -mannosidases sont des enzymes d'une importance capitale du fait de leur rôle central dans le processus de biosynthèse et de maturation de la fraction glycanique des N-glycoprotéines et, de leurs domaines variés d'applications. Ainsi, il nous apparaissait important de rechercher des sources originales d' α -mannosidases aux propriétés nouvelles et intéressantes. Dans cette étude, quatre α -mannosidases extracellulaires nommées M1, M2, M3 et M4 ont été purifiées à partir du suc digestif de la larve du charançon *Rhynchophorus palmarum*. Le protocole de purification comporte la saturation à 80% au sulfate d'ammonium et les chromatographies par filtration sur gel et par échangeur d'anions sur gel DEAE-Sepharose Fast Flow (pour M1) et, une troisième étape chromatographique sur gel d'interaction hydrophobe de type Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow (pour M2, M3 et M4). Les enzymes purifiées ont des structures dimériques (M1 et M2) et monomériques (M3 et M4) avec des masses moléculaires natives estimées respectivement à 112, 125, 72 et 111 kDa. Les α -mannosidases sont toutes acides et leur activité hydrolytique est maximale à pH 4,5 ou 5,0. Trois d'entre elles sont mésophiles (M2, M3 et M4) avec des températures optimales respectives de 55, 50 et 60°C tandis que M1 est thermophile et thermostable pendant 25 min à 65°C. Les enzymes purifiées sont de type Michaelien et les constantes (K_M) déterminées à partir de la représentation de Lineweaver-Burk sont respectivement de 0,36 ; 0,13 ; 0,22 ; 0,16 mM. Les activités des α -mannosidases ont été testées en présence de divers agents chimiques tels que les ions métalliques, les agents chélateur, réducteurs et détergents et la plupart n'affectent pas l'activité de ces enzymes. Bien que l'ion Zn^{2+} et le β -mercaptoéthanol soient des activateurs respectifs des enzymes M1 et M2, le Cu^{2+} , le SDS et le pCMB sont des inhibiteurs communes des quatre α -mannosidases. M1, M2, M3 et M4 sont sensibles aux inhibiteurs spécifiques du groupe des azafuranoses tels que la swainsonine (Sw) et la désoxyiminomannitol (DIM) et présentent une spécificité large d'hydrolyse en clivant les liaisons α -1,2; α -1,3 et α -1,6 des mannobioses rencontrées dans la nature. Ces caractéristiques nous permettent de les assigner dans le groupe des α -mannosidases du catabolisme des N-glycannes. Ainsi, ces enzymes seraient impliquées dans la dégradation des composés oligomannosylés contenus dans l'alimentation de la larve facilitant ainsi sa digestion. L'utilisation de ces enzymes dans des réactions de synthèse a montré qu'elles possèdent également des propriétés transférasiques. Dans les conditions optimales de transmannosylation avec le *para*-nitrophényl- α -D-mannopyranoside comme donneur et accepteur de résidus de mannose, des néomannoconjugués ont été obtenus avec des pourcentages moyens et respectifs de $12.34 \pm 0.75\%$, $12.15 \pm 0.79\%$, $5.59 \pm 0.35\%$ et de $8.43 \pm 0.50\%$ pour les α -mannosidases M1, M2, M3 and M4. Au regard des leurs propriétés décrites ci-dessus, nous pouvons dire que les α -mannosidases du suc digestif de la larve du charançon *Rhynchophorus palmarum* pourraient servir de nouveaux outils pour des applications biotechnologiques aussi bien dans l'hydrolyse d'oligomannosides qu'en synthèse de néomannoconjugués aux propriétés fonctionnelles nouvelles et intéressantes.

Mots clés: α -mannosidases, suc digestif, purification, caractérisation, hydrolyse, synthèse, transmannosylation, charançon du palmier à huile, *Rhynchophorus palmarum* (Coléoptères: Curculionidés).

Abstract: The α -mannosidases are enzymes of great interest due to their critical role in N-glycoproteins processing and catabolism and their wide area of application. Thus, the search of new α -mannosidases with improved properties from original sources and able to be use as biotechnological tool is so important. In this study, four extracellular α -mannosidases named M1, M2, M3 and M4 have been purified from the digestive fluid of the larval oil palm weevil *Rhynchophorus palmarum*. The process of the purification includes ammonium sulphate saturation (80%) and chromatographies on gel filtration and anion exchange on a DEAE-Sepharose Fast Flow columns (for M1) and a third chromatographic step on a Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow columns (for M2, M3 and M4). The purified enzymes functioned in dimeric (M1 and M2) and in monomeric (M3 and M4) structures with native estimated molecular weights of 112, 125, 72 and 111 kDa, respectively. The α -mannosidases are acidic and displayed a maximum hydrolytic activity at pH 4.5 or 5.0. Three of them (M2, M3, and M4) are mesophilic with optimum temperatures of 55, 50 and 60°C, respectively while M1 exhibits thermophilic and thermostable characteristics for 25 min at 65°C. The purified enzymes obeyed the Michaelis-Menten equation and the Michaelis constants (K_M) determined by using a Lineweaver-plot were 0.36, 0.13, 0.22 and 0.16 mM, respectively. The α -mannosidases were tested with a variety of chemicals as metal ions, chelating, reducing and detergent agents and, mostly were found to be without significant effect. Although Zn^{2+} (in the presence of M1) and 2-mercaptoethanol (in the presence of M2) led to enhance the two enzymes activity, Cu^{2+} , SDS and pCMB displayed a common property by inhibiting the four α -mannosidases. M1, M2, M3 and M4 are sensitive to specific azafuranose inhibitors as swainsonine (Sw) and diimminomannitol (DIM) and also show a broad natural specificity by hydrolyzing α -1,2; α -1,3 and α -1,6 mannobioses. These characteristics prompted us to categorize them as catabolic α -mannosidases. So, these enzymes would help in the larval oil palm weevil nutrition allowing digestion by the removal mannose-rich oligosaccharides in the beetles's diet. Using these enzymes in kinetically controlled synthesis showed that the α -mannosidases displayed also transmannosylation activities. In optimum synthesis conditions with *para*-nitrophenyl- α -D-mannopyranoside either as the donor and the acceptor of the mannosyl residue, new oligomannoconjugates were synthesized with an average of mannose transferred of approximately $12.34 \pm 0.75\%$, $12.15 \pm 0.79\%$, $5.59 \pm 0.35\%$ and $8.43 \pm 0.50\%$ for M1, M2, M3 and M4, respectively. With regard to their interesting properties described above, the α -mannosidases from the digestive fluid of oil palm weevil (*Rhynchophorus palmarum*) larvae constitute novel tools for biotechnological application as for the removal of mannose residues from oligomannosides and for transmannosylation reactions to synthesize mannosylated compounds having interesting functional and biological properties.

Key words: extracellular α -mannosidases, purification, characterization, hydrolysis, synthesis, transmannosylation, oil palm weevil, *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Curculionidae).