

THESE

présentée devant

L'INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE TOULOUSE

en vue de l'obtention du

DOCTORAT

N° d'ordre : 765

Spécialité : Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries
Filière : Microbiologie et catalyse industrielle

par

Gaëtan Richard

Ingénieur de l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Toulouse

**SYNTHESE DE DERIVES GLUCOSYLES DU 1,5-ANHYDRO-D-FRUCTOSE A
L'AIDE DE GLUCANE-SACCHARASES NATIVES ET RECOMBINANTES**

Soutenue le 21 décembre 2004 devant la commission d'examen :

<u>M. René-Marc Willemot</u>	Professeur, INSA, Toulouse
Mme Laurence Mulard	Chargée de recherche, Institut Pasteur, Paris
M Klaus Buchholz	Professeur, Institut technologique des sucres, Braunschweig
Mme Sandrine Morel	Maître de Conférences, INSA, Toulouse
Mme Magali Remaud-Simeon	Maître de Conférences, INSA, Toulouse
M Pierre Monsan	Professeur, INSA, Toulouse

Cette thèse a été préparée au laboratoire de Biotechnologie-Bioprocédés de l'INSA de Toulouse, UMR CNRS 5504, UMR INRA 792, dans le cadre de l'Ecole Doctorale de Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries de Toulouse.

NOM : RICHARD **Prénom** : Gaëtan

Titre : Synthèse de dérivés glucosylés du 1,5-anhydro-D-fructose à l'aide de glucane-saccharases natives et recombinantes.

Thèse de Doctorat

Spécialité : Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries

Année : 2004

Lieu : INSA de Toulouse

RESUME

Le développement d'un procédé de synthèse de l'**AF** catalysée par l' α -(1,4) glucane-lyase rend aujourd'hui la molécule facilement accessible à partir d'amidon. Sa valorisation fait l'objet du projet européen NEPSA auquel sont intégrés mes travaux de thèse. Ils sont focalisés sur la synthèse de dérivés glucosylés de l'**AF** à l'aide de glucane-saccharases (GS). Ces enzymes catalysent à partir de saccharose le transfert d'unités glucosyle sur des molécules exogènes dites acceptrices.

Pour la première fois, il a été démontré que l'**AF** est reconnu comme accepteur par les GS produites par des souches de *Leuconostoc mesenteroides* et *Neisseria polysaccharea*. Les produits de glucosylation sont des anhydro-D-fructo-glucooligosaccharides (**AFGOS**) résultant de transferts successifs d'unités glucosyle sur l'**AF**. Des familles d'**AFGOS** de structures différentes peuvent être synthétisées par l'utilisation de GS de spécificités distinctes.

Les **AFGOS** produits par la réaction d'accepteur conservent un fort pouvoir anti-oxydant mais sont dépourvus de propriétés prébiotiques. La réactivité particulière de l'**AF** a également été mise à profit pour la dérivation quantitative, spécifique et rapide de l'**AF** et des **AFGOS** en oximes.

La production des **AFGOS** a été optimisée en contrôlant le rapport molaire saccharose/**AF** et la matière sèche pour atteindre des taux de conversion compris entre 50 et 80 % selon la GS utilisée. D'autre part, l'utilisation de variants de GS obtenus par ingénierie rationnelle permet d'améliorer encore la glucosylation de l'**AF**. Pour isoler de nouvelles enzymes plus efficaces par criblage de banques de variants générés par ingénierie combinatoire, une méthode basée sur la réduction spécifique de l'**AF** a été développée.

MOTS CLES

1,5-anhydro-D-fructose, réaction d'accepteur, glucosylation, glucane-saccharase, *Leuconostoc mesenteroides*, *Neisseria polysaccharea*, transglucosylation, oxime, 1,5-anhydro-D-fructo-réductase

JURY

Président : M. René-Marc Willemot Professeur, INSA, Toulouse

Membres :

Mme Laurence Mulard	Chargée de recherche, Institut Pasteur, Paris
M Klaus Buchholz	Professeur, Institut technologique des sucres, Braunschweig
Mme Sandrine Morel	Maître de Conférences, INSA, Toulouse
Mme Magali Remaud-Simeon	Maître de Conférences, INSA, Toulouse
M Pierre Monsan	Professeur, INSA, Toulouse

Soutenue le 21 décembre 2004

Cette thèse a été préparée au laboratoire de Biotechnologie-Bioprocédés de l'INSA de Toulouse, UMR CNRS 5504, UMR INRA 792, dans le cadre de l'Ecole Doctorale de Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries.

SUMMARY

The development of the of 1,5-anhydro-D-fructose (**AF**) production from starch catalysed by α -(1,4) glucanlyase makes now **AF** easily available. Its valorisation is currently the subject of the NEPSA european project in which my thesis work is involved. This work is focused on the synthesis of **AF** glucosylated derivatives with glucansucrases (GS) which catalyse the transfer of glucosyl residues from sucrose to an exogenous molecule named acceptor.

We have demonstrated for the first time that **AF** is recognized as an acceptor by the GS from *Leuconostoc mesenteroides* and *Neisseria polysaccharea* strains. The glucosylation products are anhydro-D-fructo-glucooligosaccharides (**AFGOS**) which result from successive glucosyl transfers to **AF**. Several **AFGOS** families of different structures are obtained owing to the specificity of the GS used.

AFGOS present an anti-oxydant power as high as **AF** but no prebiotic effect. The reactivity of **AF** was also studied in the case of oxime derivatization, and we developed a fast, quantitative and specific conversion of **AF** and **AFGOS**.

Last, the production of **AFGOS** was optimised thanks to the control of the sucrose/**AF** molar ratio and the total sugar concentration, thus reaching conversions comprised between 50 to 80 % owing to the GS employed. In addition, the use of GS variants constructed by rational engineering enabled the further increase of conversions. In order to isolate new enzymes improved for **AF** glucosylation and which are generated by combinatorial engineering, a specific screening method based on the specific **AF** reduction was developed.

KEY-WORDS

1,5-anhydro-D-fructose, acceptor reaction, glucosylation, glucansucrase, *Leuconostoc mesenteroides*, *Neisseria polysaccharea*, transglucosylation, oxime, 1,5-anhydro-D-fructo-reductase

NOM : RICHARD **Prénom** : Gaëtan

Titre : Synthèse de dérivés glucosylés du 1,5-anhydro-D-fructose à l'aide de glucane-saccharases natives et recombinantes.

Thèse de Doctorat

Spécialité : Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries

Année : 2004

Lieu : INSA de Toulouse

PUBLICATIONS

Richard G., Morel S., Willemot, R.W., Monsan P., Remaud-Simeon M. (2003) Glucosylation of α -butyl- and α -octylglucopyranosides by dextransucrase and alternansucrase from *Leuconostoc mesenteroides*, *Carbohydrate Research* 338 : 855-864.

Richard G., Yu S., Monsan P., Remaud-Simeon M., Morel S. (2004) A novel family of glucosyl 1,5-anhydro-D-fructose derivatives synthesized by transglucosylation with dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F *Carbohydrate Research*, sous presse.

Richard G., Puech J., Morel S., Yu S., Monsan P., Remaud-Simeon M. (en préparation) Chemical synthesis and enzymatic glucosylation with dextransucrase from *L. mesenteroides* B-512F of 1,5-anhydro-D-fructose oxime derivatives.

Richard G., Yu S., Monsan P., Remaud-Simeon M., Morel S. (en préparation) Use of glucansucrases presenting different specificities in order to synthesize different families of 1,5-anhydro-D-fructose glucosylated derivatives.

Richard G., Yu S., Monsan P., Remaud-Simeon M., Morel S. (en préparation) Comparison of different methods for the screening of large libraries of glucansucrase variants for the improvement of 1,5-anhydro-D-fructose glucosylation by combinatorial engineering.

POSTER

G. Richard, P. Monsan, S. Morel, S. Yu, M. Remaud-Simeon (2003) *Enzymatic glucosylation of 1,5-anhydro-D-fructose by glucansucrases from Leuconostoc mesenteroides* 5^{ème} Carbohydrate Bioengineering Meeting, Groningen (Pays-Bas)

P. Monsan, G. Véronèse, C. Albenne, G. Joucla, E. Fabre, S. Morel, **G. Richard**, A. Bertrand, C. Moulis, S. Pizzut, M. Remaud-Siméon (2003) *Glucansucrases: useful tools for the valorisation of sucrose and starch derivatives*

Symposium International « Chimie Verte: utilisations et applications des matières premières renouvelables », Poitiers (France)

G. Richard, P. Monsan, S. Morel, S. Yu, M. Remaud-Simeon (2003) *Enzymatic glucosylation of 1,5-anhydro-D-fructose by glucansucrases from Leuconostoc mesenteroides*
BioTrans, Olomouc (République Tchèque)

G. Richard, S. Morel, J. Puech, P. Monsan, S. Yu, M. Remaud-Simeon (2004) *Synthèse chimique et glucosylation enzymatique de dérivés oximes de l'anhydro-D-fructose*
XX^{ème} journée de Chimie-Biologie, Toulouse (France)

G. Richard, S. Morel, P. Monsan, S. Yu, M. Remaud-Simeon (2004) *A novel family of glucosyl 1,5-anhydro-D-fructose derivatives synthesized by transglucosylation with dextranucrase from Leuconostoc mesenteroides NRRL B-512F*
XX^{èmes} journées de Chimie et Biochimie des Glucides, Dourdan (France)

G. Richard, S. Morel, J. Puech, P. Monsan, S. Yu, M. Remaud-Simeon (2004) *Organic synthesis and enzymatic glucosylation of 1,5-anhydro-D-fructose oxime derivatives*
Bioconversions and Organic Synthesis, Obernai (France)

G. Richard, S. Yu, H. Gornitzka, P. Monsan, M. Remaud-Simeon, S. Morel (2004) *Comparison of the glucosylation of 1,5-anhydro-D-fructose and its oxime derivatives catalyzed by amylosucrase*
6^{ème} Carbohydrate Bioengineering Meeting, Barcelone (France)

COMMUNICATIONS ORALES

Présentations semestrielles en anglais des résultats de thèse lors de réunions de groupe réunissant les partenaires européens du projet NEPSA (NEW Products from Starch derived 1,5-Anhydro-D-fructose, www.eurice.de/NEPSA)
(Saärbrücken, *Allemagne* : Sept 2002, Toulouse, *France* : Mars 2003 ; Lund, *Suède* : Sept. 2003 ; Braunschweig, *Allemagne* : Mars 2004 ; Saärbrücken, *Allemagne* : Nov 2004)

« Je me suis trompé : la cuisine n'est pas de la chimie, ni l'inverse. La cuisine est une production d'aliments, tandis que la chimie est une production de connaissances ».

Hervé THIS, initiateur de la gastronomie moléculaire.

Ce mémoire de thèse représente l'aboutissement de trois ans de travaux de recherche. Ils m'ont non seulement permis de me lier d'amitié avec de nombreuses personnes du laboratoire de biotechnologies-bioprocédés, mais également avec d'autres Européens au travers des « meeting » auxquels j'ai participé dans le cadre du projet NEPSA. Ces quelques lignes sont là pour remercier toutes ces personnes.

Avant tout, je tiens à adresser ma gratitude au Professeur Pierre MONSAN pour m'avoir proposé ce sujet de thèse. Certes, plusieurs jours ont été nécessaires pour que je donne ma réponse, mais je ne regrette en rien d'avoir accepté. Cette petite molécule d'anhydrofructose, ou AF pour les intimes, m'a beaucoup souri, et les travaux que j'ai réalisés m'ont véritablement passionné pendant ces trois années.

Je remercie également profondément Sandrine MOREL pour m'avoir encadré, et je suis fier d'avoir été son premier thésard. Nos nombreuses discussions sur le déroulement des travaux et sur les problèmes rencontrés ont permis de faire de nets progrès. Merci aussi pour m'avoir offert la possibilité d'assurer des travaux pratiques et dirigés, et ainsi connaître les plaisirs de l'enseignement, et finalement d'y prendre goût.

Merci à toi aussi Magali REMAUD pour avoir assuré le co-encadrement avec Sandrine. Merci pour ton soutien, et la motivation que tu sais nous apporter et qui nous refait pousser des ailes aux moments où nous en avons le plus besoin. Je n'oublierai pas non plus tous les bons moments que nous avons passés également avec Pierre et Sandrine lors des différents meeting NEPSA et congrès.

Bien sûr, il ne faut pas oublier tous les autres acteurs de l'équipe qui ont participé de près ou de loin à mes travaux. La liste est longue, alors j'espère n'en oublier aucun : Alain, Anne, Audrey, Cécile, Claire, David (les deux), Elise, Emeline, Florence, Françoise, Gaby, Gilles, Miguel, René-Marc, Sandra, Sophie (les deux), Stéphane, Valérie. Je les remercie avant tout pour leur amitié et leur bonne humeur de tous les jours, mais aussi pour leur aide. En effet, je suis chimiste de formation, et par conséquent la biologie moléculaire était il y a trois ans un monde inconnu. Ils ont alors pu répondre, avec plaisir je crois, à toutes mes interrogations. Je n'oublie pas non plus notre Peco à nous, si disponible, et qui m'a beaucoup aidé et beaucoup appris au cours de ces années.

Petit clin d'œil également à mes deux stagiaires, par ordre chronologique Laurent et Julien. Ils m'ont tous deux apporté du soutien pendant quelques mois et j'espère que leur stage leur a autant apporté qu'à moi.

Les différents meeting européens m'ont par ailleurs amené à rencontrer d'autres personnes. Parmi elles, Virginie et Jérôme de Genibio, ainsi que Olaf, Mikkel, Heidi, Leila, ... sans oublier Shukun qui n'est pas prêt d'en terminer avec l'AF...

Je remercie aussi mes deux rapporteurs de thèse : Laurence MULARD qui nous a apporté une vision critique de mes travaux grâce à son œil externe à l'univers des glucane-saccharases, et Klaus BUCHHOLZ, avec qui le dialogue pendant les meeting NEPSA a été fort profitable.

Mes nombreuses heures d'enseignement m'ont en parallèle donné l'opportunité de me sortir un peu la tête du monde de la Recherche. Je remercie donc tout le personnel-enseignant que j'ai pu côtoyer, notamment Sylvie, Marlène, Patrick, Yves, Eugénie, Stéphane... pour m'avoir aidé dans cette nouvelle tâche. Je me dois aussi de remercier les élèves avec qui nous avons passé de bons moments notamment pendant les microthèses.

Enfin, je terminerai par ceux qui m'ont soutenu moralement pendant ces travaux. Tout d'abord, Delfine (avec un f sic) qui a du souvent me partager le soir ou le week-end avec dame HPLC qu'il fallait éteindre, lancer, contrôler, voire simplement vérifier-qu'il-reste-assez-de-solvant et qui m'a même fait relever de mon lit à quelques reprises !!! Mes parents et Fabien également qui depuis toujours me soutiennent dans mes études, et sans qui je ne serais pas en train d'écrire ces quelques lignes. Et enfin, toute la famille Ruiz et Marcato que je côtoie maintenant avec grand plaisir depuis plus de cinq ans et dont la générosité est sans limite.

SOMMAIRE

Introduction.....	19
Première partie - Etude bibliographique	25
Chapitre A - Le 1,5-anhydro-D-fructose.....	27
Partie I. Structure de l'anhydro-D-fructose.....	29
I.1. Formes adoptées par l'AF à l'état solide et en phase aqueuse.....	29
I.2. Stabilité de l'AF en solution aqueuse.....	30
I.2.1. En milieu acide.....	31
I.2.2. En milieu alcalin.....	31
I.3. Comportement de l'AF en milieu organique.....	32
I.4. Résumé des différentes formes adoptées par la molécule d'anhydr-D-fructose	33
Partie II. Voie d'obtention de l'anhydro-D-fructose	35
II.1. L'AF au cœur de la troisième voie de dégradation de l'amidon ou du glycogène.....	35
II.1.1. Dégradation de polymères de stockage par les deux voies d'hydrolyse et de phosphorolyse.....	35
II.1.2. Voie de l'anhydro-D-fructose	37
II.1.2.1. Présence de l'AF dans de nombreux organismes vivants.....	37
II.1.2.2. L' α -1,4-glucane-lyase : une lyase originale à l'origine de l'AF	39
II.1.2.3. AF : un intermédiaire vers la synthèse de métabolites secondaires	45
II.1.3. Rôle physiologique de AF.....	49
II.1.4. Comparaison des métabolites obtenus lors de la dégradation de glucanes.....	50
II.2. Synthèse chimique de AF	52
II.2.1. Synthèse à partir d'hydroxyglucals	52
II.2.2. Synthèse à partir d'anhydro-D-glucitol.....	53
II.3. Synthèse enzymatique du 1,5-anhydro-D-fructose	54
II.3.1. Production d'AF à partir d'amidon et de glucane-lyase.....	54
II.3.2. Oxydation de l'anhydro-D-glucitol en AF à l'aide de pyranose-oxidase	56
Partie III. Propriétés et applications de L'anhydro-D-fructose	56
III.1. Toxicologie de l'AF	56
III.2. Propriétés de l'AF d'intérêt applicatif.....	57
III.2.1. Antioxydant	57
III.2.1.1. Antioxydants = agents préventifs du stress oxydant	57
III.2.1.2. AF : anti-oxydant de premier choix	58
III.2.1.3. Développement d'anti-oxydants amphiphiles	60
III.2.2. AF : agent antimicrobien	60
III.2.3. AF : Antidiabétique	61
III.2.3.1. Système de régulation hormonale de la glycémie	61
III.2.3.2. Diabète = dysfonctionnement de ce système	62

III.2.3.3. Implication de l'AF dans le traitement du diabète	63
III.2.4. Autres propriétés remarquables de l'AF et dérivés	63
III.2.4.1. L'ascospyrone P comme nouvel antimicrobien naturel	64
III.2.5. Bilan des brevets applicatifs de l'AF et dérivés	64
<i>III.3. AF comme synthon chimique et biochimique.....</i>	<i>67</i>
III.3.1. Modification chimique de AF	67
III.3.2. Modification biochimique de AF	70
Chapitre B - Les Glucane-saccharases	73
<i>Partie I. Polymérasés originales utilisatrices de saccharose.....</i>	<i>76</i>
I.1. Micro-organismes producteurs	76
I.2. Classification des glucane-saccharases	76
I.2.1. Classification de l'Enzyme Commission E.C	76
I.2.2. Classification basée sur les homologues de structure	78
I.3. Structure des glucane-saccharases	79
I.3.1. Structure primaire	79
I.3.1.1. GS de la famille 70	79
I.3.1.2. GS de la famille 13 : l'amylosaccharase	81
I.3.2. Structure secondaire : une structure prédite en tonneau (β/α) ₈	81
I.3.3. Structure tertiaire : l'amylosaccharase, seule GS de structure 3D résolue	82
I.3.4. Nomenclature des sites de fixation des substrats saccharidiques des glycoside-hydrolases	83
I.4. Réactions catalysées par les glucane-saccharases à partir de saccharose	83
I.4.1. Etape 1 : formation du complexe glucosyl-enzyme	85
I.4.2. Etape 2 : transfert du résidu glucosyle sur une molécule hydroxylée	87
<i>Partie II. Les glucane-saccharases, catalyseurs de réactions d'accepteur.....</i>	<i>89</i>
II.1. Mécanisme	89
II.2. Synthèse d'oligosaccharides	90
II.3. Réaction de disproportionation	94
II.4. Intérêts et applications de la réaction d'accepteur	95
II.4.1. Production d'oligosaccharides présentant une activité prébiotique	95
II.4.1.1. Définition des ingrédients fonctionnels alimentaires	95
II.4.1.2. Oligosaccharides obtenus avec la GS de <i>L. mesenteroides</i> B-1299	96
II.4.1.3. Oligosaccharides obtenus avec la GS de <i>L. mesenteroides</i> B-1355	97
II.4.2. Les glucane-saccharases outils efficaces de glucosylation	97
II.4.2.1. Glucosylation de glucoconjugués pour la synthèse d'APG	97
II.4.2.2. Glucosylation de flavonoïdes en vue de l'augmentation de leur hydrophilie	98
II.4.2.3. Glucosylation de macromolécules	99
Objectifs des travaux de thèse	101

Deuxième partie - Matériels et méthodes	105
<i>Partie I. Matériels chimiques et biologiques</i>	107
<i>I.1. Produits chimiques.....</i>	107
<i>I.2. Matériel Biologique.....</i>	107
<i>Partie II. Production de GS.....</i>	108
<i>II.1. Production</i>	108
II.1.1. Production des GS de <i>L. mesenteroides</i>	108
II.1.2. Production de l'AS de <i>N. polysaccharea</i>	108
<i>II.2. Purification des enzymes.....</i>	109
II.2.1. Glucane-saccharase de <i>L. mesenteroides</i> B-512F et B-1355:	109
II.2.2. Glucane-saccharase de <i>L. mesenteroides</i> B-1299 :	109
II.2.3. Amylosaccharase de <i>N. polysaccharea</i>	109
<i>Partie III. Dosage de l'AF.....</i>	110
<i>III.1. Méthode au DNS.....</i>	110
<i>III.2. Chromatographie sur couche mince.....</i>	110
<i>III.3. Par réduction à l'AF-réductase.....</i>	110
<i>Partie IV. Evaluation de la quantité d'amylose par réaction de complexation à l'iode.....</i>	111
<i>Partie V. Caractérisation de l'activité des glucane-saccharases.....</i>	111
<i>Partie VI. Réactions de glucosylation.....</i>	112
<i>IV.1. Paramètres de la réaction.....</i>	112
<i>IV.2. Conditions réactionnelles</i>	113
<i>IV.3. Purification des AFGOS</i>	114
VI.3.1. Conditions de production des AFGOS	114
VI.3.2. Dé-dextranisation par précipitation à l'éthanol.....	114
VI.3.3. Elimination des mono et disaccharides par chromatographie d'exclusion	115
VI.3.3.1. Sur résine Biogel® P2	115
VI.3.3.2. Sur résine K ⁺	115
VI.3.4. Obtention de chaque AFGOS par chromatographie préparative	115
<i>Partie VII. Dérivation en oxime.....</i>	116
<i>VII.1. Conditions réactionnelles.....</i>	116
<i>VII.2. Purification de l'AF oxime par chromatographie liquide préparative.....</i>	116
<i>VII.3. Purification de l'AF éthyloxime et l'AF benzyloxime par chromatographie sur colonne de silice.....</i>	117
<i>Partie VIII. Techniques analytiques.....</i>	119
<i>VIII.1. Chromatographie liquide haute performance (CLHP)</i>	119
<i>VIII.2. Couplage Chromatographie Liquide – Spectrométrie de Masse (CL-SM)</i>	119
<i>VIII.3. Spectrométrie de masse haute résolution (SMHR).....</i>	120
<i>VIII.4. Caractérisation structurale par résonance magnétique nucléaire (RMN).....</i>	120

<i>VIII.5. Analyses cristallographiques par diffraction aux rayons X</i>	120
Partie IX. Détermination du pouvoir anti-oxydant par la méthode à l'acide thiobarbiturique	120
Partie X. Evaluation des propriétés prébiotiques	121
Partie XI. Modélisation moléculaire	122
<i>XI.1. Champ de force « CFF91 »</i>	122
<i>XI.2. Calculs de minimisation d'énergie potentielle</i>	124
XI.2.1. Démarche.....	124
XI.2.2. Découpage de l'enzyme.....	125
XI.2.3. Algorithme de « steepest descent ».....	125
Troisième Partie - Résultats et discussion	127
Chapitre A - Glucosylation du 1,5-anhydro-d-fructose par les glucane-saccharases natives	129
Partie I. Glucosylation de l'AF en présence des GS natives	131
I.1. Avant propos : étude de la stabilité de l'AF dans les tampons de glucosylation	131
I.2. GS natives sélectionnées pour la glucosylation de l'AF	133
I.3. Glucosylation de l'AF dans les conditions de référence	133
I.3.1. Influence de l'AF sur l'activité des GS	133
I.3.1.1. Mise en évidence de la glucosylation de l'AF	134
I.3.1.2. Influence de la spécificité des enzymes	136
I.4. Analyses par chromatographie-liquide couplée à la spectrométrie de masse (CL-SM)	138
I.4.1. Produits de glucosylation synthétisés avec la DSR de <i>L. mesenteroides</i> B-512F.....	138
I.4.2. Analyse CL-SM avec les GS de <i>L. mesenteroides</i> B-1299 et B-1355.....	141
I.5. Isolement des produits de glucosylation.....	142
I.5.1. Purification par chromatographie d'exclusion sur résines BioGel et K ⁺	142
I.5.1.1. Séparation sur résine BioGel® P2 des oligosaccharides synthétisés en présence des GS produites par les souches de <i>L. mesenteroides</i>	143
I.5.1.2. Séparation sur résine échangeuse de cations K ⁺ des dérivés glucosylés de l'AF synthétisés en présence de l'AS de <i>N. polysaccharea</i>	144
I.5.2. Isolement des dérivés glucosylés de l'AF par CLHP préparative.....	147
I.5.2.1. Oligosaccharides obtenus avec la DSR de <i>L. mesenteroides</i> B-512F.....	147
I.5.2.2. Oligosaccharide produit par la DSR de <i>L. mesenteroides</i> B-1299.....	148
I.5.2.3. Purification des oligosaccharides synthétisés en présence de l'AS de <i>N. polysaccharea</i>	148
I.6. Caractérisation structurale des produits de glucosylation par RMN.....	148
I.6.1. Produits de glucosylation synthétisés par la DSR de <i>L. mesenteroides</i> B-512F.....	148
I.6.2. Analyse structurale du régio-isomère de DP4 synthétisé par la DSR de <i>L. mesenteroides</i> B-1299	151
I.6.2.1. Produit de glucosylation de l'AF synthétisé par l'AS de <i>N. polysaccharea</i>	153
Partie II. Optimisation de la glucosylation de l'AF par le contrôle des conditions réactionnelles	154

<i>II.1. Efficacité de la glucosylation de l'AF dans les conditions de référence</i>	154
<i>II.2. Amélioration de l'efficacité de glucosylation de l'AF</i>	155
II.2.1. Influence des conditions réactionnelles sur les taux de conversion.....	156
II.2.2. Influence des conditions réactionnelles sur le pourcentage de glucose transféré.....	157
II.2.3. Influence des conditions réactionnelles sur le rendement et la quantité d'AFGOS produits.....	159
II.2.4. Influence sur la répartition de taille des AFGOS synthétisés.....	161
II.2.5. Bilan de l'effet des conditions initiales.....	162
<i>II.3. Synthèse d'isomaltooligosaccharides comme produits secondaires</i>	164
Partie III. Conclusion	168
Chapitre B - Etude des propriétés et de la réactivité de l'AF et de ses dérivés	169
Partie I. Etude des propriétés de l'AF et des AFGOS	171
I.1. Evaluation des propriétés prébiotiques.....	171
I.2. Propriétés réductrices de l'AF.....	174
I.2.1. Oxydation de l'AF par l'acide 3,5-dinitrosalicylique.....	174
I.2.2. Réaction de l'AF avec la phénylhydrazine.....	175
I.3. Propriétés anti-oxydantes des AFGOS.....	177
Partie II. Synthèse de dérivés oximes de l'AF et évaluation de leur pouvoir accepteur	179
II.1. Objectifs de la dérivation en oxime.....	179
II.2. Etude de la dérivation de l'AF en oxime.....	180
II.2.1. Description de la réaction de dérivation de l'AF en oxime.....	180
II.2.2. Optimisation de la synthèse d'AF oxime.....	181
II.2.3. Isolement des dérivés AF oxime.....	183
II.2.3.1. Purification de l'AF oxime par CLHP préparative.....	184
II.2.3.2. Purification de l'AF éthyloxy et benzyloxy par chromatographie sur colonne de gel de silice.....	185
II.2.4. Caractérisation structurale des dérivés AF oxime.....	187
II.2.4.1. Confirmation de la structure par RMN.....	187
II.2.4.2. Analyses cristallographiques par diffraction aux rayons X.....	188
II.2.5. Etude de la spécificité de la dérivation en oxime.....	189
II.3. Dérivation en oxime des AFGOS.....	189
II.3.1. Dérivation des AFGOS avec l'hydroxylamine.....	189
II.3.2. Dérivation des AFGOS avec le <i>O</i> -éthylhydroxylamine.....	191
II.3.3. Dérivation des AFGOS avec le <i>O</i> -benzylhydroxylamine.....	192
II.4. Etude du pouvoir accepteur des dérivés oximes.....	194
II.4.1. Influence de la chaîne alkyle sur l'efficacité de glucosylation.....	194
II.4.1.1. Comparaison du pouvoir accepteur sur la base des taux de conversion.....	194
II.4.1.2. Interprétation des résultats expérimentaux par modélisation moléculaire.....	195
II.4.2. Etude des produits de glucosylation des dérivés oximes.....	199

<i>Partie III. Conclusion</i>	202
Chapitre C - Approches pour l'optimisation des glucane-saccharases par ingénierie rationnelle et combinatoire	205
<i>Partie I. Ingénierie rationnelle</i>	208
<i>I.1. Glucosylation de l'AF par les variants de la DSR-E de L. mesenteroides B-1299</i>	208
I.1.1. Glucosylation de l'AF par le variant DLG-CD2.....	209
I.1.2. Glucosylation de l'AF par le variant DSR-E-ΔPS	211
<i>I.2. Modélisation moléculaire du positionnement de l'AF dans le site actif de l'AS</i>	213
<i>Partie II. Ingénierie combinatoire</i>	213
<i>II.1. Développement et comparaison de méthodes de criblage</i>	215
II.1.1. Criblage par colorimétrie	215
II.1.1.1. Criblage colorimétrique par dosage des sucres réducteurs au DNS	215
II.1.1.2. Criblage colorimétrique par détection du polymère amylose synthétisé en présence de l'AS de <i>N. polysaccharea</i>	216
II.1.2. Criblage par chromatographie sur couche mince	217
II.1.3. Criblage par chromatographie liquide haute performance	219
II.1.3.1. Utilisation de la colonne carbohydre Ca^{2+}	219
II.1.3.2. Utilisation de la colonne C18	220
II.1.4. Criblage par réduction de l'AF par l'anhydro-D-fructo-réductase	221
II.1.4.1. Principe de la réduction enzymatique de l'AF.....	222
II.1.4.2. Mise au point du crible	222
II.1.5. Comparaison des méthodes de criblage	227
<i>II.2. Protocole proposé pour le criblage des banques de variants</i>	229
<i>Partie III. Conclusion</i>	231
Conclusion générale	233
Références bibliographiques	239
Table des illustrations	257
Liste des abréviations	267
Annexes - Spectres RMN	271

INTRODUCTION

Le 1,5-anhydro-D-fructose (**AF**) est une molécule qui suscita peu d'intérêt jusqu'à ce qu'elle soit mise en évidence à l'état naturel dans de nombreux organismes vivants.

Au début des années 80, LICHTENTHALER et coll. [LICHTENTHALER, F.W. et coll., 1980] furent les premiers à décrire une voie de synthèse chimique de l'**AF** à partir du glucose en plusieurs étapes. D'autres voies de synthèse ont été proposées à partir de sucres simples tels que le 1,5-anhydro-D-glucitol par Nakamura et coll. [NAKAMURA, T. et coll., 1988]. Cependant ces synthèses par voie chimique manquent cruellement de spécificité et nécessitent donc de nombreuses étapes de protection/déprotection des fonctions alcools, qui limitent fortement les rendements en **AF**. Ces synthèses faiblement efficaces expliquent le peu d'études menées sur l'**AF**.

Depuis une quinzaine d'années, une nouvelle activité enzymatique, l' α -(1,4) glucanelyase, a été mise en évidence dans différents organismes vivants tels que les algues rouges, les morilles ou encore le foie chez le rat. Cette exo-enzyme agit sur les polymères de stockage tels que l'amidon ou le glycogène respectivement pour les règnes végétal et animal et libère de l'**AF** et de la dextrine limite comme co-produit. L'**AF** ainsi formé peut alors conduire à des métabolites secondaires de nature différente selon l'organisme considéré. Chez les mammifères, l'**AF** est réduit en 1,5-anhydro-D-glucitol, l'un des polyols majoritaires dans le sang chez l'homme après le glucose, et utilisé en médecine comme marqueur du diabète. Chez les végétaux, l'**AF** est la matière première pour la synthèse de molécules à activité antimicrobienne telles que la microthécine ou l'échinosporine, et à activités anti-oxydantes telle que l'ascospyrone. Cette voie de l'anhydro-D-fructose est aujourd'hui considérée comme la troisième voie de dégradation des polysaccharides de stockage, aux côtés de l'hydrolyse et de la phosphorolyse.

Il est donc aujourd'hui possible de produire par voie enzymatique de l'**AF** à partir de matières premières renouvelables telles que l'amidon à l'échelle du laboratoire. Ainsi, la société DANISCO (Copenhague, Danemark) peut produire plusieurs centaines de grammes d'**AF** à partir d'amidon et d' α -(1,4) glucanelyase recombinante.

Des études menées sur l'**AF** ont alors pu démontrer le fort potentiel de cette molécule. De nombreuses propriétés de l'**AF**, telles que sa non toxicité, son fort pouvoir anti-oxydant, son pouvoir sucrant basses calories, ont été mises en évidence. Il semblerait également que l'**AF** puisse jouer un rôle dans le traitement du diabète. Ainsi, une recherche dans les bases de

données telles que Espacenet (<http://ep.espacenet.com>) aboutit à l'heure actuelle à l'obtention d'une vingtaine de brevets portant sur les applications de l'AF et de ses dérivés.

C'est dans ce cadre que le projet européen NEPSA (NEw Products from Starch derived Anhydro-D-fructose - <http://www.eurice.de/NEPSA>) réunit depuis 2001 plusieurs partenaires dont les travaux de recherche portent sur la valorisation de l'AF. Les différents laboratoires réunis dans ce consortium ont pour objectifs :

- l'optimisation de la production enzymatique de l'AF à l'aide de glucane-lyases et d'amidon par :
 - o le criblage de nouvelles sources de glucane-lyases ;
 - o la compréhension du mécanisme à partir de la structure tri-dimensionnelle de l'enzyme qui doit être obtenue.
- le développement de nouveaux dérivés de l'AF :
 - o des anti-oxydants, des émulsifiants ou des synthons synthétisés par modification chimique de l'AF ;
 - o des copolymères contenant des unités AF ;
 - o l'anhydro-D-glucitol ou l'anhydro-D-mannitol par réduction enzymatique de l'AF, conversion enzymatique régio- et stéréosélective
 - o des glucoconjugués obtenus par modification enzymatique de l'AF.

Bien évidemment, la multidisciplinarité est l'une des clés du projet : elle permet la complémentarité et la transversalité des travaux de recherche.

L'équipe d'ingénierie enzymatique moléculaire du LBB de l'INSA dirigée par le Pr. P. MONSAN participe également à ce projet. Spécialisée dans l'étude des glucane-saccharases (GS), l'équipe a proposé une nouvelle voie de valorisation possible de l'AF par glycosylation enzymatique catalysée par ces enzymes.

Les GS, d'origine bactérienne, catalysent la synthèse d'un polymère de glucose, appelé glucane, à partir d'un substrat abondant et peu coûteux : le saccharose. Cette polymérisation est basée sur le transfert d'unités glucosyle du saccharose sur une chaîne de glucose en cours d'élongation. Cependant, en présence d'une molécule exogène, dite acceptrice, les résidus glucosyle peuvent également être transférés sur l'accepteur pour conduire à la synthèse de glucoconjugués. L'intérêt des GS réside dans leur spécificité à catalyser la formation de différents types de liaisons glucosidiques. Au laboratoire, plusieurs souches de GS sont utilisées pour la production d'enzymes présentant des spécificités différentes.

Mes travaux de thèse ont été totalement intégrés au projet NEPSA. Ils ont été centrés sur l'étude de la glycosylation de l'**AF** par les GS. Cette molécule n'avait encore jamais été testée comme accepteur. Les objectifs étaient d'étudier la faisabilité de la réaction, de tester plusieurs GS de diverses spécificités afin de synthétiser des dérivés glycosylés de l'**AF** de structures différentes, et enfin d'évaluer les propriétés de ces nouvelles molécules.

Le manuscrit présenté fait le bilan de mes travaux de recherche. Il se divise en trois parties et débute par une étude bibliographique qui traite des deux principaux intervenants dans la réaction de glycosylation que sont l'**AF** et les GS. Tout d'abord, il y est fait état de l'ensemble des connaissances acquises sur la molécule d'**AF** concernant sa structure, son mode de synthèse et ses propriétés. Ensuite, le second chapitre est réservé aux GS, à leur diversité, leur mode d'action et leur aptitude à glycosyler des accepteurs.

La seconde partie décrit ensuite les matériels et les méthodes utilisés pour mener à bien les travaux de recherche.

La troisième partie est, quant à elle, consacrée aux résultats obtenus. Elle se divise en trois chapitres. Le premier est dédié à l'étude de la réaction d'accepteur, à la caractérisation des produits de glycosylation de l'**AF** et à l'optimisation de la réaction.

Ensuite, les propriétés prébiotiques et anti-oxydantes, ainsi que la réactivité de l'**AF** et de ses dérivés glycosylés sont examinées.

Le dernier chapitre enfin traite des travaux conduits sur l'optimisation du catalyseur enzymatique par ingénierie rationnelle et combinatoire visant à générer des enzymes plus performantes pour la glycosylation de l'**AF**.

**PREMIERE PARTIE -
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

**CHAPITRE A -
LE 1,5-ANHYDRO-D-FRUCTOSE**

L'anhydro-D-fructose (**AF**) est une molécule originale de structure distincte de celle des autres sucres et caractérisée par l'absence de carbone anomérique et la présence d'une fonction carbonyle (si l'**AF** est sous forme non hydratée).

La première partie de ce chapitre rassemble les données bibliographiques disponibles sur la molécule d'**AF**, ses voies de synthèse naturelle et chimique, et ses propriétés.

Partie I. STRUCTURE DE L'ANHYDRO-D-FRUCTOSE

I.1. Formes adoptées par l'AF à l'état solide et en phase aqueuse

Historiquement, l'anhydro-D-fructose (**AF**) fut d'abord identifié par DEFFIEUX et coll. chez les morilles de *Morchella vulgaris* [DEFFIEUX, M.G. et coll., 1986; DEFFIEUX, M.G. et coll., 1987]. Leurs travaux portant sur les sucres à activité antibiotique, tels que la microthécine, ont conduit à l'identification de l'**AF**. Selon eux, l'**AF** est un anhydrohexose (de formule brute $C_6H_{10}O_5$) qui présente à l'état solide une masse molaire de 162 g/mol (déterminée par spectrométrie de masse de type CIMS) et une fonction carbonyle (mise en évidence par spectrométrie IR). L'analyse en RMN liquide, également menée par TAGUCHI et coll. [TAGUCHI, T. et coll., 1993], a exclu la présence d'une insaturation due à un carbone sp^2 . Ainsi ont-ils proposé une forme bicyclique en solution aqueuse (cyclisation 2-6) et monocyclique carbonylée à l'état solide, toutes deux en accord avec la formule brute (cf Figure 1). Ces formes seraient en équilibre dans l'eau avec une prédominance pour la forme hémicétale intramoléculaire.

DEFFIEUX et coll. ont ensuite tenté élucider la structure tri-dimensionnelle de l'**AF**. Cependant, son état amorphe empêche toute étude cristallographique. Celle-ci est par contre réalisable sur le dérivé oxime de l'**AF** : à partir des données structurales obtenues par diffraction aux rayons X, l'**AF** solide a été caractérisé comme étant un anhydrocétohexose de conformation chaise 4C_1 (Figure 1) [DEFFIEUX, M.G. et coll., 1986].

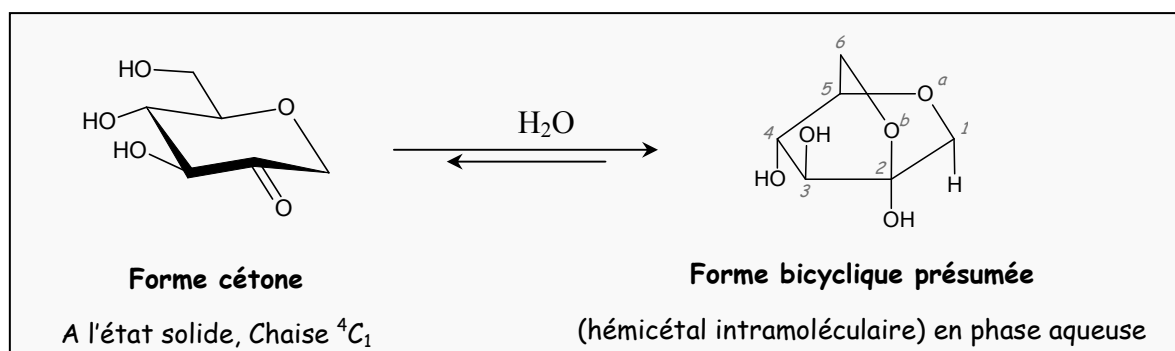


Figure 1 - Formes cétonique et bicyclique de l'anhydro-D-fructose proposées par DEFFIEUX et coll. en accord avec les résultats structuraux (RMN liquide, Spectrométrie IR, CIMS, analyse élémentaire).

Ces 2 formes sont en équilibre déplacé vers l'hémicétal intramoléculaire [DEFFIEUX, M.G. et coll., 1986].

TAGUCHI et coll. [TAGUCHI, T. et coll., 1993] ont complété cette étude structurale quelques années plus tard. La spectrométrie de masse, cette fois-ci de type FABMS attribue à l'AF une masse molaire de 180 g/mol (soit 18 g/mol de plus que les 162 g/mol déterminés par DEFFIEUX et coll. par CIMS), et la RMN liquide montre que le déplacement chimique du C6 de l'AF est similaire à celui du glucose, excluant sa participation à une liaison hémicétalique intramoléculaire. La forme bicyclique proposée par DEFFIEUX et coll. [DEFFIEUX, M.G. et coll., 1986] n'existe donc pas : l'AF adopte au contraire la forme hydratée en solution aqueuse (toujours sous forme chaise 4C_1) (Figure 2), largement prédominante par rapport à la forme cétone [TAGUCHI, T. et coll., 1993; YU, S. et coll., 1998].

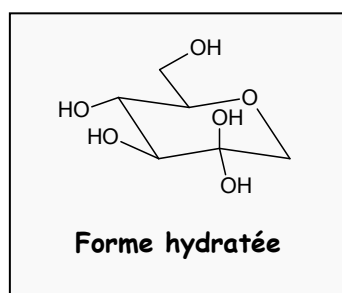


Figure 2 - Forme hydratée de l'anhydro-D-fructose proposée par TAGUCHI [TAGUCHI, T. et coll., 1993].

YU et coll. [YU, S. et coll., 1995] ont montré quant à eux à l'aide d'amylose marqué ou non et d'eau deutérée l'existence additionnelle de la forme 2,3-énediol. Celle-ci résulte du déplacement 1-3 de l'hydrogène (Figure 3). Mais, dissous dans D_2O , aucun déplacement d'hydrogène n'est observé, même en présence de la glucane-lyase (enzyme responsable de la formation de l'AF – cf II.1.2) : l'incorporation de 2H a uniquement lieu lors de la formation de l'AF, au sein du site actif de l'enzyme [YU, S. et coll., 1995].

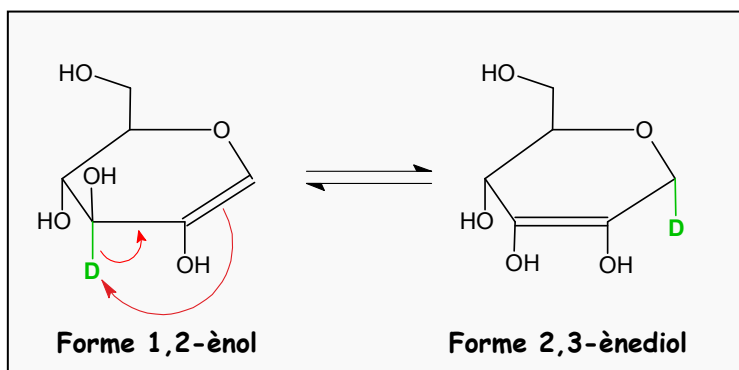


Figure 3 - Equilibre tautomérique entre les formes énols mis en évidence par YU et coll. [YU, S. et coll., 1995]

I.2. Stabilité de l'AF en solution aqueuse

En milieu aqueux, l'AF est totalement hydraté et adopte la conformation de type chaise 4C_1 [ANDERSEN, S.M. et coll., 2002b; TAGUCHI, T. et coll., 1993]. Cependant, l'hydratation de

l'AF est lente (environ 5 h dans D₂O), et de nombreux composés sont initialement présents (formes cétonique, dimériques, ...) [ANDERSEN, S.M. et coll., 1998; ANDERSEN, S.M. et coll., 2002b]. Par contre, aux pH extrêmes, le comportement de l'AF est différent.

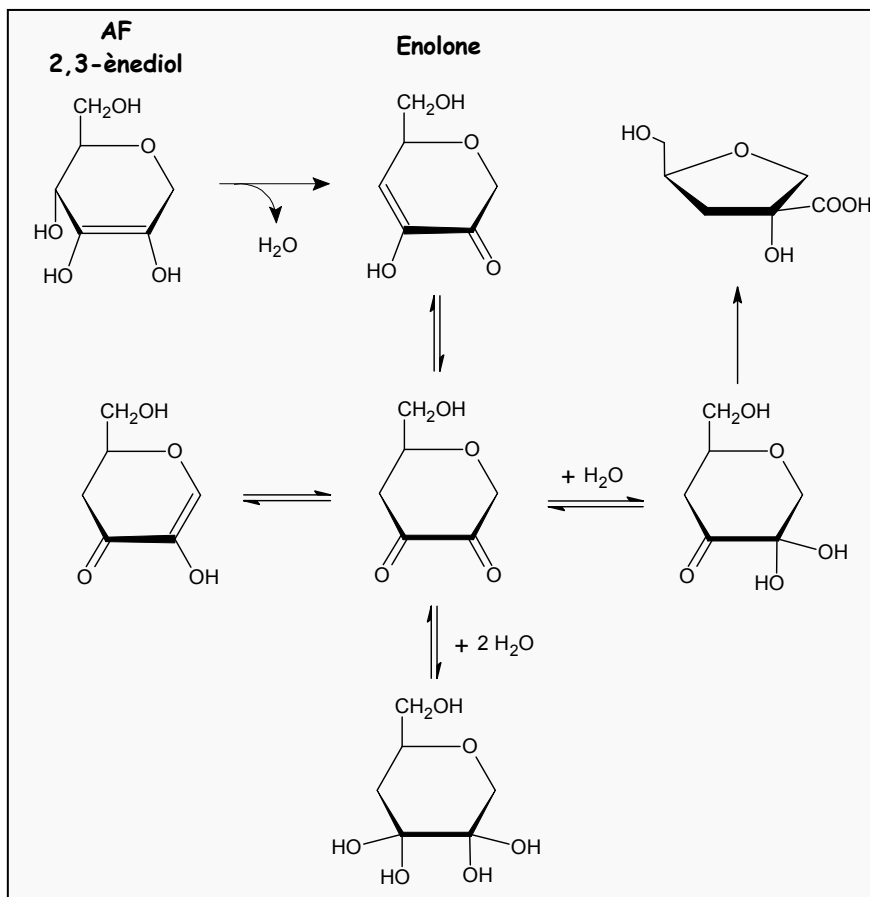
I.2.1. En milieu acide

En milieu acide (HCl 1M), il a été démontré que l'AF est stable et adopte uniquement la forme hydratée. Cependant, dans des milieux acides non aqueux (l'acide acétique glacial par exemple), des produits de dégradation ont été observés en RMN du ¹³C après 24h de reflux. Ils n'ont cependant pas été identifiés [ANDERSEN, S.M. et coll., 2002b].

I.2.2. En milieu alcalin

En milieu fortement basique (pH entre 12 et 14), lorsque l'AF est dissous dans D₂O, le proton porté par le carbone C3 est substitué par un ²H. Ceci indique l'existence d'un équilibre entre l'AF cétonique et la forme 2,3-ènediol à des pH élevés.

D'autre part, dans des conditions identiques, la RMN du ¹H et ¹³C a montré l'instabilité de l'AF dans l'eau. De nombreux produits apparaissent. Ils ont été isolés et caractérisés, et il a été proposé le mécanisme de la Figure 4 pour expliquer leur formation à partir de l'AF 2,3-ènediol [ANDERSEN, S.M. et coll., 2002b].



En milieu légèrement basique (pH=8.5), après 24 h sous atmosphère non oxygénée, une forme isomère minoritaire de l'AF est présente aux côtés de la forme hydratée **5.1** dans un rapport 3:1 : il s'agit de l'hex-3-ulose de configuration *ribo* **5.4**. Des expériences menées dans D₂O démontrent que la forme 2,3-ènediol est un intermédiaire pour la formation de **5.4** [ANDERSEN, S.M. et coll., 2002b].

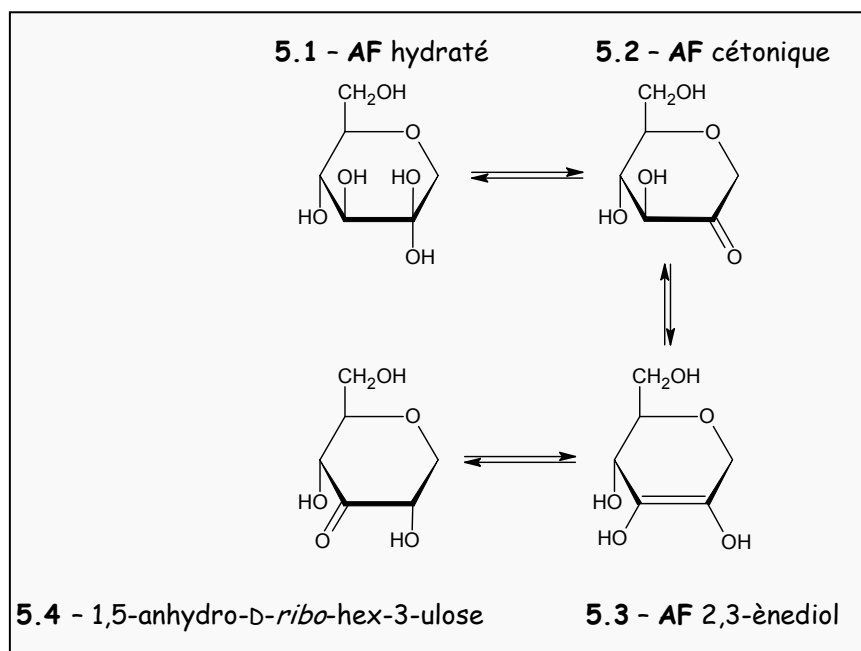


Figure 5 – Comportement de l'AF en milieu légèrement alcalin (pH=8.5) : présence de l'AF cétonique et de l'hex-3-ulose dans un rapport 3:1 [ANDERSEN, S.M. et coll., 2002b].

L.3. Comportement de l'AF en milieu organique

Alors qu'en solution aqueuse, l'AF se trouve très majoritairement sous forme hydratée, il en est tout autrement dans les solvants organiques. Ainsi, dans le DMSO ou la pyridine, FREIMUND et KÖPPER [FREIMUND, S. et coll., 1998b] ont montré que l'AF est sous forme cétonique qui peut elle-même former deux dimères de type I et II de type C2 spirocétal. La proportion entre les trois structures est différente selon le solvant considéré (Figure 6).

ANDERSEN et coll. ont également noté une évolution de la composition du mélange dans la pyridine : après 1 semaine, le rapport molaire entre les deux dimères s'inverse : il passe de 2:1 à 1:23 [ANDERSEN, S.M. et coll., 1998].

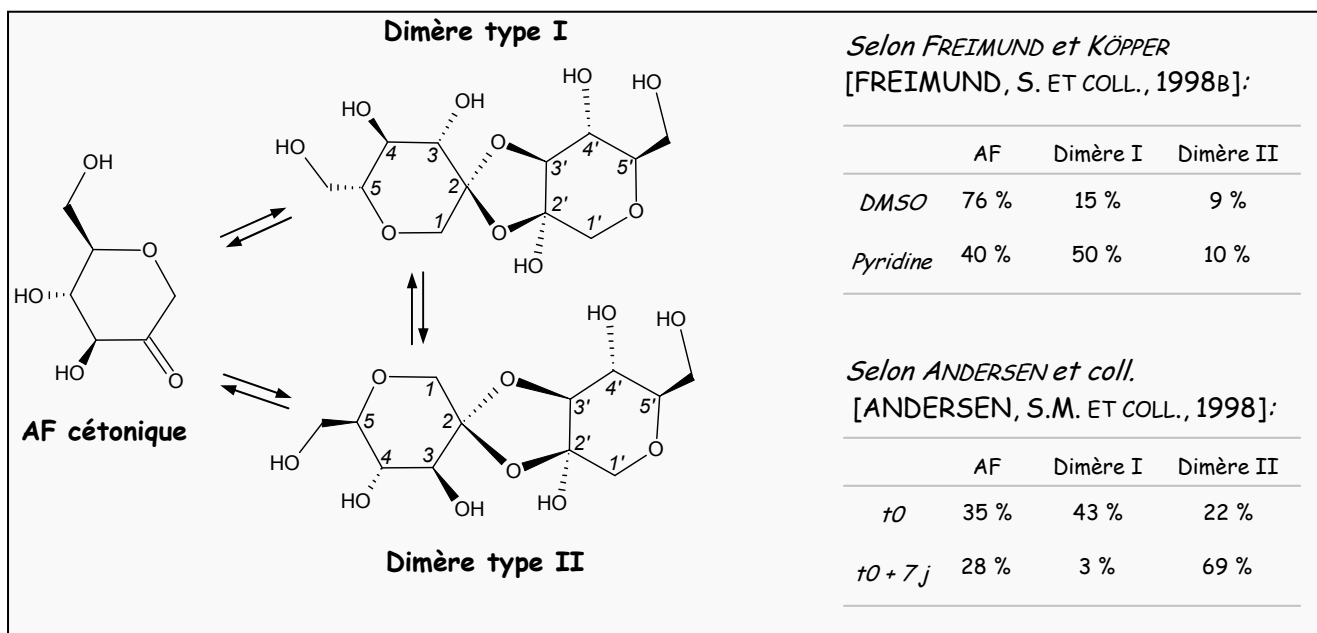


Figure 6 - Formation de dimères de l'AF dans les solvants organiques au côté de la forme cétonique et répartition de ces trois formes dans le DMSO ou la pyridine [ANDERSEN, S.M. et coll., 1998; FREIMUND, S. et coll., 1998b].

Cependant, la présence de ces dimères dans les solvants organiques en plus de l'AF cétonique conduit à des milieux de synthèse finaux complexes à cause des multiples réactions possibles. Pour palier ce problème, ANDERSEN et coll. ont démontré que la dérivation en milieu organique de l'AF en dérivé oxime permet d'obtenir uniquement le monomère (Figure 7) [ANDERSEN, S. M. et coll., 2000].

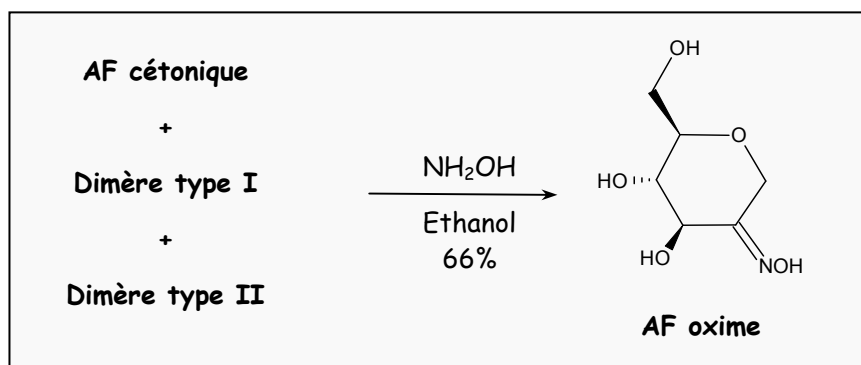


Figure 7 – Dérivation de l'AF en son dérivé oxime dans la pyridine pour l'obtention spécifique du monomère [ANDERSEN, S. M. et coll., 2000].

I.4. Résumé des différentes formes adoptées par la molécule d'anhydr-D-fructose

Pour résumer, la Figure 8 reprend les différentes formes adoptées par l'AF. Cette molécule originale apparaît donc comme un synthon remarquable de par sa structure : pas de carbone anomérique, mais un centre prochiral réactif (fonction carbonyle), une fonction alcool primaire et

plusieurs fonctions alcools secondaires. Elle peut ainsi être utilisée comme point de départ pour la synthèse d'autres molécules d'intérêts divers (voir paragraphe III.3).

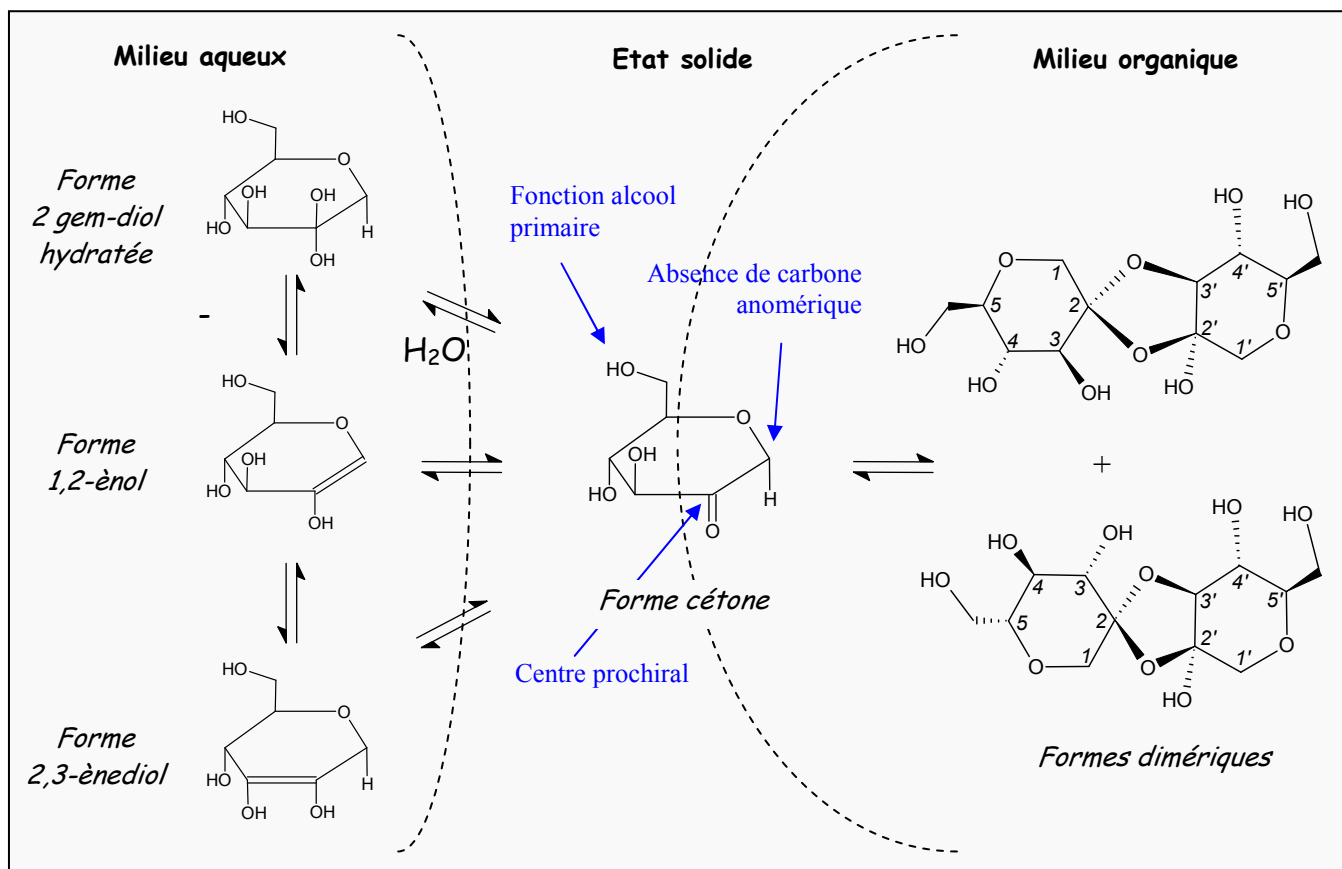


Figure 8 - Récapitulatif des différentes formes adoptées par la molécule d'AF

Nota Bene : Le terme 1,5-anhydro-D-fructose a été attribué à la molécule **9.2** en considérant qu'elle pourrait être le résultat d'une cyclisation par déshydratation entre les carbones C1 et C5 de la forme linéaire du fructose **9.1**. Notons cependant que cette cyclisation du fructose est irréalisable par voie chimique ou biologique.

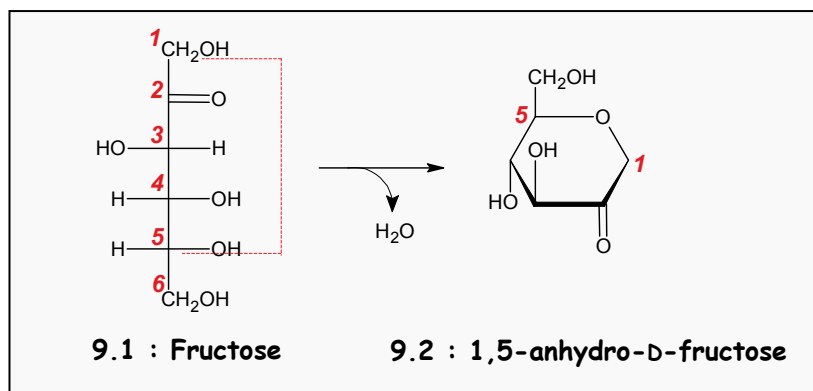


Figure 9 – Origine de la dénomination « 1,5-anhydro-D-fructose ».

Partie II. VOIE D'OBTENTION DE L'ANHYDRO-D-FRUCTOSE

II.1. L'AF au cœur de la troisième voie de dégradation de l'amidon ou du glycogène

II.1.1. Dégradation de polymères de stockage par les deux voies d'hydrolyse et de phosphorolyse

Le glucose représente la principale source d'énergie des organismes vivants: la glycolyse permet la libération d'énergie sous forme d'ATP et l'oxydation du glucose en pyruvate qui contient encore la plus grande partie de l'énergie biologiquement active. Ce pyruvate est par la suite dégradé lors du cycle de Krebs ce qui permet ensuite la libération de CO_2 et H_2O chez les animaux et les végétaux (conditions aérobies) avec libération de 278 kcal (ou 38 moles d'ATP).

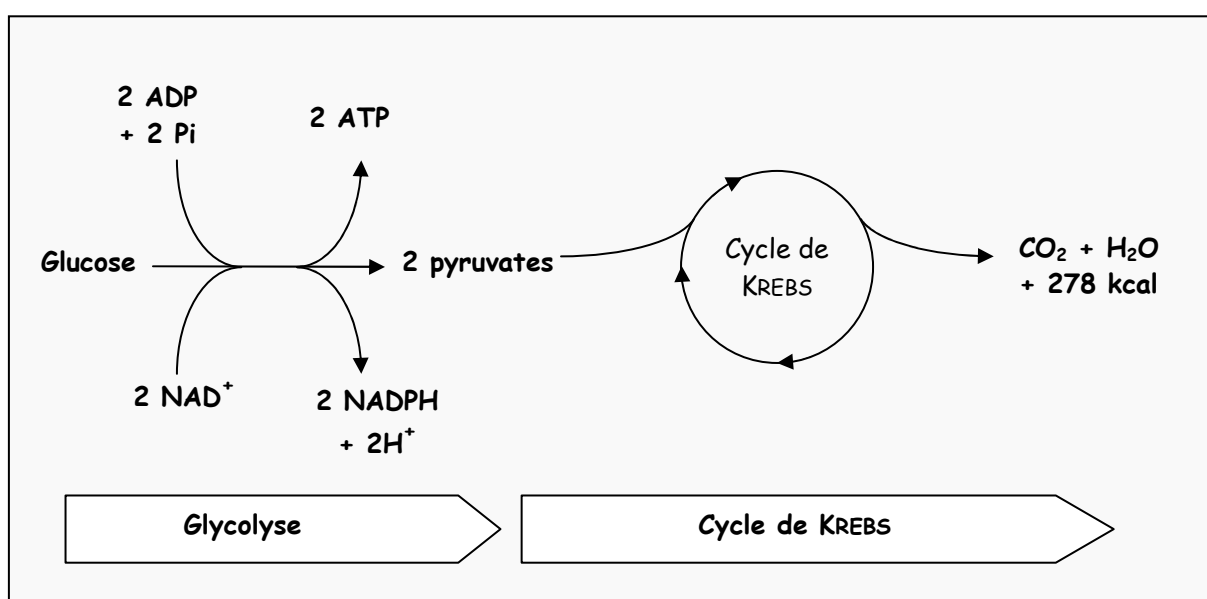


Figure 10 – Dégradation par glycolyse du glucose en pyruvate, ensuite complètement dégradé en CO_2 et H_2O via le cycle de KREBS avec libération d'énergie sous forme d'ATP.

La principale source du glucose indispensable à la vie de nombreux organismes provient de la dégradation de polymères de stockage.

L'amidon et le glycogène sont les principaux polymères de stockage pour le règne végétal et les cellules animales respectivement. L'amidon est constitué de deux polymères : l'amylose (longues chaînes de glucose liées en $\alpha(1-4)$, non ramifié) et l'amylopectine (de même structure mais avec des ramifications de type $\alpha(1-6)$). Quant au glycogène, sa structure est proche de celle de l'amylopectine, mais il est plus ramifié et se présente sous forme plus compacte. Ces polymères de stockage sont donc des α -(1,4)-glucanes.

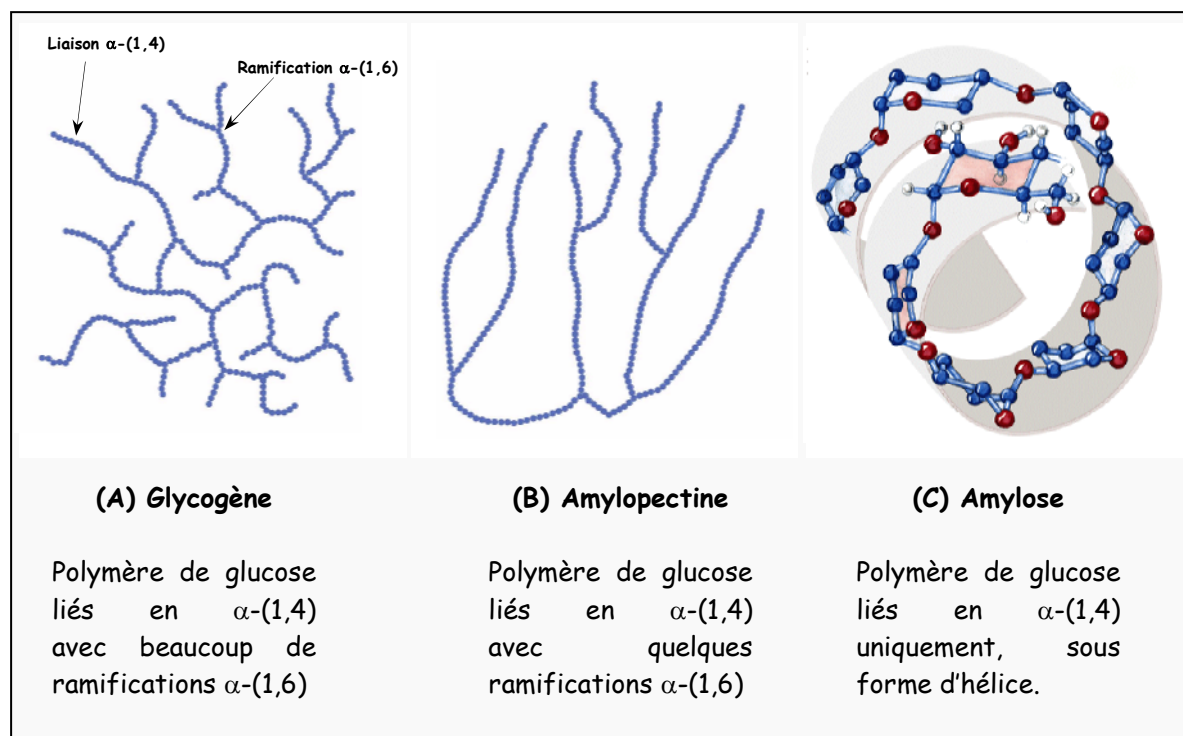


Figure 11 – Représentation du (A) glycogène, (B) de l'amylopectine et (C) de l'amylose.

La libération de glucose par dégradation des polymères de stockage se fait selon deux voies possibles :

- la phosphorolyse : elle conduit à la dégradation complète d'amidon/glycogène en G1P/G6P et glucose (G) par l'action séquentielle de quatre enzymes : La glycogène phosphorylase, l' α -(1,4) glucane 6-glucosyltransférase, l'amylo- α -(1,6)glucosidase et la phosphoglucomutase (Figure 12).
- l'hydrolyse : plusieurs classes d'hydrolases (E.C. 3.2.1.-) interviennent pour dégrader les α -(1,4)-glucanes :
 - les α -amylases : endoglycosidases coupant les liaisons α (1-4) et libérant des oligosaccharides de petites tailles (4 à 8 unités) ; elles sont présentes dans les deux règnes végétal et animal ;
 - les β -amylases : exoglycosidases libérant du maltose à partir de l'extrémité non réductrice (en coupant une liaison sur deux) ; on les trouve uniquement dans le règne végétal ;
 - les amyloglucosidases (dégradation à partir de l'extrémité non-réductrice avec libération de glucose).

Ces enzymes vont conduire à la formation de glucose, de maltooligosaccharides, ainsi que des dextrans limités résultant de la présence des ramifications α -(1,6) non hydrolysées.

Depuis une dizaine d'années, une alternative à ces deux voies de dégradation des polymères de stockage a été proposée : elle fait intervenir l'AF comme composé intermédiaire, avant de conduire à différents métabolites secondaires.

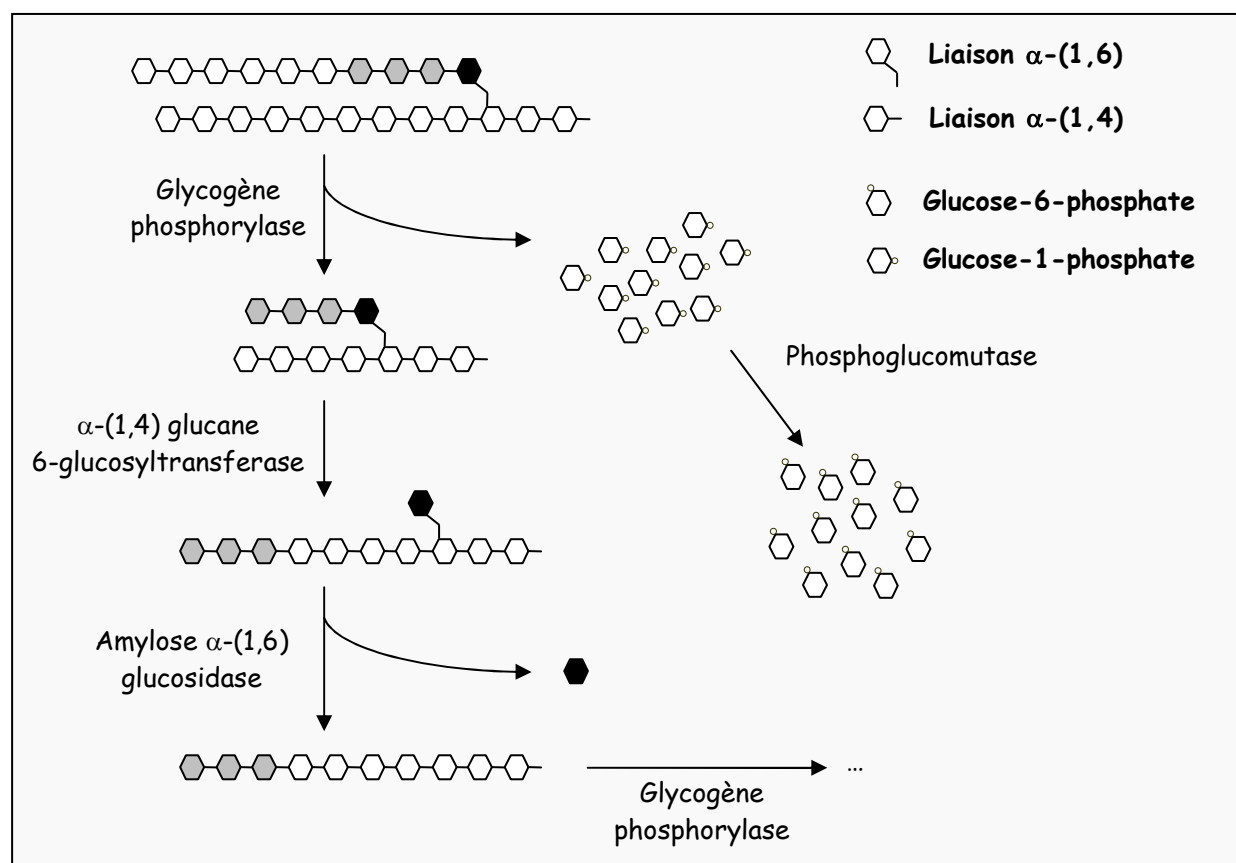


Figure 12 – Dégradation du glycogène par phosphorolyse sous l'action successive de plusieurs enzymes, conduisant à la formation de glucose-6-phosphate, entrant ensuite dans la glycolyse.

II.1.2. Voie de l'anhydro-D-fructose

II.1.2.1. Présence de l'AF dans de nombreux organismes vivants

Au milieu des années 80, BAUTE et DEFFIEUX furent les premiers à mettre en évidence la présence de l'AF chez les organismes vivants. Leurs travaux portaient sur l'étude de molécules à activité antibiotique chez les morilles, tels que la cortalcérone (caractéristique des Basidiomycètes – structure sur la Figure 31), la microthécine et l'échinospirine (chez les Ascomycètes – structures sur la Figure 20). Ces molécules, absentes dans la cellule, apparaissent suite à une agression physique (congélation/décongélation, dessiccation, sonication,...) ou chimique (contact avec des solvants organiques par exemple), qui libèreraient par plasmolyse un ensemble d'enzymes agissant par déshydratation sur leurs précurseurs directs, à savoir la glucosone et l'AF respectivement (Figure 13) [BAUTE, M.R. et coll., 1987; MERLET, D. et coll., 1991].

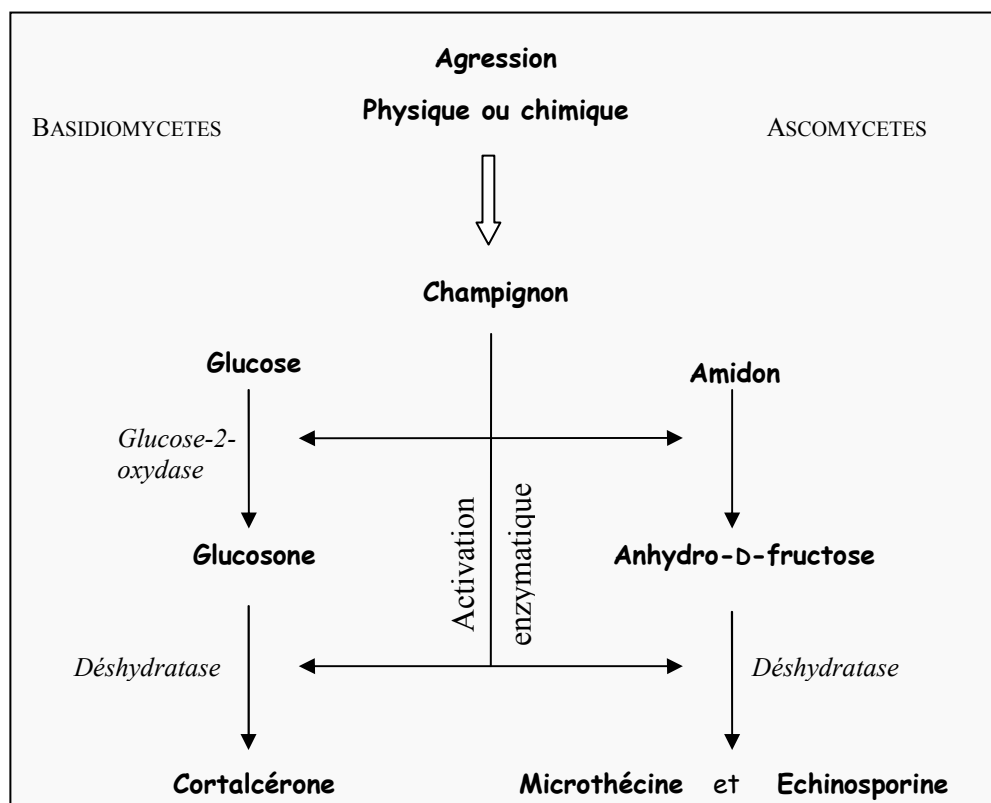


Figure 13 – Synthèse de molécules d'intérêt antibiotique (cortalcérone, microthécine, échinosporine) chez les champignons de type Basidiomycètes et Ascomycètes soumis à un effet activateur modulé par une agression physique ou chimique (congélation/décongélation, dessiccation, sonication, contact avec un solvant organique ...) [MERLET, D. et coll., 1991].

KAMETANI et coll., ont quant à eux, mis en évidence la présence de l'AF chez le rat. L'étude de la distribution de l'AF dans les organes a montré que les plus fortes concentrations se trouvent dans le foie ($0.49 \mu\text{g/g}$ de tissu sec), au niveau de la glande adrénale ($0.12 \mu\text{g/g}$) et la rate ($0.09 \mu\text{g/g}$). Les autres organes contiennent des quantités moindres ($< 0.05 \mu\text{g/g}$) tandis que l'AF est absent du plasma. Plus globalement, la distribution de AF est semblable à celle du glycogène [KAMETANI, S. et coll., 1996].

Ils ont également démontré la présence de l'AF dans les lignées de cellules sanguines humaines, en tant que métabolite intermédiaire pour la synthèse du 1,5-anhydro-D-glucitol à partir de glycogène [SUZUKI, M. et coll., 1996].

Enfin, ces mêmes auteurs ont étudié le métabolisme du glycogène chez *Escherichia coli* C600 : l'AF est présent chez ces bactéries à hauteur de 1 ‰ massique du glycogène, ainsi que l'anhydro-D-glucitol dont le rôle important dans la dégradation du glycogène a été souligné (voir II.1.3) [SHIGA, Y. et coll., 1999].

Des études de quantification de l'AF et de la microthécine (métabolite secondaire de AF à activité antibiotique) par une technique de GC-MS ont montré la présence de l'AF dans de nombreuses algues rouges : la plus riche étant l'espèce *Gracilariopsis lemaneiformis*

(respectivement 1900 et 37 $\mu\text{g AF/g}$ d'algue sèche pour les algues originaires de Californie et de Chine), alors que les autres espèces d'algues rouges, mais aussi vertes et brunes, ne contiennent pas plus de 2 $\mu\text{g/g}$ [BROBERG, A. et coll., 1999].

Tableau 1- Présence de l'AF dans divers organismes vivants.

Organisme vivant	Commentaires	[AF] $\mu\text{g/g}$	Référence
Champignons du genre <i>Ascomycètes</i> (ex : espèces <i>Morchella costata</i> , <i>M. conica</i> , <i>M. vulgaris</i> , <i>Peziza aurantia</i>)	Apparition de l'AF suite à un traitement activateur du champignon.	n.d.	[DEFFIEUX, M.G. et coll., 1987] [MERLET, D. et coll., 1991]
Les algues rouges	1 ^{ère} purification de GLase ⁽¹⁾ appartenant à <i>G. lemaneiformis</i>	n.d.	[YU, S. et coll., 1993a]
Le rat	Majoritairement présent dans le foie.	0.49	[KAMETANI, S. et coll., 1996]
Lignées de cellules sanguines humaines	AF en tant que précurseur du 1,5-anhydro-D-glucitol	n.d.	[SUZUKI, M. et coll., 1996]
L'algue rouge <i>Gracilariaopsis lemaneiformis</i>	Algue la plus riche en AF	37-1900	[BROBERG, A. et coll., 1999]
Algues rouges, vertes, brunes	Teneurs plus faibles en AF	0.01-1.7	[BROBERG, A. et coll., 1999]
<i>Escherichia coli</i> C600	AF intervient dans le métabolisme du glycogène comme précurseur de l'anhydro-D-glucitol	1%o massique du glycogène	[SHIGA, Y. et coll., 1999]
<i>Pseudomonas</i> sp.	Oxydation de AG en AF	n.d.	[NAKAMURA, T. et coll., 1986]

⁽¹⁾ GLase : α -(1,4) glucane-lyase ; n.d. : non déterminé.

II.1.2.2. L' α -1,4-glucane-lyase : une lyase originale à l'origine de l'AF

II.1.2.2.a. Caractérisation de l' α -1,4-glucane lyase

Chez tous les organismes vivants où l'AF a été mis en évidence (excepté chez *Pseudomonas* sp.), sa synthèse résulte de l'action d'une α -(1,4)-glucane lyase (E.C 4.2.2.13 - GLase) agissant sur l'amidon (pour les végétaux) ou le glycogène (pour les animaux).

Cette enzyme a été purifiée et caractérisée pour la première fois par YU et coll. dans les algues rouges *Gracilariaopsis lemaneiformis*, *G. verrucosa*. [BOJSEN, K. et coll., 1999b; YU, S. et coll., 1993a] et *G. chorda* [YOSHINAGA, K. et coll., 1999]. Chez *G. lemaneiformis*, la GLase a été localisée exclusivement dans les chloroplastes [YU, S. et coll., 1993b]. Depuis, d'autres organismes producteurs de GLase ont été identifiés : les champignons *Morchella costata*, *Morchella vulgaris* [YU, S. et coll., 1997], et *Peziza ostracoderma* [BOJSEN, K. et coll., 1999c].

Des alignements de séquences ont permis de classer les GLases au sein de la famille 31 des glycoside-hydrolases (GH) [YU, S. et coll., 1999a].

Si on compare la séquence des GLases à celle des α -glucosidases à rétention de configuration de la même famille 31 des GH, 23 à 28% de leur génome est similaire. De plus, certaines régions des α -glucosidases connues comme intervenant dans la catalyse sont conservées chez les GLases [YU, S. et coll., 1999a]. Ces analogies expliquent l'existence de similarités mécanistiques entre les 2 types d'enzymes (cf. II.1.2.2.c).

Parmi les GLases identifiées, on peut encore distinguer deux groupes taxonomiques. Des alignements de séquences (Tableau 2) indiquent une identité de 75 à 80% au sein de chacune des deux sous-familles des GLases (algues et champignons), et seulement 28-29 % entre ces deux groupes. Ainsi, les GLases d'algues ont une masse molaire d'environ 110 kDa, un pH optimal de 4, et une température optimale entre 40 et 50 °C. Quant aux GLases produites par les champignons, leur taille se situe autour de 120 kDa, le pH optimal se situe autour de 6.5, et présente une température optimale entre 40 et 48 °C (Tableau 2). Elles diffèrent également en terme de spécificité de substrat (maltooligosaccharides, amylopectine ou glycogène), de comportement cinétique, et de propriétés électrophorétiques.

Par contre, les alignements réalisés avec les autres lyases de polysaccharide de la classe E.C. 4.2.2.1-12 ne montrent pas de similarités [YU, S. et coll., 1999a].

Par ailleurs, l'activité de la lyase chute de 80 % entre pH 7.0 et 8.0, ce qui semble indiquer la dégradation des glucanes la nuit, puisque le pH des chloroplastes varie avec la luminosité [YU, S. et coll., 1993b].

Tableau 2 – Caractéristiques des α -(1,4) glucane lyases produites par différentes souches.

	Souche productrice	% d'identité ⁽¹⁾	Réf.
Algues rouges	<i>Gracilariopsis lemaneiformis</i> from China	100 %	[BOJSEN, K. et coll., 1999a; YU, S. et coll., 1993a; YU, S., 2003]
	<i>Gracilariopsis lemaneiformis</i> from California	75	[BOJSEN, K. et coll., 1999a; YU, S., 2003]
	<i>Gracilariopsis lemaneiformis</i> from Venezuela	82	[BOJSEN, K. et coll., 1999a]
	<i>Gracilariopsis verrucosa</i> from Venezuela	n.d.	[YU, S. et coll., 1999b]
	<i>Gracilaria chorda</i>	78	[YOSHINAGA, K. et coll., 1999]
Champignons	<i>Morchella costata</i>	21	[BOJSEN, K. et coll., 1999c; YU, S. et coll., 1997; YU, S., 2003]
	<i>Morchella vulgaris</i>	20	[BOJSEN, K. et coll., 1999c; YU, S. et coll., 1997; YU, S., 2003]
	<i>Peziza ostracoderma</i>	24	[BOJSEN, K. et coll., 1999c; YU, S. et coll., 1999b]

⁽¹⁾ par rapport à la GLase *G. lemaneiformis*.

II.1.2.2.b. Synthèse d'AF par réaction de clivage de glucanes catalysée par l' α -1,4-glucane lyase

Contrairement aux autres lyases de la classe E.C 4.2.2 (pectate lyase : E.C. 4.2.2.2 ; pectine lyase : E.C. 4.2.2.10 ; xanthane lyase : E.C. 4.2.2.12) qui dégradent des polysaccharides contenant des unités acides ou esters, la GLase n'agit que sur des homopolysaccharides (Figure 15, Figure 14)[YOSHINAGA, K. et coll., 1999; YU, S. et coll., 1999a]. Par voie de conséquence, les produits obtenus sont différents.

En effet, la pectate lyase par exemple (Figure 14) clive la liaison glucosidique O1-C4', pour libérer une unité glucose et introduire une double liaison entre le C4' et C5'. Cette réaction d'élimination est facilitée par la présence d'un hydrogène acide (H5') adjacent à la fonction acide. A l'inverse, les homopolysaccharides ne présentent pas ce type d'activation. La GLase clive la liaison glucosidique O1-C1, libérant une unité AF avec une double liaison entre les carbones C1 et C2 (Figure 15): il s'agit de la forme 1,2-ènol de l'AF [YU, S. et coll., 1999a].

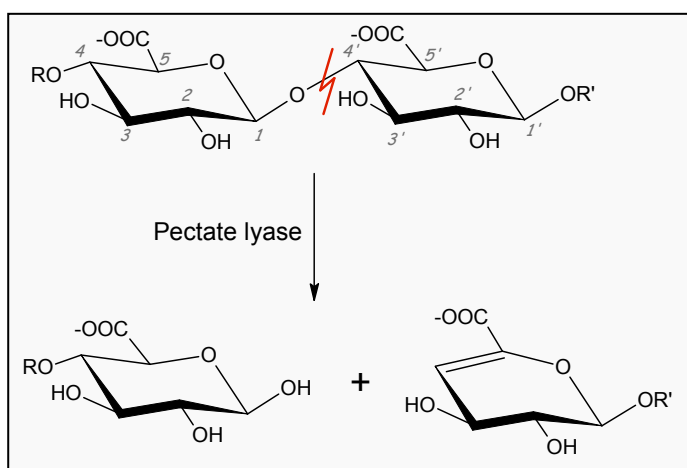


Figure 14 - Réaction de dégradation de polysaccharide catalysée par la pectate lyase (E.C. 4.2.2.2) conduisant au glucose [LEE, S.S. et coll., 2003; YOSHINAGA, K. et coll., 1999].

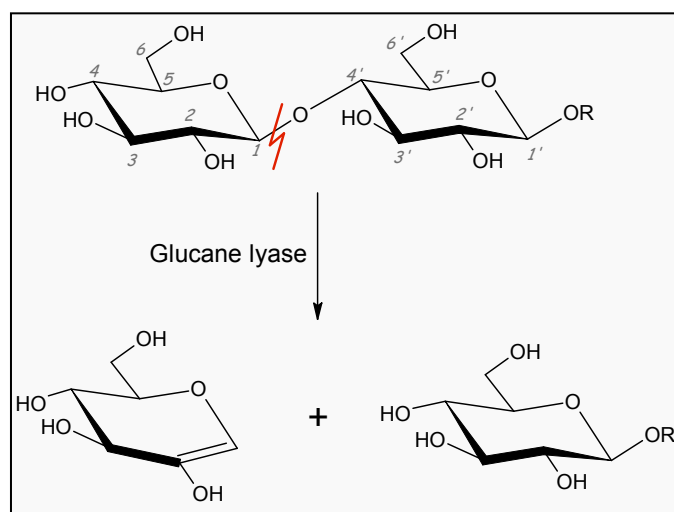


Figure 15 - Schéma réactionnel de la dégradation d' α -(1,4) glucanes catalysée par la GLase avec synthèse d'AF [YU, S., 2000].

La GLase agit préférentiellement sur des oligomères ou polymères de glucose, tels que le maltose, les maltosaccharides, l'amidon ou le glycogène. Aucun monosaccharide (tel que le glucose, mannose ou galactose) n'est utilisé comme substrat par l'enzyme. Elle attaque par l'extrémité non-réductrice (*exo*-lyase) et de façon spécifique les liaisons α -(1,4). La GLase va ainsi cliver les liaisons glucosidiques α -(1-4) successivement en libérant une unité AF selon un

mécanisme d'attaque multichaîne, non processif. La réaction se terminera à la rencontre d'une ramification. Les produits finaux seront donc l'AF, le glucose ou une dextrine limite, dans le cas d'un substrat non linéaire [YU, S. et coll., 1995]. Le rendement en AF libéré sera fonction du degré de ramification du polymère, le glycogène étant le meilleur substrat [YU, S. et coll., 1997].

Pour illustration (Figure 16), avec des maltooligosaccharides linéaires, uniquement du glucose et de l'AF sont obtenus en fin de dégradation avec un ratio AF:Glc de $(n-1):1$ (avec n le nombre d'unités glucose liées successivement par une liaison α -(1,4)). Dans le cas de l'amylopectine ou du glycogène (polymères ramifiés), l'AF et des dextrines limites sont les produits obtenus [YU, S. et coll., 1995].

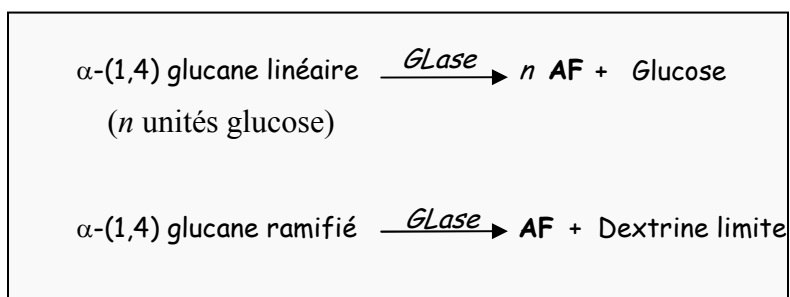


Figure 16 – Synthèse d'AF par réaction de clivage de glucanes catalysée par l' α -1,4-glucane lyase

II.1.2.2.c. Mécanisme de l' α -1,4-glucane lyase

L'élucidation du mécanisme des GLases s'est appuyé sur le mode d'action des α -glucosidases de la famille 31 des GH avec lesquelles de fortes similarités sont observées. Ces analogies suggèrent un mécanisme catalytique similaire.

Le mécanisme catalytique des α -glucosidases se divise en deux étapes successives : la formation d'un complexe covalent glucosyl-enzyme, puis l'hydrolyse de ce complexe. Il fait intervenir deux acides aminés clés : l'un agissant en tant que nucléophile et l'autre en tant que catalyseur acide/base. Chaque étape s'accompagne d'une inversion de configuration : au final, il y a donc rétention de configuration du carbone anomérique.

La première étape consiste en l'action simultanée de deux aa sur le résidu glucosyle de l'extrémité non-réductrice du polysaccharide (Figure 17) : l'oxygène de la liaison glucosidique est protoné par un acide carboxylique (acide glutamique) ce qui favorise l'attaque nucléophile d'un acide carboxylique déprotoné sur le carbone anomérique avec rupture de la liaison C-O, via un

intermédiaire de type oxocarbenium. Le complexe glucosyl-enzyme est formé [YU, S. et coll., 1999a].

Dans la seconde étape, une molécule d'eau est activée par le même acide glutamique ayant joué le rôle d'acide dans la première étape. Cette molécule d'eau attaque alors le carbone anomérique du glucosyl-enzyme pour libérer du glucose (Figure 17), dont la configuration du carbone anomérique est identique à la molécule de départ.

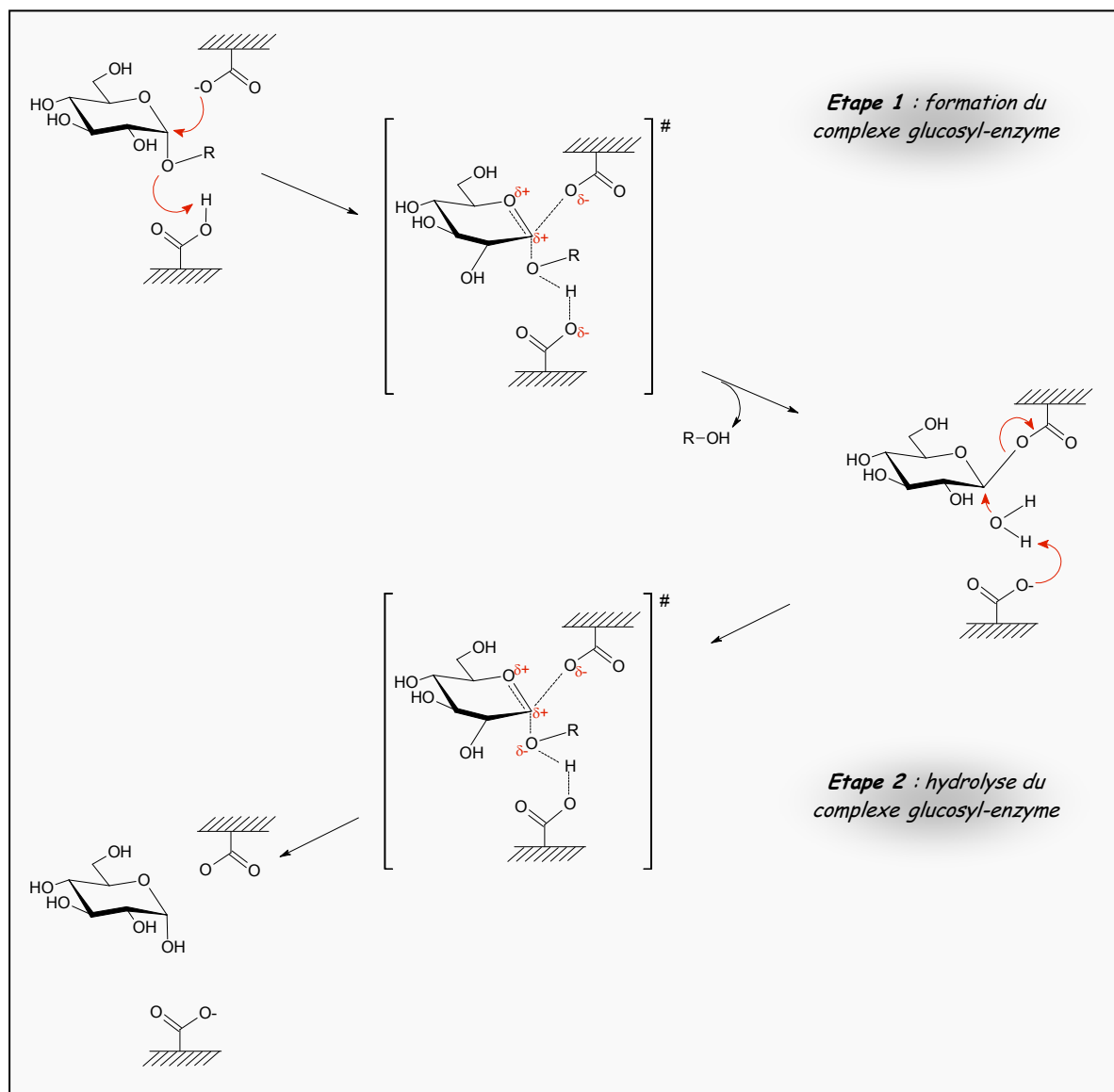


Figure 17 -Mécanisme d'action des α -glucosidases: 1ère étape de formation du complexe covalent glucosyl-enzyme, puis 2nde étape d'hydrolyse du complexe avec libération du glucose [LEE, S.S. et coll., 2002; LEE, S.S. et coll., 2003; YU, S. et coll., 1999a].

Concernant les GLases, il a été suggéré que la première étape du mécanisme soit identique à celle des α -glucosidases précédemment décrite. En effet, il a été démontré que le 1-deoxynojirimycin est un inhibiteur pour les deux enzymes, et que l'utilisation de carbodiimides

inactive aussi bien la GLase que l' α -glucosidase [LEE, S.S. et coll., 2003; YU, S. et coll., 1999a]. De plus, LEE et coll. ont isolé le complexe glucosyl-enzyme à partir de la GLase de *Gracilariopsis* et de fluorure 5-fluoro- β -L-idopyranosyl (5FIdoF – l'un des plus puissants inactivateurs d' α -glucosidase) comme substrat. La liaison covalente glucosyl-enzyme fait ainsi intervenir l'acide aminé Asp 553 de la GLase de *Gracilariopsis*, hautement conservé chez toutes les enzymes de la famille 31 des GH, et notamment les GLases [LEE, S.S. et coll., 2002]. Cet Asp 553 est donc supposé jouer le rôle du nucléophile. Par contre, à ce jour, l'acide aminé donneur de proton n'a pas encore été identifié.

Quant à la seconde étape, elle est nécessairement différente de celle des α -glucosidases puisque ces enzymes libèrent du glucose et la GLase de l'AF. Ainsi, pour les GLases, LEE et coll. suggèrent qu'un troisième acide aminé basique à proximité du nucléophile permet l'attaque de l'hydrogène porté par le C2 du résidu glucosyle pour conduire à l'AF par une réaction de syn-élimination [LEE, S.S. et coll., 2002; LEE, S.S. et coll., 2003] (**Figure 18**).

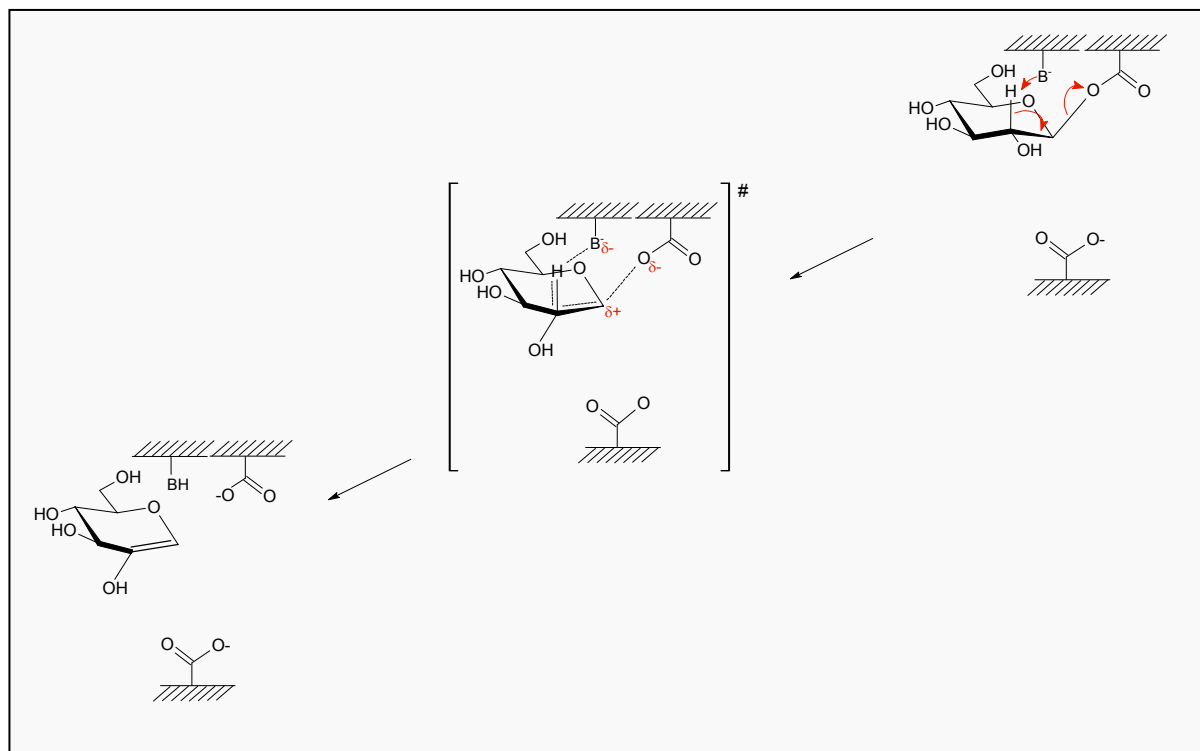


Figure 18 - Seconde étape du mécanisme d'action de la GLase : coupure de la liaison glucosyle-enzyme par réaction d'élimination, avec formation d'AF [LEE, S.S. et coll., 2002; LEE, S.S. et coll., 2003; YU, S. et coll., 1999a].

Les GLases catalysent donc la dégradation d' α -1,4-glucanes en AF par un mécanisme non hydrolytique en 2 étapes : formation d'un complexe glucosyl-enzyme puis syn-élimination. Il fait intervenir trois acides aminés : deux acides carboxyliques jouant le rôle de nucléophile (Asp 253) et de donneur de proton, et une base.

Ces enzymes se distinguent ainsi à la fois des autres lyases de polysaccharides de la classe E.C. 4.2.2.- à laquelle elles appartiennent, et des α -glucosidases de la famille 31 des glycosides hydrolases.

II.1.2.3. AF : un intermédiaire vers la synthèse de métabolites secondaires

L'AF n'est qu'un métabolite intermédiaire dans cette troisième voie de dégradation des α -1,4-glucanes. En effet, selon l'organisme vivant considéré, l'AF conduit à des métabolites secondaires aux propriétés différentes (voir le récapitulatif de la Figure 24 de la page 49).

II.1.2.3.a. Réduction de l'AF en 1,5-anhydro-D-glucitol

Le métabolisme de l'AF en 1,5-anhydro-D-glucitol (AG) est uniquement présent chez les mammifères.

En 1996, SUZUKI et coll. démontrèrent dans les lignées de cellules sanguines humaines que le précurseur immédiat de l'AG est l'AF [SUZUKI, M. et coll., 1996] plutôt que le glucose, initialement décrit comme le précurseur de l'AG chez le rat [SUZUKI, M. et coll., 1994] et chez *E. coli* [SHIGA, Y. et coll., 1993]. D'autres études ont également confirmé ces nouveaux résultats : l'AF est réduit en AG dans les cellules de mammifères [KAMETANI, S. et coll., 1996]. Plus tard, l'enzyme responsable de la synthèse d'AG à partir d'AF fut isolée à partir de foie de porc : il s'agit d'une réductase NADPH dépendante (Figure 19) [SAKUMA, M. et coll., 1998].

D'un point de vue cinétique et thermodynamique, l'AF est moins stable que l'AG *in vivo*. Chez le rat, le glycogène est dégradé en AF à une vitesse de 22 μ g/h, contre 29 mg/h pour la réduction d'AF en AG. L'AF est par conséquent un métabolite instable, et il est rapidement converti en AG qui lui est métaboliquement et physiologiquement inerte [KAMETANI, S. et coll., 1996].

Par ailleurs, KAMETANI et coll. étudièrent la répartition de l'AG dans divers organes chez le rat, et montrèrent une répartition uniforme de l'AG, à l'inverse de l'AF principalement présent dans le foie. Ceci résulte de la faible perméabilité des membranes cellulaires à l'AF, indiquant que l'AF est utilisé au sein de la cellule où il a été produit [KAMETANI, S. et coll., 1996].

Enfin, l'AG est en partie phosphorylé par des kinases dans les cellules de mammifères, dans des proportions différentes selon l'organe étudié [MIZUNO, H. et coll., 1995]. Le produit obtenu est alors l'AG-6-phosphate dont la synthèse est catalysée par une hexo kinase (E.C. 2.7.1.1) (Figure 19) [SHIGA, Y. et coll., 1999; YU, S. et coll., 1999a].

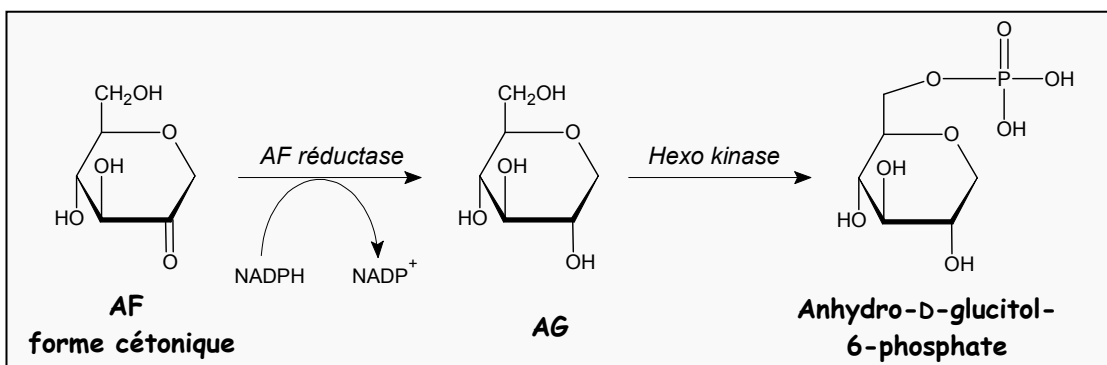


Figure 19 – Réduction de l'AF en 1,5-anhydro-D-glucitol (AG) par une NADPH dépendante réductase, et phosphorylation de l'AG en anhydro-D-glucitol-6-phosphate [SHIGA, Y. et coll., 1999; YU, S. et coll., 1999a].

II.1.2.3.b. Déshydratation de l'AF en microthécine et échinosporine

Lors de leur étude sur les composés à activité antibiotique présents chez les morilles, DEFFIEUX et coll. isolèrent le précurseur de la microthécine [2-hydroxy-2(hydroxyméthyl)-2*H*-pyran-3(6*H*)-one] comme étant l'AF [BAUTE, M.A. et coll., 1989; DEFFIEUX, M.G. et coll., 1987]. Ils proposèrent un mécanisme pour la formation de la microthécine racémique par action de deux déshydratases en début et fin de mécanisme. En accord avec les données spectrophotométriques, il a ainsi été proposé le mécanisme de la Figure 20 [BAUTE, M.R. et coll., 1986].

Chez les morilles *Peziza echinospora*, une activité enzymatique supplémentaire a été mise en évidence par BAUTE et coll. : elle s'ajoute aux deux précédentes déshydratases et intervient en milieu de mécanisme avant la seconde déshydratase. Elle permet ainsi la formation de l'échinosporine [5-epipentenomycin] énantiomériquement pure [BAUTE, M.A. et coll., 1991] (Figure 20).

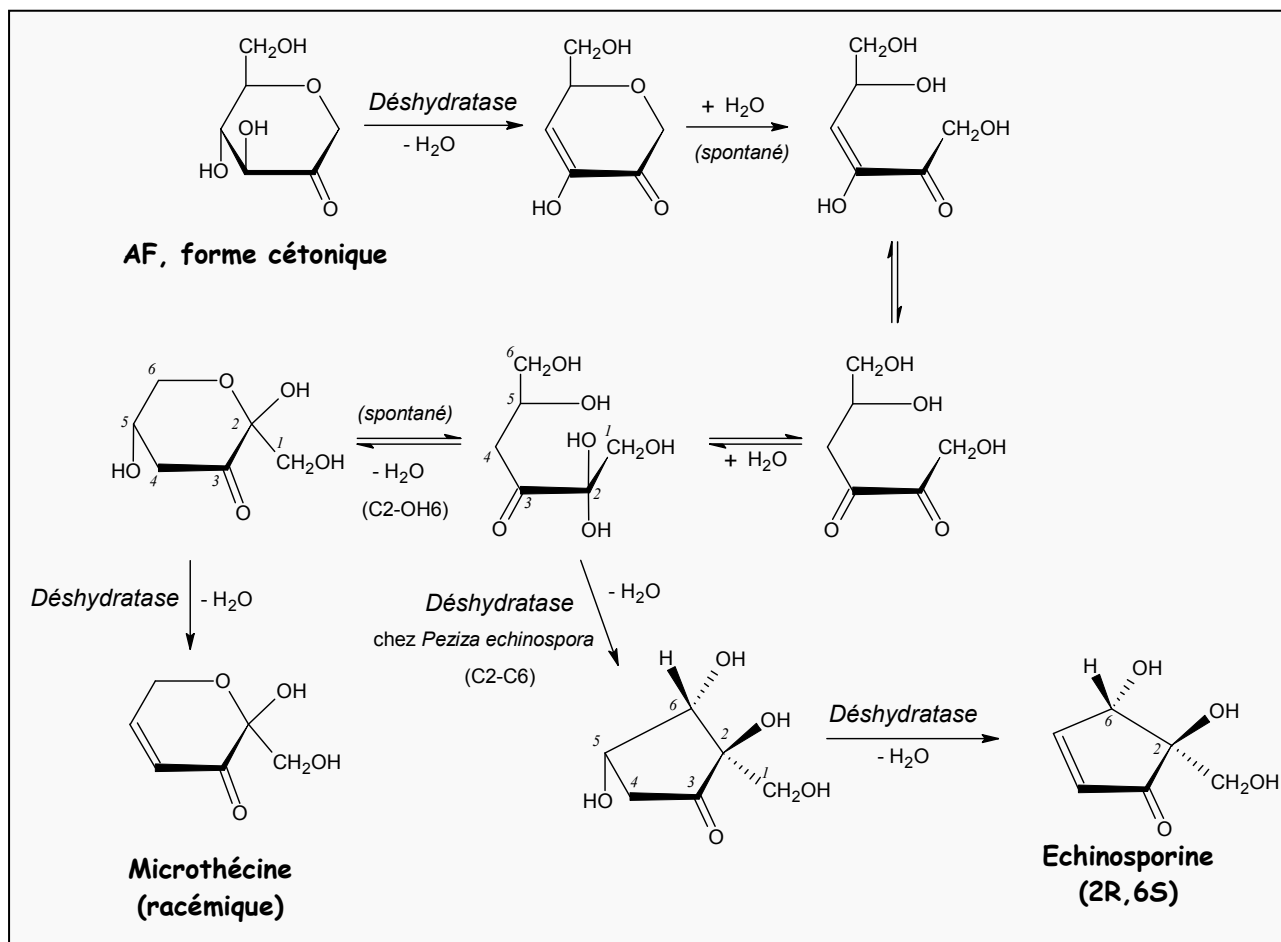
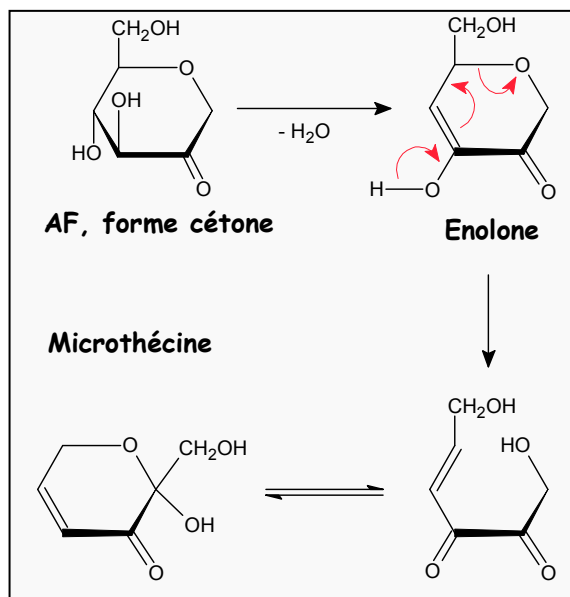


Figure 20 – Mécanisme proposé par BAUTE et coll. pour la synthèse de la microthécine [BAUTE, M.R. et coll., 1986] et de l'échinosporine [BAUTE, M.A. et coll., 1991] à partir d'AF, sous l'action successive de deux déshydratases.

Chez l'algue rouge *Gracilariopsis lemaneiformis*, BROBERG et coll. proposèrent un mécanisme de formation de la microthécine à partir d'AF différent de celui décrit par BAUTE et coll. chez les morilles. Par le biais d'études RMN et de marquage isotopique, la formation de la microthécine ne peut pas suivre le mécanisme proposé par BAUTE et coll. (au niveau des étapes d'hydrolyse de la liaison ether intramoléculaire et de l'équilibre céto-énolique). BROBERG et coll. proposèrent donc le mécanisme de la Figure 21. Ces étapes sont nécessairement sous contrôle enzymatique pour rendre compte de la formation de microthécine à partir d'énolone [BROBERG, A. et coll., 1996].

Figure 21 – Mécanisme de formation de la microthécine à partir de l'AF proposé par BROBERG et coll. [BROBERG, A. et coll., 1996].



II.1.2.3.c. Formation d'ascopyrone à partir d'AF

BAUTE et coll. ont mis en évidence la synthèse d'ascopyrone P [1,5-anhydro-4-deoxy-D-glycero-hex-1-en-3-ulose, APP] et d'ascopyrone T (APT) à partir d'AF catalysée selon eux par une seule déshydratase chez le champignon *Anthracobia melaloma* et chez diverses truffes (*Tuber melanosporum* et *Terfezia* sp.) [BAUTE, M.A. et coll., 1993]. Récemment, YU et coll. purifièrent et caractérisèrent partiellement chez *Anthracobia melaloma* deux enzymes nécessaires à la formation d'APP à partir d'AF : une AF-déshydratase (AFDH) qui intervient en premier pour former l'ascopyrone M, et une ascopyrone tautomérase (APTMT) qui catalyse ensuite l'isomérisation de l'APM en APP [YU, S. et coll., 2004b] (Figure 22).

Ainsi, selon YU et coll., l'AFDH est présente chez toutes les espèces produisant de l'ascopyrone (P, T et M). Par contre, l'APTMT est uniquement présente chez les champignons *Anthracobia melanoma* et ceux de l'ordre des *Pezizales* (*Peziza petersi*, *Plicaria anthacina*, ...) chez qui l'APP a été mise en évidence. Quant aux champignons de l'ordre des *Tuberales* (truffes des espèces *Tuber melanosporum* et *Terfezia* sp.), l'APTMT étant absente, c'est de l'APT qui est obtenu par équilibre avec l'APM.

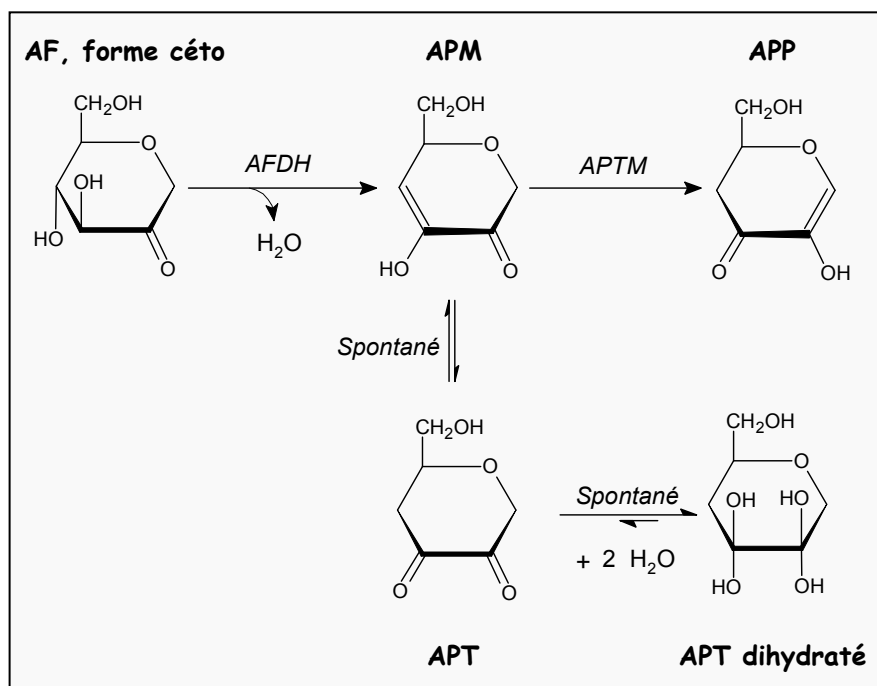


Figure 22 – Formation de l'ascopyrone P (APP) à partir d'anhydro-D-fructose (AF) via l'intermédiaire ascopyrone M (APM) sous l'action successive de deux enzymes : l'AF-déshydratase (AFDH) et l'ascopyrone tautomérase (APTM) [YU, S. et coll., 2004b].

Ainsi cette voie de synthèse enzymatique de l'APP à partir de l'AF est une alternative plus efficace à la synthèse chimique en 8 étapes à partir du glucose, décrite récemment par ANDERSEN et coll. [ANDERSEN, S.M. et coll., 2002a], ou à celle développée par une équipe de scientifiques américains basée sur la pyrolyse de l'amylopectine, de l'amylose ou de la cellulose, et conduisant à des rendements inférieurs à 3 % avec des étapes de purification complexes [SHAFIZADEH, F. et coll., 1978; STEVENSON, T. et coll., 1981].

II.1.3. Rôle physiologique de AF

Le rôle physiologique de la dégradation du glycogène/amidon via l'AF est aujourd'hui encore mal compris. En effet, les deux autres voies que sont l'hydrolyse et la phosphorolyse sont primordiales pour le développement cellulaire, mais celle de l'AF n'apporte pas d'énergie. Par ailleurs, comme nous l'avons vu au paragraphe II.1.2.3, les métabolites secondaires de la voie de l'AF diffèrent selon le groupe taxonomique considéré.

Chez les mammifères et les procaryotes, l'AF réduit en AG pourrait fonctionner comme un régulateur du métabolisme des sucres [SAKUMA, M. et coll., 1998; SHIGA, Y. et coll., 1999] (Figure 23). En effet, chez *E. coli*, une fois le glucose extracellulaire épuisé, l'AG est synthétisé et relargué dans le milieu [SHIGA, Y. et coll., 1993], puis l'AG est réabsorbé pour être phosphorylé

en AG-6-phosphate [MIZUNO, H. et coll., 1995; SHIGA, Y. et coll., 1996], qui sera lui-même relargué vers l'extérieur [SHIGA, Y. et coll., 1996]. A partir de ces observations, SHIGA et coll. proposèrent le mécanisme de régulation du métabolisme du glycogène de la Figure 23 [SHIGA, Y. et coll., 1999] : lorsque le glucose est abondant dans le milieu, le glycogène est synthétisé et stocké, tandis que la GLase synthétise de l'AF. La concentration intra-cellulaire est constante et faible, l'excédant étant transféré vers le milieu extra-cellulaire. Tant qu'il y a du glucose, l'AF s'accumule dans le milieu extérieur et n'est pas réduit en AG. Par contre, lors de l'épuisement du glucose, la réduction dans la cellule de l'AF n'est plus inhibée et il se forme de l'AG, ce qui induit la dégradation du glycogène. Enfin, l'utilisation du glycogène est stoppée par la phosphorylation de l'AG en AG-6-P qui, excrété, n'agit plus sur la dégradation du glycogène.

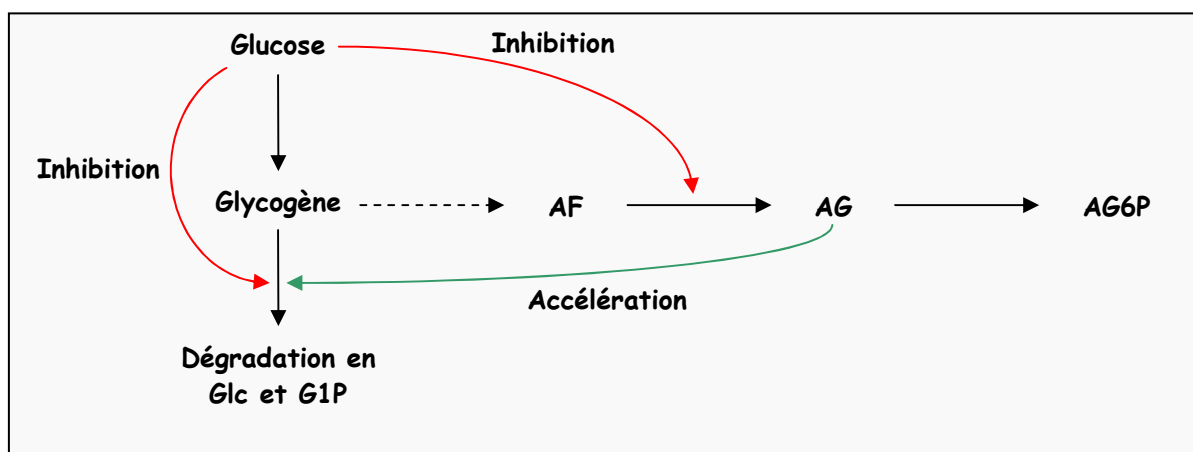


Figure 23 – Mécanisme de régulation du métabolisme du glycogène, faisant intervenir l'anhydro-D-fructose (AF), l'anhydro-D-glucose (AG) et l'AG-6-phosphate (AG6P) [SHIGA, Y. et coll., 1999].

Quant aux champignons et aux algues, l'AF conduit à plusieurs métabolites secondaires avec des fonctions potentielles dans la réponse au stress. Chez les champignons, DEFFIEUX et coll. ont supposé que la synthèse de l'AF puis de la microthécine est un moyen de se protéger des agressions extérieures, grâce à ses propriétés antibiotiques [BAUTE, M.A. et coll., 1989]. Chez les plantes, l'AF étant localisé au niveau du chloroplaste, YU et PETERSEN supposent que grâce à son pouvoir réducteur élevé, l'AF protège le chloroplaste des dommages radicalaires [YU, S. et coll., 1993b].

II.1.4. Comparaison des métabolites obtenus lors de la dégradation de glucanes

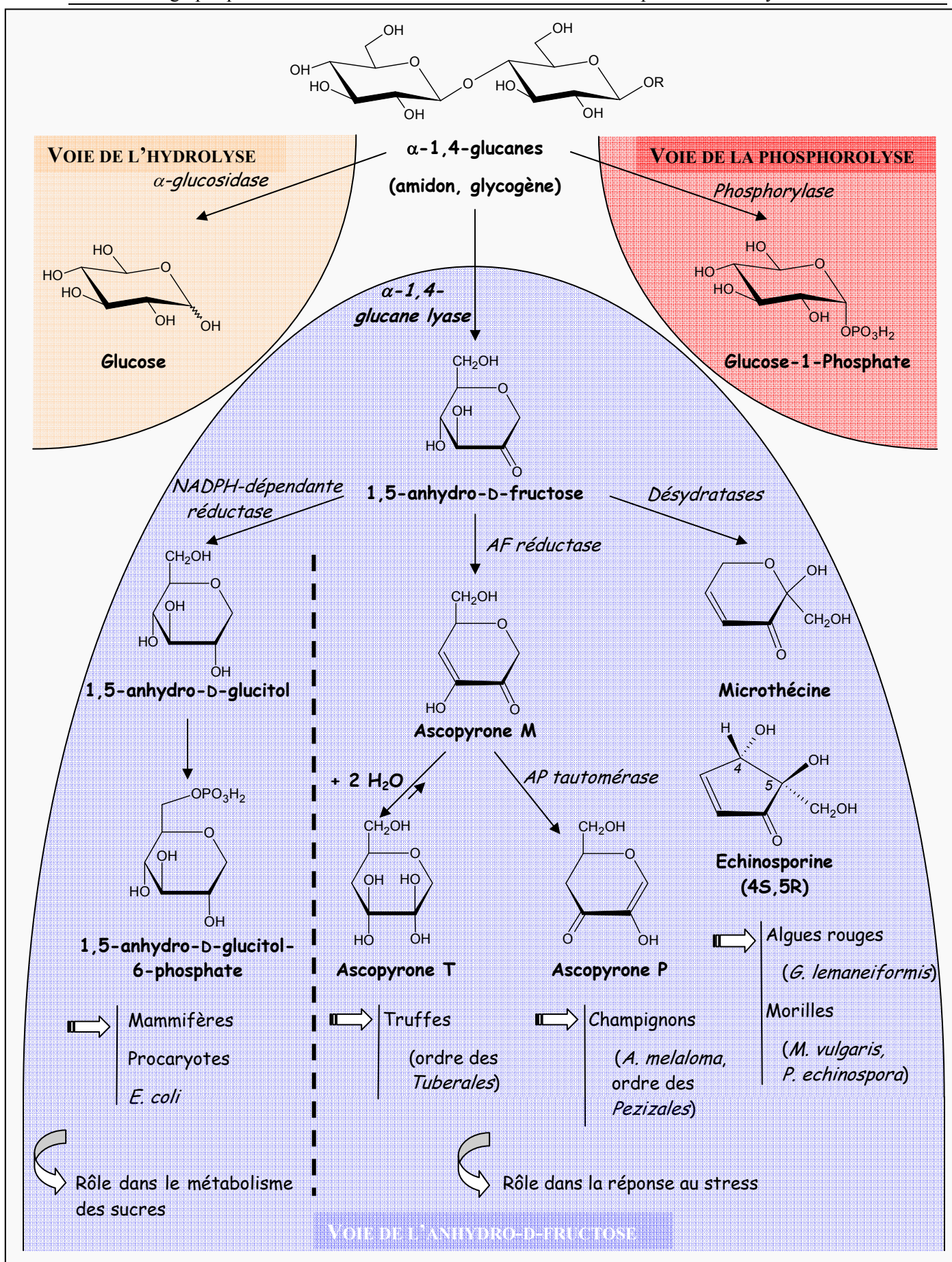


Figure 24 – Comparaison des 3 voies de dégradation d' α -(1,4) glucanes (amidon ou glycogène), et synthèse de divers métabolites secondaires à partir de l'AF.

II.2. Synthèse chimique de AF

II.2.1. Synthèse à partir d'hydroxyglucals

Historiquement, l'AF a d'abord été synthétisé par voie chimique avant sa mise en évidence dans les organismes vivants et sa synthèse par voie enzymatique.

En 1980, LICHTENTHALER et coll. furent les premiers à mettre en place une voie de synthèse rapide des 1,5-anhydrocétoses à partir d'hydroxyglucals benzoylés **24.1** [LICHTENTHALER, F.W. et coll., 1980] (Figure 25). Ces derniers sont facilement obtenus à partir de glucose en 3 étapes [ANDERSEN, S.M. et coll., 2002b].

La synthèse développée par LICHTENTHALER et coll. consiste à protéger la fonction cétone par dérivaison en oxime (**24.2**), puis débenzoyler et déprotéger la fonction oxime de **24.3**.

Une alternative à cette voie de synthèse, plus délicate, consiste à déprotéger la fonction cétone de **24.2** pour la transformer en fonction thiocétale (**24.6**) et ensuite débenzoyler (**24.7**) puis déprotéger la fonction carbonyle pour obtenir l'AF [LICHTENTHALER, F.W. et coll., 1980].

Dix ans plus tard, LICHTENTHALER et coll. ont décrit une 3^{ème} voie de synthèse chimique : au lieu de passer par le dérivé oxime **24.2**, ils ont exploité la réactivité des 2-oxoglycosyl bromides benzoylés **24.8**. Ces composés peuvent être efficacement obtenus avec un rendement de 90% à température ambiante à partir de **24.1**. Ensuite l'AF tribenzoate **24.5** est obtenu par voie radicalaire en utilisant Br₃SnH/hv ou AIBN [LICHTENTHALER, F.W. et coll., 1990].

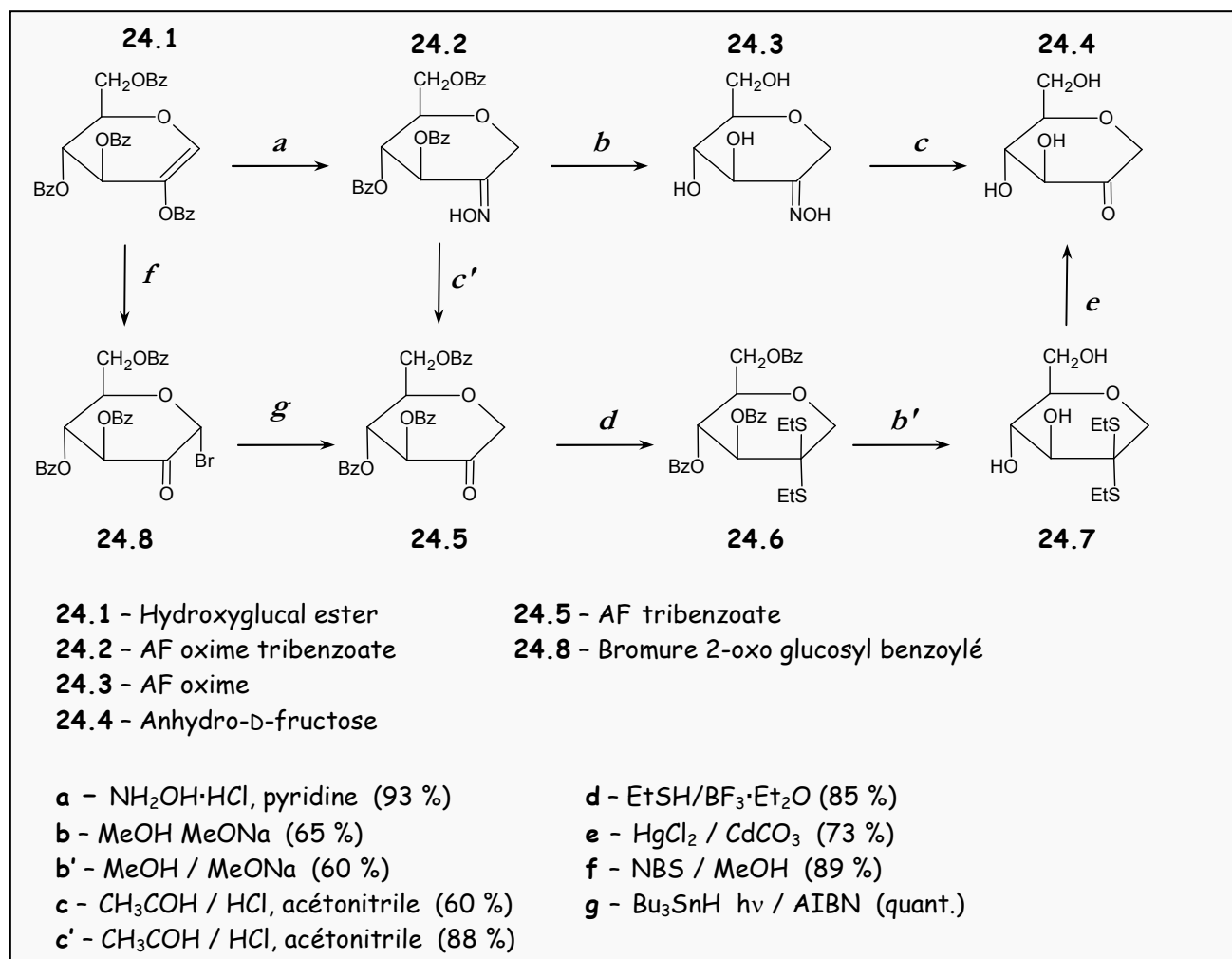


Figure 25 – Différentes voies de synthèse chimique de l'AF à partir d'hydroxyglucals benzoylés proposées par LICHTENTHALER [LICHTENTHALER, F.W. et coll., 1980; LICHTENTHALER, F.W. et coll., 1990].

II.2.2. Synthèse à partir du 1,5-anhydro-D-glucitol

Les travaux de NAKAMURA et coll. sur l'anhydro-D-glucitol **25.1** ont fait l'objet d'un dépôt de brevet portant sur la synthèse chimique de l'AF à partir d'anhydro-D-glucitol. L'oxydation chimique spécifique de la fonction hydroxyle secondaire de l'anhydro-D-glucitol en C2 est impossible sans oxyder les autres fonctions hydroxyles. Leur invention consiste donc à protéger d'abord les fonctions hydroxyles portées en C4 et C6 par acétalisation (**25.2**), puis celle en C3 par monosilylation (avec un rendement modéré à cause de la synthèse de l'isomère de position en C2) (**25.3**). Dès lors, l'oxydation spécifique de la fonction alcool portée par le C2 de **25.3** est possible, avant déprotection complète par catalyse acide pour obtenir l'AF.

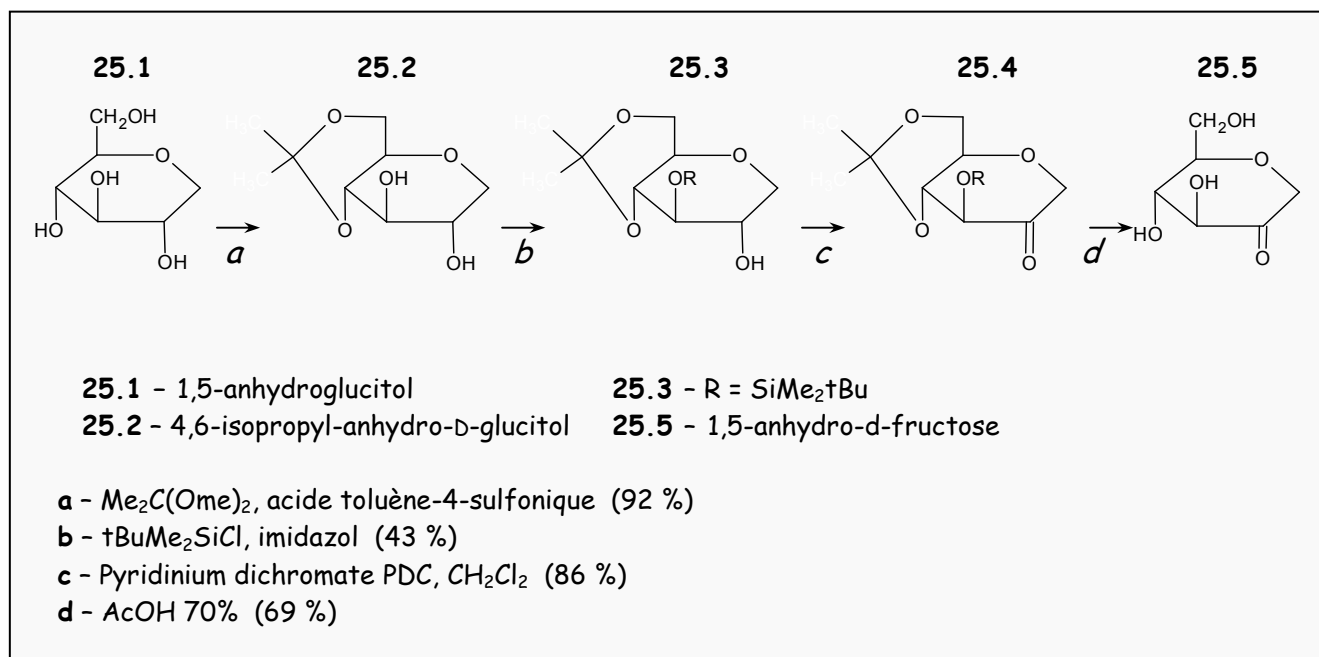


Figure 26 - Synthèse chimique de l'AF par oxydation de l'anhydro-D-glucitol proposé par NAKAMURA et coll. [NAKAMURA, T. et coll., 1988].

Mais ces synthèses chimiques de l'AF mettent bien en avant la difficulté à faire réagir spécifiquement certaines fonctions alcools, obligeant à passer par de multiples étapes de protection/déprotection. Ces voies sont par conséquent coûteuses, et expliquent le peu de travaux réalisés sur l'AF, jusqu'à la mise en évidence de sa synthèse par voie enzymatique où le nombre d'étapes et donc les coûts (notamment de l'enzyme) sont moindres.

II.3. Synthèse enzymatique du 1,5-anhydro-D-fructose

II.3.1. Production d'AF à partir d'amidon et de glucane-lyase

L'AF est aujourd'hui principalement produit par dégradation de l'amidon, en présence de glucane-lyase. Dans le cadre du projet européen auquel participent ces travaux de thèse, la production d'AF est assurée par la société DANISCO.

Le Tableau 3 ci-dessous récapitule les brevets déposés sur la production enzymatique d'AF à partir d' α -1,4-glucanes.

Tableau 3 – Brevets portant sur la production d'AF

Brevet # (Année)	Intitulé	Auteurs	Process
FR 2617502 [BAUTE, M. A. et coll., 1989]	Préparation enzymatique d'AF	BAUTE M.A. et coll.	Solution contenant un α -(1,4) glucane et une enzyme produite par les champignons Macro-Ascomycètes et Discomycètes
WO 94/09122 [KENNE, L. et coll., 1994]	A new glucane lyase producing AF	KENNE L. et coll.	Description de l'action de l' α -glucane lyase isolée chez <i>G. lemaneiformis</i> et <i>G. verrucosa</i>
US 2003 207 409 [YU, S. et coll., 2003]	Use of α -glucan lyase for preparation of AF	YU S. et coll.	Production de 100 ^{ème} de g d'AF : α -(1,4) glucane lyase + α -(1,4) glucane-lyase pure issue de champignons (<i>Morchella</i>) ou d'algues (<i>Gracilariaopsis</i>) + hydrolase spécifique des liaisons autres que α -(1,4).
WO 96/12026 [YU, S. et coll., 1996]	α -glucane lyase and its use in the production of AF	YU S. et coll.	Description de la glucane lyase de <i>Gracilariaopsis lemaneiformis</i> . Utilisation de l'enzyme purifiée pour la production d'AF.

II.3.2. Oxydation de l'anhydro-D-glucitol en AF à l'aide de pyranose-oxidase

NAKAMURA et coll. travaillent depuis 1986 sur les pyranose-oxidases (POx) produites par les souches du genre *Pseudomonas* [NAKAMURA, T. et coll., 1986]. Ces enzymes permettent d'oxyder de façon spécifique les fonctions alcool de sucres.

Sans connaître parfaitement l'activité enzymatique, ils démontrèrent que l'enzyme produite par la nouvelle souche *Pseudomonas* sp. NK-85001 utilisait uniquement l'anhydro-D-glucitol (= 1-deoxy-D-glucose) comme substrat, conduisant à l'AF en présence d'un accepteur d'électrons (tel que l'O₂, la phénazine méthosulfate, le 2,6-dichlorophénolindophénol – DCIP). Depuis, cette enzyme a été caractérisée : c'est une pyranose-oxydase (POx) produite par différents microorganismes tels que *Pseudomonas* sp., *Coriolus consors*, *Coriodres versicolor* [FREIMUND, S. et coll., 1998a; NAKAMURA, T. et coll., 1986].

FREIMUND et coll. ont confirmé ces travaux en démontrant que le 1,5-anhydro-D-glucitol est facilement oxydé en AF en présence de POx de la souche *Peniophora gigantea* avec un rendement de 98 % [FREIMUND, S. et coll., 1998a; GIFFHORN, F. et coll., 2000; YABUUCHI, M. et coll., 1989](Figure 27).

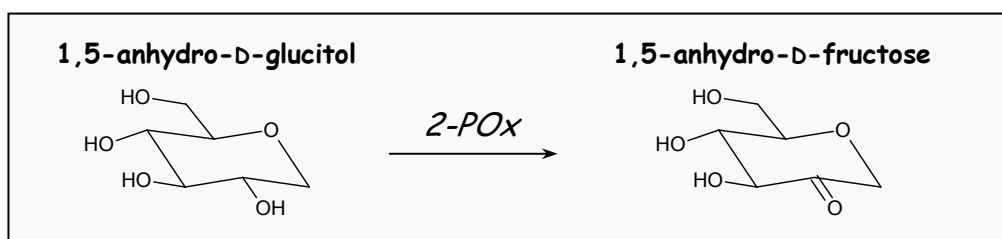


Figure 27 – Synthèse de l'AF par oxydation enzymatique du 1,5-anhydro-D-glucitol à l'aide de pyranose-2-oxydase (2-POx) de *Pseudomonas* sp. [FREIMUND, S. et coll., 1998a].

Partie III. PROPRIETES ET APPLICATIONS DE L'ANHYDRO-D-FRUCTOSE

III.1. Toxicologie de l'AF

Dans la perspective de l'utilisation de l'AF notamment dans l'industrie agro-alimentaire (IAA), des études ont été menées pour mettre en évidence sa non-toxicité.

YU et coll. ont démontré par le test d'AMES¹ la non génotoxicité de l'AF sur 5 souches de la bactérie *Salmonella typhimurim*, et l'absence de mutations chez les mammifères (essais réalisés sur des cellules de lymphome de souris). Administré à hautes doses de 5g/kg d'AF chez le rat, aucune

¹ Test de mutagenèse consistant à examiner si une substance chimique ou agent physique est capable d'induire des mutations spécifiques chez différentes souches de *Salmonella typhimurim*.

toxicité n'a été observée dans les 15 jours suivants l'expérience. De même, pour les souris, l'injection intraperitonéale quotidienne de 2g/kg d'AF n'a induit aucun effet indésirable dans le mois suivant. Il est ainsi clair que l'AF présente peu ou pas de toxicité [YU, S. et coll., 2004a].

III.2. Propriétés de l'AF d'intérêt applicatif

III.2.1. Antioxydant

III.2.1.1. Antioxydants = agents préventifs du stress oxydant

Un antioxydant est défini comme une molécule permettant de prévenir, d'inhiber ou de réduire la vitesse d'oxydation d'un milieu oxydable. Les antioxydants sont très largement utilisés dans l'industrie agro-alimentaire (IAA), et plus particulièrement en présence de corps gras insaturés : l'oxydation de ces derniers peut générer de nouvelles propriétés indésirables tant au niveau du goût que de l'odeur. Les antioxydants sont également omniprésents dans les systèmes biologiques, car ils protègent les composants cellulaires (l'ADN, les protéines, les membranes ...) des dégâts occasionnés par des espèces oxygénées actives (le peroxyde d'hydrogène, les radicaux hydroxyles, l'oxygène singulet, etc ...).

Dans les organismes vivants, les cellules et tissus se protègent de l'oxydation grâce à un arsenal d'enzymes (superoxydase dismutase (SOD), glutathion peroxydase, catalase) et à des micronutriments telles que l'acide ascorbique (plus connu sous le nom de vitamine C, Figure 28), l' α -tocophérol (ou vitamine E, Figure 28) [MORISAKI, K. et coll., 1996]. Ces antioxydants peuvent être utilisés tels quels dans l'IAA, mais présentent plusieurs inconvénients :

- ils sont relativement coûteux lorsqu'ils sont d'origine naturelle ;
- ils présentent une susceptibilité à se dégrader rapidement ;
- une activité en général faible, excepté pour la vitamine C, l'un des plus puissants antioxydants ;
- ils sont généralement peu solubles dans les phases lipidiques, comme c'est le cas pour la vitamine C. Il est alors nécessaire d'utiliser des ascorbyl esters tel que le stearate, palmitate ou laurate d'ascorbyle.

C'est pourquoi sont utilisés des antioxydants synthétiques, tels que l'hydroxyanisole butylée, ou l'hydroxytoluène butylé (en cours d'interdiction).

Plus généralement, les antioxydants chimiques incluent des amines aromatiques, des phénols substitués, et des composés sulfurés [BUCHTER-LARSEN, A. et coll., 1998]. Signalons également qu'il existe des préparations industrielles antioxydantes, comme, par exemple, les

fort pouvoir réducteur de l'AF. En effet, cette forme est prédominante en milieu alcalin, comme l'ont montré les études RMN [YU, S. et coll., 1998].

Notons que la forme 2,3-ènediol présente une forte analogie structurale avec la vitamine C (Figure 28) dont l'activité anti-oxydante largement décrite dans la littérature résulte de la forte capacité à libérer des électrons [KURATA, T. et coll., 1996; MORISAKI, K. et coll., 1996].

La capacité de l'AF à piéger les espèces radicalaires à présent démontrée, il est impératif de connaître les produits d'oxydation de l'AF afin de pouvoir l'utiliser comme anti-oxydant alimentaire par exemple. ANDERSEN et coll. ont étudié le comportement de l'AF dans les conditions oxydantes. Sous O₂, en milieu légèrement alcalin (pH ≈ 8.5), l'AF est facilement oxydé au niveau du carbone C3 pour conduire au 1,5-anhydro-D-*erythro*-hexo-2,3-diulose ; par contre, sous atmosphère inerte, il se forme du 1,5-anhydro-D-*ribo*-hex-3-ulose [ANDERSEN, S. M. et coll., 2000] (Figure 29).

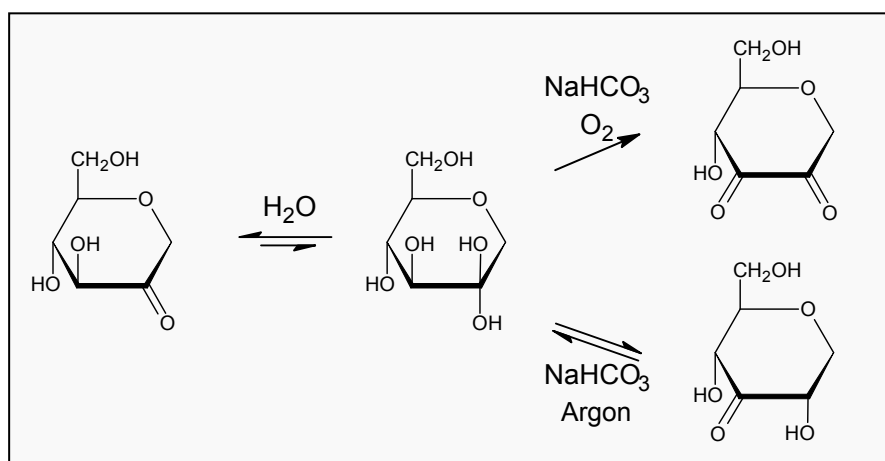


Figure 29 - Produits d'oxydation de l'AF (l'hydrogénocarbonate NaHCO₃ permettant de se placer à un pH voisin de 8.5) [ANDERSEN, S. M. et coll., 2000]

Au final, l'AF présente toutes les qualités requises pour se substituer aux anti-oxydants actuels : (1) un potentiel antio-xydant remarquable ; (2) une origine naturelle, et sa synthèse se fait dans des conditions douces à partir de matières premières renouvelables (amidon et glucane lyase) impliquant ainsi un faible coût de production ; (3) l'AF est non métabolisable, et non toxique [BUCHTER-LARSEN, A. et coll., 1998; FUJISUE, M. et coll., 1999; YU, S. et coll., 1996].

Les brevets revendiquant l'utilisation de l'AF comme antioxydant se multiplient, avec des applications dans divers domaines tels que la médecine, l'industrie alimentaire, les cosmétiques [BUCHTER-LARSEN, A. et coll., 1998; FUJISUE, M. et coll., 1999; YU, S. et coll., 1996].

Cependant, à l'heure actuelle, l'AF n'est pas encore commercialisé, et l'optimisation de la production à l'échelle industrielle est l'un des objectifs majeurs de sa valorisation.

III.2.1.3. Développement d'anti-oxydants amphiphiles

Le caractère hydrophile des anti-oxydants limite leur utilisation dans les phases lipidiques : l'acide ascorbique, très peu soluble dans les corps gras protège peu ces produits de l'oxydation [ANDERSEN, S. M. et coll., 2000]. De la même façon, l'AF est peu liposoluble, ce qui freine son développement et l'étendue de ses applications.

L'objectif est donc de conférer à de telles molécules un caractère lipophile en leur greffant, par exemple, une chaîne alkyle sur l'une de leurs fonctions hydroxyles par réaction d'acylation. Mais pour conserver les propriétés oxydantes, il est important de ne pas modifier le système 2,3-enediol en effectuant la réaction d'acylation sur la fonction hydroxyle primaire.

Ainsi, ANDERSEN et coll. [ANDERSEN, S.M. et coll., 1999; ANDERSEN, S. M. et coll., 2000] ont mis en place cette dérivation de l'AF par voie chimique et enzymatique à partir d'acides gras, permettant ainsi d'avoir une molécule amphiphile protégeant aussi bien les milieux organiques que aqueux de l'oxydation en venant se placer à l'interface.

III.2.2. AF : agent antimicrobien

Un agent antimicrobien est une substance qui tue, empêche ou inhibe la croissance ou la reproduction de pathogènes. On distingue trois classes, selon le type de microorganisme sur lequel il agit, les anti-bactériens, les anti-fongiques et les anti-viraux agissant respectivement sur les bactéries, champignons et virus.

La préservation des aliments est depuis toujours un enjeu majeur, d'autant plus aujourd'hui avec l'augmentation des « prêt-à-consommer ». Pour limiter la dégradation des aliments, plusieurs techniques sont préconisées : respect de la chaîne du froid, stockage basse température ou stérilisation haute température, ou ajout d'agents de préservation. Parmi ces derniers, on compte beaucoup de molécules synthétiques, mais leur usage est sérieusement contrôlé (non toxicité, et non altération des perceptions gustato-olfactives des aliments).

Divers travaux rapportent le pouvoir antimicrobien de l'AF, et ont fait l'objet de dépôts de brevets [HIZUKURI, S. et coll., 2001; YAJIMA, M et coll., 2001].

Pour supprimer ou inhiber la croissance bactérienne, l'AF peut être utilisé seul, ou en combinaison avec un antioxydant (acide ascorbique, α - ou β -tocophérol, catéchine,...) et/ou d'un agent chélatant (acide citrique, acide polyphosphorique, acide malique, ...). Dans ce deuxième cas,

la concentration nécessaire en **AF** pour obtenir la même activité est moindre [HIZUKURI, S. et coll., 2001]. Ainsi, YAJIMA M. et coll. ont breveté un procédé de fabrication d'aliments présentant une excellente préservation, et une qualité inaltérée au cours duquel de l'**AF** est incorporé. L'effet antimicrobien de l'**AF** est encore plus performant lorsque l'aliment est chauffé. Ils conseillent selon l'aliment considéré des concentrations en **AF** entre 0.01 et 10 % (m/m) et un chauffage entre 50 et 250 °C pendant 1 à 300 minutes [YAJIMA, M et coll., 2001]. Par ailleurs, il a été démontré l'effet inhibiteur de la prolifération de bactéries Gram +, mais aussi de bactéries Gram -, telles que *Bacillus anthracis* (bactérie responsable de l'anthrax), *Lactobacillus casei*, souvent rencontrées dans le cas de contamination alimentaire [HIZUKURI, S. et coll., 2001; YAJIMA, M et coll., 2001]. A titre d'exemple, avec une concentration de 1 % d'**AF**, 90 % et 100 % des bactéries *Pseudomonas aeruginosa* et *Salmonella typhimurium* respectivement, sont détruites après un chauffage de 10 min à 55 °C [YAJIMA, M et coll., 2001].

L'**AF** représente donc aujourd'hui une alternative aux antimicrobiens actuels, d'autant plus que l'obtention de dérivés amphiphiles conservant des propriétés antimicrobiennes, permet l'utilisation de la molécule dans des milieux hydrophiles ou lipophiles [BUCHTER-LARSEN, A. et coll., 2003].

III.2.3. AF : Antidiabétique

III.2.3.1. Système de régulation hormonale de la glycémie

Dans le corps humain, le taux de glucose sanguin est maintenu à un niveau constant (environ 5.6 mM = 1 mg/mL) grâce à un système hormonal complexe composé de 3 hormones (l'insuline, le glucagon et l'adrénaline) et d'une incrétine (le glucagon-like peptide 1 - le GLP-1).

L'insuline traduit une situation d'hyperglycémie : elle signale aux tissus (foie, muscles, tissus adipeux) que le taux de glucose sanguin est trop élevé et stimule le stockage de glucose sous forme de glycogène (dans le foie et les muscles). Quant au glucagon, son rôle est inverse : il signale que le taux de glucose est trop bas (hypoglycémie), et qu'il faut en libérer. Enfin, une troisième hormone, l'adrénaline, est produite de façon concomitante au glucagon. Elle est libérée dans le sang et stimule l'activité générale (augmentation de la tension artérielle, du rythme cardiaque, dilatation des voies respiratoires). De plus, comme pour le glucagon, elle renforce la mobilisation du glucose et inhibe les processus de stockage.

III.2.3.2. Diabète = dysfonctionnement de ce système

Le diabète traduit une élévation anormale de la concentration en glucose dans le sang. En 1995, le nombre de cas de diabétiques dans le monde était de 135 millions. Le diabète est une maladie grave qui peut, si elle n'est pas soignée, conduire à des maladies cardiaques, la cécité, l'impuissance. Aujourd'hui, l'organisation mondiale de la santé estime que 300 millions de personnes seront touchées en 2025. On distingue deux types de diabète : le type I et le type II.

Le diabète de type I (ou diabète insulino-dépendant DID ou encore diabète maigre) représente environ 10 % des diabétiques au niveau mondial. Il se traduit par un dysfonctionnement des îlots pancréatiques, cellules productrices de l'insuline : trop peu ou pas d'insuline est secrété par le pancréas, ce qui conduit à une augmentation de la concentration sanguine en glucose. Les patients atteints de DID doivent donc s'injecter de l'insuline dans le sang de manière directe.

Quant au diabète de type II (ou diabète non-insulino-dépendant DNID ou diabète gras), il touche 90 % des patients diabétiques. Dans ce cas, de l'insuline est produite normalement, mais les organes ne l'utilisent pas : les cellules cibles sont de moins en moins sensibles à l'insuline, et le taux de glucose sanguin augmente. On parle alors de résistance à l'insuline. Elle peut évoluer vers une diminution progressive de la production pancréatique d'insuline, voire vers un diabète insulino-dépendant.

Le GLP-1 ne semble pas être à l'origine de ce dérèglement hormonal. En effet, des études ont montré que chez les cas diabétiques de type II, la prise alimentaire n'induit pas une augmentation de la production de GLP-1. De même, le GLP-1 conserve son action insulino-tropique. Seule une étude a mis en évidence la diminution de la sécrétion de GLP-1 chez de tels patients [AHREN, B. et coll., 2001].

Pour combattre le diabète, l'une des thérapies émergentes les plus prometteuses consiste en l'utilisation de l'hormone GLP-1. Des études ont démontré l'effet antidiabétique du GLP-1, par injection sous cutanée ou intraveineuse, chez les patients diabétiques de type I ou II. Par ailleurs, le GLP-1 est bien tolérée et ne risque pas de conduire à des états d'hypoglycémie (puisqu'il est glucose dépendant) à l'inverse des autres régimes thérapeutiques.

Cependant, le GLP-1 est instable dans le sang ; il a une durée de vie très courte : 4 min par voie intraveineuse, et 30 à 60 min en sous cutané [AHREN, B., 1998]. De plus, l'administration par

voie gastrique est impossible à cause de la dégradation catalysée par des enzymes gastro-intestinales.

Différentes approches sont expérimentées à l'heure actuelle : administration buccale, ou injection en parallèle d'inhibiteurs des enzymes dégradant le GLP-1. Cependant, la meilleure solution serait la stimulation de la sécrétion endogène de GLP-1 [AHREN, B. et coll., 2000].

III.2.3.3. Implication de l'AF dans le traitement du diabète

Des études chez la souris ont été menées pour examiner l'influence de l'AF sur la sécrétion d'insuline [AHREN, B. et coll., 2000]. Administré par voie gastrique avec du glucose à une dose équivalente ou deux fois inférieure, l'AF stimule la sécrétion d'insuline et la tolérance au glucose. Mais l'AF n'agit pas de façon directe. Qu'il soit injecté avec ou sans glucose, l'AF conduit à une augmentation de la production de GLP-1, et c'est cette hormone qui induit ensuite une sécrétion d'insuline. L'AF agit vraisemblablement directement sur les cellules L intestinales, lieu de production du GLP-1. Les travaux de AHREN et coll. suggèrent donc l'utilisation de l'AF pour stimuler la sécrétion de GLP-1 endogène et par voie de conséquence l'insuline [AHREN, B. et coll., 2000].

Signalons également que le métabolite secondaire de l'AF chez les mammifères, l'anhydro-D-glucitol (AG), est un marqueur clinique du diabète. L'AG est l'un des sucres majoritaires dans le fluide cérébrospinal et le plasma de l'homme (20-40 mg/mL [YAMANOUCHI, T. et coll., 1987]). Chez les patients diabétiques, il a été observé une diminution spécifique de la concentration en AG dans le plasma [AKANUMA, H. et coll., 1981; YAMANOUCHI, T., 1987; YAMANOUCHI, T. et coll., 1987]. L'AG constitue donc un marqueur du contrôle glycémique chez les patients diabétiques non-insulino-dépendants [YAMANOUCHI, T. et coll., 1989]. YABUUCHI et coll. proposèrent un test enzymatique simple pour quantifier l'AG dans le plasma, basé sur l'oxydation enzymatique à l'aide de la 2-pyranose oxydase [NAKAMURA, T. et coll., 1986; YABUUCHI, M. et coll., 1989].

III.2.4. Autres propriétés remarquables de l'AF et dérivés

Des propriétés de l'AF autres que celles détaillées dans les paragraphes précédents sont décrites dans la littérature :

- le pouvoir sucrant basses calories : l'AF est non métabolisable, et peut être utilisé en tant que molécule sucrante dans les boissons ou produits alimentaires [YU, S. et coll., 1996];
- un stabilisant de parfums [YAJIMA, M et coll., 2003];

- un colorant alimentaire [HIZAKU, S. et coll., 2002].

III.2.4.1. L'ascospyrone P comme nouvel antimicrobien naturel

L'ascospyrone P (APP) (voir **Figure 22**), métabolite secondaire de la dégradation des α -1,4-glucanes via la voie de l'AF a été démontré comme ayant une activité antimicrobienne contre deux souches de *Staphylococcus* et une souche d'*Escherichia* [BAUTE, M.A. et coll., 1993]. Des études plus poussées sur une large gamme de micro-organismes ont confirmé le pouvoir anti-bactérien de cette molécule sur une large gamme de bactéries. Par contre, l'APP est généralement inactif sur les champignons (sauf à fortes doses) [THOMAS, L.V. et coll., 2002]. A l'inverse de l'APP, son dérivé hydraté, l'ascopyrone T (APT) n'a pas de propriétés antimicrobiennes [BAUTE, M.A. et coll., 1993] [THOMAS, L.V. et coll., 2002].

THOMAS et coll. ont, quant à eux, étudié la utilisation potentielle de l'APP comme agent de préservation des aliments. Selon eux, une concentration de 2000 mg/kg est nécessaire pour observer un effet antibactérien [THOMAS, L.V. et coll., 2004].

L'APP constitue donc un antimicrobien et antioxydant naturel qui pourrait jouer un rôle lors de la réponse à un stress biotique ou abiotique chez les champignons. Facilement produit par voie enzymatique, il pourrait se substituer aux antimicrobiens actuellement utilisés dans l'IAA (tels que la nisine ou la natamycine). Cependant, des tests supplémentaires portant sur la toxicologie pour l'homme et l'éventuelle modification des propriétés organoleptiques doivent être réalisées.

III.2.5. Bilan des brevets applicatifs de l'AF et dérivés

Tableau 5 – Récapitulatif des brevets déposés à ce jour sur les applications de l'AF et de ses dérivés.

Brevet # (Année)	Intitulé	Auteurs	Propriété utilisée
WO 96/12026 [YU, S. et coll., 1996]	α -1,4-glucan lyase an dits use in the production of AF	YU S. et coll.	Antioxydant Exemples d'utilisation de l'AF dans la mayonnaise, vinaigrette.
US 5 695 970 [KENNE, L. et coll., 1994]	Glucan-lyase producing AF	PEDERSEN M. et coll.	Antioxydant Pouvoir réducteur de l'AF nettement supérieur à celui des autres sucres (fructose, glucose) : réagit à froid avec le DNS.
WO 98/50532 [BUCHTER-LARSEN, A. et coll., 1998]	A process for preparing an antioxydant	MARCUSSEN I. et coll.	Antioxydant Protection de milieu par synthèse <i>in situ</i> de l'AF à partir de glucane et de glucane lyase recombinante.
BU 2002 170083 [BUCHTER-LARSEN, A. et coll., 2002]	Process for preparing an anti-oxydant	MARCUSSEN I. et BUCHTER-LARSEN A.	Antioxydant Utilisation de l'AF pour ses propriétés anti-oxydantes dans les boissons alcoolisées. ; et préparation <i>in situ</i> de l'AF à partir d'amidon et de glucane lyase.
US 2002 051840 [ANDERSEN, S. M. et coll., 2002]	Anti-oxydant	ANDERSEN S.M. et coll.	Antioxydant Description des propriétés antioxydantes du dérivé déshydraté de l'AF : l'ascospyrone.
US 2002 102342 [ANDERSEN, S. M. et coll., 2000]	AF substituted with a hydrophobic group for use as anti-oxidant and/or emulsifier	ANDERSEN S.M. et coll.	Antioxydant / Emulsifiant Description des produits d'oxydation de l'AF. Synthèse de dérivés 3-O et 6-O-acétylés par voie chimique, ou enzymatique (à l'aide de la NOVOZYME 435.
WO 96/12026 [YU, S. et coll., 1996]	α -glucanlyase and its use in the production of AF	YU S. et coll.	Antioxydant / Pouvoir sucrant Utilisation des propriétés antioxydantes et sucrantes de l'AF pour la préparation d'aliments et de boissons.
US 2002 198158 [AHREN, B. et coll., 2001]	Use of a cyclic ether for the preparation of a medicament affecting glucose tolerance	YU S. et AHREN B.	Antidiabétique L'utilisation de médicaments contenant de l'AF ou un de ses dérivés permet d'augmenter la tolérance au glucose.
US 2003 161862 [HIZUKURI, S. et coll., 2001]	Bacterial growth regulators or inhibitors with the use of AF	Abe J. et coll.	Antimicrobien AF = antimicrobien dont l'effet est accentué par l'utilisation d'un antioxydant et/ou un agent chélatant.
US 2003 152676	Process for producing foods having good keeping qualities and food keeping agent	MUROYA K. et coll.	Antimicrobien Procédé de fabrication d'aliments dont la préservabilité est améliorée par l'ajout d'AF au cours du process. Une étape de chauffage permet d'améliorer l'efficacité de préservation de l'aliment..

Tableau 5 (suite) - Récapitulatif des brevets déposés à ce jour sur les applications de l'AF et de ses dérivés

Brevet # (Année)	Intitulé	Auteurs	Propriété utilisée
WO 03 037906	Antimicrobial use of AF derivatives	YU S. et coll.	Antimicrobien Utilisation de dérivés de l' AF (ascospyrone, AF acétylé, énonolone,...) comme agents antimicrobiens, et plus particulièrement contre la souche <i>Bacillus anthracis</i> .
JP 2002 058 477 [SAEKI, Y. et coll., 2002b]	Lysozyme modified with AF or sugar chain containing AF as constituent saccharide, and antimicrobial agent	HISAKU S. et coll.	Antimicrobien Greffage d' AF sur une lysozyme afin d'obtenir une enzyme dont le pH optimum d'activité antimicrobienne est voisin de 6.
JP 2002 017 319 [SAEKI, Y. et coll., 2002a]	AF -containing bacterial growth controller or inhibitor against thermophilic, acid-fast bacterium alicyclobacillus	SAEKI Y. et coll.	Antimicrobien Utilisation d'un inhibiteur de la croissance de souches du genre <i>Alicyclobacillus</i> , synthétisé à partir d' AF .
JP 2001 089 377 [HIZAKU, S. et coll., 2001]	Agent for suppressing or inhibiting bacterial proliferation containing AF	HISAKU S. et coll.	Antimicrobien AF comme agent antibactérien tuant ou inhibant la croissance de bactéries Gram +
JP 2003 268397 [YAJIMA, M et coll., 2003]	Stabilized perfume composition and method for stabilizing perfume	YAJIMA M. et coll.	Stabilisant de parfums L' AF permet de stabiliser des parfums de fruit ou de citrus aux boissons et aliments auxquels il est ajouté
JP 2002 027945 [HIZAKU, S. et coll., 2002]	Use of AF as food color	HISAKU S. et coll.	Colorant alimentaire Utilisation de l' AF pour donner une couleur entre le jaune et le marron à des aliments an chauffant à une température plus basse que dans les méthodes conventionnelles.
US 2003 088039 [BUCHHOLZ, K. et coll., 2004]	Synthesis of copolymers containing AF derivatives	GLUMER A. et coll.	Copolymérisation de AF Copolymérisation entre des dérivés acétylés de l' AF et le vinylacétate ou vinylbutirrate
JP 2004 045628	Platelet aggregation inhibitor comprising AF and oits derivatives	HIZUKURI, S et YAMAJI, K.	Utilisation d' AF ou un de ses dérivés comme principe actif d'un inhibiteur d'agrégation plaquettaire
JP 04113182	Method for producing wheat gluten or gliadin modified with AF and use of wheat gluten ot the gladin AS food emulsifier	HISAKU, S. et coll.	Greffage chimique de l' AF au groupe amino du gluten ou gliadine de blé en vue de leur utilisation comme émulsifiant alimentaire.

III.3. AF comme synthon chimique et biochimique

Actuellement, la chimie des sucres tente d'augmenter l'efficacité des synthèses de leurs dérivés à haute valeur ajoutée. De telles modifications peuvent être effectuées par voie chimique ou biochimique. Cependant, la première voie nécessite la mise en œuvre de nombreuses étapes de protection et déprotection (à cause de la multifonctionnalité de la molécule) et ce type de réaction manque cruellement de spécificité. De ce fait, les enzymes représentent une alternative intéressante : elles catalysent des réactions régio- et stéréosélectives et sont efficaces dans des conditions douces de température et de pression.

Parmi la grande diversité de sucres utilisés comme brique élémentaire, l'AF se distingue par sa multifonctionnalité : ce monosaccharide présente non seulement une fonction alcool primaire et deux secondaires, mais surtout un centre pro-chiral par son groupe carbonyle (Figure 8). Ainsi, l'AF constitue un synthon remarquable.

III.3.1. Modification chimique de AF

La Figure 30 résume les voies de synthèse chimique de composés d'intérêt divers à partir d'AF.

En premier lieu, des anhydroalditols, tels que le 1,5-anhydro-D-mannitol **30.4** ou le 1,5-anhydro-D-glucitol **30.5**, peuvent être synthétisés par réduction de la forme cétone de l'AF **30.1**. Selon le réducteur utilisé (NaBH_4 ou H_2), l'un des deux épimères (**30.4** ou **30.5**) est majoritairement obtenu dans un ratio 4:1. Ces 1,5-anhydroalditols présentent notamment un intérêt pour la synthèse de tensioactifs non ioniques [ANDERSEN, S.M. et coll., 2000].

L'obtention du dérivé oxime **30.6** de AF en phase organique permet de piéger l'AF sous sa forme monomère, puisque aucun des deux dimères n'est alors observé [ANDERSEN, S.M. et coll., 2000].

Des sucres aminés, tels que la 1,5-anhydro-D-mannosamine **30.7**, sont obtenus après réduction du dérivé oxime **30.6** de l'AF [ANDERSEN, S.M. et coll., 2000]. Ces molécules de type 2-amino-1-deoxy-1,5-anhydroalditols ont été caractérisées par FUJIMOTO et coll. [FUJIMOTO, K. et coll., 1988] comme possédant une activité « coupe faim » et peuvent être utilisés comme précurseurs pour la synthèse d'oligonucléotides [ANDERSEN, S. M. et coll., 2000].

Par ailleurs, ANDERSEN et coll. [ANDERSEN, S.M. et coll., 1999; ANDERSEN, S. M. et coll., 2000] ont travaillé sur l'acylation de l'AF en présence d'acides gras, l'objectif étant d'apporter à la molécule un caractère lipophile tout en conservant les propriétés antioxydantes

(cf. paragraphe II.2.1). Ainsi, à basse température, l'AF au préalable dérivé en oxime **30.6** pour éviter la présence de dimères, est principalement acétylé sur la fonction alcool 6 pour conduire à **30.8** (et en position 3 dans une moindre mesure) en présence de chlorure de lauryle.

D'autre part, l'AF peut être traité par l'anhydride acétique dans la pyridine pour conduire à l'énolone **30.9** au côté de dimères de l'AF [ANDERSEN, S.M. et coll., 1998; ANDERSEN, S.M. et coll., 2000; FREIMUND, S. et coll., 1998b]. Ceci constitue donc une troisième voie de synthèse de l'énolone aussi obtenue en 6 étapes [AHREN, B. et coll., 2001; BREHM, M. et coll., 1987] ou en 2 étapes [BREHM, M. et coll., 1987] à partir de glucose. Cette dihydropyranone présente un intérêt considérable depuis quelques années pour la synthèse de molécules naturelles telles que la palythazine **30.13** [JARGLIS, P. et coll., 1982] et la bissetone **30.11** [BREHM, M. et coll., 1987; CARDELLINA, J.H. et coll., 1987], l'antibiotique spectinomycine.

La réduction spécifique par hydrogénation catalytique de la double liaison éthylénique de l'énolone acétylée conduit à **30.12**, ainsi qu'à un plus faible pourcentage de son C3 épimère dans un ratio 6 :1. En augmentant la pression à 3 kPa, le composé **30.10** est majoritairement obtenu [ANDERSEN, S.M. et coll., 2000].

Enfin, comme il l'a été vu lors de l'étude des propriétés antioxydantes, l'AF peut se trouver sous forme oxydée. Bien qu'il ne soit pas oxydé à pH 7 par l'oxygène moléculaire, ANDERSEN et coll. [ANDERSEN, S. M. et coll., 2000] ont montré qu'une légère augmentation du pH conduit aux deux formes oxydées que sont le 1,5-anhydro-D-ribo-hex-3-ulose **30.15**, et le 1,5-anhydro-D-erythro-hexo-2,3-diulose **30.16** (voir paragraphe III.2.1.2) [ANDERSEN, S. M. et coll., 2000].

La Figure 30 résume les différentes dérivations de l'AF envisageables que nous venons de décrire. Elle illustre ainsi les potentialités de cette molécule.

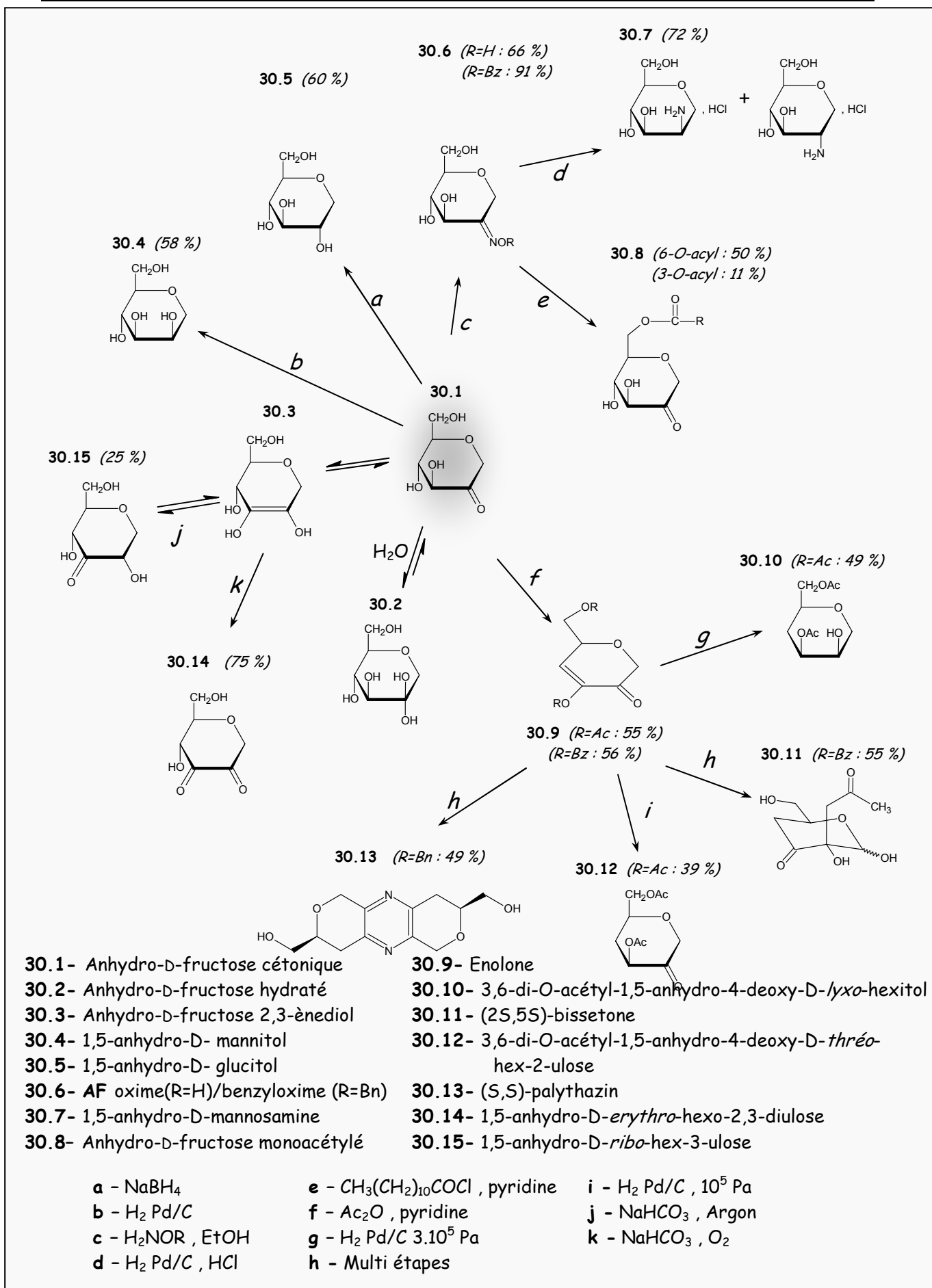


Figure 30 – Voies de modification chimique de l'AF. 69

III.3.2. Modification biochimique de AF

De par leur multifonctionnalité et leurs centres pro-chiraux, la modification biochimique des sucres à l'aide d'enzymes est nettement plus efficace que par voie chimique.

De nombreux travaux ont été effectués sur la pyranose oxydase (POx = pyranose:oxygène 2-oxidoreductase ; synonyme glucose-2-oxidase ; EC 1.1.3.10) pour l'obtention de sucres dicarbonyles. Ces composés sont importants tant d'un point de vue biologique que chimique. A titre d'exemple, certains d'entre eux se retrouvent dans les tissus des mammifères où ils sont impliqués dans la réticulation des protéines ; le 3-deoxyglucose est lui, présent dans le sang et les urines à de fortes concentrations chez les sujets diabétiques. Quant à leur intérêt chimique, les dicarbonyles représentent d'intéressants synthons grâce à de nombreux groupes fonctionnels et des centres pro-chiraux : ce type de molécule se retrouve alors souvent lors des synthèses d'antibiotiques et de sucres aminés [FREIMUND, S. et coll., 1998a].

L'un des plus importants sucres dicarbonyles est le glucosone (ou 2-céto-D-glucose). Il résulte de l'oxydation quantitative du glucose catalysée par la POx, et présente un intérêt industriel car il s'agit d'un intermédiaire pour la synthèse du fructose (par hydrogénation catalytique) ou de l'antibiotique cortalcérone (par double déshydratation enzymatique) (Figure 31) [GIFFHORN, F. et coll., 2000].

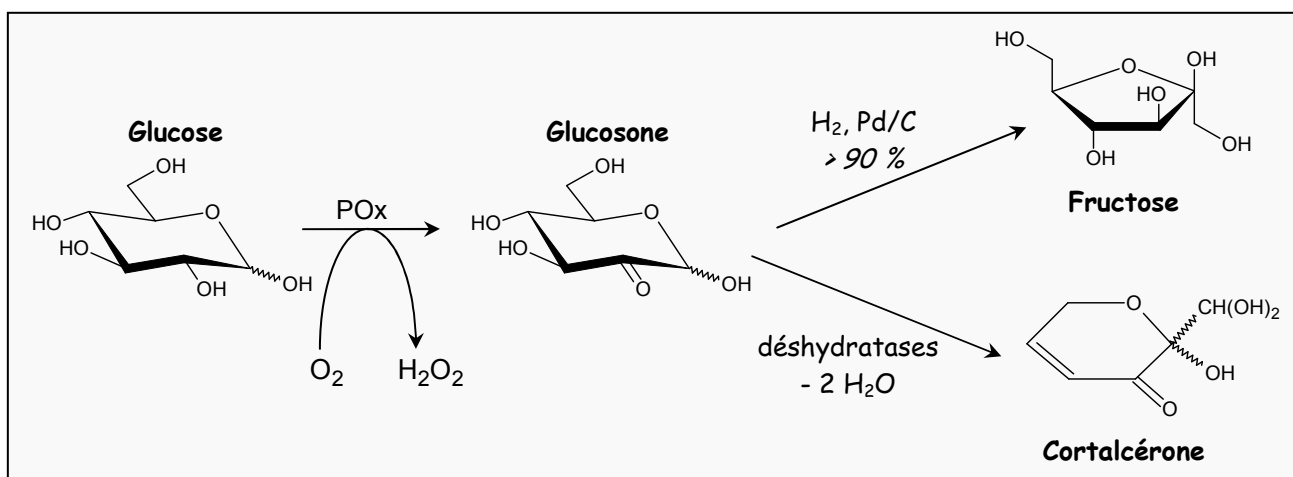


Figure 31 - Le glucosone, comme intermédiaire de synthèse du fructose ou de la cortalcérone à partir de glucose.

D'un point de vue structural, le substrat de la POx doit nécessairement adopter la forme pyranose et posséder une fonction hydroxyle sur le C2 en position équatoriale [FREIMUND, S. et coll., 1998a; GIFFHORN, F. et coll., 2000]. De nombreuses molécules, telles que le glucose, satisfont à ces critères et sont oxydés en position 2.

L'AF a aussi été testé comme substrat. Lui-même produit par oxydation catalysée en C2 de l'anhydro-D-glucitol par la pyranose oxidase de *Peniophora gigantea* (voir paragraphe II.3.2), l'incubation prolongée conduit ensuite au dérivé 2,3-dicétonique **32.2** [FREIMUND, S. et coll., 1998a].

Plus généralement, FREIMUND et coll. ont alors montré la capacité de la POx à oxyder d'autres substrats en C3, notamment lorsque la molécule ne présente pas (ou plus) de groupe oxydable en position C2. Cette variation de régiosélectivité résulte d'après eux de la rotation possible du substrat au sein du site actif de la POx [FREIMUND, S. et coll., 1998a].

Cependant, il faut noter que parallèlement à l'activité d'oxydation régiosélective des positions 2 et/ou 3, la POx est capable d'hydrolyser les liaisons glucosidiques et de transférer des unités glucose. Mais selon FREIMUND et coll., cette activité d'hydrolyse/transfert est une activité secondaire comparée à l'activité d'oxydation [FREIMUND, S. et coll., 1998a].

ANDERSEN et coll. [ANDERSEN, S.M. et coll., 1999; ANDERSEN, S. M. et coll., 2000] ont proposé une alternative enzymatique à l'acylation chimique de l'AF (voir paragraphe III.3.1). En effet, les lipases et protéases catalysent la coupure de liaisons ester en solution aqueuse. Dans un solvant organique, cette activité s'inverse et ces enzymes sont alors capables de catalyser des réactions d'estérification [synthesis, 1990, 112-115].

Ainsi, dans l'acétone et à température ambiante, l'acylation régiosélective de l'alcool primaire de l'AF est quantitative en présence de l'enzyme Novozyme 435 (nom commercial désignant une lipase de *Candida antarctica* immobilisée) avec les acides lauriques (C₁₂), palmitiques (C₁₆) et stéariques (C₁₈) conduisant ainsi à **32.3**. Cependant, le milieu réactionnel final est complexe à cause des dimères formés à partir des produits d'acylation [ANDERSEN, S.M. et coll., 1999; ANDERSEN, S. M. et coll., 2000].

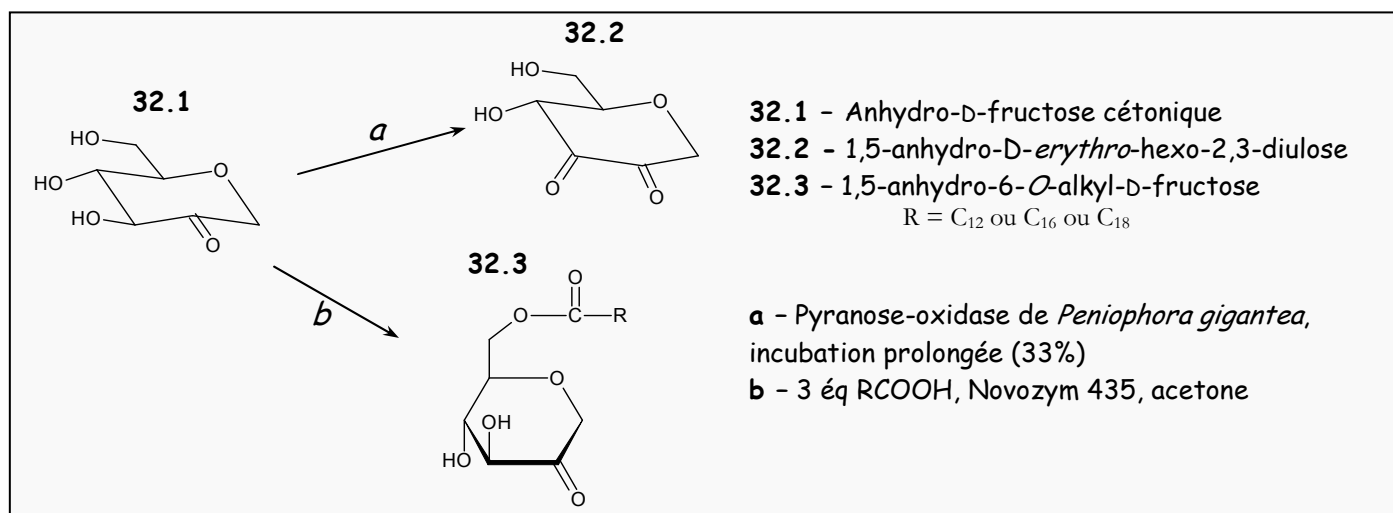


Figure 32 – Voies de modification biochimique de l'AF.

**CHAPITRE B -
LES GLUCANE-SACCHARASES**

L'intérêt porté aux glucane-saccharases (GS) date du XIX^{ème} siècle. Les GS produites par les souches de *L. mesenteroides* étaient à l'origine de la formation de dextrane (polymère de glucose) dans les sirops de cannes à sucre ou de betteraves, ce qui induisait alors une augmentation de la viscosité [PASTEUR, L., 1861]. Depuis, le dextrane a été étudié pour son utilisation comme substitut du plasma sanguin [GROENWALL, A. J. et coll., 1948], agent fluidifiant [CERNING, J., 1990], coagulant ou transporteur de fer [GARVIE, E. I., 84; SOETART, W. et coll., 1995] et enfin comme support chromatographique [SOETART, W. et coll., 1995].

Au milieu du XX^{ème} siècle, l'implication des GS dans la formation de caries a été démontrée [FITZGERALD, R.J. et coll., 1960]. Ainsi, les GS produites par les bactéries du genre *Streptococcus* présentes dans la cavité buccale utilisent le saccharose pour former du glucane, polymère assurant à la fois la fixation des bactéries sur la dent et leur survie en l'absence de substrat [HAMADA, S. et coll., 1980]. De l'acide lactique est alors produit par le streptocoque par fermentation du saccharose, conduisant à l'acidification de la plaque dentaire, à l'origine de la cariogenèse [DIBDIN, G.H. et coll., 1988; VAN HOUTE, J. et coll., 1989].

Plus récemment, l'amylosaccharase de *N. polysaccharea* a été étudiée pour sa capacité à synthétiser un polymère de type amylose à partir de saccharose. Plusieurs applications ayant fait l'objet de dépôts de brevets ont été proposées pour ce polymère :

- agent texturant dans l'industrie agro-alimentaire, grâce à sa structure hélicoïdale ;
- agent d'encapsulation de principes actifs ou de substances aromatiques ;
- fibre alimentaire facilitant le transit intestinal, grâce à sa résistance aux amylases.

Les GS ont donc été l'objet de nombreux travaux que ce soit pour l'étude de leur rôle physiologique ou la compréhension de leur mode d'action. Ainsi, ces enzymes, d'origine bactérienne, catalysent naturellement la formation de polymère de glucose (appelé glucane), par transferts successifs d'unités D-glucopyranosyle issues du saccharose. Cette polymérisation s'accompagne de la libération de fructose (Figure 33) et l'énergie de la réaction provient de la rupture de la liaison glucosidique du saccharose. Cette réaction de glucosylation ne nécessite donc pas de cofacteurs ou d'intermédiaires phosphorylés.

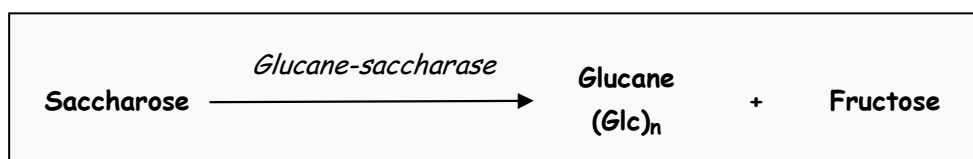


Figure 33 - Schéma de la réaction de synthèse de glucane (polymère de glucose) catalysée par les glucane-saccharases

Partie I. POLYMERASES ORIGINALES UTILISATRICES DE SACCHAROSE

I.1. Micro-organismes producteurs

Les GS sont des enzymes extracellulaires majoritairement produites par des bactéries lactiques des genres *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Lactobacillus* [MONSAN, P. et coll., 2001]. Une même souche peut produire plusieurs GS, comme c'est le cas pour *L. mesenteroides* B-742 [COTE, G.L. et coll., 1983], *L. mesenteroides* B-1355 [LOPEZ-MUNGUIA, A. et coll., 1993] ou *L. mesenteroides* B-1299 [BOZONNET, S. et coll., 2002; MONCHOIS, V. et coll., 1996].

Quant à l'amylosaccharase, son origine est connue depuis longtemps. Elle est produite par de nombreuses souches du genre *Neisseria* de façon intracellulaire chez *N. perflava* [HEHRE, E.J. et coll., 1946], *N. canis*, *N. cinerea*, *N. subflava* [MACKENZIE, C.R. et coll., 1978]), et extracellulaire chez *N. polysacharea* [RIOU, J.Y. et coll., 1983; ZHU, P. et coll., 2003a]). Des études récentes ont également montré la présence de gènes codant pour une amylosaccharase putative dans le génome de *N. meningitidis* [ZHU, P. et coll., 2003b] *Deinococcus radiodurans* [DA SILVA, A.C. et coll., 2002a], *Xanthomonas axonopodis* ou *campestris* [DA SILVA, A.C. et coll., 2002b], *Pirellula* sp. [GLOEKNOER, F.O. et coll., 2003] et *Caulobacter crescentus* [NIERMAN, W.C. et coll., 2001].

I.2. Classification des glucane-saccharases

I.2.1. Classification de l'Enzyme Commission E.C.

Historiquement, les enzymes furent d'abord classifiées selon la méthode proposée par l'Enzyme Commission (E.C.) (classification IUB-MB, 1984). Cette classification repose sur le type de réaction catalysée et sur la spécificité de l'enzyme pour le substrat.

Ainsi, les GS constituent la classe E.C. 2.4.1.- : il s'agit de transférases (classe 2) assurant le transfert d'unités glycosyles (sous classe 4) et plus particulièrement d'unités hexosyles (sous-sous classe 1). Le numéro d'ordre (4^{ème} nombre de l'E.C.) permet ensuite de différencier les GS selon la nature du polymère formé.

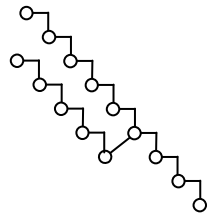
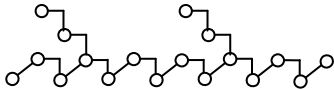

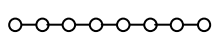
En effet, les GS peuvent être distinguées par la structure du polymère qu'elles synthétisent et par le type de liaison glucosidique formée. Le numéro d'ordre permet ainsi de différencier (voir Tableau 6):

- Les *dextrane-saccharases* (DSR) (E.C. 2.4.1.5) : elles catalysent la formation d'un glucane contenant au moins 50 % de liaisons glucosidiques α -(1,6) successives et des

- ramifications de type α -(1,2), α -(1,3) ou α -(1,4). Ce polymère est appelé dextrane. Les souches productrices de ces DSR les plus courantes sont *L. mesenteroides* NRRL B-512F, B742 [COTE, G.L. et coll., 1983] et B1299 [BOZONNET, S. et coll., 2002] ;
- Les *alternane-saccharases* (ASR) (E.C. 2.4.1.140) : elles catalysent la formation d'alternane, un glucane composé de liaisons α -(1,3) et α -(1,6) alternées, et également porteur de ramifications en α -(1,3). Les micro-organismes producteurs sont *L. mesenteroides* NRRL B-1355, B-1501 et B-1498 [COTE, G.L. et coll., 1982b; LOPEZ-MUNGUIA, A. et coll., 1993; SEYMOUR, F.R. et coll., 1979] ;
 - Les *amylosaccharases* (AS) (E.C. 2.4.1.4) : elles présentent une spécificité originale puisqu'elles catalysent la formation d'un polymère de type amylose uniquement composé de liaisons α -(1,4) ;
 - Les *mutane-saccharases* (E.C. 2.4.1.5) : le polymère formé, appelé mutane, est composé d'au moins 50 % de liaisons α -(1,3). Ces enzymes sont produites par *L. mesenteroides* B-1149 et différentes souches de *Streptococcus* sp. [MOOSER, G., 1992; SIDEBOTHAM, R.L., 1974]

Tableau 6 - Glucanes synthétisés par les GS reflétant la diversité de spécificité de ces enzymes.

Liaisons glucosidiques mises en jeu : α -(1,6) ($\circ-\gamma$), α -(1,3) (\circ/\backslash), et α -(1,4) ($\circ-\circ$).

Enzyme	Classe	Famille des GH	Polymère synthétisé	Exemples de souches productrices
Dextrane-saccharase	E.C. 2.4.1.5	70		<i>L. mesenteroides</i> NRRL B-512F
Alternane-saccharase	E.C. 2.4.1.140	70		<i>L. mesenteroides</i> NRRL B-1355
Mutane-saccharase	E.C. 2.4.1.5	70		<i>S. mutans</i>
Amylo-saccharase	E.C. 2.4.1.4	13		<i>Neisseria</i> sp.

Une même souche peut produire plusieurs GS de spécificités différentes. Ce phénomène, fréquemment rencontré pour les bactéries lactiques, a été confirmé par le clonage de différents gènes issus d'un même organisme codant pour différentes GS (Tableau 7).

Tableau 7 – Pourcentage des liaisons glucosidiques présentes dans les glucanes synthétisés en présence de diverses GS natives, dont certaines ont été clonées [SIDEBOTHAM, R.L., 1974].

Souche productrice	Type de liaison glucosidique formée				Référence	Enzyme recombinante correspondante	
	α -(1,6)	α -(1,2)	α -(1,3)	α -(1,4)			
<i>L. mesenteroides</i>	NRRL B-512F	95 %	-	5 %	-	[WILKE-DOUGLAS, M. J. et coll., 1989]	DSR-S
		85 %	-	15 %	-	[MONCHOIS, V. et coll., 1996]	DSR-B
	NRRL B-1299	95 %	-	5 %	-	[MONCHOIS, V. et coll., 1998]	DSR-A
		68 %	32 %	-	-	[FABRE, E., 2004]	DSR-E
	NRRL B-1355	95 %	-	5 %	-	[ARGUELLO-MORALES, M.A. et coll., 2000]	DSR-C
		54 %	-	46 %	-		ASR
<i>Neisseria polysaccharea</i>	-	-	-	100 %	[HENRISSAT, B., 1991a]	AS	

Ces enzymes sont aujourd'hui disponibles sous forme recombinante et généralement exprimées chez *E. coli*. Au total, on compte plus de 36 gènes codant pour des GS. Ces travaux ont permis d'approfondir les relations structure/fonction et de proposer en parallèle un autre type de classification pour ces enzymes.

1.2.2. Classification basée sur les homologies de structure

La classification proposée par l'Enzyme Commission prend en compte uniquement la spécificité de l'enzyme pour le substrat, et non les homologies de structure et de mécanisme. Pour cette raison, un second mode de classification basé sur les homologies de structure a été proposé par HENRISSAT. Elle est basée sur les homologies de structures primaires, secondaires et tertiaires, et les mécanismes réactionnels qui en découlent. Cette classification d'abord

réservée aux glycoside-hydrolases et aux transglycosidases (GH) [DAVIES, G. et coll., 1995; HENRISSAT, B., 1991b; HENRISSAT, B. et coll., 1993] a ensuite été étendue aux autres enzymes : glycosyl-transférases, glucide esterases, et polysaccharide-lyases [CAMPBELL, J.A. et coll., 1997]. Il y a peu, les modules de liaison des glucides ont également été introduits dans la classification [COUTINHO, P.M. et coll., 1999]. Cette base de données est régulièrement mise à jour sur le site web CAZY : <http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/index.html> [COUTINHO, P.M. et coll., 1999].

Ainsi, deux enzymes spécifiques du même substrat (même E.C.) pourront appartenir à deux familles distinctes ; à l'inverse, une même famille pourra contenir des enzymes de spécificités différentes (E.C. différents).

Sur la base des homologies structurales et mécanistiques, les GS sont classées dans la catégorie des GH alors qu'elles sont regroupées dans la catégorie des transférases (E.C. 2.4-) de la classification proposée par l'Enzyme Commission. La majorité des GS se trouvent dans la famille 70 des GH. Seule l'amylosaccharase fait figure d'exception. C'est en effet la seule GS appartenant à la famille 13 des GH, famille regroupant principalement les enzymes intervenant dans la dégradation ou la transformation de l'amidon. Comme nous le verrons par la suite, les familles 13 et 70 ont de fortes homologies structurales et mécanistiques, ce qui a conduit à les placer dans le même clan GH-H.

I.3. Structure des glucane-saccharases

I.3.1. Structure primaire

I.3.1.1. GS de la famille 70

La plupart des GS de la famille 70 des GH produites par les souches des genres *Leuconostoc* et *Streptococcus* comportent environ 1500 acides aminés et présentent une masse moléculaire comprise entre 150 et 180 kDa [REMAUD-SIMEON, M. et coll., 2000].

La comparaison de leurs structures primaires a permis d'identifier une organisation en quatre domaines (Figure 34):

- le *peptide signal* : il permet la translocation des GS produites vers le milieu extérieur [ABO, H. et coll., 1991; MONCHOIS, V. et coll., 1999a]. Située à l'extrémité N-terminale de la protéine, cette zone présente 40 % d'identité entre toutes les GS [MONCHOIS, V. et coll., 1997a].
- Une *zone variable* : elle comporte peu d'homologie entre toutes les GS et ne semble pas intervenir dans la catalyse [MONCHOIS, V. et coll., 1996].

- Le *domaine catalytique* : cette zone est la plus conservée : 49 % des résidus sont identiques ou similaires dans toutes les GS [ARGUELLO-MORALES, M.A. et coll., 2000] ; elle contient notamment les acides aminés clés impliqués dans la catalyse et formant la triade catalytique (voir paragraphe 1.4.1).
- Le *domaine de liaison au glucane* (GBD – Glucan Binding Domain) : situé à l'extrémité C-terminale, ce GBD contient des unités répétées caractéristiques des GS [GIFFARD, P.M. et coll., 1991; RUSSEL, R.R., 1990]. Leur nombre et leur répétitivité varient d'une enzyme à l'autre [BANAS, J.A. et coll., 1990; MONCHOIS, V. et coll., 1997a]. Les fonctions proposées du GBD sont multiples : (1) modulation de l'équilibre entre la synthèse du glucane et l'hydrolyse du saccharose [ABO, H. et coll., 1991; KONISHI, N. et coll., 1999] (2) aide à l'extension de la chaîne de glucane en cours d'élongation [MONCHOIS, V. et coll., 1998] ; (3) fixation du dextrane stimulant l'activité catalytique [MONCHOIS, V. et coll., 1999b; ROBYT, J.F. et coll., 1995] ; (4) participation à la variation du type de liaison glucosidique introduite dans le glucane [VICKERMAN, M.M. et coll., 1996].

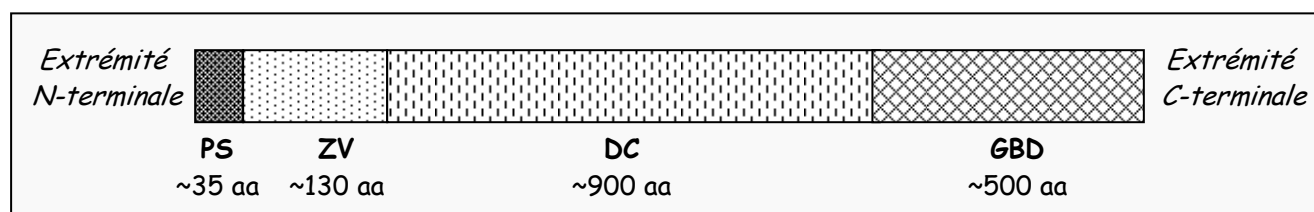


Figure 34 – Structure primaire commune aux GS de la famille 70 des GH, composée de 4 domaines : le peptide signal (PS), la zone variable (ZV), le domaine catalytique (DC) et le domaine de liaison au glucane (GBD).

Parmi les GS, l'enzyme recombinante DSR-E de *L. mesenteroides* B-1299 se distingue par sa structure primaire : elle possède un second domaine catalytique DC2 à l'extrémité C-terminale (Figure 35) responsable de la formation de liaisons glucosidiques de type α -(1,2), alors que le premier domaine catalytique assure la synthèse de liaisons α -(1,6) [BOZONNET, S. et coll., 2002; MACGREGOR, E.A. et coll., 1996]. Cette enzyme présente donc une taille nettement supérieure de 313 kDa.

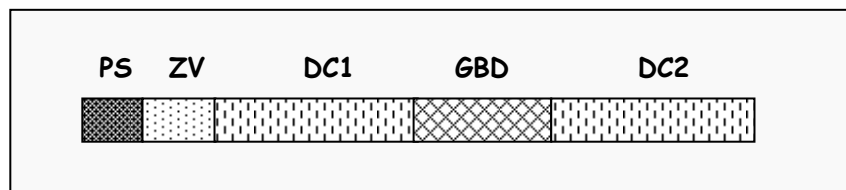


Figure 35 – Structure originale de l'enzyme recombinante DSR-E de *L. mesenteroides* B-1299

I.3.1.2. GS de la famille 13 : l'amylosaccharase

L'amylosaccharase se distingue des autres GS par sa structure primaire. Elle présente une taille plus faible (72 kDa pour 636 acides aminés), et ne possède pas de régions équivalentes à la zone variable ou au domaine de liaison au glucane. L'amylosaccharase fait également partie de la famille 13 des GH dont elle possède toutes les caractéristiques structurales décrites ci après.

I.3.2. Structure secondaire : une structure prédite en tonneau (β/α)₈

L'amylosaccharase présente les mêmes caractéristiques structurales que les autres enzymes de la famille 13, à savoir :

- un premier domaine sous forme de tonneau (β/α)₈ [BANNER, D.W. et coll., 1975a; MACGREGOR, E.A. et coll., 1996] ou TIM-barrel (du nom de la triose-phosphate isomérase [BANNER, D.W. et coll., 1975b] ; il correspond à une succession de 8 feuillets β et de 8 hélices α alternés et reliés par des boucles (β 1- α 1- β 2- α 2- β 3- α 3- β 4- α 4- β 5- α 5- β 6- α 6- β 7- α 7- β 8- α 8).
- un second domaine entre le 3^{ème} feuillet et la 3^{ème} hélice qui serait impliqué dans la fixation du substrat, la diversité fonctionnelle et la stabilité [BELSHAW, N.J. et coll., 1993b; DECLERCK, N. et coll., 1990; MATSUURA, Y. et coll., 1984]
- un troisième domaine en forme de « clé grecque » constituée de brins β anti-parallèles ; il s'agit d'un domaine non catalytique, mais ayant une affinité non négligeable pour les granules d'amidon [BELSHAW, N.J. et coll., 1993a].

Les résultats de prédictions de structure secondaire menées par MACGREGOR et coll [MACGREGOR, E.A. et coll., 1996], indiquent que les GS de la famille 70 des GH sont caractérisées par une permutation circulaire du tonneau : l'enchaînement β 1- α 1- β 2- α 2- β 3 se situerait en aval des éléments α 3- β 4- α 4- β 5- α 5- β 6- α 6- β 7- α 7- β 8- α 8. Cette permutation est confirmée par des travaux de modélisation du domaine catalytique de la glucosyl-transférase

de *S. mutans* [TSAI, Y.W. et coll., 2000] et de dichroïsme circulaire effectués sur la glucosyl-transferase de *S. downei* [MONCHOIS, V. et coll., 1999b].

Cette différence de structure a conduit à classer les GS dans une famille distincte de celle de l'amylosaccharase de *N. polysaccharea* à savoir la famille 70 et non la famille 13 [COUTINHO, P.M. et coll., 1999].

I.3.3. Structure tertiaire : l'amylosaccharase, seule GS de structure 3D résolue

A ce jour, aucune structure tridimensionnelle de GS de la famille 70 des GH n'a été obtenue, notamment à cause de leur masse moléculaire élevée et d'une organisation en multi-domaines. D'autre part, la purification de ces enzymes se heurte à des problèmes de dégradation de la protéine, qui rendent délicate l'obtention d'enzyme pure.

Par contre, l'amylosaccharase de *N. polysaccharea* a été purifiée jusqu'à homogénéité avec succès par POTOCKI DE MONTALK et coll. [POTOCKI DE MONTALK, G. et coll., 2004] pour effectuer des expériences de cristallisation et de diffraction aux rayons X [SKOV, L.K. et coll., 2000; SKOV, L.K. et coll., 2001]. Cette étude a révélé que la protéine est organisée en 5 domaines dont le domaine catalytique en forme de tonneau (β/α)₈ (Figure 36). Cette architecture n'est pas unique, puisqu'elle se retrouve dans plusieurs familles d'enzymes [DA SILVA, A.C. et coll., 2002b].

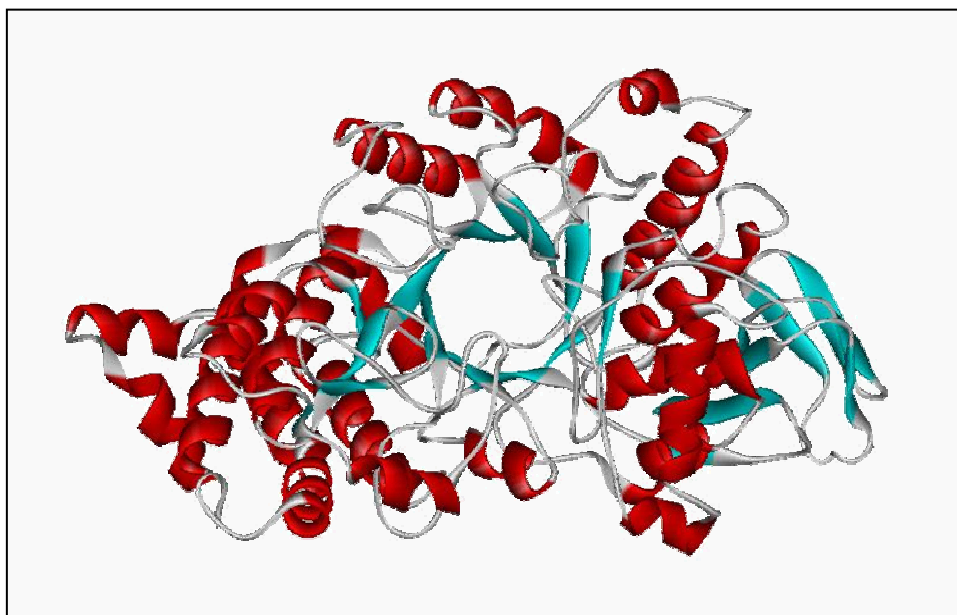


Figure 36 – Représentation tri-dimensionnelle de l'amylosaccharase de *Neisseria polysaccharea* [SKOV, L.K. et coll., 2000; SKOV, L.K. et coll., 2001] avec en son centre la structure en forme de tonneau (β/α)₈ du domaine catalytique.

I.3.4. Nomenclature des sites de fixation des substrats saccharidiques des glycoside-hydrolases

Le positionnement de substrats à la surface ou dans le site actif des enzymes repose sur une complémentarité stéréospécifique et électronique mettant en jeu des interactions de Van der Waals, des liaisons hydrogènes, liaisons ioniques et hydrophobes [THOMAS, J.A. et coll., 1971a].

Dans le cas d'arrimage de polysaccharides sur une enzyme, on considère indépendamment chaque unité glycosyle du polysaccharide. On parle alors de sous-sites de fixation, chacun regroupant un ou plusieurs acides aminés en interaction avec une unité glycosyle.

Cette nomenclature est principalement utilisée pour les enzymes de dépolymérisation telles que les glycoside-hydrolases, mais aussi les protéases et les nucléases [DAVIES, G. et coll., 1997; SUGANUMA, T. et coll., 1978; SUGANUMA, T. et coll., 1996; THOMAS, J.A. et coll., 1971b]. Pour les glycoside-hydrolases, DAVIES et coll. [DAVIES, G. et coll., 1997] ont proposé une nomenclature pour les sous-sites de fixation. Leur nombre peut varier de 2 à 10 suivant les enzymes et la taille des substrats saccharidiques qu'elles hydrolysent. Les sous-sites sont numérotés de $-n$ (extrémité non-réductrice) à $+n$ (extrémité réductrice). La rupture de la liaison glycosidique intervient par convention entre les sous-sites +1 et -1 (Figure 37).

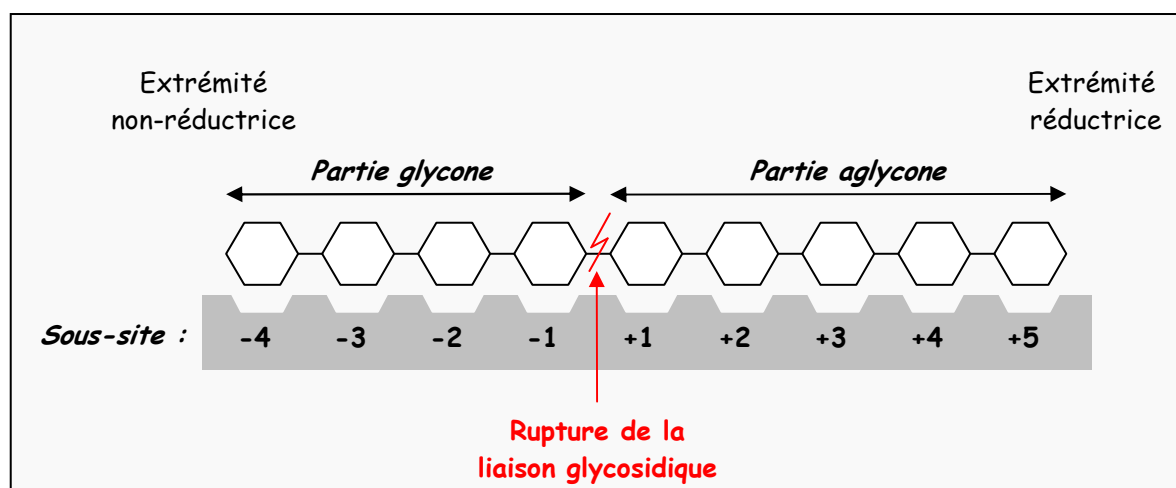


Figure 37 – Représentation des sous-sites de fixation des polysaccharides au site catalytique [DAVIES, G. et coll., 1997].

I.4. Réactions catalysées par les glucane-saccharases à partir de saccharose

La réaction catalysée par les GS est une transglucosylation : après clivage du saccharose, l'unité glycosyle est transférée sur une molécule hydroxylée et l'unité fructose est libérée dans le milieu. L'utilisation d'un substrat abondant et peu coûteux tel que le saccharose est un avantage pour l'utilisation des GS comme catalyseurs de réactions de glucosylation. Quelques

autres donneurs de résidus glucosyles ont été identifiés mais sont très peu utilisés : le fluorure d' α -D-glucopyranosyle et le p-nitrophényl- α -D-glucopyranoside [BINDER, T.P. et coll., 1985a; BINDER, T.P. et coll., 1985b; FIGURES, W.R. et coll., 1976a; FIGURES, W.R. et coll., 1976b; GENGHOSH, D.S. et coll., 1972].

En présence de saccharose seul, l'expérience a démontré que l'utilisation de GS conduit à la formation de polymère de haute masse moléculaire, de fructose, de leucrose (et autres isomères du saccharose), de glucose, et que la néo-synthèse du saccharose (réaction d'échange isotopique) a lieu (Figure 38). De plus, il a été observé que la configuration du carbone anomérique reste inchangée après réaction.

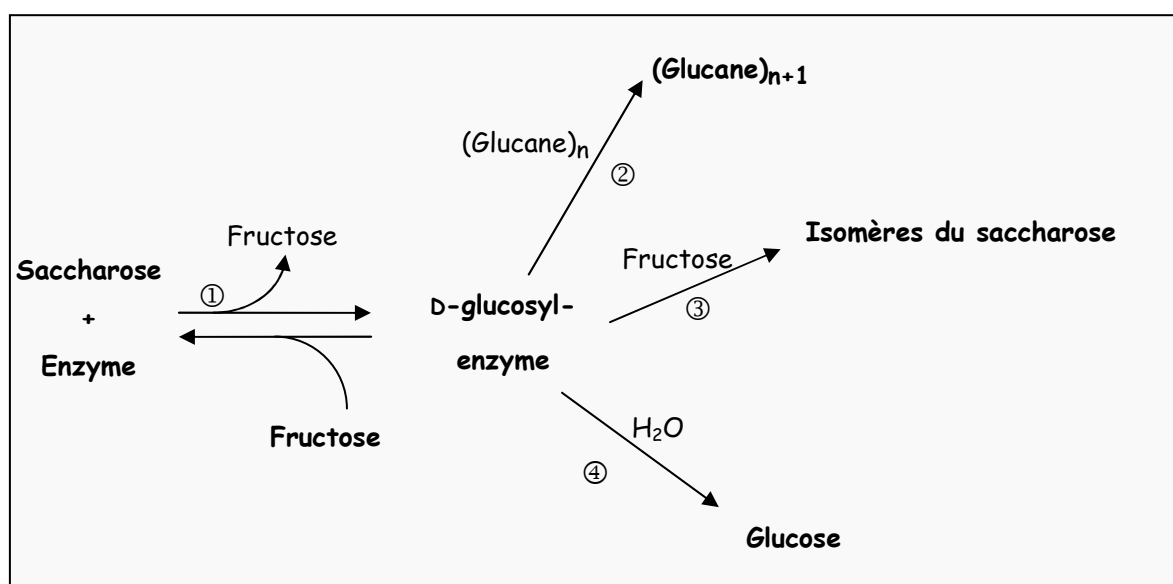


Figure 38 – Schéma général des réactions naturellement catalysées par les GS des familles 13 et 70 des GH en présence de saccharose.

Pour rendre compte de tous ces faits expérimentaux, il a été proposé un mécanisme en deux étapes, analogue à celui des α -amylases:

- (1) formation d'un complexe glucosyle-enzyme (Figure 40), puis
- (2) transfert du résidu glucosyle sur une molécule hydroxylée (Figure 41) qui peut être de différentes natures :

- une chaîne de glucose en cours d'élongation pour augmenter la taille du polymère d'une unité (réaction de polymérisation);
- le fructose pour conduire à des isomères du saccharose (leucrose [STODOLA, F.H., 1952], turanose, tréhalulose – structures Figure 43) ou le saccharose lui-même par réaction d'échange isotopique (réaction inverse à la première étape [EBERT, K.H. et coll., 1967b; JUNG, M.S. et coll., 1981; MAYER, R.M. et coll., 1981];

- l'eau pour former du glucose (réaction d'hydrolyse) [EBERT, K.H. et coll., 1967a; GOODMAN, S.D. et coll., 1955].

Chacune des deux étapes met en jeu une inversion de configuration du carbone anomérique, ce qui conduit à une rétention de configuration après la seconde étape.

I.4.1. Etape 1 : formation du complexe glucosyl-enzyme

Des alignements de séquences des domaines catalytiques des GS et des enzymes de la famille des α -amylases ont montré la conservation dans les GS de 6 résidus parmi les 7 hautement conservés au sein de la famille 13. Parmi ces 6 résidus, on retrouve (Figure 39):

- les 3 acides aminés (aa) formant la triade catalytique des α -amylases : deux acides aspartique Asp286 et Asp393 (pour l'AS de *N. polysaccharea*) et un acide glutamique Glu328 qui intervient dans la première étape de formation du complexe glucosyl-enzyme [MATSUURA, Y. et coll., 1984; MONCHOIS, V. et coll., 1997b; TAKASE, K., 1992a; TAKASE, K., 1992b];
- une arginine Arg284 et un autre acide aspartique Asp182;
- une histidine His392 impliquée dans la stabilisation du complexe covalent.

AS	126_GLTYLHLM-P	182_DFIENH	254_QWDLN	282_ILRMDAVAF	328_EAIV	388_YVR--SHD	480_GLPLIYLGD
<u>Enzymes de la famille des α-amylases</u>							
TAKA	56_GFTAIWIT-P	117_DVVANH	173_LPDLD	202_GLRIDTVKH	230_EVLD	292_FVE--NHD	323_GIPIIYAGQ
AMY1	34_GVYHVWLP-P	88_DIVINH	150_IDHLN	176_AWRDLDFARG	205_EVWD	286_FVD--NHD	318_GTPCIFYDH
ISO	218_GVTAVEFL-P	292_DVVYNH	342_GANFN	371_GFRFDLASV	435_EPWA	505_FID--VHD	574_GTPLMQGGD
OLG	44_GIDVIWLS-P	98_DLVVNH	167_QPDLN	195_GFRMDVINP	255_EMPG	324_YWN--NHD	360_GTPYIYQGE
AMP	435_GISVIYLN-P	487_DGVFNH	565_WADFI	593_GWRDLVANE	626_ELWG	698_LLG--SHD	745_GMPSIYYGD
AM	106_GLLKMEEL-P	252_DVWANK	290_LYDVK	317_EFRIDHFRG	368_EDLG	416_YTG--THD	485_NIPATQFGN
CGT	70_GVTALWISQP	135_DFAPNH	197_LADFN	225_GIRVDVAVKH	257_EWFL	323_FID--NHD	354_GVPAIYYGT
SUP	34_AIGGVHLL-P	82_DFMINH	164_QIDID	192_LIRLDAFAY	215_EIWD	290_TLD--THD	369_GIPQIYYVG
TRS	54_GVDCLVWP-P	108_DFVMNH	178_QPDLN	206_GFRLDVAVPY	252_EANQ	322_FLR--NHD	385_GSPVLYYGD
<u>Glucane-saccharases</u>							
GTF-S	849_GITQFEMA-P	915_DLVPNQ	395_ANDVD	433_GVRVDVAVDN	475_EAWS	542_FIR--AHD	614_TVTRVYYGD
GTF-D	894_GVTSFEMA-P	959_DWVPDQ	423_ANDID	461_GCRVDVAVDN	503_EAWS	579_FIR--AHD	649_SITRLYYGD
DSR-B	939_GITSFQLA-P	1004_DWVPDQ	491_ANDVD	529_GIRVDVAVDN	571_EQWS	639_FVR--AHD	709_TVPRVYYGD
DSR-S	958_GVTSFQLA-P	1023_DWVPDQ	509_ANDVD	547_GIRVDVAVDN	589_EDWS	657_FVR--AHD	727_TVPRVYYGD

Figure 39 – Régions conservées de la séquence de l'AS de *N. polysaccharea* et de quelques enzymes de la famille 13 des α -amylases et de quelques GS de la famille 70.

Rouge : résidus strictement conservés (triade catalytique) ; Bleu : 4 résidus additionnels les mieux conservés

TAKA : α -amylase d'*Aspergillus oryzae*, AMY1 : α -amylase d'orge, ISO : isoamylase de *Pseudomonas* sp. strain SMP1, OLG : oligo-1,6-glucosidase de *Bacillus cereus*, AMP : amylopullulanase de *Thermoanaerobacter ethanolicus*, AM : amyloamylase de *Solanum tuberosum*, CGT : cyclodextrine glucanotransférase de *Bacillus circulans* strain 8, SUP : sucrose phosphorylase de *Leuconostoc mesenteroides*, TRS : trehalose synthétase de *Pimelobacter* sp. strain R48, GTF-S de *Streptococcus downei* Mfe 28, GTF-D de *Streptococcus mutans* GS5, DSR-B de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299, DSR-S de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F.

Le rôle de ces acides aminés a été confirmé par mutagenèse dirigée chez diverses enzymes [KATO, C. et coll., 1992a; KATO, C. et coll., 1992c; MONCHOIS, V. et coll., 1997a; MONCHOIS, V. et coll., 2000; TSUMORI, H. et coll., 1997] suggérant que les résidus retrouvés dans les GS jouent le même rôle que pour les α -amylases [MACGREGOR, E.A. et coll., 1996] et que la première étape de formation du complexe glucosyl-enzyme est identique pour les deux familles.

La formation du complexe glucosyl-enzyme débiterait donc par le clivage du saccharose (Figure 40). L'oxygène de la liaison glucosidique de ce disaccharide serait d'abord protoné par l'acide glutamique Glu328 de la triade. Simultanément, le carbone anomérique subirait une attaque nucléophile de l'acide aspartique Asp286, conduisant à la formation d'un complexe covalent glucosyl-enzyme, au travers d'une liaison β -glucosylester. Cette première étape aboutirait alors à une inversion de configuration du carbone anomérique.

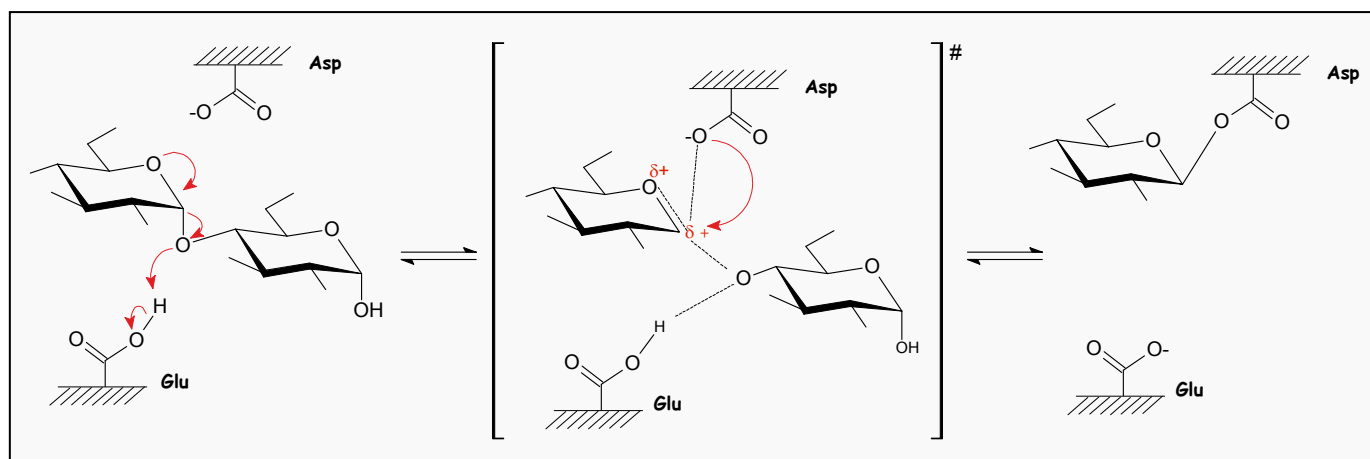


Figure 40 – Première étape de formation du complexe glucosyl-enzyme des GS, analogue à celle des α -amylases.

Dans *S. sobrinus*, MOOSER et coll. ont réussi à mettre en évidence la formation de ce complexe covalent [MOOSER, G. et coll., 1991c; MOOSER, G. et coll., 1991b]. Par la suite, de nombreuses études de mutagenèse dirigée sur l'acide aspartique impliqué dans la liaison covalente du complexe glucosyl-enzyme ont montré le rôle crucial de ce résidu dans la catalyse [KATO, C. et coll., 1992b; KATO, C. et coll., 1992c; MONCHOIS, V. et coll., 1997a].

I.4.2. Etape 2 : transfert du résidu glucosyle sur une molécule hydroxylée

Selon MOOSER et coll. [MOOSER, G. et coll., 1991c; MOOSER, G., 1992], le transfert du résidu glucosyle sur une molécule hydroxylée se produirait par l'*extrémité non-réductrice* comme dans le cas de la réaction de transglucosylation catalysée par les enzymes de la famille 13. En effet, pour ces enzymes, suite à la formation du complexe glucosyl-enzyme, l'acide glutamique Glu328 de la triade alors déprotoné activerait l'une des fonctions hydroxyles de l'accepteur ce qui permettrait alors à l'oxygène d'attaquer le carbone anomérique du résidu glucosyle lié à l'enzyme (Figure 41). Quant au troisième aa de la triade, l'Asp393, son rôle serait de stabiliser l'état de transition [MOOSER, G. et coll., 1991a].

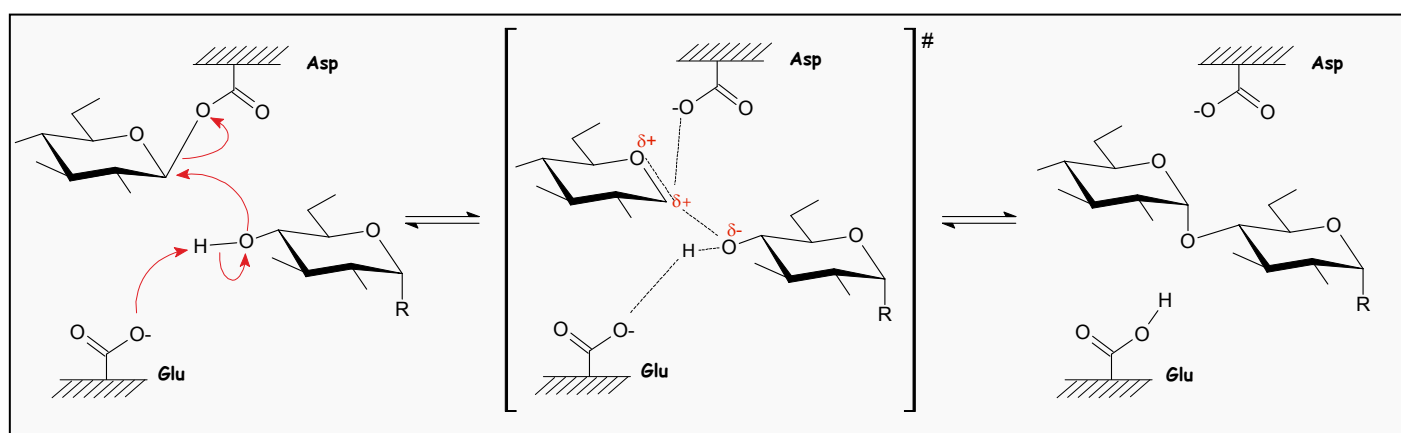


Figure 41 – Seconde étape du mécanisme de rupture du complexe covalent glucosyl-enzyme et transfert du résidu glucosyle sur une molécule hydroxylée. C'est sur la base de ce mécanisme que MOOSER propose l'élongation du glucane par l'*extrémité non-réductrice* [MOOSER, G. et coll., 1991c; MOOSER, G., 1992].

Cependant, le mécanisme proposé par MOOSER est encore incomplet, car il n'explique pas phénomènes expérimentaux observés, à savoir la détection de polymère de haute masse molaire tôt au cours de la réaction (et donc l'absence de produits de taille intermédiaire) et la non-nécessité d'une amorce.

C'est pour cette raison qu'il a été supposé que le mécanisme d'action des GS soit processif : une seule chaîne de glucose serait synthétisée par une enzyme, sans libération intermédiaire dans le milieu réactionnel [BOVEY, F.A., 1959; EBERT, K.H. et coll., 1968; KOBAYASHI, M. et coll., 1984; KOBAYASHI, M. et coll., 1985; KOBAYASHI, M. et coll., 1986; KOEPESELL, H.J. et coll., 1953; YOKOYAMA, I. et coll., 1985].

Or, ALBENNE et coll. [ALBENNE, C. et coll., 2003; SKOV, L.K. et coll., 2002] ont récemment élucidé le mode de synthèse de l'amylose par l'AS de la famille 13. Ainsi, l'AS

produit en début de réaction du glucose, qui sert ensuite d'accepteur pour produire du maltose. L'affinité des produits de la réaction est telle qu'ils sont rallongés préférentiellement, et que la concentration des oligosaccharides de taille croissante est maintenue à de très faibles concentrations. Or, au cours des années 80 de si faibles concentrations étaient difficilement décelables, ce qui a conduit à proposer un mécanisme processif. Pour les GS de la famille 70, JOUCLA et coll. [JOUCLA, G., 2003] ont proposé un mécanisme comparable à celui de l'AS pour l'ASR de *L. mesenteroides* B-1355 : l'élongation se ferait donc par l'extrémité non-réductrice selon un mécanisme non processif, ou semi-processif.

Ce mécanisme des GS s'oppose donc à celui de ROBYT et coll. qui proposent une élongation par l'*extrémité réductrice* [ROBYT, J.F. et coll., 1974]. Selon eux, deux sites de catalyse seraient impliqués dans l'élongation du glucane pour expliquer ce type d'élongation. Des expériences similaires mais avec les autres GS de spécificités différentes ont conduit à proposer un mécanisme analogue [DITSON, S.L. et coll., 1984; ROBYT, J.F. et coll., 1983b].

Cependant, l'existence de deux sites catalytiques dans les GS, à la base de la théorie proposée par ROBYT, n'a encore jamais été démontrée. A l'exception de la DSR-E de *L. mesenteroides* B-1299 dont la structure primaire a été récemment déterminée, un seul site catalytique de clivage du saccharose a été identifié dans les GS. De plus, le déplacement d'une longue chaîne de glucane entre deux sites est difficilement envisageable pour des raisons d'encombrement stériques.

La première théorie de MOOSER semble donc être la plus plausible (un seul site catalytique, élongation par l'extrémité non-réductrice) d'autant qu'elle est basée sur le mécanisme des α -amylases de la famille 13 avec lesquelles des homologues structurales ont été démontrées. Malgré tout, seule l'obtention de données structurales (cristallisation des intermédiaires glucosyl-enzyme par exemple), et l'étude de la cinétique de formation d'oligosaccharides par d'autres enzymes pourra définitivement permettre de conclure quant au mécanisme d'action des GS de la famille 70 des GH.

Partie II. LES GLUCANE-SACCHARASES, CATALYSEURS DE REACTIONS

D'ACCEPTEUR

Les réactions d'accepteur catalysées par les GS consistent au transfert de résidus glucosyles issus du saccharose sur des molécules exogènes possédant une fonction hydroxyle (molécules saccharidique ou non) [KOEPEL, H.J. et coll., 1953]. Dans ce cas, la réaction d'accepteur est en compétition avec la synthèse de polymère.

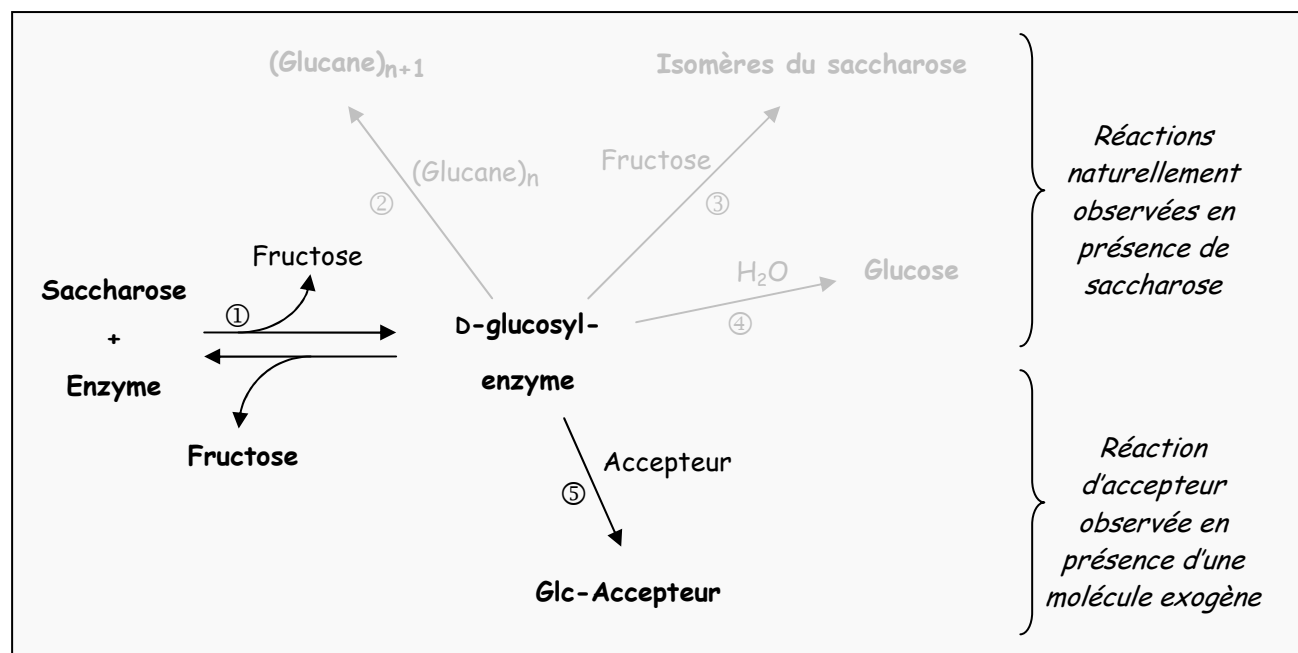


Figure 42 – Réaction de glucosylation d'une molécule exogène appelée accepteur en présence de GS; cette réaction dite d'accepteur est en compétition avec les réactions naturellement catalysées par les GS

II.1. Mécanisme

Pour la réaction d'accepteur, il a été démontré et unanimement admis que pour les GS de la famille 70 le transfert du résidu glucosyle du saccharose sur l'accepteur se fait par l'extrémité non-réductrice [COTE, G.L. et coll., 1984; GERMAINE, G.R. et coll., 1976; JUNG, M.S. et coll., 1981; MUKASA, H. et coll., 2001; ROBYT, J.F. et coll., 1978]. Ceci vient donc renforcer l'hypothèse de MOOSER (élongation par l'extrémité non-réductrice mettant en jeu un seul site catalytique) puisqu'il est difficilement concevable de penser que les réactions de polymérisation et d'accepteur ne suivent pas le même mécanisme.

II.2. Synthèse d'oligosaccharides

Un très grand nombre d'études portant sur la glucosylation de différents accepteurs sont référencées dans la littérature et il ressort que les accepteurs peuvent être classés en deux catégories :

- les *accepteurs forts* : ils sont facilement glucosylés par les GS ; les produits de glucosylation engendrés sont, à leur tour, des accepteurs conduisant ainsi à la formation de familles d'oligosaccharides [ROBYT, J.F. et coll., 1978]. Leur présence va accélérer la consommation du saccharose et favoriser la synthèse d'oligosaccharides au détriment de la polymérisation [ROBYT, J.F. et coll., 1983a]. COTE et coll. ont ainsi proposé d'évaluer le pouvoir accepteur par la capacité à diminuer le rendement en polymère [COTE, G.L. et coll., 2003a]. Le maltose et l'isomaltose sont parmi les meilleurs accepteurs.
- Les *accepteurs faibles* : ils sont difficilement reconnus par les GS et ne vont conduire qu'à un produit monoglucosylé, voire diglucosylé. En leur présence, le rendement en oligosaccharides est faible, et la vitesse de réaction diminue fortement [KOEPSSELL, H.J. et coll., 1953]. Le fructose appartient à cette classe et conduit à des isomères du saccharose, par exemple le leucrose [DEVULAPALLE, K.S. et coll., 1994] [SUMNER, J. et coll., 1935].

Le Tableau 8 rassemble quelques exemples de substrats testés comme accepteurs des GS. Les exemples sélectionnés montrent l'intérêt de l'utilisation de GS de spécificités différentes. Grâce à des GS d'origines différentes, il est possible de synthétiser des dérivés glucosylés de structures diverses, aux propriétés potentiellement distinctes (cas du maltose avec la DSR de *L. mesenteroides* B-1299 au paragraphe II.4.1.2). Notons par ailleurs que les liaisons glucosidiques formées sont alors identiques à celles synthétisées lors de la formation du polymère : la spécificité des GS est conservée pour la réaction d'accepteur.

Mais des études du pouvoir accepteur ne sont pas limitées aux seuls mono ou disaccharides. D'autres molécules telles que des dérivés de sucre, ou des sucres déshydratés ont également été testés comme accepteurs [DEMUTH, K. et coll., 2002] [RICHARD, G. et coll., 2003]. Ces travaux montrent ainsi l'importance de la structure de la molécule pour être reconnue comme accepteur.

A titre d'exemple, parmi les alkylglucosides, les *n*-octyl- α - et β -glucopyranosides ne sont pas reconnus comme accepteurs par la DSR de *L. mesenteroides* B-512F [DEMUTH, K. et

coll., 2002] [RICHARD, G. et coll., 2003]. Par contre, l'asr de *L. mesenteroides* B-1355 reconnaît l'épimère α comme accepteur, donnant ainsi lieu à la synthèse de dérivés glucosylés [RICHARD, G. et coll., 2003]. Enfin, le *n*-butyl- α -glucopyranoside est, quant à lui, glucosylé par la DSR de *L. mesenteroides* B-512F et B-1299, ainsi que par l'ASR de *L. mesenteroides* B-1355, chacune d'entre elles permettant la synthèse de dérivés spécifiques.

Ces mêmes travaux portant sur la réaction d'accepteur font aussi état de l'influence des conditions réactionnelles sur le rendement de la glucosylation. Ainsi, la taille et la quantité de dérivés glucosylés synthétisés et intimement liée au rapport molaire saccharose/accepteur et à la quantité de matière sèche. En règle générale, l'utilisation de rapports molaires S/A élevés et de milieux concentrés favorisent la synthèse de dérivés glucosylés. [DOLS-LAFARGUE, M. et coll., 2001a; DOLS-LAFARGUE, M. et coll., 2001b; RICHARD, G. et coll., 2003] [SU, D. et coll., 1993].

Tableau 8 - Exemples de molécules testées comme accepteurs des GS.

L'utilisation de GS de spécificités différentes permet la synthèse de dérivés glucosylés de structures diverses. (*) Structure du dérivé donné en Figure 43.

Accepteurs monosaccharidiques						
Accepteur	Enzyme	Structure DP2	Structure DP3	Structure DP4	Structure DP5	Référence
D-fructose Fru	DSR de <i>L. m.</i> B-512F	Leucrose (*) : Glc- α -(1,5)- Fru	n.d.			[ALBENNE, C. et coll., 2003; ROBYT, J.F. et coll., 1983a]
	DSR de <i>L. m.</i> B-1299					Isomaltulose : Glc- α -(1,6)- Fru
	AS de <i>N. p.</i>	Turanose (*) : Glc- α -(1,3)- Fru	Trehalulose (*) : Glc- α -(1,1)- Fru	n.d.		[POTOCKI DE MONTALK, G. et coll., 2000]
D-glucose Glc	DSR de <i>L. m.</i> B-512F	IM2 : Glc- α -(1,6)- Glc	IM3 : Glc- α -(1,6)-Glc- α -(1,6)- Glc	IM4 : Glc- α -(1,6)-Glc- α -(1,6)-Glc- α -(1,6)- Glc	...	[ROBYT, J.F. et coll., 1983a]
	DSR de <i>L. m.</i> B-1355	IM2 : Glc- α -(1,6)- Glc	IM3 : Glc- α -(1,6)-Glc- α -(1,6)- Glc et Glc- α -(1,3)-Glc- α -(1,6)- Glc	n.d.		[COTE, G.L. et coll., 1982a]
	AS de <i>N. p.</i>	M2 : Glc- α -(1,4)- Glc	M3 : Glc- α -(1,4)-Glc- α -(1,4)- Glc	M4 : Glc- α -(1,4)-Glc- α -(1,4)-Glc- α -(1,4)- Glc	...	[ALBENNE, C, 2002]
Accepteurs disaccharidiques						
Accepteur	Enzyme	Structure DP3	Structure DP4	Structure DP5	Structure DP6	Référence
Maltose Glc-α-(1,4)-Glc	DSR de <i>L. m.</i> B-512F	Glc- α -(1,6)- Glc-α-(1,4)-Glc	Glc- α -(1,6)-Glc- α -(1,6)- Glc-α-(1,4)-Glc	Glc- α -(1,6)-Glc- α -(1,6)- Glc-α-(1,6)-Glc-α-(1,6)-Glc-α-(1,4)-Glc	...	[ROBYT, J.F. et coll., 1983a]
	DSR de <i>L. m.</i> B-1299	OD3 : Glc- α -(1,6)- Glc-α-(1,4)-Glc	OD4 : Glc- α -(1,6)-Glc- α -(1,6)- Glc-α-(1,4)-Glc	...		[DOLS-LAFARGUE, M. et coll., 1998]
	DSR de <i>L. m.</i> B-1355	Panose : Glc- α -(1,6)- Glc-α-(1,4)-Glc	Glc- α -(1,3)-Glc- α -(1,6)- Glc-α-(1,4)-Glc Glc- α -(1,6)-Glc- α -(1,6)- Glc-α-(1,4)-Glc	n.d.		[LEATHERS, T.D. et coll., 1995; LOPEZ-MUNGUIA, A. et coll., 1993; PELENC, V. et coll., 1991]

Accepteur	Enzyme	Structure DP3	Structure DP4	Structure DP5	Structure DP6	Référence
	AS de <i>N. p.</i>	M3 : Glc- α -(1,4)-Glc- α -(1,4)-Glc	M4 : Glc- α -(1,4)-Glc- α -(1,4)-Glc- α -(1,4)-Glc	M5 : Glc- α -(1,4)-Glc- α -(1,4)-Glc- α -(1,4)-Glc- α -(1,4)-Glc		[POTOCKI DE MONTALK, G., 1999]
Isomaltose Glc- α -(1,6)-Glc	DSR de <i>L. m.</i> B-512F	IM3 : Glc- α -(1,6)-Glc- α -(1,6)-Glc	IM4 : Glc- α -(1,6)-Glc- α -(1,6)-Glc- α -(1,6)-Glc	IM5 : Glc- α -(1,6)-Glc- α -(1,6)-Glc- α -(1,6)-Glc- α -(1,6)-Glc- α -(1,6)-Glc	...	[ROBYT, J.F. et coll., 1983a]
	DSR de <i>L. m.</i> B-1355	IM3 : Glc- α -(1,6)-Glc- α -(1,6)-Glc et : Glc- α -(1,3)-Glc- α -(1,6)-Glc	n.d.			[COTE, G.L. et coll., 1982a]
Cellobiose Glc- β -(1,4)-Glc	DSR de <i>L. m.</i> B-512F	Glc- α -(1,6)-Glc- β -(1,4)-Glc	Glc- α -(1,6)-Glc- α -(1,6)-Glc- β -(1,4)-Glc	Glc- α -(1,6)-Glc- α -(1,6)-Glc- α -(1,6)-Glc- α -(1,6)-Glc- β -(1,4)-Glc	...	[COTE, G.L. et coll., 1982a; ROBYT, J.F. et coll., 1983a]
	DSR de <i>L. m.</i> B-1355	Glc- α -(1,2)-[Glc- β -(1,4)]-Glc Glc- α -(1,6)-Glc- β -(1,4)-Glc	n.d. Glc- α -(1,6)-Glc- α -(1,6)-Glc- β -(1,4)-Glc	Glc- α -(1,3)-Glc- α -(1,6)-Glc- α -(1,6)-Glc- β -(1,4)-Glc Glc- α -(1,6)-Glc- β -(1,4)-Glc Glc- α -(1,3)-[Glc- α -(1,6)]-Glc- α -(1,6)-Glc- β -(1,4)-Glc	n.d. n.d.	[ARGUELLO-MORALES, M.A. et coll., 2001; COTE, G.L. et coll., 1982a]

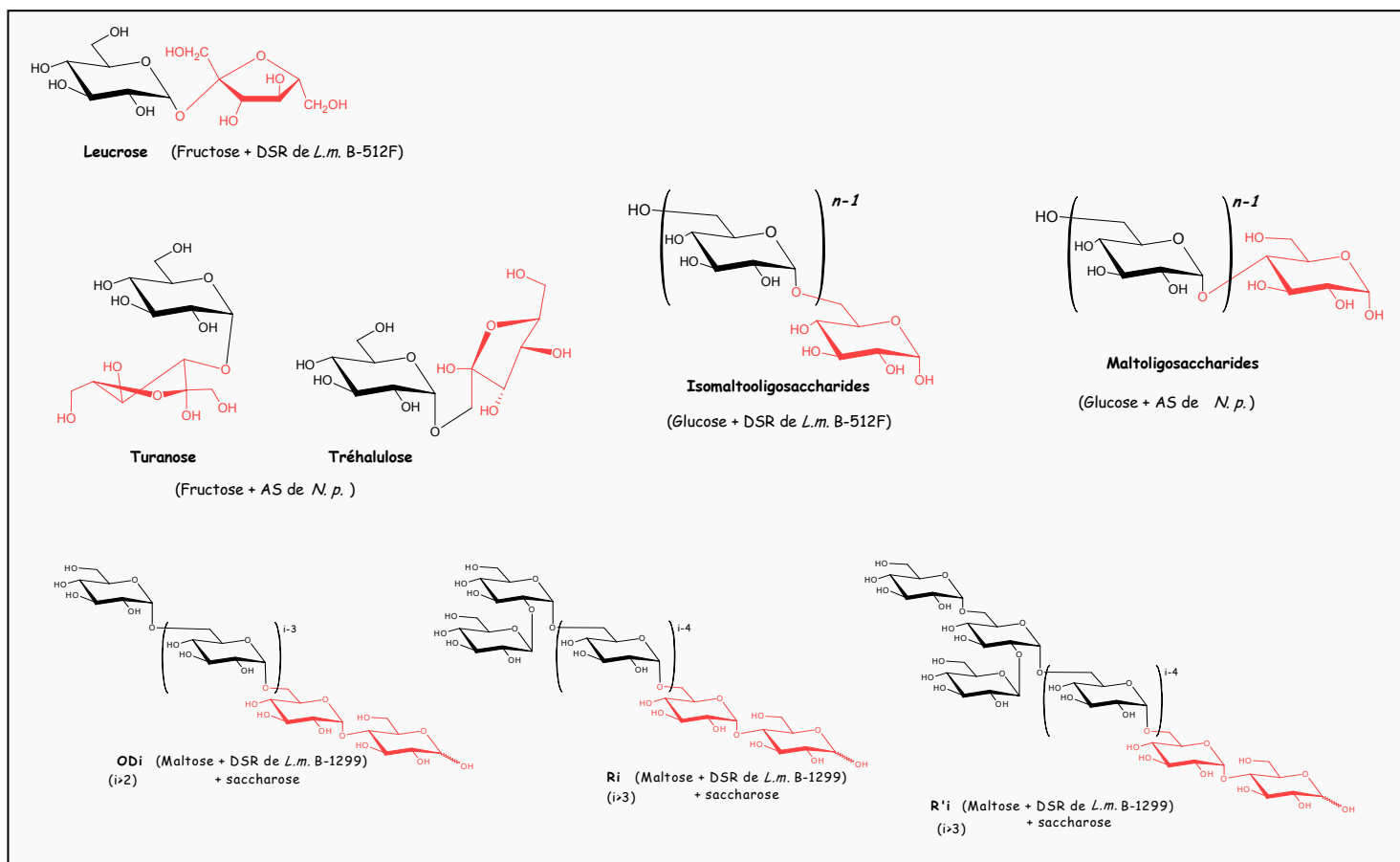


Figure 43 – Structures de quelques produits de glucosylation obtenus avec des GS de spécificités différentes. L'unité accepteur est signalée en rouge.

II.3. Réaction de disproportionation

La disproportionation consiste en un réarrangement des produits de la réaction de glucosylation qui deviennent à la fois donneur et accepteur. Il va ainsi y avoir transfert d'une unité glucosyle d'un dérivé glucosylé dit donneur vers une autre molécule dite acceptrice, selon le schéma de la Figure 44.

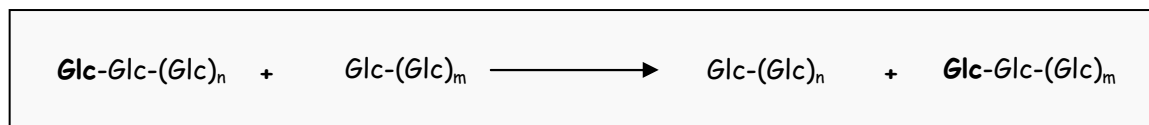


Figure 44 – Schéma de la réaction de disproportionation.

En étudiant les GS de *L. mesenteroides* NRRL B-512F et *S. mutans* 6715, BINDER et coll. ont observé pour la première fois que certains oligosaccharides formés agissaient ensuite en tant que donneurs de glucose [BINDER, T.P. et coll., 1983; RICHARD, G. et coll., 2003]. Cependant, cette réaction est limitée (vitesse faible) tant qu'il reste du saccharose, et n'intervient donc qu'en fin de réaction après épuisement du substrat [DITSON, S.L. et coll., 1986; RICHARD, G. et coll., 2003].

De la même façon, ALBENNE et coll. [ALBENNE, C. et coll., 2002] ont démontré que le transfert de résidus glucosyle intervient sur un mélange de maltooligosaccharides de degré de polymérisation compris entre 2 et 7 mis en présence de l'AS de *N. polysacchara*.

II.4. Intérêts et applications de la réaction d'accepteur

II.4.1. Production d'oligosaccharides présentant une activité prébiotique

II.4.1.1. Définition des ingrédients fonctionnels alimentaires

D'après la définition de ROBERFROID donnée en 2000 [ROBERFROID, M.B., 2000], un constituant alimentaire est dit fonctionnel s'il contient au moins un ingrédient (nutritif ou non) ayant des effets bénéfiques sur la santé à long terme, par action spécifique sur une ou plusieurs fonctions de l'organisme. Les exemples de constituants fonctionnels les plus connus sont la vitamine C, ou le calcium.

La plupart des aliments fonctionnels arrivent intacts dans le colon, sans subir de dégradation par les enzymes digestives (principalement les amylases et les lipases). Dès lors, ils peuvent interagir de différentes manières :

- *en tant que micro-constituants* : dégradés en métabolites par la flore intestinale, ces derniers vont avoir un effet global positif dans l'organisme ; ils n'ont alors aucune valeur nutritionnelle ;
- *en tant que probiotiques* : il s'agit d' « organismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exercent un effet positif sur la santé, au delà des effets nutritionnels classiques » [GIBSON, G.R. et coll., 1995a]. Bien évidemment, il faut que ces souches soient d'origine humaine, non pathogènes ni toxiques. Mais il est également important que ces probiotiques contiennent un nombre élevé de cellules viables, adhèrent à la muqueuse intestinale et qu'ils produisent des composés anti-microbiens. Les probiotiques les plus connus sont les bactéries lactiques et les bifidobactéries contenues dans les produits laitiers fermentés ;
- *en tant que prébiotiques* : ce sont des ingrédients fonctionnels non digestibles, mais bénéfiques pour la santé par stimulation de la croissance et/ou de l'activité métabolique de bactéries de la flore intestinale. Pour qu'un prébiotique soit considéré comme tel, il ne doit être ni absorbé, ni digéré en amont du colon. Il doit être reconnu comme un substrat spécifique par les bactéries ayant un rôle bénéfique pour l'organisme et modifier la composition de la flore colique dans un sens favorable à un meilleur état de santé, ou en atténuant la virulence des souches pathogènes [GIBSON, G.R. et coll., 1995b]. Les molécules dont les propriétés prébiotiques ont été

démonstrées sont des oligosaccharides contenant des liaisons résistantes aux enzymes digestives, mais qui peuvent être fermentées par les bactéries lactiques [MONSAN, P. et coll., 1995]. Quelques exemples de prébiotiques commercialisés sont donnés dans le Tableau 9.

Tableau 9 – Quelques exemples de prébiotiques commercialisés à l'heure actuelle.

Molécule prébiotique	Structure	Fournisseur	Nom commercial
Lactulose	Gal- β -1,4-Fru	Morinaga (Japon)	MLS-50 [®]
Galactooligosaccharides	β -galacto-oligosaccharides	Yakult (Japon)	Oligomate [®]
Fructooligosaccharides	...-Fru- β -2,1-Fru-...	Beghin Meiji Industries (France)	Actilight [®]
Isomaltooligosaccharides	...-Glc- α -1,6-Glc-...	Showa Sangyo (Japon)	IMO 900
Glucosaccharides	Mélange ODi, Ri et R'i (décrits sur la Figure 43)	Solabia (France)	BioEcolia [®]

Un mélange de probiotiques et prébiotiques peut être contenu dans un même aliment : on parle alors de *synbiotique* [GIBSON, G.R. et coll., 1995b].

II.4.1.2. Oligosaccharides obtenus avec la GS de *L. mesenteroides* B-1299

En présence de saccharose et de maltose comme accepteur, la dextrane-saccharase de *L. mesenteroides* B-1299 catalyse la formation de trois familles de gluco-oligosaccharides (GOS) [SIDEBOTHAM, R.L., 1974] : les ODi, les Ri et les R'i, avec *i* le degré de polymérisation (voir Tableau 8 pour rappel).

Les propriétés prébiotiques de ces oligosaccharides ont été mises en évidence, ce qui a fait l'objet d'un dépôt de brevet [PAUL, F. et coll., 1992].

En tant que prébiotiques, ces GOS ne sont pas dégradés par les enzymes digestives *in vitro* [VALETTE, P. et coll., 1993], et les GOS R4 et R5 résistent en présence de jejunum de rats après 24 h d'incubation [QUIRASCO, M. et coll., 1994]. Il est raisonnable de dire que la résistance de ces GOS R4 et R5 résulte de la présence de liaisons α -1,2 à l'extrémité non-réductrice. *In vivo*, chez le rat dépourvu de flore intestinale, seulement 20 % des GOS sont consommés alors que tout disparaît chez le rat inoculé avec une flore intestinale humaine

([VALETTE, P. et coll., 1993]). Les bactéries constituant cette flore, les espèces *Bacteroides* sont impliquées dans la consommation des GOS.

En 1992, l'INRA a mené des études pré-cliniques sur un lot de veau, en collaboration avec BioEurope, société produisant les GOS à l'échelle industrielle. Pour le lot test, pour lequel l'alimentation était supplémentée de 0.15 % de GOS (p/p), une diminution significative de 20 % des coûts vétérinaires a été observée en comparaison du lot témoin [MONSAN, P. et coll., 1995].

Signalons également que l'ensemble des GOS produits par la DSR de *L. mesenteroides* B-1299 ont été testés pour leur action dans le traitement ou la prévention du diabète de type II. BOUCHER et coll. ont ainsi démontré que chez les souris obèses, une alimentation contenant ces GOS permet d'améliorer la tolérance au glucose [BOUCHER, J. et coll., 2003].

II.4.1.3. Oligosaccharides obtenus avec la GS de *L. mesenteroides* B-1355

Les sucres maltose, mélibiose et raffinose ont été testés comme accepteurs de la GS de *L. mesenteroides* B-1355, en présence de saccharose. Des tests effectués sur les oligo-alternanes synthétisés ont montré qu'ils favorisent la croissance de bactéries probiotiques (*Bifidobacterium* sp.) sans être assimilables par les souches indésirables (*Salmonella* sp., *Escherichia coli*) ([COTE, G.L. et coll., 2003b]).

II.4.2. Les glucane-saccharases outils efficaces de glucosylation

II.4.2.1. Glucosylation de glucoconjugués pour la synthèse d'APG

Les alkylnpolyglucosides (APG) représentent à l'heure actuelle une classe d'agents de surface non ioniques à l'avenir prometteur : ils sont non toxiques, dermo-tolérants, et biodégradables. Ils sont synthétisés à partir de matières renouvelables d'origine naturelle, par condensation d'un alcool gras (issu d'huiles végétales) et de glucose (obtenu par exemple par dégradation d'amidon de blé ou de maïs). Cette réaction conduit à l'obtention de molécules amphiphiles caractérisées par la balance hydrophile/lipophile (HLB), définissant le poids relatif des deux parties de polarités opposées. Les propriétés tensioactives des APG sont alors intimement liées à la HLB, dont la valeur peut être modulée par le choix de l'alcool de départ [HILL, K., 97]. L'autre possibilité pour augmenter la HLB serait d'accroître le nombre d'unités glucose (ou degré polymérisation DP) sur la molécule. Or ceci est difficilement réalisable par voie chimique à cause de la multifonctionnalité de la molécule, cette voie ne

conduisant au mieux qu'à des mélanges d'APG de DP moyens faibles et ne contenant au maximum que 3 résidus glucose.

Une autre voie de synthèse a été proposée par RICHARD et coll. [RICHARD, G. et coll., 2003]. Elle consiste à produire par voie enzymatique des APG à partir d' α -butyl et d' α -octylglucopyranoside [RICHARD, G. et coll., 2003] (Figure 45) ou de β -butylglucopyranoside [RICHARD, G., 2004] en présence de GS de *L. mesenteroides* de différentes spécificités. Il a ainsi été démontré que la longueur de la chaîne glucosidique est augmentée de façon significative, tout en conservant la spécificité des enzymes utilisées, et que l'efficacité de la glucosylation est liée au rapport molaire saccharose/accepteur. La structure de l'accepteur joue également sur l'efficacité de glucosylation : l' α -octylglucopyranoside n'est pas glucosylé en présence des GS des souches *L. mesenteroides* NRRL B-512F et B-1299 [RICHARD, G. et coll., 2003]. Par ailleurs, le degré de polymérisation (nombre d'unités glucosyle) des APG synthétisés à partir du β -butylglucopyranoside avec la GS de la souche *L. mesenteroides* B-1355 ne dépasse pas une valeur de 3, alors qu'à partir de l'isomère α , des APG de tailles supérieures sont obtenus [RICHARD, G., 2004].

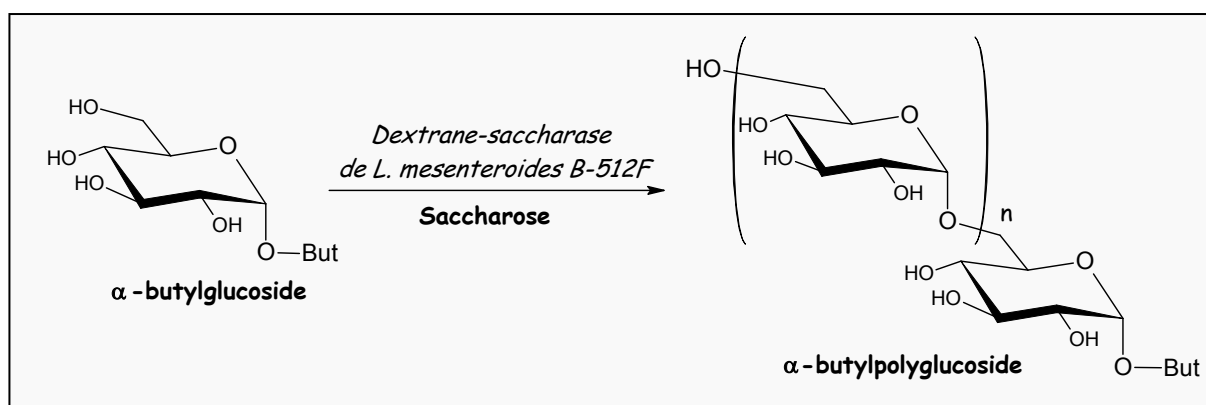


Figure 45 – Synthèse d'APG par glucosylation enzymatique d' α -butylglucoside, en présence de la dextrane-saccharase de *L. mesenteroides* NRRL B-512F [RICHARD, G. et coll., 2003].

II.4.2.2. Glucosylation de flavonoïdes en vue de l'augmentation de leur hydrophilie

La catéchine appartenant à la famille des flavonoïdes présente des propriétés très intéressantes, notamment un fort pouvoir anti-oxydant (20 fois supérieur à celui de la vitamine E) et trouve de nombreuses applications dans les domaines médicaux et alimentaires.

Cependant, sa faible solubilité en milieu aqueux limite son utilisation. La catéchine a été testée comme accepteur par différentes équipes, qui ont mis en évidence la synthèse de dérivés mono et diglucosylés. Le greffage d'unités glucosyle permet alors d'augmenter la solubilité de la catéchine [NAKAHARA, K. et coll., 1995b; NAKAHARA, K. et coll., 1995a] (Figure 46).

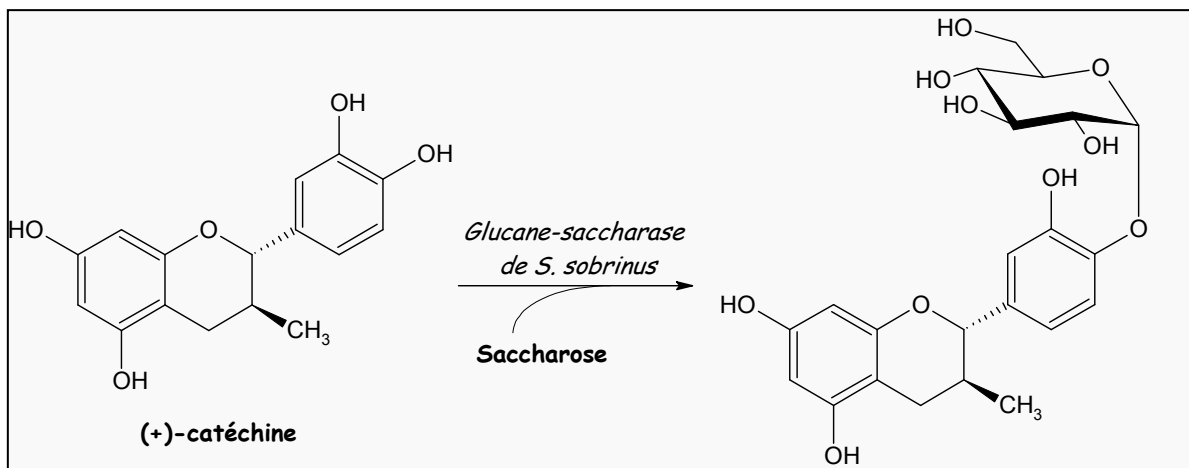


Figure 46- Augmentation de l'hydrophilie de la (+)-catéchine par glucosylation catalysée par la glucane-saccharase de *S. sobrinus* 6715 [NAKAHARA, K. et coll., 1995b].

II.4.2.3. Glucosylation de macromolécules

Les GS peuvent aussi être employées pour modifier des polymères.

Ainsi, l'amylosaccharase de *N. polysaccharea* est un outil puissant pour glucosyler des macromolécules telles que l'amylopectine ou le glycogène, en vue de produire des polymères aux propriétés nutritionnelles ou à la texture améliorées.

Ainsi, la société PLANTTEC-BIOTECHNOLOGIE a déposé un brevet permettant de modifier le rapport amidon/amylose dans les végétaux, par l'introduction d'une amylosaccharase recombinante et d'une enzyme de branchement. Ceci permet alors d'améliorer la qualité des polymères végétaux et de diversifier leur structure [QUANZ, M., 2004].

OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE

Au terme de cette étude bibliographique, il apparaît clairement que l'AF est une molécule aux potentialités multiples et que ses nombreuses propriétés (pouvoir anti-oxydant, non toxicité, pouvoir sucrant basses calories, forte réactivité) permettent d'envisager une multitude d'applications.

Dans le cadre du projet européen NEPSA, l'objectif des différents partenaires est de synthétiser de nouveaux dérivés de l'AF afin d'élargir davantage le spectre des applications possibles. Mes travaux de thèse sont intégrés à ce projet et visent à synthétiser par voie enzymatique des dérivés glucosylés de l'AF.

La voie de synthèse que nous proposons repose sur l'emploi de catalyseurs enzymatiques, les glucane-saccharases (GS) dont nous avons vu dans la partie bibliographique qu'elles sont capables de glucosyler différents types de molécules, le plus souvent en conservant leur spécificité.

L'AF n'ayant jamais été testé comme accepteur des GS, le *premier objectif de ma thèse* sera donc de montrer si oui ou non ce monosaccharide est reconnu comme accepteur par les GS.

Notons cependant qu'à ce jour, seuls YOSHINAGA et coll. [DEMUTH, K. et coll., 2002] ont isolé un dérivé monoglucosylé de l'AF. La synthèse emprunte une voie différente de celle que nous proposons. Elle repose sur l'utilisation de la cyclodextrine gluconotransférase, enzyme capable de transférer des maltooligosaccharides à partir du cyclomaltoheptaose sur la molécule d'AF. Les produits sont ensuite digérés par des glucoamylases pour conduire au 1,5-anhydro-3-O- α -glucopyranosyl-D-fructose [DEMUTH, K. et coll., 2002].

Le *second objectif de ma thèse* sera de mettre en relief la possibilité de synthèse de produits de glucosylation de différentes structures, aux propriétés variables, par l'emploi de GS de diverses spécificités. Ainsi, quatre GS de spécificités différentes ont été sélectionnées :

- la dextrane-saccharase de *L. mesenteroides* B-512F (responsable de la formation de liaisons α -(1,6) uniquement)
- la dextrane-saccharase de *L. mesenteroides* B-1299 (liaisons formées de type α -(1,2) et α -(1,6))
- l'alternane-saccharase de *L. mesenteroides* B-1355 (liaisons α -(1,6) et α -(1,3)) et

- l'amylosaccharase de *N. polysaccharea* (uniquement synthèse de liaisons α -(1,4)).

Les propriétés et la réactivité de l'AF et de ses dérivés glucosylés seront examinées : c'est le *troisième objectif de ma thèse*. Par exemple, nous étudierons le pouvoir anti-oxydant des produits de glucosylation de l'AF, ainsi que leurs propriétés prébiotiques. En effet, cette propriété ayant été démontrée pour certains oligosaccharides synthétisés par glucosylation en présence des GS sélectionnées, nous pouvons espérer conférer des propriétés prébiotiques à l'AF glucosylé.

Enfin, le *quatrième objectif de ma thèse* sera d'optimiser la glucosylation de l'AF afin de réduire les quantités résiduelles d'AF et de synthétiser des produits avec des rendements élevés. D'une part, nous étudierons l'influence des conditions réactionnelles initiales (rapport molaire saccharose/AF et matière sèche) sur les rendements. D'autre part, nous proposerons d'agir directement sur le catalyseur enzymatique par ingénierie moléculaire rationnelle ou combinatoire.

Au cours de cette thèse, nous avons donc essayé d'atteindre ces objectifs. Les résultats obtenus seront présentés et discutés dans la partie résultats et discussion

**DEUXIEME PARTIE -
MATERIELS ET METHODES**

Partie I. MATÉRIELS CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES

I.1. Produits chimiques

Les produits commerciaux ont été achetés chez :

- Prolabo pour le fructose,
- Merck pour la saccharose,

L'anhydro-D-fructose (AF), non commercialisé à l'heure actuelle, a été gracieusement fourni par la société DANISCO, membre du projet NEPSA, sous forme de solutions aqueuses à environ 10 % (p/p). Une solution standard de concentration 21,000 $\mu\text{mol/mL}$ (soit 3,780 g/L) a été utilisée pour effectuer des étalonnages externes.

Les tampons utilisés sont décrits dans le Tableau 10 ci-dessous.

Tableau 10 – Composition des tampons utilisés.

Tampon	Composition	pH
PBS	NaCl 140 mM	7,3
	KCl 2.7 mM	
	Na ₂ HPO ₄ 10 mM	
	KH ₂ PO ₄ 1.8 mM	
Acétate de sodium	CH ₃ COONa 20 mM	5,2
Bistris	Bistris 20 mM	6,5

I.2. Matériel Biologique

Les souches de *L. mesenteroides* NRRL B-512F, B-1299 et B-1355 sont fournies par la National Research Regional Laboratories NRRL, Peoria (Illinois, USA). La souche d'*E. coli* JM 109 (Promega) a été utilisée pour l'expression de l'amylosaccharase recombinante. Les préparations enzymatiques ont ensuite été produites au laboratoire par nos soins à partir de ces différentes souches.

L'AF-réductase recombinante de *Sinorhizobium morelense* à 300 U/mL a été gracieusement offerte par l'université de Saarbrücken, dans le cadre du projet NEPSA [KUHN, A. M., 2004].

Partie II. PRODUCTION DE GS

II.1. Production

II.1.1. Production des GS de *L. mesenteroides*

Le milieu de culture utilisé pour la production des GS de *L. mesenteroides* est le milieu défini et optimisé par AURIOL [AURIOL, D., 1985] pour la production de dextrane-saccharase par *L. mesenteroides* NRRL B-512F :

Saccharose	40 g/L
Extrait de levure (Biomérieux)	20 g/l
K ₂ HPO ₄	20 g/l
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,2 g/l
MnSO ₄ , H ₂ O	0,01 g/l
NaCl	0,01 g/l
CaCl ₂	0,02 g/l
Sulfate de fer	0,01 g/l
pH ajusté à 7.	

Les cultures sont réalisées en fermenteur ou erlenmeyer à 27 °C sous une agitation de 200 rpm.

II.1.2. Production de l'AS de *N. polysaccharea*

La culture de ces souches est réalisée dans le milieu LURIA-BERTANI (LB) :

Tryptone	10 g/L
Extrait de levure	5 g/L
NaCl	10 g/L
Ampicilline	100 µg/mL

La culture est effectuée en milieu liquide dans des erlenmeyers bafflés sur des volumes de 35 mL à 1 L, les volumes étant augmentés étape après étape. Les milieux sont dans un premier temps agités à 250 rpm et incubés à 37 °C sur la nuit pour permettre la croissance de la souche (période pendant laquelle la protéine recombinante n'est pas exprimée). Puis la culture est poursuivie à 30 °C (avec augmentation du volume de production) : quand la DO atteint une valeur de 0.1 à 600 nm, la production de l'enzyme est induite par l'ajout d'IPTG à 1 mM et la production se poursuit pendant 12 h.

II.2. Purification des enzymes.

II.2.1. Glucane-saccharase de *L. mesenteroides* B-512F et B-1355:

Les milieux bruts de cultures, dont le pH a été ramené à 5,4 à l'aide d'HCl 37% p/p, sont centrifugés (7500 rpm, 20 mn, +4°C). L'enzyme soluble est ensuite isolée par démixtion de phase dextrane/PEG, par ajout de PEG (18 % P/V) dans le surnageant de culture. La phase dextrane contenant l'enzyme est suspendue dans du tampon acétate (20 mM, pH 5,4) en vue d'être utilisée pour les réactions de glucosylation.

L'activité de l'enzyme est alors mesurée par la méthode au DNS (voir III.1).

II.2.2. Glucane-saccharase de *L. mesenteroides* B-1299 :

La majorité de l'activité alternane-saccharases est insoluble car associée à la membrane cellulaire. Les milieux bruts de cultures, dont le pH a été ramené à 5,4 à l'aide d'HCl 37% p/p, sont centrifugés (7500 rpm, 20 mn, +4°C). Le culot de centrifugation est repris dans du tampon acétate de sodium pH 5,2, 20 mM, et utilisé directement pour les réactions de glucosylation.

L'activité de l'enzyme est alors mesurée par la méthode au DNS (voir III.1).

II.2.3. Amylosaccharase de *N. polysaccharea*

Les bactéries recombinantes cultivées dans les conditions données précédemment sont centrifugées à 8000 g, 10 min à 4°C. Le culot bactérien est alors resuspendu dans du tampon PBS pour atteindre une DO de 80 à 600 nm. La sonication est réalisée sur 4 cycles de 30 sec avec une amplitude de 30 % et à 4 °C, interrompus par 3 min à 4 °C ; l'appareil utilisé est un Vibra Cell 72412 (Bioblock Scientific). Une solution de triton X-100 à 1% (v/v) est ajoutée au sonicat, qui est alors mis sous agitation douce à 4°C pendant 30 min afin de limiter l'agrégation protéique. Après centrifugation à 10 000 g pendant 30 min à 4 °C, le surnageant est stocké à 4°C.

L'amylosaccharase recombinante est alors purifiée selon le protocole proposé par ALBENNE [ALBENNE, C, 2002]. Il comprend une purification par chromatographie d'affinité entre la protéine Glutathione S-transférase/Amylosaccharase (GST/AS) et le support Glutathion Sepharose 4B (Amersham Pharmacia Biotech), puis une dialyse, et finalement une étape de concentration de l'enzyme par ultra-filtration.

L'amylosaccharase de fusion GST/AS purifiée a alors été utilisée comme catalyseur des réactions de glucosylation.

L'activité de l'enzyme est alors mesurée par la méthode au DNS (voir III.1).

Partie III. DOSAGE DE L'AF

III.1. Méthode au DNS

La solution d'acide 3,5-dinitrosalicylique (à conserver à l'abri de la lumière) est préparée comme suit :

acide 3,5-dinitrosalicylique	10 g/L
tartrate de sodium et potassium	300 g/L
soude	16 g/L

L'échantillon d'AF de concentration comprise entre 0 à 2 g/L est ajouté à de l'eau distillée et réagit avec le DNS (volume à volume) ; l'ajout du DNS marque le temps initial de la réaction. Après 15 min à température ambiante, la densité optique est lue à 550 nm.

Le dosage est réalisé par étalonnage externe d'une solution d'AF de concentration connue (21 mmol/L). La gamme de linéarité s'étend de 0 à 2 g/L.

III.2. Chromatographie sur couche mince

Les plaques de CCM utilisées sont des plaques Alugram® SIL G/UV₂₅₄ commercialisées par MACHEREY-NAGEL de 5x10 cm.

Les révélateurs employés sont de compositions suivantes sont [MERCK, E., 80]:

(1). Orcinol / Fer (III) / H₂SO₄ :

mélanger 10 mL de solution <i>a</i> et 1 mL de solution <i>b</i> (à préparer juste avant utilisation).
solution <i>a</i> : 1 g de chlorure de fer (III) dans 100 mL d'acide sulfurique 10% (v/v)
solution <i>b</i> : orcinol à 6% dans l'éthanol (p/v)

Après vaporisation, les plaques sont chauffées à 100 °C pendant 10-15 min.

(2). CuCl₂ :

solution à 0,5 % (p/p) dans l'eau

Les complexes oxime apparaissent quelques minutes après pulvérisation.

III.3. Par réduction à l'AF-réductase

L'activité enzymatique de l'AF-réductase (exprimée en Unité/mL ; U/mL) est la quantité d'enzyme nécessaire pour réduire une micromole d'AF par minute à 30 °C à pH=6,5. L'AF-réductase réduit l'AF en 1,5-anhydro-D-mannitol en présence d'un cofacteur, le NADPH (Figure 47) [KUHN, A. M., 2004].

La réduction de l'AF est menée en format microplaque (volume réactionnel de 200 μ L):

100 mM de BisTris, pH 6,5
NADPH 0.14 mM avec NaHCO ₃ 0,01 %
AF entre 0 et 0,10 mM
AF-réductase à 5 U/mL
Température : 30 °C

Le dosage de l'AF est réalisé en retour, par mesure de la disparition du NADPH dosé par spectrophotométrie à 340 nm (le coefficient d'extinction molaire du NADPH est de 6,3 mL/ μ mol.cm à cette longueur d'onde).

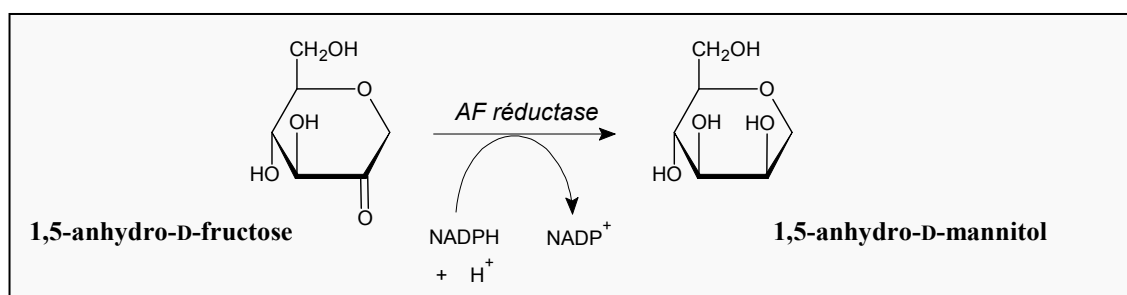


Figure 47 – Réduction enzymatique de l'AF en 1,5-anhydro-D-mannitol par l'AF-réductase en présence de NADPH comme cofacteur.

Partie IV. EVALUATION DE LA QUANTITE D'AMYLOSE PAR REACTION DE COMPLEXATION A L'IODE

La taille du polymère de type amylose synthétisé par l'amylosaccharase de *Neisseria polysaccharea* peut être évaluée par réaction colorimétrique avec une solution d'iodure de potassium KI préparée de composition :

Iode I ₂	2 g/L
Iodure de potassium KI	20 g/L

1 volume de solution de KI est ajouté à 5 volumes de milieu réactionnel contenant du polymère. La densité optique est ensuite lue entre 420 et 600 nm afin de déterminer le λ_{max} donc la valeur est liée à la longueur de chaîne du polymère synthétisé.

Partie V. CARACTERISATION DE L'ACTIVITE DES GLUCANE-SACCHARASES

Une unité d'activité de glucane-saccharase (exprimée en unité U/mL) est la quantité d'enzyme nécessaire pour catalyser la consommation d'une micromole de saccharose par minute dans les conditions suivantes :

Saccharose 100 g/L (concentration saturante)

Tampon : - acétate de sodium 50 mM, pH=5,2 pour les glucane-saccharases de *L. mesenteroides*

- phosphate salin PBS 1X, pH=7,3 pour l'amylosaccharase de *N. polysacchara*

Température : 30 °C

La consommation d'une micromole de saccharose provoque la libération d'une micromole de fructose, sucre réducteur dosé par réaction d'oxydo-réduction avec l'acide dinitrosalicylique (DNS) (Figure 48) [SUMNER, J. et coll., 1935].

L'échantillon à analyser est ajouté volume à volume au DNS, puis chauffé à 95 °C pendant 5 min, refroidit, et dilué dans 5 volumes d'eau. La densité optique est alors mesurée à 550 nm. Un étalonnage externe est réalisé pour des concentrations en fructose comprises entre 0 et 2 g/L.

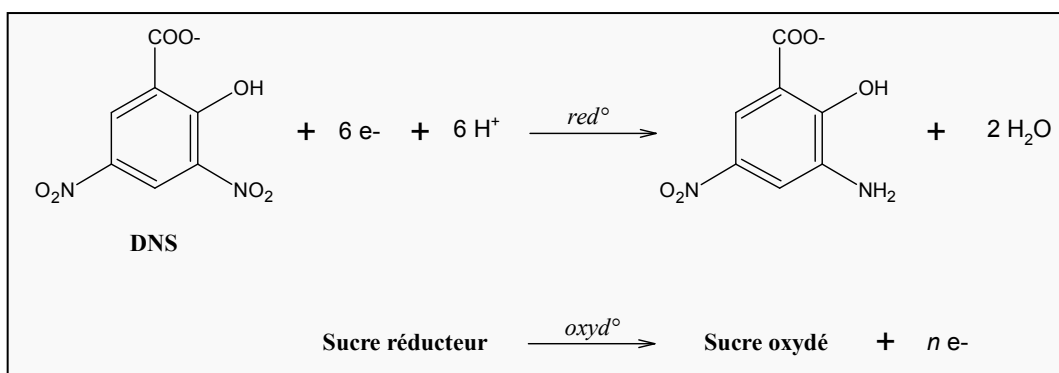


Figure 48 – Réaction de dosage des sucres réducteurs par l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS)

Partie VI. REACTIONS DE GLUCOSYLATION

La glycosylation de l'AF est réalisée en présence d'AF (accepteur), de saccharose (donneur de résidus glucosyles) et de GS (catalyseur).

IV.1. Paramètres de la réaction

Pour définir les conditions réactionnelles de la réaction de glycosylation de l'AF, deux paramètres sont utilisés :

- le rapport molaire saccharose/accepteur (S/A) :
$$S/A = \frac{[\text{Saccharose}]_{\text{g/L}}^0 / 342}{[\text{AF}]_{\text{g/L}}^0 / 180}$$

- la concentration en sucres totaux massique (CST) :
$$\text{CST} = [\text{Saccharose}]_{\text{g/L}}^0 + [\text{AF}]_{\text{g/L}}^0$$

L'efficacité de la glucosylation de l'**AF** est déterminée à partir de plusieurs critères :

- le *taux de conversion* : il correspond au pourcentage d'**AF** disparu (ou glucosylé) ;

$$\text{Taux} = \frac{[\text{AF}]^0 - [\text{AF}]^f}{[\text{AF}]^0}$$

- le *pourcentage de glucose transféré sur l'AF et les AFGOS* : il indique la part d'unités glucosyle initialement disponibles transférées sur l'**AF** et les **AFGOS**, par rapport au glucose transféré sur le polymère (polymérisation) ou sur d'autres accepteurs;

$$\% \text{ Glc transféré} = \frac{\sum_{i>1} \left(\frac{[\text{AFGOS } i]_{\text{g/L}}^f}{MM(\text{AFGOS } i)} \times (i-1) \right)}{[\text{Sacch}]_{\text{g/L}}^0 / 342} \quad \text{avec } i \text{ le degré de polymérisation.}$$

- le *rendement* de la réaction : il tient compte des deux critères précédents, et traduit la quantité d'**AFGOS** produits ($[\text{AFGOS}]_{\text{g/L}}^f$) par rapport à ce qui était initialement disponible (en **AF** et en glucose) ; il est défini par la formule :

$$\text{rendement} = \frac{[\text{AFGOS}]_{\text{g/L}}^f}{[\text{AF}]_{\text{g/L}}^0 + \frac{MM(\text{Glc}) - 18}{MM(\text{Sac})} \times [\text{Saccharose}]_{\text{g/L}}^0}$$

- le *degré de polymérisation moyen* : il rend compte de la répartition de taille des produits de glucosylation synthétisés :

$$DP \text{ moyen} = \sum_{i \geq 2} p(\text{AFGOS } i) \times i$$

avec $p(\text{AFGOS } i)$ le pourcentage molaire de l'**AFGOS** de DP i .

IV.2. Conditions réactionnelles

Les conditions de référence employées pour la réaction de glucosylation sont les suivantes :

AF	52 g/L, soit 0,29 M	} Rapport molaire S/A de 1 CST de 152 g/L
Saccharose	100 g/L, soit 0,29 M	
Enzyme	1 U/mL	
Tampon	acétate de sodium (20 mM, pH=5,2) pour les GS de <i>L. mesenteroides</i> PBS (1X, pH=7,3) pour l'AS de <i>N. polysaccharea</i>	
Température	30 °C	

La réaction est considérée comme terminée lorsque la totalité du saccharose est consommé.

L'influence des paramètres S/A et/ou CST est étudiée en modifiant les concentrations en **AF** et en saccharose (Tableau 11).

Tableau 11 – Concentrations en saccharose et **AF** utilisées pour différents rapports molaires saccharose/accepteur S/A et concentrations en sucres totaux CST.

		Rapport molaire Saccharose/Accepteur				
		0.5	1	2	3	5
CST	50 g/L	-	[AF]=17 g/L [Sacch]=33 g/L	-	-	-
	100 g/L	-	[AF]=34 g/L [Sacch]=66 g/L	-	-	-
	152 g/L	[AF]=78 g/L [Sacch]=74 g/L	[AF]=52 g/L [Sacch]=100 g/L	[AF]=32 g/L [Sacch]=120 g/L	[AF]=23 g/L [Sacch]=129 g/L	[AF]=14 g/L [Sacch]=138 g/L
	200 g/L	-	[AF]=69 g/L [Sacch]=131 g/L	-	-	-
	300 g/L	-	[AF]=103 g/L [Sacch]=197 g/L	-	-	-

Les réactions de glucosylation des dérivés oxime et éthyloxime de l'**AF** ont été réalisées dans les mêmes conditions, avec une concentration en accepteur de 0.29 M.

IV.3. Purification des AFGOS

VI.3.1. Conditions de production des AFGOS

La production des **AFGOS** a été réalisée dans les conditions optimale de glucosylation de l'**AF**. Les quantités utilisées sont indiquées dans le Tableau 12.

Tableau 12 – Quantités en **AF** et saccharose utilisées pour la synthèse d'**AFGOS** ensuite isolés.

Enzyme utilisée	DSR de <i>L. m.</i> B-512F	DSR de <i>L. m.</i> B-1299	AS de <i>N. polysaccharea</i>
Saccharose (g)	30	100	21
AF (g)	5	46	5
Unités (U)	180	500	68
Volume réactionnel (mL)	65	1000	200

VI.3.2. Dé-dextranisation par précipitation à l'éthanol

Le polymère formé en présence des GS de *L. mesenteroides* est précipité par ajout à froid d'éthanol absolu (volume à volume). Le mélange est laissé sous agitation à 4 °C pendant une nuit, puis centrifugé à 15 000 rpm à 4 °C pendant 10 min. Le surnageant est concentré par évaporation jusqu'à une concentration d'environ 250 g/L.

VI.3.3. Elimination des mono et disaccharides par chromatographie d'exclusion

VI.3.3.1. Sur résine Biogel® P2

L'élimination des mono et disaccharides est effectuée sur une colonne de 91 x 10 cm, remplie d'une phase stationnaire de type BioGel® P2 (gel de polyacrylamide, particules fines de diamètre 45-90 µm). Le débit d'eau ultra pure est maintenu à 14 mL/min à l'aide d'une pompe péristaltique. Le signal RI est mesuré par un détecteur réfractométrique ICS.

VI.3.3.2. Sur résine K⁺

La résine CR 1320 K⁺ a été utilisée comme phase stationnaire, sur un lit de 95 x 5 cm. Les purifications sont effectuées à 60 °C, avec de l'eau ultra pure dont le débit est fixé à 17.5 mL/min à l'aide d'une pompe péristaltique. Un détecteur ICS est utilisé pour l'acquisition du signal RI.

Note : cette résine échangeuse de cation est composée de polymère de styrène divinylbenzène sulphonatés avec comme contre ion le cation K⁺. En plus de son rôle de tamis moléculaire (grâce aux billes de résine), la résine permet la séparation de sucres par rapport à la différence de stabilité des complexes sucre-polyol-contreion ; seuls certains polyols et certains sucres ont la capacité de former un complexe avec les contre ions permettant ainsi une séparation des produits en fonction de leur constante de complexation. Avec la résine K⁺, fructose et glucose sont co-élus mais monosaccharides, disaccharides et oligosaccharides sont séparés. La résine Ca²⁺ quant à elle est préférable pour une séparation des monosaccharides.

VI.3.4. Obtention de chaque AFGOS par chromatographie préparative

Le système utilisé est une colonne à compression axiale, de 40 mm de diamètre, avec en aval une pompe ICS et en amont un détecteur réfractométrique 8120 d'ICS. La phase stationnaire est du type 120-10-C18 PRONTOSIL EUROBOND (10 µm). La purification a été effectuée sur un lit d'une hauteur de 240 mm, traversé par de l'eau ultra-pure à un débit de 50 mL/min. Les injections se font manuellement à l'aide d'une boucle de 1 mL, et les solutions purifiées préparées à 100-150 g/L.

Tableau 13 – Données du cristal d'**AFoxH** ; longueurs et angles de liaison de la molécule d'**AFoxH**.

Données du cristal		Longueur de liaison (Å)		Angle de liaison (°)	
Formule empirique	C6H11NO5	C(1)-O(1)	1.4377(15)	O(1)-C(1)-C(2)	109.95(10)
Poids moléculaire	177.16	C(1)-C(2)	1.5074(18)	N(1)-C(2)-C(1)	126.84(13)
Système cristallin	Orthorhombique	C(2)-N(1)	1.2729(18)	N(1)-C(2)-C(3)	117.35(12)
Groupe spatial	P2(1)2(1)2(1)	C(2)-C(3)	1.5189(18)	C(1)-C(2)-C(3)	115.76(11)
Z	4	C(3)-O(3)	1.4163(15)	O(3)-C(3)-C(2)	113.09(10)
a (Å)	7.7808(5)	C(3)-C(4)	1.5245(16)	O(3)-C(3)-C(4)	107.46(10)
b (Å)	9.3976(6)	C(4)-O(4)	1.4241(14)	C(2)-C(3)-C(4)	111.00(10)
c (Å)	10.8080(7)	C(4)-C(5)	1.5263(16)	O(4)-C(4)-C(3)	109.51(10)
α (°)	90	C(5)-O(1)	1.4321(14)	O(4)-C(4)-C(5)	108.32(10)
β (°)	90	C(5)-C(6)	1.5130(17)	C(3)-C(4)-C(5)	110.45(10)
γ (°)	90	C(6)-O(5)	1.4256(16)	O(1)-C(5)-C(6)	107.52(10)
V (Å ³)	790.29(9)	N(1)-O(2)	1.4108(15)	O(1)-C(5)-C(4)	108.34(9)
Densité (calc) (g/cm ³)	1.489			C(6)-C(5)-C(4)	111.85(10)
Taille du cristal (mm ³)	0.1 x 0.4 x 0.6			O(5)-C(6)-C(5)	111.33(10)
Coefficient d'absorption (mm ⁻¹)	0.131			C(2)-N(1)-O(2)	112.16(11)
T (K)	133(2)			C(5)-O(1)-C(1)	112.53(9)
λ (Å)	0.71073				
F (000)	376				
Nombre de réflexions acquises	4607				
Réflexions indépendantes (R(int))	1620 (0.0247)				
Méthode d'affinement	Méthode des moindres carrés sur F ²				
Paramètre de structure absolue	0.7(9)				
Densité électronique résiduelle (e. Å ⁻³)	0.207 and -0.272				

VII.3. Purification de l'AF éthylxime et l'AF benzyloxime par chromatographie sur colonne de silice

Une colonne de 30 x 200 mm remplie de gel de silice 60 M (230-400 mesh) a été préparée. La purification de l'**AFoxBn** a été effectuée en utilisant une phase mobile composée d'hexane et d'acétate d'éthyle dans un rapport 1/2 (V/V), alors que pour l'**AFoxEt**, plus polaire, l'acétate d'éthyle pur est suffisant.

1,5-anhydro-D-fructose éthylxime:

Les données cristallographiques sont rassemblées dans le Tableau 14.

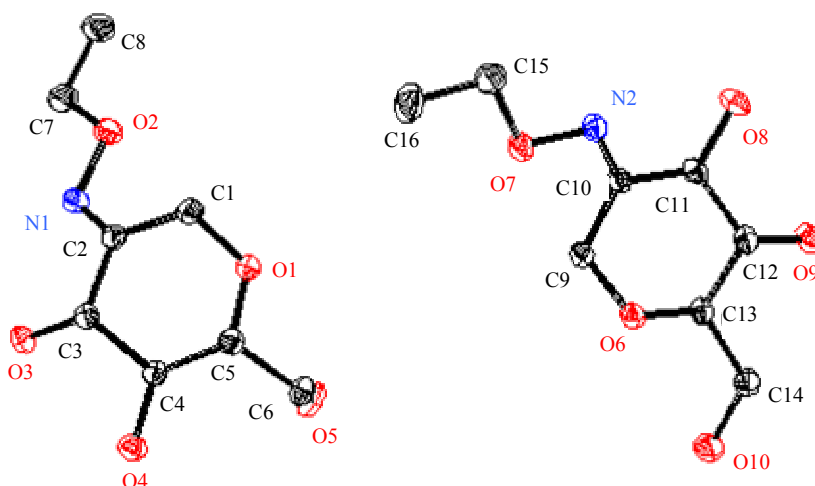


Tableau 14 – Données du cristal d'**AFoxEt** ; longueurs et angles de liaison de la molécule d'**AFoxEt**.

Données du cristal		Longueur de liaison (Å)		Angle de liaison (°)	
Formule empirique	C ₈ H ₁₆ NO ₅ .50	C(1)-O(1)	1.426(3)	O(1)-C(1)-C(2)	108.57(17)
Poids moléculaire	214.22	C(1)-C(2)	1.511(3)	N(1)-C(2)-C(1)	126.7(2)
Système cristallin	Triclinique	C(2)-N(1)	1.273(3)	N(1)-C(2)-C(3)	119.45(17)
Groupe spatial	P1	C(2)-C(3)	1.506(3)	C(1)-C(2)-C(3)	113.78(18)
Z	2	C(3)-O(3)	1.419(2)	O(3)-C(3)-C(2)	110.53(17)
a (Å)	4.5789(6)	C(3)-C(4)	1.538(3)	O(3)-C(3)-C(4)	111.08(15)
b (Å)	10.0533(14)	C(4)-O(4)	1.429(2)	C(2)-C(3)-C(4)	110.25(15)
c (Å)	11.5074(16)	C(4)-C(5)	1.541(2)	O(4)-C(4)-C(3)	109.54(15)
α (°)	77.944(2)	C(5)-O(1)	1.436(3)	O(4)-C(4)-C(5)	111.27(16)
β (°)	80.815(2)	C(5)-C(6)	1.506(3)	C(3)-C(4)-C(5)	110.94(15)
γ (°)	80.451(3)	C(6)-O(5)	1.423(3)	O(1)-C(5)-C(6)	107.40(15)
V (Å ³)	506.55(12)	N(1)-O(2)	1.413(2)	O(1)-C(5)-C(4)	109.33(16)
Densité (calc) (g/cm ³)	1.404	C(7)-O(2)	1.442(3)	C(6)-C(5)-C(4)	114.14(16)
Taille du cristal (mm ³)	0.1 x 0.2 x 0.6	C(7)-C(8)	1.502(3)	O(5)-C(6)-C(5)	110.62(17)
Coefficient d'absorption (mm ⁻¹)	0.119	C(9)-O(6)	1.428(3)	C(2)-N(1)-O(2)	112.20(16)
T (K)	193(2)	C(9)-C(10)	1.505(3)	C(5)-O(1)-C(1)	111.88(15)
λ (Å)	0.71073	C(10)-N(2)	1.269(3)	N(1)-O(2)-C(7)	108.52(15)
F (000)	230	C(10)-C(11)	1.507(3)	O(2)-C(7)-C(8)	106.90(19)
Nombre de réflexions acquises	3384	C(11)-O(8)	1.414(2)	O(6)-C(9)-C(10)	109.22(17)
Réflexions indépendantes (R(int))	2866 (0.0174)	C(11)-C(12)	1.529(3)	N(2)-C(10)-C(9)	126.88(18)
Méthode d'affinement	Méthode des moindres carrés sur F ²	C(12)-O(9)	1.423(2)	N(2)-C(10)-C(11)	119.53(17)
Paramètre de structure absolue	0.6(8)	C(12)-C(13)	1.536(3)	C(9)-C(10)-C(11)	113.57(16)
Densité électronique résiduelle (e. Å ⁻³)	0.359 and -0.269	C(13)-O(6)	1.437(2)	O(8)-C(11)-C(10)	114.02(16)
		C(13)-C(14)	1.513(3)	O(8)-C(11)-C(12)	111.26(17)
		C(14)-O(10)	1.428(3)	C(10)-C(11)-C(12)	109.67(17)
		N(2)-O(7)	1.413(2)	O(9)-C(12)-C(11)	110.59(18)
		C(15)-O(7)	1.441(3)	O(9)-C(12)-C(13)	106.18(15)
		C(15)-C(16)	1.505(3)	C(11)-C(12)-C(13)	110.22(16)
				O(6)-C(13)-C(12)	109.99(15)
				O(6)-C(13)-C(14)	106.00(17)
				C(12)-C(13)-	111.83(17)
				O(10)-C(14)-C(13)	112.53(18)
				C(10)-N(2)-O(7)	112.28(16)
				N(2)-O(7)-C(15)	108.71(15)
				O(7)-C(15)-C(16)	106.45(19)
				C(9)-O(6)-C(13)	112.64(17)

Partie VIII. TECHNIQUES ANALYTIQUES

VIII.1. Chromatographie liquide haute performance (CLHP)

Les analyses chromatographiques sont réalisées sur une chaîne HEWLETT PACKARD composée :

- d'une pompe quaternaire 1050 ;
- d'un module de dégazage en ligne 1050 ;
- d'un passeur automatique d'échantillons 1100 ;
- d'un détecteur réfractométrique 1100, et d'un détecteur UV 1050 ($\lambda=207$ nm).

Les colonnes utilisées pour l'analyse des milieux de glycosylation sont thermostatées à l'aide d'un four externe, et sont de deux types :

- une colonne spécifique pour la séparation de monosaccharides : carbohydrate Ca^{2+} (Alltech), 300 x 6.5 mm, traversée par de l'eau ultra pure à 0.5 mL/min et thermostatée à 90 °C.
- une colonne apolaire : phase stationnaire PRONTOSIL EUROBOND C18 (Bischoff Chromatography), 250 x 4 mm, porosité de 5 μm , maintenue à 30 °C avec de l'eau ultra-pure à 0.5 mL/min comme éluant ;

Une seconde colonne apolaire (PRONTOSIL 120-3-C18-AQ, 125 x 4.0 mm, de porosité 3 μm) a été utilisée dans le cadre d'un test de criblage à 30°C avec un mélange eau/acétonitrile 90/10 (V/V) comme phase mobile.

Un étalonnage externe est réalisé avec les monosaccharides (fructose, glucose et **AF**) et avec le saccharose pour des concentrations comprises entre 1 et 20 g/L. Les échantillons à analyser sont dilués dans de l'eau de façon à se placer dans cette gamme de concentration.

VIII.2. Couplage Chromatographie Liquide – Spectrométrie de Masse (CL-SM)

Les analyses LC-SM ont été réalisées à l'université Paul Sabatier (Toulouse), dans le service commun de spectrométrie de masse (S. RICHELME).

L'appareil utilisé est un spectromètre de masse API 365 (Perking-Elmer SCIEX). La séparation par chromatographie liquide est assurée par une colonne de type C18 identique à celle décrite en VIII.1. Les molécules sont ensuite ionisées par ESI (Electron Spray Ionisation), puis les ions sont séparés par un quadripôle et détectés en mode positif.

VIII.3. Spectrométrie de masse haute résolution (SMHR)

La masse moléculaire précise des molécules purifiées a été déterminée en FAB (Fast Atom Bombardment) par un spectromètre de masse Autospec, de géométrie EBE (Micromass, Manchester, GB). L'appareil fonctionne à une tension accélératrice de 8 kV, en mode positif. 1 μ L d'échantillon est mélangé au bout de la sonde avec une matrice de:

- glycerol pour les α -(1,6) AFGOS DP 3 et 4
- dithiothreitol/dithioerythritol pour les α -(1,6) AFGOS DP 2 et 3 et l'AF oxime.

VIII.4. Caractérisation structurale par résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les études RMN ont été réalisées au service commun de RMN (M. VEDRENNE) de l'université Paul Sabatier (Toulouse).

Les spectres ^1H (400.130 MHz) et ^{13}C (100.612 MHz) ainsi que les séquences HSQC et HMBC ont été obtenus sur un spectromètre Bruker-ARX 400 équipé d'un système ultrashim.

Les échantillons ont été préparés dans du D_2O , excepté pour l'AF benzyloxime dans le DMSO, à des concentrations d'environ 80 g/L.

VIII.5. Analyses cristallographiques par diffraction aux rayons X

La structure tri-dimensionnelle des dérivés AF oxime et AF éthyloxime déterminée par cristallographie par diffraction aux rayons X a été réalisée par H. GORNITZKA, au service commun de cristallographie de l'université Paul Sabatier (Toulouse) sur un appareil de type BRUKER AXS CCD 1000.

Partie IX. DETERMINATION DU POUVOIR ANTI-OXYDANT PAR LA METHODE A

L'ACIDE THIOBARBITURIQUE

Le pouvoir anti-oxydant est mesuré par la méthode à l'acide thiobarbiturique (TBA), proposée par FUJISUE et coll. [FUJISUE, M. et coll., 1999]. Elle est basée sur l'oxydation de l'acide linoléique plus ou moins inhibée par la présence d'une molécule anti-oxydante (Figure 49). L'essai est réalisé en tube scellé dans les conditions suivantes :

Acide linoléique	4.5 mM
Tween 40	0.04 % (v/v)
Anti-oxydant	0.1 % ou 0.01 % (p/p)
Thermostaté à 50 °C pendant 2 semaines	

La vitamine C est utilisée comme référence, et un témoin négatif sans anti-oxydant est aussi réalisé.

Après 2 semaines à 50 °C, la quantité de malonaldéhyde (résultant de la coupure oxydante de l'acide linoléique) est dosée par ajout de TBA dans les conditions suivantes :

500 µL	acide trichloroacétique	20 %
250 µL	TBA	0.67 %
500 µL	de milieu réactionnel	

Le mélange est alors chauffé à 100 °C pendant 10 min, puis refroidi à température ambiante. Après centrifugation à 10 000 rpm pendant 10 min, l'absorbance du surnageant est lue à 532 nm : le complexe TBA:malonaldéhyde est responsable de la coloration rose-violet.

Le pouvoir anti-oxydant est alors calculé comme étant le pourcentage d'acide linoléique non oxydé, avec une valeur fixée à 0 pour le témoin négatif.

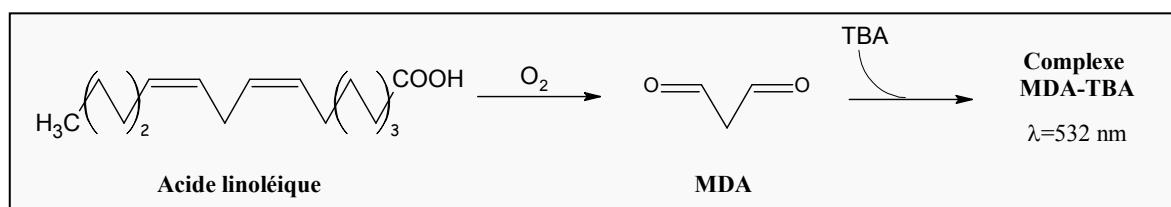


Figure 49 – Oxydation naturelle de l'acide linoléique, dont le produit d'oxydation, le malondialdéhyde (MDA) est dosé par complexation avec l'acide thiobarbiturique (TBA)

Partie X. EVALUATION DES PROPRIETES PREBIOTIQUES

Les propriétés prébiotiques ont été étudiées en collaboration avec la société GENIBIO (St Giron, 09).

Le pouvoir prébiotique des oligosaccharides est évalué par leur aptitude à stimuler la croissance de bactéries représentatives des flores bénéfiques intestinale et vaginale, et leur incapacité à stimuler la flore pathogène.

Les bactéries bénéfiques et pathogènes sélectionnées pour cette étude sont indiquées dans le Tableau 15.

Tableau 15 – Bactéries représentatives des écosystèmes vaginaux et intestinaux utilisées pour l'évaluation des propriétés prébiotiques des AFGOS.

Ecosystème	Toxicité des souches	Souches représentatives
Intestinal	Bénéfiques	<i>Lactobacillus acidophilus</i> BL 2020 <i>Bifidobacterium breve</i> BL 9909
	Pathogènes	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 CIP 103571 <i>Salmonella typhimurium</i> CIP 6062T
Vaginal	Bénéfiques	<i>Lactobacillus crispatus</i> BLL 2008 <i>Lactobacillus jensenii</i> BLL 2108
	Pathogènes	<i>Candida albicans</i> ATCC 2091 <i>Escherichia coli</i> CIP 548 T

Les bactéries sont cultivées en fermenteur, pendant 48h dans des milieux de culture contenant comme seule source de carbone les oligosaccharides. Un milieu adapté à la croissance de chaque souche a été employé. Ils sont recensés dans le Tableau 16.

Tableau 16 - Composition des bouillons utilisés pour les fermentations

Bactéries lactiques	g/L	<i>E. Coli/S. typhimurium</i>	g/L	<i>C. albicans</i>	g/L
Oligosaccharides	10	Oligosaccharides	10	Oligosaccharides	10
15 mL de bouillon MRS :		15 mL de bouillon Trypcase-soja :		15 mL de bouillon Sabouraud	
Tryptone	10	Peptone pancréatique de caséine	17	Peptone pancréatique de caséine	5
Extrait de viande bactériologique	10	Peptone papaïnique de soja	3	Extrait de viande bactériologique	5
Extrait autolytique de levure	5	NaCl	5	Sous conditions aérobies A 30 °C pendant 48 h	
Tween 80	1.1	K ₂ HPO ₄	2.5		
K ₂ HPO ₄	2	Sous conditions aérobies			
Acétate de sodium	5	A 37 °C pendant 48 h			
Citrate d'ammonium	2				
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0.20				
MnSO ₄ , H ₂ O	0.05				
Sous conditions anérobies					
A 37 °C pendant 48 h					

La croissance des bactéries a été suivie par mesure de la turbidité à 640 nm. Le pourcentage de glucides consommés après 48h de fermentation a été mesuré par CLHP.

Partie XI. MODELISATION MOLECULAIRE

L'étude de modélisation moléculaire est réalisée sur une station Silicon Graphics O2 R.1000, à l'aide des logiciels InsightII, Biopolymer et Discover (Accelrys Inc., San Diego, USA).

Nous avons uniquement utilisé des méthodes de mécanique moléculaire. Le champ de force « CFF91 » a été systématiquement employé au cours des études de modélisation. Nous avons choisi l'algorithme « Steepest descent » pour la minimisation des fonctions d'énergie potentielle.

XI.1. Champ de force « CFF91 »

L'énergie potentielle d'une molécule est un paramètre majeur de la modélisation moléculaire. Les formules empiriques permettant de la calculer constituent le champ de force. Celui-ci devra être le mieux adapté possible au calcul des variations de l'énergie potentielle en fonction de la géométrie moléculaire.

En mécanique moléculaire, l'énergie potentielle est décomposée en la somme de fonctions potentielles supposées indépendantes à caractère géométrique entre atomes liés (énergies d'élongation des liaisons, de déformation des angles de valence et de torsion autour des angles dièdres), auxquelles s'ajoutent les énergies d'interactions entre atomes non-liés (interactions de van der Waals, électrostatiques et liaisons hydrogène).

$$E_{\text{totale}} = E_{\text{liaison}} + E_{\text{angle}} + E_{\text{torsion}} + E_{\text{van der Waals}} + E_{\text{électro}} + E_{\text{liaisonH}}$$

Il existe des champs de force, dits de deuxième génération, qui comportent des termes additionnels (termes croisés) reflétant des interactions mixtes.

Le champ de force « CFF91 » utilisé au cours de cette étude est un champ de force de deuxième génération, dérivé du champ de force de première génération CVFF (Consistence Valence Force Field). Ce champ de force est particulièrement adapté à la modélisation moléculaire des protéines.

La Figure 50 donne une illustration géométrique des différents termes composant le champ de force CFF91.

On trouve les termes d'élongation (1), de déformation des angles de valence (2) et de torsion autour des angles dièdres (3). Le terme (4) illustre la déformation hors du plan. Les expressions (5) à (11) représentent les termes croisés. Elles prennent en compte, par exemple, l'élongation de la liaison couplée à une déformation de l'angle de valence adjacent (7) ou encore la torsion d'un dièdre couplée à la déformation angulaire entre les mêmes atomes (8).

Le terme (12) illustre les interactions entre atomes non liés (van der Waals, électrostatiques et liaison hydrogène). L'expression des interactions de van der Waals se décompose en une somme de termes répulsifs et attractifs constituant le potentiel de LENNARD-JONES ; celle de l'énergie électrostatique est de type coulombien.

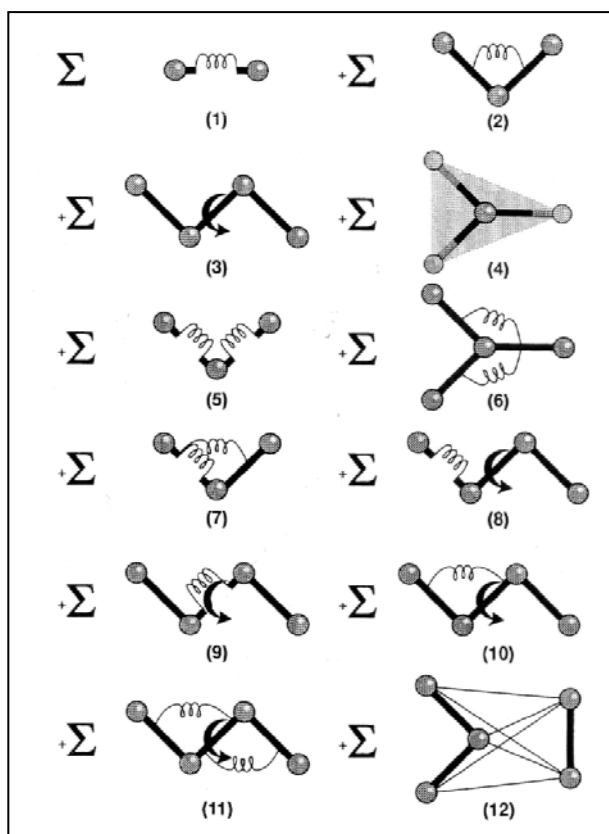


Figure 50 – Représentation géométrique des différents termes de champ de force CFF91

XI.2. Calculs de minimisation d'énergie potentielle

XI.2.1. Démarche

Chacun des termes composant l'expression de l'énergie potentielle possède une valeur d'équilibre préférentielle (longueur de liaison, angle de valence, ..) pour laquelle l'énergie est minimale.

En mécanique moléculaire, les calculs de minimisation consistent, à partir d'une géométrie initiale, à rechercher le jeu de coordonnées cartésiennes qui minimise la somme de toutes les contributions énergétiques dues aux déformations des coordonnées internes et aux interactions entre atomes non-liés. La méthode consiste à modifier, par petits incréments, tous les paramètres définissant la géométrie du système jusqu'à ce que l'énergie potentielle moyenne atteigne un minimum local. Notons que des contraintes sont souvent imposées à la géométrie initiale dans les premières étapes de minimisation pour « diriger » les calculs selon des hypothèses préétablies. Les solutions qui en résultent ne sont valides qu'à condition que ces contraintes soient complètement supprimées dans les étapes de minimisation finales.

XI.2.2. Découpage de l'enzyme

Afin de limiter les temps de calcul qui sont environ proportionnels au carré du nombre d'atomes, nous avons utilisé une forme « tronquée » de l'amylosaccharase, circonscrite aux zones d'intérêt.

Nous avons conservé les boucles $\beta \rightarrow \alpha$ du tonneau $(\beta/\alpha)_8$ qui, le plus souvent, ont un rôle fonctionnel majeur. De plus, nous avons ajouté les résidus appartenant aux éléments structuraux adjacents (fin des brins β et début des hélices α suivantes). La position de ces derniers résidus est fixée lors des calculs afin de préserver l'intégrité structurale de l'enzyme ainsi découpée.

Le découpage de l'AS a conduit à une forme « tronquée » comportant 309 acides aminés sur les 628 que compte l'enzyme recombinante. Les segments suivants ont été conservés :

102-112 ; 131-163 ; 182-278 ; 284-304 ; 328-332 ; 348-358 ; 387-464 ; 484-536.

Pour les calculs de minimisation, les extrémités des segments conservés de l'AS ont été fixés.

XI.2.3. Algorithme de « steepest descent »

Au cours de cette étude, nous avons utilisé la méthode de la plus grande pente ou « steepest descent ». Cet algorithme prévoit, dans un premier temps, de calculer l'énergie initiale, puis de déplacer chaque atome individuellement selon les trois directions cartésiennes et de recalculer l'énergie après chaque déplacement. Ceci revient à calculer la dérivée première de l'énergie potentielle. L'algorithme permet ensuite de déplacer tous les atomes sur une distance qui dépend de (dE/dri) puis de recalculer à nouveau la dérivée première de l'énergie à partir de cette nouvelle position. Cette méthode se révèle très performante pour supprimer les interférences entre atomes et certains problèmes stéréochimiques, tout en préservant la structure globale d'une molécule ou d'un système moléculaire.

**TROISIEME PARTIE -
RESULTATS ET DISCUSSION**

**CHAPITRE A -
GLUCOSYLATION DU 1,5-ANHYDRO-D-FRUCTOSE PAR
LES GLUCANE-SACCHARASES NATIVES**

De par sa faible disponibilité, l'anhydro-D-fructose (AF) n'a jamais été testé comme accepteur des glucane-saccharases.

L'objectif de ce chapitre est de mettre en oeuvre la glucosylation enzymatique de l'AF et d'étudier les produits de glucosylation alors formés. Plusieurs glucane-saccharases ont été sélectionnées sur la base de spécificités différentes, afin d'une part, de tester le pouvoir accepteur de l'AF pour chacune de ces enzymes, et d'autre part, d'être en mesure de synthétiser des dérivés glucosylés de l'AF de structures différentes. Une large partie de ce chapitre est donc consacrée à l'isolement et à la caractérisation des dérivés glucosylés de l'AF par résonance magnétique nucléaire.

La seconde partie de ce chapitre est, quant à elle, destinée à démontrer l'influence des conditions initiales (rapport molaire saccharose/accepteur et matière sèche) sur l'efficacité de la glucosylation de l'AF. Les résultats obtenus seront alors utiles pour choisir au mieux les concentrations en AF et en saccharose à fixer pour la production optimale de dérivés glucosylés de l'AF.

Partie I. GLUCOSYLATION DE L'AF EN PRESENCE DES GS NATIVES

I.1. Avant propos : étude de la stabilité de l'AF dans les tampons de glucosylation

Pour des raisons de commodité (essentiellement pour pouvoir travailler avec des concentrations élevées), nous avons lyophilisé les lots d'AF fournis par DANISCO. Notons cependant que l'AF étant très hygroscopique, les solutions d'AF préparées par nos soins ont systématiquement été dosées par CLHP (détection réfractométrique) par étalonnage externe (grâce à une solution standard d'AF de concentration 21,000 $\mu\text{mol/mL}$ (3.78 mg/mL), elle aussi fournie par DANISCO).

L'étude bibliographique a décrit les différentes formes de l'AF présentes en milieux aqueux ou organiques. En milieu aqueux, la forme hydratée est la forme prédominante adoptée par l'AF. Cependant, selon le pH employé, on note une influence sur l'équilibre entre formes hydratée et cétonique (paragraphe I.2 de la partie bibliographique). Les GS sélectionnées pour cette étude étant actives dans des milieux tamponnés à des pH différents, nous avons, avant tout, étudié les structures adoptées par l'AF dans deux tampons :

- l'acétate de sodium AcONa 20 mM, de pH 5,2, employé pour les GS des souches de *L. mesenteroides*

- le tampon phosphate salin PBS 1, de pH 7,3, employé pour l'amylosaccharase de *N. polysaccharea*.

L'analyse par CLHP sur colonne C18 montre la présence de trois composés juste après dissolution de l'AF dans le tampon AcONa (Figure 51-A). L'équilibre est atteint dans ce cas après 3 heures à température ambiante, et le composé majoritaire (pic 1) est attribué à l'AF hydraté grâce à une solution témoin en AF. Des analyses par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse montrent que les pics 2 et 3 correspondent à des produits d'une masse molaire de 340 g/mol, donc certainement des dimères de l'AF qui dans l'eau évoluent rapidement vers la forme hydratée.

Par contre, dans le tampon PBS, la forme hydratée de l'AF est majoritaire à 96 % dès la dissolution de l'AF (Figure 51-B).

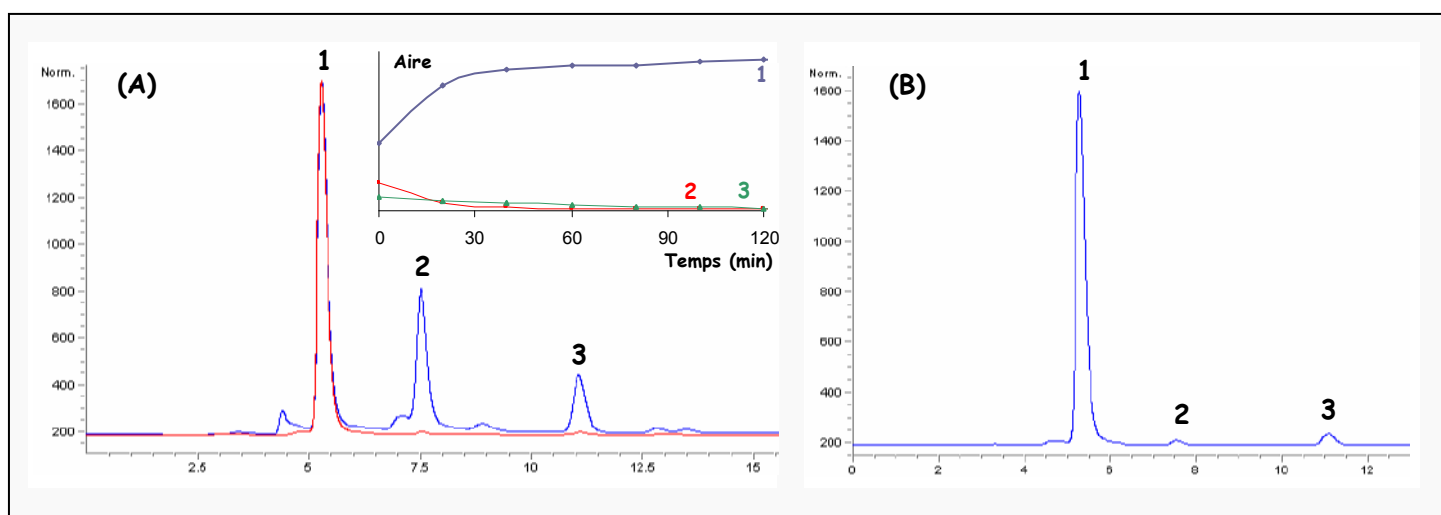


Figure 51 – Comportement de l'AF après dissolution dans les deux tampons de glucosylation (A) acétate de sodium, pH = 5,2 et (B) PBS, pH = 7,3.

Paramètres CLHP : colonne C18, eau ultra-pure 0,5 mL/min, détecteur RI

Identification des chromatogrammes : tracé bleu : t=0 (juste après dissolution) ; tracé rouge : t=2h.

Identification des pics : 1 : forme hydratée de l'AF ; 2 et 3 : dimères de l'AF.

Cette étude préliminaire confirme donc l'effet du pH de la solution dans laquelle l'AF est dissous sur les structures adoptées par la molécule. Pour la poursuite de l'étude de la glucosylation de l'AF, nous avons donc pris garde à ne travailler que sur la forme hydratée en préparant les solutions dans les tampons de glucosylation suffisamment longtemps à l'avance.

I.2. GS natives sélectionnées pour la glucosylation de l'AF

Pour tester l'AF comme accepteur des GS, nous avons sélectionné plusieurs de ces enzymes de spécificités différentes dans l'objectif de synthétiser des produits de glucosylation de l'AF de structures différentes.

Les GS sélectionnées sont décrites dans le chapitre B de la partie bibliographique, et le Tableau 17 rappelle les principales liaisons glucosidiques formées par ces enzymes.

Tableau 17 – Spécificité des GS sélectionnées pour l'étude de la glucosylation de l'AF.

Légende : ✓ : présence de la liaison ; ✗ : absence de la liaison.

Souche	Enzyme	α -(1,6)	α -(1,2)	α -(1,3)	α -(1,4)
<i>L. m.</i> NRRL B-512F	Dextrane-saccharase (DSR)	✓	✗	✗	✗
<i>L. m.</i> NRRL B-1299	Dextrane-saccharase (DSR)	✓	✓	✗	✗
<i>L. m.</i> NRRL B-1355	Alternane-saccharase (ASR)	✓	✗	✓	✗
<i>N. polysaccharea</i>	Amylosaccharase (AS)	✗	✗	✗	✓

I.3. Glucosylation de l'AF dans les conditions de référence

I.3.1. Influence de l'AF sur l'activité des GS

Afin de glucosyler l'AF, il est avant tout important de vérifier si cette molécule ne joue pas le rôle d'inhibiteur des GS. Les activités de l'AS de *N. polysaccharea* et la DSR de *L. mesenteroides* B-512F ont donc été mesurées en présence de différentes concentrations en AF. Cependant, l'AF réagissant avec le DNS à froid, l'activité enzymatique ne peut pas être mesurée par dosage du fructose avec le DNS. Nous avons donc utilisé la CLHP sur colonne carbohydrate Ca^{2+} pour doser le fructose libéré dans le milieu par clivage du saccharose.

Avec la DSR de *L. mesenteroides* B-512F, nous n'avons pas observé d'influence de la présence d'AF sur l'activité enzymatique. Pour l'AS de *N. polysaccharea*, nous avons montré une légère activation de l'enzyme en présence d'AF (Tableau 18). Quelle que soit la concentration en AF, entre 25 et 100 g/L, l'activité est augmentée d'un facteur 2,5 environ. La présence de l'AF ne désactive donc pas l'enzyme, ce qui est primordial pour la suite de l'étude.

De plus, il est généralement constaté que les molécules reconnues comme accepteur des GS ne sont pas inhibiteurs, mais peuvent au contraire activer l'enzyme.

Tableau 18 – Activité des GS mesurées en présence de différentes concentrations en AF.

	[AF] g/L	0	26	52	104
Activité	DSR de <i>L.m.</i> B-512F	3,5	n.d.	3,3	n.d.
(U/mL)	AS de <i>N.p.</i>	1,0	2,7	2,5	2,3

I.3.1.1. Mise en évidence de la glucosylation de l'AF

La réaction de glucosylation a d'abord été mise en œuvre dans des conditions initiales prises comme références : concentrations en AF et saccharose de 52 g/L et 100 g/L, soit un rapport molaire S/A de 1 et une concentration en sucres totaux (CST) de 152 g/L.

Pour étudier la glucosylation de l'AF, il est à la fois nécessaire de suivre l'évolution des concentrations en AF (accepteur) et en saccharose (donneur de résidus glucose), ainsi que l'apparition de produits de glucosylation (oligosaccharides de degrés de polymérisation -DP-croissants).

Nota bene : par convention, le degré de polymérisation DP correspond au nombre d'unités glycosyle de l'oligosaccharide. Ainsi, le DP d'un monosaccharide est de 1, d'un disaccharide de 2, etc.... L'AF est quant à lui un DP 1 et le produit de monoglucosylation un DP 2.

Le choix s'est donc naturellement porté sur la CLHP doté d'un détecteur réfractométrique, universellement utilisé pour la détection et la quantification des sucres. Or, une seule colonne chromatographique est insuffisante pour séparer à la fois les monosaccharides (glucose, fructose, AF) et disaccharides (saccharose) des oligosaccharides de DP supérieur à 2. Ainsi, nous avons choisi d'utiliser deux colonnes complémentaires :

- une colonne apolaire de type C18, avec de l'eau ultra pure comme éluant afin d'observer les produits de glucosylation ; dans ce cas, le temps de rétention augmente avec le DP.
- une colonne carbohydate Ca^{2+} spécialement conçue pour la séparation de mono et disaccharides. D'autres colonnes ont été testées (Aminex H^+ , Carbohydate K^+ , ...), mais seule la colonne carbohydate Ca^{2+} permet de séparer efficacement l'AF (accepteur), le fructose (résultant du clivage du saccharose), le glucose (obtenu par la réaction d'hydrolyse du saccharose) et le saccharose (substrat des GS), tous présents dans le milieu réactionnel au cours de la glucosylation de l'AF (Figure 52).

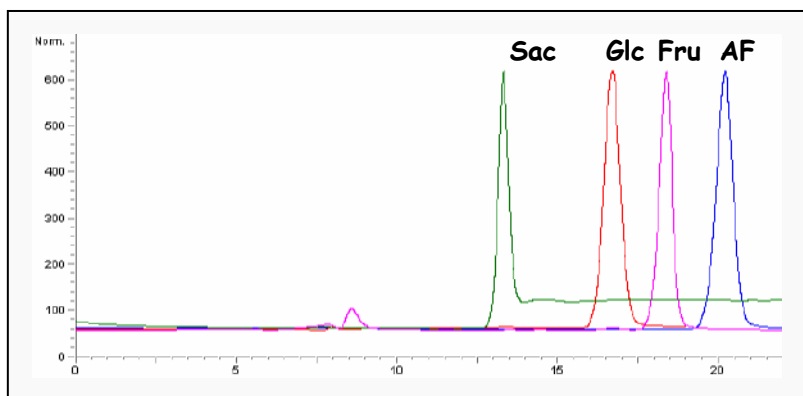


Figure 52 – Utilisation de la colonne carbohydre Ca^{2+} pour la séparation des mono (fructose, glucose, AF) et disaccharide (saccharose).

Paramètre CLHP: colonne carbohydre Ca^{2+} , eau ultra pure à 0,5 mL/min, T(colonne) = 90 °C.

Identification des pics : **Sac** : saccharose ; **Glc** : glucose ; **Fru** : fructose.

Quelle que soit la GS testée, nous avons observé sur colonne carbohydre Ca^{2+} après plusieurs heures de réaction la consommation totale du saccharose avec libération concomitante de fructose (Figure 53-A) indiquant que l'enzyme est active.

Par ailleurs, la diminution du pic de l'AF après consommation totale du saccharose montre qu'une partie de l'accepteur a réagi. Sur colonne C18, de nouveaux pics de temps de rétention élevés sont présents en fin de réaction (Figure 53-B). Parallèlement, un témoin sans AF (uniquement en présence de saccharose et d'enzyme) montre que ces nouveaux pics sont liés à la présence de l'AF dans le milieu réactionnel.

Notons également qu'une petite quantité de leucrose (Figure 53-A) est synthétisée en présence des GS de *L. mesenteroides*. Il résulte de la glycosylation du fructose, dont la concentration, donc la probabilité de glycosylation, croît avec l'avancement de la réaction.

Par conséquent, nous avons démontré que l'AF est glycosylé dans les conditions de référence, avec formation de produits de glycosylation. Toutes les GS sélectionnées pour cette étude (Tableau 17) reconnaissent l'AF comme accepteur.

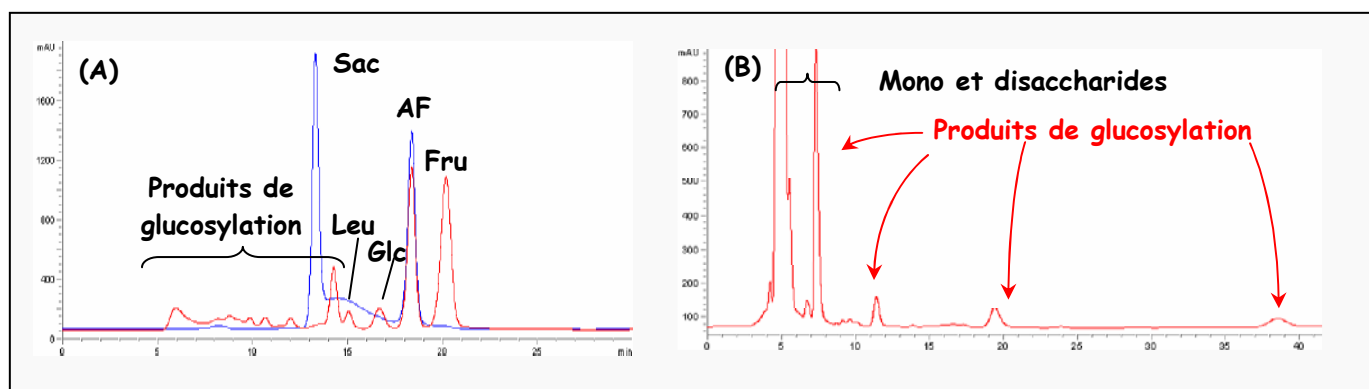


Figure 53 – Chromatogrammes obtenus lors de la glycosylation de l'AF en présence de saccharose, catalysée par la dextrane-saccharase de *L. mesenteroides* B-512F sur (A) la colonne carbohydre Ca^{2+} et (B) la colonne C18.

Identification des chromatogrammes : tracé bleu: temps initial ; tracé rouge: temps final.

Identification des pics : **Sac** : saccharose, **Fru** : fructose, **Glc** : glucose, **Leu** : leucrose.

A ce stade de l'étude, nous ne pouvons évaluer que le taux de conversion de l'AF, c'est-à-dire le pourcentage d'AF consommé. En effet, ne connaissant ni le degré de polymérisation des produits de glucosylation formés, ni leur coefficient de réponse, nous ne sommes pas en mesure de calculer le pourcentage de glucose transféré sur l'AF, le rendement, ou encore le DP moyen des oligosaccharides formés.

Le Tableau 19 indique les taux de conversion obtenus pour les différentes GS sélectionnées lorsque la réaction de glucosylation est menée dans les conditions de référence.

Tableau 19 - Taux de conversion obtenus pour les GS sélectionnées pour cette étude.

L.m. : *Leuconostoc mesenteroides* ; *N. p.* : *Neisseria polysaccharea*.

Souche productrice	<i>L. m.</i> B-512F	<i>L. m.</i> B-1299	<i>L.m.</i> B-1355	<i>N. p.</i>
Enzyme	DSR	DSR	ASR	AS
S/A exact	1,2	0,8	1,0	1,1
CST exacte (g/L)	131	156	144	135
Taux de conversion	26,1	24,5	18,9	21,6

D'une manière générale, entre 1/5 et 1/4 seulement de l'AF est glucosylé dans les conditions de référence.

Par comparaison aux autres accepteurs, l'AF n'est pas un accepteur fort comme le maltose qui est converti en oligosaccharides à hauteur de 51 % molaire dans les mêmes conditions. Cependant, l'AF n'est pas non plus un accepteur faible : à l'inverse du fructose (glucosylé à hauteur de 7% molaire), une série d'oligosaccharides est synthétisée (Figure 53), alors que seul du leucrose est obtenu par glucosylation du fructose.

L'AF peut donc être considéré comme un accepteur modéré. Mais afin de produire une plus grande quantité de dérivés glucosylés, et d'améliorer l'efficacité de glucosylation de l'AF, la Partie II de ce chapitre sera consacrée à l'influence du rapport molaire S/A et de la CST sur les taux de conversion de l'AF et les rendements de glucosylation. Mais avant cela, nous allons nous pencher sur l'importance du choix de GS de spécificités différentes pour la synthèse de produits de structures différentes.

I.3.1.2. Influence de la spécificité des enzymes

Nous avons comparé les profils chromatographiques des produits de la réaction d'accepteur synthétisés en présence des trois GS de *L. mesenteroides* dans les conditions de référence (Figure 54-A). D'une part, nous observons que des produits de glucosylation

identiques sont synthétisés. Ces composés comportent vraisemblablement uniquement des liaisons glucosidiques α -(1,6), liaison communément formée par les trois enzymes.

D'autre part, on observe sur la Figure 54-A que des produits additionnels sont obtenus avec la DSR de *L. mesenteroides* B-1299 et l'ASR de *L. mesenteroides* B-1355 en comparaison de ceux synthétisés avec la DSR de *L. mesenteroides* B-512F. Or, ces deux enzymes sont spécifiques de la formation de liaisons α -(1,2) et α -(1,3) respectivement. Il est donc raisonnable de supposer que ces produits additionnels résultent de la spécificité de l'enzyme, et possèdent vraisemblablement des liaisons α -(1,2) ou α -(1,3). Seule une étude par caractérisation des produits par RMN permettra de confirmer cette hypothèse.

Quant à l'AS de *N. polysaccharea*, le profil chromatographique des produits de glucosylation est radicalement différent de celui de la DSR de *L. mesenteroides* B-512F (Figure 54-B). Cela suppose la synthèse de produits très différents du point de vue structural. Ceci est cohérent avec la différence de spécificité existant entre les deux enzymes : la DSR de *L. mesenteroides* B-512F et l'AS de *N. polysaccharea* catalysent la formation de liaisons glucosidiques uniquement de type α -(1,6) et α -(1,4) respectivement.

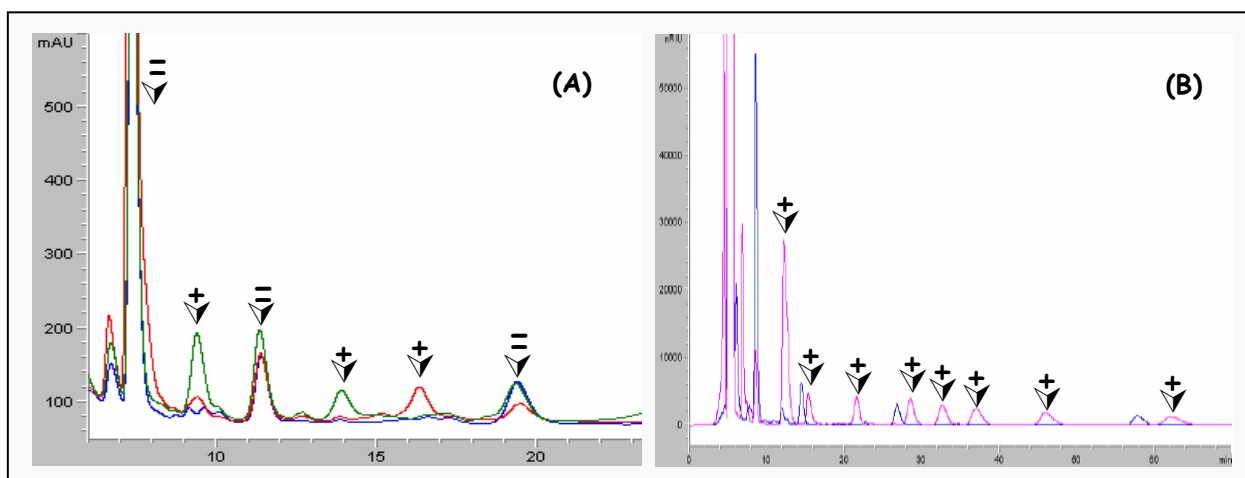


Figure 54 – Comparaison des profils chromatographiques des produits synthétisés en présence (A) de GS de *L. mesenteroides* (en bleu : DSR de *L.m.* B-512F ; en rouge : DSR de *L.m.* B-1299 ; en vert : ASR de *L.m.* B-1355) et (B) en bleu : la DSR de *L. mesenteroides* B-512F et en violet : l'AS de *N. polysaccharea*.

Paramètres CLHP : colonne C18, eau ultra-pure, 0,5 mL/min, détection réfractométrique.

Identification des pics : "=" : produits communs aux GS ; "+" : produits additionnels.

Ainsi, sans connaître précisément la structure des produits de glucosylation formés, nous savons d'ores et déjà que nous sommes en mesure de synthétiser des dérivés glucosylés de l'AF de structures différentes grâce à l'utilisation de GS de spécificités différentes.

Des études de couplage chromatographie liquide/spectrométrie de masse ont alors été menées pour déterminer le degré de polymérisation des différents produits observés par CLHP sur colonne C18.

I.4. Analyses par chromatographie-liquide couplée à la spectrométrie de masse (CL-SM)

Avant d'élucider la structure des dérivés glucosylés de l'AF par RMN, ce qui nécessite l'obtention de produits purs, nous avons utilisé le couplage chromatographie liquide – spectrométrie de masse (en mode Electron Spray Ionisation - ESI) pour déterminer le DP des produits présents dans le milieu réactionnel final de glucosylation (Figure 54).

La séparation des composés sur colonne C18 a été suivie par la mesure du courant ionique total (CIT). Les produits de glucosylation de l'AF se sont révélés être facilement ionisés, conduisant à l'acquisition d'un spectre du CIT semblable aux chromatogrammes obtenus par CLHP.

I.4.1. Produits de glucosylation synthétisés avec la DSR de *L. mesenteroides* B-512F

Le spectre de masse a révélé la présence de trois adduits $[M+Na^+]$, $[M+K^+]$ et $[M+Na^+-H_2O]$ pour chaque pic du spectre du CIT (Figure 55) pour des masses molaires M correspondant à des oligosaccharides (Tableau 20).

De plus, l'adduit $[M+Na^+-H_2O]$ résulte de la capacité de l'AF à se déshydrater. Rappelons que cette molécule existe sous les formes cétonique et hydratée, cette dernière étant majoritaire en phase aqueuse. Il peut donc y avoir perte d'une molécule d'eau lors du passage de la forme hydratée à la forme cétonique, d'où la présence de l'adduit $[M+Na^+-H_2O]$ sur les spectres de masse. Or cette déshydratation n'est possible que pour l'AF et ses dérivés glucosylés. Par conséquent tous les pics observés sur le tracé du CIT correspondent à des dérivés glucosylés de l'AF, composés d'une unité AF et de DP-1 résidus glucosyles.

Nous avons ainsi pu attribuer le DP de chaque dérivé glucosylé de l'AF mis en évidence par CLHP sur colonne C18 (Figure 56).

Nous avons également constaté la présence d'un seul dérivé par DP (Figure 57), et grâce à la spectrométrie de masse, plus sensible que la CLHP, un dérivé de DP 7 a été mis en évidence.

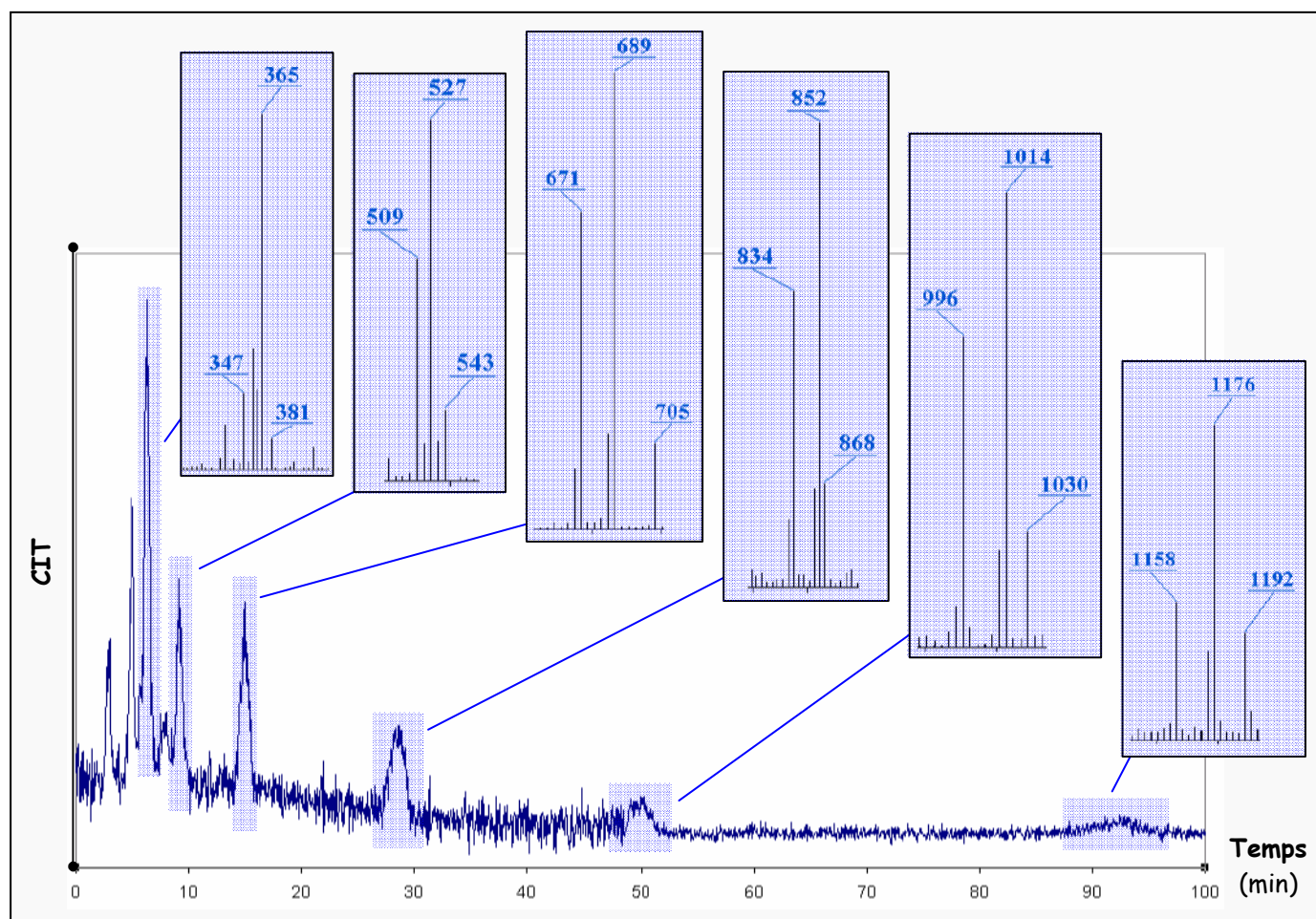


Figure 55 – Mesure du courant ionique total (CIT) lors de l'injection en LC-MS du milieu réactionnel final de glycosylation de l'AF en présence de la DSR de *L. mesenteroides* B-512F ; chaque pic du CIT est accompagné de son spectre de masse.

Paramètres LC : colonne C18, eau ultra-pure à 0,5 mL/min.

Tableau 20 – Détermination par couplage LC-MS de la masse molaire et du DP des produits de glycosylation associés aux pics chromatographiques observés sur colonne C18. Les analyses de masse haute résolution réalisées sur les trois premiers dérivés confirment les résultats de LC-MS.

Temps de rétention sur colonne C18 (min)	m/z			Masse molaire (g/mol)	Degré de polymérisation (DP)	Analyses de masse haute résolution des produits purifiés	
	$[M+Na^+ - H_2O]$	$[M+Na^+]$	$[M+K^+]$			Masse prédite (g/mol)	Masse mesurée (g/mol)
6,8	347	365	381	342	2	365,10598	365,10570
9,1	509	527	543	504	3	527,15881	527,15873
15,1	671	689	705	666	4	689,21163	689,21229
27,4	834	852	868	828	5	n.d.	n.d.
47,1	996	1014	1030	990	6	n.d.	n.d.
84,2	1158	1176	1192	1152	7	n.d.	n.d.

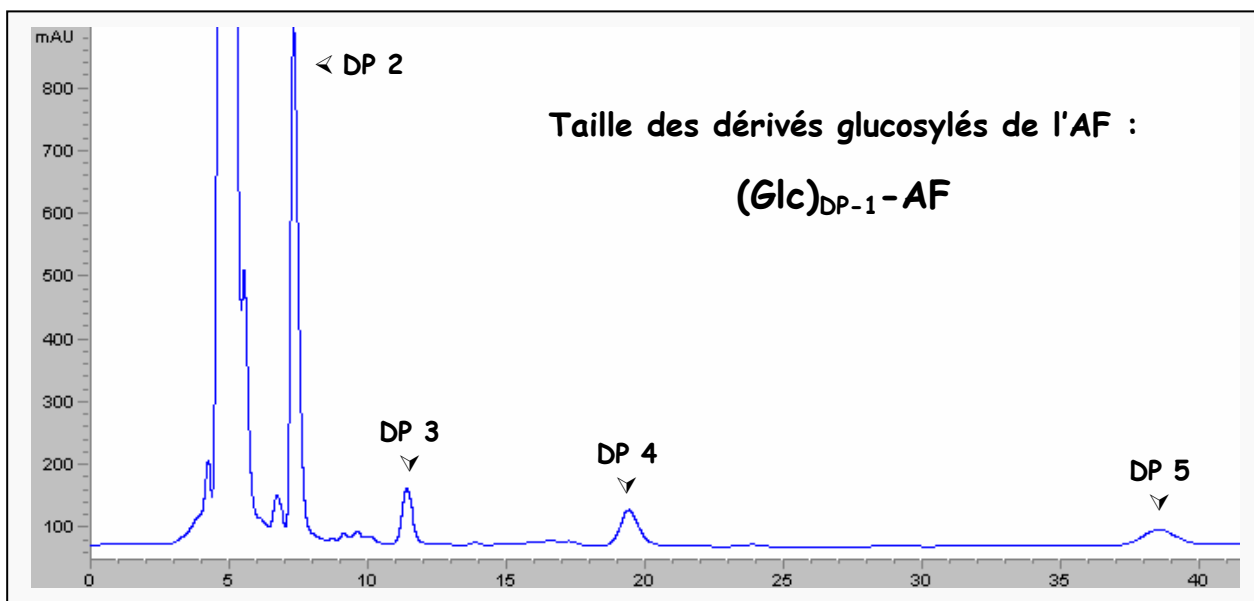


Figure 56 - Attribution du degré de polymérisation (DP) de chaque dérivé glycosylé de l'AF synthétisé en présence de la DSR de *L. mesenteroides* B-512F observé par CLHP sur colonne C18.

Paramètres CLHP : colonne C18, eau ultra-pure à 0,5 mL/min, détection par réfractométrie.

Les résultats de LC-MS peuvent être également présentés sous la forme du graphique présenté sur la Figure 57, où la masse moléculaire (et donc le DP) est directement associée au temps de rétention du dérivé glycosylé de l'AF.

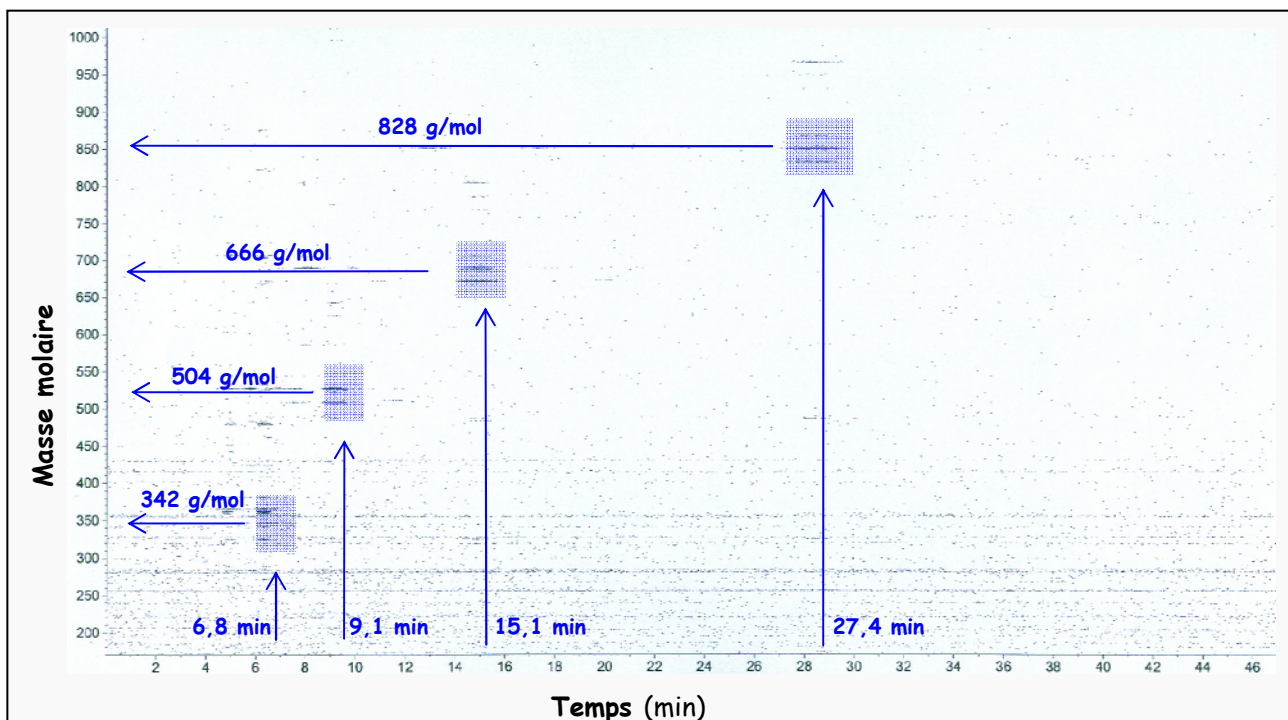


Figure 57 – Représentation bidimensionnelle de l'élution des dérivés glycosylés de l'AF et de leur masse molaire associée, déterminée par spectrométrie de masse.

I.4.2. Analyse CL-SM avec les GS de *L. mesenteroides* B-1299 et B-1355

Pour la DSR de *L. mesenteroides* B-1299 et l'ASR de *L. mesenteroides* B-1355, la Figure 58 montre que pour une même masse molaire (et donc un même DP) deux produits de glycosylation sont cette fois-ci présents. En effet, les trois adduits $[M+K^+]$, $[M+Na^+]$ et $[M+Na^+-H_2O]$ sont systématiquement observés.

Le composé de temps de rétention le plus élevé correspond au dérivé glycosylé obtenu avec la DSR de *L. mesenteroides* B-512F. Ceci est cohérent avec la spécificité des deux enzymes, toutes deux étant capables de catalyser la formation de liaisons α -(1,6).

L'autre produit étant un dérivé glycosylé de l'AF (il présente l'adduit $[M+Na^+-H_2O]$ en spectrométrie de masse), il est nécessairement de structure différente puisqu'il est élué avec un temps de rétention différent. Il correspond donc à un régio-isomère. Notons que pour un même DP, le régio-isomère est systématiquement moins retenu sur la colonne C18. Du fait de la spécificité des deux GS, généralement conservée lors de réactions d'accepteurs, il est fortement probable que ces régio-isomères obtenus avec la DSR de *L. mesenteroides* B-1299 et l'ASR de *L. mesenteroides* B-1355 possèdent au moins une liaison glycosidique de type α -(1,2) et α -(1,3), respectivement. Cependant, seule une étude par RMN des produits purifiés pourra confirmer cette hypothèse.

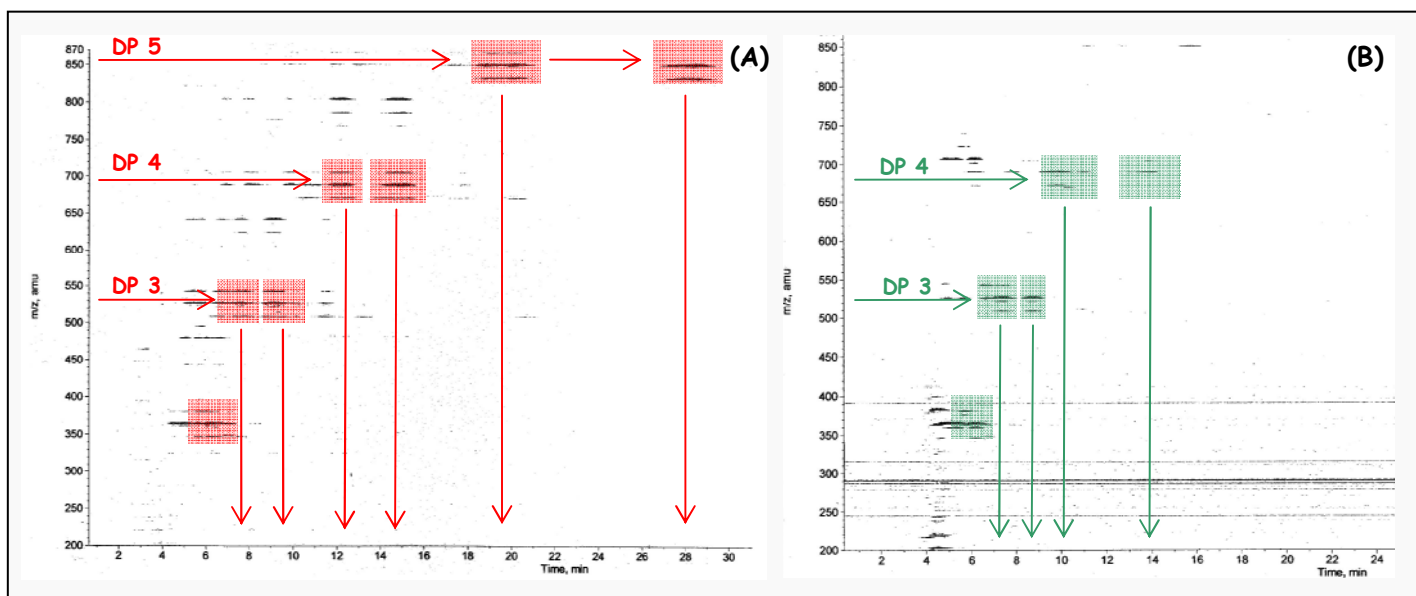


Figure 58 – Représentations bidimensionnelles en fonction du temps de rétention de la masse molaire des dérivés glycosylés de l'AF synthétisés en présence de (A) la DSR de *L. mesenteroides* B-1299 et (B) l'ASR de *L. mesenteroides* B-1355.

Pour les deux enzymes, on observe la présence de deux dérivés glycosylés de l'AF pour les DP de 3 à 5 : celui de temps de rétention le plus élevé est identique à celui synthétisé par la DSR de *L. mesenteroides* B-512F, et celui de temps de rétention plus faible est un régio-isomère.

Concernant l'AS de *N. polysaccharea*, les analyses LC-MS menées sur les milieux de synthèse n'ont pas permis d'attribuer de DP car la technique de séparation n'est pas assez résolutive, et les dérivés glucosylés présentent des temps de rétention trop proches.

I.5. Isolement des produits de glucosylation

L'objectif de la purification est la séparation des dérivés glucosylés de l'AF des co-produits de la réaction que sont le fructose, le leucrose et le glucane.

Dans un premier temps, le polymère est éliminé du milieu réactionnel final de glucosylation par précipitation à l'éthanol à froid. Après centrifugation, le surnageant est concentré puis purifié par chromatographie d'exclusion pour ensuite isoler les dérivés glucosylés de l'AF par CLHP préparative.

I.5.1. Purification par chromatographie d'exclusion sur résines BioGel et K⁺

En effet, le fructose est un produit secondaire de la réaction, résultant du clivage du saccharose. Il est présent en forte quantité en fin de réaction (environ la moitié de la masse initiale de saccharose si on ne tient pas compte du leucrose formé). Après consommation totale du saccharose, il reste également de l'AF, du glucose résultant de l'hydrolyse du donneur, et du leucrose. Tous ces sucres doivent être éliminés pour deux raisons.

D'abord, ils représentent un pourcentage élevé de la matière sèche (surtout le fructose), et de ce fait, la purification de chacun des produits de glucosylation perd en efficacité s'ils ne sont pas au préalable éliminés.

De plus, les essais d'évaluation des propriétés prébiotiques des produits de glucosylation de l'AF doivent être effectués en l'absence de mono et disaccharides dans le cas de tests réalisés *in vitro* (résultats de ces études donnés dans le paragraphe 1.1. du chapitre B). En effet, ces sucres sont souvent utilisés par la flore intestinale pathogène pour son développement. Or, un prébiotique doit préférentiellement être consommé par la flore bénéfique pour l'organisme, et non par la flore pathogène.

Nous avons donc eu recours d'une part à la chromatographie d'exclusion sur résine de type BioGel[®] P2 pour éliminer ces mono et disaccharides. De telles séparations ont été menées avec les mélanges obtenus avec les GS de *L. mesenteroides*.

Pour le milieu final de glucosylation obtenu avec l'AS de *N. polysaccharea*, il a été purifié sur une résine de type K⁺ alliant les principes de séparation par exclusion et par échange de cations.

I.5.1.1. Séparation sur résine BioGel® P2 des oligosaccharides synthétisés en présence des GS produites par les souches de *L. mesenteroides*

Les produits de glucosylation synthétisés en présence des DSR de *L. mesenteroides* B-512F et B-1299 ont été pré-purifiés avec la résine BioGel® P2. La Figure 59 est un exemple de séparation du mélange d'oligosaccharides obtenu avec la DSR de *L. mesenteroides* B-512F.

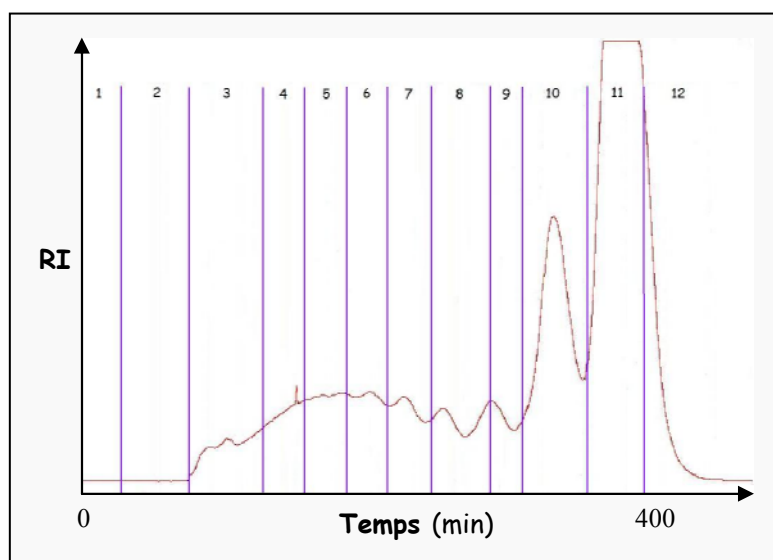


Figure 59 – Séparation sur BioGel® P2 du mélange final de glucosylation de l'AF en présence de la GS de *L. mesenteroides* B-512F, avec récupération de 12 fractions.

NB : l'acquisition débute 1 heure après l'injection ; le dernier pic a donc un temps d'éluion de 400 + 60 min.

Des fractions collectées à intervalles réguliers au cours de la purification ont été analysées par CLHP, sur les colonnes C18 et carbohydate Ca²⁺ pour évaluer la qualité de la séparation.

Il apparaît ainsi que seules les fractions 11 et 12 contiennent du fructose, de l'AF et du glucose (Figure 60), c'est-à-dire les composés que l'on souhaite éliminer.

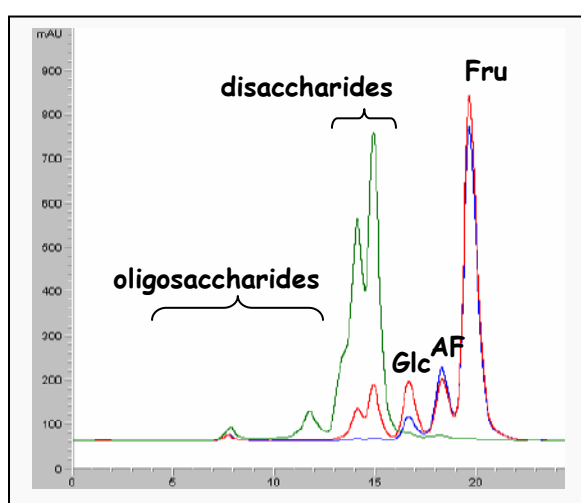


Figure 60 – Analyse par CLHP analytique des fractions 10 à 12 recueillies par séparation sur colonne BioGel® P2.

Paramètres CLHP : colonne carbohydate Ca²⁺, eau ultra pure à 0,5 mL/min, détection réfractométrique

Identification des pics : **Fru** : fructose, **Glc** : glucose.

Identification des spectres : en bleu : fraction 12, en rouge : fraction 11, en vert : fraction 10.

Les fractions 7 à 10 quant à elles ne contiennent pas ces monosaccharides, mais des oligosaccharides de DP supérieur à 2. Comme le montre la Figure 61, chaque fraction contient majoritairement un dérivé glucosylé de l'AF, ainsi qu'un produit secondaire.

En accord avec le principe de la chromatographie d'exclusion, les premières fractions contiennent les produits de DP les plus élevés (temps de rétention élevés sur CLHP analytique).

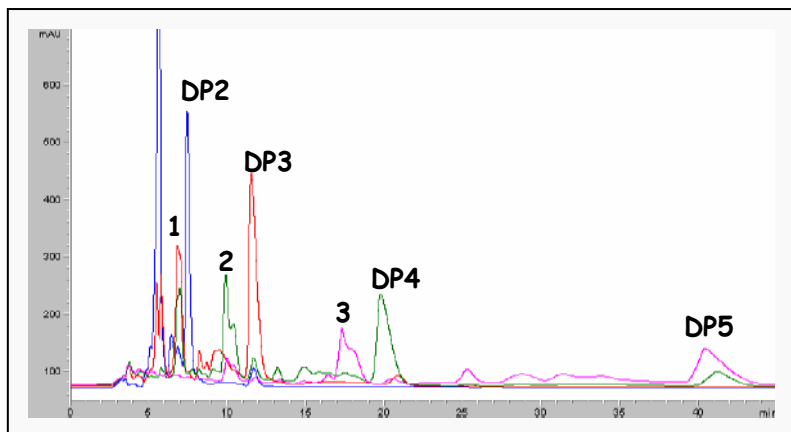


Figure 61 - Analyse par CLHP analytique des fractions 7 à 10 recueillies par séparation sur colonne BioGel® P2.

Paramètres CLHP : colonne C18, eau ultra-pure à 0,5 mL/min, détecteur RI

Identification des pics : DP2, 3, 4, 5: dérivés glucosylés de AF. 1, 2, 3: produits secondaires (IMOS, voir paragraphe II.3).

Identification des spectres : en bleu : fraction 10, en rouge : fraction 9, en vert : fraction 8, en violet : fraction 7.

Nous avons alors entrepris d'isoler par CLHP préparative les dérivés glucosylés de l'AF de DP 2, 3 et 4 respectivement présents dans les fractions 10, 9 et 8, et ce, afin de confirmer leur structure ensuite par RMN.

Cet exemple de séparation d'un mélange d'oligosaccharides, montre que cette résine BioGel P2 permet d'éliminer efficacement les monosaccharides, et surtout le fructose, dont la concentration élevée en fin de réaction est gênante pour une séparation ultérieure par CLHP préparative. Le fractionnement des premiers produits élués (avant le fructose) facilite également l'étape suivante de séparation.

Cependant, ce type de chromatographie d'exclusion a un inconvénient majeur : la séparation est longue, puisque tous les oligosaccharides sont élués sur 6 h, et avec un débit de 14 mL/min, les oligosaccharides sont fortement dilués dans chaque fraction.

I.5.1.2. Séparation sur résine échangeuse de cations K⁺ des dérivés glucosylés de l'AF synthétisés en présence de l'AS de *N. polysaccharea*.

Le mélange final obtenu par glucosylation de l'AF en présence de l'AS de *N. polysaccharea* a été purifié sur colonne échangeuse de cation de type K⁺. La Figure 62 est un exemple de séparation. De la même façon que pour la séparation sur BioGel® P2, plusieurs fractions ont été recueillies puis analysées par CLHP analytique (Figure 63).

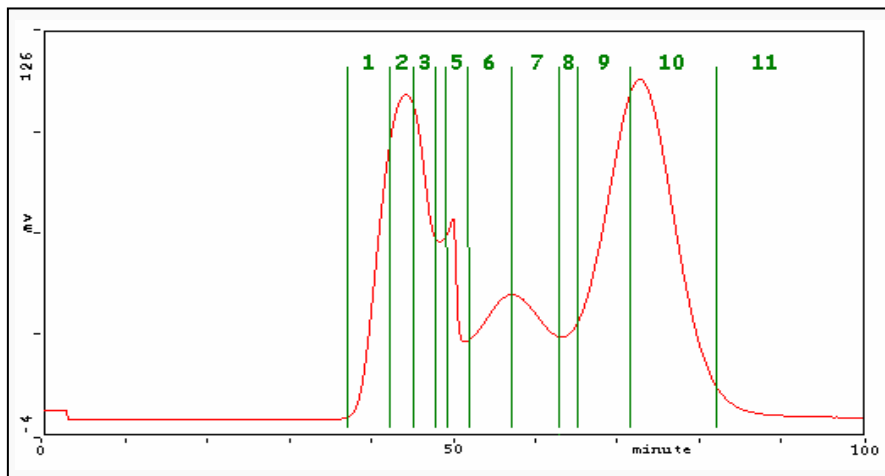


Figure 62 – Séparation sur résine K⁺ du mélange final de glucosylation de l'AF obtenu avec l'AS de *N. polysaccharea*, avec récupération de 11 fractions.

Ainsi, ce type de résine permet également d'éliminer les glucides de faible masse molaire : l'analyse sur CLHP analytique (Figure 63) montre que l'on peut regrouper les fractions en deux classes : celles contenant les oligosaccharides (fractions 1 à 4) et celles contenant les mono et disaccharides (fractions 5 à 11).

Pour caractériser les produits de glucosylation de l'AF synthétisés en présence de l'AS de *N. polysaccharea*, nous avons alors opté pour l'isolement par CLHP préparative du composé de temps de rétention de 9.5 min à partir des fractions 5 à 8 regroupées.

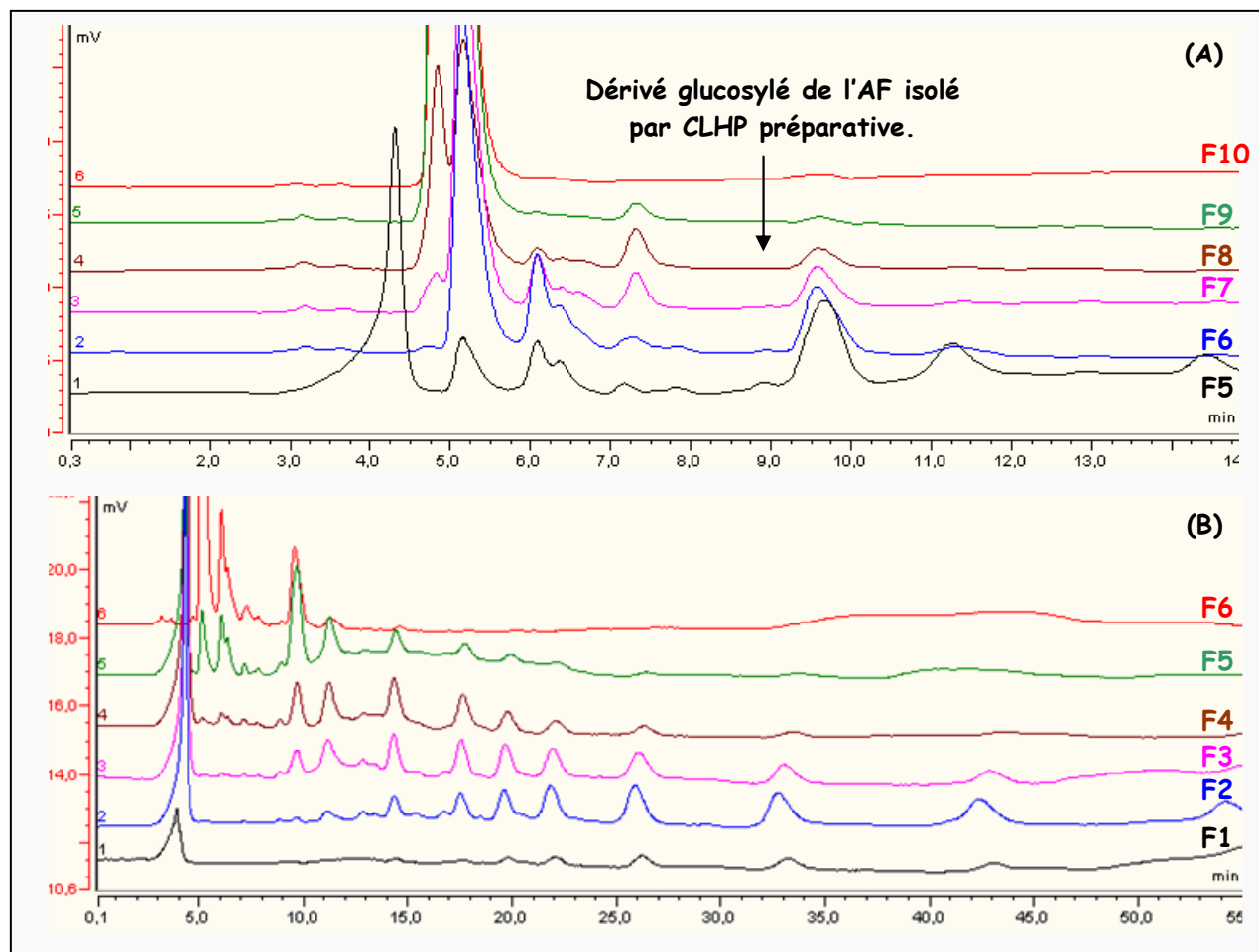


Figure 63 – Analyse par CLHP des fractions 5 à 10 (A) et 1 à 6(B) recueillies sur colonne K⁺.

Paramètres CLHP : colonne C18, eau ultra-pure à 0,5 mL/min, détecteur RI.

Si on compare les deux résines BioGel[®] P2 et K⁺, chacune permet d'éliminer le fructose. Par contre, on constate que la séparation sur résine K⁺ est de moins bonne qualité. En effet, l'analyse des profils chromatographiques obtenus par CLHP sur colonne C18 (Figure 63) montre que les fractions 1 à 4 contiennent un grand nombre de dérivés glucosylés de l'AF, alors que seulement 2 ou 3 composés d'intérêt étaient présents dans les fractions collectées lors de l'utilisation de la résine K⁺.

Par contre, la résine K⁺ se démarque par sa rapidité : le fructose est élué en 1h20 sur résine K⁺, contre 7h30 sur BioGel[®] P2, d'où un gain en productivité. De même, les oligosaccharides sont beaucoup moins dilués lors de l'utilisation de la résine K⁺ : ils sont recueillis dans 420 mL contre 4L avec la résine BioGel[®] P2 (pour une dizaine de grammes déposés).

En conclusion, la résine K^+ est à privilégier pour l'élimination de mono et disaccharides de mélanges réactionnels de glucosylation finaux ; elle est performante par sa rapidité et ses faibles volumes d'élution, mais est peu efficace pour la séparation des oligosaccharides.

La BioGel[®] P2, quant à elle, est intéressante si l'on souhaite ensuite isoler les oligosaccharides, par CLHP préparative par exemple, mais les composés seront fortement dilués. Des étapes longues de concentration seront donc nécessaires.

I.5.2. Isolement des dérivés glucosylés de l'AF par CLHP préparative

I.5.2.1. Oligosaccharides obtenus avec la DSR de *L. mesenteroides* B-512F

Les dérivés glucosylés de l'AF en partie pré-séparés par chromatographie d'exclusion ont été isolés par CLHP préparative en phase inverse (phase stationnaire de type C18).

Les trois dérivés glucosylés de l'AF de DP 2, 3 et 4 ont été purifiés à partir des fractions 8, 9 et 10 de la Figure 59 respectivement. Ils ont été obtenus à l'échelle de plusieurs dizaines de milligrammes avec une pureté supérieure à 90 %.

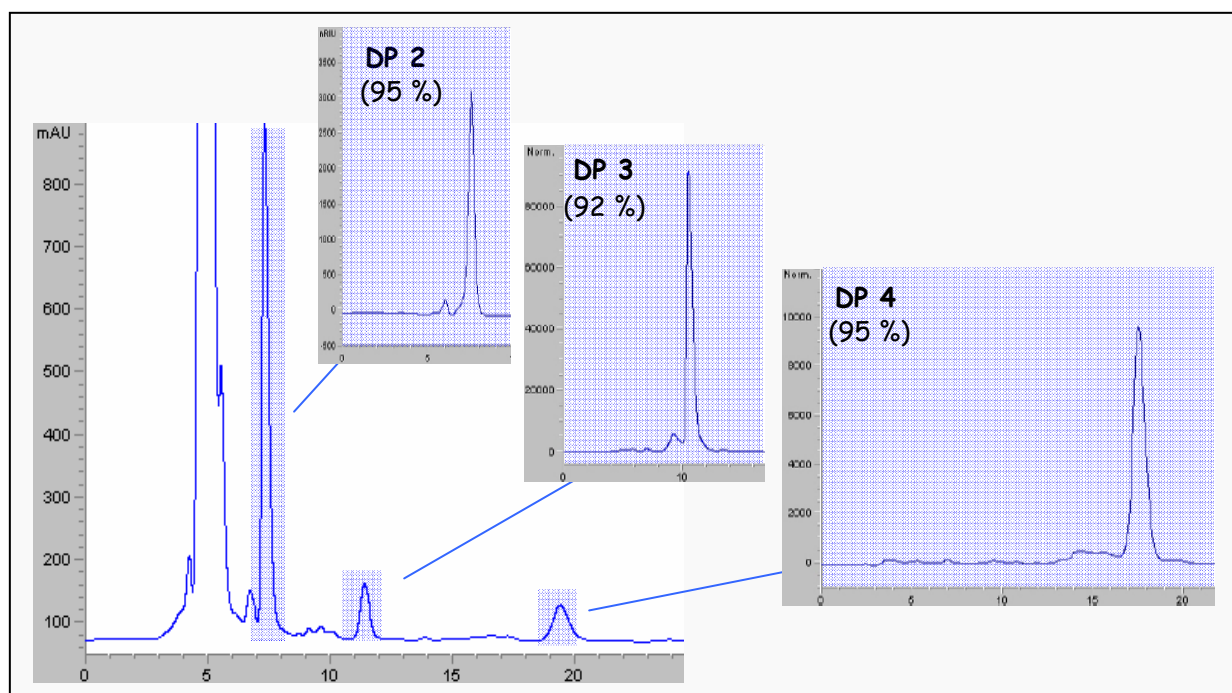


Figure 64 – Evaluation de la pureté par CLHP des dérivés glucosylés de l'AF de DP 2, 3 et 4 synthétisés par glucosylation de l'AF en présence de la DSR de *L. mesenteroides* B-512F.

Paramètres CLHP : colonne C18, eau ultra pure à 0,5 mL/min, détecteur réfractométrique.

I.5.2.2. Oligosaccharide produit par la DSR de *L. mesenteroides* B-1299

Afin de mettre en évidence la spécificité de la DSR de *L. mesenteroides* B-1299 lors de la glucosylation de l'AF, nous avons isolé le régio-isomère de DP4 spécifiquement synthétisé par cette enzyme.

Quelques dizaines de milligrammes de ce composé ont pu être obtenus, avec une pureté de 81 % mesurée par CLHP sur colonne C18 (Figure 65).

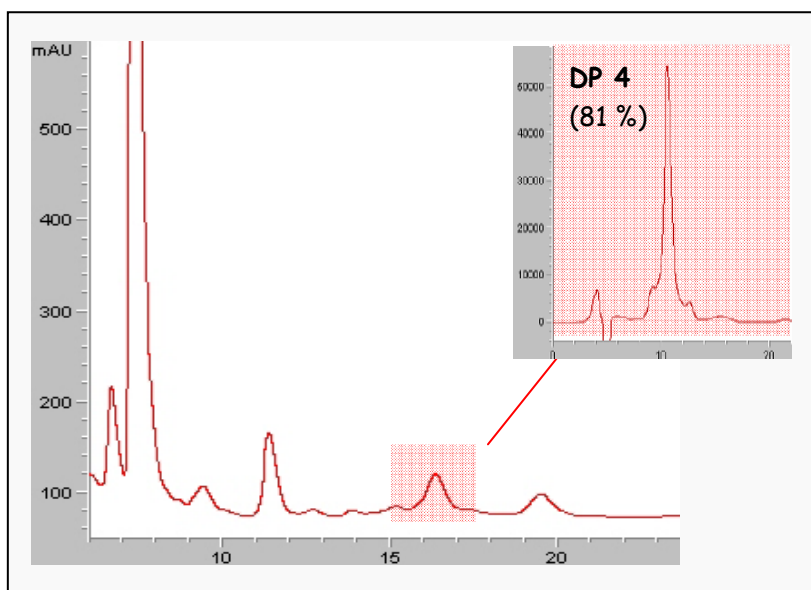


Figure 65 – Evaluation de la pureté par CLHP du régio-isomère de DP4 obtenu par glucosylation de l'AF en présence de la DSR de *L. mesenteroides* B-1299.

Paramètres CLHP : colonne C18, eau ultra pure à 0,5 mL/min, détecteur RI.

I.5.2.3. Purification des oligosaccharides synthétisés en présence de l'AS de *N. polysaccharea*

Le composé élué à 9.5 min sur colonne C18 (Figure 63) a seulement été purifié à 66 % par CLHP préparative. Des étapes supplémentaires doivent être mises en œuvre pour l'obtention d'un produit pur.

I.6. Caractérisation structurale des produits de glucosylation par RMN

I.6.1. Produits de glucosylation synthétisés par la DSR de *L. mesenteroides* B-512F

Une fois purifiés par CLHP préparative (voir paragraphe I.5.2.1), les produits de glucosylation de l'AF de DP 2, 3 et 4 synthétisés en présence de la DSR de *L. mesenteroides* B-512F ont été caractérisés par RMN du proton et du carbone 13. Les séquences HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation, $^3J_{C-H}$) et HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence, $^1J_{C-H}$) ont également été effectuées pour permettre d'identifier les structures sans ambiguïté.

Ces analyses révèlent tout d'abord que les dérivés glucosylés de l'AF contiennent effectivement une unité AF à l'extrémité réductrice. Nous avons en effet retrouvé les mêmes déplacements chimiques que ceux observés pour l'AF. Seul le carbone C6 est légèrement déblindé (de 61 à 66 ppm) indiquant son implication dans une liaison glucosidique.

En outre, le spectre du ^{13}C ne révèle aucun déplacement chimique correspondant à une fonction carbonyle (autour de 200 ppm) ou éthylénique (entre 130 et 160 ppm) pour le carbone C2, mais qui se situe à 93 ppm. Par conséquent, l'unité AF est sous forme hydratée.

Le DP des oligosaccharides déjà mesuré par LC-MS a été confirmé par RMN : en effet on compte autant de protons anomériques que d'unités glucosyle greffées sur l'AF (qui lui n'en possède pas). Ainsi, pour chaque oligosaccharide, les intégrations effectuées sur le spectre du proton révèlent DP-1 protons à 3,5 ppm. Les constantes de couplage de ces protons anomériques sont proches de 3,5 Hz indiquant l'orientation axiale en α de la liaison glucosidique.

Pour le dérivé glucosylé de l'AF de DP 2, on observe sur le spectre HMBC le couplage entre le carbone anomérique du résidu glucosyle et le carbone C6 de l'unité AF. Sur le spectre ^{13}C , on observe un déblindage de ce même carbone C6 par rapport à la molécule d'AF, ce qui révèle son implication dans une liaison glycosidique. Par conséquent, cette molécule est l' α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-O-1,5-anhydro-D-fructose.

Le même raisonnement peut être mené avec les dérivés glucosylés de l'AF de DP 3 et 4, pour lesquels l'étude RMN démontre la présence exclusive de liaisons glucosidiques de type α -(1,6). Ces composés sont donc respectivement l' α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-O-1,5-anhydro-D-fructose et l' α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-O-1,5-anhydro-D-fructose.

Ainsi, les dérivés glucosylés de l'AF synthétisés en présence de la DSR de *L. mesenteroides* B-512F ont la structure indiquée sur la Figure 66: ils résultent de transferts successifs de résidus glucosyle sur l'AF par formation de liaisons glucosidiques de type α -(1,6). Ces nouveaux produits ont donc été baptisés α -(1,6) 1,5-anhydro-D-fructo-glucooligosaccharides (notés α -(1,6) AFGOS).

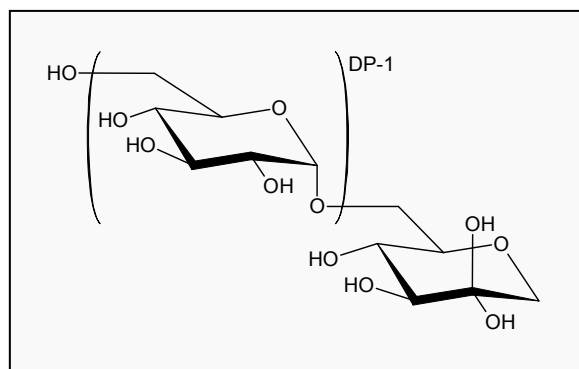


Figure 66 – Structure des α -(1,6) 1,5-anhydro-D-fructo-glucooligosaccharides synthétisés par glucosylation de l'AF catalysée par la DSR de *L. mesenteroides* B-512F.

Tableau 21 – Déplacements chimiques des protons et carbones des dérivés glucosylés de l'AF baptisés AFGOS.

Le déblindage du carbone C6 de 61 à 66 ppm montre son implication dans une liaison glucosidique.

Molécule	Résidu ^a	Déplacement chimique (δ , ppm)								
		1a	1b	2	3	4	5	6a	6b	
AF	¹ H	3,36	3,66	-	3,46	3,34	3,31	3,58	3,80	
	¹³ C	71,9	92,8	77,1	69,2	80,8	61,4			
AFGOS 2	AF	¹ H	3,40	3,67	-	3,48	3,49	3,50	3,63	3,86
		¹³ C	72,2	92,8	77,3	68,7	79,2	66,2		
	Glc I	¹ H	4,86	3,46	3,69	3,33	3,61	3,69	3,76	
		¹³ C	98,2	71,7	73,3	69,7	71,9	60,7		
AFGOS 3	AF	¹ H	3,41	3,67	-	3,47	3,48	3,48	3,64	3,89
		¹³ C	72,2	92,8	77,4	68,7	79,1	66,3		
	Glc I	¹ H	4,88	3,48	3,64	3,42	3,81	3,67	3,88	
		¹³ C	98,2	71,6	73,5	69,7	70,3	65,6		
	Glc II	¹ H	4,87	3,48	3,63	3,35	3,64	3,68	3,77	
		¹³ C	97,9	71,7	73,2	69,7	72,0	60,6		
AFGOS 4	AF	¹ H	3,46	3,66	-	3,50	3,51	3,51	3,65	3,90
		¹³ C	72,2	92,8	77,4	68,7	79,1	66,3		
	Glc I	¹ H	4,87	3,51	3,66	3,43	3,82	3,89	3,69	
		¹³ C	98,2	71,6	73,5	69,7	70,3	65,7		
	Glc II	¹ H	4,88	3,51	3,66	3,43	3,82	3,69	3,89	
		¹³ C	97,8	71,7	73,5	69,7	70,4	65,7		
	Glc III	¹ H	4,88	3,51	3,65	3,34	3,66	3,70	3,76	
		¹³ C	97,9	71,7	73,3	69,7	72,0	60,6		

^a Résidus glucose numérotés à partir du résidu AF.

Par ailleurs, si on étudie la relation entre le temps de rétention des α -(1,6) AFGOS sur colonne C18 et leur DP, on peut mettre en évidence une loi logarithmique (Figure 67). Cette relation déjà observée pour les oligosaccharides synthétisés avec la DSR de *L. mesenteroides* B-1299 [DOLS-LAFARGUE, M. et coll., 1998; RICHARD, G. et coll., 2003] démontre que les α -(1,6) AFGOS appartiennent à une seule et même famille d'oligosaccharides.

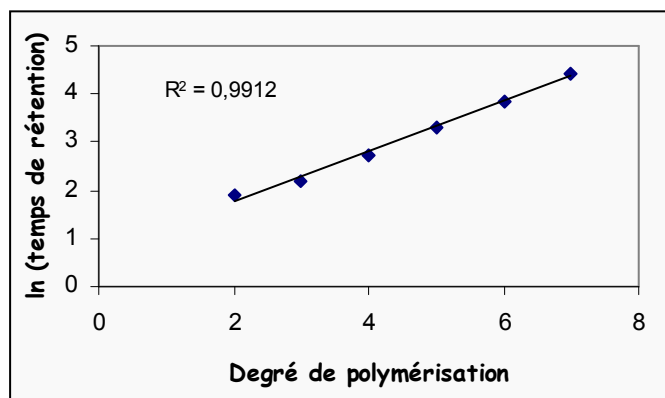


Figure 67 – Relation logarithmique entre le degré de polymérisation DP des α -(1,6) AFGOS et leur temps de rétention sur colonne C18.

Jamais ces dérivés glucosylés de l'AF n'ont été décrits dans la littérature. Seuls YOSHINAGA et coll. [DOLS-LAFARGUE, M. et coll., 1998] ont synthétisé un disaccharide de structure proche : le 1,5-anhydro-3-O- α -glucopyranosyl-D-fructose. Cependant, la synthèse de ce disaccharide est plus complexe. Elle résulte d'un transfert de résidus glucose catalysé par une cyclodextrine glucanosyltransférase, suivi d'une digestion des oligosaccharides obtenus à l'aide d'une glucoamylases.

I.6.2. Analyse structurale du régio-isomère de DP4 synthétisé par la DSR de *L. mesenteroides* B-1299

Pour démontrer la relation entre la structure des produits obtenus et la spécificité de la DSR de *L. mesenteroides* B-1299, le régio-isomère de DP 4 (voir Figure 57-A) a été caractérisé par RMN à partir des spectres ^{13}C et HMBC.

Comme pour les α -(1,6) AFGOS, ce produit présente à l'extrémité non réductrice une unité AF sous forme hydratée (déplacements chimiques du proton et du carbone donnés dans le Tableau 22).

Le spectre ^{13}C révèle que le carbone C6 de l'unité AF est déblindé ; le spectre HMBC révèle un couplage entre ce carbone C6 et le carbone anomérique d'une unité glucose. Enfin, le proton porté par ce carbone anomérique présente une constante de couplage caractéristique

d'un liaison α . Par conséquent, l'unité AF est liée à un résidu glucosyle au travers d'une liaison α -(1,6).

De la même façon, la RMN démontre que ce résidu glucosyle est lui-même lié à une seconde unité glucose par une liaison α -(1,6).

Pour cette seconde unité glucosyle, on observe sur le spectre du ^{13}C un déblindage du carbone C2 (de 72 à 76 ppm) ainsi qu'un couplage $^3J_{\text{C-H}}$ de ce carbone avec le proton anomérique d'un troisième résidu glucosyle. Ce régio-isomère de DP 4 contient donc une liaison glucosidique α -(1,2) entre la seconde et la troisième unité glucosyle.

Tableau 22 – Déplacements chimiques des protons et carbones de l' α -(1,2) AFGOS DP 4 synthétisé par glucosylation de l'AF en présence de la DSR de *L. mesenteroides* B-1299.

Le déblindage du carbone C6 du Glc I montre l'implication de ce carbone dans une liaison α -(1,6), et le déblindage du carbone C2 du Glc II dans une liaison α -(1,2).

Molécule	Résidu ^a	Déplacement chimique (δ , ppm)								
		1		2	3	4	5	6		
		1a	1b					6a	6b	
AFGOS 4 α (1 \rightarrow 2)	AF	^1H	3,68	3,40	-	7,10	3,02	3,03	3,65	3,89
		^{13}C	72,2		92,8	77,4	68,7	79,1	66,3	
	Glc I	^1H	4,87	$J_{1,2}=3,8$ Hz	3,49	3,65	3,39	3,79	3,67	3,90
		^{13}C	98,2		71,5	73,5	69,7	70,6	66,0	
	Glc II	^1H	5,09	$J_{1,2}=3,3$ Hz	3,60	3,77	3,39	3,66	3,71	3,77
		^{13}C	95,6		75,7	71,5	69,7	71,9	60,6	
	Glc III	^1H	5,03	$J_{1,2}=3,8$ Hz	3,46	3,69	3,36	3,83	3,71	3,77
		^{13}C	96,3		71,5	73,0	69,6	72,0	60,5	

^a les résidus glucosyles sont numérotés à partir du résidu AF.

La structure du régioisomère de DP 4 synthétisé en présence de la DSR de *L. mesenteroides* B-1299 est représentée sur la Figure 68. Il s'agit de l' α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-O-1,5-anhydro-D-fructose. Par convention on le notera α -(1,2) AFGOS de DP 4.

L'isolement et la caractérisation de ce composé démontre que la spécificité de la DSR de *L. mesenteroides* B-1299 est conservée lors de la réaction d'accepteur dans le cas de l'AF. Par extrapolation, on peut supposer que l'autre régio-isomère de DP3 mis en évidence lors des études LC-MS est l' α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-O-1,5-anhydro-D-fructose.

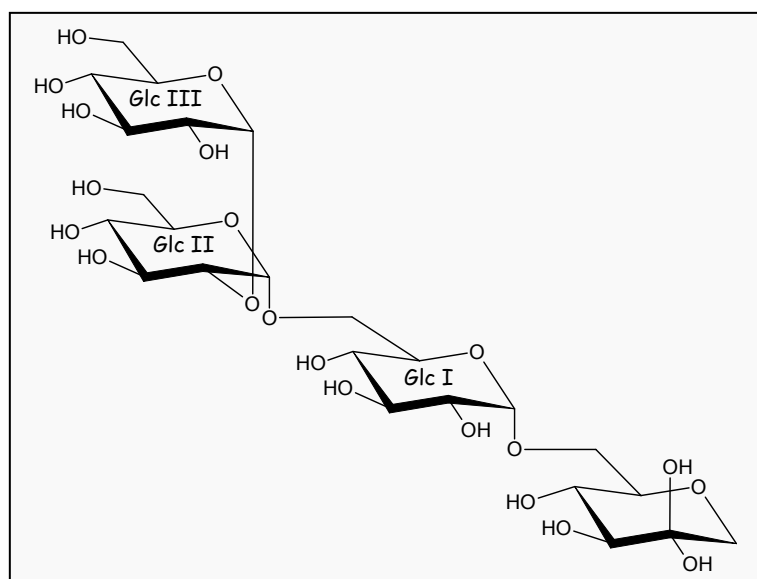


Figure 68 – Structure de l' α -(1,2) AFGOS de DP 4 synthétisé par glucosylation de l'AF en présence de la DSR de *L. mesenteroides* B-1299.

La synthèse de tels régio-isomères procède par conséquent comme suit : la DSR de *L. mesenteroides* B-1299 catalyse le transfert d'unités glucose sur l'AF avec formation de liaisons α -(1,6) pour conduire à l'obtention d' α -(1,6) AFGOS identiques à ceux obtenus avec la DSR de *L. mesenteroides* B-512F ; ensuite, à partir de ces α -(1,6) AFGOS la même enzyme catalyse l'ajout d'une unité glucosyle avec formation d'une liaison α -(1,2), pour obtenir les α -(1,2) AFGOS. Cependant, il semble que la formation d'une liaison α -(1,2) nécessite la présence d'une liaison α -(1,6) puisque nous n'avons pas démontré la présence d' α -D-Glc-(1 \rightarrow 2)-O-1,5-AF. Des résultats similaires ont été obtenus lors de la glucosylation de maltose avec cette enzyme [DOLS-LAFARGUE, M. et coll., 1998; FABRE, E., 2004; FABRE, E. et coll., 2005].

L'utilisation d'une enzyme de spécificité différente de la DSR de *L. mesenteroides* B-512F permet donc de synthétiser des dérivés glucosylés de structures différentes. La présence de liaisons glucosidiques autres que des liaisons α -(1,6) (ici α -(1,2)) peut être un atout pour l'obtention de dérivés glucosylés de l'AF aux propriétés différentes.

I.6.2.1. Produit de glucosylation de l'AF synthétisé par l'AS de *N. polysaccharea*

Malgré la faible pureté du produit d'intérêt (temps de rétention de 9,5 min sur la Figure 63), l'étude des spectres RMN montre qu'il est composé d'une unité AF liée à une unité glucosyle par une liaison α -(1,4). Le déplacement chimique du carbone C4 de l'AF lié au glucose est de 76.4 ppm. Il s'agit donc de l' α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-O-1,5-anhydro-D-fructose.

Les produits présents dans la fraction 2 obtenue par séparation sur résine K^+ Figure 63 ont aussi été étudiés par RMN. Sur le spectre du ^{13}C on observe les mêmes déplacements chimiques que pour le dérivé glucosylé de l'AF précédemment identifié.

L'utilisation de l'AS de *N. polysaccharea* comme catalyseur de la glucosylation de l'AF permet donc la synthèse de dérivés glucosylés dont les unités glucosyle sont uniquement liées en α -(1,4). Ces nouvelles molécules sont donc notés α -(1,4) AFGOS et sont représentés sur la Figure 69.

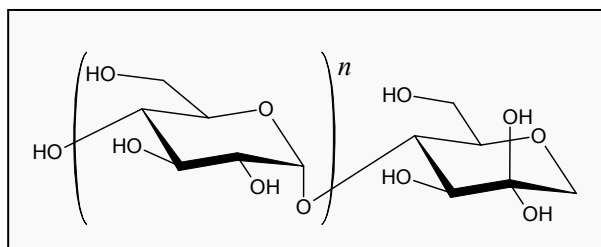


Figure 69 – Structure des α -(1,4) 1,5-anhydro-D-fructo-glucooligosaccharides

Partie II. OPTIMISATION DE LA GLUCOSYLATION DE L'AF PAR LE CONTROLE

DES CONDITIONS REACTIONNELLES INITIALES

II.1. Efficacité de la glucosylation de l'AF dans les conditions de référence

La structure des AFGOS synthétisés en présence des GS de *L. mesenteroides* à présent déterminée, l'efficacité de la glucosylation de l'AF a été évaluée dans les conditions de référence (S/A = 1, CST = 15,2 %, activité d'1 U/mL). Nous avons calculé : le taux de conversion de l'AF, le pourcentage de glucose issu du saccharose transféré sur l'AF et les AFGOS (dévié de la synthèse de polymère), le rendement de glucosylation et le degré de polymérisation DP moyen des AFGOS présents dans le milieu réactionnel final.

Dans le cas de l'AS de *N. polysaccharea* nous avons seulement pu déterminer le taux de conversion et le rendement. En effet, en considérant que les nouveaux produits identifiés par CLHP sont des dérivés glucosylés de l'AF. Nous verrons dans le chapitre C au paragraphe II.3.3 que cette hypothèse est confirmée. Par contre, ne connaissant pas le DP de chaque produit de glucosylation, nous sommes dans l'incapacité de calculer le pourcentage de glucose utilisé pour la réaction d'accepteur ainsi que le DP moyen.

Les résultats obtenus dans les conditions de référence sont donc indiqués dans le Tableau 23.

Au-delà des taux de conversion dont nous avons déjà discuté au paragraphe 1.3.1.1, il apparaît qu'au maximum 1/3 des résidus glucosyle initialement disponibles sont transférés sur l'AF. La majorité reste utilisée pour la synthèse de polymère. Ceci conduit à l'obtention de rendements faibles compris entre 20 et 35 % et confirme que l'AF est un accepteur modéré. De plus, dans ces conditions de référence, le transfert d'unité glucosyle sur l'AF et les AFGOS est peu efficace : environ les 3/4 de l'AF et du saccharose initialement présents ne sont pas utilisés pour la réaction d'accepteur.

Quant au DP moyen, il traduit l'allongement des chaînes glucosidiques. Avec la DSR de *L. mesenteroides* B-1299, des AFGOS de petite taille sont synthétisés, alors qu'ils sont un peu plus longs dans le cas de l'ase de *L. mesenteroides* B-1355.

Tableau 23 – Evaluation de l'efficacité de glucosylation de l'AF dans les conditions de référence pour les différentes GS de *L. mesenteroides* et *N. polysaccharea*.

Souche productrice	<i>L. m.</i> B-512F	<i>L. m.</i> B-1299	<i>L.m.</i> B-1355	<i>N. p.</i>
Enzyme	DSR	DSR	ASR	AS
Rapport S/A exact	1,2	0,8	1,0	1,1
TSC exacte	13,1 %	15,6 %	14,4 %	13,5 %
Taux de conversion (%)	26,1	24,5	18,9	21,6
% Glucose transféré	20,0	35,2	24,2	n.d.
Rendement (%)	19,8	32,1	24,8	29,9
DP moyen	2,32	2,26	2,39	n.d.

A partir de ces résultats, nous avons optimisé la réaction de transfert sur l'AF, l'objectif premier étant d'atteindre les taux de conversion les plus élevés possible, afin de produire des AFGOS de manière efficace.

II.2. Amélioration de l'efficacité de glucosylation de l'AF

Afin d'améliorer l'efficacité de la glucosylation de l'AF, nous avons étudié indépendamment l'influence de deux paramètres : le rapport molaire saccharose/accepteur (S/A) et la concentration en sucres totaux (CST) – ou matière sèche, et ce pour une même activité enzymatique.

Selon la GS utilisée, nous avons observé différents effets sur le taux de conversion, le pourcentage de glucose transféré sur l'AF et les AFGOS, le rendement et le DP moyen, effets qui vont être détaillés dans les paragraphes ci-dessous.

II.2.1. Influence des conditions réactionnelles sur les taux de conversion

Le taux de conversion traduit uniquement la part de l'AF initialement présent qui a réagi. Il permet donc de connaître la quantité résiduelle d'AF après glucosylation, quantité qui est donc inutilisée, voire perdue si aucune méthode de recyclage n'est ensuite mise en place.

L'augmentation du rapport molaire S/A pour une CST constante conduit à une amélioration des taux de conversion pour toutes les GS testées (Figure 70) : la multiplication du rapport S/A par un facteur 10 conduit à des taux de conversion 2 à 3 fois supérieurs.

En effet, travailler avec des rapports S/A élevés implique un nombre d'unités glucosyle disponibles pour la glucosylation supérieur, et de faibles concentrations en AF (pour conserver une CST constante). Dans ce cas, même si peu de molécules d'AF sont glucosylées, proportionnellement, le taux de conversion est amélioré.

Seule la DSR de *L. mesenteroides* B-1299 est moins influencée par le rapport S/A. En effet, les taux de conversion évoluent peu, et se situent autour de 25 %.

L'augmentation de la CST améliore aussi les taux de conversion obtenus avec les GS produites par les souches de *L. mesenteroides*. En milieu cinq fois plus concentré, le taux de conversion est multiplié par un facteur 2 pour la DSR de *L. mesenteroides* B-512F et l'ASR de *L. mesenteroides* B-1355. Pour la DSR de *L. mesenteroides* B-1299, l'effet est encore plus net. Le taux de conversion est cinq fois plus élevé dans ces conditions.

Quelle que soit la GS produite par *L. mesenteroides*, l'augmentation de la CST favorise la glucosylation (Figure 70). Nous pouvons suggérer que cela résulte de la compétition entre la réaction d'accepteur et la polymérisation. D'après les travaux d'ALBENNE et coll. [ALBENNE, C, 2002] et JOUCLA et coll. [JOUCLA, G., 2003] la polymérisation est initiée par une molécule de glucose dont la vitesse de formation est uniquement liée à l'activité enzymatique. Pour une même activité enzymatique, la concentration en complexes glucosyl-enzyme sera constante. Par conséquent, plus la CST du milieu réactionnel sera élevée, plus le rapport entre la concentration d'AF et celle de l'initiateur de polymérisation sera élevée (pour un même rapport molaire S/A et une même activité enzymatique). Ainsi, la glucosylation de l'AF sera favorisée au détriment de l'initiateur et donc de la synthèse de polymère. D'où des taux de conversion de l'AF supérieurs pour des CST élevées.

Quant à l'AS de *N. polysaccharea*, l'utilisation de CST élevées conduit à de moins bons résultats : les taux de conversion plus faibles sont obtenus en travaillant dans des milieux plus concentrés. Ceci peut être attribué à un effet inhibiteur aux concentrations élevées en saccharose, ce qui se traduit par une consommation incomplète du saccharose observée expérimentalement.

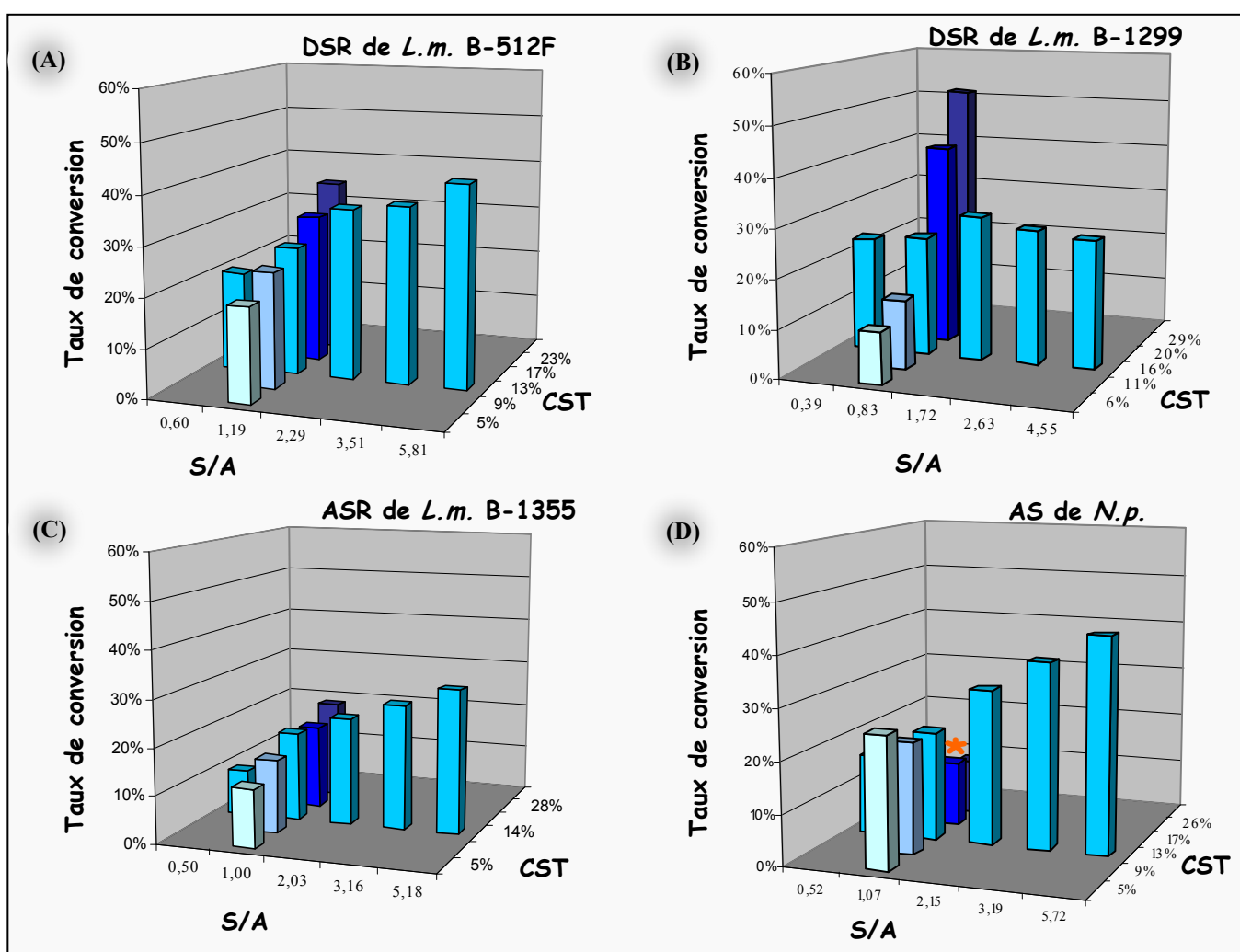


Figure 70 – Influence du rapport S/A et de la CST sur les *taux de conversion* pour (A) la DSR de *L. m.* B-512F ; (B) la DSR de *L. m.* B-1299 ; (C) l'ASR de *L. m.* B-1355 ; et (D) l'AS de *N. p.*
 (*) Consommation incomplète du saccharose.

II.2.2. Influence des conditions réactionnelles sur le pourcentage de glucose transféré

En présence de saccharose et d'un accepteur dans le milieu, la synthèse de glucane et la réaction d'accepteur sont en compétition. Les GS catalysent le transfert de glucose soit sur une chaîne de glucane en élévation, soit sur les molécules acceptrices, l'AF et les AFGOS

dans notre étude. L'objectif étant de synthétiser le plus d'AFGOS possible, il faut donc que la plus grande part de résidus glucosyle issus du saccharose soit transférée sur l'AF et ses dérivés glucosylés. C'est le critère sur lequel nous allons nous pencher à présent.

Comme le montre la Figure 71, le pourcentage de glucose transféré sur l'AF et les AFGOS est également influencé par les conditions initiales : il diminue avec le rapport S/A mais augmente avec la CST quelle que soit la GS utilisée.

Dans le détail, la DSR de *L. mesenteroides* B-512F et l'ASR de *L. mesenteroides* B-1355 sont influencées de façon similaire par le rapport S/A et la CST. Par contre, la DSR de *L. mesenteroides* B-1299 est l'enzyme pour laquelle la modification du rapport S/A ou de la CST modifie de façon très importante le pourcentage de glucose transféré sur l'AF et les AFGOS.

Une possible explication de l'effet du rapport S/A est la suivante. Pour des rapports S/A élevés, le nombre d'unités glucosyle disponibles pour le transfert augmente alors que la quantité d'AF diminue. L'accepteur est donc en trop faible concentration pour entrer en compétition avec la glucosylation de l'initiateur de la synthèse du polymère. De ce fait, le pourcentage de glucose transféré sur l'AF et les AFGOS diminue.

Au contraire, l'emploi de CST élevées favorise la glucosylation de l'AF pour les mêmes raisons que celles décrites dans le paragraphe précédent : le rapport des concentrations entre l'AF et l'initiateur de la polymérisation augmente dans ce cas et donc le transfert sur l'AF est favorisé. D'où une augmentation du pourcentage de glucose utilisé pour la réaction d'accepteur.

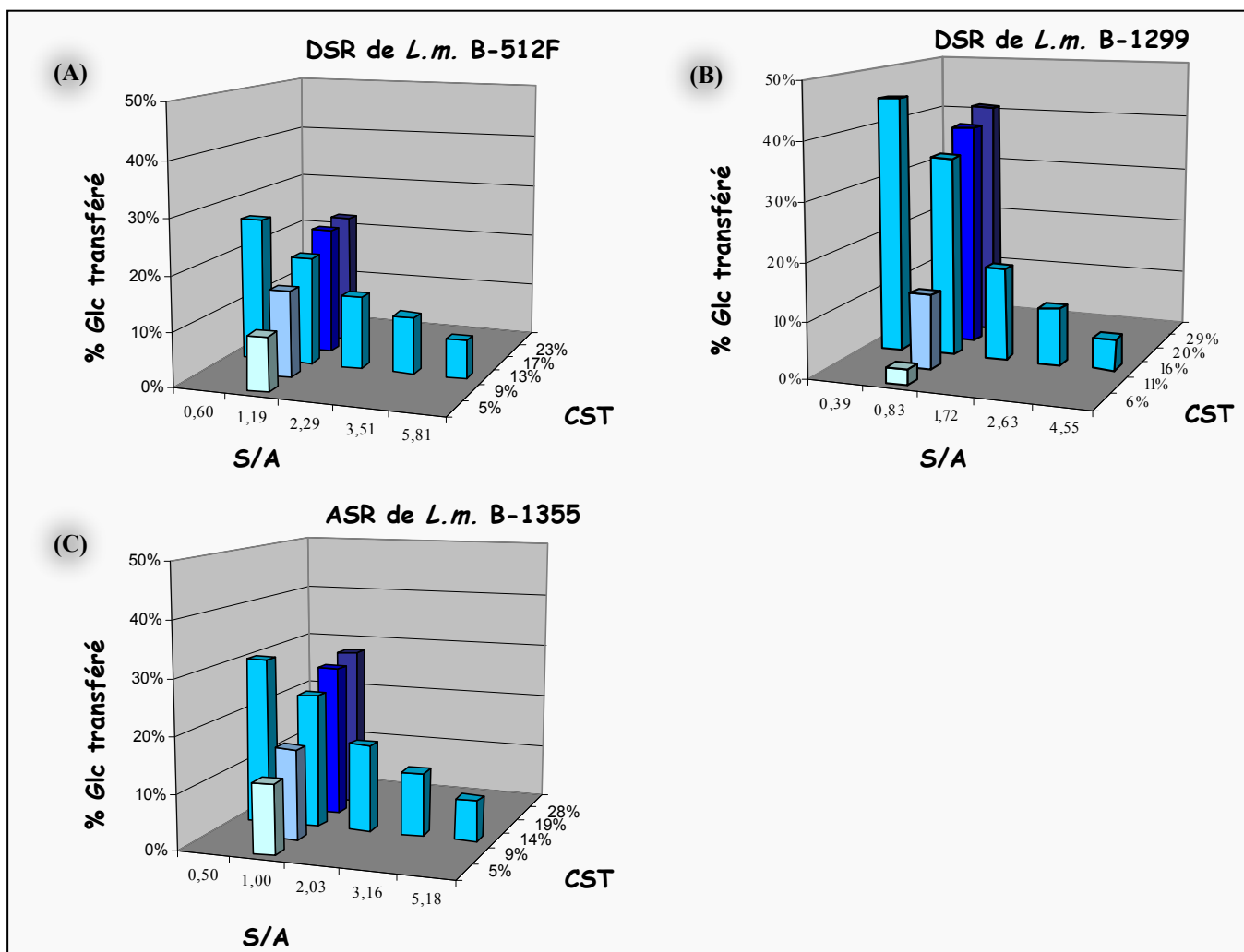


Figure 71 – Influence du rapport S/A et de la CST sur le pourcentage de résidus glucosyle transférés sur l'AF et les AFGOS, avec (A) la DSR de *L. m.* B-512F ; (B) la DSR de *L. m.* B-1299 ; (C) l'ASR de *L. m.* B-1355.

En résumé, alors que l'augmentation de la CST améliore aussi bien le taux de conversion que le transfert de glucose sur l'AF ou les AFGOS, le rapport S/A a des effets antagonistes. D'une part, son augmentation permet d'améliorer les taux de conversion, mais simultanément, le pourcentage de glucose transférés sur les accepteurs diminue. Le calcul du rendement de la réaction fera donc apparaître un rapport S/A optimal.

II.2.3. Influence des conditions réactionnelles sur le rendement et la quantité d'AFGOS produits

Le rendement de la réaction de glycosylation de l'AF que nous avons calculé tient compte à la fois du taux de conversion et du pourcentage de glucose transféré sur l'accepteur.

Le calcul du rendement fait ainsi apparaître un optimum pour le choix du rapport molaire S/A pour lequel le taux de conversion et le pourcentage de glucose transférés sur les

accepteurs sont les plus élevés. Ainsi, le rendement est optimal pour des concentrations équimolaires en AF et en saccharose.

Quant à l'influence de la CST, les taux de conversion et le pourcentage de glucose transféré sur les accepteurs augmentant avec la matière sèche, le rendement de la réaction suit la même évolution. Il faut donc travailler dans des milieux concentrés pour avoir les meilleurs rendements. Signalons que pour l'AS de *N. polysaccharea* les rendements diminuent pour des CST supérieures à 14 % à cause d'une consommation incomplète du saccharose.

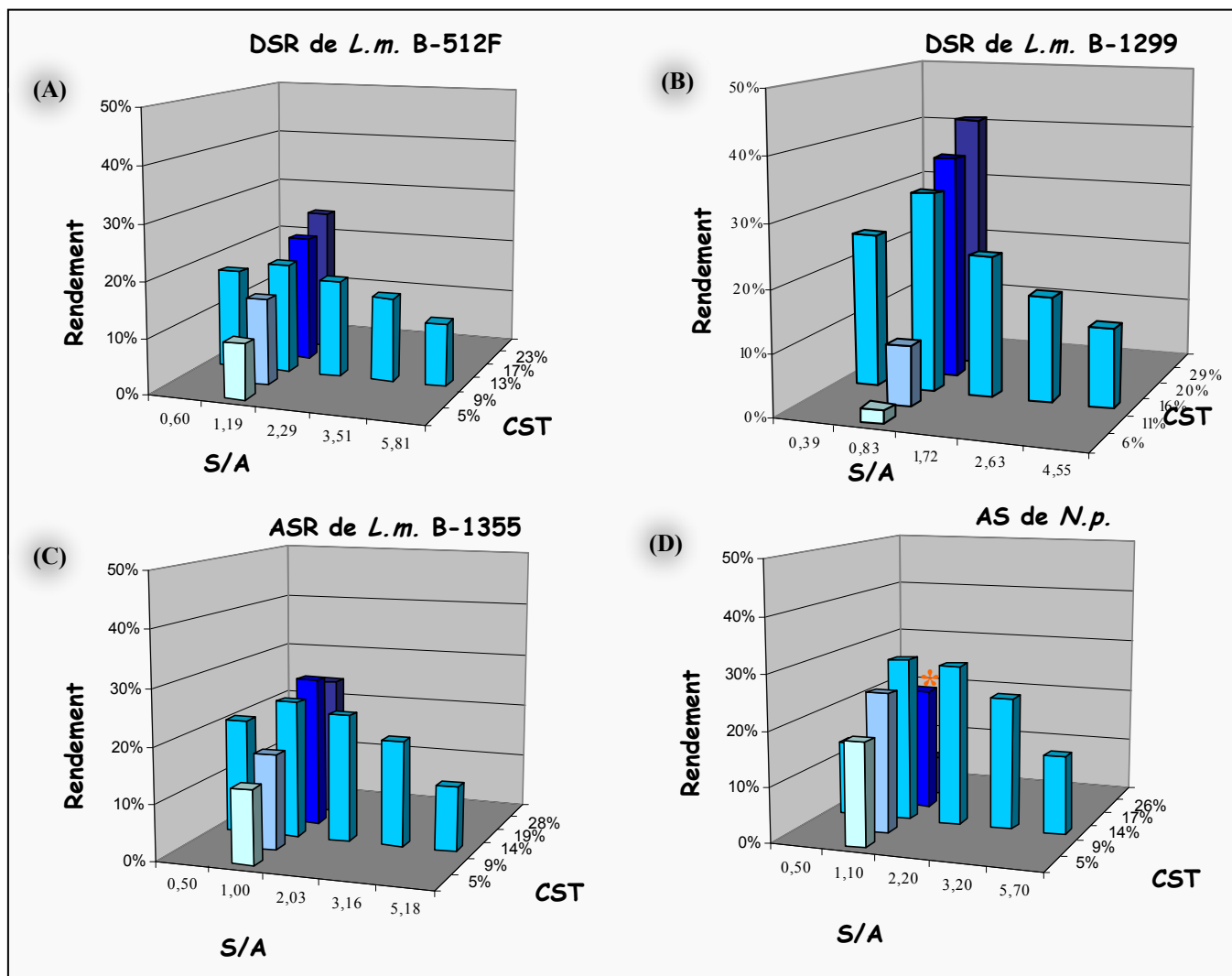


Figure 72 – Influence du rapport S/A et de la CST sur le rendement de la glycosylation de AF et la quantité d'AFGOS produits (pour une même quantité initiale de 100 g) avec (A) la DSR de *L. m.* B-512F ; (B) la DSR de *L. m.* B-1299 ; (C) l'ASR de *L. m.* B-1355 ; et (D) l'AS de *N. p.*

(*) Consommation incomplète du saccharose.

Les quantités d'AFGOS produits par réaction de glycosylation de l'AF dans les conditions imposées par le choix du rapport S/A et de la CST sont données sur la Figure 73. Pour être comparables, ces calculs ont été réalisés pour une même quantité initiale de 100 g d'AF.

Ils montrent ainsi que l'augmentation du rapport S/A ou de la CST permet de produire davantage d'AFGOS, excepté pour la DSR de *L. mesenteroides* B-1299. Pour cette enzyme, le taux de glucosylation varie peu avec le rapport S/A, alors que le pourcentage de glucose transféré sur l'accepteur diminue ce qui entraîne une diminution d'AFGOS produits.

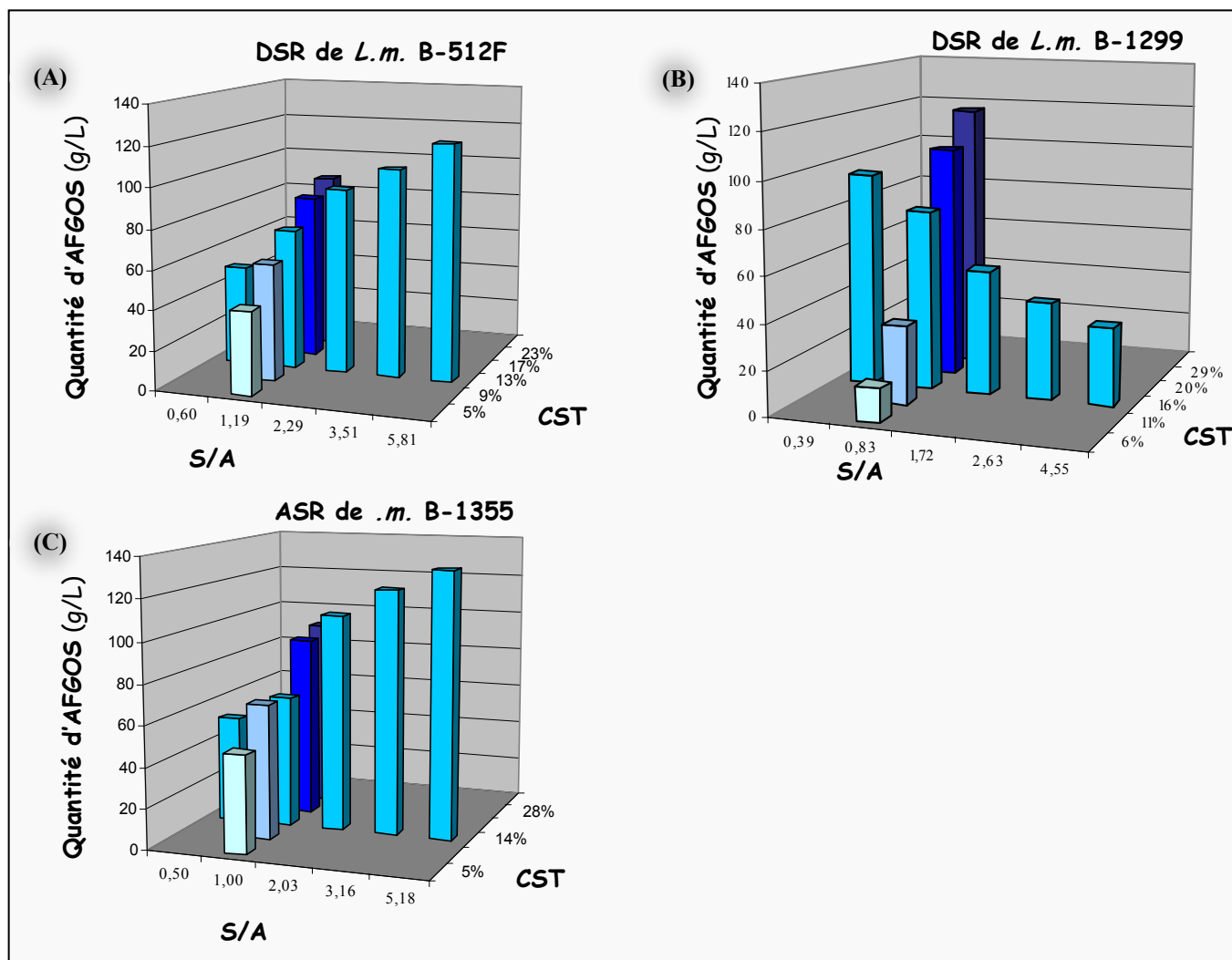


Figure 73 – Influence du rapport molaire S/A et de la CST sur la *quantité d'AFGOS* produits par glucosylation de 100 g d'AF avec (A) la DSR de *L. m.* B-512F ; (B) la DSR de *L. m.* B-1299 ; (C) l'ASR de *L. m.* B-1355 .

II.2.4. Influence sur la répartition de taille des AFGOS synthétisés

Quelle que soit l'enzyme utilisée comme catalyseur, l'augmentation du rapport S/A conduit à un allongement des chaînes des AFGOS et donc du degré de polymérisation moyen (Figure 74). De la même façon, travailler dans des milieux concentrés permet la synthèse d'AFGOS de DP plus élevés, excepté pour la DSR de *L. mesenteroides* B-1299 qui catalyse préférentiellement la synthèse d'oligosaccharides courts dans ces conditions.

Le choix du rapport S/A et de la CST est donc un moyen pour orienter la synthèse vers des AFGOS courts ou longs, lesquels pourraient présenter des propriétés différentes selon leur taille.

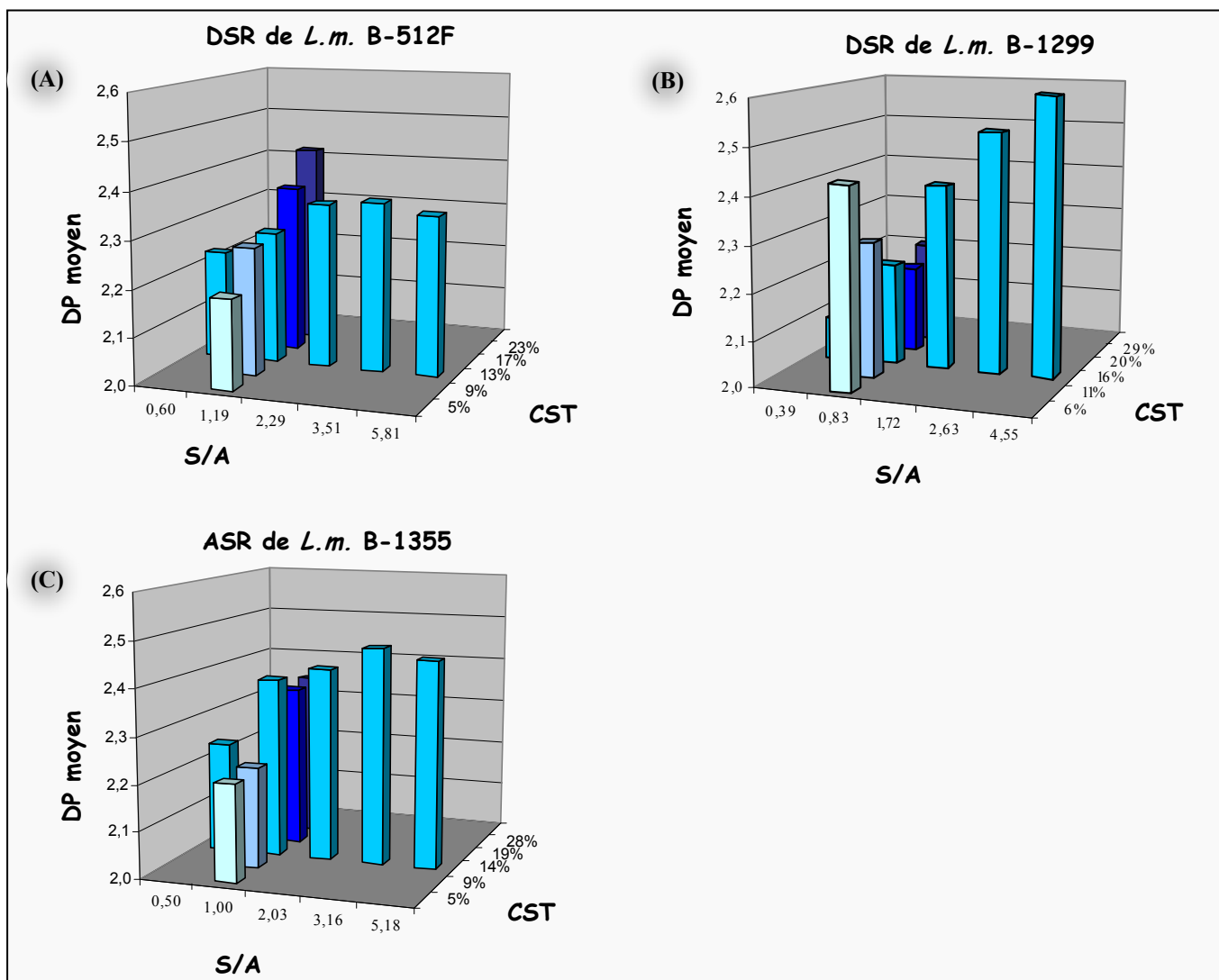


Figure 74 – Influence du rapport S/A et de la *répartition de taille* (degré de polymérisation moyen <DP>) des AFGOS synthétisés avec (A) la DSR de *L. m.* B-512F ; (B) la DSR de *L. m.* B-1299 ; (C) l'ASR de *L. m.* B-1355

II.2.5. Bilan de l'effet des conditions initiales

Au terme de cette étude de l'influence du rapport molaire saccharose/accepteur et de la CST sur l'efficacité de la glucosylation, il est clair que l'efficacité de la glucosylation et la spécificité de reconnaissance de l'AF (liée à la topologie du site actif) est propre à chaque enzyme.

Pour les trois GS de *L. mesenteroides*, l'influence de la CST est univoque : accroître la matière sèche permet d'améliorer l'efficacité de glucosylation de l'AF (taux de conversion, rendement, taille des AFGOS...).

Par contre, le rapport S/A influence de deux manières opposées l'efficacité de la glucosylation de l'AF. D'un côté, l'augmentation de ce paramètre permet d'accroître les taux de conversion, ce qui conduit à des concentrations en AF résiduel moindres. Mais de l'autre, le transfert des résidus glucosyles issus du saccharose sur l'AF et les AFGOS perd de façon significative en efficacité. En clair, en augmentant le rapports S/A, de plus en plus d'AF est converti en AFGOS (en valeur relative), mais la proportion de saccharose utilisée pour la glucosylation des accepteurs est de plus en plus faible. Nous avons alors démontré que le rendement de la réaction présente un optimum pour un rapport S/A proche de 1.

Tableau 24 – Récapitulatif de l'influence du rapport molaire S/A et de la CST sur l'efficacité de glucosylation de l'AF pour les différentes enzymes sélectionnées.

Légende : ↗ : augmentation, → : stagnation, ↘ : diminution, ↗↘ : maxima.

Paramètre étudié	Pour la DSR de <i>L. m.</i> B-512F		Pour la DSR de <i>L. m.</i> B-1299		Pour l'ASR de <i>L. m.</i> B-1355		Pour l'AS de <i>N. p.</i>	
	↗ de S/A	↗ de CST	↗ de S/A	↗ de CST	↗ de S/A	↗ de CST	↗ de S/A	↗ de CST
Taux de conversion	↗	↗	→	↗	↗	↗	↗	↘
% du Glc transféré sur l'AF	↘	↗	↘	↗	↘	↗	n.d.	n.d.
Rendement	↗↘	↗	↗↘	↗	↗↘	↗	↗↘	↗
Quantité d'AFGOS produits	↗	↗	↘	↗	↗	↗	n.d.	n.d.
<DP>	↗	↗	↗	↗	↗	↗	n.d.	n.d.

Cependant, chercher à atteindre le rendement optimal ne correspondra pas toujours à un choix judicieux. En effet, ces travaux portent sur la synthèse de dérivés glucosylés de l'AF et non de glucane. De plus, l'AF est le réactif limitant car le plus onéreux, alors que le saccharose est un substrat abondant et peu coûteux. Il faut donc préférentiellement chercher à atteindre des taux de conversion élevés, même si cela doit se faire avec une consommation excessive de saccharose.

Par conséquent d'après nos travaux, il est préférable d'utiliser un rapport S/A et une CST élevés pour la glucosylation de l'AF en présence des GS de *L. mesenteroides*. Pour l'AS de *Neisseria polysaccharea*, l'utilisation de milieux dilués avec un rapport S/A élevé est préconisé. Nous avons donc mis en œuvre la glucosylation de l'AF dans les conditions optimales et ainsi atteint des taux de conversions compris entre 50 et 80 % (Tableau 25), nettement supérieurs à ceux obtenus dans les conditions de référence. Ce qui signifie également que nous sommes capables de produire davantage d'AFGOS : entre 200 et 370 g selon la GS utilisée, à partir de 100 g d'AF.

Tableau 25 – Conditions de glucosylation préconisées pour la glucosylation efficace de l'AF.

(¹) pour une quantité initiale de 100g d'AF

	Souche productrice	<i>L. m.</i> B-512F	<i>L. m.</i> B-1299	<i>L.m.</i> B-1355
	Enzyme	DSR	DSR	ASR
Conditions de référence	Rapport S/A exact	1,2	0,8	1,0
	TSC exacte	131 g/L	156 g/L	144 g/L
	Taux de conversion	26,1 %	24,5 %	18,9 %
	AFGOS produits (¹)	71 g	65 g	79 g
Conditions optimisées	Rapport S/A exact	4	3	1.6
	TSC exacte	550 g/L	490 g/L	440 g/L
	Taux de conversion	67 %	76 %	49 %
	AFGOS produits (¹)	180 g	230 g	130 g

II.3. Synthèse d'isomaltooligosaccharides comme produits secondaires

L'étude approfondie des milieux finaux de glucosylation de l'AF avec la DSR de *L. mesenteroides* B-512F révèle par CLHP la présence de produits secondaires aux côtés des α -(1,6) AFGOS (Figure 76).

L'étude LC-MS décrite dans le paragraphe 1.4 a en effet permis de déterminer la masse molaire de ces produits secondaires. En effet, seuls les AFGOS peuvent se déshydrater par perte d'une molécule d'eau au niveau du carbone C2 de l'unité AF, d'où la présence de l'adduit $[M+Na^+-H_2O]$ sur les spectres de masse correspondant (Figure 75). Si un composé ne présente pas cet adduit sur son spectre de masse, il peut être conclu que ce n'est pas un AFGOS, mais d'un produit secondaire de la réaction. De plus, par la détermination des masses molaires de ces co-produits, nous savons qu'il s'agit d'oligosaccharides.

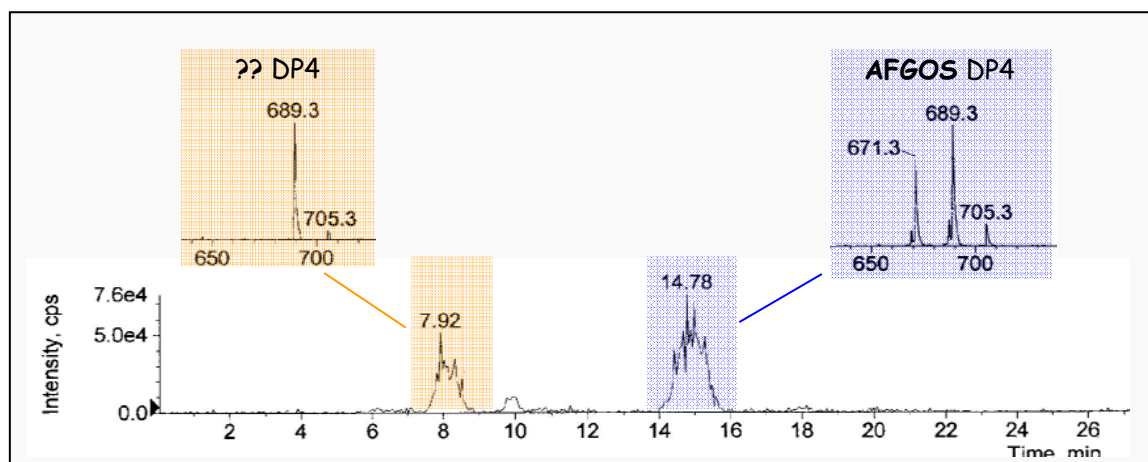


Figure 75 – Comparaison des spectres de masse d'un oligosaccharide de DP4 et l'AFGOS DP4 : seul le dérivé glucosylé de l'AF présente un ion correspondant à $[M+Na^+-H_2O]$. Les composés ne présentant cet adduit ne peuvent pas être des AFGOS, mais des produits secondaires de type oligosaccharide.

Grâce à la spectrométrie de masse, nous avons ainsi pu déterminer le degré de polymérisation de chaque produit secondaire.

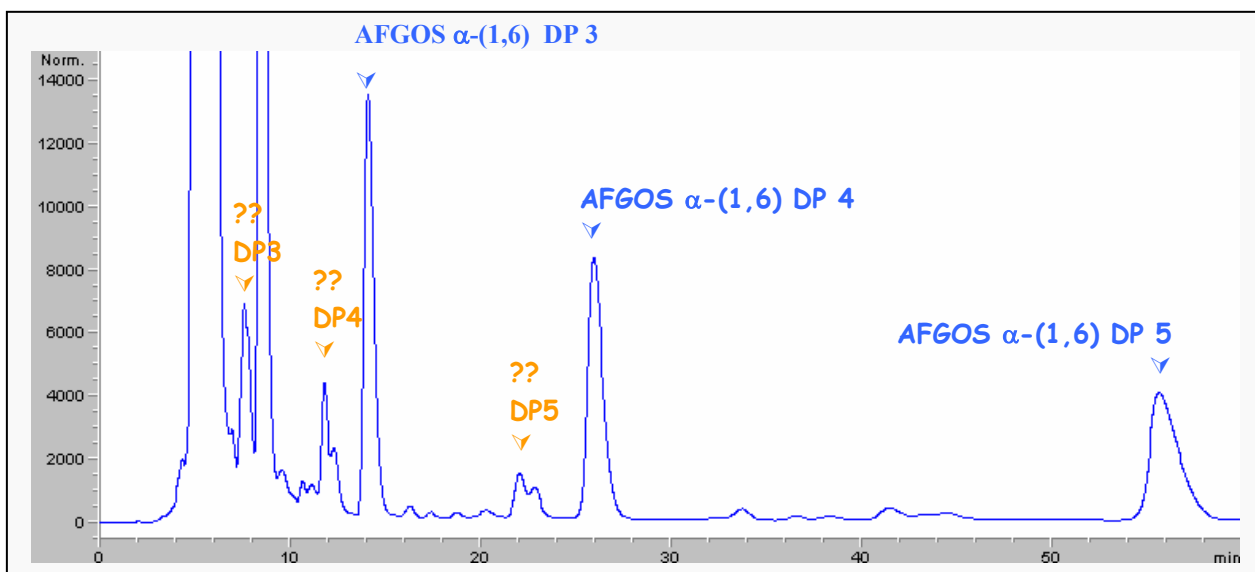


Figure 76 – Présence aux côtés des α -(1,6) AFGOS de pics secondaires identifiés dont le degré de polymérisation a été déterminé par CL-SM.

Paramètres CLHP : colonne C18, eau ultra-pure à 0,5 mL/min, détecteur réfractométrique.

Au vu de la forme particulière de ces pics (épaulement dû aux formes α et β) observés sur les chromatogrammes, nous en avons conclu qu'il s'agit d'isomaltooligosaccharides (notés IMOS) pour lesquels les anomères α et β du proton anomérique de l'extrémité réductrice ont des temps de rétention différents. Ces composés résultent de la glucosylation du glucose (lui-même issu de l'hydrolyse du saccharose) avec formation de liaisons glucosidiques uniquement de type α -(1,6).

Pour confirmer la présence de ces IMOS dans le milieu final de glucosylation, sans avoir à les isoler, plusieurs essais ont été menés en parallèle :

- des IMOS ont été synthétisés par réaction de glucosylation du glucose en présence de *L. mesenteroides* B-512F. Le profil chromatographique final a été comparé à celui de la Figure 76 : la comparaison des temps de rétention confirme que ce sont des IMOS (Figure 77).

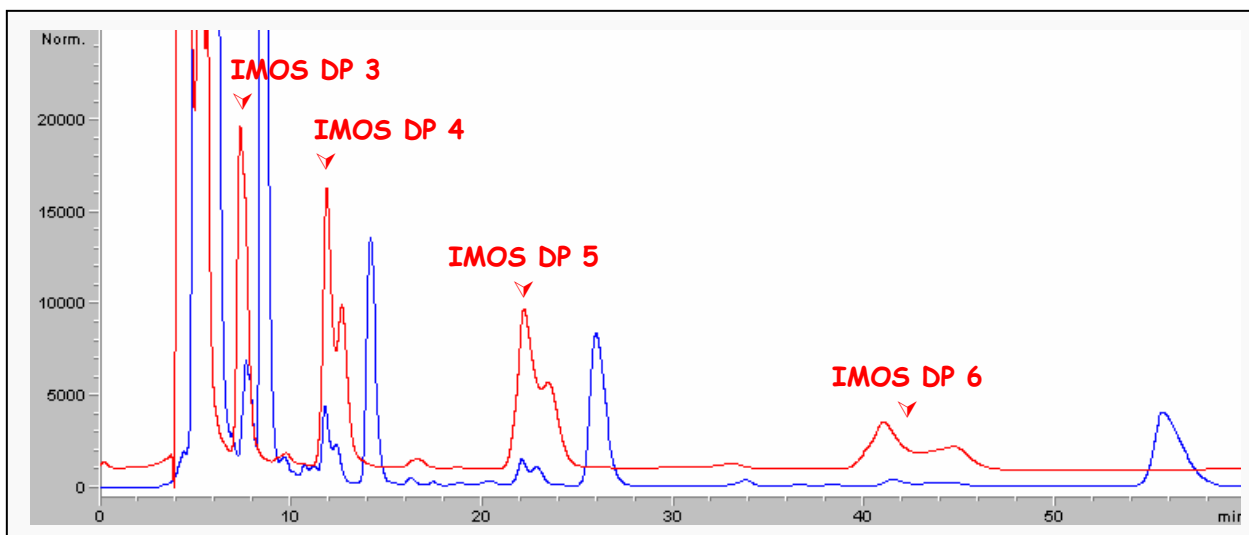


Figure 77 – Comparaison par CLHP d'un mélange d'IMOS (en rouge) synthétisés par glucosylation du glucose en présence de la DSR de *L. mesenteroides* B-512F et d'un mélange d'AFGOS obtenus par glucosylation de l'AF (en bleu).

Paramètres CLHP : colonne C18, eau ultra-pure à 0,5 mL/min, détecteur réfractométrique.

- le mélange d'IMOS précédemment synthétisé a été coinjecté avec le mélange d' α -(1,6) AFGOS : l'augmentation exclusive des pics correspondant aux produits secondaires de la Figure 76 confirme qu'ils correspondent à des IMOS (Figure 78).

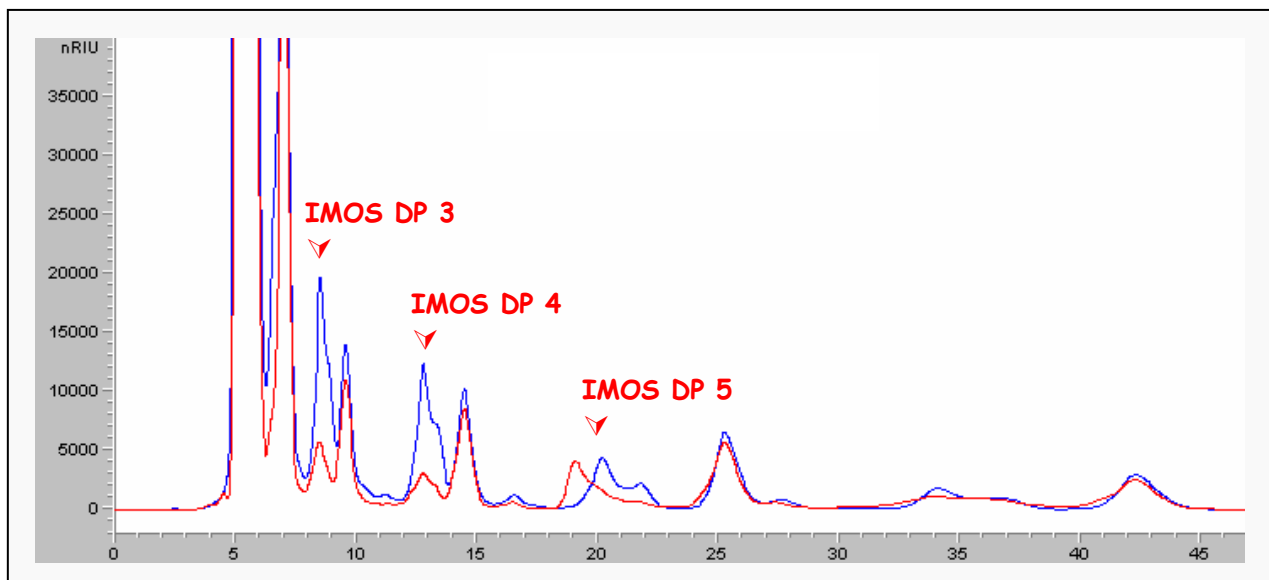


Figure 78 – Comparaison des chromatogrammes obtenus par CLHP sur colonne C18 d'un mélange d' α -(1,6) AFGOS avant (en rouge) et après (en bleu) coinjection du mélange d'IMOS.

Paramètres CLHP : colonne C18, eau ultra-pure à 0,5 mL/min, détecteur réfractométrique.

Les produits secondaires présents aux côtés de l'AF en fin de réaction de glucosylation sont donc des IMOS. D'un point de vue quantitatif, les IMOS représentent environ 2 % (p/p)

de la matière sèche, et tout comme pour les AFGOS, l'optimisation des conditions initiales (rapport S/A et CST) augmente le pourcentage massique d'IMOS dans le milieu, ce qui représente un inconvénient dans cette étude (Figure 79).

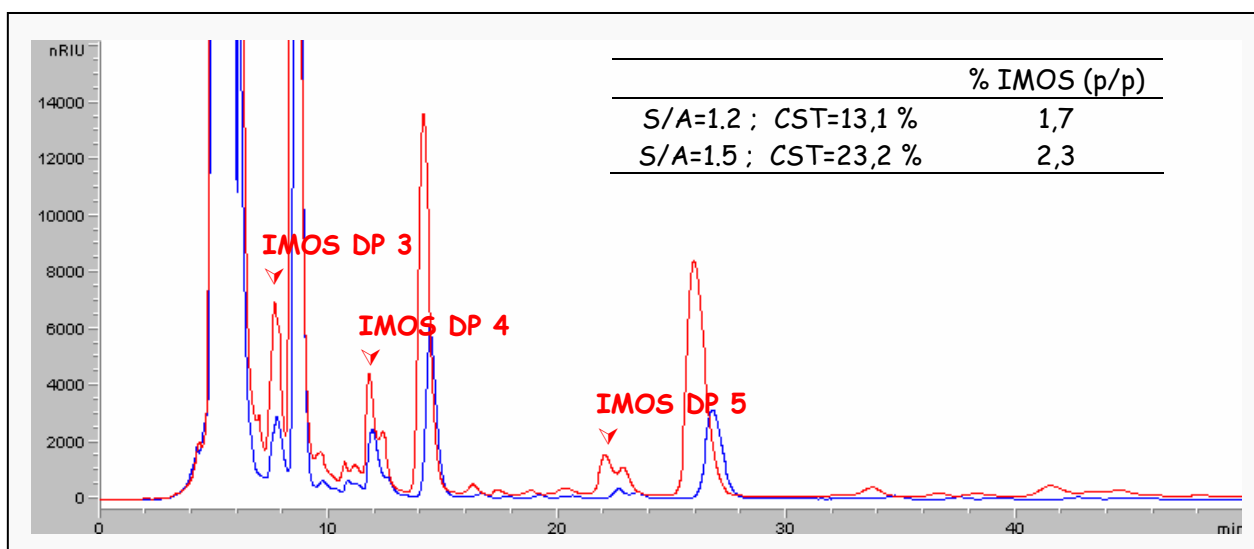


Figure 79 – Influence des conditions initiales (rapport S/A et CST) sur la quantité d'IMOS produits.

Paramètres CLHP : colonne C18, eau ultra-pure à 0.5 mL/min, détection par réfractométrie.

Identification des chromatogrammes: S/A=1,2 et CST=13,1 % : en bleu ; S/A=1,5 et CST=23,2% : en rouge.

Concernant les autres GS de *L. mesenteroides*, il semble y avoir également synthèse d'IMOS, mais dans une moindre mesure. Cependant leur détection est difficile à cause des régio-isomères de temps de rétention proches (surtout pour les α -(1,2) AFGOS).

Pour l'AS de *N. polysaccharea*, les IMOS sont absents du milieu final de glucosylation. En effet, cette enzyme catalyse la formation exclusives de liaisons α -(1,4), et ne permet donc pas de former des IMOS, composés de liaisons α -(1,6). Notons tout de même que nous n'obtenons pas de maltooligosaccharides (synthétisés par glucosylation de glucose en présence de l'AS de *N. polysaccharea*).

La synthèse d'IMOS comme produits secondaires de réactions d'accepteurs n'a jamais été observée, du moins pas à de telles concentrations. L'AF se démarque donc des autres accepteurs décrits dans la littérature.

Pour expliquer la synthèse de ces IMOS, on peut avancer l'hypothèse que la présence d'AF dans le milieu réactionnel favorise l'hydrolyse du saccharose pour libérer davantage de glucose qui par glucosylation conduit aux IMOS.

Partie III. CONCLUSION

Ce premier chapitre démontre que le 1,5-anhydro-D-fructose est reconnu comme accepteur des GS utilisées dans cette étude. Les dérivés obtenus ont été baptisés 1,5-anhydro-D-fructo-glucooligosaccharides (**AFGOS**) : ils résultent de transferts successifs d'unités glucosyle avec formation de liaisons glucosidiques de type α -(1,6), α -(1,2) ou α -(1,4). En effet, les GS conservent leur spécificité lors de la réaction de glucosylation de l'AF. L'utilisation d'une enzyme de spécificité donnée permet ainsi de synthétiser des familles d'**AFGOS** de différentes structures, dont les propriétés pourraient elles aussi différer.

La production des **AFGOS** peut être contrôlée par le choix des conditions initiales. En effet, nous avons démontré que le rapport molaire saccharose/AF et la concentration en sucres totaux ont une influence directe sur les taux de conversion, les rendements et la taille des **AFGOS** synthétisés. Ainsi, la production d'**AFGOS** avec les GS des souches *L. mesenteroides* devra être préférentiellement réalisée pour des rapports S/A élevés et des milieux concentrés. Quant à l'AS de *N. polysaccharea*, en se basant seulement sur les taux de conversion, nous avons démontré qu'il est préférable d'utiliser des rapports S/A élevés et des CST faibles.

Enfin, nous avons mis en lumière le comportement original de l'AF vis-à-vis de la synthèse de produits secondaires tels que les IMOS. En effet, jamais dans la littérature il n'a été fait mention dans le cas de réaction d'accepteur de la présence d'IMOS aux concentrations obtenues dans le cas de l'AF. Cette originalité résulte de la présence de l'AF qui favorise sans doute la formation de glucose par réaction d'hydrolyse du saccharose, point de départ de la synthèse des IMOS. L'obtention de structures tri-dimensionnelles des sites catalytiques des GS pourrait permettre de mieux comprendre ce phénomène.

**CHAPITRE B -
ETUDE DES PROPRIETES ET DE LA REACTIVITE DE
L'AF ET DE SES DERIVES**

La glycosylation de l'AF en présence de GS conduit à la synthèse de dérivés glycosylés dont la structure dépend de la spécificité de l'enzyme utilisée. Or l'étude bibliographique sur les GS a montré que les dérivés glycosylés du maltose obtenus en présence de la DSR de *L. mesenteroides* B-1299 présentent des propriétés prébiotiques. Nous avons donc dans ce chapitre étudié les propriétés prébiotiques de deux familles d'AFGOS.

Par ailleurs, nous avons souhaité savoir si la glycosylation de l'AF modifie ou non le fort pouvoir anti-oxydant, propriété qui ouvre de nombreuses applications à ce monosaccharide, notamment dans l'industrie agroalimentaire.

Enfin, nous avons mis à profit la réactivité particulière de l'AF : grâce à sa fonction carbonyle, la dérivation de l'AF et des AFGOS en différents oximes a été proposée et optimisée. Initialement, l'objectif était de développer un mode de purification original basé sur l'utilisation d'une résine fonctionnelle (par fixation spécifique de l'AF et des AFGOS sur la résine avec formation d'une liaison covalente). Mais, d'autres finalités sont apparues et se sont révélées plus intéressantes : la dérivation en oxime est par exemple une méthode efficace pour la mise en évidence d'AFGOS dans un mélange complexe.

Partie I. ETUDE DES PROPRIETES DE L'AF ET DES AFGOS

I.1. Evaluation des propriétés prébiotiques

Les propriétés prébiotiques de l'AF et des AFGOS ont alors été étudiées en collaboration avec la société GENIBIO (FRANCE) dans le cadre du projet NEPSA.

Rappelons brièvement que pour être qualifiée de prébiotique, une molécule doit présenter les propriétés suivantes :

- résistance à l'attaque des enzymes digestives ;
- stimulation du développement de microorganismes ayant une action bénéfique pour l'hôte, et
- absence de stimulation de la croissance de bactéries pathogènes.

Nous avons étudié les propriétés prébiotiques de deux familles d'AFGOS de structures proches des GOS (excepté pour l'extrémité réductrice):

- les α -(1,6) AFGOS synthétisés avec la DSR de *L. mesenteroides* B-512F au niveau de la flore vaginale ;
- les α -(1,2) AFGOS (en mélange avec les α -(1,6) AFGOS) obtenus avec la DSR de *L. mesenteroides* B-1299 au niveau intestinal.

Au préalable, les mélanges d'AFGOS ont été dé-dextranisés par précipitation à l'éthanol et les monosaccharides et disaccharides éliminés par chromatographie d'exclusion (voir paragraphe I.4.1 du chapitre A).

Plusieurs souches de lactobacilles et de bifidobactéries (voir partie matériels et méthodes) représentatives des flores intestinale et vaginale ont été utilisées. Trois souches pathogènes ont également été sélectionnées : il s'agit d'*E. coli*, de *Salmonella typhimurium* et de *Candida albicans*.

Pour déterminer l'effet prébiotique des AFGOS, des fermentations ont été réalisées sur les souches précédemment citées sur des milieux permettant leur croissance et ne comportant que les molécules étudiées comme seule source de carbone. Nous avons alors évalué l'aptitude des AFGOS à stimuler le développement de la flore bénéfique par rapport à la flore pathogène par le suivi de la croissance des bactéries (par mesure de la turbidité) et de la consommation des glucides (suivi par CLHP).

Deux populations d'oligosaccharides d'activité prébiotique connue ont été utilisées comme référence. Il s'agit des deux familles de dérivés glucosylés du maltose (décrites dans le paragraphe II.2 du chapitre B de la partie bibliographique) :

- les α -(1,6) GOS, qui résultent de la glucosylation du maltose par formation de liaisons α -(1,6) ; ces oligosaccharides possèdent potentiellement des propriétés prébiotiques au niveau vaginal [ROUSSEAU, V. et coll., 2004].
- les α -(1,2) GOS, qui ont la même structure de base que les α -(1,6) GOS excepté la dernière unité glucosyle liée en α -(1,2) ; il a été démontré que ces oligosaccharides agissent comme des prébiotiques au niveau de la flore intestinale [DJOUZY, Z. et coll., 1997].

De même, le glucose, utilisé à la fois par les souches bénéfiques et pathogènes pour leur développement, a servi de témoin.

Au niveau de la flore intestinale, le Tableau 26 montre que le glucose ne peut effectivement pas être considéré comme un prébiotique puisqu'il est consommé aussi bien par les bactéries bénéfiques que pathogènes. Quant à l'AF, il est peu consommé et peu utilisé pour la croissance de ces mêmes bactéries.

Pour les oligosaccharides, les α -(1,2) GOS ne sont pas consommés par les bactéries pathogènes, mais uniquement par *B. breve*. Les α -(1,2) AFGOS quant à eux ne permettent

pas non plus la croissance des souches pathogènes ; une légère consommation est observée uniquement avec la souche *B. breve* mais sans croissance significative de celle-ci.

Par conséquent, sur la base des tests effectués et des souches bactériennes sélectionnées, les α -(1,2) AFGOS ne peuvent pas être considérés comme des prébiotiques pour les bactéries constitutives de la flore intestinale. À l'inverse, les résultats confirment le caractère prébiotique des oligosaccharides α -(1,2) GOS [DJOUZY, Z. et coll., 1997], uniquement consommés par l'une des souches représentatives de la flore intestinale.

Tableau 26 – Evaluation des propriétés prébiotiques de glucides par le suivi de la quantité de glucides consommés et de la croissance des souches représentatives de la flore intestinale.

	souches	Glucides	Variation de turbidité	% glucides consommés
FLORE BENEFIQUE	<i>Lactobacillus acidophilus</i> BL 2020	glucose	0,473	92
		AF	0,089	21
		α -(1,2) GOS	0,098	1
		α -(1,2) AFGOS	0,040	0
	<i>Bifidobacterium breve</i> BL 9909	glucose	0,421	85
		AF	0,026	10
		α -(1,2) GOS	0,302	32
		α -(1,2) AFGOS	0,089	15
FLORE PATHOGENE	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 CIP 103571	glucose	0,190	68
		AF	0,124	10
		α -(1,2) GOS	0,082	0
		α -(1,2) AFGOS	0,045	0
	<i>Salmonella typhimurium</i> CIP 6062T	glucose	0,099	76
		AF	0,110	44
		α -(1,2) GOS	0,064	0
		α -(1,2) AFGOS	0,080	0

Concernant la flore vaginale, les résultats du Tableau 27 montrent que le glucose est fortement consommé par les souches bénéfiques et pathogènes. L'AF est lui peu consommé et les bactéries se développent peu.

Les α -(1,6) GOS, quant à eux, peuvent clairement être qualifiés de prébiotiques par rapport à nos tests [ROUSSEAU, V. et coll., 2004]. Ils sont fortement consommés par les lactobacilles testés, et très peu par la flore pathogène. La présence d' α -(1,6) AFGOS enfin

n'est pas profitable au développement des quatre souches testées puisqu'ils ne sont que très peu consommés par les bactéries bénéfiques.

Les α -(1,6) AFGOS et l'AF sont donc peu consommés quel que soit le type de bactérie considéré. Cela démontre qu'ils ne présentent pas de propriétés prébiotiques au niveau vaginal.

Tableau 27 - Evaluation des propriétés prébiotiques de glucides par le suivi de la quantité de glucides consommés et de la croissance des souches représentatives de la flore vaginale.

	souches	oligosaccharides	Δ turbidité	% oligosaccharides consommés
FLORE BENEFIQUE	<i>Lactobacillus Crispatus</i> BLL 2008	glucose	0,431	95
		AF	0,053	22
		α -(1,6) GOS	0,377	87
		α -(1,6) AFGOS	0,091	15
	<i>Lactobacillus Jensenii</i> BLL 2108	glucose	0,401	95
		AF	0,046	11
		α -(1,6) GOS	0,298	89
		α -(1,6) AFGOS	0,111	27
FLORE PATHOGENE	<i>Candida Albicans</i> ATCC 2091	glucose	0,190	91
		AF	0,110	22
		α -(1,6) GOS	0,107	2
		α -(1,6) AFGOS	0,093	7
	<i>Escherichia Coli</i> CIP548T	glucose	0,129	26
		AF	0,060	12
		α -(1,6) GOS	0,086	5
		α -(1,6) AFGOS	0,069	10

Que ce soit l'AF ou les α -(1,6) AFGOS et α -(1,2) AFGOS, aucun de ces sucres ne présente de propriétés prébiotiques. La faible croissance des souches est liée à la présence d'AF dans le milieu, sans doute toxique à cause de son fort pouvoir réducteur.

I.2. Propriétés réductrices de l'AF

I.2.1. Oxydation de l'AF par l'acide 3,5-dinitrosalicylique

L'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS) est couramment utilisé comme réactif des sucres réducteurs (dosage du fructose pour la mesure d'activité par exemple). Généralement, cette réaction d'oxydo-réduction nécessite un apport d'énergie par chauffage à 100 °C lors de la

réaction avec le fructose ou le glucose par exemple. Mais dans le cas de l'AF, la réaction avec le DNS se fait à froid. En effet, l'AF possède une fonction carbonyle, à l'inverse des autres sucres réducteurs pour lesquels cette fonction est engagée dans une liaison hémiacétale. L'AF présente donc un pouvoir réducteur élevé lui permettant de réagir de façon spécifique avec le DNS à froid.

Nous avons donc suivi la cinétique de réaction de l'AF avec le DNS (Figure 80) par mesure de la densité optique (DO) du produit formé absorbant à 550 nm. Elle montre que la réaction d'oxydo-réduction est rapide (environ 10 min). On observe une légère décroissance de la DO dans le temps. Il sera donc préférable de contrôler la durée des réactions. La valeur choisie pour la lecture de la DO est donc de 15 minutes.

Dans ces conditions, la Figure 81 montre que la réponse de l'AF au DNS est une fonction linéaire de la concentration jusqu'à 3,78 g/L.

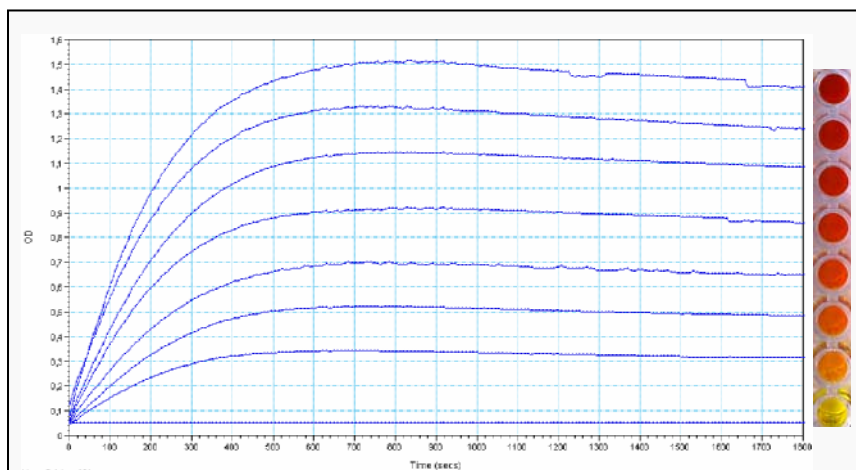


Figure 80 – Suivi cinétique de l'absorption à 550 nm de réaction de l'AF avec le DNS pour des concentrations inférieures à 21 mM (3,78 g/L).

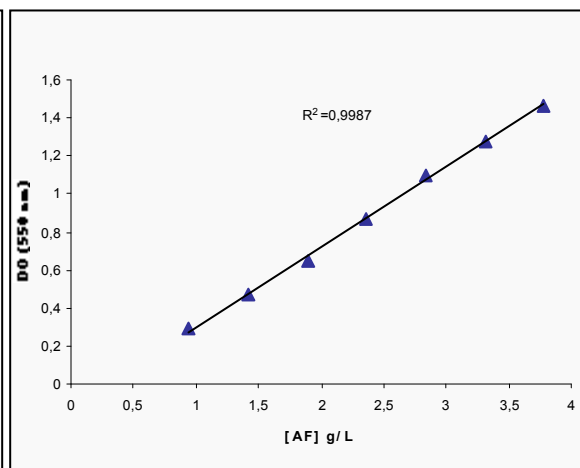


Figure 81 – Réponse de l'AF au DNS (DO mesuré après 15 min de réaction).

I.2.2. Réaction de l'AF avec la phénylhydrazine

La phénylhydrazine est un autre réactif employé pour doser les sucres réducteurs (Figure 82). La réaction de couplage nécessite également une étape de chauffage. Nous avons là encore comparé la réactivité de l'AF par rapport au glucose et au fructose, et ce, avec et sans chauffage.

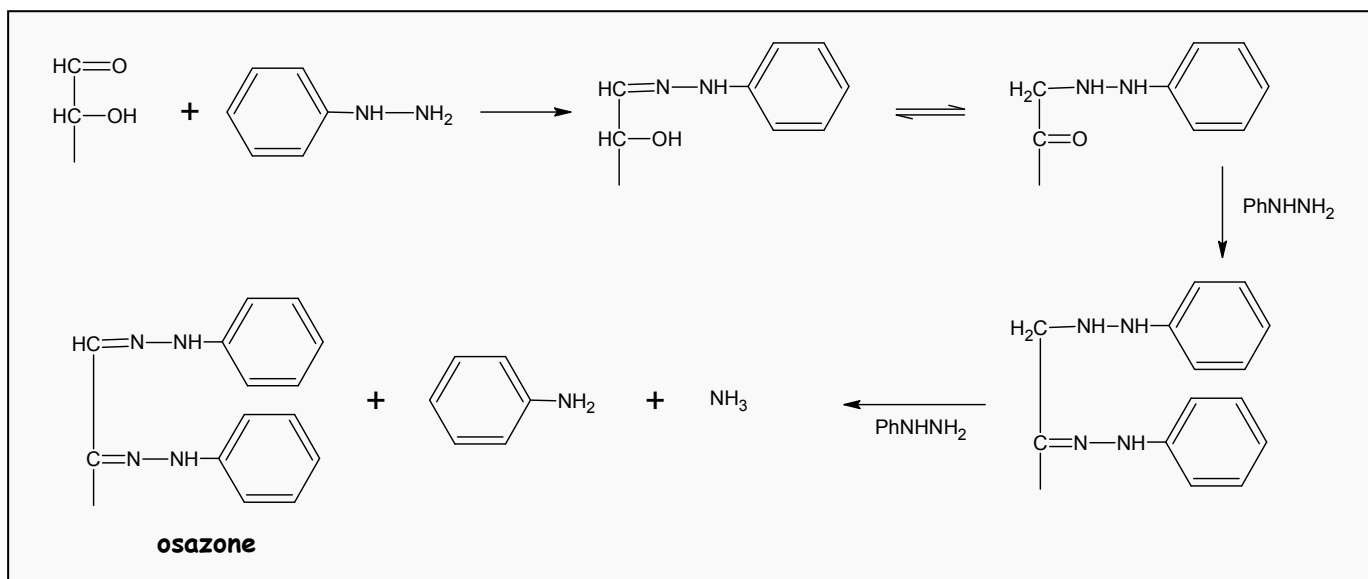


Figure 82 – Réaction de la phénylhydrazine avec les sucres réducteurs.

Nous pouvons ainsi constater qu'il n'existe aucune différence entre les trois monosaccharides que ce soit avec ou sans chauffage (Figure 83-A). Dans le premier cas, les solutions restent incolores, alors qu'après 2 h de chauffage, les solutions deviennent jaune pâle du fait de la présence de l'osazone.

Mais 24 h après être resté à température ambiante, il est intéressant de remarquer que l'AF se distingue des autres sucres par sa couleur orangée (Figure 83-B). Le tracé du spectre d'absorption des solutions obtenues montre qu'avec l'AF comme réactif, le produit final présente une absorption supplémentaire à 490 nm (Figure 84).

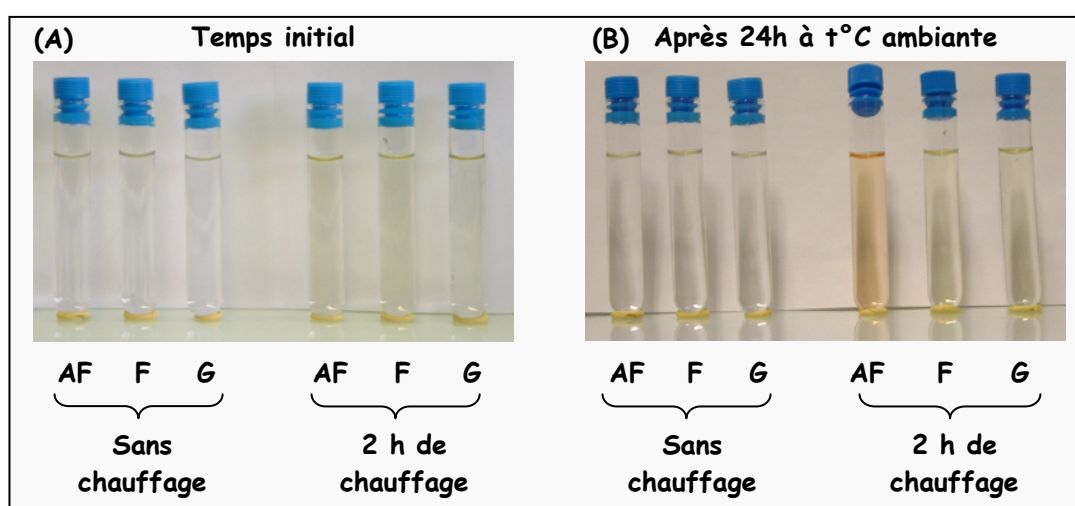


Figure 83 – Comparaison de la réaction de l'AF (AF), du glucose (G) et du fructose (F) avec la phénylhydrazine avec et sans chauffage aux temps initial (A) et après 24 h (B).

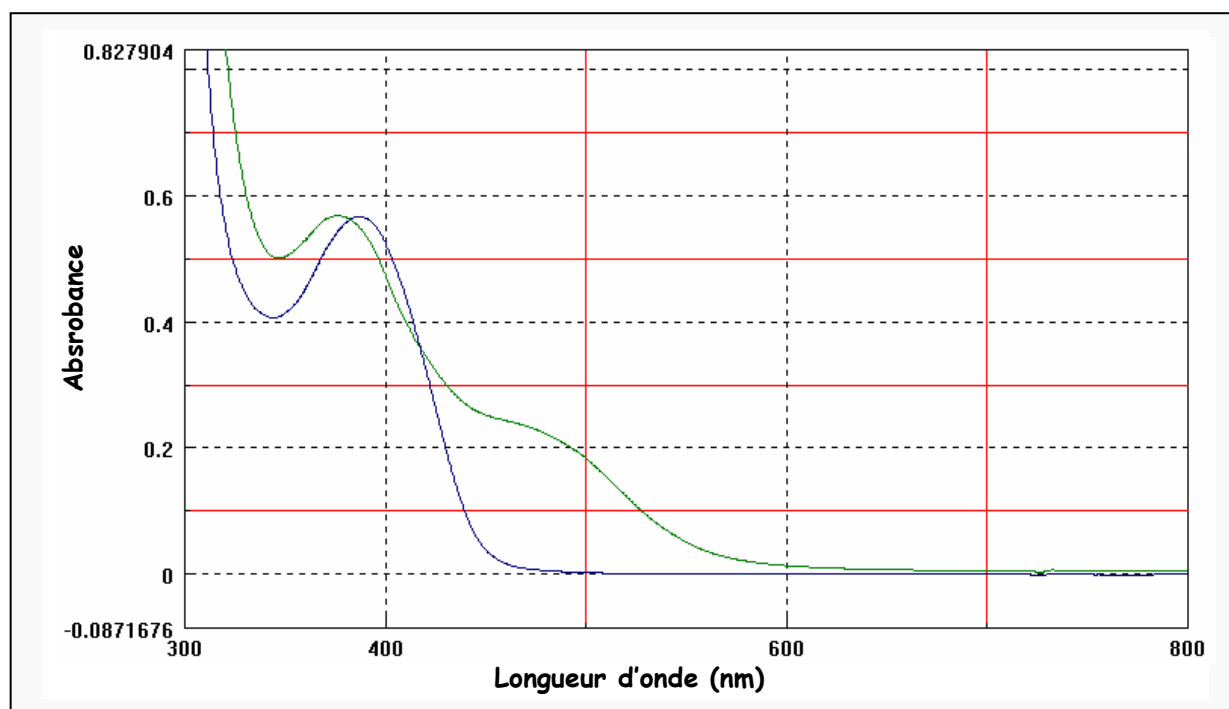


Figure 84 – Spectre d'absorption des produits de réaction de la phenylhydrazine avec l'AF (spectre vert) et le fructose/glucose (spectre bleu).

Ces deux exemples montrent donc que la molécule d'AF présente une réactivité particulière par rapport aux autres sucres tels que le fructose ou le glucose. Cette particularité résulte de la présence au sein de la structure de l'AF d'une fonction carbonyle réactive.

I.3. Propriétés anti-oxydantes des AFGOS

De nombreux travaux décrivent le fort pouvoir anti-oxydant de l'AF, essentiellement lié à l'existence de la forme 2,3-ènediol de l'AF [FUJISUE, M. et coll., 1999; YU, S. et coll., 1996]. La question que nous nous sommes posée est la suivante : les AFGOS conservent-ils ou non un pouvoir anti-oxydant élevé comme l'AF ?

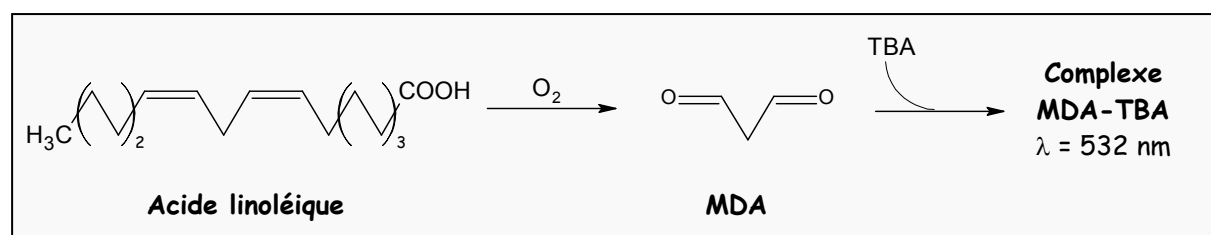
Pour répondre à cette question, nous avons tout d'abord mesuré le pouvoir réducteur à froid par la méthode au DNS d'un milieu de synthèse contenant seulement de l'AF au départ, et d'un mélange final de glucosylation contenant de l'AF et des AFGOS obtenus après glucosylation. On note que le pouvoir réducteur à froid évolue peu, ce qui nous laisse supposer que les AFGOS sont aussi réducteurs que l'AF (Tableau 28).

Tableau 28 – Dosage de l'AF (en g/L) dans les milieux réactionnels de glycosylation aux temps initial et final par la méthode au DNS

DSR de <i>L. mesenteroides</i> B-512F		DSR de <i>L. mesenteroides</i> B-1299		ASR de <i>L. mesenteroides</i> B-1355	
Ti	Tf	Ti	Tf	Ti	Tf
41,4	45,2	43,2	47,5	42,2	47,7

Pour confirmer l'hypothèse avancée précédemment, le pouvoir réducteur des α -(1,6) AFGOS de DP 2, 3 et 4 synthétisés avec la DSR de *L. mesenteroides* B-512F a été déterminé par la méthode à l'acide thiobarbiturique (TBA) [FUJISUE, M. et coll., 1999].

Cette méthode repose sur le dosage colorimétrique du complexe malonedialdéhyde (MDA):TBA. Le MDA est un composé libéré par dégradation d'acides gras insaturés sensibles à l'oxygène tel que l'acide linoléique (Figure 85). En présence de composés anti-oxydants dans le milieu, la dégradation de l'acide linoléique est limitée, et par conséquent la formation de MDA diminue.

**Figure 85** – Principe du test à l'acide thiobarbiturique (TBA) utilisé pour la mesure du pouvoir anti-oxydant des AFGOS.

L'oxydation naturelle de l'acide linoléique conduit au malonedialdéhyde (MDA) dosé par complexation avec le TBA. Cette oxydation est limitée par la présence d'anti-oxydants dans le milieu.

Le pouvoir anti-oxydant de chaque AFGOS est déterminé par le pourcentage d'acide linoléique n'ayant pas été oxydé. Les résultats sont donnés sur la Figure 86. L'AF et la vitamine C sont utilisés comme molécules de référence.

Les résultats obtenus montrent donc que l'AF présente un pouvoir anti-oxydant élevé, proche de celui de la vitamine C. Cependant, les résultats diffèrent de ceux de FUJISUE et coll. obtenus selon le même protocole [FUJISUE, M. et coll., 1999]. En effet, dans notre cas le pouvoir anti-oxydant de l'AF est légèrement inférieur (d'un facteur 1.2) à celui de la vitamine C.

Concernant les **AFGOS**, nous constatons que les produits glucosylés conservent leur propriétés anti-oxydantes, et ce quel que soit le DP.

Ces résultats remarquables peuvent s'expliquer par l'étude de la structure des **AFGOS**. En effet, au cours de la glucosylation catalysée par les GS, la première unité glucose est transférée sur le carbone C6 (ou C4) de l'AF. L'équilibre tautomérique au niveau du système O2-C2-C3 de l'unité AF est donc maintenu : la forme 2,3-enediol, responsable du pouvoir anti-oxydant, peut toujours être adoptée par l'unité AF des **AFGOS**.

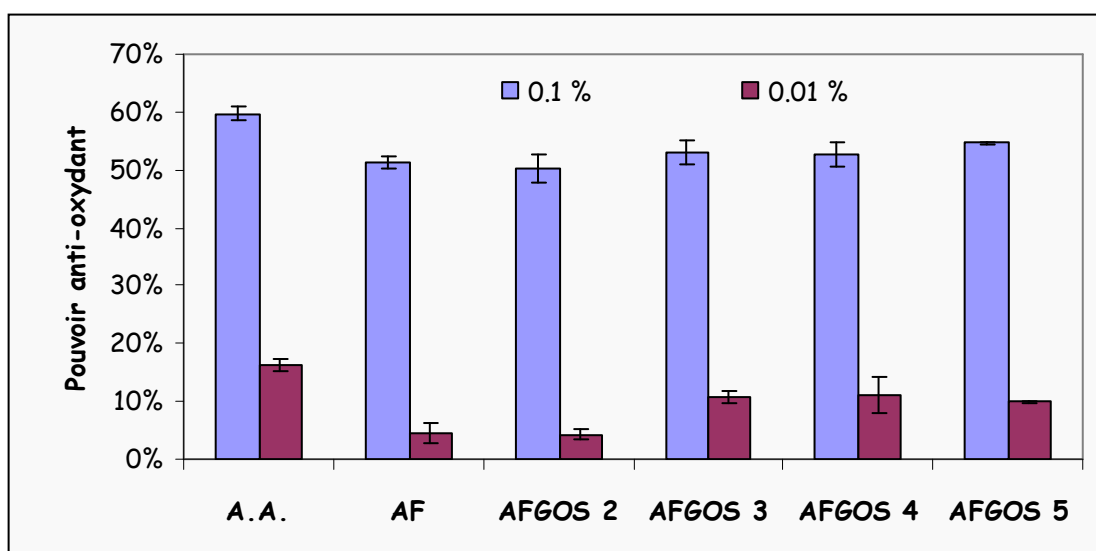


Figure 86 – Evaluation du pouvoir anti-oxydant de l'AF et des **AFGOS** par la méthode à l'acide thiobarbiturique, et comparaison à celui de l'acide ascorbique (A.A.) pris comme référence. Essais menés pour deux concentrations massiques en composé anti-oxydant : 0,1 % et 0,01 % (p/p) et le dosage du malonedialdéhyde est répété 5 fois.

Partie II. SYNTHÈSE DE DÉRIVÉS OXIMES DE L'AF ET ÉVALUATION DE LEUR

POUVOIR ACCEPTEUR

II.1. Objectifs de la dérivation en oxime

Le premier objectif de la dérivation en oxime est d'élargir la gamme des dérivés de l'AF. Ainsi, l'alkylhydroxylamine NH_2OR peut réagir sur les **AFGOS** avec formation d'une fonction oxime au niveau de l'AF située à l'extrémité réductrice. Une nouvelle classe de produits peuvent alors être synthétisés : les **AFGOS** oximes. Mais la synthèse de dérivés oximes présente également d'autres intérêts. Elle permet :

- de développer une réaction spécifique sur l'AF et les **AFGOS** ;
- de rendre l'AF et les **AFGOS** visibles en UV grâce à la fonction oxime qui absorbe à 207 nm ;

- de modifier la polarité des **AFGOS** par l'utilisation d'alkylhydroxylamine dont la chaîne alkyl est plus ou moins longue ;
- de mettre en œuvre une séparation de l'AF et des **AFGOS** des autres sucres présents dans le mélange final de glycosylation. En effet, il est envisageable de créer une liaison covalente de type imine avec une résine fonctionnelle de type amino $-NH_2$ et ainsi de retenir spécifiquement les **AFGOS**.

Cependant, ce dernier objectif a été vite abandonné : après fixation des **AFGOS** sur la résine, il s'est avéré que la liaison covalente formée était très difficile à rompre par hydrolyse acide.

Pour atteindre ces objectifs, des études ont donc d'abord été menées avec l'AF, puis appliquées aux **AFGOS**.

II.2. Etude de la dérivation de l'AF en oxime

II.2.1. Description de la réaction de dérivation de l'AF en oxime

L'AF est la seule molécule parmi les sucres composant le milieu réactionnel de glycosylation qui présente une fonction carbonyle non impliquée dans une fonction hémiacétal comme c'est le cas pour les autres sucres. Par conséquent, nous avons choisi de mettre en œuvre une réaction de dérivation spécifique de l'AF en agissant sur la fonction carbonyle.

La dérivation en oxime est basée sur la réaction entre le chlorhydrate d'alkylhydroxylamine $NH_2OR \cdot HCl$ et la fonction carbonyle de l'AF conduisant à la formation de l'AF oxime (**AFoxR**) qui possède une liaison oxime $=N-O-R$ absorbant à 207 nm (Figure 87). Trois groupes alkyls de polarités différentes ont été utilisés (-H, -Et et -Bn), en vue de les tester par la suite comme accepteurs des GS.

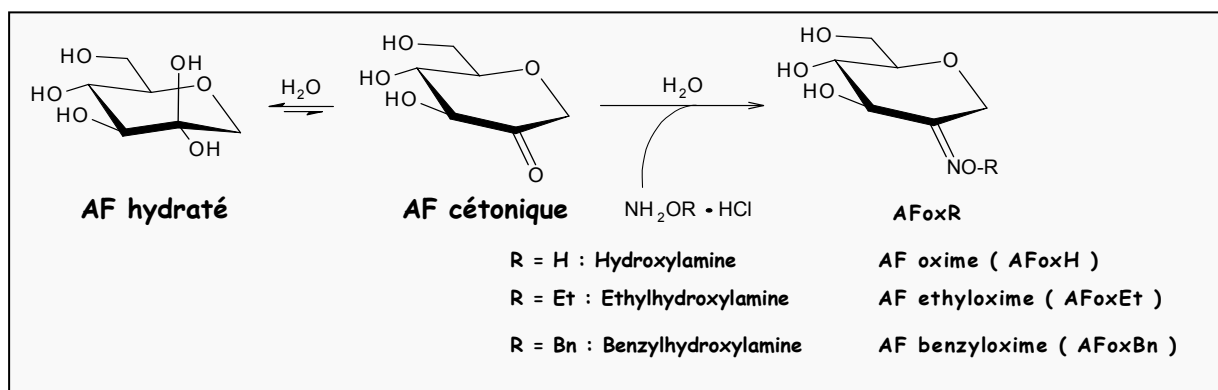


Figure 87 – Schéma réactionnel de la dérivation de l'AF en oxime.

La spécificité de la dérivation en oxime a été vérifiée en utilisant comme substrat le fructose, le glucose ou le saccharose (au lieu de l'AF). Nous avons montré par CLHP qu'aucun de ces sucres ne réagit avec les alkylhydroxylamines : la réaction est donc spécifique de l'AF dans les conditions décrites (c'est-à-dire à température ambiante).

En outre, au regard de la structure des AFoxR (Figure 87), la fonction carbonyle à l'origine de la forte réactivité avec le DNS a été substituée par une fonction oxime. Les AFoxR ne peuvent donc plus réagir avec le DNS à froid, ce que nous avons confirmé *a posteriori* sur les produits purifiés.

Ainsi, la méthode au DNS peut donc être utilisée pour doser l'AF n'ayant pas réagi lors de la dérivation en oxime, et donc calculer les rendements de la réaction.

Nous avons proposé d'effectuer la dérivation de l'AF dans des conditions réactionnelles les plus simples possibles : en phase aqueuse, et en présence d'AF et d'alkylhydroxylamine introduits dans des proportions stoechiométriques (à 63 mM).

Dans ces conditions, nous avons obtenu de bons rendements indiqués dans le Tableau 29. Cependant, rappelons que le réactif utilisé est le chlorohydrate d'alkylhydroxylamine $\text{NH}_2\text{OR}\cdot\text{HCl}$, la présence de HCl conjointement à l'hydroxylamine permettant de stabiliser le produit commercial. La présence de cet acide fort conduit ainsi à une forte acidification du milieu réactionnel puisque le pH mesuré est de 1,6 (pour une concentration de 63 mM). Or, cette réaction de dérivation s'apparente à une amidation acido-catalysée. Cette réaction n'est pas optimale en milieu trop acide à cause de la protonation de l'amine (ou alkylhydroxylamine), dont la réactivité diminue alors fortement : la réaction doit être effectuée en milieu légèrement acide.

Nous avons donc étudié l'influence du pH sur le rendement de la dérivation.

Tableau 29 – Rendement de dérivation de l'AF en oxime, en présence de différents alkylhydroxylamine pour un pH proche de 1,6.

Alkylhydroxylamine	NH_2OH	NH_2OEt	NH_2OBn
Rendement	97,6 %	61,7 %	81,9 %

II.2.2. Optimisation de la synthèse d'AF oxime

La Figure 88 montre l'influence du pH sur le rendement de la dérivation de l'AF en oxime. Le pH du milieu réactionnel a été ajusté à l'aide d'une solution d'acétate de sodium.

Pour atteindre le rendement maximal, il faut se placer à un pH voisin de 4,8. Dans les conditions développées dans cette étude, nous obtenons des rendements quantitatifs pour l'AF oxime (AFoxH) et l'AF éthyloxime (AFoxEt) (supérieurs à 99,5 % et 99,9 % respectivement), et très corrects pour l'AF benzyloxime (AFoxBn) (plus de 94 %) (Figure 88).

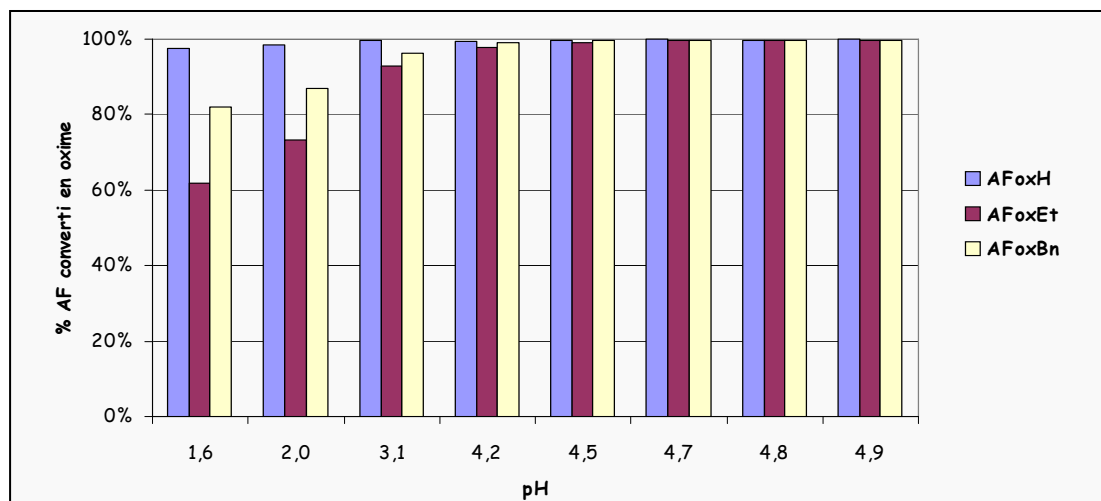


Figure 88 – Rendement de la réaction de dérivation de l'AF en oxime en fonction du pH.

Cette dérivation de l'AF est déjà décrite dans la littérature par ANDERSEN et coll. [ANDERSEN, S.M. et coll., 2000], mais elle est réalisée en milieu organique et les rendements obtenus sont respectivement de 66 et 91 % pour l'AFoxH et l'AFoxBn [ANDERSEN, S.M. et coll., 2000]. Nous avons donc amélioré l'efficacité de conversion de l'AF en oxime.

De plus, la synthèse que nous avons développée est plus propre et plus simple que celle d'ANDERSEN et coll. [ANDERSEN, S.M. et coll., 2000]. En effet, leur protocole préconise d'éliminer au préalable HCl par précipitation à la potasse, puis de dériver l'AF sous balayage d'azote dans l'éthanol. Comparativement, la synthèse que nous proposons consiste seulement à mélanger les deux réactifs dans des proportions stoechiométriques dans de l'eau tamponnée à pH 4,8.

Pour chacune des réactions, la cinétique de formation du dérivé AF oxime a été suivie. On note que la cinétique augmente avec le pH (Figure 89). Ainsi, pour un pH de 4,8, les trois produits sont synthétisés rapidement: 20 min pour l'AFoxH, moins de 60 min pour l'AFoxEt et l'AFoxBn.

Là aussi, cette voie de synthèse se démarque de celle d'ANDERSEN et coll. [ANDERSEN, S.M. et coll., 2000] dont le protocole préconise de laisser la réaction se dérouler sur une nuit.

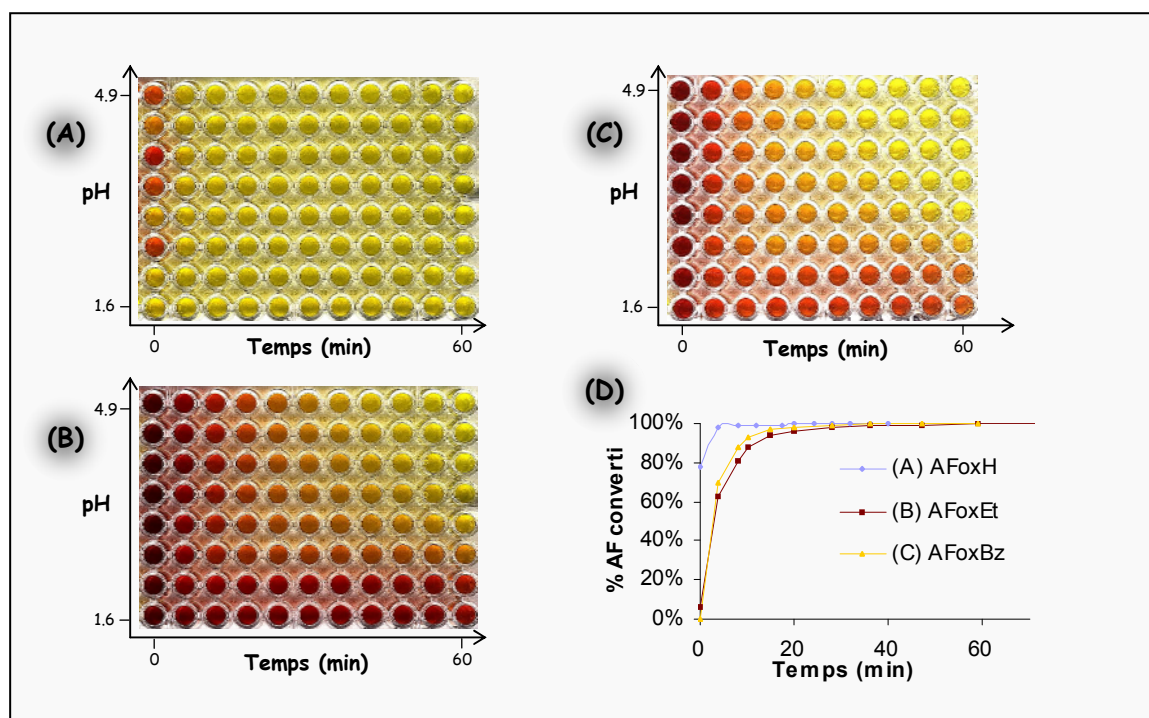


Figure 89 – Influence du pH sur la cinétique de formation de (A) l'AF oxime **AFoxH**, (B) l'AF éthylloxime **AFoxEt** et (C) l'AF benzyloxime **AFoxBn**. L'AF résiduel est dosé par la méthode au DNS (coloration rouge qui s'intensifie avec la quantité d'AF). (D) Cinétique de formation des trois dérivés à pH = 4,8.

II.2.3. Isolement des dérivés AF oxime

Bien que la dérivation en oxime soit quantitative, l'étude CLHP des milieux finaux montre qu'il est nécessaire d'éliminer des produits faiblement retenus sur colonne C18 pour isoler les dérivés oximes (Figure 90). Ces produits sont vraisemblablement de l'AF n'ayant pas réagi, les sels d'acétate de sodium, et l'alkylhydroxylamine (en réalité introduit en très léger excès par rapport à l'AF).

Le greffage de chaînes alkyles de différentes tailles (-H, -Et ou -Bn) confère aux molécules d'AF alkyloxime des polarités distinctes. Ces différences peuvent être mises en évidence par CLHP sur colonne C18 avec de l'eau ultra pure comme éluant. L'injection des milieux réactionnels finaux montre ainsi une augmentation de l'apolarité entre l'**AFoxH**, proche de celle de l'AF, l'**AFoxEt**, et enfin l'**AFoxBn** qui reste lié à la phase stationnaire à cause de sa forte hydrophobicité (Figure 90).

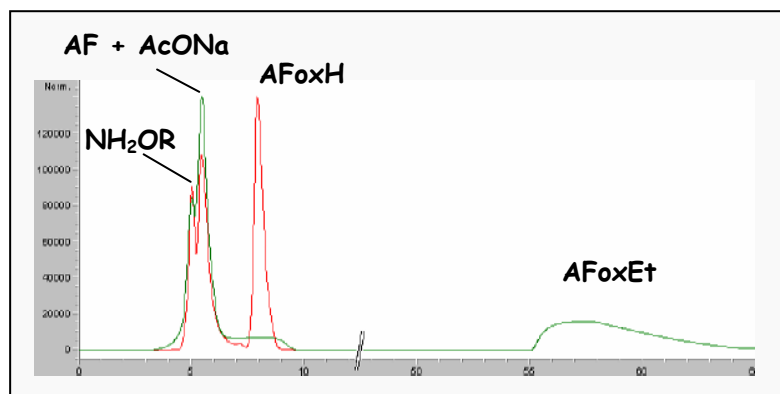


Figure 90 – Profil d'élution des dérivés oximes de l'AF sur colonne C18. Plus le composé est apolaire, plus il est retenu.

Paramètres CLHP : colonne C18, eau ultra-pure à 0,5 mL/min, détection par réfractométrie.

Différents procédés de purification doivent donc être mis en œuvre pour séparer les dérivés oximes de l'AF :

- l'AFoxH ayant un caractère polaire proche de l'AF seule la CLHP préparative est adaptée pour effectuer une telle séparation ;
- les dérivés AfoxEt et AfoxBn étant plus hydrophobes ont été séparés par chromatographie sur colonne de gel de silice.

II.2.3.1. Purification de l'AF oxime par CLHP préparative

La purification a été effectuée sur colonne préparative en phase inverse (phase de type C18 identique à celle utilisée en analytique). L'AF oxime AfoxH est obtenu avec une pureté de 92 % (Figure 91).

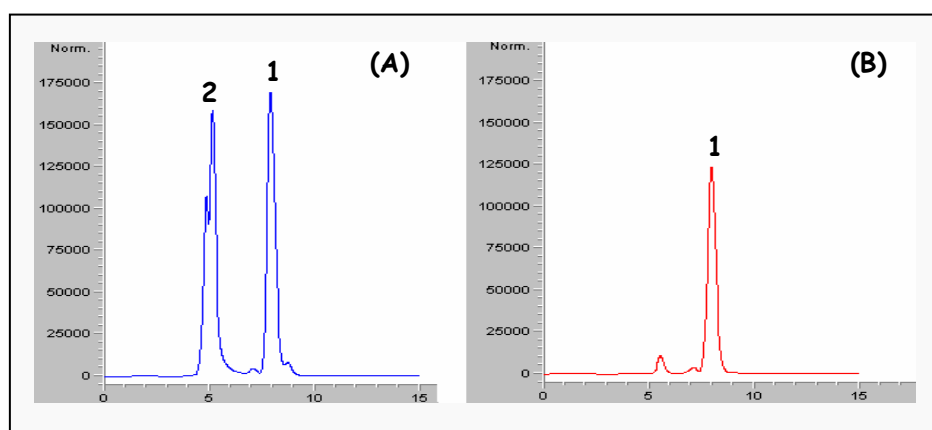


Figure 91 – Analyse par CLHP (A) du milieu réactionnel final de dérivaison de l'AF en oxime et (B) de l'AFoxH purifié.

Paramètres CLHP : colonne C18, eau ultra pure 0,5 mL/min, détection par réfractométrie.

Identification des pics : 1 : AfoxH, 2 : acétate de sodium et hydroxylamine.

La CLHP préparative permet donc d'isoler efficacement l'**AFoxH**, mais nous aurions également pu l'obtenir par des étapes de recristallisations successives (particulièrement pour des grandes quantités d'**AFoxH**), comme décrits par ANDERSEN et coll. [ANDERSEN, S.M. et coll., 2000].

II.2.3.2. Purification de l'AF éthyloxy et benzyloxy par chromatographie sur colonne de gel de silice

Pour l'**AFoxEt** et l'**AFoxBn**, nous avons envisagé leur purification par chromatographie sur colonne de gel de silice. La qualité de la séparation a été suivie par chromatographie sur couche mince (CCM), avec révélation sous UV à 254 nm puisque les deux dérivés oxime (et plus particulièrement l'AF benzyloxy) absorbent à cette longueur d'onde.

II.2.3.2.a. Purification de l'AF benzyloxy

Nous avons d'abord démontré par CCM (Figure 92) que la phase mobile hexane/acétate d'éthyle 1/2 (V/V) permet de séparer l'AF benzyloxy ($R_f = 0,16$) de l'*O*-benzylhydroxylamine ($R_f = 0$). La CCM met en évidence la présence d'une impureté ($R_f = 0,8$) que nous n'avons pas caractérisée. Elle permet aussi de visualiser l'influence du pH sur le rendement de la réaction de dérivation : pour la piste ① (pH = 1,5), la conversion n'est pas complète : il reste de l'*O*-benzylhydroxylamine sur la ligne de dépôt. A l'inverse, sur la piste ④ (pH = 4,8), la tache de l'AF benzyloxy est intense, alors que celle de l'*O*-benzylhydroxylamine est à peine visible.

Lors de la production d'AF benzyloxy **AFoxBn**, un précipité blanc est apparu quelques minutes après l'ajout d'AF au mélange *O*-benzylhydroxylamine/acétate de sodium. Après concentration du milieu réactionnel, le précipité a été recueilli par filtration, et la CCM a confirmé qu'il correspond à de l'AF benzyloxy pur ($R_f = 0,16$). La précipitation spontanée de l'**AFoxBn** est une preuve de sa faible solubilité dans l'eau. Cette propriété est due à son apolarité élevée liée à la présence d'un groupe benzyle dans la molécule.

Cependant, la phase aqueuse n'est pas épuisée en AF benzyloxy comme le démontre la CCM. Nous avons donc procédé à une purification en deux temps sur colonne de silice : étape 1 - élimination de l'impureté avec le mélange hexane/acétate d'éthyle 1/2 (V/V) solvant avec lequel l'**AFoxBn** n'est pas entraîné (Figure 92), puis (2) récupération de l'AF benzyloxy par élution à l'acétate d'éthyle pur.



Figure 92 – Analyse sur chromatographie sur couche mince des milieux finaux de dérivation de l'AF en AFoxBn benzyloxime à différents pH.

Phase mobile : hexane/acétate d'éthyle 1/2 (V/V).

Révélation : UV 254 nm.

Pistes : ① : pH = 1,4; ② : pH = 2,2 ③ : pH = 4,2; ④ : pH = 4,8

Par ces deux méthodes, nous avons produit de l'AFoxBn pur à 97 %.

II.2.3.2.b. Purification de l'AF éthyloxime

L'optimisation des conditions de séparation pour l'AFoxEt a montré que l'acétate d'éthyle pur est la meilleure phase mobile pour la CCM (Figure 93-A). De la même façon que pour l'AF benzyloxime, le dépôt sur CCM des réactions de dérivation effectuées à différents pH permet de visualiser le rendement de la conversion en fonction du pH, une valeur de 4,8 étant optimale. Pareillement, la présence d'impuretés pour des Rf de 0,75 et 0,68 est mise en évidence.

La purification a donc été réalisée sur colonne de silice, avec de l'acétate d'éthyle pur comme éluant, pour obtenir l'AF éthyloxime pur à 95 % (Figure 93-B et Figure 94).

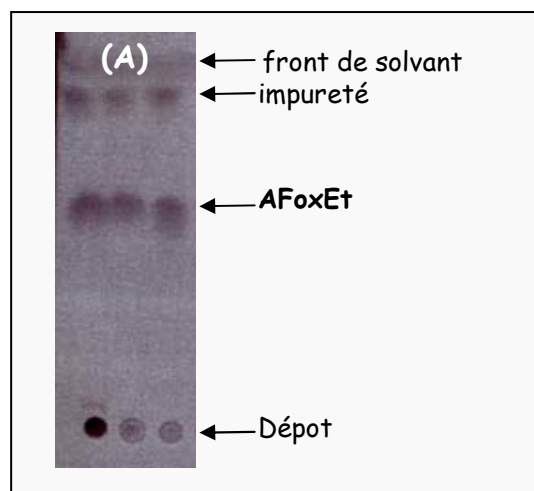


Figure 93 - Analyse sur CCM mince (A) des milieux finaux de dérivation de l'AF en AFoxEt à différents pH et (B) de l'AFoxEt après purification.

Phase mobile : acétate d'éthyle pur.

Révélation : sous UV 254 nm.

Pistes : ① : pH = 1,5 ; ② : pH = 2,5 ; ③ : pH = 4,7.

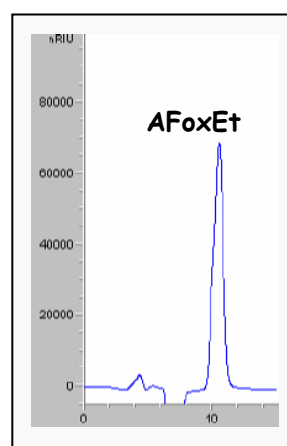


Figure 94 – Evaluation de la pureté de l'AFoxEt par CLHP.

Paramètre CLHP : colonne C18, eau/acétonitrile 90/10 (v/v) à 0,5 mL/min, détection par réfractométrie

II.2.4. Caractérisation structurale des dérivés AF oxime

II.2.4.1. Confirmation de la structure par RMN

La structure des AF alkyloximes a été déterminée par des analyses RMN du ^1H , ^{13}C et les séquences HSQC et HMBC. Sur les spectres ^1H et ^{13}C , on retrouve tous les déplacements chimiques de l'AF. Seul le carbone C2 montre un fort déblindage (de 93 à 160 ppm) (Tableau 30), preuve de son implication dans une liaison de type oxime. Des carbones supplémentaires sont mis en évidence sur le spectre ^{13}C : ils correspondent aux chaînes éthyle ou benzyle. Ces analyses structurales permettent de confirmer la structure des AF alkyl oximes donnée en Figure 95.

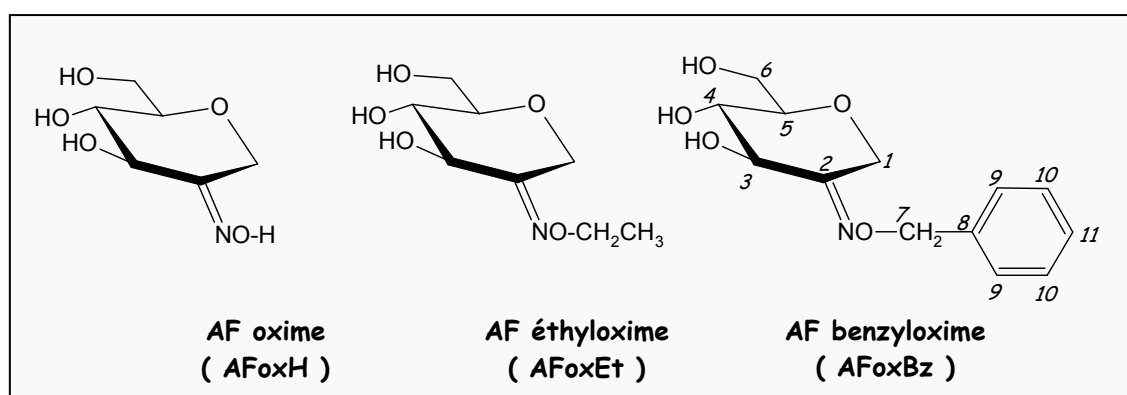


Figure 95 – Structure des dérivés alkyloximes de l'AF.

Tableau 30 – Déplacements chimiques (δ) du proton et du carbone des dérivés alkyloximes de l'AF.

Molecule	δ (ppm)	1		2	3	4	5	6		7	8	9	10	11
		1a	1b					6a	6b					
AF	^{13}C	71,9		92,8	77,1	69,2	80,8		61,4					
	^1H	3,36	3,66	-	3,46	3,34	3,31		3,58	3,80				
AF oxime	^{13}C	60,8		155,9	72,7	72,0	80,2		61,2					
	^1H	5,03	3,87	-	4,24	3,47	3,44		3,82	3,64				
AF oxime éthyl	^{13}C	61,4		155,9	72,7	72,0	80,2		61,2	13,8	70,3			
	^1H	4,98	3,86	-	4,24	3,46	3,42		3,81	3,63	4,07	1,16		
AF oxime benzyl	^{13}C	60,7		157,6	72,9	72,3	82,1		62,3	75,8	138,5	128,4	128,5	129,0
	^1H	4,80	3,92	-	4,02 (t)	3,37	3,20		3,63	3,46	5,08	-	7,35	7,35

II.2.4.2. Analyses cristallographiques par diffraction aux rayons X

La structure tridimensionnelle des dérivés alkyloximes de l'**AF** a pu être déterminée par des analyses de cristallographie par diffraction aux rayons X grâce à l'obtention de cristaux de l'**AFoxH** et de l'**AFoxEt**. Concernant l'**AFoxBn**, de multiples essais ont été réalisés (méthanol, acétate d'éthyle, toluène, benzène, ...) sans réussir à obtenir de cristaux.

L'**AFoxEt** purifié a spontanément cristallisé lors de l'évaporation de l'acétate d'éthyle. Des cristaux aciculaires (Figure 96) ont été obtenus, et l'étude cristallographique a révélé une structure triclinique avec une résolution de 0,7 Å du cristal. La maille constitutive est composée de deux molécules d'**AFoxEt** et d'une molécule d'eau (Figure 97).



Figure 96 - Cristaux aciculaires d'**AFoxEt**.

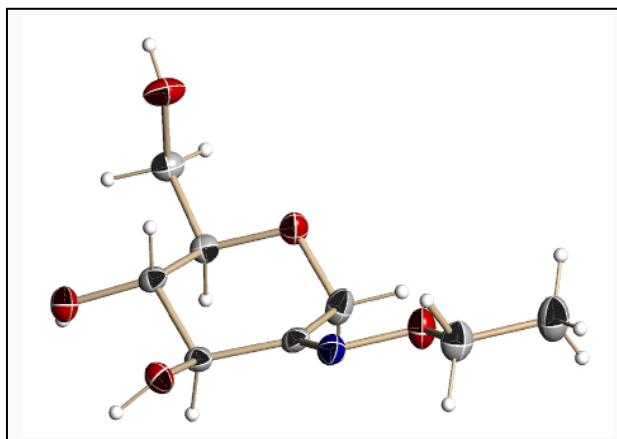


Figure 97 - Représentation de deux molécules d'**AFoxEt** et d'une molécule d'eau permettant le maintien du réseau.

De la même façon, des cristaux d'**AFoxH** ont été obtenus par évaporation lente d'une solution concentrée dans le méthanol. Le système cristallin est de type orthorhombique (résolution de 0.7 Å). La structure spatiale de l'**AFoxH** est présentée sur la Figure 98.

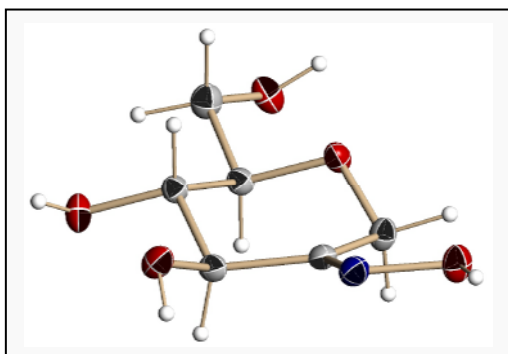


Figure 98 – Représentation de la structure tridimensionnelle de l'**AFoxH**.

II.2.5. Etude de la spécificité de la dérivation en oxime

La réaction de dérivation en oxime a également été mise en œuvre en présence des principaux sucres rencontrés lors de la réaction de glycosylation, à savoir le fructose, le glucose et le saccharose.

Dans les mêmes conditions que celles décrites dans le cas de l'**AF**, nous n'avons observé aucune consommation du fructose, glucose ou saccharose en présence d'un quelconque réactif alkylhydroxylamine. Ceci démontre donc que la dérivation en oxime est spécifique de la molécule d'**AF**.

II.3. Dérivation en oxime des AFGOS

Nous avons démontré dans les paragraphes précédents la conversion quantitative de l'**AF** en différents dérivés oximes. Mais qu'en est-il de la dérivation en oxime d'un mélange d'**AFGOS** ? On peut avancer l'hypothèse que la fonction carbonyle étant toujours libre, la dérivation des **AFGOS** en oxime est possible. C'est ce que nous nous proposons de vérifier dans ce paragraphe.

II.3.1. Dérivation des AFGOS avec l'hydroxylamine

Les conditions de dérivation des **AFGOS** sont identiques à celles utilisées pour l'**AF**. Après s'être placé à un pH de 4,8, l'hydroxylamine est introduite dans des proportions équimolaires au nombre de molécules possédant une unité **AF** (on parlera d'équivalents **AF**). La réaction de dérivation des **AFGOS** a été effectuée directement sur le mélange final de glycosylation. Les **AFGOS** réagissant avec le DNS, nous avons calculé le rendement de la réaction de dérivation de l'**AF** et des **AFGOS** en oximes par dosage au DNS.

Comme le montre le Tableau 31, la dérivation en oxime des **AFGOS** est quantitative. L'**AF** et tous les **AFGOS** ont été convertis en oxime.

Tableau 31 – Evaluation du rendement de la conversion de l'**AF** et de différentes familles d'**AFGOS** en oximes par la méthode au DNS.

Famille d' AFGOS synthétisée en présence de :	Rendement de dérivation des AFGOS (%)
DSR de <i>L. mesenteroides</i> B-512F	98,8
DSR de <i>L. mesenteroides</i> B-1299	98,8
ASR de <i>L. mesenteroides</i> B-1355	98,5
AS de <i>N. polysaccharea</i>	99,8

Sur les profils chromatographiques obtenus par CLHP sur colonne C18, il est facile d'identifier les pics correspondant aux dérivés oxime des **AFGOS** (appelés **AFGOSoxH**). En effet, la présence d'une fonction oxime sur la molécule conduit à une légère augmentation du temps de rétention des dérivés **AFGOSoxH** (Figure 99). Notons cependant que l'augmentation du temps de rétention s'accroît avec le degré de polymérisation. Enfin, il est important de remarquer que suite à la dérivation en oxime, il y a disparition complète des pics correspondant aux **AFGOS** (avant dérivation) ce qui est cohérent avec les rendements du Tableau 31.

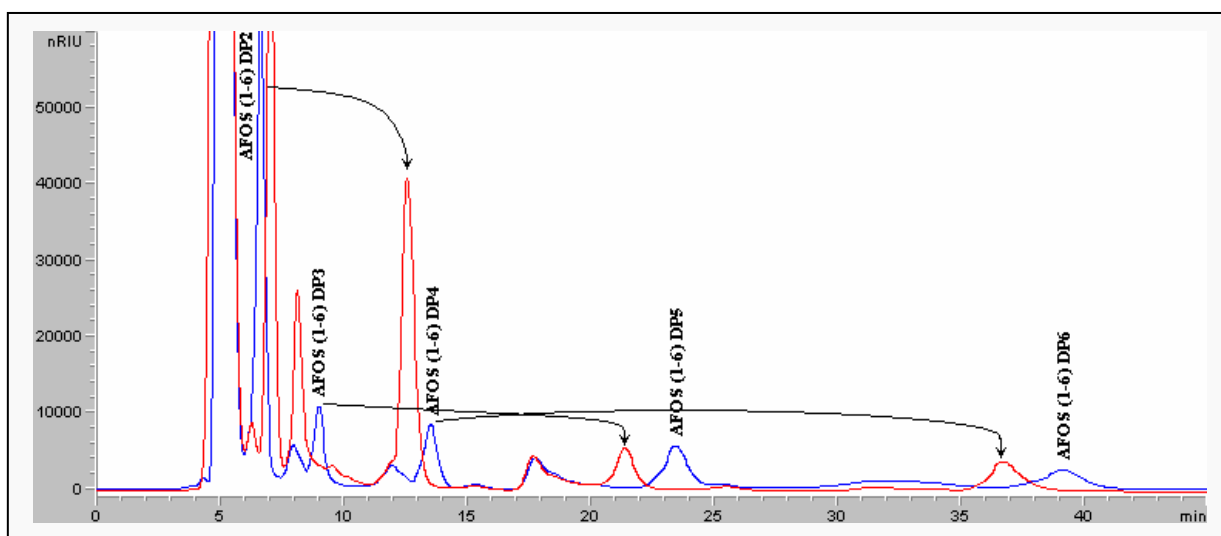


Figure 99 – Augmentation des temps de rétention par dérivation en oxime des **AFGOS** synthétisés par glucosylation de l'**AF** en présence de la DSR de *L. mesenteroides* B-512F.

Conditions CLHP : colonne C18, eau ultra-pure 0,5 mL/min, détection par réfractométrie.

Identification des chromatogrammes : en bleu : avant dérivation, en rouge : après dérivation.

Les profils chromatographiques obtenus suite à la dérivation en oxime **AFGOS** obtenus avec la DSR de *L. mesenteroides* B-1299 ou l'ASR de *L. mesenteroides* B-1355 montrent que les régio-isomères sont également dérivés en oximes (Figure 100).

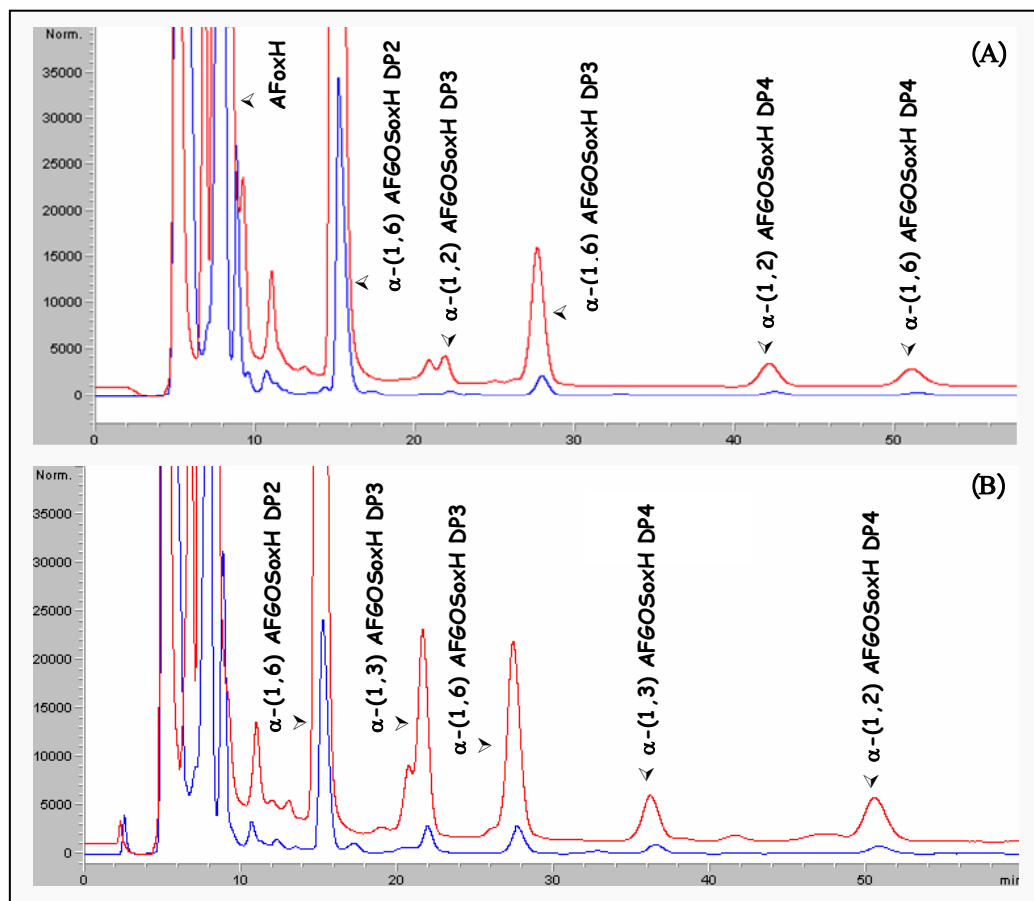


Figure 100 – Comparaison des profils chromatographiques avant et après dérivation en oxime des **AFGOS** synthétisés par glycosylation de l'**AF** en présence (A) de la DSR de *L. mesenteroides* B-1299, et (B) de l'ASR de *L. mesenteroides* B-1355.

Paramètres CLHP : colonne C18, eau ultra-pure 0,5 mL/min, détection par réfractométrie.

Identification des spectres : en rouge : UV à 207 nm, en bleu : RI.

Ainsi, nous sommes à présent en mesure de produire une nouvelle classe de dérivés de l'**AF** avec des rendements quantitatifs : ce sont des **AFGOS** possédant une fonction oxime sur le carbone C2 de l'unité **AF**.

II.3.2. Dérivation des AFGOS avec le *O*-éthylhydroxylamine

La dérivation en éthyloxime des **AFGOS** va conduire à une augmentation de l'hydrophobicité des produits obtenus (appelés **AFGOSoxEt**), comme c'est le cas pour l'**AF** (voir Figure 90 pour rappel) : les **AFGOSoxEt** auront donc une forte affinité pour la phase stationnaire de type C18. C'est pourquoi, dans ce cas précis, nous avons augmenté l'apolarité de la phase mobile en utilisant un mélange eau/acétonitrile 90/10 (V/V) afin d'augmenter la force d'éluion des **AFGOSoxEt**. Les profils chromatographiques obtenus sont présentés sur la Figure 101.

Très curieusement, ils montrent que l'utilisation d'un tel solvant à la place de l'eau inverse l'ordre d'éluion des **AFGOSoxEt** : l'**AFoxEt** est le dernier composé élué (Tr de 9 min), tandis que les **AFGOSoxEt** ont des temps de rétention plus courts (entre 5 et 8 min). En effet, la détection UV à 207 nm met en évidence la présence de composés absorbant à 207 nm (qui ne peuvent être que des **AFGOSoxEt**) en amont de l'**AFoxEt**. De ce fait, il est impossible de comparer ces profils à ceux avant dérivation, et donc de conclure quant à la nature des produits obtenus après dérivation en éthyloxime. Cependant, suite aux résultats du paragraphe précédent, il est fortement probable que nous obtenons dans ce cas des **AFGOS** sur lesquels une fonction éthyloxime a été greffée sur le carbone C2.

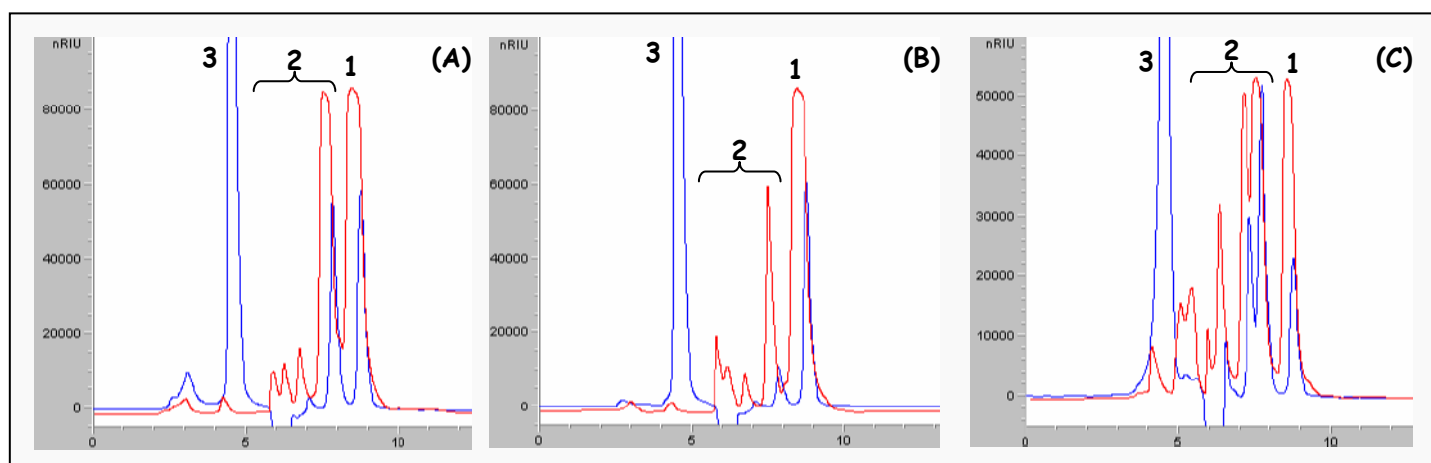


Figure 101 – Profils chromatographiques obtenus après dérivation en éthyloxime des **AFGOS** synthétisés par glucosylation de l'**AF** avec (A) la DSR de *L. mesenteroides* B-512F, (B) la DSR de *L. mesenteroides* B-1299, (C) l'AS de *N. polysacchara*.

Paramètres CLHP : colonne C18, eau/acétonitrile 90/10 (V/V) 0,5 mL/min.

Identification des pics : 1 : **AFoxEt**, 2 : **AFGOSoxEt**, 3 : fructose, glucose, saccharose.

Mode de détection : en bleu : par réfractométrie, en rouge : UV à 207 nm.

II.3.3. Dérivation des AFGOS avec le *O*-benzylhydroxylamine

La dérivation de l'**AF** en **AF** benzyloxime (**AFoxBn**) rend la molécule si apolaire qu'elle reste fixée sur la phase stationnaire de la colonne C18. L'apolarité des **AFGOS** étant supérieure à celle de l'**AF** (l'apolarité augmente avec le DP), les dérivés benzyloximes des **AFGOS** (appelés **AFGOSoxBn**) seront eux aussi très fortement retenus sur la colonne C18 avec de l'eau comme éluant.

La dérivation en benzyloxime est donc un moyen de mettre en évidence sur un chromatogramme les pics correspondant à des produits portant une fonction carbonyle libre. Dans notre étude, seuls l'**AF** et les **AFGOS** satisfont à cette condition. Ainsi, la dérivation en

benzyloxime permet de masquer les **AFGOS** (alors convertis en benzyloxime) et de ne conserver sur le chromatogramme que les pics des oligosaccharides ne possédant pas de résidus **AF** (sauf si le résidu **AF** est glucosylé sur le carbone C2, mais nous n'avons pas obtenu de tels produits à ce jour).

A titre d'illustration, la Figure 102 montre qu'après dérivation avec NH_2OBn , seuls les pics correspondant aux **AFGOS** ont disparu, tandis que ceux attribués aux IMOS (voir paragraphe II.3 du chapitre A) sont toujours présents.

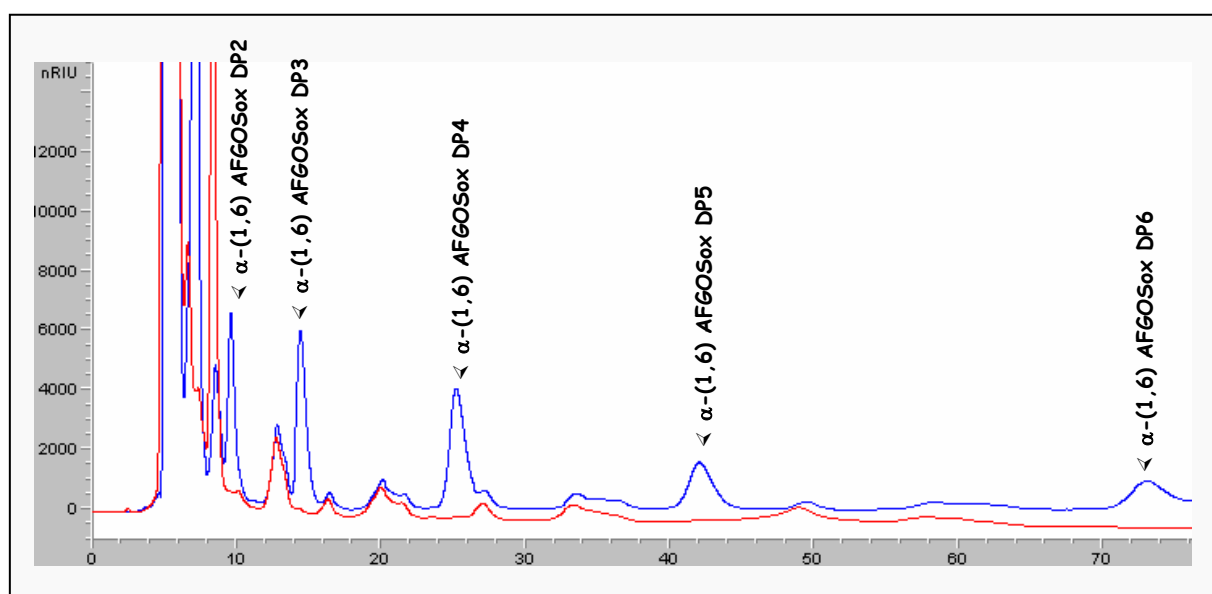


Figure 102 – Dérivation en benzyloxime des **AFGOS** synthétisés par glucosylation de l'**AF** en présence de la DSR de *L. mesenteroides* B-512F : cette dérivation permet de ne conserver que les oligosaccharides ne comportant pas de résidu **AF** à savoir les IMOS.

Paramètres CLHP : colonne C18, eau ultra-pure 0,5 mL/min, détection par réfractométrie.

Identification des spectres : en bleu : avant dérivation, en rouge : après dérivation avec NH_2OBn .

Nous avons donc réalisé cette dérivation en benzyloxime sur le mélange d'**AFGOS** synthétisés en présence de l'AS de *N. polysaccharea*. En effet, nous n'avons à ce jour pas réussi à isoler tous les produits composant le milieu réactionnel final et supposés être des produits de glucosylation.

Après dérivation en benzyloxime des produits de glucosylation, l'étude du profil chromatographique obtenu par CLHP sur colonne C18 (Figure 103) montre que tous les pics de temps de rétention supérieur à 10 min ont disparu. Ceci démontre donc que les composés correspondant sont tous des dérivés glucosylés de l'**AF**.

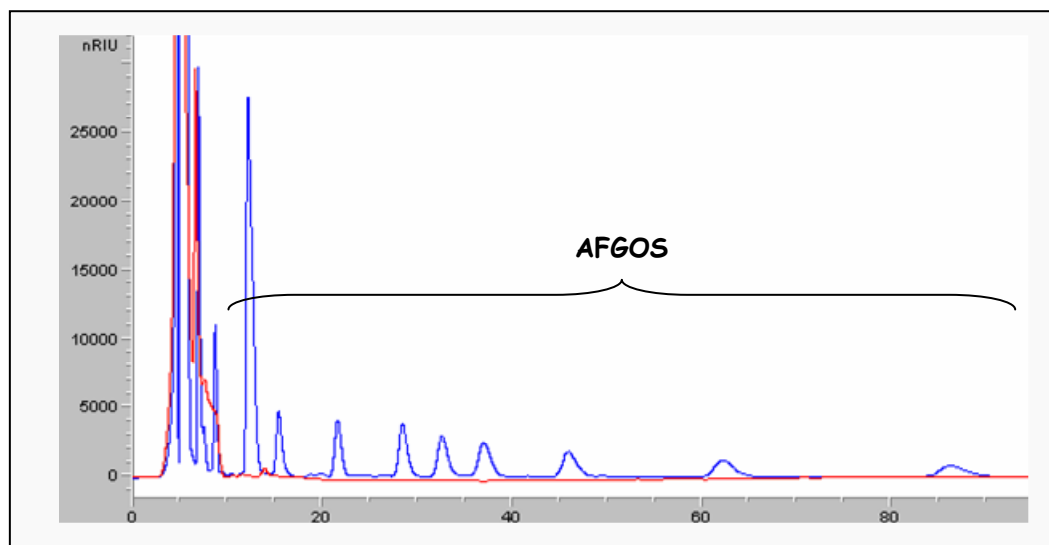


Figure 103 – Comparaison des profils chromatographiques avant et après dérivatisation en benzyloxime des **AFGOS** synthétisés par glucosylation de l'**AF** en présence de l'AS de *N. polysaccharea*.

Paramètres CLPH : colonne C18, eau ultra-pure 0,5 mL/min, détection réfractométrique.

Identification des spectres : en bleu : avant dérivatisation en benzyloxime, en rouge : après dérivatisation.

II.4. Etude du pouvoir accepteur des dérivés oximes

Seuls l'**AFoxH** et l'**AFoxEt** ont été testés comme accepteurs des GS, l'**AFoxBn** étant trop peu soluble en phase aqueuse.

La glucosylation de ces dérivés alkyloximes a été réalisée dans les mêmes conditions de référence que celles utilisées pour l'**AF**, soit une concentration molaire de 0,29 M identique pour l'accepteur et le saccharose (rapport S/A=1). Trois GS ont été utilisées : la DSR de *L. mesenteroides* B-512F, la DSR de *L. mesenteroides* B-1299 et l'AS de *N. polysaccharea*.

II.4.1. Influence de la chaîne alkyle sur l'efficacité de glucosylation

II.4.1.1. Comparaison du pouvoir accepteur sur la base des taux de conversion

Les résultats sont rassemblés dans le Tableau 32. Ils montrent clairement l'influence de la structure de l'accepteur sur l'efficacité de glucosylation.

Ainsi, pour la DSR de *L. mesenteroides* B-512F, l'**AF** est l'accepteur le moins efficace. Pour la DSR de *L. mesenteroides* B-1299, la présence d'une fonction oxime sur le carbone C2 diminue le taux de conversion d'autant plus que la chaîne alkyle est longue. Par contre, avec l'AS de *N. polysaccharea*, l'utilisation d'**AFoxEt** permet de multiplier le taux de conversion quasiment par un facteur trois, ce qui est remarquable. Obtenir de tels taux de conversion dans

les conditions de référence laisse présager de très bons résultats en augmentant le rapport molaire saccharose/accepteur.

Tableau 32 – Taux de conversion (en %) obtenus lors de la glucosylation de l'**AFoxH** et de l'**AFoxEt** en présence de saccharose et de trois GS de spécificités différentes.

Souche	Glucane-saccharase	AF	AFoxH	AFoxEt
<i>L. mesenteroides</i> B-512F	DSR	26,0	38,2	30,2
<i>L. mesenteroides</i> B-1299	DSR	27,6	17,8	4,9
<i>N. polysaccharea</i>	AS	24,0	52,8	67,1

Ces résultats montrent en outre que la dérivation en oxime n'est pas favorable dans tous les cas à la glucosylation, et que chaque GS réagit différemment en fonction de sa spécificité.

Pour identifier les facteurs moléculaires et structuraux responsables de ces phénomènes, il est indispensable de procéder à une analyse structurale de l'arrimage de l'accepteur dans le site actif de chacune des enzymes. Or, la seule GS de structure résolue étant l'AS de *N. polysaccharea*, nous avons tenté d'expliquer les faits expérimentaux en modélisant l'arrimage des 3 molécules d'**AF**, d'**AFoxH** et d'**AFoxEt** dans le site actif de cette enzyme.

II.4.1.2. Interprétation des résultats expérimentaux par modélisation moléculaire.

La démarche suivie repose sur l'étude du positionnement du produit de monoglucosylation de l'**AF**, de l'**AFoxH** et de l'**AFoxEt** à l'intérieur du site actif de l'AS de *N. polysaccharea*.

Pour construire le dérivé monoglucosylé, nous avons utilisé la structure du complexe maltoheptaose:AS obtenu par co-cristallisation d'un mutant inactif de l'amylosaccharase (E328Q) en présence de maltoheptaose. Nous avons alors superposé l'accepteur au résidu glucosyle du sous-site +1 et formé la liaison glucosidique α -(1,4) avec le résidu glucosyle du sous site -1 (unité glucosyle transférée) (Figure 104). L'ensemble a alors été minimisé par l'algorithme steepest descent.

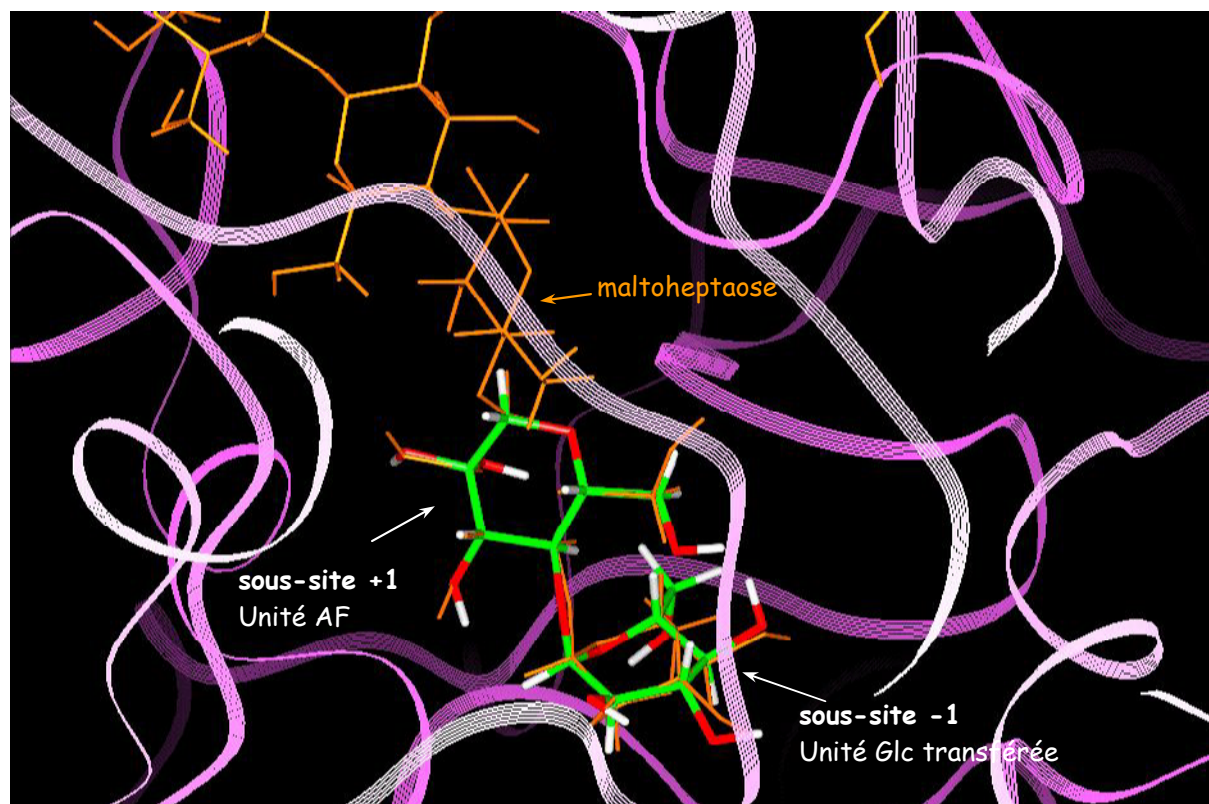


Figure 104 – Démarche suivie pour la construction des dérivés monoglucosylés de l'**AF**, de l'**AFoxH** et de l'**AFoxEt**.

L'accepteur a été superposé au résidu glucosyle du maltoheptaose placé dans le sous site +1, puis la liaison α -(1,4) a été formée avec le résidu glucosyl (unité transférée sur l'accepteur) du sous site -1.

Les constructions terminées, des procédures de minimisation ont permis de comparer les modèles afin de donner une explication aux résultats expérimentaux. Les comparaisons ont été effectuées sur la base des interactions (hydrophobes, hydrogène, gêne stérique) existantes entre le produit monoglucosylé et les acides aminés tapissant le site actif de l'enzyme.

Le nombre de liaisons hydrogène entre les dérivés monoglucosylés et l'enzyme ne diffère pas de façon significative : ce facteur ne permet donc pas d'expliquer les observations expérimentales (Figure 105).

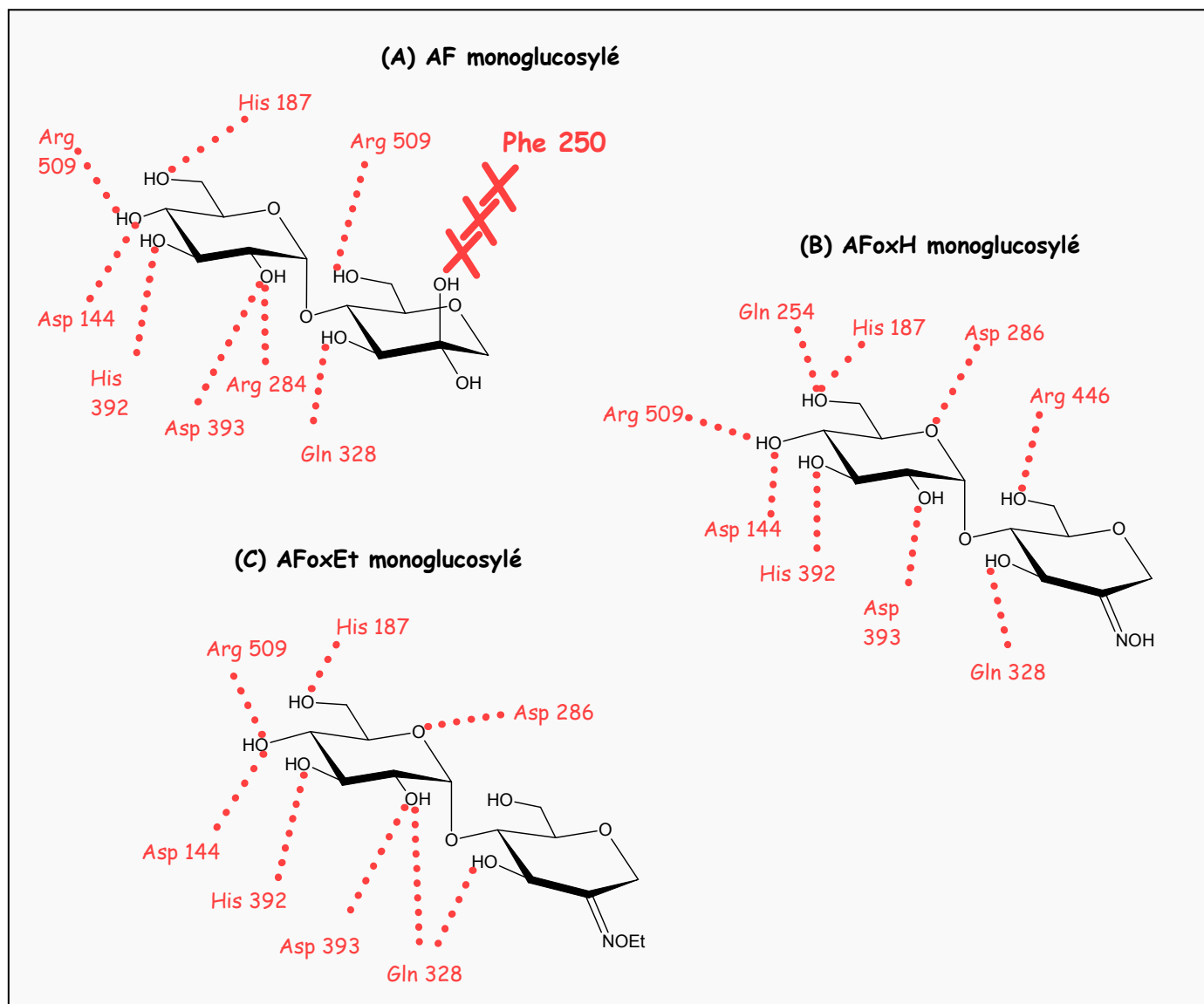


Figure 105 – Ensemble des liaisons hydrogènes présentes après minimisation d'énergie des dérivés monoglucosylés de (A) l'**AF**, (B) l'**AF** oxime, (C) l'**AF** éthyloxime à l'intérieur du site actif de l'AS de *N. polysaccharaea*.

Par contre, d'un point de vue stérique, on constate qu'un conflit est présent dans le cas de l'**AF** glucosylé, mais absent pour les dérivés oximes. En effet, le carbone C2 de l'**AF** hydraté est hybridé sp^3 , et sp^2 pour les dérivés oximes (carbone engagé dans une double liaison avec l'azote). De ce fait, la fonction hydroxyle portée par le C2 de l'**AF** en position axiale est en conflit stérique avec l'acide aminé phénylalanine 250 (Figure 105-A et Figure 106-A).

Cet effet déstabilisant n'est pas observé pour les dérivés oximes monoglucosylés (Figure 106-A), ce qui pourrait expliquer pourquoi de meilleurs taux de conversion sont obtenus avec ces accepteurs.

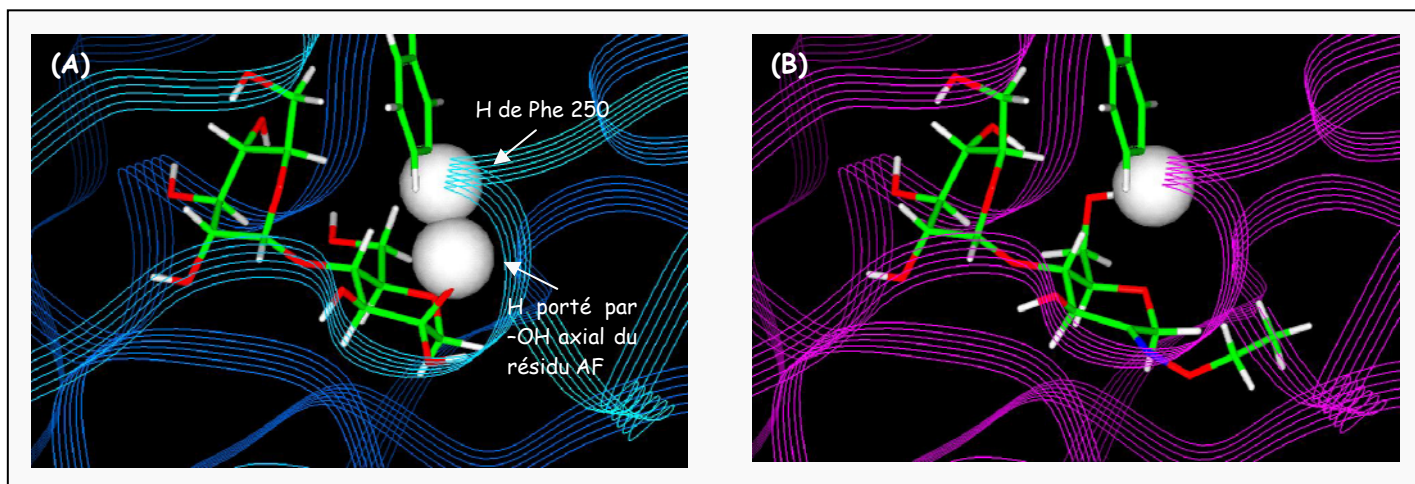


Figure 106 – Comparaison de l’arrimage des dérivés monoglucosylés de l’**AF** (A) et de l’**AF** éthyloxime (B) à l’intérieur du site actif de l’AS de *N. polysaccharaea*.

De plus, pour diminuer cette gêne stérique avec la Phe 250, on constate sur la Figure 107 que l’unité **AF** a dû subir un léger décalage par rapport à l’unité **AFoxEt**. De ce fait, l’**AF** est sans doute dans une position moins favorable à la glucosylation que l’**AFoxEt**. En effet, les résultats expérimentaux montrent que le taux de conversion diminue lorsqu’on utilise respectivement le maltose, l’**AFoxEt** puis l’**AF** comme accepteur. Or on constate sur la Figure 107 que plus la molécule est décalée, moins l’accepteur est glucosylé. Par conséquent, ce décalage est sans doute également l’origine de l’efficacité modérée de glucosylation de l’**AF**.

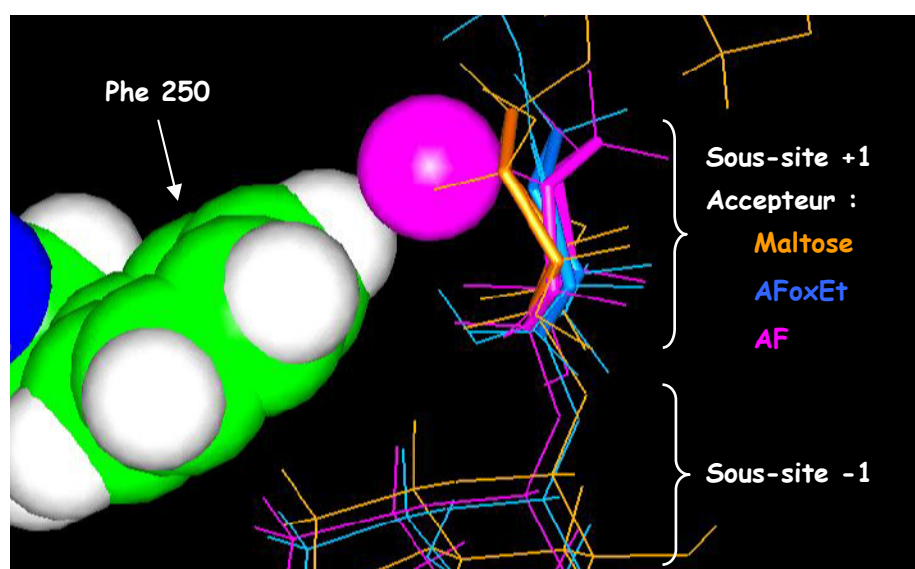


Figure 107 – Observation du déplacement du résidu **AF** par rapport au résidu **AFoxEt** afin de diminuer le conflit stérique avec l’acide aminé Phe 250.

Pour les deux dérivés oximes glucosylés, aucune gêne stérique n'est observée, ce qui est en accord avec les taux de conversion élevés obtenus expérimentalement.

II.4.2. Etude des produits de glucosylation des dérivés oximes

Les **AF** alkyloximes sont reconnus comme accepteurs des GS, mais quelle est la structure des produits de glucosylation synthétisés ? Obtient-on les mêmes produits que ceux synthétisés par dérivation en oxime des **AFGOS** et décrits dans le paragraphe II.3?

Pour répondre à cette question nous avons simplement comparé les profils chromatographiques obtenus par CLHP des **AFGOSoxH** (obtenus par dérivation en oxime des **AFGOS**) et des **AFoxHGOS** (obtenus par glucosylation du dérivé oxime) (Figure 108) synthétisés dans les mêmes conditions.

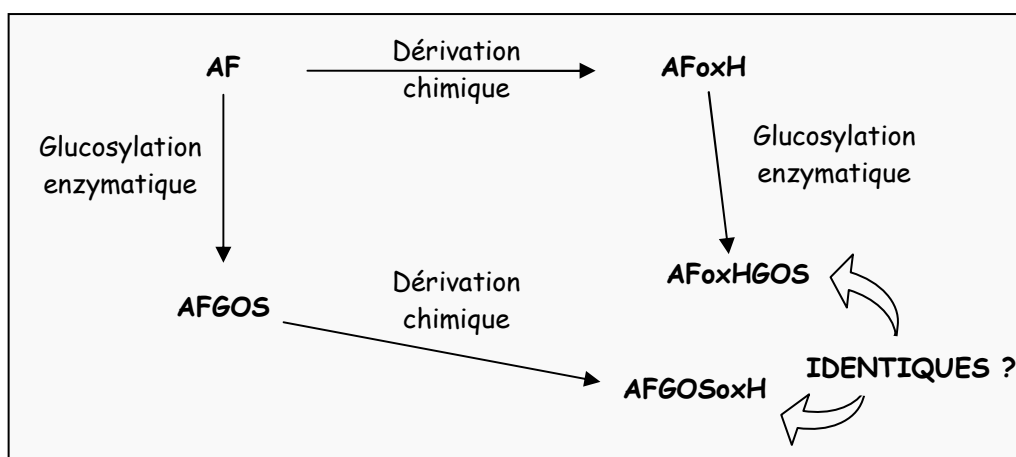


Figure 108 – Présentation des deux voies de synthèse des **AFGOSoxH** et des **AFoxHGOS** obtenus à partir de l'**AF** par réaction de glucosylation enzymatique puis dérivation chimique et inversement.

Pour les GS de *L. mesenteroides*, les profils chromatographiques des **AFGOSoxH** et des **AFoxHGOS** sont identiques. Notons que pour la DSR de *L. mesenteroides* B-1299, les régio-isomères sont présents dans les deux cas. Par ailleurs, les aires des pics correspondants aux **AFoxHGOS** sont supérieures à celles des **AFGOSoxH** : ce qui est la conséquence des taux de conversion plus élevés obtenus lors de l'étape de glucosylation des **AFoxH**, la réaction de dérivation en oxime étant quant à elle quantitative.

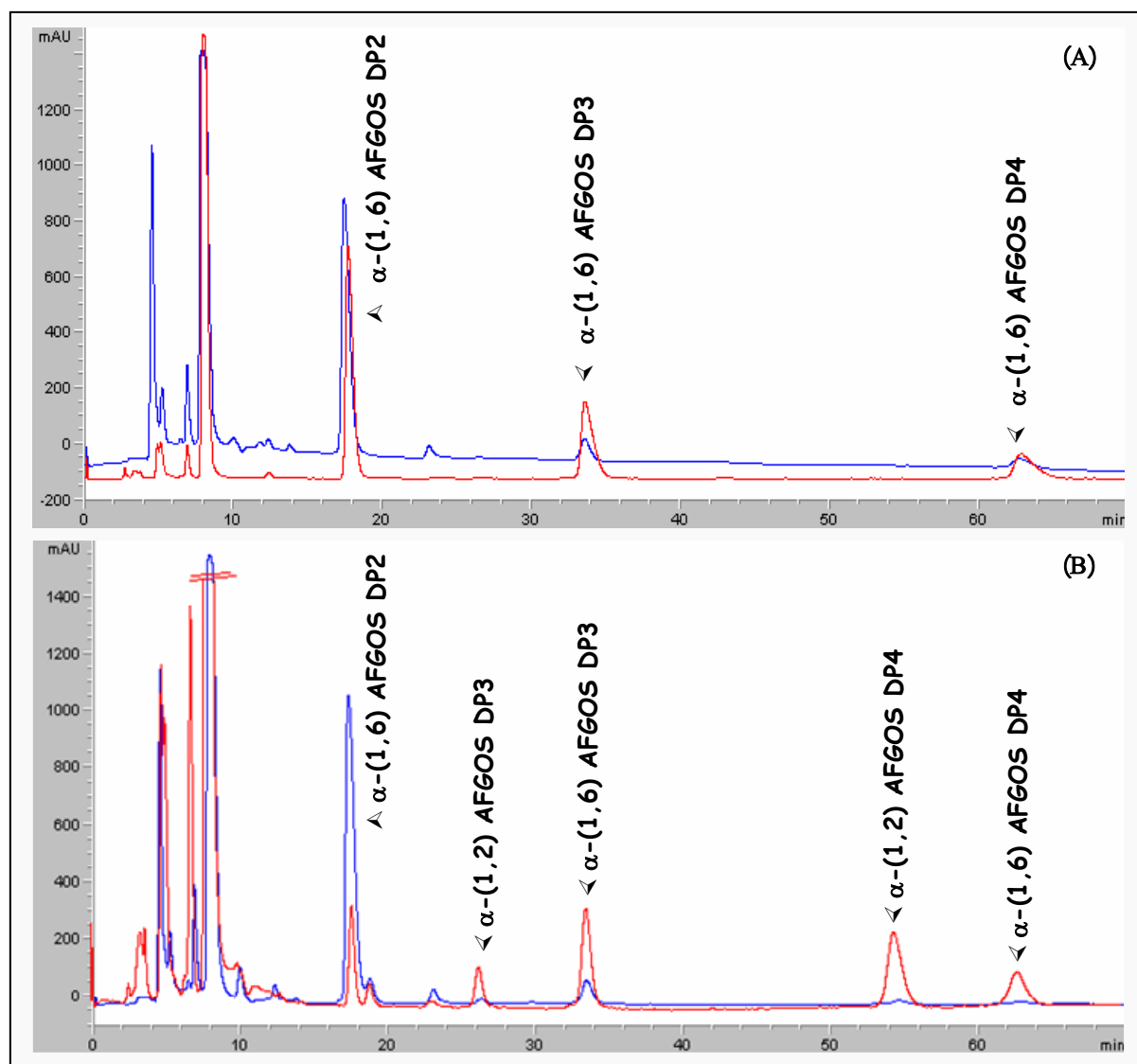


Figure 109 – Comparaison des profils chromatographiques des **AFGOSoxH** (obtenus par dérivation des AFGOS) à ceux des **AFoxHGOS** (obtenus par glycosylation des AFox), avec (A) la DSR de *L. mesenteroides* B-512F, (B) la DSR de *L. mesenteroides* B-1299.

Paramètres CLHP : colonne C18, eau ultra-pure 0,5 mL/min, détection réfractométrique (en bleu) et UV (en rouge).

Identification des spectres : en bleu : **AFGOSoxH** ; en rouge : **AFoxHGOS**

Quant à l'AS de *N. polysaccharea*, les profils chromatographiques semblent à première vue différents (Figure 110). En effet, les pics de temps de rétention élevés sont absents sur le profil correspondant aux **AFoxHGOS** (chromatogramme bleu). Cependant, sur ce même chromatogramme, on peut noter une aire beaucoup plus importante pour les premiers pics. C'est le résultat du transfert de résidus glucosyle nettement plus efficace sur l'**AFoxH** que sur l'**AF**. Il y a alors formation d'oligosaccharides plus courts puisque les mono et disaccharides seront préférentiellement glucosylés.

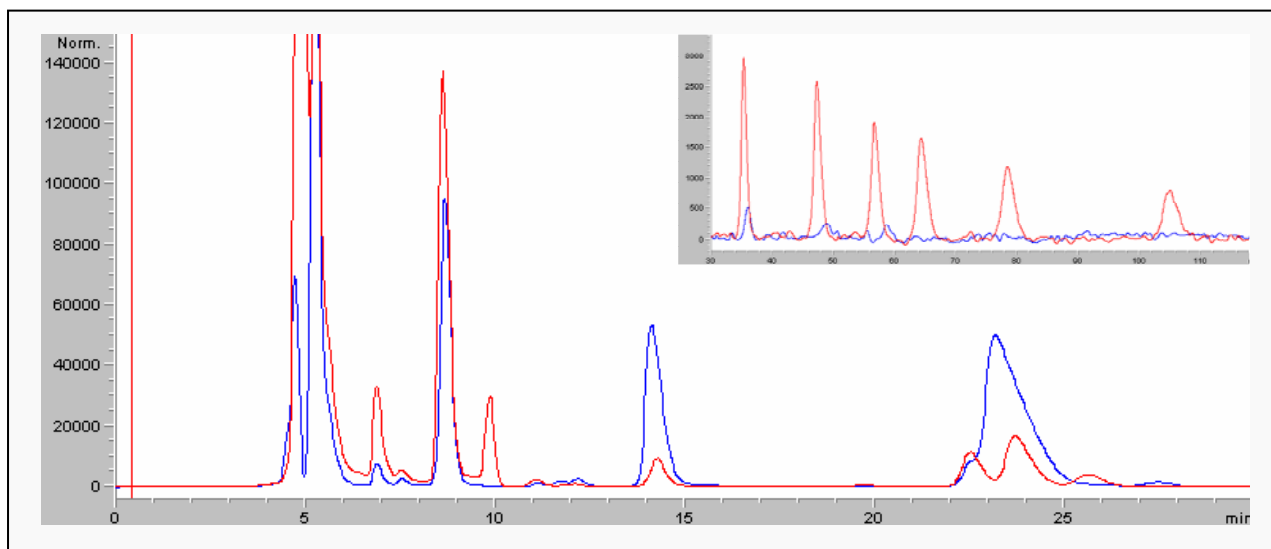


Figure 110 - Comparaison des profils chromatographiques des **AFGOSoxH** (obtenus par dérivation des **AFGOS**) à ceux des **AFoxHGOS** (obtenus par glucosylation des **AFox**), avec l'AS de *N. polysacchara*.

Paramètres CLHP : colonne C18, eau ultra-pure 0,5 mL/min, détection réfractométrique

Identification des spectres : en bleu : **AFoxHGOS**, en rouge : **AFGOSoxH**.

Par conséquent, les deux voies de synthèse des dérivés oximes des **AFGOS** présentées sur la Figure 108 permettent de synthétiser les mêmes produits, mais la dispersion de taille et les quantités obtenues diffèrent selon la voie choisie.

Par contre elles se distinguent par leur efficacité. Dans le cas de la DSR de *L. mesenteroides* B-512F par exemple, la Figure 111 montre qu'il est plus intéressant aux vues des taux de conversion de dériver d'abord l'**AF** en oxime puis d'effectuer la glucosylation de l'**AF** oxime pour obtenir le maximum d'**AFGOS** oxime. Il en va de même pour l'AS de *N. polysacchara* pour laquelle les taux de glucosylation des **AF** alkyloximes sont supérieurs à celui de l'**AF**. Par contre, pour la DSR de *L. mesenteroides* B-1299, l'autre voie (synthèse dans un premier temps des **AFGOS**) apparaît plus efficace.

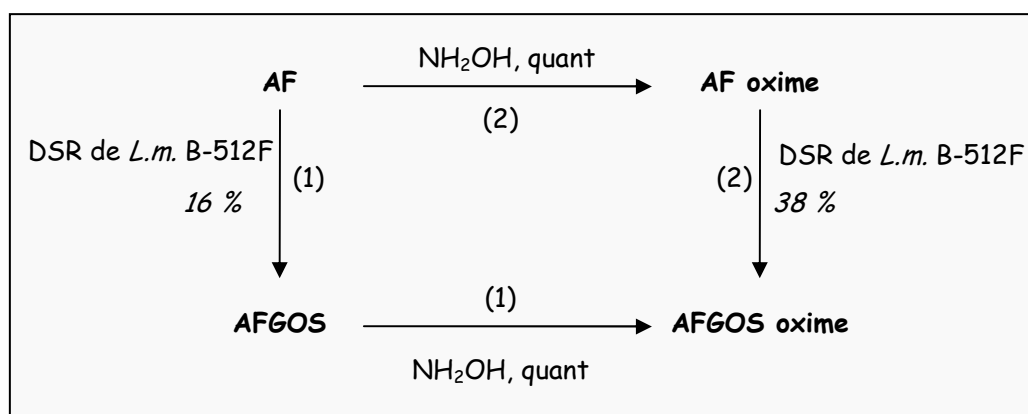


Figure 111 – Schéma des deux voies de synthèse des dérivés oximes des **AFGOS** : (1) par dérivation des **AFGOS** synthétisés par glucosylation de l'**AF** ou (2) par glucosylation des dérivés oximes de l'**AF**.

Partie III. CONCLUSION

Ce second chapitre avait pour objectif de mettre en évidence les propriétés de l'**AF** et de ses dérivés glucosylés.

Il a permis de souligner les propriétés oxydo-réductrices particulières de l'**AF**, notamment son fort pouvoir anti-oxydant. Les **AFGOS** que nous avons synthétisés conservent cette aptitude à protéger les molécules sensibles à l'oxygène, et ce à un niveau équivalent à l'**AF**. En effet, la glucosylation ne modifie pas la structure 2,3-enediol de l'unité **AF** à l'origine de cette propriété.

Par contre, les **AFGOS** ainsi que l'**AF** ne présentent pas de propriétés prébiotiques. Les fermentations menées en présence de souches représentatives des flores vaginale et intestinale ont démontré que l'**AF** et les **AFGOS** ne sont pas utilisés préférentiellement par la flore bénéfique comme source carbonée. Il semblerait que la présence de l'**AF** dans les milieux de culture inhibe la croissance des souches, peut être à cause de son fort pouvoir réducteur.

La seconde partie était consacrée à l'étude de la réactivité de l'**AF**. Nous avons ainsi développé une réaction de dérivation en oxime simple à mettre en œuvre, et spécifique de l'**AF**. Le pH est le facteur clé. Il a été démontré que pour un pH ajusté au voisinage de 4.8 les rendements sont quantitatifs et les cinétiques très rapides. Trois dérivés oximes ont été synthétisés et purifiés : l'**AF** oxime, l'**AF** éthyloxime et l'**AF** benzyloxime qui présentent tous les trois une polarité différente. Excepté pour l'**AF** benzyloxime qui n'a pas été testé, les deux autres dérivés oximes sont reconnus comme accepteurs des GS. Les taux de conversion sont intimement liés à la structure de l'accepteur et à la spécificité de l'enzyme. Les résultats les plus remarquables ont été obtenus avec l'AS de *N. polysaccharea*, pour laquelle une étude approfondie a été menée. Ainsi, la modélisation moléculaire des produits de monoglucosylation à l'intérieur du site actif de l'enzyme a souligné le possible rôle de l'acide aminé Phe 250. Celui-ci entre en conflit stérique avec l'une des fonctions hydroxyyles de l'**AF**, ce qui n'est pas le cas pour les dérivés oximes. Ce pourrait donc être une explication pour le faible taux de glucosylation de l'**AF**.

Mais cette dérivation en oxime peut également être effectuée sur les **AFGOS** qui portent à l'extrémité réductrice une unité **AF**. Cette réaction, tout aussi quantitative et spécifique permet par exemple de révéler les dérivés de l'**AF** présents dans le milieu réactionnel avec le *O*-benzylhydroxylamine comme réactif. Ainsi, dans le cas de la glucosylation de l'**AF** menée

en présence de l'AS de *N. polysaccharea*, cette dérivation a permis de confirmer que tous les produits synthétisés sont des produits de glucosylation de l'**AF**.

Cependant, pour la production d'**AFGOS** oxime, nous avons démontré que les deux voies de synthèse (glucosylation puis dérivation en oxime ou inversement) ne sont pas équivalentes d'un point de vue rendement (mais le sont au regard de la structure des **AFGOS** synthétisés). Elles sont à étudier pour chaque GS, mais le choix doit être effectué au regard de l'efficacité de l'étape de glucosylation enzymatique.

Ces nouvelles molécules pourraient présenter d'autres propriétés et applications que les **AFGOS** liées à la présence de la fonction oxime. Par exemple, l'utilisation d'alkylhydroxylamine à chaîne carbonée longue pourrait conduire à l'obtention de molécules amphiphiles aux propriétés tensioactives.

**CHAPITRE C -
APPROCHES POUR L'OPTIMISATION DES
GLUCANE-SACCHARASES PAR INGENIERIE
RATIONNELLE ET COMBINATOIRE**

Dans le chapitre A, partie II, nous avons démontré l'importance des conditions initiales (rapport molaire S/A et CST) pour l'optimisation de la glucosylation de l'AF. L'autre axe d'étude qui peut être envisagé pour améliorer la synthèse d'AFGOS est l'ingénierie enzymatique moléculaire.

En effet, l'efficacité de la glucosylation de l'AF est principalement liée à la reconnaissance de l'accepteur par la GS : l'AF sera d'autant plus glucosylé qu'il sera efficacement reconnu par l'enzyme, ce qui nécessite un positionnement (ou *docking*) optimal à l'intérieur du site actif. Le calcul des taux de conversion ayant démontré que l'AF est un accepteur modéré, nous pouvons espérer augmenter le pourcentage d'AF converti en construisant des mutants de GS plus « adaptés » pour sa glucosylation.

Nous avons proposé d'améliorer les GS pour la glucosylation de l'AF au travers de deux approches :

- *l'ingénierie rationnelle*, qui consiste en la construction de protéines mutantes à partir de l'analyse structurale (par mutation d'un ou plusieurs acides aminés voire de domaines entiers) ;
- *l'ingénierie combinatoire* qui, à l'inverse, repose sur la création de banques de mutants générés de façon aléatoire (par DNA-shuffling par exemple) puis sur le criblage de ces banques pour en extraire les mutants les plus efficaces.

Ces deux approches ont été envisagées pour l'optimisation de la glucosylation de l'AF. Notre objectif était d'identifier des variants plus efficaces ou de spécificité différente. Les premiers résultats obtenus sont décrits et discutés dans les deux parties suivantes.

Partie I. INGENIERIE RATIONNELLE

L'ingénierie rationnelle repose sur la mutation ou la délétion d'un ou plusieurs acides aminés ciblés choisis soit :

- par alignement de séquences : dans le cadre d'études de relations structure/fonctions, un acide aminé (ou un domaine entier) peut être choisi comme cible de mutation afin d'élucider son rôle dans l'activité catalytique de l'enzyme ;
- par modélisation moléculaire si la structure tridimensionnelle de l'enzyme est connue : cette technique permet de visualiser l'accepteur dans le site actif et d'identifier les acides aminés impliqués dans son bon ou mauvais positionnement.

Ces deux approches sont traitées dans les paragraphes suivants. D'une part, des variants de la DSR-E de *L. mesenteroides* de B-1299 ont été construits par délétion d'acides aminés, et leur aptitude à glucosyler l'AF a été examinée. D'autre part, la modélisation moléculaire utilisée pour modéliser l'AF et ses dérivés oximes à l'intérieur du site actif de l'amylosaccharase (voir chapitre B, paragraphe II.4.1.2) a été utilisée pour sélectionner des points de mutation.

I.1. Glucosylation de l'AF par les variants de la DSR-E de *L. mesenteroides* B-1299

La DSR-E recombinante de *L. mesenteroides* B-1299 présente une structure très originale : en plus du premier domaine catalytique CD1 responsable de la formation des liaisons glucosidiques α -(1,6), cette enzyme possède un second domaine catalytique situé à l'extrémité C-terminale (CD2), à l'origine de sa spécificité à catalyser la formation de liaisons glucosidiques α -(1,2) (Tableau 33) [FABRE, E., 2004; FABRE, E. et coll., 2005]. Cette enzyme étant fortement dégradée sous forme recombinante, il a été entrepris de construire des formes tronquées [FABRE, E. et coll., 2005] et de les tester comme catalyseurs de la glucosylation de l'AF. Il s'agit :

- du variant GBD-CD2 : obtenu sous forme pure, il ne conserve que le domaine de liaison au glucane et le CD2;
- du variant DSR-E- Δ PS : il est délété du peptide signal et constitue la forme majoritaire de la solution enzymatique obtenue (moins de formes dégradées que pour l'enzyme native).

Tableau 33 – Descriptif des variants de la DSR-E de *L. mesenteroides* B-1299 testés comme catalyseurs de la glucosylation de l'AF.

Identification des domaines de l'enzyme : PS : peptide signal, ZV : zone variable, GBD : domaine de liaison au glucane ; CD : domaine catalytique.

Variant	Structure	Propriétés
DSR-E	<p>The diagram shows a horizontal bar representing the protein structure. From left to right, it is divided into five segments: PS (peptide signal, hatched), ZV (zone variable, dotted), CD1 (catalytic domain 1, solid), GBD (glucan binding domain, cross-hatched), and CD2 (catalytic domain 2, solid).</p>	Enzyme recombinante de la DSR de <i>L. mesenteroides</i> B-1299
GBD-CD2	<p>The diagram shows a horizontal bar representing the protein structure. From left to right, it is divided into two segments: GBD (glucan binding domain, cross-hatched) and CD2 (catalytic domain 2, solid).</p>	Conservation uniquement du domaine CD2, responsable de la formation de liaisons glucosidiques α -(1,2) [FABRE, E. et coll., 2005].
DSR-E- Δ PS	<p>The diagram shows a horizontal bar representing the protein structure. From left to right, it is divided into four segments: ZV (zone variable, dotted), CD1 (catalytic domain 1, solid), GBD (glucan binding domain, cross-hatched), and CD2 (catalytic domain 2, solid). The PS domain is absent.</p>	Délétion du peptide signal, et obtention d'un variant moins dégradé que l'enzyme recombinante.

I.1.1. Glucosylation de l'AF par le variant DLG-CD2

FABRE et coll. [FABRE, E. et coll., 2005] ont démontré la capacité du variant GBD-CD2 à glucosyler un mélange d'oligosaccharides de degré de polymérisation (DP) supérieur à 4, eux-mêmes synthétisés au préalable par glucosylation du maltose en présence de la DSR de *L. mesenteroides* B-512F (oligosaccharides notés α -(1,6) GOS) [FABRE, E. et coll., 2005]. Le transfert des unités glucose se fait alors sur ces α -(1,6) GOS avec formation de liaisons glucosidiques de type α -(1,2). Cependant, ce variant GBD-CD2 est inefficace pour glucosyler directement le maltose : il semble n'agir efficacement que sur des chaînes glucosidiques de DP supérieur à 3 et comportant déjà des liaisons α -(1,6).

Dans les conditions de référence (S/A=1 et CST=15.2%, 1 U/mL), l'analyse de la réaction en présence de l'AF comme accepteur et catalysée par GBD-CD2 montre qu'aucun transfert n'intervient sur l'AF (Figure 112-B). Tout le saccharose est consommé, avec libération de fructose, mais la concentration d'AF reste constante. Aucun pic d'oligosaccharides n'apparaît sur le chromatogramme obtenu par CLHP sur colonne C18. Nous obtenons donc des résultats identiques à ceux de FABRE et coll. mais avec l'AF comme accepteur.

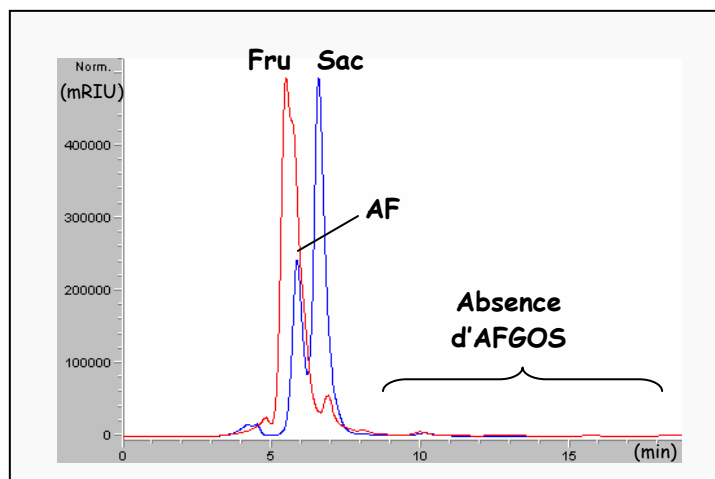


Figure 112 - Mise en évidence de la non glucosylation de l'AF en présence de saccharose et du variant GBD-CD2 de la DSR-E de *L. mesenteroides* B-1299.

Paramètres CLHP : colonne C18, eau ultra-pure à 0,5 mL/min, détecteur RI

Identification des pics : Sac : saccharose, Fru : fructose.

Identification des chromatogrammes : en bleu : temps initial, en rouge : temps final

Le variant GBD-CD2 a également été testé sur un mélange d' α -(1,6) AFGOS obtenu après pré-purification par chromatographie d'exclusion sur BioGel P2 (mélange des fractions 6 à 9 de la figure 5 du chapitre A). Nous avons constaté après consommation partielle du saccharose que les α -(1,6) AFGOS ont disparu et que de nouveaux produits ont été formés (Figure 113), ce qui est de nouveau en accord avec les résultats de FABRE et coll. avec le maltose [FABRE, E. et coll., 2005].

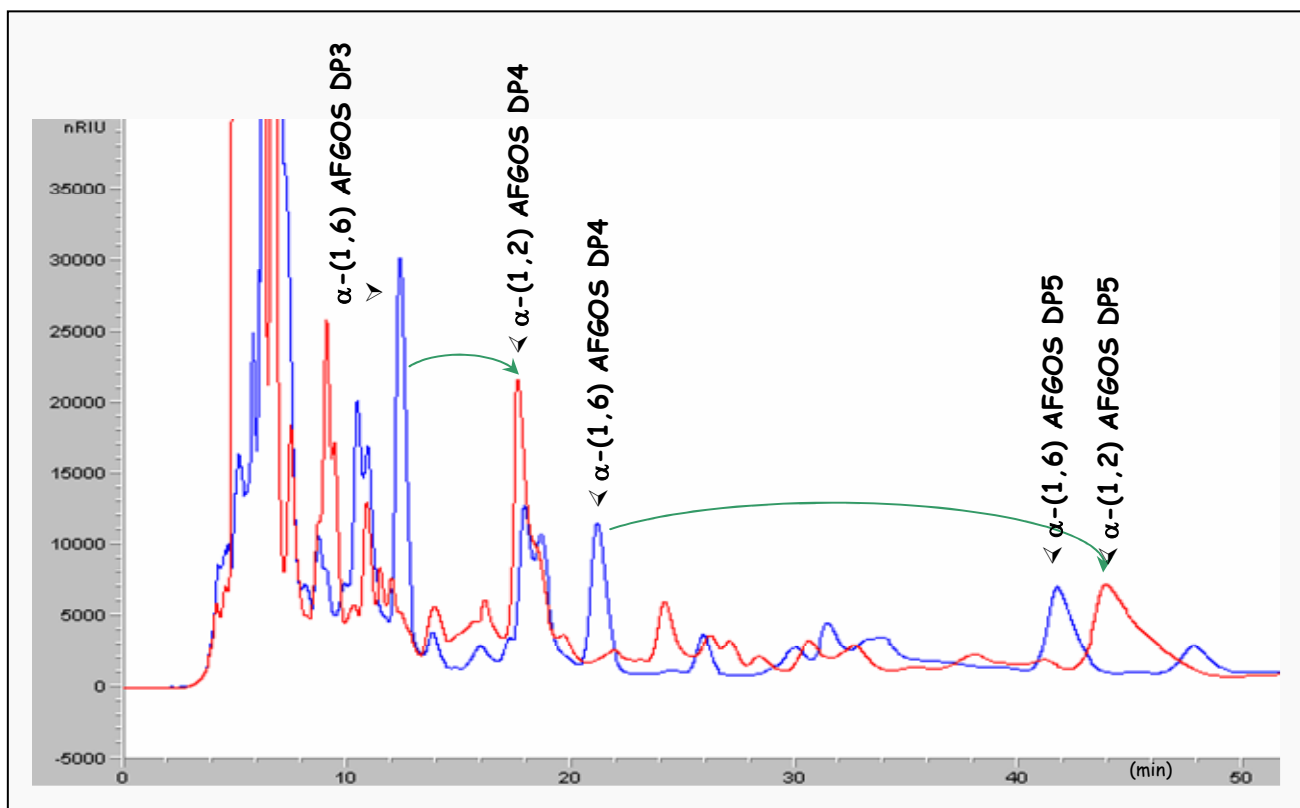


Figure 113 – Glucosylation des α -(1,6) AFGOS par le variant GBD-CD2 en présence de saccharose.

Identification des chromatogrammes : en bleu : temps initial ; en rouge : temps final.

Paramètres CLHP : colonne C18, eau ultra-pure à 0.5 mL/min, détecteur RI.

Sur la base de la spécificité du variant GBD-CD2, et par analogie avec les résultats obtenus par FABRE et coll. [FABRE, E. et coll., 2005] concernant la glucosylation des α -(1,6) GOS, nous pouvons raisonnablement supposer que les nouveaux produits formés ont été glucosylés par formation d'une liaison α -(1,2). Sur la Figure 113, nous pouvons par exemple constater par comparaison des temps de rétention que l' α -(1,6) **AFGOS** de DP3 est glucosylé avec formation d'une liaison α -(1,2) pour conduire à l' α -(1,2) **AFGOS** de DP4.

Cependant, cette hypothèse devra être vérifiée par l'analyse structurale des nouveaux oligosaccharides formés. Si elle est confirmée, le variant GBD-CD2 sera une enzyme de choix pour transformer efficacement un mélange d' α -(1,6) **AFGOS** de DP supérieur à 3 en α -(1,2) **AFGOS** avec augmentation du DP moyen

I.1.2. Glucosylation de l'AF par le variant DSR-E- Δ PS

Des résultats remarquables ont également été obtenus avec le variant DSR-E- Δ PS de la DSR-E de *L. mesenteroides* B-1299, obtenu par délétion du peptide signal.

Du point de vue des taux de conversion de l'**AF** en dérivés glucosylés, le Tableau 34 montre que l'utilisation de ce variant permet de doubler le pourcentage d'**AF** glucosylé obtenu avec l'enzyme native. Dans les conditions favorables à la glucosylation (rapport S/A et CST élevés), des taux de conversion très élevés de 80 % sont atteints. De ce fait, la quantité d'**AFGOS** synthétisés est considérablement augmentée (Figure 114). Ce mutant constitue donc une nouvelle enzyme nettement plus efficace pour la glucosylation de l'**AF**.

Tableau 34 – Taux de conversion de l'**AF** obtenus en présence de saccharose et du variant DSR-E- Δ PS.

Glucane-saccharase	DSR de <i>L. mesenteroides</i> B-512F	DSR de <i>L. mesenteroides</i> B-1299	DSR-E- Δ PS
S/A=0.9 CST=15.5 %	26,1 %	24,5 %	51,3 %
S/A=2 CST=38%	n.d.	45,6 %	79,5 %

De plus, les profils chromatographiques de la Figure 114 montrent que les produits synthétisés en présence du variant DSR-E- Δ PS sont les mêmes que ceux obtenus avec l'enzyme native, à savoir des α -(1,6) **AFGOS** et des régio-isomères comportant une liaison α -(1,2).

Par contre, c'est la proportion des régio-isomères parmi les **AFGOS** qui diffère par rapport à ceux issus de la glucoylation avec l'enzyme native (Figure 114). Ainsi, la part de l' α -(1,2)

AFGOS DP4 diminue par rapport à l' α -(1,6) **AFGOS**. L'utilisation de ce variant conduit à l'obtention d'un mélange d'**AFGOS** dont le profil se rapproche de celui obtenu avec la DSR de *L. mesenteroides* B-512F.

Ces résultats remarquables sont tout à fait inattendus et pour l'instant difficiles à expliquer. Pour identifier les facteurs à l'origine de la très forte glucosylation de l'**AF** par le variant DSR-E- Δ PS, il faudrait en effet disposer et comparer la structure tridimensionnelle du variant à celle de l'enzyme native. Cependant, l'examen des gels SDS-PAGE de DSR-E et du variant DSR-E- Δ PS montre que les deux protéines sont produites sous forme dégradées. L'augmentation des taux de conversion de l'**AF**, et de la proportion d' α -(1,6) **AFGOS** synthétisés peuvent donc être attribuées à l'action du domaine catalytique CD1 (spécifique de la formation des liaisons α -(1,6)). Il aurait été intéressant de tester un autre variant de la protéine DSR-E déletée du domaine CD2 pour évaluer avec plus de justesse l'efficacité du domaine catalytique CD1.

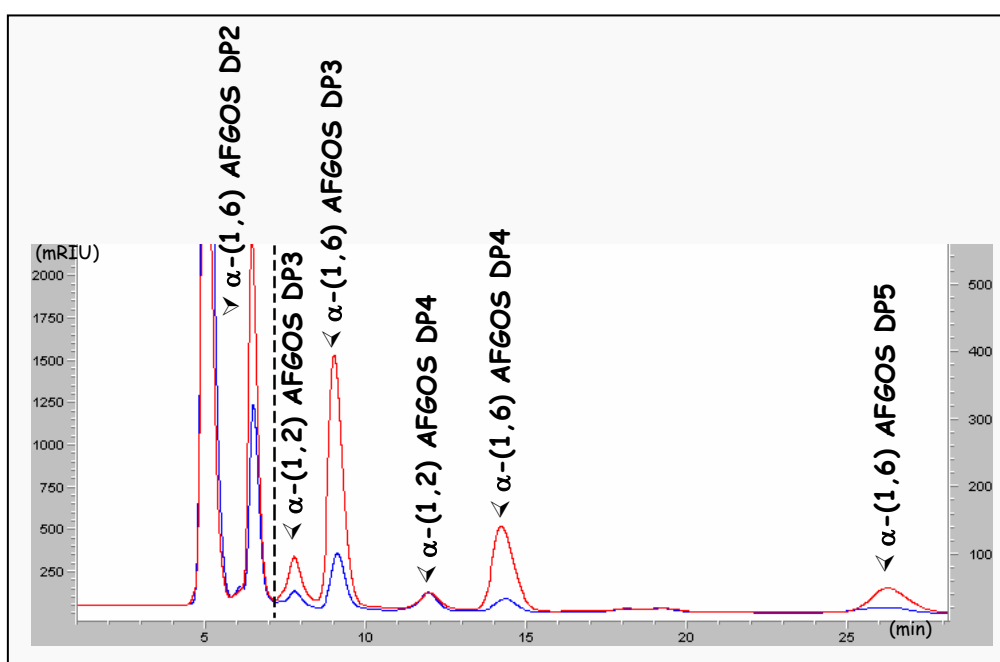


Figure 114 – Comparaison par CLHP des produits de glucosylation obtenus avec la DSR native de *L. mesenteroides* B-1299 (en bleu) à ceux synthétisés avec le variant DSR-E- Δ PS (en rouge).

Paramètres CLHP : colonne C18, eau ultra-pure à 0,5 mL/min, détection par réfractométrie.

En conclusion, même si l'interprétation de ces données est encore incomplète et demande des études complémentaires, ces résultats montrent l'intérêt de la construction de mutants de GS pour améliorer la glucosylation de l'**AF**.

I.2. Modélisation moléculaire du positionnement de l'AF dans le site actif de l'AS

Afin d'améliorer l'efficacité de la glucosylation de l'AF, nous avons modélisé l'arrimage de l'AF et de ses dérivés oximes dans le site actif de l'AS de *N. polysaccharea* (voir chapitre B, paragraphe II.4.1.2.).

Grâce aux résultats obtenus, nous avons pu émettre l'hypothèse que les faibles taux de conversion de l'AF semblent être dus à la présence de l'acide aminé Phe 250 qui entre en conflit stérique avec l'une des fonctions hydroxyles de l'AF. A l'inverse, pour les dérivés oximes, aucun conflit n'a été mis en évidence.

Nous avons donc décidé de choisir comme cible la Phe 250 qu'il serait judicieux de muter en un autre acide aminé moins encombrant, l'alanine par exemple, afin d'améliorer peut être le positionnement de l'AF dans le site actif de l'AS (par diminution des conflits stériques), et par conséquent l'efficacité de glucosylation de l'AF.

Plusieurs mutants sont actuellement en cours de préparation et seront testés pour évaluer leur aptitude à glucosyler l'AF.

Partie II. INGENIERIE COMBINATOIRE

L'ingénierie combinatoire repose sur l'emploi de techniques d'évolution moléculaire dirigée destinées à construire des banques de plusieurs milliers de variants (10^6 à 10^8) de GS par mutation aléatoire et/ou recombinaison de gènes codant pour ces enzymes.

L'une des techniques employées pour générer des variants est la méthode dite de PCR sexuelle ou « DNA shuffling », mise au point par STEMMER en 1994 [STEMMER, W.P., 1994].

La méthode, décrite sur la Figure 115, consiste d'abord à introduire des mutations aléatoires dans le gène parental par le biais de la PCR à erreur. Initialement, la technique de la PCR (Polymerase Chain Reaction) est utilisée pour réaliser des millions de copies d'un brin d'ADN à l'aide d'amorces oligonucléotidiques complémentaires des bases situées aux extrémités du brin d'ADN et d'une ADN polymérase, dont le taux d'erreur est de 0.03 % lors de la polymérisation. En jouant sur certains facteurs (concentration enzymatique, durée de la réaction, utilisation de polymérases infidèles, concentration en cations bivalents avec des concentrations inégales en dNTPs), il est possible d'augmenter le taux de mutations et de dépasser les 0.1 % selon le système utilisé. On parle alors de PCR à erreur, ou « error-prone PCR ».

Les gènes comportant des mutations sont alors fragmentés à l'aide de la DNase I qui clive aléatoirement l'ADN. Suit une étape de PCR sans amorce permettant le réassemblage des fragments d'ADN (par hybridation des fragments homologues, tandis que les parties non hybridées servent d'amorces) qui est répétée jusqu'à l'obtention de fragments de la même taille que le gène parental. Les gènes sont ensuite amplifiés par une nouvelle PCR avec amorces. Une dernière étape de sélection et/ou criblage permet de ne conserver que les variants dont la mutation est positive. Ces derniers peuvent alors entrer dans un nouveau cycle de recombinaison, jusqu'à l'obtention d'un variant satisfaisant.

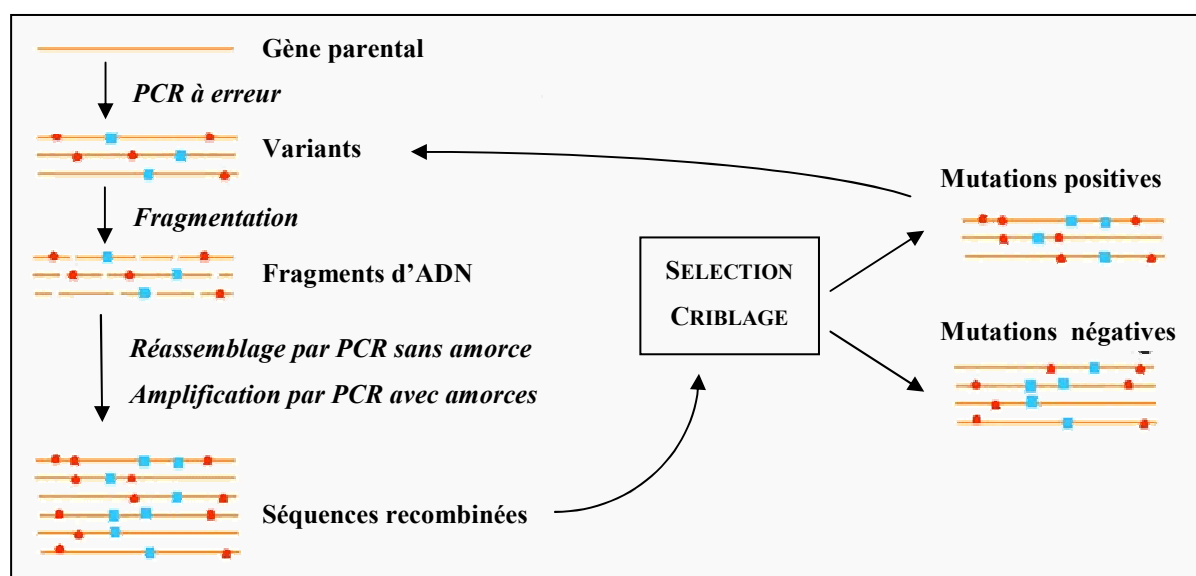


Figure 115 – Schéma de génération de variants par la technique de PCR sexuelle ou de « DNA shuffling » [STEMMER, W.P., 1994].

Des mutations sont introduites dans un gène parental par la PCR à erreur ; les gènes obtenus sont fragmentés par une enzyme de restriction, puis réassemblés par PCR sans amorce jusqu'à obtention de la taille du gène parental. Les variants positifs mis en évidence par criblage peuvent être sujet à une nouvelle PCR sexuelle.

Cette approche combinatoire est complémentaire de l'ingénierie rationnelle. Elle permet de mettre en évidence les acides aminés qui ne seraient pas choisis comme cibles de mutation par une approche rationnelle. En effet, certains acides aminés éloignés du site actif de l'enzyme, et donc *a priori* non impliqués dans la catalyse, peuvent avoir un rôle significatif sur l'efficacité de glucosylation.

Cependant, pour isoler les variants améliorés parmi de larges bibliothèques, il est impératif de mettre en place un test de criblage de ces banques rapide, efficace et automatisable pour pouvoir réaliser un criblage à haut débit (supérieur à 10 000 variants par semaine).

Nous avons donc développé et comparé dans un premier temps plusieurs cribles. Ils reposent tous sur l'évaluation de la quantité finale de l'**AF**, qui sera d'autant plus faible que l'**AF** sera efficacement glucosylé par la GS mutée. Les paragraphes suivants reprennent en détail ces méthodes de criblage qui sont ensuite comparées dans le paragraphe *II.1.5*.

II.1. Développement et comparaison de méthodes de criblage

II.1.1. Criblage par colorimétrie

II.1.1.1. Criblage colorimétrique par dosage des sucres réducteurs au DNS

Le premier crible que nous avons proposé est de type colorimétrique. Il repose sur le dosage des sucres réducteurs avec l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS). En effet, l'**AF** réagit de façon spécifique avec le DNS à froid, alors que les autres sucres du mélange (fructose, saccharose, glucose, IMOS,...) requièrent un chauffage à 100 °C pour catalyser la réaction d'oxydo-réduction.

Cependant, les **AFGOS** caractérisés dans cette étude réagissent avec le DNS à froid de par leur fort pouvoir réducteur (voir paragraphe *I.2* du chapitre B). Cette technique est par conséquent inadaptée pour la détermination de la quantité d'**AF** résiduelle dans le milieu final de glucosylation, puisque les **AFGOS** seraient également dosés.

Par contre, il est possible d'utiliser ce crible comme test hautement sélectif visant à sélectionner les GS qui catalysent le transfert sur le carbone C2 de l'**AF** hydraté. En effet, si l'une des fonctions hydroxyles du C2 est glucosylée, alors l'**AF** ne peut plus se déshydrater pour libérer la forme cétonique réactive avec le DNS. C'est ce qui se passe également lorsque l'**AF** est dérivé en oxime (voir *partie II* du chapitre B), où la fonction carbonyle, transformée en oxime, ne réagit plus avec le DNS.

Ce crible colorimétrique est donc uniquement applicable dans la recherche de variants hautement spécifiques. Les chances de trouver de tels variants sont par conséquent d'autant plus faibles. Cependant, ce test présente une cadence très élevée (7200 variants/24h) et est facile à mettre en œuvre.

II.1.1.2. Criblage colorimétrique par détection du polymère amylose synthétisé en présence de l'AS de *N. polysaccharea*

En présence d'un accepteur, la synthèse de polymère est plus ou moins déviée selon le pouvoir accepteur de la molécule. Plus l'accepteur sera fort, moins il y aura de polymère formé. Dans le cas de l'AS de *N. polysaccharea*, le polymère formé est de type amylose. Or celui-ci peut être facilement détecté : le test à l'iode est un moyen facile et rapide pour apprécier de façon qualitative la taille du polymère formé (Figure 116). En effet, en présence de iodure de potassium, il y a formation d'un complexe avec le polymère à l'origine d'une coloration violette, dont la longueur d'onde d'absorption maximale (λ_{\max}) dépend de la longueur moyenne de la chaîne (entre 400 et 650 nm).

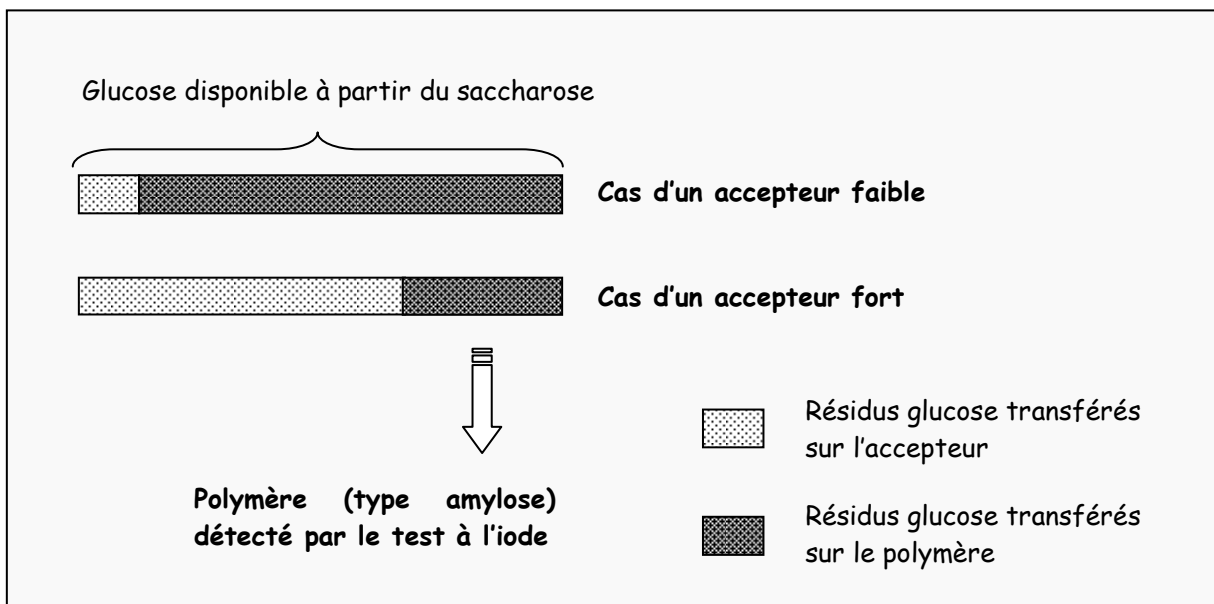


Figure 116 – Répartition des unités glucose issues du saccharose, en fonction du pouvoir accepteur de la molécule exogène introduite dans le milieu contenant l'AS de *N. polysaccharea* et du saccharose.

Dans le cas d'un accepteur faiblement reconnu, la majorité du glucose initialement disponible sous forme de saccharose est polymérisée pour former le polymère de type amylose. A l'inverse, si l'accepteur est fort (taux de conversion élevés) peu de polymère sera formé.

Nous avons envisagé d'utiliser ce test à l'iode pour cribler les banques de mutants de l'AS. En effet, en se plaçant dans des conditions initiales (rapport S/A et CST) défavorables à la glucosylation de l'AF, beaucoup de polymère est formé et le test à l'iode est positif (Figure 117). En revanche, en présence d'un mutant plus efficace, la glucosylation de l'AF devrait augmenter et conduire à une faible production de polymère mis en évidence par une coloration rose pâle et non violette.

La Figure 117 illustre les couleurs obtenues pour un test à l'iode positif (sans réaction d'accepteur) ou négatif (moins de polymère formé à cause de la réaction d'accepteur).

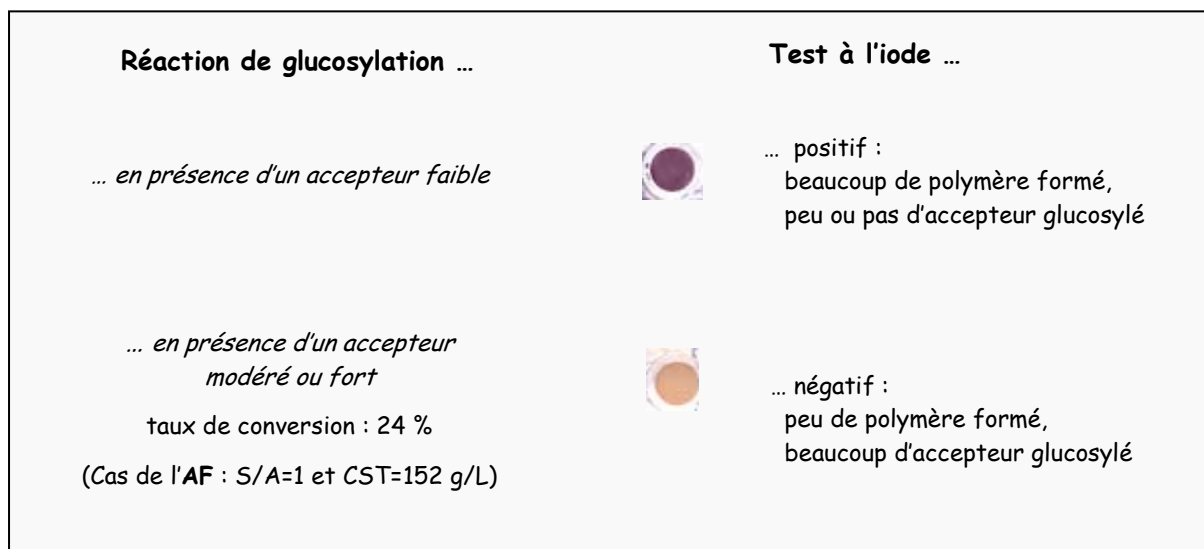


Figure 117 – Utilisation du dosage du polymère de type amylose formé par l'AS de *N. polysaccharea* pour le criblage de banques en vue de l'obtention de variants plus efficaces pour la glucosylation de l'AF.

Cette méthode peut donc être retenue comme un test de criblage. Le critère de sélection sera alors le passage d'une couleur violette à rose pâle. Les réactions de glucosylation en présence des variants devront alors être menées dans les conditions défavorables à la glucosylation (rapport S/A plus faible ou CST plus élevée) de façon à augmenter le seuil de changement de couleur.

De plus, la réaction de révélation du polymère étant rapide, une cadence élevée de criblage peut être atteinte (9600 variants/24h). Cependant, cette méthode ne peut être appliquée qu'à l'AS de *N. polysaccharea*, puisqu'elle repose sur la nature du polymère formé ; or les autres GS ne catalysent pas la formation d'un polymère de type amylose. De la même façon, ce test de criblage perd de sa pertinence si la spécificité des variants de l'AS à former des liaisons glucosidiques de type α -(1,4) est modifiée, auquel cas le polymère formé ne sera plus de type amylose.

II.1.2. Criblage par chromatographie sur couche mince

Les cribles colorimétriques décrits précédemment (surtout celui au DNS) montrent qu'il est nécessaire de développer des méthodes permettant de séparer l'AF des AFGOS en raison des propriétés physico-chimiques proches de ces molécules.

La chromatographie sur couche mince (CCM), au même titre que la CLHP, permet de séparer les constituants de mélanges complexes sur la base des différences de coefficients de partage entre une phase mobile et une phase stationnaire. Son principal avantage est qu'elle permet d'analyser simultanément plusieurs échantillons. Par contre, sa mise en œuvre est plus longue et plus fastidieuse que la CLHP (surtout au niveau de l'étape de dépôts), et la quantification est moins sensible.

Cependant, nous recherchons un variant présentant une très grande efficacité de glucosylation de l'**AF** par rapport à l'enzyme native. En conséquence, l'emploi d'une méthode peu sensible ne devrait pas représenter un obstacle à l'identification des variants améliorés.

Nous avons donc envisagé d'effectuer une CCM avec révélation à l'orcinol, révélateur spécifique des sucres.

Le choix de la phase mobile est primordial pour la bonne séparation des sucres composant le milieu réactionnel de glucosylation. Après de multiples essais, le choix s'est porté sur un mélange acétate d'éthyle/acide acétique/méthanol/eau 12:3:3:2 (en volume) : il permet de séparer l'**AF** du fructose/glucose (non séparés), du saccharose et des **AFGOS**.

En effet, la Figure 118 montre que les monosaccharides ont des rapports frontaux (Rf) différents (pistes ① à ③), et que les **AFGOS**, plus retenus par la phase stationnaire, sont séparés (pistes ④ à ⑥). En raisonnant par rapport à la polarité, il est vraisemblable que le DP des **AFGOS** augmente quand le Rf diminue.

Notons également que des traînées sont observées pour des Rf faibles (proches de ceux des **AFGOS**). Elles peuvent être attribuées à la présence de dextrane de bas poids moléculaire (les polymères les plus longs restant au niveau de la zone de dépôt). Leur présence au niveau des **AFGOS** peut constituer une gêne à la visualisation des dérivés glucosylés.

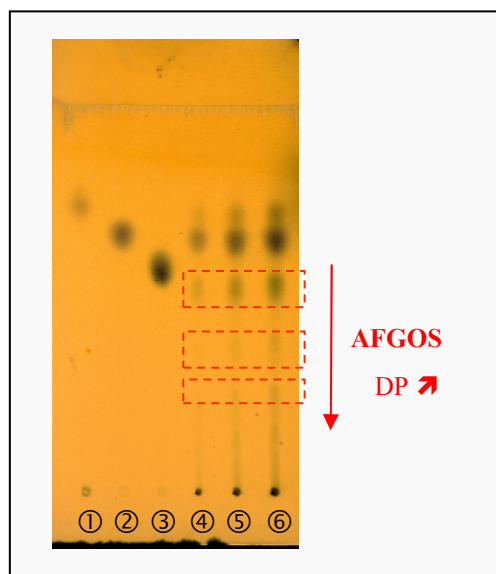


Figure 118 - Séparation d'étalons de sucres par CCM et révélation à l'orcinol.

Phase mobile : acétate d'éthyle/acide acétique/méthanol/eau 12:3:3:2 (volume).

Révéléateur : orcinol / FeCl_3 / H_2SO_4 .

Identification des pistes :

- ① AF 3.78 g/L ;
- ② fructose/glucose 5 g/L ;
- ③ saccharose 10 g/L (volumes déposés de 1 μL) ;
- ④, ⑤, ⑥ : respectivement 0,5, 1 et 2 μL déposés du milieu final de glucosylation de l'AF en présence de la DSR de *L. mesenteroides* B-512F.

Nous constatons ainsi que la CCM permet de visualiser les **AFGOS** et l'**AF** résiduel. Il peut donc être utilisé en tant que test de criblage, et le critère sera la disparition de la tache correspondant à l'**AF** (l'augmentation de l'efficacité de la glucosylation de l'**AF** se traduisant par une diminution de la concentration en **AF**). En outre, en travaillant avec une plaque de 20 cm, nous pouvons cribler entre 200 et 600 variants par jour.

II.1.3. Criblage par chromatographie liquide haute performance

L'autre méthode de séparation envisageable comme test de criblage est la CLHP. Avec cette technique, on s'affranchit de l'étape de dépôt, puisque l'injection est automatisée, et peut également être réalisée directement à partir des microplaques dans lesquelles sont réalisées les réactions de glucosylation. Cependant, à l'inverse de la CCM, elle ne permet pas d'analyser plusieurs échantillons simultanément. Il est donc impératif de mettre au point une méthode de séparation la plus rapide possible afin de palier cet inconvénient et d'avoir un débit de criblage suffisamment rapide.

Deux types de séparations peuvent être envisagés : sur colonne C18 et sur colonne carbohydate Ca^{2+} .

II.1.3.1. Utilisation de la colonne carbohydate Ca^{2+} .

Avec la colonne carbohydate Ca^{2+} , les temps d'analyse sont courts : dans le mélange, le fructose est le dernier composé à être élué (de par le principe d'exclusion stérique sur lequel repose ce type de séparation) avec un temps de rétention de 12,5 minutes pour un débit de 0,5 mL/min (Figure 119).

Par conséquent, il est possible d'injecter un nouvel échantillon toutes les 14 min pour atteindre une cadence de 100 variants / 24 h. Ce débit peut être augmenté en réalisant une injection toutes les 6 min pour éviter les volumes morts et enregistrer le signal du réfractomètre sur des fenêtres de 6 min (Figure 119). Dans ces conditions, il est possible de cribler jusqu'à 180 variants / 24 h.

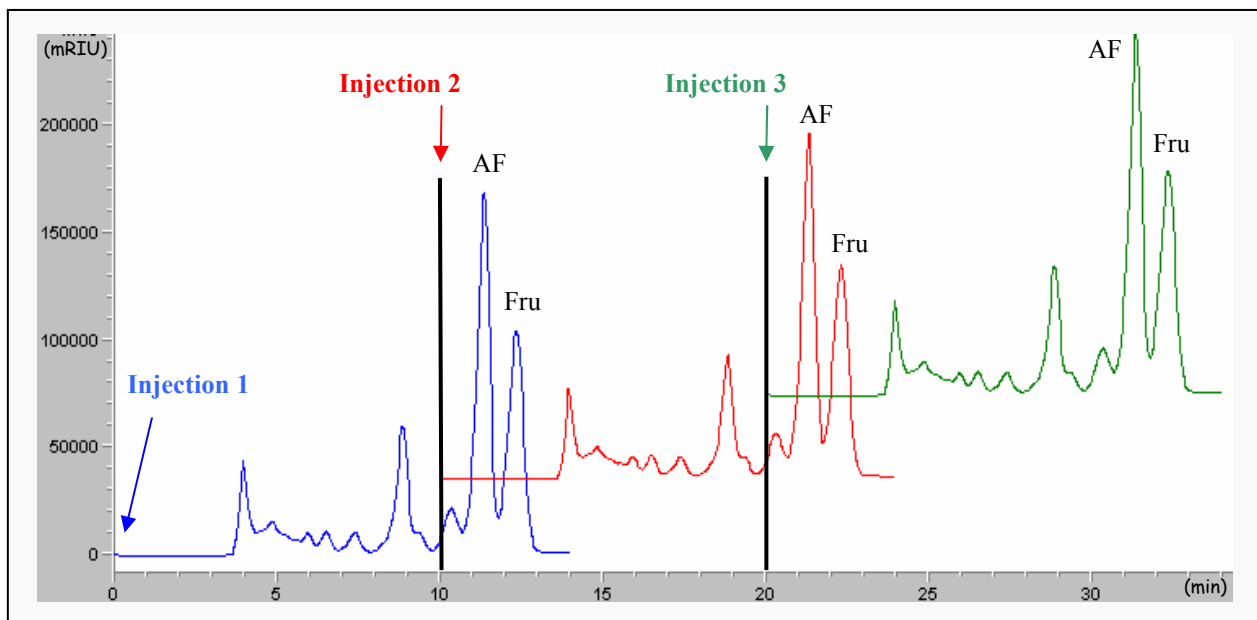


Figure 119 – Profils chromatographiques d'un même mélange final de glucosylation de l'AF.

Paramètres CLHP : colonne carbohydre Ca^{2+} , eau ultra-pure à 0,5 mL/min, détecteur RI.

Le fructose est le dernier sucre élué, avec un temps de rétention de 12,5 min, ce qui permet une cadence de 100 variants/24 h. Cette cadence peut être augmentée à 180 variants/24 h par optimisation des injections (toutes les 6 min).

Ce crible est donc particulièrement intéressant de par sa facilité de mise en œuvre (injection automatisée directe du milieu final de glucosylation). Cependant, il souffre d'une cadence faible, assez mal adaptée pour un criblage de dizaine de milliers de variants.

II.1.3.2. Utilisation de la colonne C18

L'autre solution est l'utilisation de colonnes de type C18. Cependant, avec de telles phases apolaires, il est impossible de savoir quand le dernier AFGOS présent dans le mélange sera élué. En effet, le temps de rétention des AFGOS augmente avec le DP, et pour exemple, l' α -(1,6) AFGOS DP7 est élué au bout de 84 min en utilisant de l'eau ultra pure comme éluant. Un crible ne peut donc pas être mis en place sur la base de ce type de séparation.

Pour palier les longs temps d'acquisition sur colonne C18, avec de l'eau ultra pure comme éluant, nous avons mis à profit la conversion quantitative de l'AF et des AFGOS en oximes.

En effet, après dérivation des AFGOS en éthyloxime, l'utilisation d'un mélange eau/acétonitrile 90/10 (V/V) comme éluant permet d'obtenir le profil chromatographique de la Figure 120. L'AF éthyloxime est alors le dernier composé élué avec un temps de rétention de 9 min.

Par conséquent, il est envisageable d'utiliser ce couplage dérivation en éthyl oxime / CLHP (colonne C18, éluant eau/acétonitrile 90/10) comme test de criblage. De plus, l'utilisation de colonnes C18 plus courtes (125 mm) permet de diminuer encore le temps de rétention de l'AF éthyloxime (de 9 à 7 min) (Figure 120). En contre partie, l'augmentation de la force d'éluant conduit à une diminution de la résolution. Cependant, dans l'optique d'un test de criblage reposant sur le dosage de l'AFoxEt (ou AF), la faible résolution n'est pas un obstacle. Dans ces conditions la cadence est de 180 injections/24h, voire 290 en optimisant les temps d'injection.

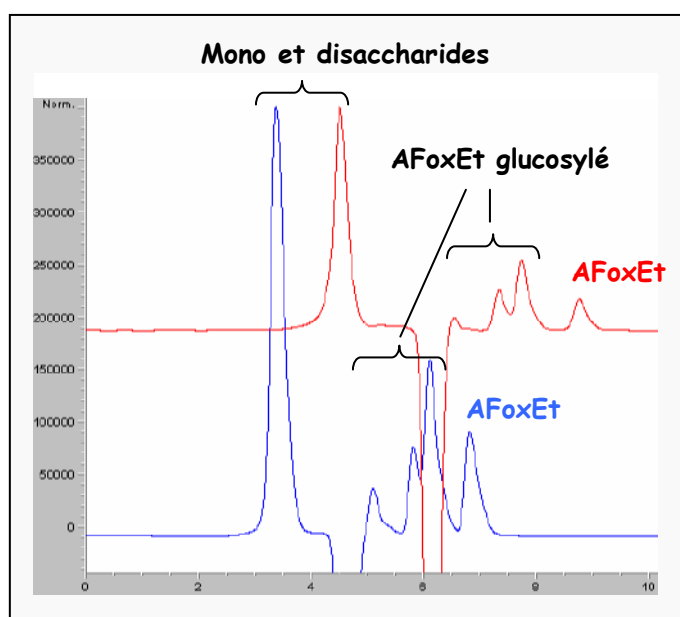


Figure 120 – Optimisation du temps de rétention de l'AF éthyloxime sur colonne C18. Exemple du mélange d'AFGOS obtenu avec l'AS de *N. polysaccharaea*.

Chromatogrammes : en rouge : sur C18 de longueur 250 mm ; en bleu : sur C18 de longueur 125 mm.

Paramètres CLHP : colonne C18, eau/acétonitrile 90/10 V/V à 0,5 mL/min, détecteur RI.

Cette technique permet donc d'augmenter un peu plus la cadence d'analyse des échantillons par rapport à l'utilisation de la colonne carbohydrate Ca^{2+} seule, mais nécessite une étape supplémentaire de dérivation, ce qui alourdit le protocole de criblage.

II.1.4. Criblage par réduction de l'AF par l'anhydro-D-fructo-réductase

L'oxydation chimique avec le DNS n'étant pas spécifique de l'AF, nous avons souhaité développer une méthode spécifique basée sur la réduction de l'AF par voie enzymatique à l'aide d'anhydro-D-fructo-réductase. L'objectif de l'un des partenaires du projet NEPSA

(l'université de Saarbrücken) est notamment la modification enzymatique de l'AF, et leurs travaux ont conduit à l'isolement et à la caractérisation d'une telle AF-réductase produite par *Sinorhizobium morelense* S-30.70.5 [KUHN, A. M., 2004].

II.1.4.1. Principe de la réduction enzymatique de l'AF

L'AF-réductase réduit la fonction carbonyle portée par le carbone C2 de l'AF en présence d'un cofacteur, le NADPH (Figure 121). La réaction est menée à 30 °C, et l'état d'avancement est suivi par spectrophotométrie à 340 nm, longueur d'absorption maximale du NADPH qui disparaît au cours de la réaction par réaction avec l'AF. La densité optique va donc diminuer dans le temps.

La cinétique de réduction de l'AF est liée à l'activité enzymatique introduite. Pour l'AF-réductase, une unité (exprimée en U/mL) correspond à la quantité d'enzyme nécessaire pour oxyder 1 µmole de NADPH (ou réduire 1 µmole d'AF) par minute.

Un très grand nombre de souches ont été criblées par l'université de Saarbrücken, et seules quelques une d'entre elles ont été sélectionnées pour la purification de l'AF-réductase. Les résultats font actuellement l'objet d'un dépôt de brevet. De nombreux sucres (fructose, glucose, saccharose, ...) ont été testés comme substrats de l'AF-réductase, et il s'est avéré que cette enzyme est spécifique des sucres comportant une fonction cétonique sur le carbone C2, à savoir l'AF dans le cadre de notre étude.

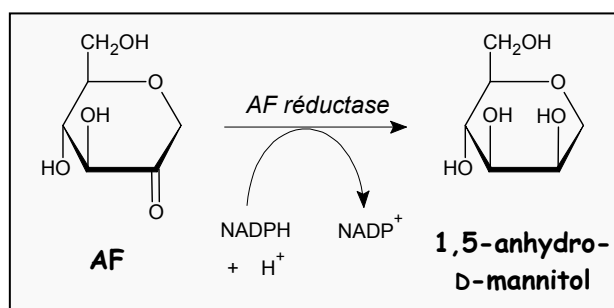


Figure 121 – Réaction de réduction de l'AF en 1,5-anhydro-D-mannitol par l'AF-réductase en présence de NADPH comme cofacteur.

Nous avons donc utilisé cette AF-réductase fournie par l'université de Saarbrücken pour le développement d'un test de criblage basé sur la réduction enzymatique de l'AF.

II.1.4.2. Mise au point du crible

II.1.4.2.a. Réponse de l'AF à l'AF-réductase

Dans les conditions utilisées (5 U/mL d'AF-réductase), tout l'AF est réduit en moins de 30 minutes (Figure 122). On peut également noter qu'en l'absence d'AF, la DO diminue

légèrement en raison de l'instabilité du NADPH. Nous avons donc voulu vérifier la linéarité de la loi :

$$\Delta(\text{DO}) = f([\text{AF}])$$

où $\Delta(\text{DO})$ correspond à la diminution de DO par rapport au blanc sans **AF**

et $[\text{AF}]$ la concentration en **AF** initialement introduite dans le milieu réactionnel.

Pour une concentration choisie en NADPH de 0.14 mM, il est impératif de travailler avec des concentrations en **AF** inférieures à cette valeur. Nous avons donc mené en parallèle la réduction de solutions standard d'**AF** de concentrations comprises entre 0 et 0.14 mM. La cinétique de la réaction suivie par spectrophotométrie à 340 nm est donnée sur la Figure 122.

Il montre donc que la DO finale sera d'autant plus faible que la concentration initiale en **AF** sera élevée.

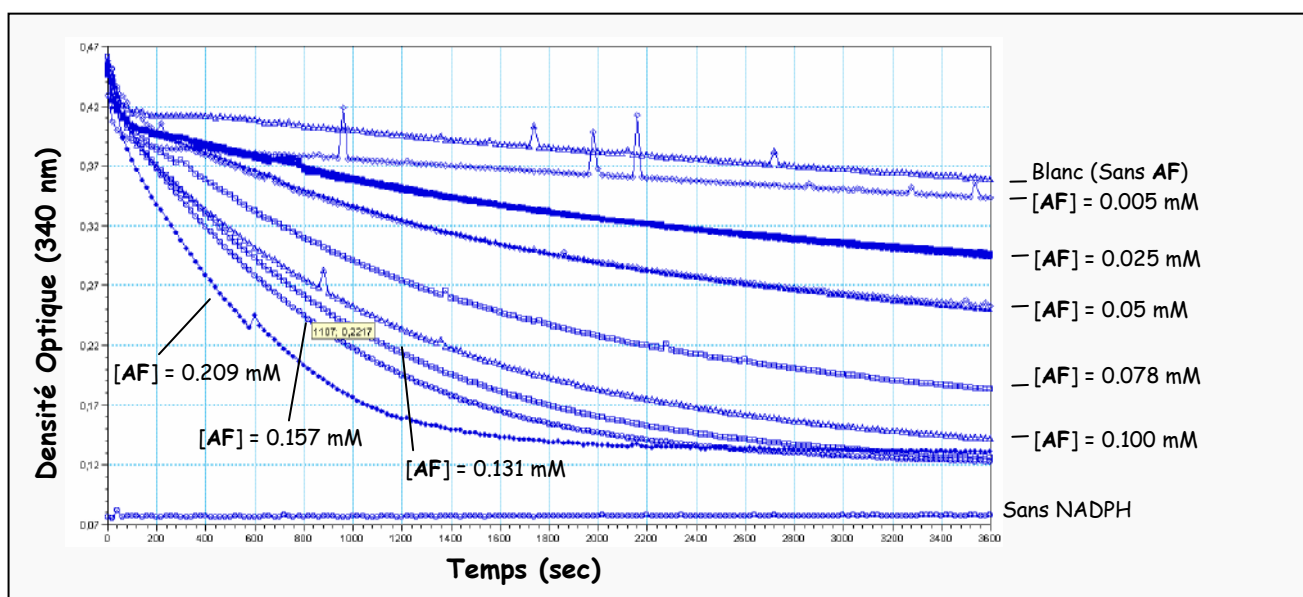


Figure 122 – Cinétique de la réduction de standards d'**AF** par l'**AF**-réductase en présence de NADPH.

La DO mesurée à 340 nm traduit la quantité de NADPH présente dans le milieu réactionnel et qui n'a pas réagi avec l'**AF**.

La variation de la DO finale par rapport au blanc ($\Delta(\text{DO})$) en fonction de la concentration en **AF** est illustrée sur la Figure 123. La réponse est linéaire pour des concentrations en **AF** inférieures à 0.1 mM, mais ne l'est plus au-delà de 0.1 mM. Cela signifie que même si l'**AF** et le NADPH sont initialement introduits dans des proportions stoechiométriques (0.14 mM), au maximum 0.1 mM d'**AF** sera réduit.

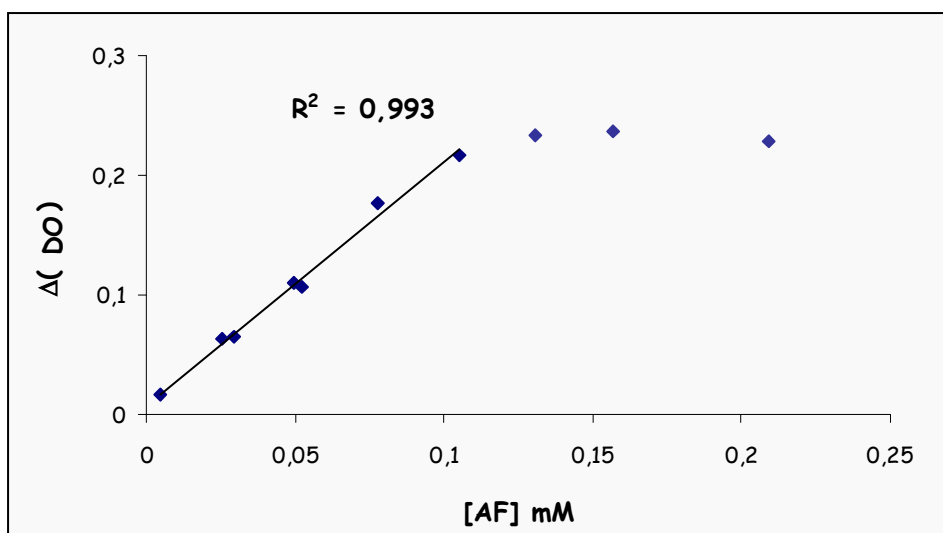


Figure 123 – Courbe de réponse de l'AF dosé par réduction catalysée par l'AF-réductase en présence de NADPH. Tracé de $\Delta(DO)=f([AF])$

II.1.4.2.b. Etude de la spécificité de l'AF-réductase

L'AF-réductase est hautement spécifique de l'AF et ne réagit pas sur le glucose, le fructose ou le saccharose comme l'ont démontré les membres de l'équipe de l'université de Saarbrücken. Nous avons de notre côté testé les AFGOS comme substrats de l'AF-réductase.

Pour démontrer si les AFGOS sont réduits par l'AF-réductase, nous avons introduit les α -(1,6) AFGOS de DP 2, 3 et 4 purs dans le milieu réactionnel en très large excès (supérieur à 1,5 mM) par rapport au NADPH (0.14 mM). Se placer en très large excès de substrat permet d'évaluer la capacité d'un substrat à être réduit. Ces mêmes essais ont été menés en parallèle avec le glucose, le fructose et le saccharose comme témoins.

La Figure 124 montre que le NADPH est très rapidement consommé dans le cas de l'AF, du fait que ce sucre soit en forte concentration. Ce test positif montre que si une molécule est reconnue comme accepteur par l'AF-réductase, on observe une forte diminution de la DO.

Par contre, en ce qui concerne les α -(1,6) AFGOS, la DO reste stable, proche de celle du témoin sans AF, ou celles des témoins glucose, fructose et saccharose.

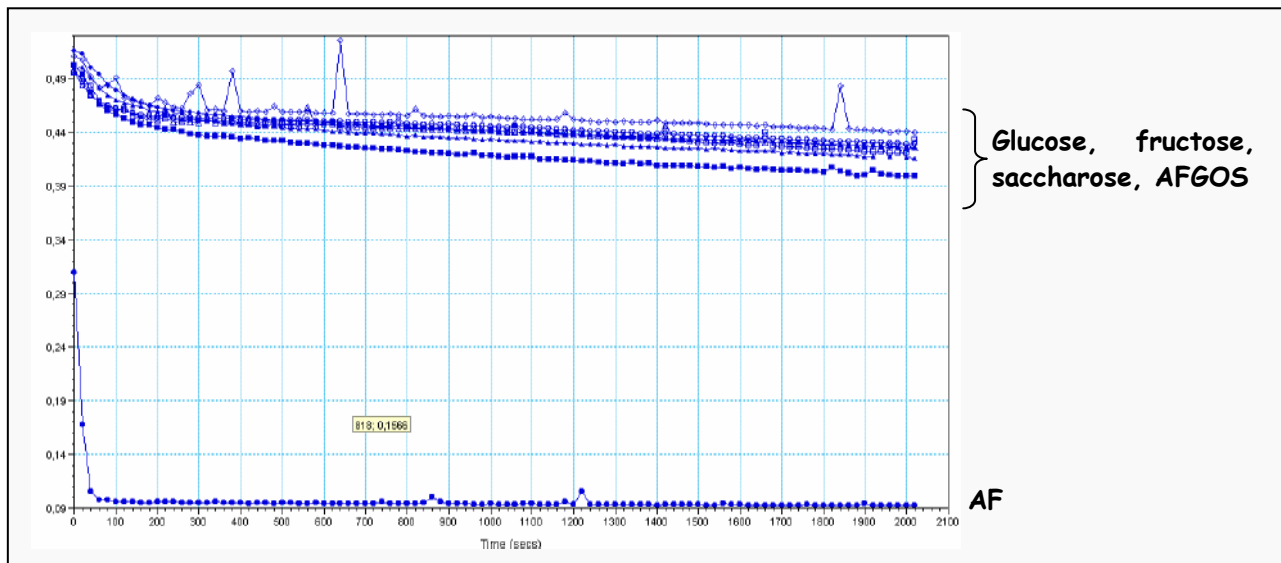


Figure 124 – Evaluation de la spécificité de l'AF-réductase pour différents hydrates de carbone : fructose, glucose, saccharose, AF et AFGOS de DP2, 3 et 4.

Cette expérience montre donc que les α -(1,6) **AFGOS** ne sont pas réduits par l'AF-réductase : cette enzyme est donc hautement spécifique de l'AF. Pour expliquer la différence entre l'AF et les **AFGOS**, penchons nous sur la structure de ces sucres. Les α -(1,6) **AFGOS** comportent un résidu AF à l'extrémité réductrice, et des unités glucose greffées à partir du carbone C6 de l'AF. La fonction carbonyle (sous forme hydratée) reste donc libre, mais la taille de ces composés augmente considérablement. Il semble donc que la géométrie du substrat soit un facteur clé pour la reconnaissance du substrat par l'AF-réductase (Figure 125).

Nous pouvons par conséquent supposé que tous les **AFGOS** synthétisés par les GS de spécificités différentes ne seront pas réduits par l'AF-réductase.

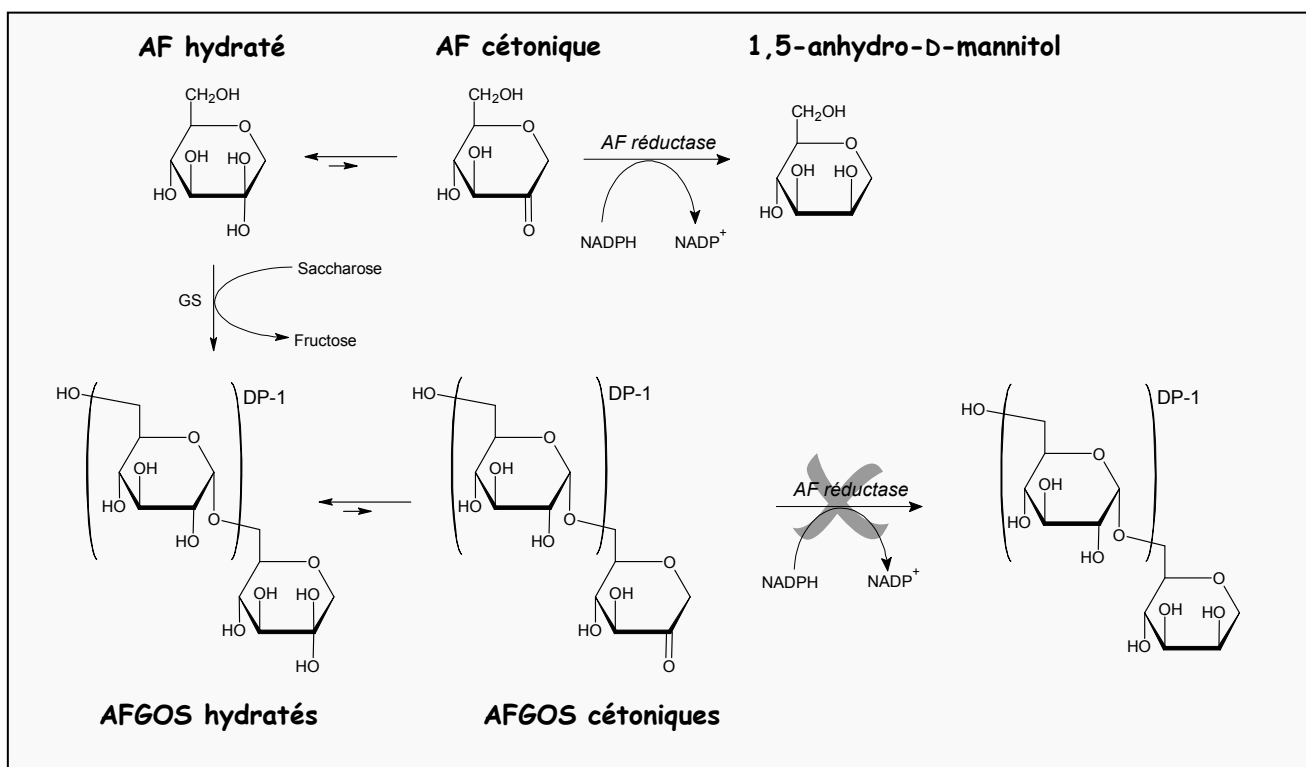


Figure 125 – Schéma de la réduction spécifique de l'AF par l'anhydro-D-fructo-réductase

Nous disposons donc à présent d'une méthode de dosage de l'AF rapide et hautement spécifique, qui peut être utilisée comme test de criblage de banques de variants de GS.

II.1.4.2.c. Développement d'un test adapté au criblage haut débit.

Grâce à la réaction précédemment décrite, nous pouvons doser directement l'AF dans le milieu réactionnel final de glycosylation, sans avoir recours à une quelconque technique de séparation, ce qui constitue un énorme avantage. De plus, la réaction de réduction est rapide, environ 30 min (Figure 125).

Par conséquent, en menant la réaction en format microplaque, la cadence atteint les 4 600 variants criblés en 24h ! Ce débit est évidemment incomparable à celui obtenu avec les techniques de séparation précédemment décrites. Par cette méthode, le test de criblage ne constitue plus une étape limitante.

Cependant, plusieurs inconvénients apparaissent. En effet, l'utilisation d'un cofacteur tel que le NADPH induit des coûts élevés (45 € les 25 mg de NADPH). Ceci limite donc la quantité de NADPH à utiliser par puits, ce qui fixe la concentration maximale en équivalents AF. Pour atteindre de telles concentrations (de l'ordre du milli-molaire), il est nécessaire

d'effectuer des dilutions successives du milieu réactionnel (concentrations en équivalents **AF** de l'ordre de la centaine de milli-molaire), ce qui augmente l'utilisation de microplaques, donc le coût.

Les conditions proposées pour effectuer la réduction de l'**AF** en format microplaque sont les suivantes :

NADPH 0.14 mM avec NaHCO ₃ 0.01 %
AF finale entre 0 et 0.10 mM
AF -réductase à 5 U/mL
100 mM de BisTris, pH 6.5
Volume de 200 µL

Des premiers tests en conditions réelles (culture de l'enzyme, réactions de glucosylation puis de réduction sur microplaques) sont actuellement menés.

II.1.5. Comparaison des méthodes de criblage

Toutes les méthodes de criblage proposées et étudiées dans ce paragraphe, sont comparées dans le Tableau 35. La comparaison des différents cribles est basée sur :

- la cadence d'analyse des variants (calculée sur 24h) ;
- la facilité de mise en œuvre, et son automatisation ;

Tableau 35 - Comparaison des méthodes de criblage des banques de variants générés par ingénierie combinatoire.

(1) Turn-over calculé sur 1 jour, soit 24 h (que la méthode puisse être automatisable ou non). (2) Par CLHP haut débit, on entend avec injecteur sur microplaques.

Test de screening	Principe sur lequel repose la méthode	Cadence ⁽¹⁾ (variants / 24h)	Avantages	Inconvénients	Test applicable ?
Dosage au DNS	Dosage de l' AF à froid par oxydo-réduction avec le DNS	7200 100 variants / plaque 1 plaque toutes les 20 min	Méthode colorimétrique rapide Utile pour cribler la glycosylation du carbone C2 de l' AF Très haut débit	Non-spécifique de l' AF (réaction du DNS avec les AFGOS)	Non (sauf pour cribler la glycosylation en C2 de l' AF)
Test à l'iode	Evaluation de la quantité de polymère de type amylose formé par réaction à l'iode	15 000 100/plaque 1 plaque toutes les 10 min	Facilité de mise en œuvre Très haut débit	Uniquement utilisable pour l' AS Test grossier	Oui (que pour cribler les variants de l' AS)
CCM Révélation à l'orcinol	Orcinol = agent de révélation des sucres	200-600 Sur plaque de 20 cm	Criblage de plusieurs mutants simultanément Débit élevé	Etape de dépôt longue Etape de pulvérisation	Oui
CLHP haut débit ⁽²⁾ colonne carbohydrate Ca ²⁺	Séparation des monosaccharides et disaccharides sur colonne carbohydrate Ca ²⁺	180	Injection directe du milieu de glycosylation Pas de préparation d'échantillon (sauf centrifugation)	Méthode longue (analyse des échantillons les uns après les autres) Débit faible	Oui
CLHP haut débit ⁽²⁾ colonne C18, et dérivatif en oxime	Séparation sur colonne courte de l' AF et des AFGOS au préalable dérivés en oxime	290	Injection directe du milieu de glycosylation Pas de préparation d'échantillon (sauf centrifugation) Débit moyen	Méthode longue (analyse des échantillons les uns après les autres) Etape supplémentaire de dérivatif	Oui
AF -réductase	Réduction de l' AF par l' AF -réductase	4800 100/plaque 1 plaque toutes les 30 min	Spécifique de l' AF (AFGOS non reconnus comme substrats) Très haut débit	Etape supplémentaire de réduction Forte dilution du milieu de glycosylation nécessaire	Oui

II.2. Protocole proposé pour le criblage des banques de variants

Afin de cribler le plus efficacement les banques de variants de GS, il apparaît judicieux de combiner deux méthodes.

Ainsi, afin de permettre un premier criblage à haut débit, la méthode de réduction de l'**AF** par l'**AF**-réductase semble être la plus adaptée : grâce à une cadence élevée, elle permet d'effectuer une première sélection des variants glucosylant le mieux l'**AF**. Par la suite, ce premier crible peut être complété par l'analyse par CLHP haut débit sur colonne carbohydrate Ca^{2+} qui permettra de mesurer le taux de conversion des variants sélectionnés dans la première étape. Bien qu'elle présente une cadence un peu plus faible que la méthode du couplage dérivation en oxime/colonne C18, l'utilisation de la colonne carbohydrate Ca^{2+} permet en effet d'éviter une étape supplémentaire de dérivation. Eventuellement, en vue de contrôler la spécificité des variants retenus, le profil des produits de glucosylation synthétisés pourra être analysé par CLHP sur colonne C18.

Ces deux méthodes seront donc utilisées de façon complémentaire pour cribler les bibliothèques déjà existantes des variants de l'ASR de *L. mesenteroides* B-1355 et de l'AS de *N. polysaccharea*. Un protocole détaillé dans la Figure 126 est proposé.

Des tests de criblage hautement spécifiques pourront également être mis en œuvre. Il s'agit :

- de la méthode colorimétrique au DNS pour la sélection de variants permettant la glucosylation de l'**AF** sur le carbone C2 ;
- de la méthode colorimétrique à l'iode qui ne pourra être appliquée que dans le cas de variants l'AS.

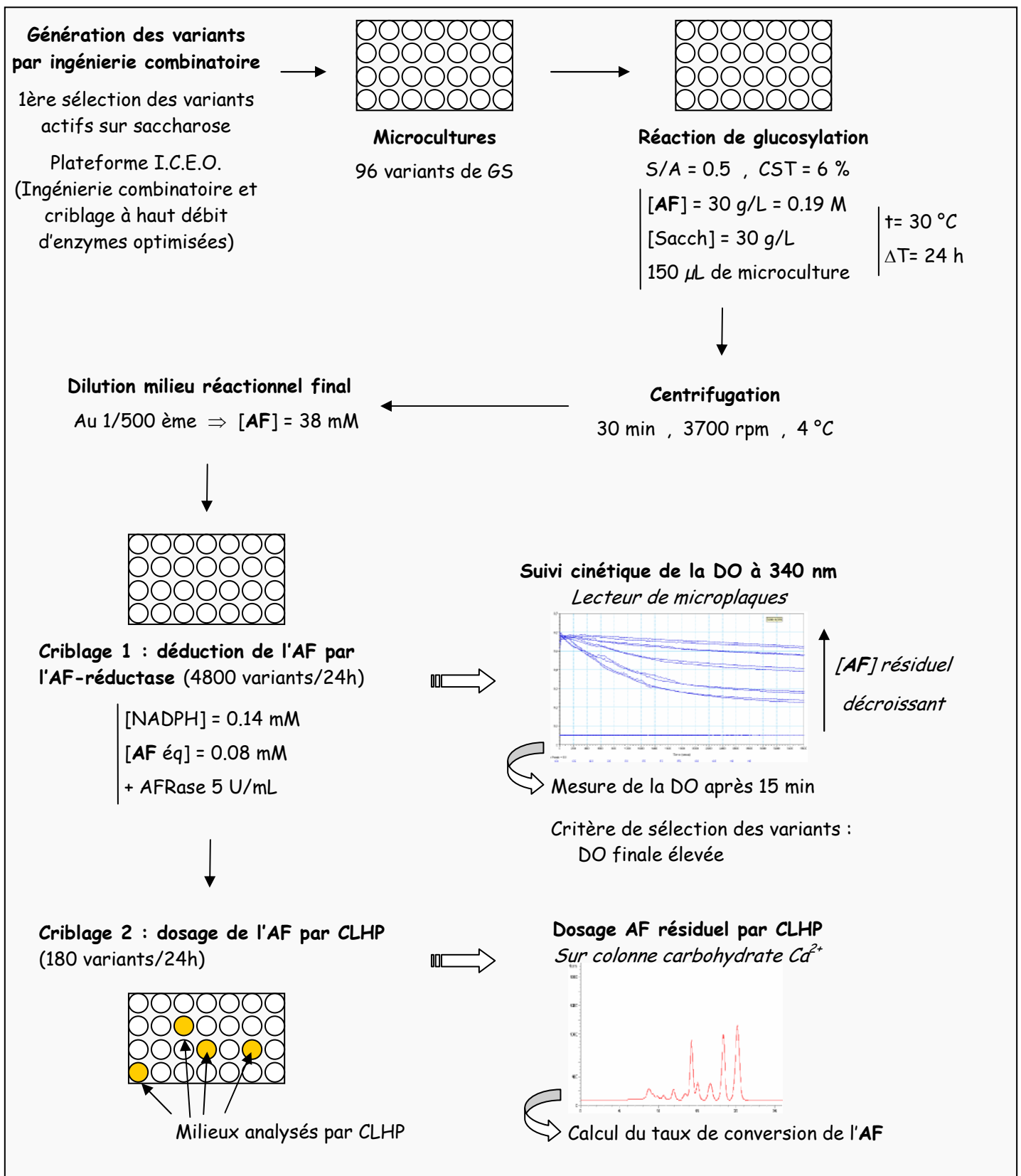


Figure 126 – Protocole proposé pour le criblage des banques de variants en vue de l'obtention d'un variant plus efficace que l'enzyme native pour la glycosylation de l'AF.

Partie III. CONCLUSION

Ce chapitre était consacré à la modification du catalyseur enzymatique de la glucosylation de l'**AF** par des techniques d'ingénierie moléculaire.

Au travers d'une approche rationnelle, nous avons testé plusieurs variants de la DSR de *L. mesenteroides* B-1299. Nous avons ainsi démontré que la délétion de certains domaines de l'enzyme permet de modifier la spécificité et l'efficacité de glucosylation de l'**AF**. Ainsi, le variant GBD-CD2, délété du premier domaine catalytique, permet la synthèse d' α -(1,2) **AFGOS** à partir d'un mélange d' α -(1,6) **AFGOS** obtenu par glucosylation de l'**AF** en présence de la DSR de *L. mesenteroides* B-512F. Quant au variant Δ PS-DSR-E, son utilisation conduit à des taux de glucosylation deux fois supérieurs à ceux de l'enzyme native (80 % dans les conditions optimisées) et a permis de montrer que le premier domaine catalytique est plus efficace pour la glucosylation de l'**AF** que le second domaine catalytique.

Pour la construction de variants de l'AS de *N. polysaccharea*, nous avons utilisé les résultats du chapitre précédent. Ceux-ci avaient mis en évidence l'implication de l'acide aminé Phe 250 dans l'efficacité de la reconnaissance de l'**AF** par l'enzyme. Nous avons donc décidé de muter cet acide aminé en alanine, par exemple, afin de tester cette nouvelle enzyme (en construction à l'heure actuelle).

En parallèle, l'approche combinatoire consiste à cribler de larges banques de variants dans le but de mettre en évidence des enzymes plus efficaces pour la glucosylation de l'**AF**. Cependant, le criblage de dizaines de milliers de variants doit consister en une méthode rapide et automatisable. Nous avons ainsi détaillé dans cette partie plusieurs cribles possibles : la chromatographie sur couche mince, la CLHP avec une colonne carbohydate Ca^{2+} , le couplage dérivation en oxime/CLHP sur colonne C18, et enfin la réduction enzymatique de l'**AF** à l'aide d'une **AF**-réductase.

Après comparaison de ces différentes techniques, nous avons proposé un protocole consistant dans un premier temps à cribler les banques à une cadence de 4800 variants / 24h par la méthode de réduction de l'**AF** par l'**AF**-réductase qui est rapide et hautement spécifique de l'**AF**. Ensuite, l'analyse par CLHP sur colonne carbohydate Ca^{2+} (cadence 280 variants / 24h) permet de déterminer avec précision le taux de conversion de l'**AF** pour les variants sélectionnés dans la première étape.

CONCLUSION GENERALE

A l'heure où la législation sur l'utilisation de molécules actives dans les domaines de l'agroalimentaire, de l'industrie pharmaceutique, de l'hygiène, etc... est de plus en plus stricte, la mise sur le marché de composés d'origine naturelle et aux multiples fonctionnalités ouvre de nouvelles perspectives.

L'anhydro-D-fructose (**AF**) est aujourd'hui un monosaccharide à l'avenir prometteur. La mise au point d'un procédé simple de synthèse enzymatique à partir d'amidon et d' α -1,4-glucane-lyase permet à la société DANISCO de disposer d'**AF** à hauteur de plusieurs centaines de grammes. De nombreux brevets, dont certains déposés par cette même société, témoignent de l'intérêt porté à l'**AF**. Ainsi, grâce à un pouvoir anti-oxydant élevé, des propriétés antidiabétiques et antimicrobiennes, l'**AF** trouve de nombreuses applications, et surtout dans l'industrie agroalimentaire.

Mais DANISCO souhaite encore étendre les applications de l'**AF** et c'est dans cet objectif que le projet européen NEPSA a vu le jour. Il regroupe différents laboratoires d'horizons divers qui travaillent de concert sur la valorisation de l'**AF** par modification chimique, enzymatique ou par copolymérisation.

Mes travaux de thèse présentés dans ce manuscrit constituent l'un des objectifs du projet visant à synthétiser des dérivés glucosylés de l'**AF** à l'aide de glucane-saccharases (GS) de spécificités distinctes, en vue de l'obtention de structures diverses aux propriétés potentiellement différentes.

La mise en pratique de la glucosylation de l'**AF** en présence de saccharose et de glucane-saccharases a ainsi permis de démontrer pour la première fois que l'**AF** est reconnu comme accepteur par les quatre enzymes sélectionnées dans cette étude. Ainsi, en présence de la dextrane-saccharase (DSR) de *L. mesenteroides* B-512F, la DSR de *L. mesenteroides* B-1299, l'alternane-saccharase (ASR) de *L. mesenteroides* B-1355 ou l'amylosaccharase (AS) de *N. polysaccharea*, de nouvelles molécules sont synthétisées. Nous les avons baptisées anhydro-D-fructo-glucooligosaccharides (**AFGOS**), et elles résultent de transferts successifs d'unités glucosyle sur l'**AF**, puis sur les dérivés glucosylés obtenus.

L'isolement par chromatographie liquide à l'échelle préparative de certains de ces **AFGOS** a montré que l'utilisation d'enzymes de spécificités distinctes conduit à l'obtention de différentes familles d'**AFGOS**. Ainsi, les dérivés glucosylés obtenus avec l'AS de *N. polysaccharea* sont composés de liaisons uniquement de type α -(1,4). Ils sont donc différents de ceux synthétisés avec les trois enzymes produites par les souches de *L. mesenteroides* qui

comportent uniquement des liaisons α -(1,6) (et appelés α -(1,6) **AFGOS**). Par contre, l'utilisation des GS de *L. mesenteroides* B-1299 ou de *L. mesenteroides* B-1355 conduit à la formation de régio-isomères. Dans la cas de la DSR de *L. mesenteroides* B-1299, nous avons isolé l'un des régio-isomères et ainsi confirmé la présence d'une liaison α -(1,2) à l'extrémité non-réductrice. Il reste cependant à confirmer la structure des régio-isomères synthétisés avec l'ASR de *L. mesenteroides* B-1355.

L'utilisation de GS de spécificités différentes est donc un moyen efficace pour la synthèse d'un panel de familles d'**AFGOS** aux structures diverses.

Au début de nos travaux, les taux de conversion de l'**AF** obtenus étaient compris entre 20 et 25 % quelle que soit la GS. L'**AF** a donc été qualifié d'accepteur modéré : il se situe entre le fructose, peu glucosylé, et le maltose, l'un des meilleurs accepteurs des GS. L'étape suivante a alors consisté en l'optimisation de la synthèse des **AFGOS**. Nous avons démontré que la glucosylation de l'**AF** est plus efficace (taux de conversion les plus élevés) lorsque le saccharose est employé en excès par rapport à l'accepteur et ce, dans des milieux initialement concentrés. Seule exception, l'AS de *N. polysaccharea* pour laquelle il est préférable de travailler dans des milieux dilués. Ainsi, il est aujourd'hui possible de glucosyler entre 50 et 80% de l'**AF**. Mais dans le même temps, le transfert des résidus glucosyle issus du saccharose n'est pas optimal, et la majorité est utilisée pour la synthèse de glucane. Cependant, le polymère formé est un co-produit facilement éliminé par précipitation, et de plus, le saccharose est un substrat abondant et peu coûteux, à l'inverse de l'**AF**.

Les conditions optimales de production **AFGOS** étant définies, leurs propriétés ont été étudiées. Ainsi, les α -(1,6) **AFGOS** conservent le pouvoir anti-oxydant de l'**AF**, lui-même proche de celui de la vitamine C. En effet, la glucosylation sur le carbone C6 de l'**AF** ne modifie pas le système 2,3-ènediol de l'unité **AF**. Les molécules conservent donc leur pouvoir réducteur. Nous pouvons supposer que les **AFGOS** synthétisés avec les autres GS sont également anti-oxydants car en aucun cas nous n'avons observé de glucosylation sur le carbone C2 de l'**AF**.

En collaboration avec la société Genibio, partenaire du projet NEPSA, il a été démontré que les α -(1,6) **AFGOS** et α -(1,2) **AFGOS** ne présentent pas de propriétés prébiotiques, certainement à cause de l'unité **AF**, fortement réducteur. En effet, des glucooligosaccharides de structure proche mais porteurs d'une unité maltose à l'extrémité réductrice, et synthétisés

en présence de la même DSR de *L. mesenteroides* B-1299 sont aujourd'hui utilisés comme prébiotiques.

D'autres propriétés méritent d'être étudiées, notamment l'action des **AFGOS** dans la prévention ou le traitement du diabète de type II. En effet, BOUCHER et coll. [BOUCHER, J. et coll., 2003] ont démontré que les α -(1,6) GOS et α -(1,2) GOS améliorent la tolérance au glucose [BOUCHER, J. et coll., 2003]. Par ailleurs, l'un des partenaires du projet NEPSA a mis en évidence par des tests *in vivo* que l'**AF** stimule la sécrétion de glucagon-like-peptide 1 et d'insuline mais de façon très éphémère [AHREN, B. et coll., 2000; AHREN, B. et coll., 2001]. Il serait donc intéressant de tester les **AFGOS** dont la structure est proche des GOS (mais avec une unité **AF** à l'extrémité réductrice) contre le diabète de type II.

La réactivité de l'**AF** et des **AFGOS** a également été examinée. Nous avons développé une réaction de dérivation spécifique en oxime de ces molécules. C'est une synthèse propre (effectuée en milieu aqueux), rapide et quantitative qui conduit à des oximes dont la polarité varie en fonction du réactif alkylhydroxylamine. Par ailleurs, l'utilisation des dérivés oximes de l'**AF** comme accepteurs de l'AS de *N. polysaccharea* a permis d'avancer une hypothèse sur les raisons du pouvoir accepteur modéré de l'**AF** grâce à l'utilisation de la modélisation moléculaire. En effet, l'acide aminé Phe 250 serait à l'origine du mauvais positionnement de l'**AF** dans le site actif. Sa mutation en un acide aminé moins encombrant pourrait peut être améliorer encore la glucosylation de l'**AF**.

La dernière partie de cette étude a porté sur la modification du catalyseur enzymatique par ingénierie moléculaire. Par une approche rationnelle, nous avons démontré la pertinence de l'utilisation de variants des GS sélectionnées. Ils permettent par exemple de modifier la structure des **AFGOS** synthétisés ou d'atteindre des taux de conversion supérieurs à ceux obtenus avec les enzymes natives. D'autres variants restent à tester. Par exemple, le GBD-CD1 résultant de la délétion du second domaine catalytique de DSR-E. Suite aux résultats de modélisation moléculaire, des variants de l'AS mutés au niveau du site accepteur sont aussi à envisager.

L'ingénierie combinatoire est une approche complémentaire : elle permet de trouver des variants qui n'auraient pas nécessairement été construits par une approche rationnelle. Pour cribler des banques de variants de l'AS de *N. polysaccharea* ou de l'ASR de *L. mesenteroides* B-1355 déjà disponibles, nous avons développé une méthode de dosage spécifique de l'**AF**

basée sur la réduction catalysée par une **AF**-réductase. Grâce à sa rapidité de criblage, (environ 25 000 variants criblés par semaine), cette méthode permet de répondre à la cadence « haut débit » de génération des clones (environ 10 000 clones par semaines) construits par évolution moléculaire dirigée au laboratoire sur la plateforme ICEO. Dès lors, des campagnes de criblage de banques de variants peuvent débiter afin d'isoler de nouveaux catalyseurs encore plus efficaces pour la glucosylation de l'**AF**.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- ABO, H.; MATSUMURA, T.; KODAMA, T.; OHTA, H.; FUKUI, K.; KATO, K.; et KAGAWA, H. (1991) Peptide sequences for sucrose splitting and glucan binding within *Streptococcus sobrinus* glucosyltransferase (water-insoluble glucan synthetase), *J.Bacteriol.* **173** 989-996
- AHREN, B. (1998) Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) : a gut hormone of potential interest in the treatment of diabetes, *Bioessays* **20** 642-651
- AHREN, B.; HOLST, J.J.; et YU, S. (2000) 1,5-Anhydro-D-fructose increases glucose tolerance by increasing glucagon-like peptide-1 and insulin in mice , *Eur.J.Pharmacol.* **397** 219-255
- AHREN, B. et YU, S. (2001) Use of a cyclic ether for the preparation of a medicament for affecting glucose tolerance, *WO 0151058*
- AKANUMA, H.; OGAWAKA, K.; LEE, Y.S.; et AKANUMA, Y. (1981) Reduced levels of plasma 1,5-anhydroglucitol in diabetic patients, *J.Biochem.* **90** 157-162
- ALBENNE, C (2002) Ingénierie rationnelle de l'amylosaccharase de *Neisseria polysaccharea* : de la structure aux bases moléculaires de la catalyse. Thèse de doctorat, INSA Toulouse, France
- ALBENNE, C.; SKOV, L.K.; MIRZA, O.; GAJHEDE, M.; FELLER, G.; D'AMICO, S.; ANDRE, G.; POTOCKI DE MONTALK, G.; VAN DER VEEN, B.A.; MONSAN, P.; et REMAUD-SIMEON, M. (2003) Molecular basis of the amylose-like polymer formation catalyzed by *Neisseria polysaccharea* amylosucrase, *J.Biol.Chem.* **279** 726-734
- ALBENNE, C.; SKOV, L.K.; MIRZA, O.; GAJHEDE, M.; POTOCKI DE MONTALK, G.; MONSAN, P.; et REMAUD-SIMEON, M. (2002) Maltooligosaccharide disproportionation reaction: an intrinsic property of amylosucrase from *Neisseria polysaccharea*, *FEBS letters* **527** 67-70
- ANDERSEN, S. M., JENSEN, H. M., ISAK, T., MARCUSSEN, J., and YU, S. (2002) Anti-oxydant, *US 2002 051840*
- ANDERSEN, S.M.; JENSEN, H.M.; et YU, S. (2002a) Ascopyrone P: chemical synthesis from D-glucose, *J.Carbohydr.Chem.* **21** 569-578
- ANDERSEN, S.M.; LUNDT, I.; et MARCUSSEN, J. (2000) 1,5-anhydro-D-fructose : stereoselective conversions to 1,5-anhydroalditols and deoxy/amino substituted analogues, *J.Carbohydr.Chem.* **19** 717-725
- ANDERSEN, S.M.; LUNDT, I.; MARCUSSEN, J.; SOTOFTE, I.; et YU, S. (1998) Structure of 1,5-anhydro-D-fructose: X-ray analysis of crystalline acetylated dimeric forms , *J.Carbohydr.Chem.* **17** 1027-1035
- ANDERSEN, S.M.; LUNDT, I.; MARCUSSEN, J.; et YU, S. (1999) 1,5-Anhydro-D-fructose: regioselective acylation with fatty acids , *Carbohydr.Res.* **320** 250-256
- ANDERSEN, S.M.; LUNDT, I.; MARCUSSEN, J.; et YU, S. (2002b) 1,5-anhydrofructose; a versatile chiral building block: biochemistry and chemistry, *Carbohydr.Res* **337** 873-890
- ANDERSEN, S. M., MARCUSSEN, J., LUNDT, I., and YU, S. (2000) 1,5-anhydro-D-fructose substituted with a hydrophobic group for use as anti-oxidant and/or emulsifier , *WO 0056745*
- ARGUELLO-MORALES, M.A.; REMAUD-SIMEON, M.; PIZZUT, S.; SARCABAL, P.; WILLEMOT, R.M.; et MONSAN, P. (2000) Sequence analysis of the gene encoding alternansucrase, a sucrose glucosyltransferase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355, *FEMS Microbiol.Lett.* **182** 81-85
- ARGUELLO-MORALES, M.A.; REMAUD-SIMEON, M.; WILLEMOT, R.M.; VIGNON, M.; et MONSAN, P. (2001) Novel oligosaccharides synthesized from sucrose donor and cellobiose acceptor by alternansucrase, *Carbohydr.Res.* **331** 403-411

AURIOL, D. (1985) Production et purification en continu de la dextrane-saccharase de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. Thèse de doctorat, INSA Toulouse, France

B

- BANAS, J.A.; RUSSEL, R.R.; et FERRETTI, J.J. (1990) Sequence analysis of the gene for the glucan-binding protein of *Streptococcus mutans* Ingbritt., *Infection and Immunity* **58** 667-673
- BANNER, D.W.; BLOOMER, A.C.; PETSKO, G.A.; PHILLIPS, D.C.; POGSON, C.I.; WILSON, I.A.; CORRON, P.H.; FURTH, A.J.; MILMAN, J.D.; OFFORD, R.E.; PRIDLE, J.D.; et WALEY, S.G. (1975a) Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 Å resolution using amino acid sequence data, *Nature* **255** 609-614
- BANNER, D.W.; BLOOMER, A.C.; PETSKO, G.A.; PHILLIPS, D.C.; POGSON, C.I.; WILSON, I.A.; CORRON, P.H.; FURTH, A.J.; MILMAN, J.D.; OFFORD, R.E.; PRIDLE, J.D.; et WALEY, S.G. (1975b) Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 Å resolution using amino acid sequence data, *Nature* **255** 609-614
- BAUTE, M. A., BAUTE, M. R., and DEFFIEUX, M. G. (1989) Enzymatic preparation of 1,5-anhydro-D-fructose , *FR* 2617502
- BAUTE, M.A.; BAUTE, M.R.; et DEFFIEUX, M.G. (1989) Fungal bioconversions yielding unusual antibiotic pyrones from sugars. XV. Biogenesis of 1,5-D-anhydrofructose, the precursor of microthecin in morels: a novel degradation of α -D-1,4-glucans such as glycogen or starch , *Bull.Soc.Pharm.* **128** 9-18
- BAUTE, M.A.; DEFFIEUX, M.G.; BAUTE, M.R.; BADO, A.; VERCAUTEREN, J.; LEGER, J.M.; et NEVEU, A. (1991) Fungal enzymic activity degrading 1,4- α -D-glucans to echinosporin (5-epipentenomycin D) , *Phytochemistry* **30** 4211-
- BAUTE, M.A.; DEFFIEUX, M.G.; VERCAUTEREN, J.; BAUTE, M.R.; et BADO, A. (1993) Enzymic activity degrading 1,4--glucans to ascopyrones P and T in Pezizales and Tuberales, *Phytochemistry* **33** 41-45
- BAUTE, M.R.; BAUTE, M.A.; et DEFFIEUX, M.G. (1986) Bioconversions fongiques produisant, à partir de sucres, des composés pyroniques inhabituels à activité antibiotique. XIV - Mécanisme enzymatique vraisemblable de la formation de la microthécine et de la cortalcérone, *Bull.Soc.Pharm.* **125** 29-36
- BAUTE, M.R.; BAUTE, M.A.; et DEFFIEUX, M.G. (1987) Proposed pathway to the pyrones cortalcérone and microthecin in fungi , *Phytochemistry* **25** 1395-1397
- BELSHAW, N.J. et WILLIAMSON, G. (1993a) Specificity of the binding domain of glucoamylase 1, *Eur.J.Biochem.* **211** 717-724
- BELSHAW, N.J. et WILLIAMSON, G. (1993b) Specificity of the binding domain of glucoamylase 1, *Eur.J.Biochem.* **211** 717-724
- BINDER, T.P.; COTE, G.L.; et ROBYT, J.F. (1983) Disproportionation reactions catalysed by *Leuconostoc* and *Streptococcus* glucansucrases, *Carbohydr.Res.* **124** 275-286
- BINDER, T.P. et ROBYT, J.F. (1985a) Inhibition of *Streptococcus mutans* 6715 glucosyltransferases by sucrose analogs modified at positions 6 and 6', *Carbohydr.Res.* **140** 9-20
- BINDER, T.P. et ROBYT, J.F. (1985b) Inhibition of *Streptococcus mutans* 6715 glucosyltransferases by sucrose analogs modified at positions 6 and 6', *Carbohydr.Res.* **140** 9-20
- BOJSEN, K.; YU, S.; KRAGH, K.M.; et MARCUSSEN, J. (1999a) A group of α -1,4-glucan lyases and their genes from the red alga *Gracilariopsis lemaneiformis* : purification, cloning, and heterologous expression, *Biochim.Biophys.Acta.* **1430** 396-402

- BOJSEN, K.; YU, S.; KRAGH, K.M.; et MARCUSSEN, J. (1999b) A group of α -1,4-glucan lyases and their genes from the red alga *Gracilariopsis lemaneiformis* : purification, cloning, and heterologous expression, *Biochim.Biophys.Acta.* **1430** 396-402
- BOJSEN, K.; YU, S.; et MARCUSSEN, J. (1999c) A group of α -1,4-glucan lyase genes from the fungi *Morchelle costata*, *M. vulgaris* and *Peziza ostracoderma*. Cloning, complete sequencing and heterologous expression, *Plant Molecular Biology* **40** 445-454
- BOUCHER, J.; DAVIAUD, D.; REMAUD-SIMEON, M.; CARPENE, C.; SAULNIER-BLACHE, J.S.; MONSAN, P.; et VALET, P. (2003) Effect of non-digestible gluco-oligosaccharides on glucose sensitivity in high fat diet fed mice, *J.Physiol.Biochem.* **59** 169-174
- BOVEY, F.A. (1959) Enzymatic polymerisation I. Molecular weight and branching during the formation of dextran, *J.Polym.Sci.* **35** 167-182
- BOZONNET, S.; DOLS-LAFARGUE, M.; FABRE, E.; PIZZUT, S.; REMAUD-SIMEON, M.; MONSAN, P.; et WILLEMOT, R.M. (2002) Molecular characterization of DSR-E, an α -1,2 linkage synthesising dextransucrase with two catalytic domains, *J.Bact.* **184** 5753-5761
- BREHM, M.; DAUBEN, W.G.; KOHLER, P.; et LICHTENTHALER, F.W. (1987) Proof of the (S,S) configuration of (-) bissetone by synthesis from D-glucose, *Angew.Chem.Int.Ed.Engl.* **26** 1271-1271
- BROBERG, A.; KENNE, L.; et PEDERSEN, M. (1996) Presence of microthecin in the red alga *Gracilariopsis lemaneiformis* and its formation from 1,5-anhydro-D-fructose , *Phytochemistry* **41** 151-154
- BROBERG, A.; KENNE, L.; et PEDERSEN, M. (1999) Analysis of 1,5-Anhydro-D-fructose, Microthecin, and 4-Deoxy-glycero-hexo-2,3-diulose in Algae Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry in Selected Ion Monitoring Mode, *Anal.Biochem.* 35-42
- BUCHHOLZ, K., GLUMER, A., and YU, S. (2004) Synthesis of copolymers containing anhydrofructose derivatives, *WO 0132728*
- BUCHTER-LARSEN, A. et MARCUSSEN, J. (1998) Preparing an anti-oxidant in situ in plants by genetic transformation , *WO 9850532*
- BUCHTER-LARSEN, A., MORGAN, A. J., and YU, S. (2002) Antimicrobial use of anhydro-d-fructose derivatives, *US 2002 170083*
- BUCHTER-LARSEN, A., MORGAN, A. J., and YU, S. (2003) Antimicrobial use of anhydro-d-fructose derivatives, *WO 03 037906*

C

- CAMPBELL, J.A.; DAVIES, G.J.; BULONE, V.; et HENRISSAT, B. (1997) A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities, *Biochem.J.* **326** 929-939
- CARDELLINA, J.H.; HENDRICKSON, R.L.; et MANDFREDI, K.P. (1987) Bissetone, a unique antimicrobial pyranone from the gorgonian *Briareum polyanthea*, *Tetrahedron letters* **28 (7)** 727-730
- CERNING, J. (1990) Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria, *FEMS Microbiol.Rev.* **7** 113-130
- COTE, G.L. et DUNLAP, C.A. (2003a) Alternansucrase acceptor reactions with methyl hexopyranosides, *Carbohydr.Res.* **338** 1961-1967
- COTE, G.L.; HOLT, S.M.; et MILLER-FOSMORE, C. (2003b) Prebiotic oligosaccharides via alternansucrase acceptor reactions, *American Chemical Society* **849** 76-89

- COTE, G.L. et ROBYT, J.F. (1982a) Acceptor reactions of alternansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355, *Carbohydr.Res.* **111** 127-142
- COTE, G.L. et ROBYT, J.F. (1982b) Isolation and partial characterization of an extracellular glucansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355 that synthesizes an alternating (1 → 6), (1 → 3)- α -D-glucan, *Carbohydrate Research* **101** 57-74
- COTE, G.L. et ROBYT, J.F. (1983) The formation of α -(1,3) branch linkages by an exocellular glucansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-742, *Carbohydr.Res.* **119** 141-156
- COTE, G.L. et ROBYT, J.F. (1984) The formation of α -D-(1,3) branch linkages by a D-glucansucrase from *Streptococcus mutans* 6715 producing a soluble D-glucan, *Carbohydr.Res.* **127** 95-107
- COUTINHO, P.M. et HENRISSAT, B. (1999) Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach, Dans : Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering (Eds : GILBERT, H. J., DAVIES, G., HENRISSAT, B., and SVENSSON, B. The Royal Society of Chemistry) pp 3-12

D

- DA SILVA, A.C.; FERRO, J.A.; REINACH, F.C.; FURLAN, L.R.; QUAGGIO, R.B.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; VAN SLUYS, M.A.; ALMEIDA, N.F.; ALVES, L.M.; DO AMARAL, A.M.; BERTOLINI, M.C.; CAMARGO, L.E.; CAMAROTTE, G.; CANNAVAN, F.; CARDOZO, J.; CHAMBERGO, F.; CIAPINA, L.P.; CICARELLI, R.M.; COUTINHO, L.L.; CURSINO-SANTOS, J.R.; EL-DORRY, H.; FARIA, J.B.; FERREIRA, A.J.; FERRO, M.I.; FORMIGHIERI, E.F.; FRANCO, M.C.; GRAGGIO, C.C.; GRUBER, A.; KATSUYAMA, A.M.; KISHI, L.T.; LEITE, R.P.; LEMOS, E.G.; LEMOS, M.V.; LOCALI, E.C.; MACHADO, M.A.; MADEIRA, A.M.; MARTINEZ-ROSSI, N.M.; MARTINS, E.C.; MEIDANIS, J.; MENCK, C.F.; MIYAKI, C.Y.; MOON, D.H.; MOREIRA, L.M.; NOVO, M.T.; OKURA, V.K.; OLIVEIRA, M.C.; OLIVEIRA, V.R.; PEREIRA, H.A.; ROSSI, A.; SENA, J.A.; SILVA, C.; DE SOUZA, R.F.; SPINOL, L.A.; SPINOLA, L.A.; TAKITA, M.A.; TAMURA, R.E.; TEIXEIRA, E.C.; TEZZA, R.I.; TRINDADE DOS SANTOS, M.; TRUFFI, D.; TSAI, S.; WHITE, F.F.; SETUBAL, J.C.; et KITAJIMA, J.P. (2002a) Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities, *Nature* **417** 459-463
- DA SILVA, A.C.; FERRO, J.A.; REINACH, F.C.; FURLAN, L.R.; QUAGGIO, R.B.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; VAN SLUYS, M.A.; ALMEIDA, N.F.; ALVES, L.M.; DO AMARAL, A.M.; BERTOLINI, M.C.; CAMARGO, L.E.; CAMAROTTE, G.; CANNAVAN, F.; CARDOZO, J.; CHAMBERGO, F.; CIAPINA, L.P.; CICARELLI, R.M.; COUTINHO, L.L.; CURSINO-SANTOS, J.R.; EL-DORRY, H.; FARIA, J.B.; FERREIRA, A.J.; FERRO, M.I.; FORMIGHIERI, E.F.; FRANCO, M.C.; GRAGGIO, C.C.; GRUBER, A.; KATSUYAMA, A.M.; KISHI, L.T.; LEITE, R.P.; LEMOS, E.G.; LEMOS, M.V.; LOCALI, E.C.; MACHADO, M.A.; MADEIRA, A.M.; MARTINEZ-ROSSI, N.M.; MARTINS, E.C.; MEIDANIS, J.; MENCK, C.F.; MIYAKI, C.Y.; MOON, D.H.; MOREIRA, L.M.; NOVO, M.T.; OKURA, V.K.; OLIVEIRA, M.C.; OLIVEIRA, V.R.; PEREIRA, H.A.; ROSSI, A.; SENA, J.A.; SILVA, C.; DE SOUZA, R.F.; SPINOL, L.A.; SPINOLA, L.A.; TAKITA, M.A.; TAMURA, R.E.; TEIXEIRA, E.C.; TEZZA, R.I.; TRINDADE DOS SANTOS, M.; TRUFFI, D.; TSAI, S.; WHITE, F.F.; SETUBAL, J.C.; et KITAJIMA, J.P. (2002b) Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities, *Nature* **417** 459-463
- DAVIES, G. et HENRISSAT, B. (1995) Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases, *Structure* **3** 853-859
- DAVIES, G.; WILSON, K.S.; et HENRISSAT, B. (1997) Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases, *Biochem.J.* **321** 11707-11713
- DECLERCK, N.; JOYET, P.; GAILLARDIN, C.; et MASSON, J.M. (1990) Use of amber suppressors to investigate the thermostable *Bacillus stearothermophilus* α -amylase. Amino acid at 6 histidine residues reveal a critical position, *J.Biol.Chem.* **265** 15481-15488
- DEFFIEUX, M.G.; BAUTE, M.A.; BAUTE, M.R.; ATFANI, M.M.; et CARPY, M.A. (1986) Bioconversions fongiques produisant, a partir de sucres, des composés pyroniques inhabituels à activité antibiotique. XIII:

- Identification du composé glucidique se comportant comme un précurseur de la microthécine: l' anhydro-1,5-D-fructose, *Bull.Soc.Pharm.* **125** 17-28
- DEFFIEUX, M.G.; BAUTE, M.R.; BAUTE, M.A.; ATFANI, M.M.; et CARPY, M.A. (1987) 1,5-D-anhydrofructose, the precursor of the pyrone microthecin in *Morchella vulgaris* , *Phytochemistry* **26** 1391-1393
- DEMUTH, K.; JORDENING, H.J.; et BUCHHOLZ, K. (2002) Oligosaccharide synthesis : new unconventional acceptors, *Carbohydr.Res.* **337** 1811-1820
- DEVULAPALLE, K.S. et MOOSER, G. (1994) Subsite specificity of the active site of glucosyltransferases from *Streptococcus sobrinus*, *J.Biol.Chem.* **269** 11967-11971
- DIBDIN, G.H. et SHELLIS, R.P. (1988) Physical and biochemical studies of *Streptococcus mutans* sediments suggest new factors linking the cariogenicity of plaque with its extracellular polysaccharide content, *J.Dent.Res.* **67** 890-895
- DITSON, S.L. et MAYER, R.M. (1984) Dextranucrase : the direction of chain growth during autopolymerisation, *Carbohydr.Res.* **126** 170-175
- DITSON, S.L.; SUNG, S.M.; et MAYER, R.M. (1986) Dynamic reactivities of dextranucrase, *Arch.Biochem.Biophys.* **249** 53-60
- DJOUZY, Z. et ANDRIEUX, C. (1997) Compared effects of three oligosaccharides on metabolism of intestinal microflora in rats inoculated with a human faecal flora, *British Journal of Nutrition* **78** 313-324
- DOLS-LAFARGUE, M.; REMAUD-SIMEON, M.; WILLEMOT, R.M.; VIGNON, M.; et MONSAN, P. (1998) Structural characterization of the maltose acceptor-products synthesized by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 dextranucrase, *Carbohydr.Res.* **305** 549-559
- DOLS-LAFARGUE, M.; WILLEMOT, R.M.; MONSAN, P.; et REMAUD-SIMEON, M. (2001a) Factors affecting α -1,2 glucooligosaccharide synthesis by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 dextranucrase, *Biotechnol.Bioeng.* **74**
- DOLS-LAFARGUE, M.; WILLEMOT, R.M.; MONSAN, P.; et REMAUD-SIMEON, M. (2001b) Reactor optimization for α -1,2 glucooligosaccharide synthesis by immobilized dextranucrase, *Biotechnol.Bioeng.* **75** 276-284
- E**
- EBERT, K.H. et BROSCHE, M. (1967a) Origin of branches in native dextrans, *Biopolymers* **5** 423-430
- EBERT, K.H. et BROSCHE, M. (1967b) Origin of branches in native dextrans, *Biopolymers* **5** 423-430
- EBERT, K.H. et SCHENK, G. (1968) Mechanism of biopolymer growth : the formation of dextran and levan, *Adv.Enzymol.* **30** 179-210
- F**
- FABRE, E. (2004) Caractérisation de la dextrane saccharase DSR-E de *Leuconostoc mesenteroides*, et application à la synthèse de composés prébiotiques. Thèse de doctorat, INSA Toulouse, France
- FABRE, E.; BOZONNET, S.; ARCACHE, A.; WILLEMOT, R.M.; VIGNON, M.; MONSAN, P.; et REMAUD-SIMEON, M. (2005) Role of the two catalytic domains of DSR-E dextranucrase and their involvement in the formation of highly α -(1,2) branched dextran, *J.Bact.* **sous presse**
- FIGURES, W.R. et EDWARDS, J.R. (1976b) α -D-Glucopyranosyl fluoride as a D-glucopyranosyl donor for a glycosyltransferase complex from *Streptococcus mutans* FA1, *Carbohydr.Res.* **48** 245-253

- FIGURES, W.R. et EDWARDS, J.R. (1976a) α -D-Glucopyranosyl fluoride as a D-glucopyranosyl donor for a glycosyltransferase complex from *Streptococcus mutans* FA1, *Carbohydr.Res.* **48** 245-253
- FITZGERALD, R.J. et KEYES, P.J. (1960) Demonstration of the tiologic role of *Streptococci* in experimental caries in the hamster, *J.Am.Dent.Assoc.* **61** 9-19
- FREIMUND, S.; HUWIG, A.; GIFFHORN, F.; et KOPPER, S. (1998a) Rare keto-aldoses from enzymic oxidation: substrates and oxidation products of pyranose 2-oxidase, *Chem.Eur.J.* **4** 2442-2455
- FREIMUND, S. et KOPPER, S. (1998b) Dimeric structures of 1,5-anhydro-D-fructose, *Carbohydr.Res.* **308** 195-200
- FUJIMOTO, K.; SAKATA, T.; KURATA, T.; OKABE, Y.; et ARASE, K. (1988) Effect of an amino group at carbon 2 of deoxyglucose analogues on anorexia in the rat, *Eur.J.Pharm.* 147-477
- FUJISUE, M.; YOSHINAGA, K.; MUROYA, K.; ABE, J.I.; et HIZUKURU, S. (1999) Preparation and antioxidative activity of 1,5-anhydrofructose, *J.Appl.Glycosci.* **46** 439-444

G

- GARVIE, E. I. (1984) *Methods Microbio.* (Eds : BERGAN, T. Academic Press)
- GENGHOH, D.S. et HEHRE, E.J. (1972) De novo glycosidic linkage synthesis by glycosylases : α -D-glucosylfluoride polymerization by dextranase, *Proc.Soc.Exp.Bio.Med.* **140** 1298-1301
- GERMAINE, G.R. et SCHACHTELE, C.F. (1976) *Streptococcus mutans* dextransucrase: mode of interaction with high molecular weight dextran and role in cellular aggregation, *Infect.Immun.* **13** 365-372
- GIBSON, G.R. et ROBERFROID, M. (1995a) Dietary modulation of the human colonic microflora: introducing the concept of prebiotics, *J.Nutr.* **125** 1401-1412
- GIBSON, G.R. et ROBERFROID, M. (1995b) Dietary modulation of the human colonic microflora: introducing the concept of prebiotics, *J.Nutr.* **125** 1401-1412
- GIFFARD, P.M.; SIMPSON, C.L.; MILWARD, C.P.; et JACQUES, N.A. (1991) Molecular characterization of a cluster of at least two glucosyltransferases genes in *Streptococcus salivarius* ATCC 25975, *J.Gen.Microbiol.* **137** 2577-2593
- GIFFHORN, F.; KOPPER, S.; HUWIG, A.; et FREIMUND, S. (2000) Rare sugars ans sugar-based synthons by chemo-enzymatic synthesis, *Enzyme Microb.Technol.* **27** 734-742
- GLOEKNOER, F.O.; KUBE, M.; NAUER, M.; TEELING, H.; LOMBARDOT, T.; LUDWIG, W.; GADE, D.; BECK, A.; BORZYM, K.; HEITMANN, K.; RABUS, R.; SCHLESNER, H.; AMANN, R.; et REINHARDT, R. (2003) Complete genome sequence of the marine planstomycete *Pirellula* sp. strain 1, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **100** 8298-8303
- GOODMAN, S.D.; WEIL, R.M.; et STERN, K.G. (1955) On the mechanism of dextran formation. Chromatographic studies with C¹⁴-labelled sugars, *J.Biol.Chem.* **217** 977-985

GROENWALL, A. J. et INGELMAN, G. A. (1948) Manufacture of infusion and injection fluids, *US 2 437 518*

H

- HAMADA, S. et SLADE, H.D. (1980) Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*, *Microbiol.Rev.* **44** 331-384
- HEHRE, E.J. et HAMILTON, D.M. (1946) Bacterial synthesis of an amylopectin-like polysaccharide from sucrose, *J.Biol.Chem.* **166** 77-78

- HENRISSAT, B. (1991a) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities, *Biochem.J.* **280** 309-316
- HENRISSAT, B. (1991b) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities, *Biochem.J.* **280** 309-316
- HENRISSAT, B. et BAIROCH, A. (1993) New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities, *Biochem.J.* **293** 781-788
- HILL, K. (1997) Alkylpolyglucosides - Technology, properties and applications (Eds : VON RYBINSKI, W. and STOLL, G. VCH WEINHEIM)
- HIZAKU, S., ABE, J. I., MUROYA, T., YOSHINAGA, K., ISHIBA, H., and FUJISUE, M. (2002) use of 1,5-anhydrofructose as food color, *JP 2002 027945*
- HIZAKU, S., TAKEDA, Y., ABE, J. I., MUROYA, M., YOSHINAGA, K., and FUJISUE, M. (2001) 1,5-D-anhydrofructose for inhibiting bacterial proliferation , *JP 2001089377*
- HIZUKURI, S., ABE, J. I., TAKEDA, Y., MUROYA, K., YOSHINAGA, K., FUJISUE, M., and ISHIBA, H. (2001) Bacterial growth regulators or inhibitors with the use of 1,5-anhydro-D-fructose in agriculture, food, pharmaceuticals, and cosmetics, *US 2003/0161862*

J

- JARGLIS, P. et LICHTENTHALER, F.W. (1982) Stereospecific synthesis of (S,S)-Palythazine from D-glucose, *Angew.Chem.Int.Ed.Engl.* **21** 141-
- JOUCLA, G. (2003) Caractérisation de l'alternane-saccharase de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355: approche rationnelle et aléatoire par la conception de nouvelles glucane-saccharases. Thèse de doctorat,
- JUNG, M.S. et MAYER, R.M. (1981) Dextranucrase: donor substrate reactions, *Arch.Biochem.Biophys.* **208** 288-295

K

- KAMETANI, S.; SHIGA, Y.; et AKANUMA, H. (1996) Hepatic production of 1,5-anhydrofructose and 1,5-anhydroglucitol in rat by the third glycogenolytic pathway, *Eur J.Biochem.* **242** 832-838
- KATO, C.; NAKANO, Y.; et KURAMITSU, H.K. (1992b) Molecular genetic analysis of the catalytic site of *Streptococcus mutans* glucosyltransferases, *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **189** 1184-1188
- KATO, C.; NAKANO, Y.; et KURAMITSU, H.K. (1992a) Molecular genetic analysis of the catalytic site of *Streptococcus mutans* glucosyltransferases, *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **189** 1184-1188
- KATO, C.; NAKANO, Y.; et KURAMITSU, H.K. (1992c) Molecular genetic analysis of the catalytic site of *Streptococcus mutans* glucosyltransferases, *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **189** 1184-1188
- KENNE, L., PEDERSEN, M., and YU, S. (1994) A new glucan lyase producing 1,5-anhydrofructose, *WO 9409122*
- KOBAYASHI, M.; YOKOYAMA, I.; et MATSUMADA, K. (1984) Activation of dextranucrase from *leuconostoc mesenteroides* by the substrate dextran, *Agric.Biol.Chem.* **48** 221-223
- KOBAYASHI, M.; YOKOYAMA, I.; et MATSUMADA, K. (1985) Effectors differently modulating the dextranucrase activity of *Leuconostoc mesenteroides*, *Agric.Biol.Chem.* **49** 3189-3195
- KOBAYASHI, M.; YOKOYAMA, I.; et MATSUMADA, K. (1986) Substrate binding sites of *Leuconostoc* dextranucrase evaluated by inhibition kinetics, *Agric.Biol.Chem.* **50** 2585-2590

KOEPSSELL, H.J.; TSUCHIYA, H.; HELLMAN, N.N.; HOFFMEN, C.A.; SHARPE, E.S.; et JACKSON, R.W. (1953) Enzymatic synthesis of dextran. Acceptor specificity and chain initiation, *J.Biol.Chem.* **200** 793-801

KONISHI, N.; TORII, Y.; YAMAMOTO, T.; OHTA, H.; FUKUI, K.; OHTA, H.; HANAMOTO, S.; MATSUNO, H.; KOMATSU, H.; KODAMA, T.; et KATAYAMA, E. (1999) Structure and enzymatic properties of genetically truncated forms of the water-insoluble glucan-synthesizing glucosyltransferase from *Streptococcus sobrinus*, *Journal of Biochemistry (Tokyo)* **126** 287-295

KUHN, A. M. (2004) 1,5-anhydro-D-frukto-reduktase aus *Si,orhizobium morelense* S-30.7.5.: isolierung, charakterisierung, überexpression in *E.coli* sowie verwendung als neuer biokatalysator. Thèse de doctorat,

KURATA, T.; MIYAKE, N.; OTSUKA, T.; MIYAKE, N.; et OTSUKA, Y. (1996) Formation of L-threonolactone and oxalic acid in the autoxidation reaction of L-ascorbic acid – Possible involvement of singlet oxygen, *Biosci.Biotech.Biochem.* **60** 1212-1214

L

LEATHERS, T.D.; HAYMAN, G.T.; et COTE, G.L. (1995) Rapid screening of *Leuconostoc mesenteroides* mutants for elevated proportions of alternan to dextran, *Curr.Microbiol.* **31** 19-22

LEE, S.S.; YU, S.; et WITHERS, S.G. (2002) alpha-1,4-Glucan Lyase Performs a Trans-Elimination via a Nucleophilic Displacement Followed by a Syn-Elimination, *JACS* **124** 4948-4949

LEE, S.S.; YU, S.; et WITHERS, S.G. (2003) Detailed dissection of a mechanism for glycoside cleavage: the alpha-1,4-Glucose, *Biochemistry* **42** 13081-13090

LICHTENTHALER, F.W.; EL ASHRY, E.S.H.; et GOECKEL, V.H. (1980) Sugar enolones. XIV. A convenient access to 1,5-anhydroketoses, *Tetrahedron lett.* **21** 1429-1432

LICHTENTHALER, F.W.; SCHWIDETZKY, S.; et NAKAMURA, K. (1990) Acylated 2-oxoglycosyl bromides : exploration of their reaction potential, *Tetrahedron lett.* **31** 71-74

LOPEZ-MUNGUIA, A.; PELENC, V.; REMAUD-SIMEON, M.; BITON, J.; MICHEL, J.; LANG, C.; et MONSAN, P. (1993) Production and purification of alternansucrase, glucosyltransferase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355 for the synthesis of oligoalternans, *Enz.Microb.Technol.* **15** 77-85

M

MACGREGOR, E.A.; JESPERSEN, H.M.; et SVENSSON, B. (1996) A circularly permuted [alpha]-amylase-type [alpha]/[beta]-barrel structure in glucan-synthesizing glucosyltransferases, *FEBS letters* **378** 263-266

MACKENZIE, C.R.; MCDONALD, I.J.; et JOHNSON, K.G. (1978) Glycogen metabolism in the genus *Neisseria*: synthesis from sucrose by amylosucrase, *Can.J.Microbiol.* **24** 357-362

MATSUURA, Y.; KUSUNOKI, M.; HARADA, W.; et KAKUDO, M. (1984) Structure and possible catalytic residues of Taka-amylase A, *J.Biochem.(Tokyo)* **95** 697-702

MAYER, R.M.; MATTHEWS, M.M.; FUTERMAN, C.L.; PARNAIK, V.K.; et JUNG, S.M. (1981) Dextranucrase: acceptor substrate reactions, *Arch.Biochem.Biophys.* **208** 278-287

MERCK, E. (1980) Révélateurs pour la chromatographie en couche mince et sur papier (Eds :

MERLET, D.; MELLADO, M.; DEFFIEUX, M.G.; BAUTE, M.A.; CAMBAR, J.; et BAUTE, M.R. (1991) Cytotoxic effects of biogenetically related pyrone and cyclopentenone fungal metabolites on a renal cell line (LLC-PK1), *Bull.Soc.Pharm* 5-16

MIZUNO, H.; MORITA, M.; et AKANUMA, H. (1995) Phosphorylation of 1,5-anhydro-D-glucitol in mammalian cells, *J.Biochem.* **118** 411-417

- MONCHOIS, V.; ARGUELLO-MORALES, M.A.; et RUSSEL, R.R. (1999a) Isolation of an active catalytic core of *Streptococcus downei* MFe28 GTF-I glucosyltransferase, *Journal of bacteriology* **181** 2290-2292
- MONCHOIS, V.; LAKEY, J.H.; et RUSSEL, R.R.B. (1999b) Secondary structure of *Streptococcus downei* GTF-I glucansucrase, *FEMS Microbiology Letters* **177** 243-248
- MONCHOIS, V.; REMAUD-SIMEON, M.; RUSSEL, R.R.; MONSAN, P.; et WILLEMOT, R.M. (1997a) Characterization of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextransucrase (DSR-S) and identification of amino-acid residues playing a key role in enzyme activity, *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **48** 465-472
- MONCHOIS, V.; REMAUD-SIMEON, M.; RUSSEL, R.R.; MONSAN, P.; et WILLEMOT, R.M. (1997b) Characterization of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextransucrase (DSR-S) and identification of amino-acid residues playing a key role in enzyme activity, *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **48** 465-472
- MONCHOIS, V.; REVERTE, A.; REMAUD-SIMEON, M.; MONSAN, P.; et WILLEMOT, R.M. (1998) Effect of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextransucrase carboxy- terminal deletions on dextran and oligosaccharide synthesis, *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **64** 1644-1649
- MONCHOIS, V.; VIGNON, M.; ESCALIER, P.C.; SVENSSON, B.; et RUSSEL, R.R. (2000) Involvement of Gln 937 of *Streptococcus downei* GTF-I glucansucrase in transition-state stabilisation, *Eur.J.Biochem.* **2000** 4127
- MONCHOIS, V.; WILLEMOT, R.M.; REYN, A.; CROUX, C.; et MONSAN, P. (1996) Cloning and sequencing of a gene coding for a novel dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 synthesising only α -1,6 and α -1,3 linkages, *Gene* **182** 23-32
- MONSAN, P.; BOZONNET, S.; ALBENNE, C.; JOUCLA, G.; WILLEMOT, R.M.; et REMAUD-SIMEON, M. (2001) Homopolysaccharides from lactic acid bacteria, *International Dairy Journal* **11** 675-685
- MONSAN, P. et PAUL, F. (1995) Oligosaccharide feed additives, Dans : Biotechnology in animal feeds and animal feedings (Eds : WALLACE, R. J. and CHESSON, A. VCH) pp 233-245
- MOOSER, G. (1992) Glycosidases and glycosyltransferases, Dans : The enzymes Vol. XX (Eds : Academic Press Inc.) pp 187-221
- MOOSER, G.; HEFTA, S.A.; PAXTON, R.J.; SHIVELY, J.E.; et LEE, T.D. (1991a) Isolation and sequence of an active-site peptide containing a catalytic aspartic acid from two *Streptococcus mutans* glucosyltransferases, *J.Biol.Chem.* **266** 8916-8922
- MOOSER, G.; HEFTA, S.A.; PAXTON, R.J.; SHIVELY, J.E.; et LEE, T.D. (1991b) Isolation and sequence of an active-site peptide containing a catalytic aspartic acid from two *Streptococcus mutans* glucosyltransferases, *J.Biol.Chem.* **266** 8916-8922
- MOOSER, G.; HEFTA, S.A.; PAXTON, R.J.; SHIVELY, J.E.; et LEE, T.D. (1991c) Isolation and sequence of an active-site peptide containing a catalytic aspartic acid from two *Streptococcus mutans* glucosyltransferases, *J.Biol.Chem.* **266** 8916-8922
- MORISAKI, K. et OZAKI, S. (1996) Design of novel hybrid vitamin C derivatives: thermal stability and biological activity, *Chem.Pharm.Bull.* **44** 1647-1655
- MUKASA, H.; TSUMORI, H.; et SHIMAMURA, A. (2001) Dextran acceptor reaction of *Streptococcus sobrinus* glucosyltransferase GTF-I as revealed by using uniformly ¹³C-labeled sucrose, *Carbohydr.Res.* **333** 19-26

N

- NAKAHARA, K.; KONTANI, M.; ONO, H.; KODAMA, T.; TANAKA, T.; OOSHIMA, T.; et HAMADA, S. (1995b) Glucosyltransferase from *Streptococcus sobrinus* catalyses glucosylation of catechin., *Appl.Env.Microbiol.* **61** 2768-2770

- NAKAHARA, K.; KONTANI, M.; ONO, H.; KODAMA, T.; TANAKA, T.; OOSHIMA, T.; et HAMADA, S. (1995a) Glucosyltransferase from *Streptococcus sobrinus* catalyses glucosylation of catechin., *Appl.Env.Microbiol.* **61** 2768-2770
- NAKAMURA, T.; NAITO, A.; TAKAHASHI, Y.; et AKANUMA, H. (1986) Oxidation of 1,5-anhydro-D-glucitol to 1,5-anhydro-D-fructose catalyzed by an enzyme from bacterial membranes, *J.Biochem.(Tokyo)* **99** 607-613
- NAKAMURA, T., TAKAHASHI, A., and KATO, K. (1988) *JP 63072696*
- NIERMAN, W.C.; FELDBLYUM, T.V.; LAUB, M.T.; PAULSEN, I.T.; NALSON, K.E.; EISEN, J.; HEIDELBERG, J.F.; ALLEY, M.R.K.; OHTA, N.; MADDOCK, J.R.; POTOCKA, I.; NELSON, W.C.; NEWTON, A.; STEPHENS, C.; PHADKE, N.D.; ELY, B.; DEBOY, R.T.; DODSON, R.J.; DURKIN, A.S.; GWINN, M.L.; HAFT, D.H.; KOLONAY, J.F.; SMIT, J.; CRAVEN, M.B.; KHOURI, H.; SHETTY, J.; BERRY, K.; UTTERBACK, T.; TRAN, K.; WOLF, A.; VAMATHEVAN, J.J.; ERMOLAEVA, M.; WHITE, O.; SALZBERG, S.; VENTER, J.C.; SHAPIRO, L.; et FRASER, C.M. (2001) Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **98** 4136-4141

P

- PASTEUR, L. (1861) Sur la fermentation visqueuse, *Bull.Soc.Chim.* 30-31
- PAUL, F., LOPEZ-MUNGUIA, A., REMAUD-SIMEON, M., PELENC, V., and MONSAN, P. (1992) Method for the production of α -1,2 oligodextrans using *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299, *US 5 141 858*
- PELENC, V.; LOPEZ-MUNGUIA, A.; REMAUD-SIMEON, M.; BITON, J.; MICHEL, J.; PAUL, F.; et MONSAN, P. (1991) Enzymatic synthesis of oligoalternans, *Sci.Aliment.* **11**
- POTOCKI DE MONTALK, G. (1999) L'amylosucrase de *Neisseria polysaccharea* : aspects structuraux et caractérisation de son activité catalytique. Thèse de doctorat, INSA Toulouse, France
- POTOCKI DE MONTALK, G.; REMAUD-SIMEON, M.; WILLEMOT, R.M.; PLANCHOT, V.; et MONSAN, P. (2004) Sequence analysis of the gene encoding amylosucrase from *Neisseria polysaccharea* and characterization of the recombinant enzyme, *J.Bacteriol.* **181** 375-381
- POTOCKI DE MONTALK, G.; REMAUD-SIMEON, M.; WILLEMOT, R.M.; SARÇABAL, P.; PLANCHOT, V.; et MONSAN, P. (2000) Amylosucrase from *Neisseria polysaccharea*: novel catalytic properties, *FEBS Lett.* **471** 219-223

Q

- QUANZ, M. (2004) Genetically modified plant cells and plants with an increases activity of an amylosucrase protein and a branching enzyme, *WO 00/73422*
- QUIRASCO, M.; LOPEZ-MUNGUIA, A.; PELENC, V.; REMAUD-SIMEON, M.; PAUL, F.; et MONSAN, P. (1994) Enzymatic production of gluco-oligosaccharides containg α -1,2 osidic bonds. Potential applications in nutrition, *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **750** 317-320

R

- REMAUD-SIMEON, M.; WILLEMOT, R.M.; SARCABAL, P.; POTOCKI DE MONTALK, G.; et MONSAN, P. (2000) Glucansucrases: molecular engineering and oligosaccharides synthesis, *Journal of molecular catalysis* **10** 117-128
- RICHARD, G. (2004) *non publié*

- RICHARD, G.; MOREL, S.; WILLEMOT, R.M.; MONSAN, P.; et REMAUD-SIMEON, M. (2003) Glucosylation of α -butyl- and α -octyl-glucopyranosides by dextransucrase and alternansucrase from *Leuconostoc mesenteroides*, *Carbohydrate Research* **338** 855-864
- RIOU, J.Y.; GUIBOURDENCHE, M.; et POPOFF, M.Y. (1983) A new taxon in the genus *Neisseria*, *Ann.Microbiol.(Inst.Pasteur)* **134 B** 257-267
- ROBERFROID, M.B. (2000) Concepts and strategy of functional food science: the european perspective, *Am.J.Clin.Nutr.* **71 suppl** 1660S-1664S
- ROBYT, J.F. et EKLUND, S.H. (1983a) Relative, quantitative effects of acceptors in the reaction of *Leuconostoc mesenteroides* B-512F dextransucrase, *Carbohydr.Res.* **121** 279-286
- ROBYT, J.F.; KIM, D.; et YU, L. (1995) Mechanism of dextran activation of dextransucrase, *Carbohydrate Research* **266** 293-299
- ROBYT, J.F.; KIMBLE, B.K.; et WALSETH, T.F. (1974) The mechanism of dextransucrase action. Direction of dextran biosynthesis, *Arch.Biochem.Biophys.* **165** 634-640
- ROBYT, J.F. et MARTIN, P.J. (1983b) Mechanism of synthesis of D-glucans by D-glucosyltransferases from *Streptococcus mutans* 6715, *Carbohydr.Res.* **113** 301-315
- ROBYT, J.F. et WALSETH, T.F. (1978) The mechanism of acceptor reactions of *Leuconostoc mesenteroides* B-512F dextransucrase, *Carbohydr.Res.* **61** 433-445
- ROUSSEAU, V.; LEPARGNEUR, J.; ROQUES, C.; REMAUD-SIMEON, M.; et PAUL, F. (2004) Prebiotic effect of oligosaccharides on selected vaginal lactobacilli and pathogenic microorganisms., *Anaerobie soumis-*
- RUSSEL, R.R. (1990) Molecular genetics of glucan metabolism in oral *Streptococci*, *Arch.Oral Biol.* **35** 53S-58S
- S**
- SAEKI, Y., MUROYA, T., and FUJISUE, M. (2002a) 1,5-anhydrofructose-containing bacterial growth controller or inhibitor against thermophilic, acid fast bacterium *Alicyclobacillus*, *JP 2002 017319*
- SAEKI, Y., MUROYA, T., and FUJISUE, M. (2002b) 1,5-anhydrofructose-containing bacterial growth controller or inhibitor against thermophilic, acid fast bacterium *Alicyclobacillus*, *JP 2002 017319*
- SAKUMA, M.; KAMETANI, S.; et AKANUMA, H. (1998) Purification and some properties of a hepatic NADPH-dependent reductase that specifically acts on 1,5-anhydro-D-fructose, *J.Biochem.(Tokyo)* **123** 189-193
- SEYMOUR, F.R.; KNAPP, R.D.; CHEN, E.C.M.; BISHOP, H.; et JEANES, A. (1979) Structural analysis of *Leuconostoc* dextrans containing 3-O- α -D-glucosyl residues in both linear-chain and branch-point positions, or only in branch-point positions, by methylation and by ^{13}C NMR spectroscopy, *Carbohydrate Research* **74** 41-62
- SHAFIZADEH, F.; FURNEAUX, R.H.; STEVENSON, T.; et COCHRAN, T.G. (1978) 1,5-anhydro-D-fructo-4-deoxy-D-glycero-hex-1-en-3-ulose and other pyrolysis products of cellulose, *Carbohydr.Res* **67** 433-447
- SHIGA, Y.; KAMETANI, S.; KADOKURA, T.; et AKANUMA, H. (1999) 1,5-anhydroglucitol promotes glycogenolysis in *Escherichia coli*, *J.Biochem.(Tokyo)* **125** 166-172
- SHIGA, Y.; KAMETANI, S.; MIZUNO, H.; et AKANUMA, H. (1996) *Escherichia coli* phosphorylates 1,5-anhydroglucitol and releases 1,5-anhydroglucitol 6-phosphate when glucose is absent in the medium, *J.Biochem.* **119** 173-179

- SHIGA, Y.; MIZUNO, H.; et AKANUMA, H. (1993) Conditional synthesis and utilization of 1,5-anhydroglucitol in *Eschericia coli*, *J.Bacteriol.* **175** 7138-7141
- SIDEBOTHAM, R.L. (1974) Dextrans, *Adv.Carbohydr.Chem.Biochem.* **30** 371-444
- SKOV, L.K.; MIRZA, O.; HENRIKSEN, A.; POTOCKI DE MONTALK, G.; REMAUD-SIMEON, M.; SARCABAL, P.; WILLEMOT, R.M.; MONSAN, P.; et GAJHEDE, M. (2001) Amylosucrase, a glucan-synthesizing enzyme from the α -amylase family, *J.Biol.Chem.* **276** 25273-25278
- SKOV, L.K.; MIRZA, O.; SPROGOE, D.; DAR, I.; REMAUD-SIMEON, M.; ALBENNE, C.; MONSAN, P.; et GAJHEDE, M. (2002) Oligosaccharide and sucrose complexes of amylosucrase. Structural implications for the polymerase activity, *J.Biol.Chem.* **277** 47741-47747
- SKOV, L.K.; PIRZA, O.; HENRIKSEN, A.; POTOCKI DE MONTALK, G.; REMAUD-SIMEON, M.; SARCABAL, P.; WILLEMOT, R.M.; MONSAN, P.; et GAJHEDE, M. (2000) Crystallization and preliminary X-ray studies of recombinant amylosucrase from *Neisseria polysaccharea*, *Acta.Cryst.* **D56** 203-205
- SOETART, W.; SCHENGERS, D.; BUCHHOLZ, K.; et VANDAMME, E.J. (1995) A wide range of carbohydrate modifications by a single micro-organism: *Leuconostoc mesenteroides*, Dans : Carbohydrate Bioengineering (Eds : PETERSEN, S. B., SVENSSON, B., and PEDERSON, S. Elsevier Science B.V.) pp
- STEMMER, W.P. (1994) DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *in vitro* recombination for molecular evolution, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **91** 173-179
- STEVENSON, T.; STENLAMP, R.E.; JENSEN, L.H.; COCHRAN, T.G.; SHAFIZADEH, F.; et FURNEAUX, R.H. (1981) The crystal structure of 1,5-anhydro-4-deoxy--glycero-hex-1-en-3-ulose, *Carbohydr.Res* **90** 319-325
- STODOLA, F.H. (1952) A new disaccharide produced by *Leuconostoc mesenteroides*, *J.Am.Chem.Soc.* **74** 3202-
- SU, D. et ROBYT, J.F. (1993) Control of the synthesis of dextran and acceptor-products by *Leuconostoc mesenteroides* B-512FM dextranucrase, *Carbohydr.Res.* **248** 339-348
- SUGANUMA, T.; MATSUNO, R.; OHNISHI, M.; et HIROMI, K.A. (1978) A study of the mechanism of action of taka-amylase A¹ on linear oligosaccharides by product analysis and computer simulation, *J.Biochem.* **84** 293-316
- SUGANUMA, T.; OHNISHI, M.; HIROMI, K.A.; et NAGAHAMA, T. (1996) Elucidation of the subsite structure of bacterial saccharifying α -amylase and its mode of degradation of maltose, *Carbohydr.Res.* **282** 171-180
- SUMNER, J. et HOWELL, S. (1935) A method for determination of invertase activity, *J.Biol.Chem.* **108** 51-54
- SUZUKI, M.; KAMETANI, S.; UCHIDA, K.; et AKANUMA, H. (1996) Production of 1,5-anhydroglucitol from 1,5-anhydrofructose in erythroleukemia cells, *Eur.J.Biochem.* **240** 23-29
- SUZUKI, M.; MIZUNO, H.; AKANUMA, Y.; et AKANUMA, H. (1994) Synthesis of 1,5-anhydro-D-glucitol from glucose in rat hepatoma cells, *J.Biochem.* **115** 87-82
- T**
- TAGUCHI, T.; HARUNA, M.; et OKUDA, J. (1993) Effects of 1,5-anhydro-D-fructose on selected glucose-metabolizing enzymes , *Biotechnoly and Applied Biochemistry* **18** 275-283
- TAKASE, K. (1992b) Interaction of catalytic-site mutants of *Bacillus subtilis* alpha-amylase with substrates and acarbose, *Biochim.Biophys.Acta* **1122** 278-282

- TAKASE, K. (1992a) Interaction of catalytic-site mutants of *Bacillus subtilis* alpha-amylase with substrates and acarbose, *Biochim.Biophys.Acta* **1122** 278-282
- THOMAS, J.A.; RAO, G.V.; BROTHERS, C.; SPRADLIN, J.; et LI, L.H. (1971b) Subsite mapping of enzymes. Correlation of products patterns with Michaelis parameters and substret-induced strain, *J.Biol.Chem.* **246** 5621-5635
- THOMAS, J.A.; RAO, G.V.; BROTHERS, C.; SPRADLIN, J.; et LI, L.H. (1971a) Subsite mapping of enzymes. Correlation of products patterns with Michaelis parameters and substret-induced strain, *J.Biol.Chem.* **246** 5621-5635
- THOMAS, L.V.; INGRAM, R.E.; YU, S.; et DELVES-BROUGHTON, J. (2004) Investigation of the effectiveness of Ascopyrone P as a new food preservative, *International Journal of Food Microbiology* **93** 319-323
- THOMAS, L.V.; YU, S.; INGRAM, R.E.; REFDAHL, C.; ELSSER, D.; et DELVES-BROUGHTON, J. (2002) Ascopyrone P, a novel antibacterial derived from fungi, *Journal of applied Microbiology* **93** 697-705
- TSAI, Y.W.; CHIA, J.C.; SHIAU, Y.Y.; LIAW, Y.C.; et LOU, K.L. (2000) Three-dimensional modelling of the catalytic domain of *Streptococcus mutans* glucosyltransferase GtFB, *FEMS Microbiology Letters* **188** 75-79
- TSUMORI, H.; MINAMI, T.; et KURAMITSU, H.K. (1997) Identification of essential amino acids in the *Streptococcus mutans* glucosyltransferases, *J.Bacteriol.* **179** 3391-3396
- V**
- VALETTE, P.; PELENC, V.; DJOUZY, Z.; ANDRIEUX, C.; PAUL, F.; MONSAN, P.; et SZYLIT, O. (1993) Bioavailability of new synthesized glucooligosaccharides in the intestinal tract of gnotobiotic rats, *J.Sci.Food Agric.* **62** 121-127
- VAN HOUTE, J.; RUSSO, J.; et PROSTAK, K.S. (1989) Increased pH-lowering ability of *Streptococcus mutans* cell masses associated with extracellular glucan-rich matrix material and the mechanisms involved, *J.Dent.Res.* **68** 451-459
- VICKERMAN, M.M.; SULAVIK, M.C.; MINICK, P.E.; et CLEWELL, D.B. (1996) Changes in the carboxyl-terminal repeat region affect extracellular activity and glucan products of *Streptococcus gordonii* glucosyltransferase, *Infection and Immunity* **64** 5117-5128
- W**
- WILKE-DOUGLAS, M. J., PERCHOROWICZ, J. T., HOUCK, C. M., and THOMAS, B. R. (1989) Methods and compositions for altering physical characteristics of fruits and fruit products, *WO 89/12386*
- Y**
- YABUUCHI, M.; MASUDA, M.; KATOH, K.; NAKAMURA, T.; et AKANUMA, H. (1989) Simple enzymic method for determining 1,5-anhydroglucitol in plasma for diagnosis of diabetes mellitus, *Clin.Chem.* **35** 2039-2043
- YAJIMA, M, NAKAJIMA, T., MUROYA, T., YOSHINAGA, K., and FUJISUE, M. (2003) Stabilized perfume composition and method for stabilizing perfume, *JP 2003 268 397*
- YAJIMA, M, NOZAKI, K., MUROYA, K., YOSHINAGA, K., and FUJISUE, M. (2001) Process for producing foods having good preserving qualities and food preserving agents, *US 2003 152 676*
- YAMAJI, K.; PADA SARKER, K.; MARUYAMA, I.; et HIZUKURI, S. (2002) Antioxydant effects of 1,5-anhydrofructose, a new natural sugar, in vitro, *Planta Med.* **68** 16-19

- YAMANOUCHI, T. (1987) Reduction and recovery of plasma 1,5-anhydroglucitol level in diabetes mellitus, *Diabetes* **36** 709-715
- YAMANOUCHI, T.; AKANUMA, H.; NAKAMURA, T.; AKAOKA, I.; et AKANUMA, Y. (1987) Reduction of plasma 1,5-anhydroglucitol (1-deoxyglucose) concentration in diabetic patients, *Diabetologia* **31** 41-45
- YAMANOUCHI, T.; MINODA, S.; YABUUCHI, M.; AKANUMA, Y.; AKANUMA, H.; MIYASHITA, H.; et AKAOKA, I. (1989) Plasma 1,5-anhydroglucitol as new clinical marker of glycemic control in NIDDM patients [20], *Diabetes* **38** 723-729
- YOKOYAMA, I.; KOBAYASHI, M.; et MATSUMADA, K. (1985) Comparison of the multiplicity of dextranucrases from six strains of *Leuconostoc mesenteroides*, *Agric.Biol.Chem.* **49** 501-507
- YOSHINAGA, K.; FUJISUE, M.; ABE, J.I.; HANASHIRO, I.; TAKEDA, Y.; MUROYA, K.; et HIZUKURI, S. (1999) Characterisation of exo(1-4)-alpha glucan lyase from red alga *Gracilaria chorda*. Activation, inactivation and the kinetic properties of the enzyme, *Biochim.Biophys.Acta.* **1472** 447-454
- YU, S. (2000) α -1,4-Glucan lyase, a novel type of starch and glycogen degrading enzyme, *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* **12** 381-388
- YU, S. (2003) α -1,4-glucan-lase, a new starch processing enzyme for production of 1,5-anhydro-D-fructose, *Zuckerindustrie* **338** 2221-2225
- YU, S.; AHMAD, T.; KENNE, L.; et PEDERSEN, M. (1995) α -1,4-Glucan lyase, a new class of starch/glycogen degrading enzyme. III. Substrate specificity, mode of action, and cleavage mechanism, *Biochim.Biophys.Acta* **1244** 1-9
- YU, S., BOJSEN, K., KRAGH, K. M., BOJKO, M., NIELSEN, J., MARCUSSEN, J., and CHRISTENSEN, T. M. (2003) Use of α -1,4-glucan lyase for preparation of 1,5-anhydro-D-fructose, *US* 2003 207409
- YU, S., BOJSEN, K., and MARCUSSEN, J. (1996) Algal α -1,4-glucan lyase gene sequence, and enzyme use in 1,5-anhydrofructose preparation from α -1,4-glucan or starch, *WO* 9612026
- YU, S.; BOJSEN, K.; SVENSSON, B.; et MARCUSSEN, J. (1999a) alpha-1,4-glucan lyases producing 1,5-anhydro-D-fructose from starch and glycogen have sequence similarity to alpha-glucosidases, *Biochimica et biophysica acta* **1433** 1-15
- YU, S.; CHRISTENSEN, T.M.; KRAGH, K.M.; BOJSEN, K.; et MARCUSSEN, J. (1997) Efficient purification, characterization and partial amino acid sequencing of two α -1,4-glucan lyases from fungi, *Biochim.Biophys.Acta.* **1339** 311-320
- YU, S.; KENNE, L.; et PEDERSEN, M. (1993a) α -1,4-glucan lyase, a new class of starch/glycogen degrading enzyme. I: Efficient purification and characterization from red seaweeds, *Biochim.Biophys.Acta.* **1156** 313-320
- YU, S. et MARCUSSEN, J. (1999b) α -1,4-glucanlyase, molecular features and its use for production of 1,5-anhydro-D-fructose from starch, *Royal Society of Chemistry* **246** 243-250
- YU, S.; MEI, J.; et AHREN, B. (2004a) Basic toxicology and metabolism of 1,5-anhydro-d-fructose using bacteria, cultured mammalian cells, and rodents, *Food and chemical toxicology* **42** 1677-1686
- YU, S.; OLSEN, C.E.; et MARCUSSEN, J. (1998) Methods for the assay of 1,5-anhydro-D-fructose and α -1,4-glucan lyase, *Carbohydr.Res.* **305** 73-82
- YU, S. et PEDERSEN, M. (1993b) α -1,4-glucan lyase, a new class of starch/amidon-degrading enzyme .II. Subcellular localization and partial amino-acid sequence., *Planta* **191** 137-142

YU, S. et REFDAHL, C. (2004b) Enzymatic description of anhydrofructose pathway of glycogen degradation. I. Identification and purification of anhydrofructose dehydratase, ascopyrone tautomerase and α -1,4-glucan lyase in the fungus *Anthracobia melaloma*, *Biochim.Biophys.Acta* **1672** 120-129

Z

ZHU, P.; TSANG, R.H.; et TSAI, C.M. (2003b) Nonencapsulated *neisseria meningitidis* strain produces amylopectin from sucrose: altering the concept for differentiation between *N. meningitidis* and *N. polysaccharea*, *J.Clin.Microbiol.* **41** 273-278

ZHU, P.; TSANG, R.H.; et TSAI, C.M. (2003a) Nonencapsulated *neisseria meningitidis* strain produces amylopectin from sucrose: altering the concept for differentiation between *N. meningitidis* and *N. polysaccharea*, *J.Clin.Microbiol.* **41** 273-278

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figures

Figure 1 - Formes cétonique et bicyclique de l'anhydro-D-fructose proposées par DEFFIEUX et coll. en accord avec les résultats structuraux (RMN liquide, Spectrométrie IR, CIMS, analyse élémentaire).	29
Figure 2 - Forme hydratée de l'anhydro-D-fructose proposée par TAGUCHI [TAGUCHI, T. et coll., 1993].	30
Figure 3 - Equilibre tautomérique entre les formes énols mis en évidence par YU et coll. [YU, S. et coll., 1995]	30
Figure 4 - Dégradation spontanée de l'AF en milieu aqueux fortement alcalin (pH entre 12 et 14) [ANDERSEN, S.M. et coll., 2002b].	31
Figure 5 - Comportement de l'AF en milieu légèrement alcalin (pH=8.5) : présence de l'AF cétonique et de l'hex-3-ulose dans un rapport 3:1 [ANDERSEN, S.M. et coll., 2002b].	32
Figure 6 - Formation de dimères de l'AF dans les solvants organiques au côté de la forme cétonique et répartition de ces trois formes dans le DMSO ou la pyridine [ANDERSEN, S.M. et coll., 1998; FREIMUND, S. et coll., 1998b].	33
Figure 7 - Dérivation de l'AF en son dérivé oxime dans la pyridine pour l'obtention spécifique du monomère [ANDERSEN, S. M. et coll., 2000].	33
Figure 8 - Récapitulatif des différentes formes adoptées par la molécule d'AF	34
Figure 9 - Origine de la dénomination « 1,5-anhydro-D-fructose ».	34
Figure 10 - Dégradation par glycolyse du glucose en pyruvate, ensuite complètement dégradé en CO ₂ et H ₂ O via le cycle de KREBS avec libération d'énergie sous forme d'ATP.	35
Figure 11 - Représentation du (A) glycogène, (B) de l'amylopectine et (C) de l'amylose.	36
Figure 12 - Dégradation du glycogène par phosphorolyse sous l'action successive de plusieurs enzymes, conduisant à la formation de glucose-6-phosphate, entrant ensuite dans la glycolyse.	37
Figure 13 - Synthèse de molécules d'intérêt antibiotique (cortalcérone, microthécine, échinosporeine) chez les champignons de type Basidiomycètes et Ascomycètes soumis à un effet activateur modulé par une agression physique ou chimique (congélation/décongélation, dessiccation, sonication, contact avec un solvant organique ...) [MERLET, D. et coll., 1991].	38
Figure 14 - Réaction de dégradation de polysaccharide catalysée par la pectate lyase (E.C. 4.2.2.2) conduisant au glucose [LEE, S.S. et coll., 2003; YOSHINAGA, K. et coll., 1999].	41
Figure 15 - Schéma réactionnel de la dégradation d' α -(1,4) glucanes catalysée par la GLase avec synthèse d'AF [YU, S., 2000].	41
Figure 16 - Synthèse d'AF par réaction de clivage de glucanes catalysée par l' α -1,4-glucane lyase	42
Figure 17 - Mécanisme d'action des α -glucosidases: 1ère étape de formation du complexe covalent glucosyl-enzyme, puis 2nde étape d'hydrolyse du complexe avec libération du glucose [LEE, S.S. et coll., 2002; LEE, S.S. et coll., 2003; YU, S. et coll., 1999a].	43
Figure 18 - Seconde étape du mécanisme d'action de la GLase : coupure de la liaison glucosyle-enzyme par réaction d'élimination, avec formation d'AF [LEE, S.S. et coll., 2002; LEE, S.S. et coll., 2003; YU, S. et coll., 1999a].	44
Figure 19 - Réduction de l'AF en anhydro-D-glucitol (AG) par une NADPH dépendante réductase, et phosphorylation de l'AG en anhydro-D-glucitol-6-phosphate [SHIGA, Y. et coll., 1999; YU, S. et coll., 1999a].	46
Figure 20 - Mécanisme proposé par BAUTE et coll. pour la synthèse de la microthécine [BAUTE, M.R. et coll., 1986] et de l'échinosporeine [BAUTE, M.A. et coll., 1991] à partir d'AF, sous l'action successive de deux déshydratases.	47
Figure 21 - Mécanisme de formation de la microthécine à partir de l'AF proposé par BROBERG et coll. [BROBERG, A. et coll., 1996].	48

Figure 22 – Formation de l'ascopyrone P (APP) à partir d'anhydro-D-fructose (AF) via l'intermédiaire ascopyrone M (APM) sous l'action successive de deux enzymes : l'AF-déshydratase (AFDH) et l'ascopyrone tautomérase (APTMT) [YU, S. et coll., 2004b].	49
Figure 23 – Mécanisme de régulation du métabolisme du glycogène, faisant intervenir l'anhydro-D-fructose (AF), l'anhydro-D-glucose (AG) et l'AG-6-phosphate (AG6P) [SHIGA, Y. et coll., 1999].	50
Figure 24 – Comparaison des 3 voies de dégradation d' α -(1,4) glucanes (amidon ou glycogène), et synthèse de divers métabolites secondaires à partir de l'AF.	51
Figure 25 – Différentes voies de synthèse chimique de l'AF à partir d'hydroxyglucals benzoylés proposées par LICHTENTHALER [LICHTENTHALER, F.W. et coll., 1980; LICHTENTHALER, F.W. et coll., 1990].	53
Figure 26 - Synthèse chimique de l'AF par oxydation de l'anhydro-D-glucitol proposé par NAKAMURA et coll. [NAKAMURA, T. et coll., 1988].	54
Figure 27 – Synthèse de l'AF par oxydation enzymatique de l'anhydro-D-glucitol à l'aide de pyranode-2-oxydase (2-POx) de <i>Pseudomonas sp.</i> [FREIMUND, S. et coll., 1998a].	56
Figure 28 - Exemples d'antioxydants courants.	58
Figure 29 - Produits d'oxydation de l'AF (l'hydrogénocarbonate NaHCO ₃ permettant de se placer à un pH voisin de 8.5) [ANDERSEN, S. M. et coll., 2000].	59
Figure 30 – Voies de modification chimique de l'AF.	69
Figure 31 - Le glucosone, comme intermédiaire de synthèse du fructose ou de la cortalcérone à partir de glucose.	70
Figure 33 - Schéma de la réaction de synthèse de glucane (polymère de glucose) catalysée par les glucane-saccharases.	75
Figure 34 – Structure primaire commune aux GS de la famille 70 des GH, composée de 4 domaines : le peptide signal (PS), la zone variable (ZV), le domaine catalytique (DC) et le domaine de liaison au glucane (GBD).	80
Figure 35 – Structure originale de l'enzyme recombinante DSR-E de <i>L. mesenteroides</i> B-1299.	81
Figure 36 – Représentation tri-dimensionnelle de l'amylosaccharase de <i>Neisseria polysaccharea</i> [SKOV, L.K. et coll., 2000; SKOV, L.K. et coll., 2001] avec en son centre la structure en forme de tonneau (β/α) ₈ du domaine catalytique.	82
Figure 37 – Représentation des sous-sites de fixation des polysaccharides au site catalytique [DAVIES, G. et coll., 1997].	83
Figure 38 – Schéma général des réactions naturellement catalysées par les GS des familles 13 et 70 des GH en présence de saccharose.	84
Figure 39 – Régions conservées de la séquence de l'AS de <i>N. polysaccharea</i> et de quelques enzymes de la famille 13 des α -amylases et de quelques GS de la famille 70.	85
Figure 40 – Première étape de formation du complexe glucosyl-enzyme des GS, analogue à celle des α -amylases.	86
Figure 41 – Seconde étape du mécanisme de rupture du complexe covalent glucosyl-enzyme et transfert du résidu glucosyle sur une molécule hydroxylée.	87
Figure 42 – Réaction de glucosylation d'une molécule exogène appelée accepteur en présence de GS; cette réaction dite d'accepteur est en compétition avec les réactions naturellement catalysées par les GS.	89
Figure 43 – Structures de quelques produits de glucosylation obtenus avec des GS de spécificités différentes. L'unité accepteur est signalée en rouge.	94
Figure 44 – Schéma de la réaction de disproportionation.	94
Figure 45 – Synthèse d'APG par glucosylation enzymatique d' α -butylglucoside, en présence de la dextrane-saccharase de <i>L. mesenteroides</i> NRRL B-512F [RICHARD, G. et coll., 2003].	98
Figure 46 - Augmentation de l'hydrophilie de la (+)-catéchine par glucosylation catalysée par la glucane-saccharase de <i>S. sobrinus</i> 6715 [NAKAHARA, K. et coll., 1995b].	99

Figure 47 – Réduction enzymatique de l'AF en 1,5-anhydro-D-mannitol par l'AF-réductase en présence de NADPH comme cofacteur.....	111
Figure 48 – Réaction de dosage des sucres réducteurs par l'acide 3,5-dinitroisalicylique (DNS).....	112
Figure 49 – Oxydation naturelle de l'acide linoléique, dont le produit d'oxydation, le malondialdéhyde (MDA) est dosé par complexation avec l'acide thiobarbiturique (TBA).....	121
Figure 50 – Représentation géométrique des différents termes de champ de force CFF91.....	124
Figure 51 – Comportement de l'AF après dissolution dans les deux tampons de glucosylation (A) acétate de sodium, pH = 5,2 et (B) PBS, pH = 7,3.....	132
Figure 52 – Utilisation de la colonne carbohydate Ca ²⁺ pour la séparation des mono (fructose, glucose, AF) et disaccharide (saccharose).	135
Figure 53 – Chromatogrammes obtenus lors de la glucosylation de l'AF en présence de saccharose, catalysée par la dextransaccharase de <i>L. mesenteroides</i> B-512F sur (A) la colonne carbohydate Ca ²⁺ et (B) la colonne C18.....	135
Figure 54 – Comparaison des profils chromatographiques des produits synthétisés en présence (A) de GS de <i>L. mesenteroides</i> (en bleu : DSR de <i>L.m.</i> B-512F ; en rouge : DSR de <i>L.m.</i> B-1299 ; en vert : ASR de <i>L.m.</i> B-1355) et (B) en bleu : la DSR de <i>L. mesenteroides</i> B-512F et en violet : l'AS de <i>N. polysaccharea</i>	137
Figure 55 – Mesure du courant ionique total (CIT) lors de l'injection en LC-MS du milieu réactionnel final de glucosylation de l'AF en présence de la DSR de <i>L. mesenteroides</i> B-512F ; chaque pic du CIT est accompagné de son spectre de masse.	139
Figure 56 - Attribution du degré de polymérisation (DP) de chaque dérivé glucosylé de l'AF synthétisé en présence de la DSR de <i>L. mesenteroides</i> B-512F observé par CLHP sur colonne C18.	140
Figure 57 – Représentation bidimensionnelle de l'élution des dérivés glucosylés de l'AF et de leur masse molaire associée, déterminée par spectrométrie de masse.....	140
Figure 58 – Représentations bidimensionnelles en fonction du temps de rétention de la masse molaire des dérivés glucosylés de l'AF synthétisés en présence de (A) la DSR de <i>L. mesenteroides</i> B-1299 et (B) l'ASR de <i>L. mesenteroides</i> B-1355.	141
Figure 59 – Séparation sur BioGel® P2 du mélange final de glucosylation de l'AF en présence de la GS de <i>L. mesenteroides</i> B-512F, avec récupération de 12 fractions.	143
Figure 60 – Analyse par CLHP analytique des fractions 10 à 12 recueillies par séparation sur colonne BioGel® P2.....	143
Figure 61 - Analyse par CLHP analytique des fractions 7 à 10 recueillies par séparation sur colonne BioGel® P2.	144
Figure 62 – Séparation sur résine K ⁺ du mélange final de glucosylation de l'AF obtenu avec l'AS de <i>N. polysaccharea</i> , avec récupération de 11 fractions.	145
Figure 63 – Analyse par CLHP des fractions 5 à 10 (A) et 1 à 6(B) recueillies sur colonne K ⁺	146
Figure 64 – Evaluation de la pureté par CLHP des dérivés glucosylés de l'AF de DP 2, 3 et 4 synthétisés par glucosylation de l'AF en présence de la DSR de <i>L. mesenteroides</i> B-512F.....	147
Figure 65 – Evaluation de la pureté par CLHP du régio-isomère de DP4 obtenu par glucosylation de l'AF en présence de la DSR de <i>L. mesenteroides</i> B-1299.	148
Figure 66 – Structure des α -(1,6) 1,5-anhydro-D-fructo-glucooligosaccharides synthétisés par glucosylation de l'AF catalysée par la DSR de <i>L. mesenteroides</i> B-512F.	150
Figure 67 – Relation logarithmique entre le degré de polymérisation DP des α -(1,6) AFGOS et leur temps de rétention sur colonne C18.....	151
Figure 68 – Structure de l' α -(1,2) AFGOS de DP 4 synthétisé par glucosylation de l'AF en présence de la DSR de <i>L. mesenteroides</i> B-1299.	153
Figure 69 – Structure des α -(1,4) 1,5-anhydro-D-fructo-glucooligosaccharides.....	154
Figure 70 – Influence du rapport S/A et de la CST sur les <i>taux de conversion</i> pour (A) la DSR de <i>L. m.</i> B-512F ; (B) la DSR de <i>L. m.</i> B-1299 ; (C) l'ASR de <i>L. m.</i> B-1355 ; et (D) l'AS de <i>N. p.</i>	157

Figure 71 – Influence du rapport S/A et de la CST sur le <i>pourcentage de résidus glucosyle transférés sur l'AF et les AFGOS</i> , avec (A) la DSR de <i>L. m.</i> B-512F ; (B) la DSR de <i>L. m.</i> B-1299 ; (C) l'ASR de <i>L. m.</i> B-1355.	159
Figure 72 – Influence du rapport S/A et de la CST sur le <i>rendement de la glucosylation</i> de AF et la quantité d'AFGOS produits (pour une même quantité initiale de 100 g) avec (A) la DSR de <i>L. m.</i> B-512F ; (B) la DSR de <i>L. m.</i> B-1299 ; (C) l'ASR de <i>L. m.</i> B-1355 ; et (D) l'AS de <i>N. p.</i>	160
Figure 73 – Influence du rapport molaire S/A et de la CST sur la <i>quantité d'AFGOS produits</i> par glucosylation de 100 g d'AF avec (A) la DSR de <i>L. m.</i> B-512F ; (B) la DSR de <i>L. m.</i> B-1299 ; (C) l'ASR de <i>L. m.</i> B-1355.	161
Figure 74 – Influence du rapport S/A et de la CST sur la <i>répartition de taille (degré de polymérisation moyen <DP>)</i> des AFGOS synthétisés avec (A) la DSR de <i>L. m.</i> B-512F ; (B) la DSR de <i>L. m.</i> B-1299 ; (C) l'ASR de <i>L. m.</i> B-1355.	162
Figure 75 – Comparaison des spectres de masse d'un oligosaccharide de DP4 et l'AFGOS DP4 : seul le dérivé glucosylé de l'AF présente un ion correspondant à $[M+Na^+-H_2O]$	164
Figure 76 – Présence aux côtés des α -(1,6) AFGOS de pics secondaires identifiés dont le degré de polymérisation a été déterminé par CL-SM.	165
Figure 77 – Comparaison par CLHP d'un mélange d'IMOS (en rouge) synthétisés par glucosylation du glucose en présence de la DSR de <i>L. mesenteroides</i> B-512F et d'un mélange d'AFGOS obtenus par glucosylation de l'AF (en bleu).	166
Figure 78 – Comparaison des chromatogrammes obtenus par CLHP sur colonne C18 d'un mélange d' α -(1,6) AFGOS avant (en rouge) et après (en bleu) coinjection du mélange d'IMOS.	166
Figure 79 – Influence des conditions initiales (rapport S/A et CST) sur la quantité d'IMOS produits.	167
Figure 80 – Suivi cinétique de l'absorption à 550 nm de réaction de l'AF avec le DNS pour des concentrations inférieures à 21 mM (3,78 g/L).	175
Figure 81 – Réponse de l'AF au DNS (DO mesuré après 15 min de réaction).	175
Figure 82 – Réaction de la phénylhydrazine avec les sucres réducteurs.	176
Figure 83 – Comparaison de la réaction de l'AF (AF), du glucose (G) et du fructose (F) avec la phénylhydrazine avec et sans chauffage aux temps initial (A) et après 24 h (B).	176
Figure 84 – Spectre d'absorption des produits de réaction de la phénylhydrazine avec l'AF (spectre vert) et le fructose/glucose (spectre bleu).	177
Figure 85 – Principe du test à l'acide thiobarbiturique (TBA) utilisé pour la mesure du pouvoir anti-oxydant des AFGOS.	178
Figure 86 – Evaluation du pouvoir anti-oxydant de l'AF et des AFGOS par la méthode à l'acide thiobarbiturique, et comparaison à celui de l'acide ascorbique (A.A.) pris comme référence.	179
Figure 87 – Schéma réactionnel de la dérivation de l'AF en oxime.	180
Figure 88 – Rendement de la réaction de dérivation de l'AF en oxime en fonction du pH.	182
Figure 89 – Influence du pH sur la cinétique de formation de (A) l'AF oxime AFoxH, (B) l'AF éthyloxime AFoxEt et (C) l'AF benzyloxime AFoxBn.	183
Figure 90 – Profil d'élution des dérivés oximes de l'AF sur colonne C18. Plus le composé est apolaire, plus il est retenu.	184
Figure 91 – Analyse par CLHP (A) du milieu réactionnel final de dérivation de l'AF en oxime et (B) de l'AFoxH purifié.	184
Figure 92 – Analyse sur chromatographie sur couche mince des milieux finaux de dérivation de l'AF en AFoxBn benzyloxime à différents pH.	186
Figure 93 - Analyse sur CCM mince (A) des milieux finaux de dérivation de l'AF en AFoxEt à différents pH et (B) de l'AFoxEt après purification.	186
Figure 94 – Evaluation de la pureté de l'AFoxEt par CLHP.	186
Figure 95 – Structure des dérivés alkyloximes de l'AF.	187

Figure 96 - Cristaux aciculaires d'AFoxEt.....	188
Figure 97 - Représentation de deux molécules d'AFoxEt et d'une molécule d'eau permettant le maintien du réseau.....	188
Figure 98 – Représentation de la structure tridimensionnelle de l'AFoxH.	188
Figure 99 – Augmentation des temps de rétention par dérivaison en oxime des AFGOS synthétisés par glucosylation de l'AF en présence de la DSR de <i>L. mesenteroides</i> B-512F.....	190
Figure 100 – Comparaison des profils chromatographiques avant et après dérivaison en oxime des AFGOS synthétisés par glucosylation de l'AF en présence (A) de la DSR de <i>L. mesenteroides</i> B-1299, et (B) de l'ASR de <i>L. mesenteroides</i> B-1355.	191
Figure 101 – Profils chromatographiques obtenus après dérivaison en éthyloxime des AFGOS synthétisés par glucosylation de l'AF avec (A) la DSR de <i>L. mesenteroides</i> B-512F, (B) la DSR de <i>L. mesenteroides</i> B-1299, (C) l'AS de <i>N. polysaccharea</i>	192
Figure 102 – Dérivaison en benzyloxime des AFGOS synthétisés par glucosylation de l'AF en présence de la DSR de <i>L. mesenteroides</i> B-512F : cette dérivaison permet de ne conserver que les oligosaccharides ne comportant pas de résidu AF à savoir les IMOS.	193
Figure 103 – Comparaison des profils chromatographiques avant et après dérivaison en benzyloxime des AFGOS synthétisés par glucosylation de l'AF en présence de l'AS de <i>N. polysaccharea</i>	194
Figure 104 – Démarche suivie pour la construction des dérivés monoglucosylés de l'AF, de l'AFoxH et de l'AFoxEt.....	196
Figure 105 – Ensemble des liaisons hydrogènes présentes après minimisation d'énergie des dérivés monoglucosylés de (A) l'AF, (B) l'AF oxime, (C) l'AF éthyloxime à l'intérieur du site actif de l'AS de <i>N. polysaccharea</i>	197
Figure 106 – Comparaison de l'arrimage des dérivés monoglucosylés de l'AF (A) et de l'AF éthyloxime (B) à l'intérieur du site actif de l'AS de <i>N. polysaccharea</i>	198
Figure 107 – Observation du déplacement du résidu AF par rapport au résidu AFoxEt afin de diminuer le conflit stérique avec l'acide aminé Phe 250.....	198
Figure 108 – Présentation des deux voies de synthèse des AFGOSoxH et des AFoxHGOS obtenus à partir de l'AF par réaction de glucosylation enzymatique puis dérivaison chimique et inversement.	199
Figure 109 – Comparaison des profils chromatographiques des AFGOSoxH (obtenus par dérivaison des AFGOS) à ceux des AFoxHGOS (obtenus par glucosylation des AFox), avec (A) la DSR de <i>L. mesenteroides</i> B-512F, (B) la DSR de <i>L. mesenteroides</i> B-1299.....	200
Figure 110 - Comparaison des profils chromatographiques des AFGOSoxH (obtenus par dérivaison des AFGOS) à ceux des AFoxHGOS (obtenus par glucosylation des AFox), avec l'AS de <i>N. polysaccharea</i>	201
Figure 111 – Schéma des deux voies de synthèse des dérivés oximes des AFGOS : (1) par dérivaison des AFGOS synthétisés par glucosylation de l'AF ou (2) par glucosylation des dérivés oximes de l'AF.	201
Figure 112 - Mise en évidence de la non glucosylation de l'AF en présence de saccharose et du variant GBD-CD2 de la DSR-E de <i>L. mesenteroides</i> B-1299.....	210
Figure 113 – Glucosylation des α -(1,6) AFGOS par le variant GBD-CD2 en présence de saccharose.	210
Figure 114 – Comparaison par CLHP des produits de glucosylation obtenus avec la DSR native de <i>L. mesenteroides</i> B-1299 (en bleu) à ceux synthétisés avec le variant DSR-E- Δ PS (en rouge).	212
Figure 115 – Schéma de génération de variants par la technique de PCR sexuelle ou de « DNA shuffling » [STEMMER, W.P., 1994].	214
Figure 116 – Répartition des unités glucose issues du saccharose, en fonction du pouvoir accepteur de la molécule exogène introduite dans le milieu contenant l'AS de <i>N. polysaccharea</i> et du saccharose.	216
Figure 117 – Utilisation du dosage du polymère de type amylose formé par l'AS de <i>N. polysaccharea</i> pour le criblage de banques en vue de l'obtention de variants plus efficaces pour la glucosylation de l'AF.	217
Figure 118 - Séparation d'étalons de sucres par CCM et révélation à l'orcinol.....	219

Figure 119 – Profils chromatographiques d'un même mélange final de glucosylation de l'AF.	220
Figure 120 – Optimisation du temps de rétention de l'AF éthyloxime sur colonne C18. Exemple du mélange d'AFGOS obtenu avec l'AS de <i>N. polysaccharea</i>	221
Figure 121 – Réaction de réduction de l'AF en 1,5-anhydro-D-mannitol par l'AF-réductase en présence de NADPH comme cofacteur.	222
Figure 122 – Cinétique de la réduction de standards d'AF par l'AF-réductase en présence de NADPH.	223
Figure 123 – Courbe de réponse de l'AF dosé par réduction catalysée par l'AF-réductase en présence de NADPH. Tracé de $\Delta(\text{DO})=f([\text{AF}])$	224
Figure 124 – Evaluation de la spécificité de l'AF-réductase pour différents hydrates de carbone : fructose, glucose, saccharose, AF et AFGOS de DP2, 3 et 4.	225
Figure 125 – Schéma de la réduction spécifique de l'AF par l'anhydro-D-fructo-réductase.	226
Figure 126 – Protocole proposé pour le criblage des banques de variants en vue de l'obtention d'un variant plus efficace que l'enzyme native pour la glucosylation de l'AF.	230

Tableaux

Tableau 1 - Présence de l'AF dans divers organismes vivants. n.d. : non déterminé.....	39
Tableau 2 – Caractéristiques des α -(1,4) glucane lyases produites par différentes souches.....	40
Tableau 3 – Brevets portant sur la production d'AF.....	55
Tableau 4 – Composition (pourcentages massiques) des GRINDOX 142 et 1029 commercialisés par la société DANISCO [YU, S. et coll., 1996].....	58
Tableau 5 – Récapitulatif des brevets déposés à ce jour sur les applications de l'AF et de ses dérivés.....	65
Tableau 6 - Glucanes synthétisés par les GS reflétant la diversité de spécificité de ces enzymes.....	77
Tableau 7 – Pourcentage des liaisons glucosidiques présentes dans les glucanes synthétisés en présence de diverses GS natives, dont certaines ont été clonées [SIDEBOTHAM, R.L., 1974].....	78
Tableau 8 - Exemples de molécules testées comme accepteurs des GS.....	92
Tableau 9 – Quelques exemples de prébiotiques commercialisés à l'heure actuelle.....	96
Tableau 10 – Composition des tampons utilisés.....	107
Tableau 11 – Concentrations en saccharose et AF utilisées pour différents rapports molaires saccharose/accepteur S/A et concentrations en sucres totaux CST.....	114
Tableau 12 – Quantités en AF et saccharose utilisées pour la synthèse d'AFGOS ensuite isolés.....	114
Tableau 13 – Données du cristal d'AFoxH ; longueurs et angles de liaison de la molécule d'AFoxH.....	117
Tableau 14 – Données du cristal d'AFoxEt ; longueurs et angles de liaison de la molécule d'AFoxEt.....	118
Tableau 15 – Bactéries représentatives des écosystèmes vaginaux et intestinaux utilisées pour l'évaluation des propriétés prébiotiques des AFGOS.....	121
Tableau 16 - Composition des bouillons utilisés pour les fermentations.....	122
Tableau 17 – Spécificité des GS sélectionnées pour l'étude de la glycosylation de l'AF.....	133
Tableau 18 – Activité des GS mesurées en présence de différentes concentrations en AF.....	134
Tableau 19 - Taux de conversion obtenus pour les GS sélectionnées pour cette étude.....	136
Tableau 20 – Détermination par couplage LC-MS de la masse molaire et du DP des produits de glycosylation associés aux pics chromatographiques observés sur colonne C18.....	139
Tableau 21 – Déplacements chimiques des protons et carbones des dérivés glycosylés de l'AF baptisés AFGOS.....	150
Tableau 22 – Déplacements chimiques des protons et carbones de l' α -(1,2) AFGOS DP 4 synthétisé par glycosylation de l'AF en présence de la DSR de <i>L. mesenteroides</i> B-1299.....	152
Tableau 23 – Evaluation de l'efficacité de glycosylation de l'AF dans les conditions de référence pour les différentes GS de <i>L. mesenteroides</i> et <i>N. polysaccharea</i>	155
Tableau 24 – Récapitulatif de l'influence du rapport molaire S/A et de la CST sur l'efficacité de glycosylation de l'AF pour les différentes enzymes sélectionnées.....	163
Tableau 25 – Conditions de glycosylation préconisées pour la glycosylation efficace de l'AF.....	164
Tableau 26 – Evaluation des propriétés prébiotiques de glucides par le suivi de la quantité de glucides consommés et de la croissance des souches représentatives de la flore intestinale.....	173
Tableau 27 - Evaluation des propriétés prébiotiques de glucides par le suivi de la quantité de glucides consommés et de la croissance des souches représentatives de la flore vaginale.....	174
Tableau 28 – Dosage de l'AF (en g/L) dans les milieux réactionnels de glycosylation aux temps initial et final par la méthode au DNS.....	178
Tableau 29 – Rendement de dérivation de l'AF en oxime, en présence de différents alkylhydroxylamine pour un pH proche de 1,6.....	181

Tableau 30 – Déplacements chimiques (δ) du proton et du carbone des dérivés alkyloximes de l'AF.	187
Tableau 31 – Evaluation du rendement de la conversion de l'AF et de différentes familles d'AFGOS en oximes par la méthode au DNS.....	189
Tableau 32 – Taux de conversion (en %) obtenus lors de la glucosylation de l'AFoxH et de l'AFoxEt en présence de saccharose et de trois GS de spécificités différentes.	195
Tableau 33 – Descriptif des variants de la DSR-E de <i>L. mesenteroides</i> B-1299 testés comme catalyseurs de la glucosylation de l'AF.	209
Tableau 34 – Taux de conversion de l'AF obtenus en présence de saccharose et du variant DSR-E- Δ PS.....	211
Tableau 35 - Comparaison des méthodes de criblage des banques de variants générés par ingénierie combinatoire.....	228

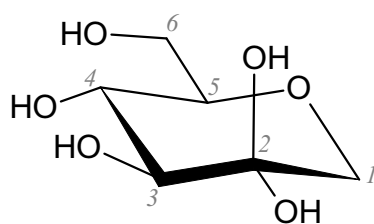
LISTE DES ABREVIATIONS

AcONa	tampon acétate de sodium
AF	1,5-anhydro-D-fructose
AFoxH	1,5-anhydro-D-fructose oxime
AFoxEt	1,5-anhydro-D-fructose éthyl oxime
AFoxBn	1,5-anhydro-D-fructose benzyl oxime
AFGOS	1,5-anhydro-D-fructoglucooligosaccharides
AFGOSoxR	AFGOS dérivés en oximes
AFoxRGOS	1,5-anhydro-D-fructose alkyl oxime glucosylé
ASR	alternane-saccharase
AS	amylo-saccharase
CCM	chromatographie sur couche mince
CLHP	chromatographie liquide haute performance
CST	concentration en sucres totaux
DP	degré de polymérisation
DSR	dextrane-saccharase
GS	glucane-saccharase
CLHP	chromatographie liquide haute performance
<i>L.m.</i>	<i>L. mesenteroides</i>
NEPSA	NEw Products from Starch derived Anhydrofructose
<i>N.p.</i>	<i>N. polysaccharea</i>
PBS	tampon phosphate salin
Rf	rapport frontal
RI	indice de réfraction (« refractive index »)
S/A	rapport molaire saccharose/accepteur
UV	ultra-violets

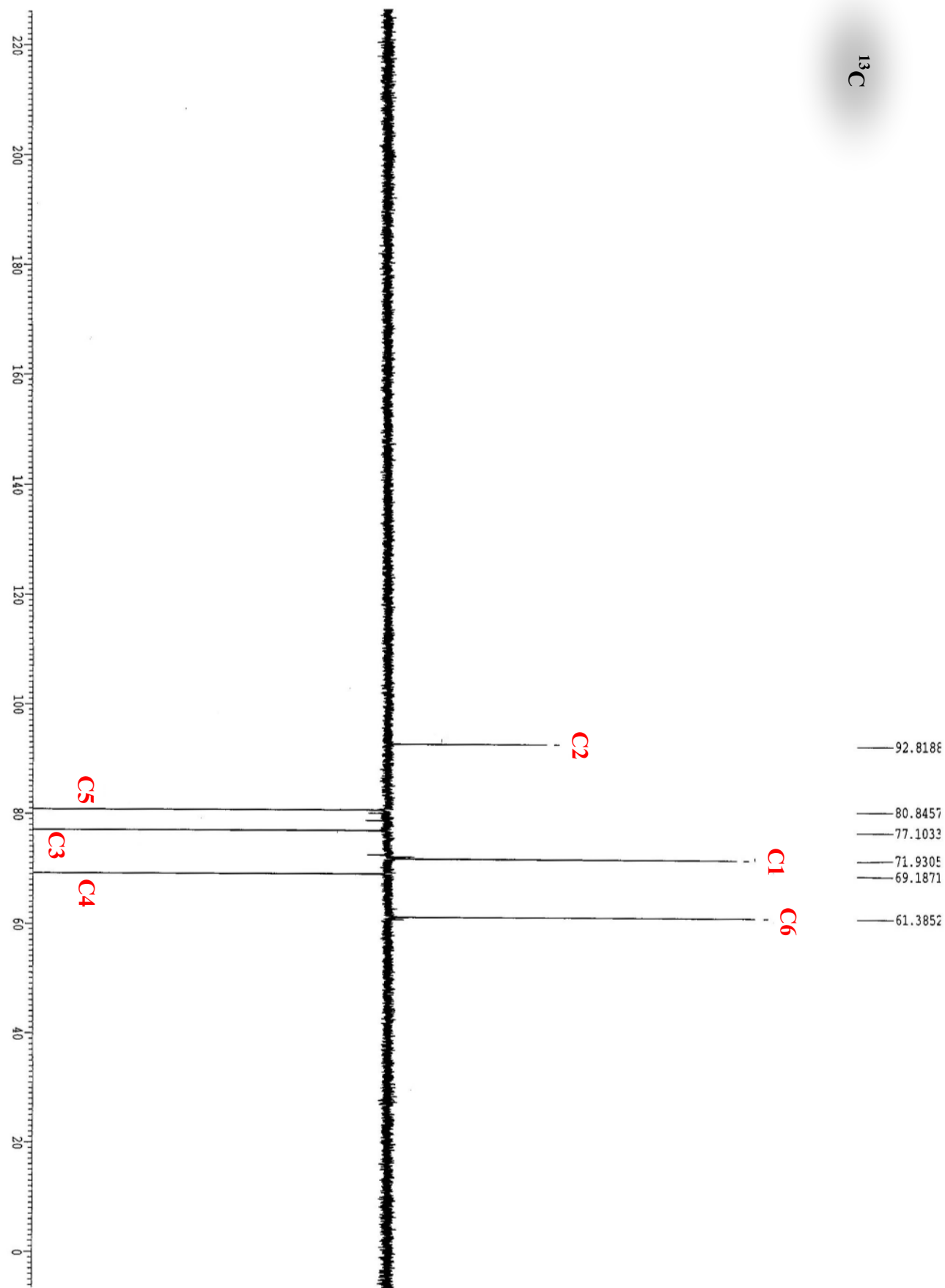
ANNEXES - SPECTRES RMN

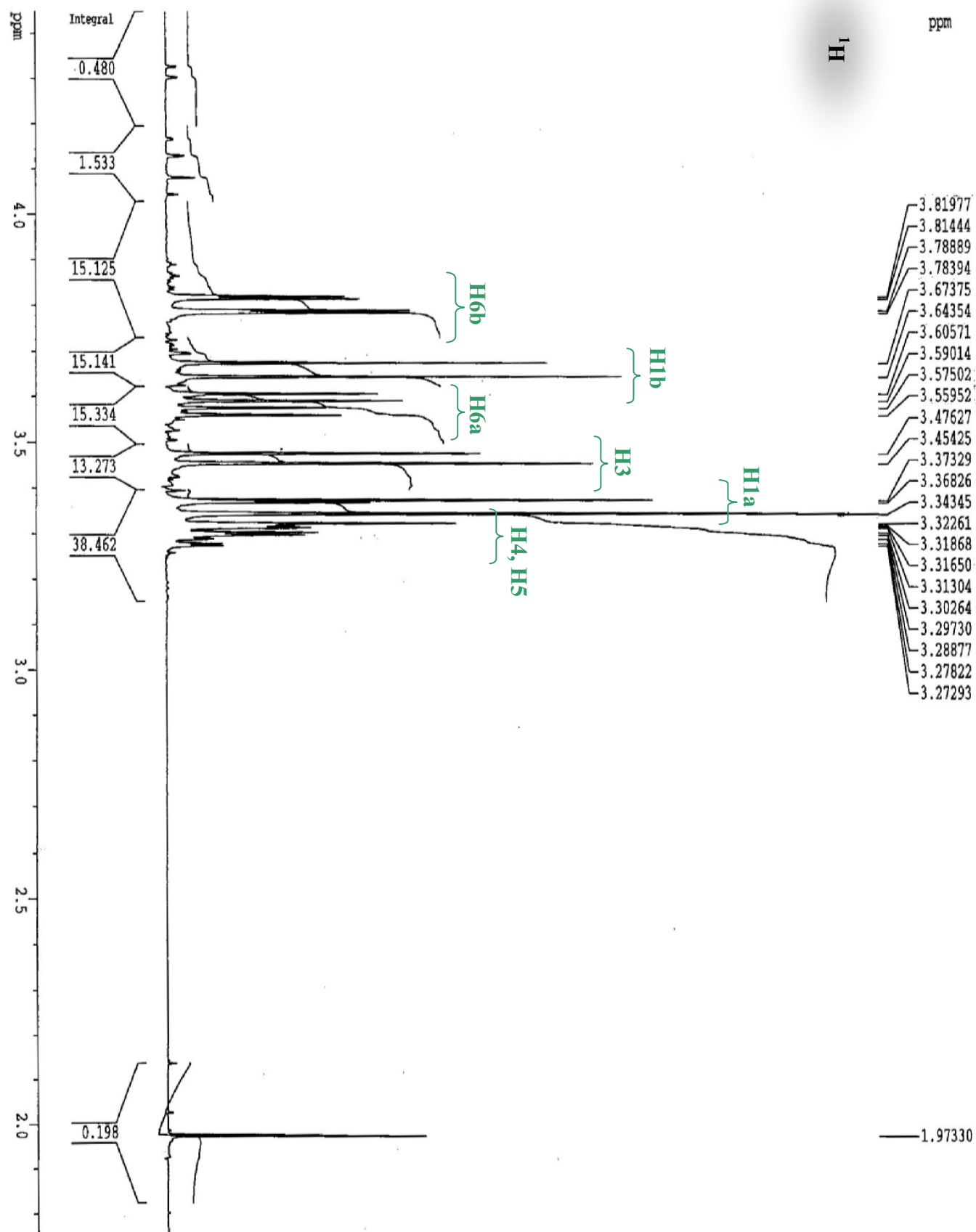
1,5-anhydro-D-fructose	273
1,5-anhydro-D-fructose oxime	279
1,5-anhydro-D-fructose éthyloxime	285
1,5-anhydro-D-fructose benzyloxime	291
α -(1,6) AFGOS DP2	297
α -(1,6) AFGOS DP3	303
α -(1,6) AFGOS DP4	309
α -(1,2) AFGOS DP4	315
α -(1,4) AFGOS DP2	321

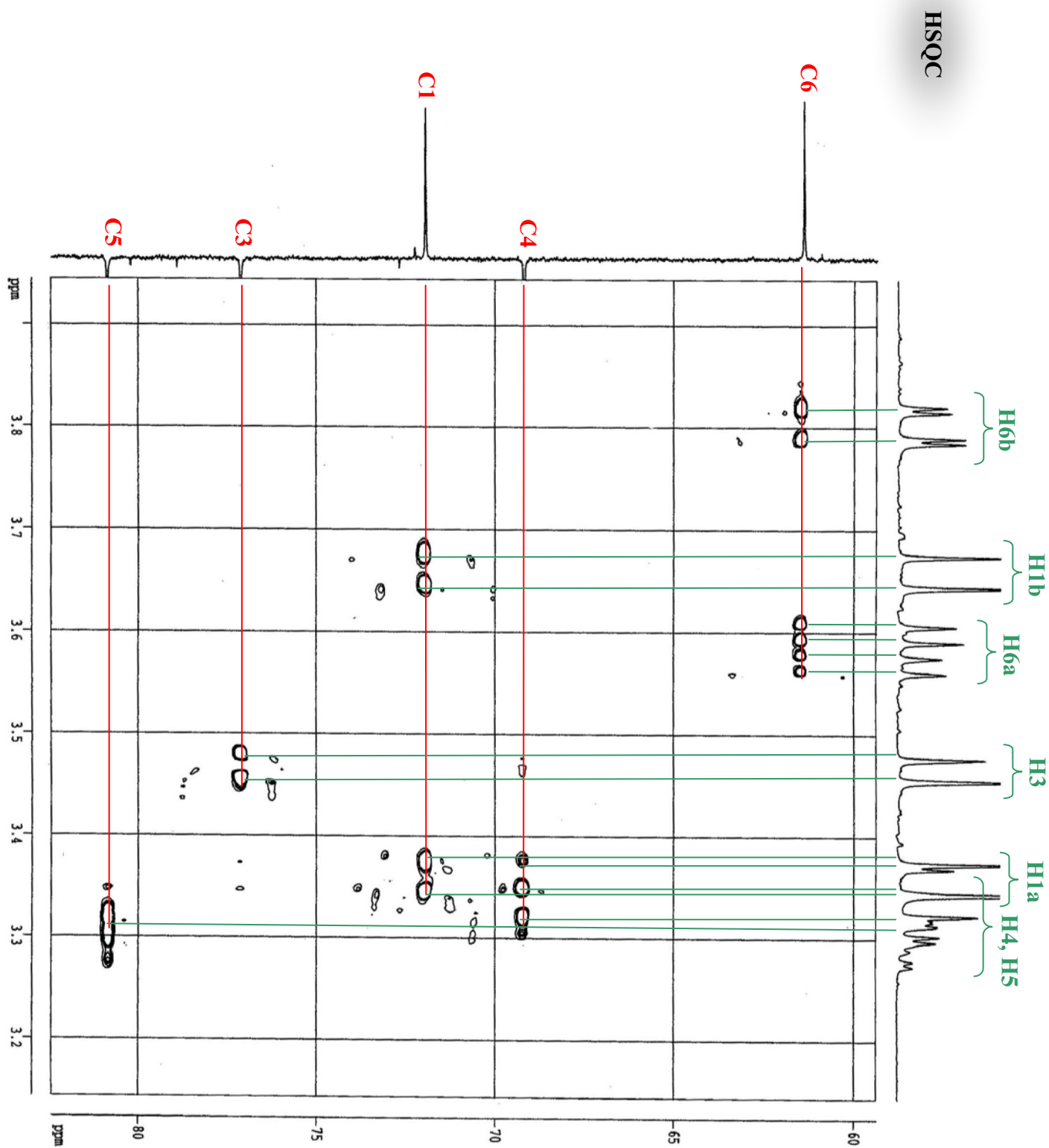
1,5-ANHYDRO-D-FRUCTOSE

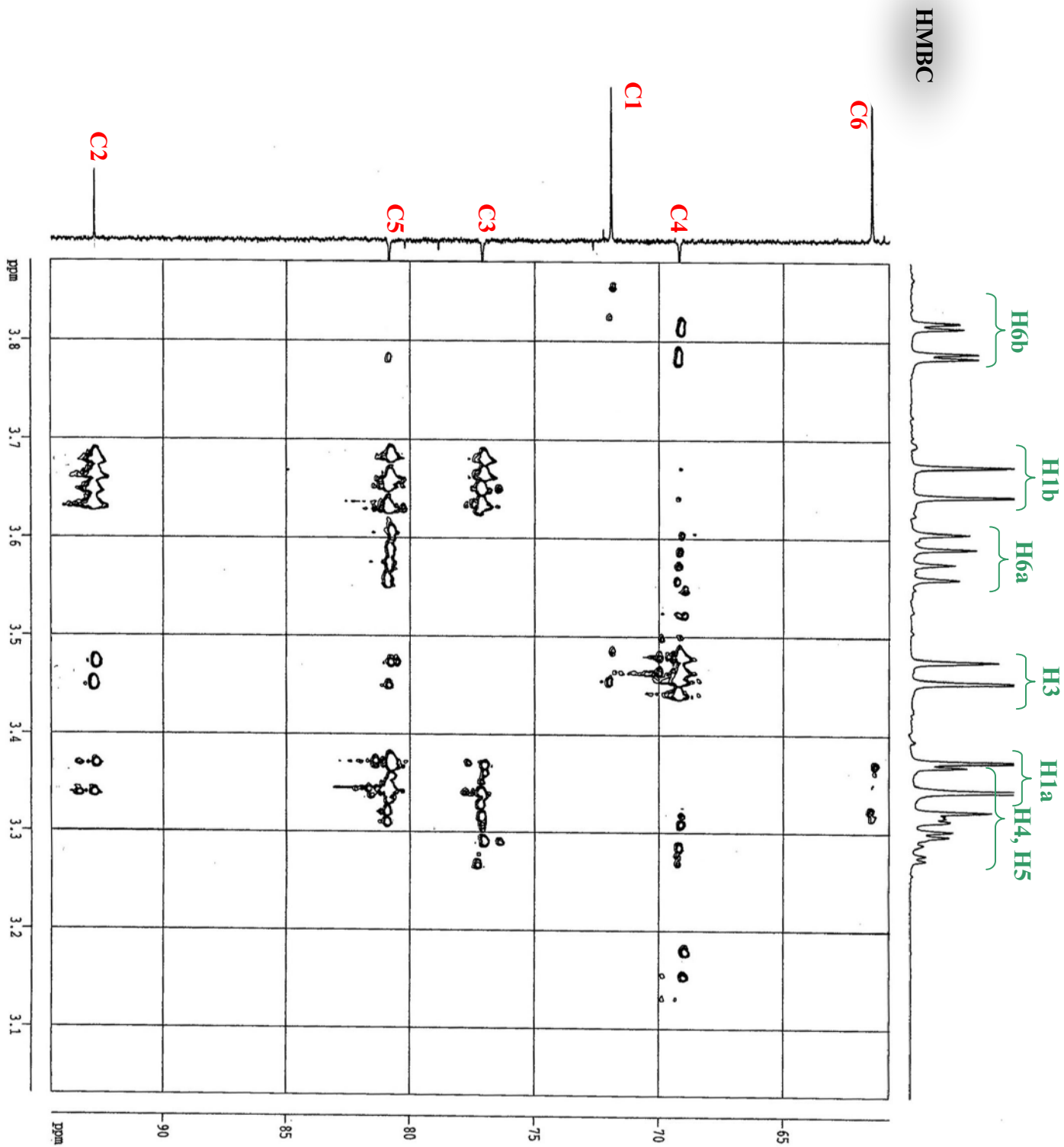


δ (ppm)	Déplacement chimique (δ , ppm)							
	1		2	3	4	5	6	
	1a	1b					6a	6b
^1H	3,36	3,66	-	3,46	3,34	3,31	3,58	3,80
^{13}C	71,9		92,8	77,1	69,2	80,8	61,4	

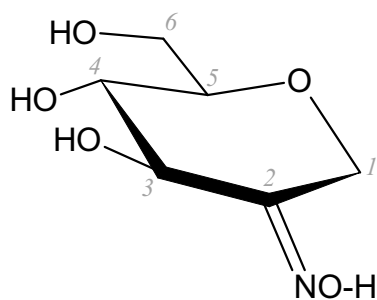




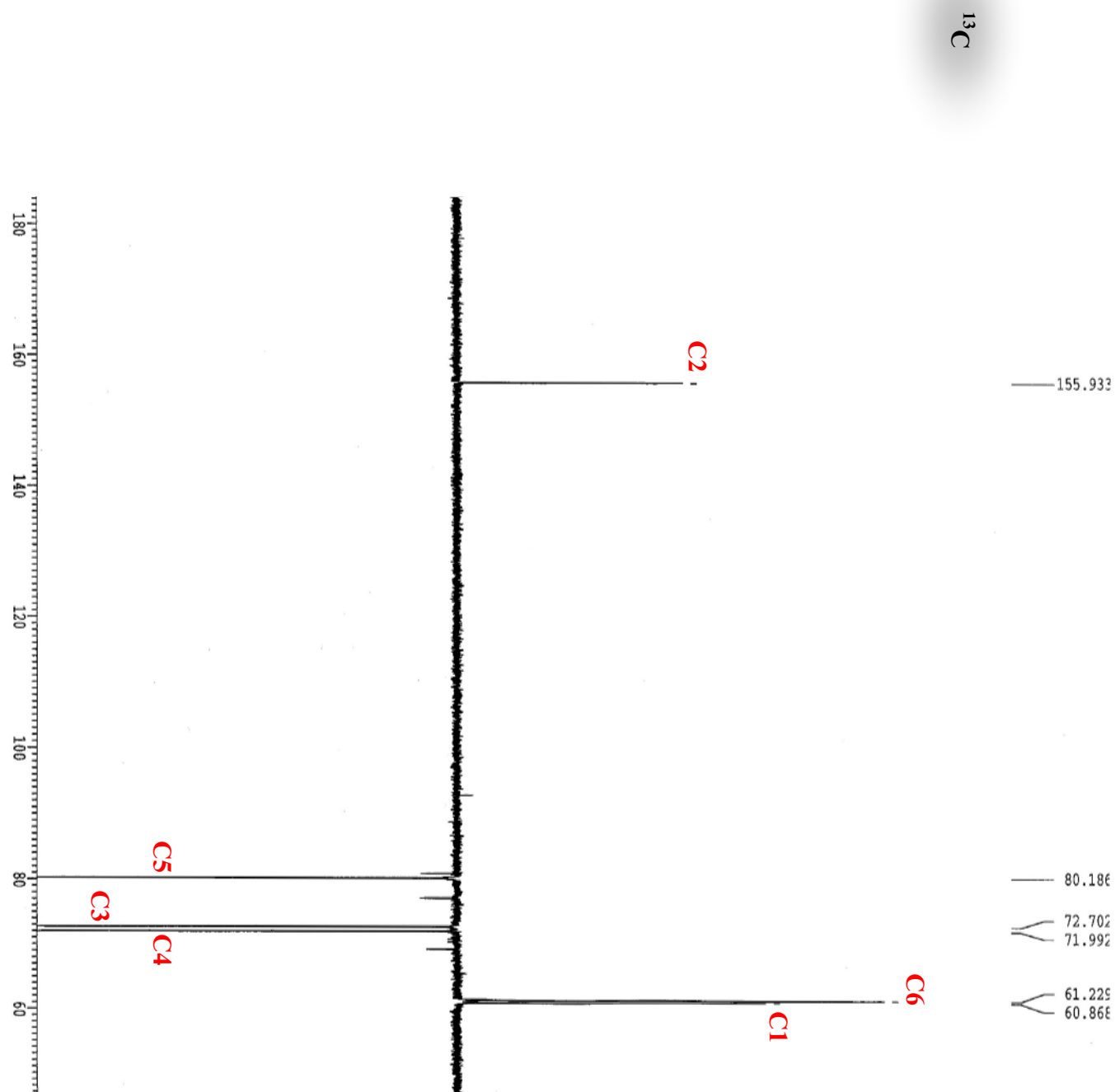


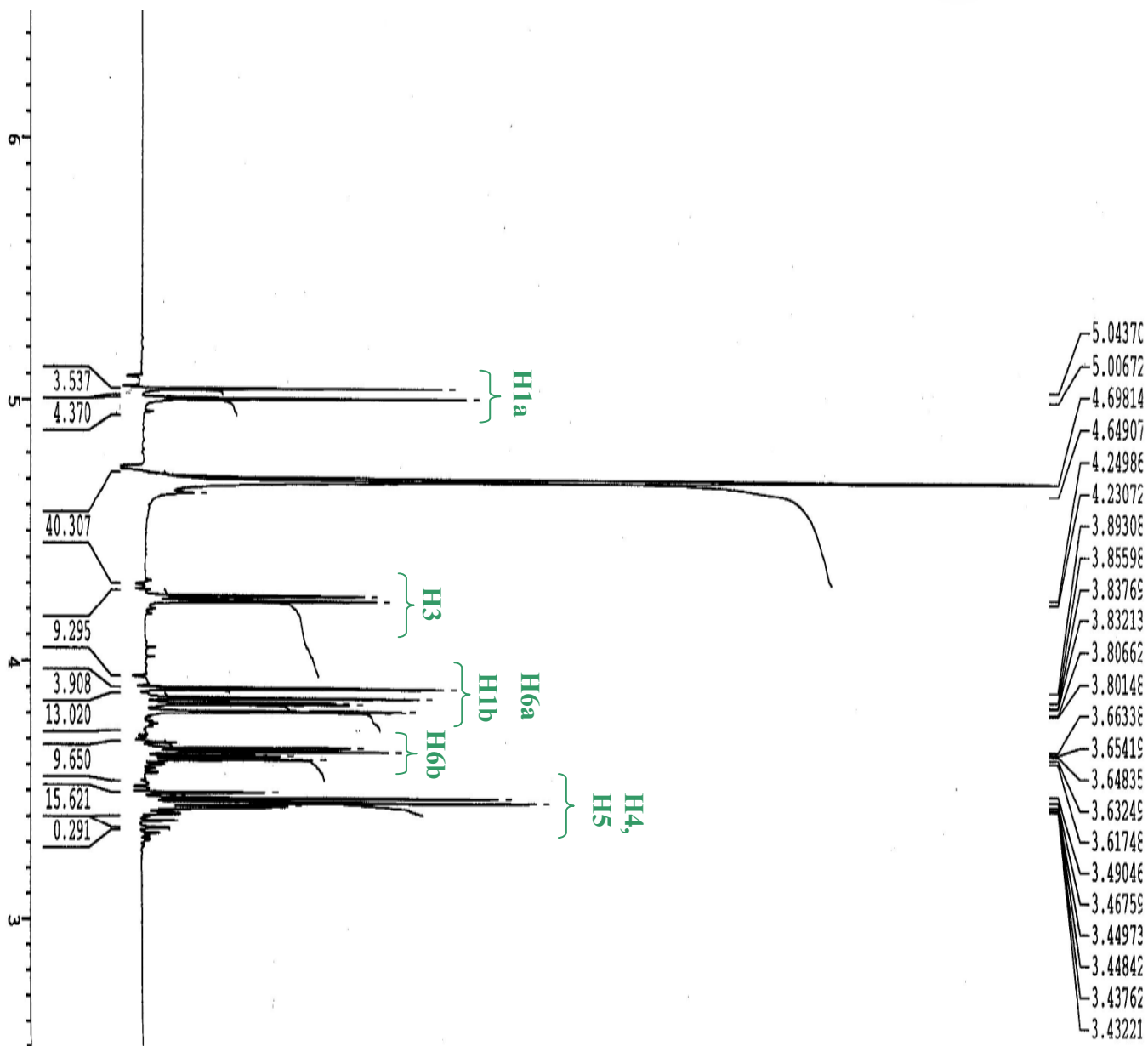


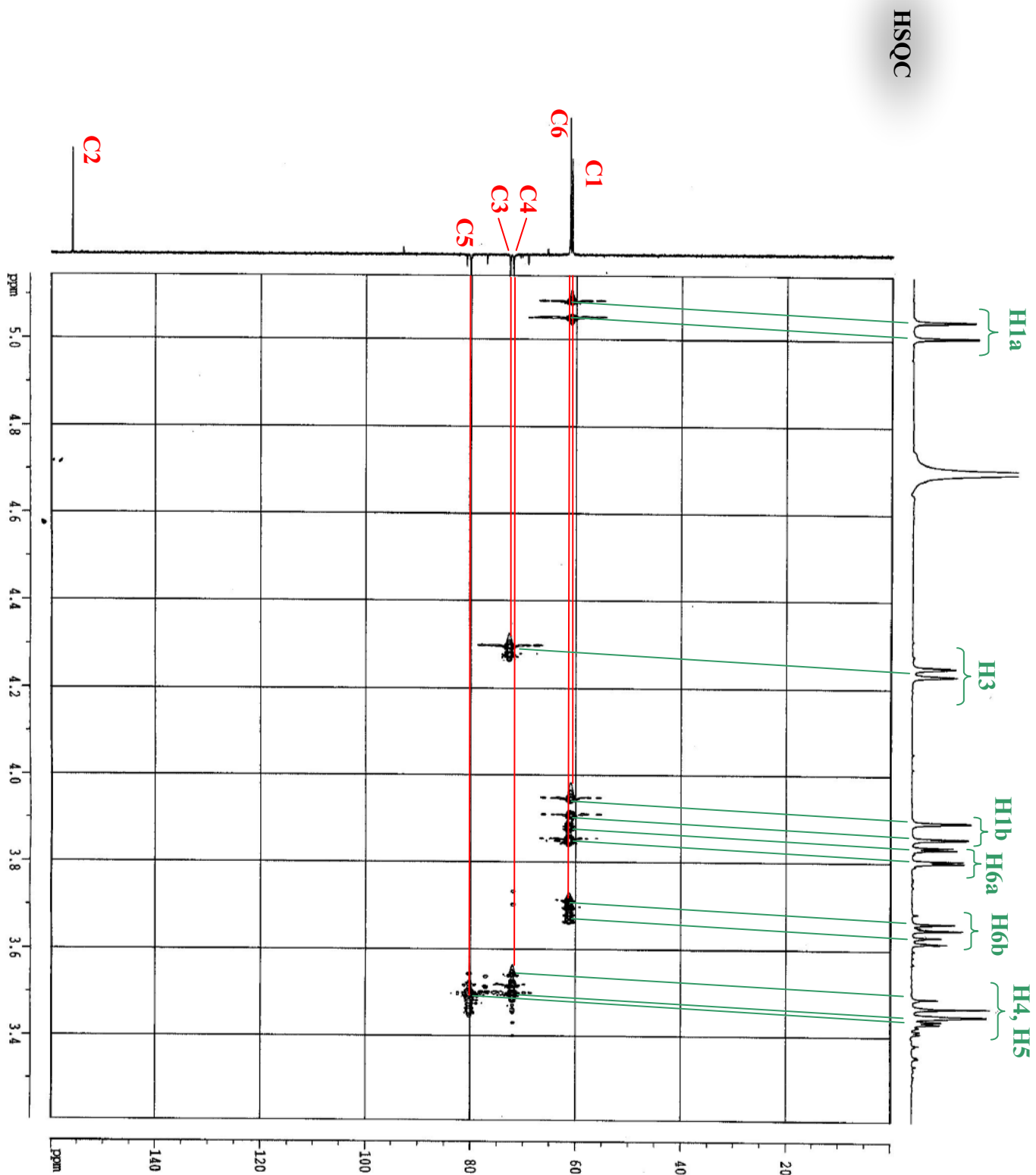
1,5-ANHYDRO-D-FRUCTOSE OXIME

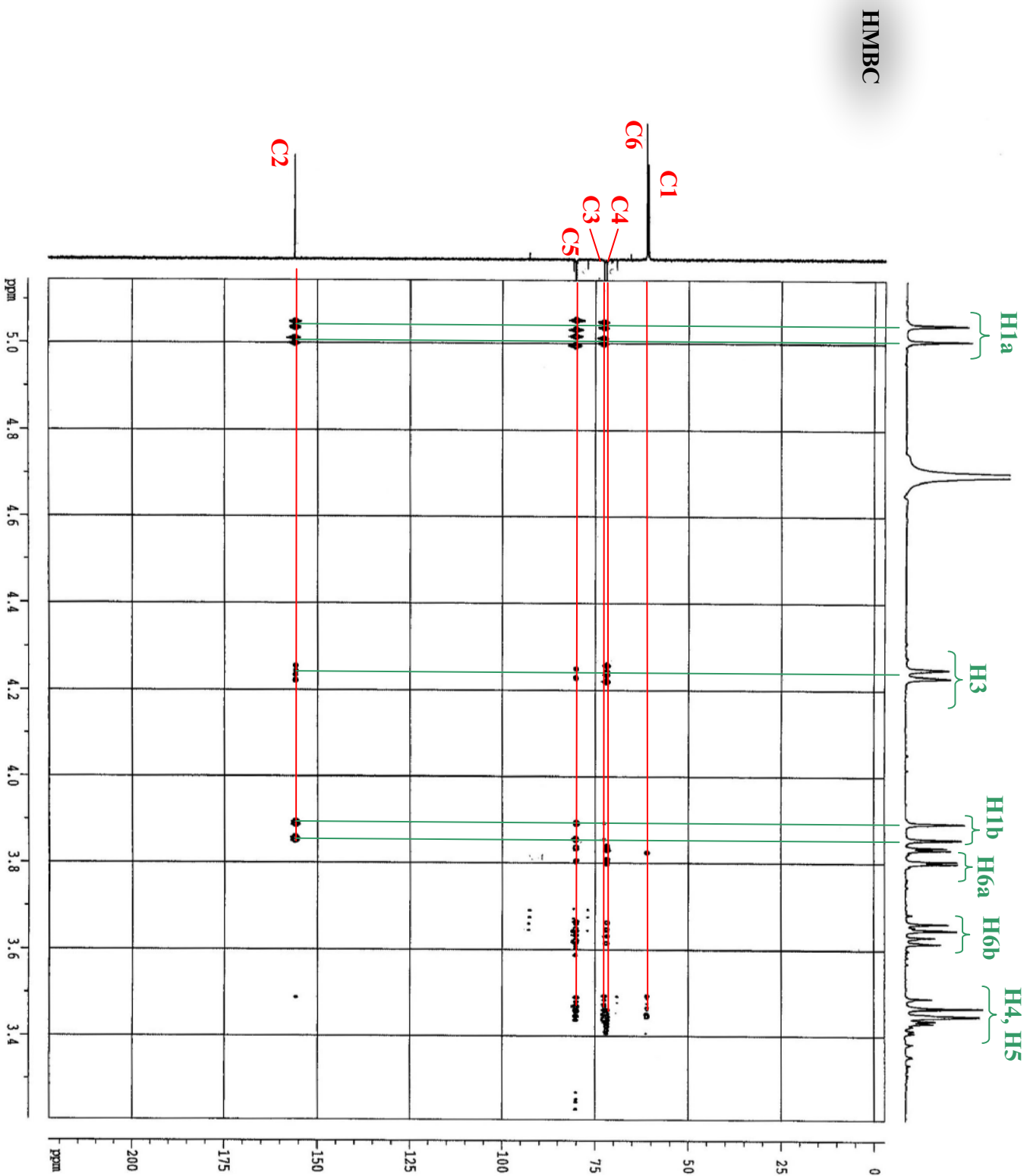


δ (ppm)	1		2	3	4	5	6	
	1a	1b					6a	6b
^{13}C	60,8		155,9	72,7	72,0	80,2	61,2	
^1H	5,03 (<i>d</i>)	3,87 (<i>d</i>)	-	4,24 (<i>d</i>)	3,47 (<i>d</i>)	3,44 (<i>ddd</i>)	3,82 (<i>dd</i>)	3,64 (<i>dd</i>)

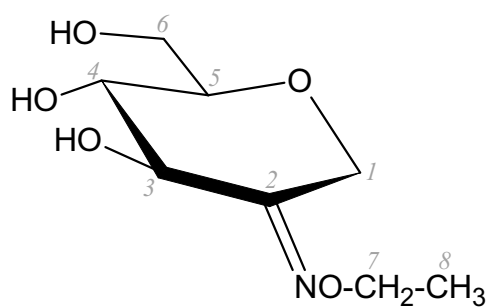




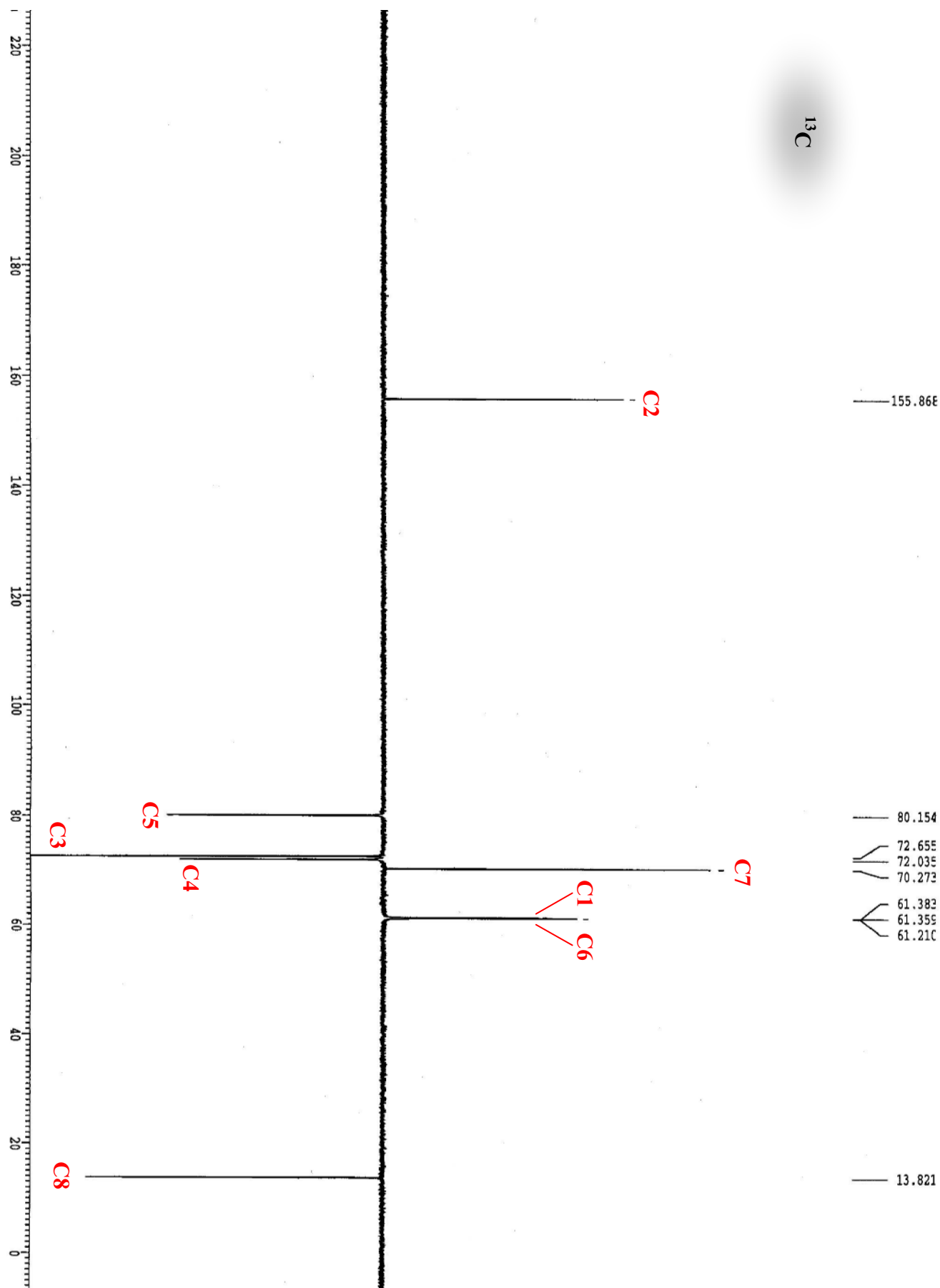


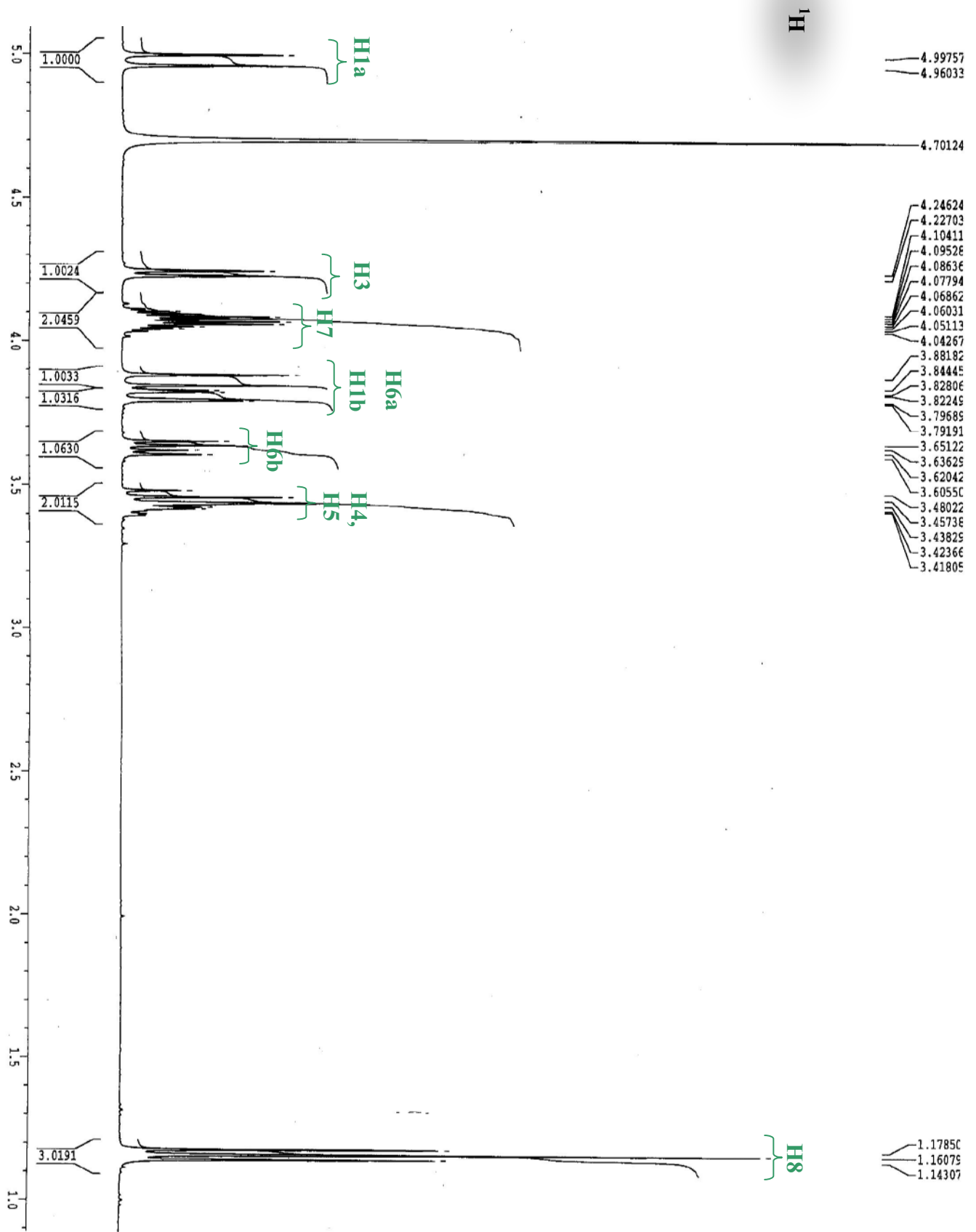


1,5-ANHYDRO-D-FRUCTOSE ETHYL OXIME

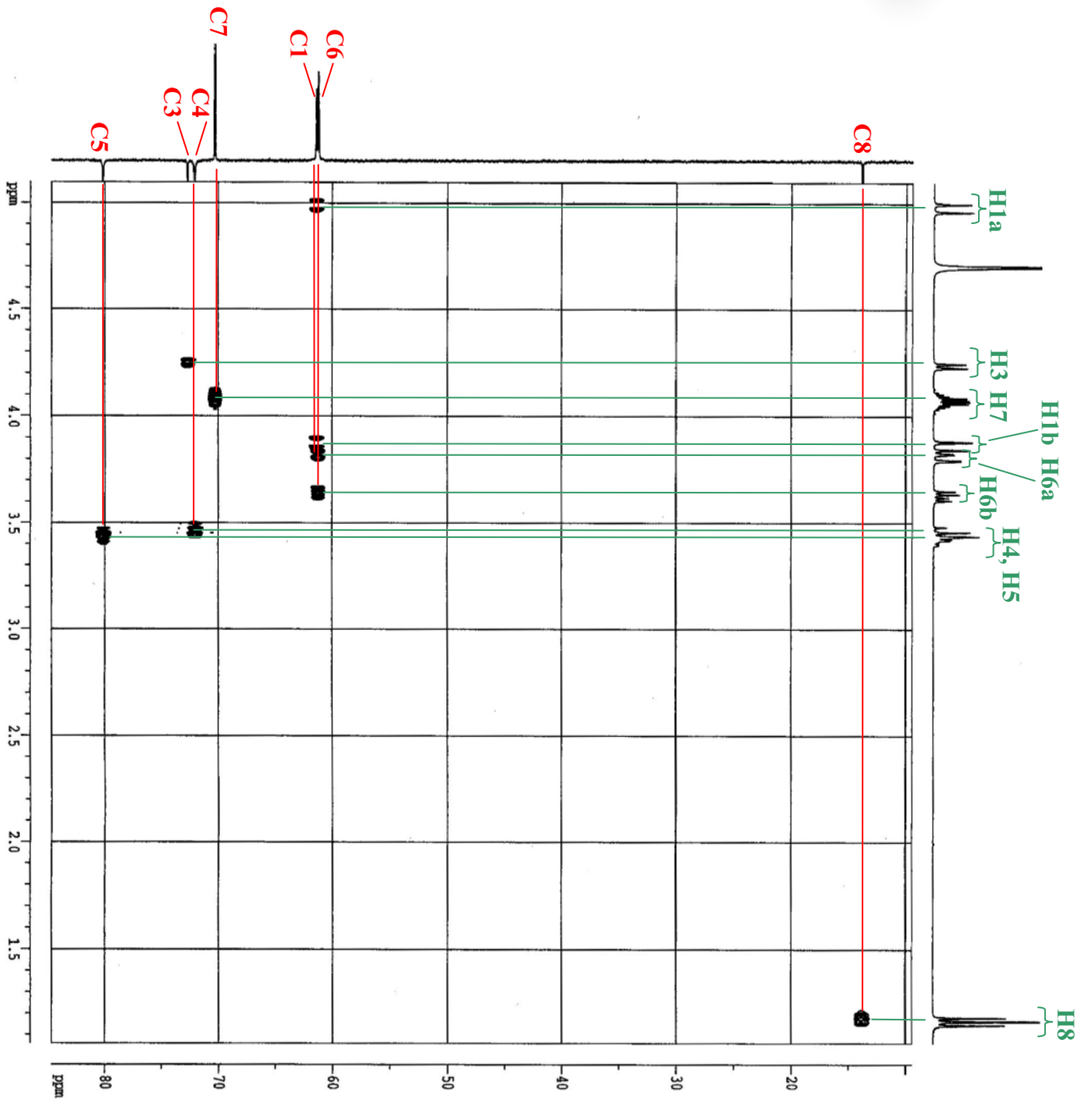


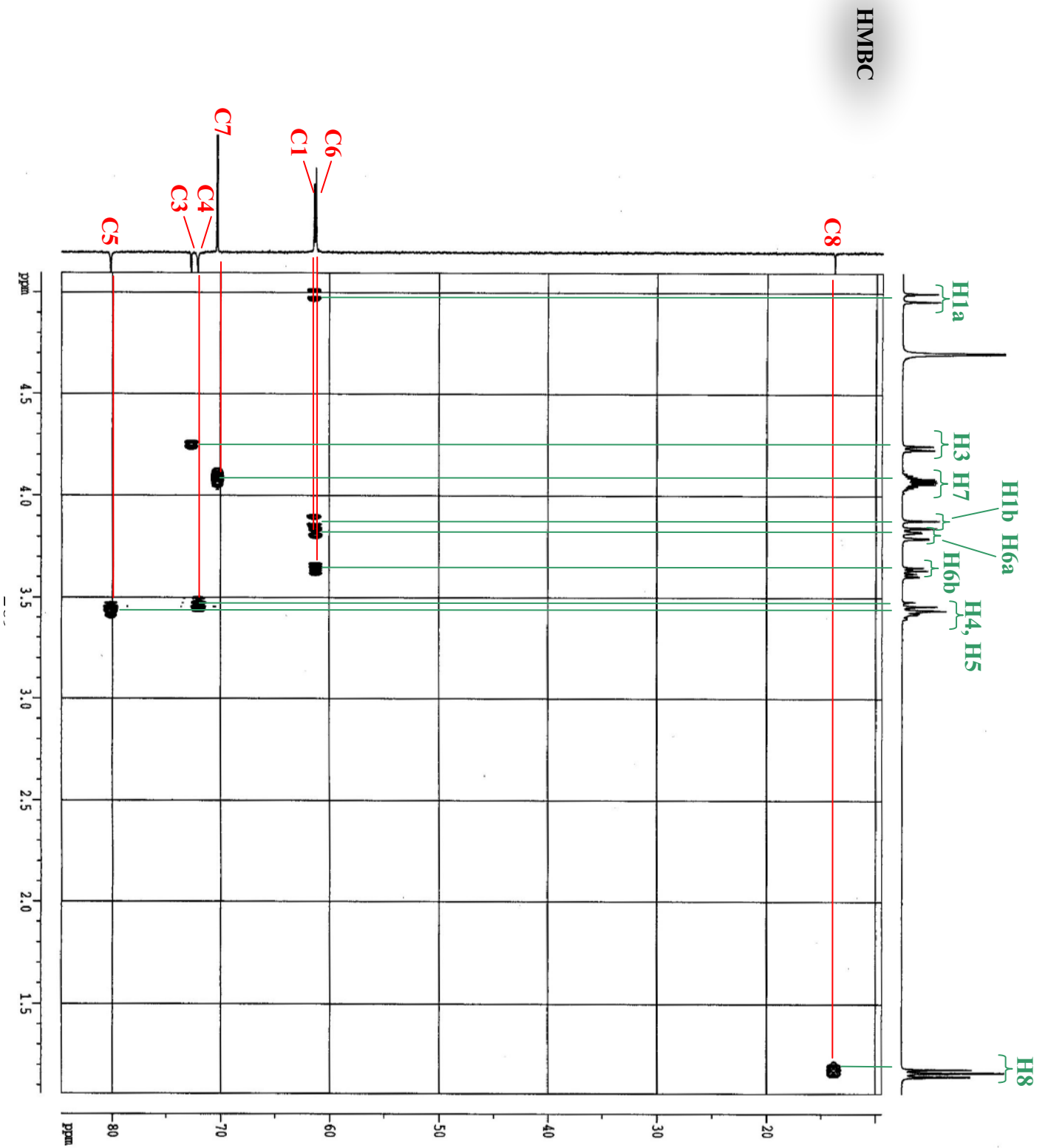
δ (ppm)	1		2	3	4	5	6		7	8
	1a	1b					6a	6b		
^{13}C	61,4		155,9	72,7	72,0	80,2	61,2		13,8	70,3
^1H	4,98 (d)	3,86 (d)	-	4,24 (d)	3,46 (?)	3,42 (?)	3,81 (dd)	3,63 (dd)		



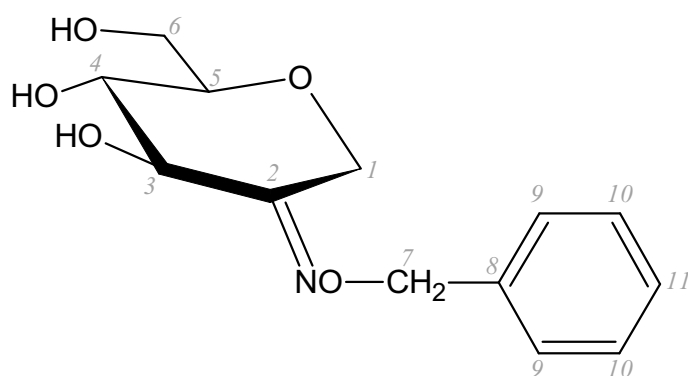


HSQC

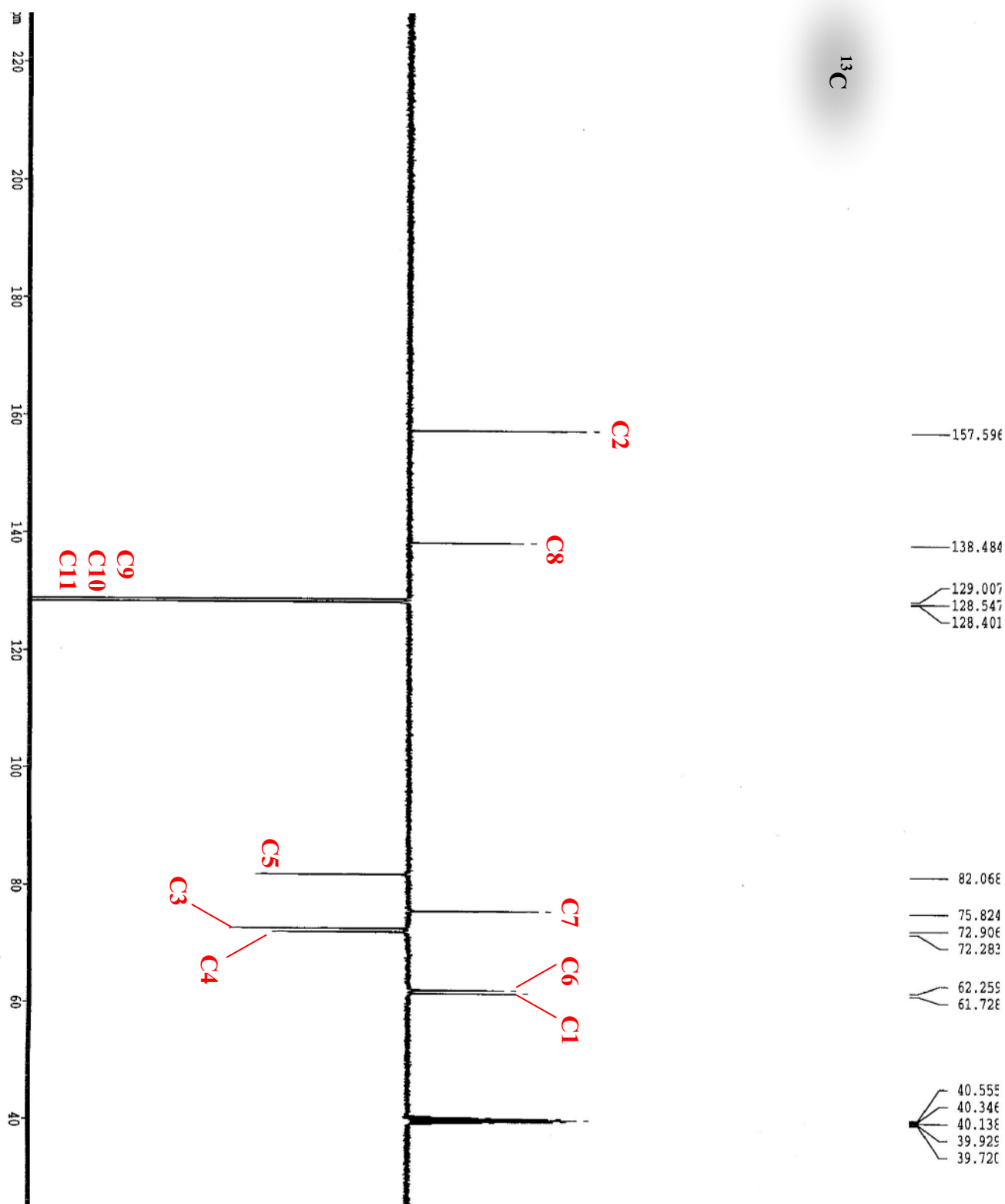




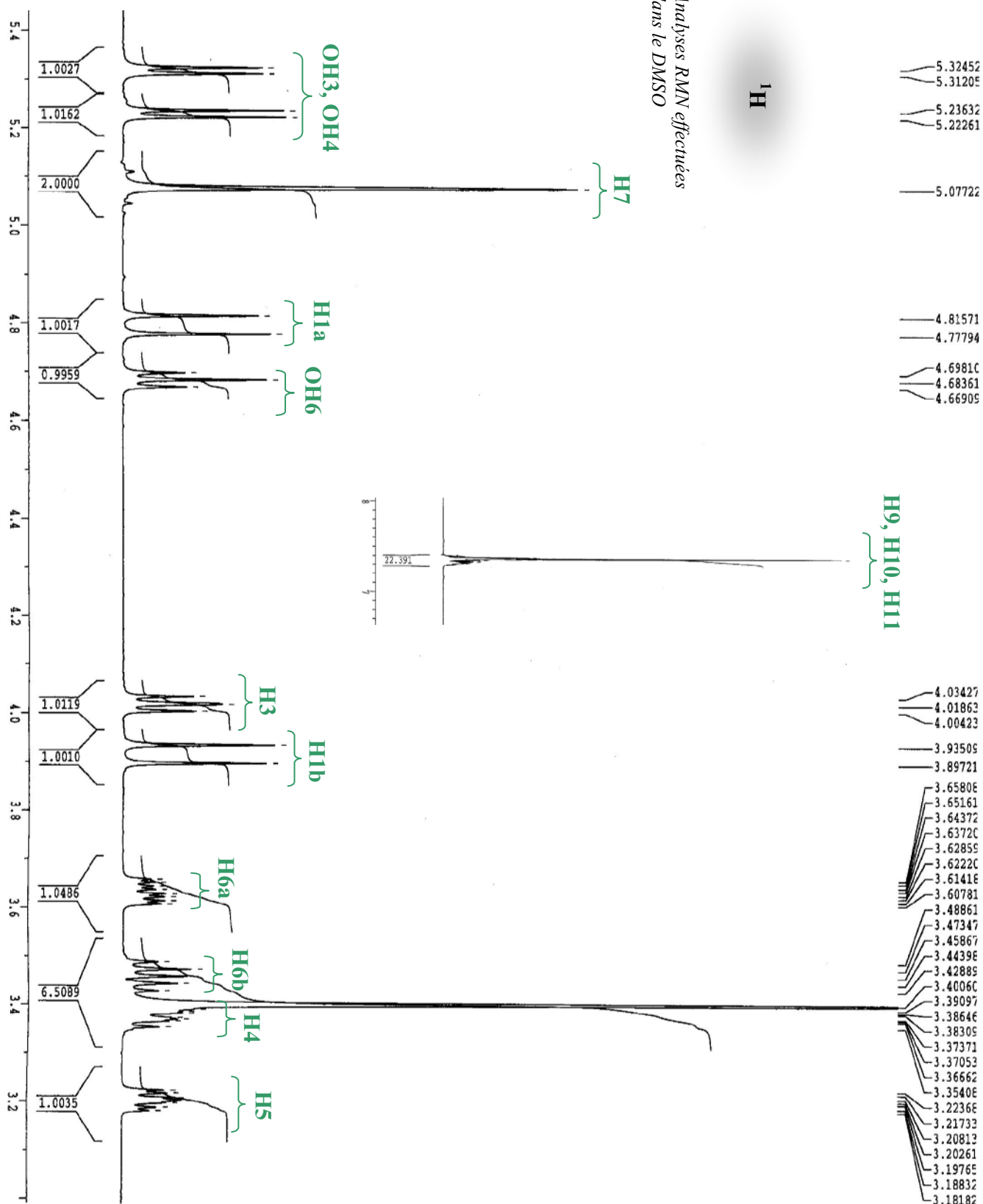
1,5-ANHYDRO-D-FRUCTOSE BENZYL OXIME

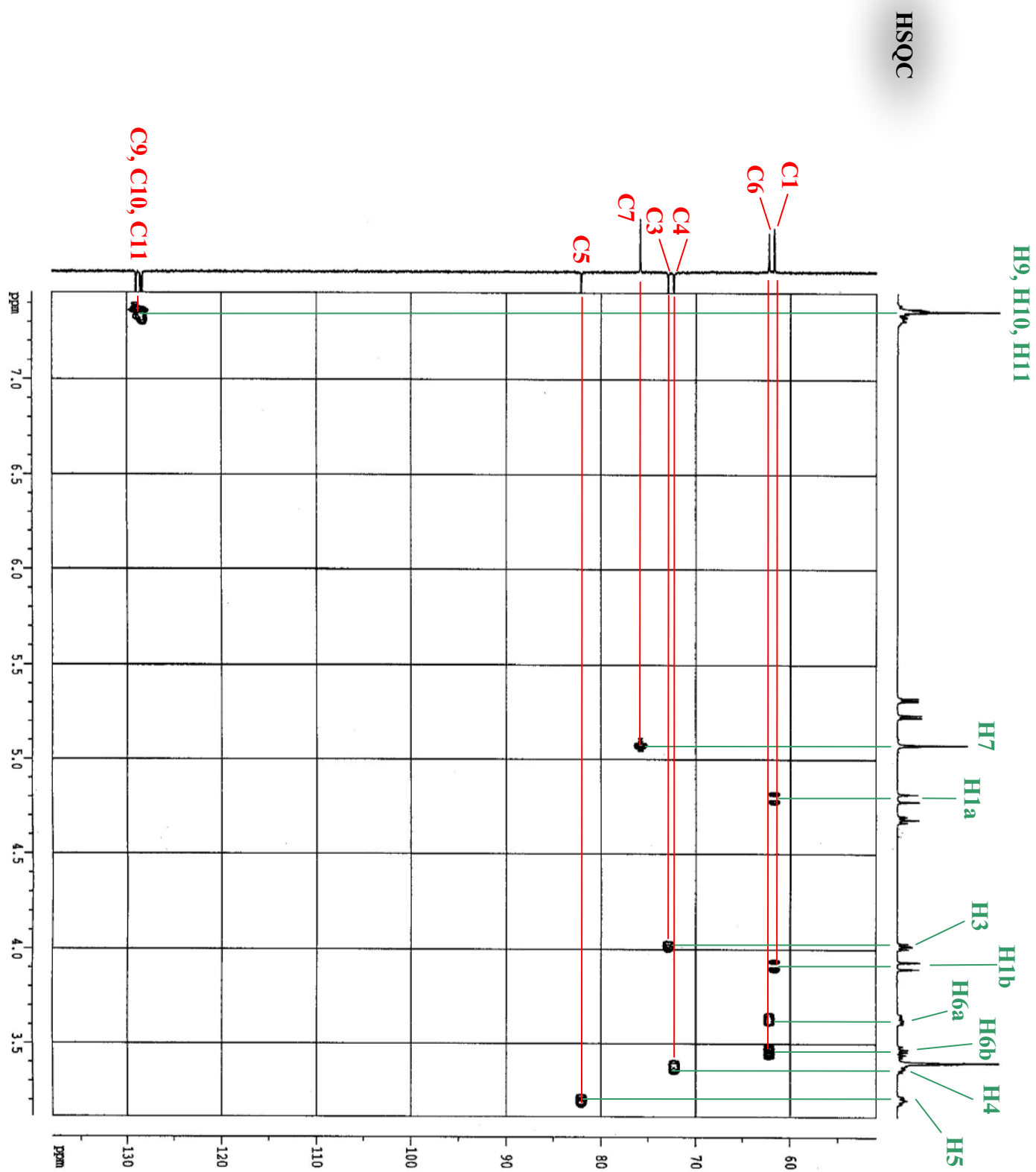


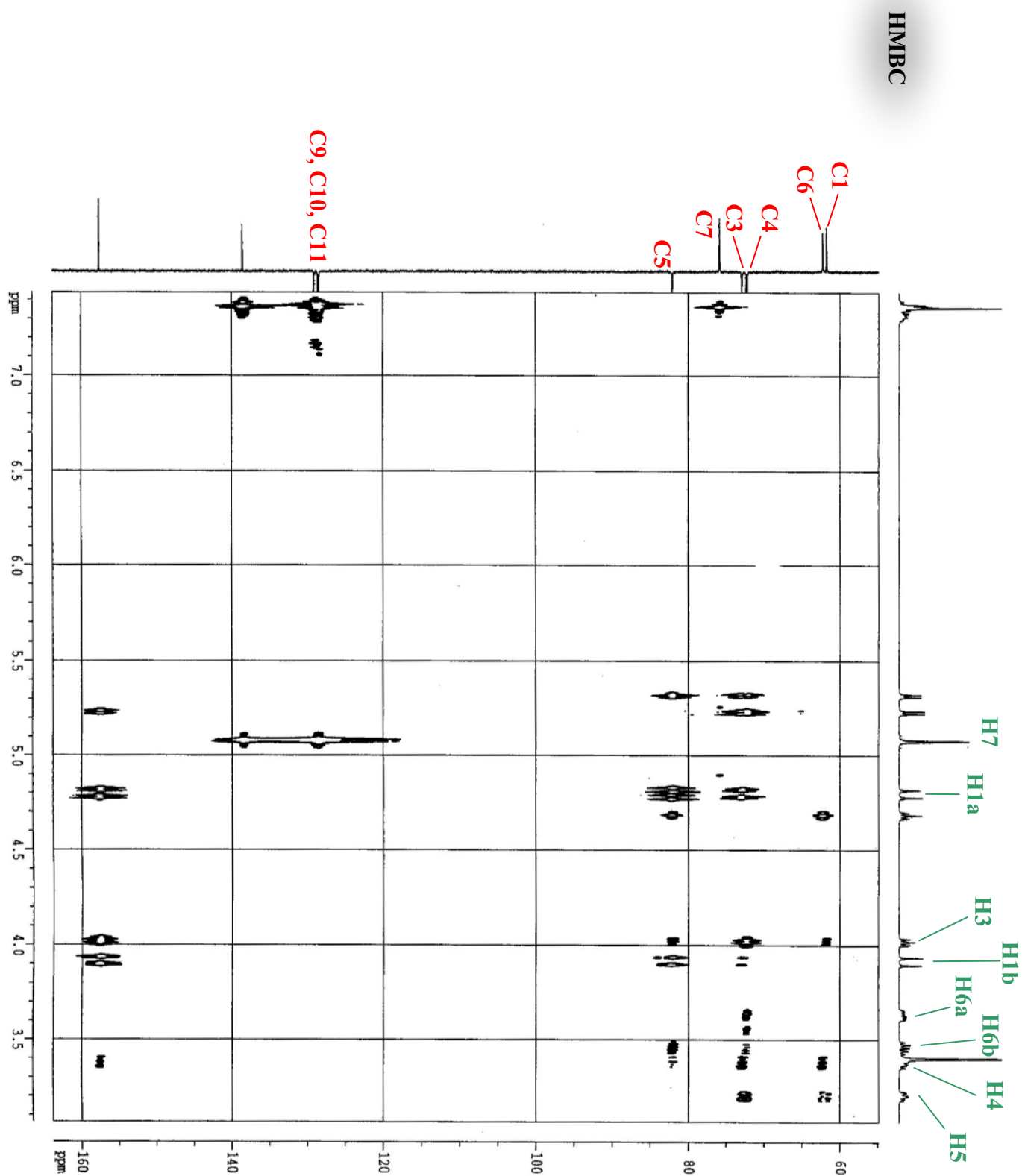
δ (ppm)	1		2	3	4	5	6		7	8	9	10	11
	1a	1b					6a	6b					
^{13}C	60,7		157,6	72,9	72,3	82,1	62,3		75,8	138,5	128,4	128,5	129,0
^1H	4,80 (<i>d</i>)	3,92 (<i>d</i>)	-	4,02 (<i>t</i>)	3,37 (<i>m</i>)	3,20 (<i>dt</i>)	3,63 (<i>ddd</i>)	3,46 (<i>dd</i>)	5,08 (<i>s</i>)	-	7,35 (<i>m</i>)	7,35 (<i>m</i>)	7,35 (<i>m</i>)



Analyses RMN effectuées dans le DMSO

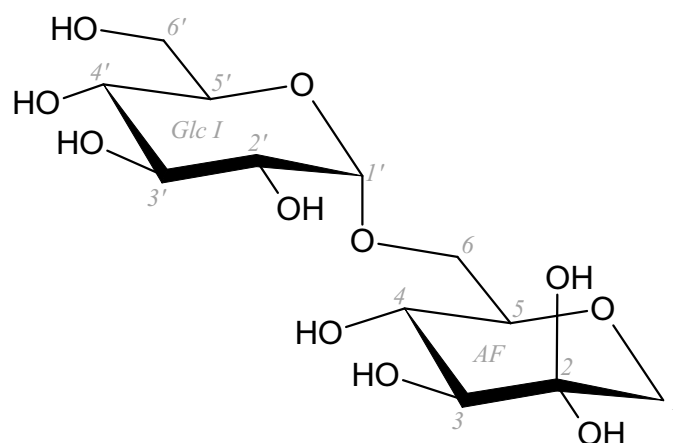




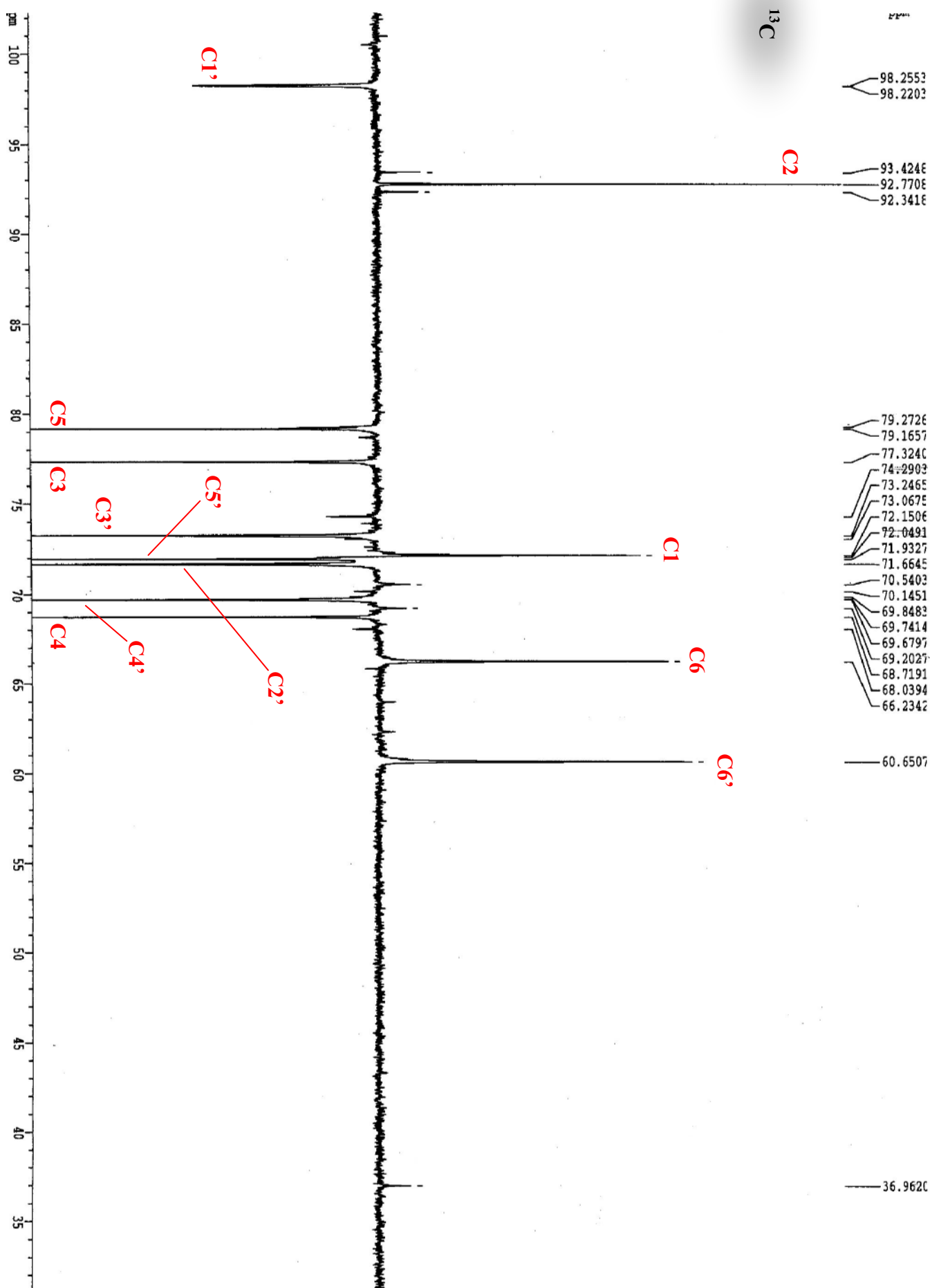


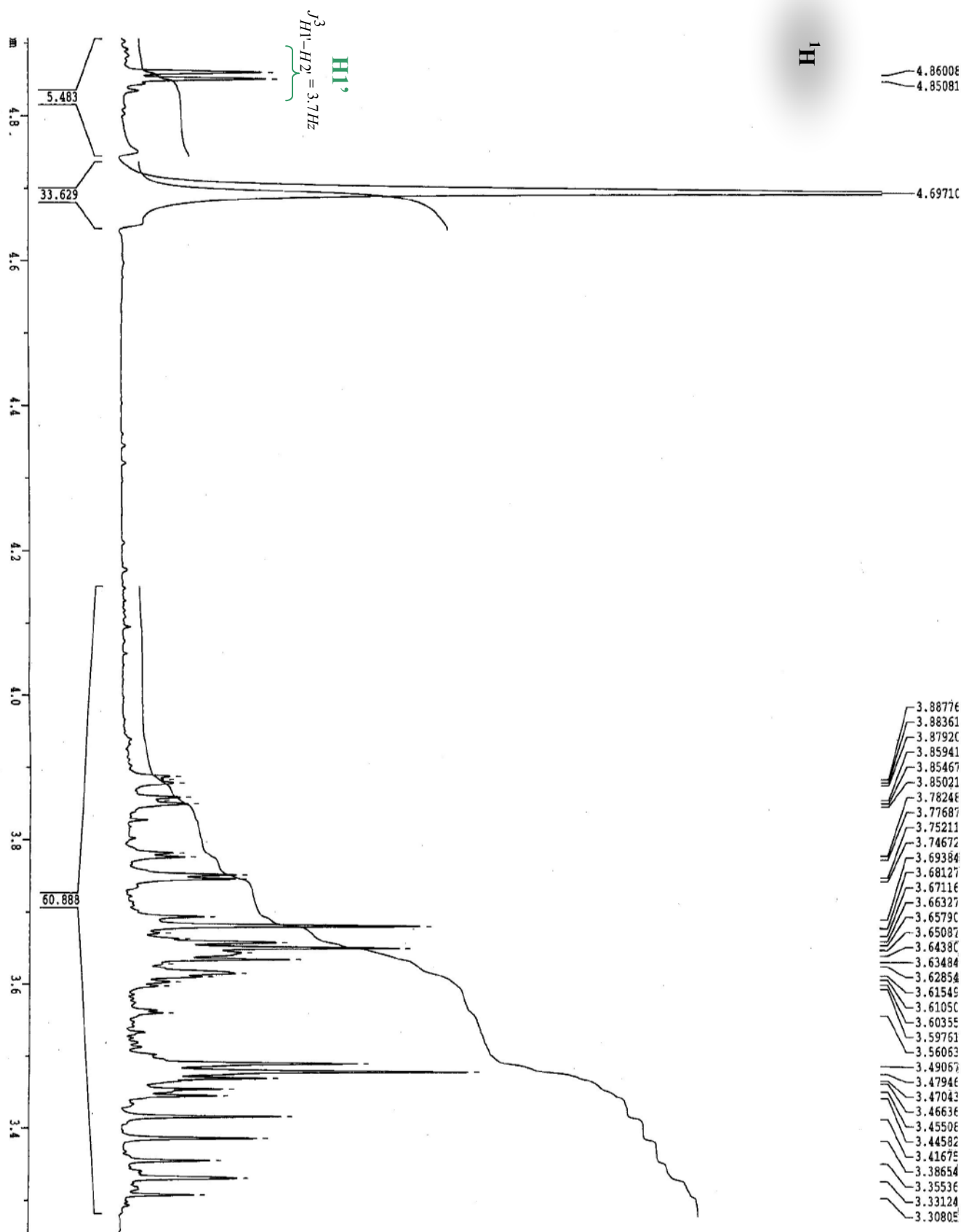
α -(1,6) ANHYDRO-D-FRUCTO-GLUCOPYRANOSE DP 2

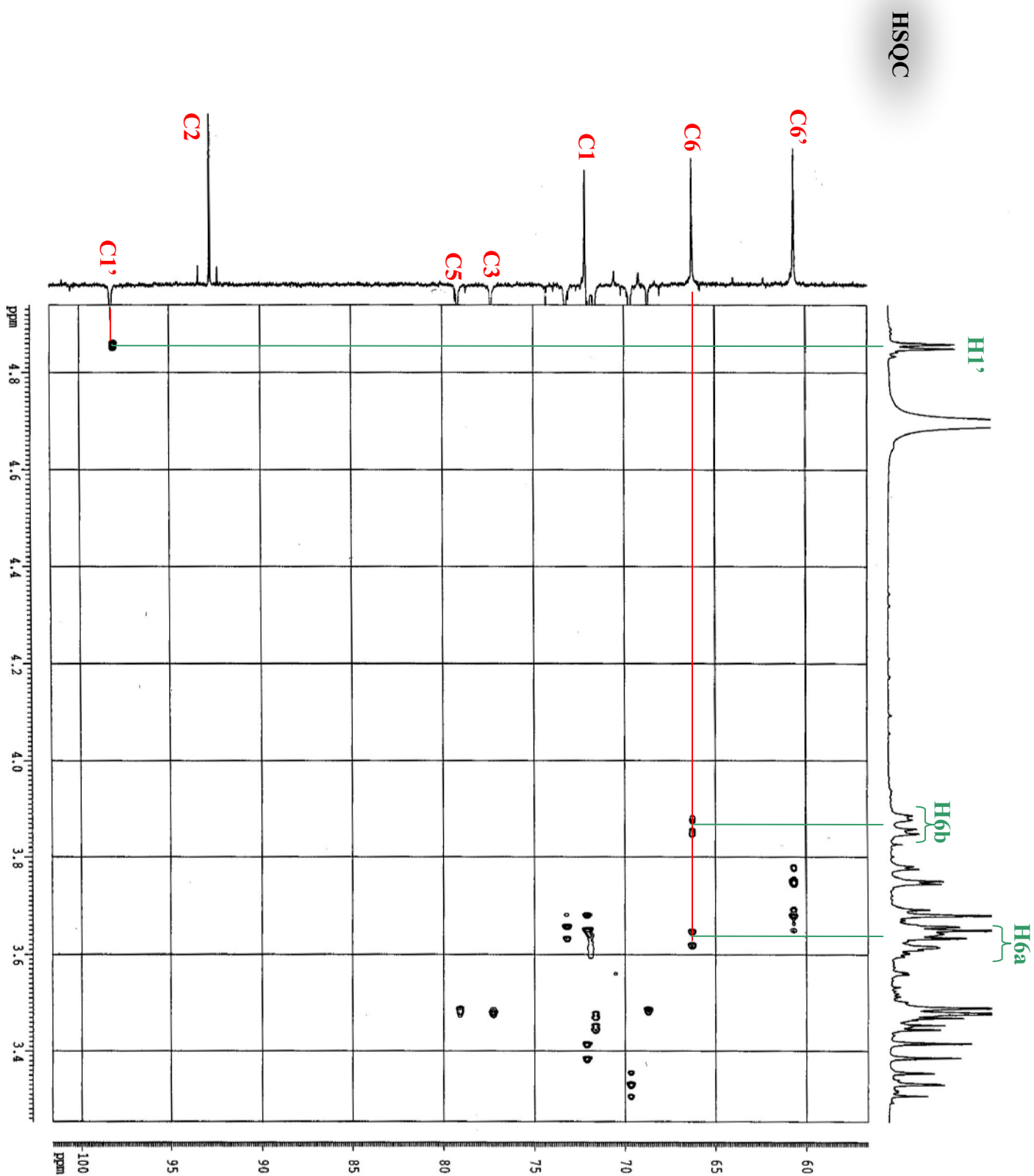
α -(1,6) AFGOS DP 2

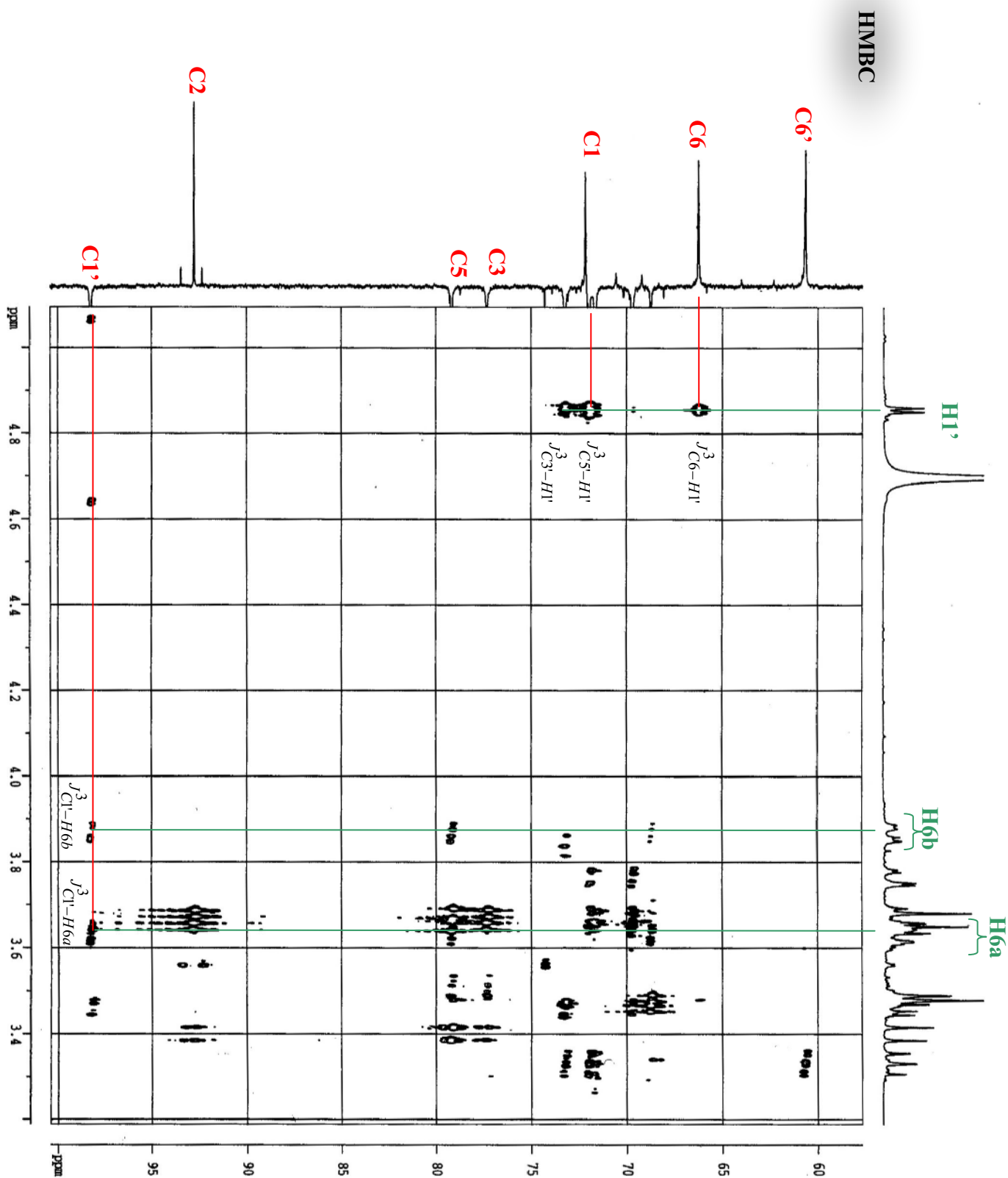


Résidu		Déplacement chimique (δ , ppm)							
		1		2	3	4	5	6	
		1a	1b					6a	6b
AF	^1H	3,40	3,67	-	3,48	3,49	3,50	3,63	3,86
	^{13}C	72,2	92,8	77,3	68,7	79,2	66,2		
Glc I	^1H	4,86	3,46	3,69	3,33	3,61	3,69	3,76	
	$J_{1-2}=3,7$ Hz ^{13}C	98,2	71,7	73,3	69,7	71,9	60,7		



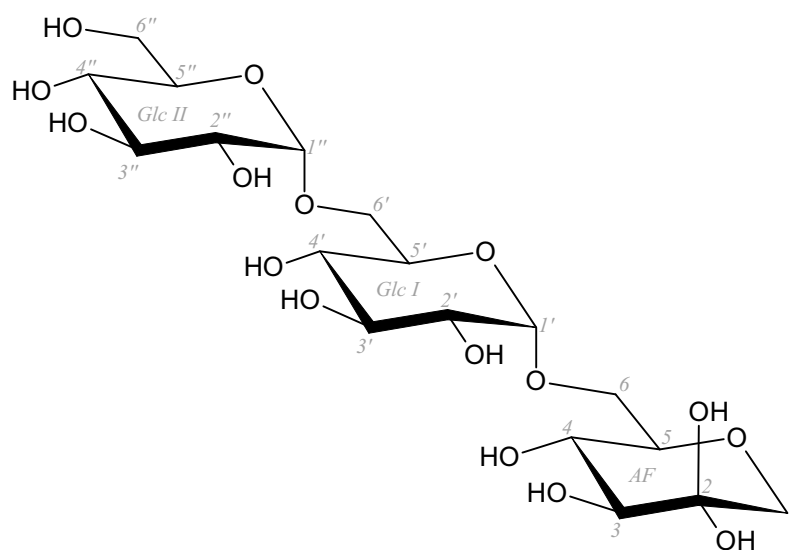




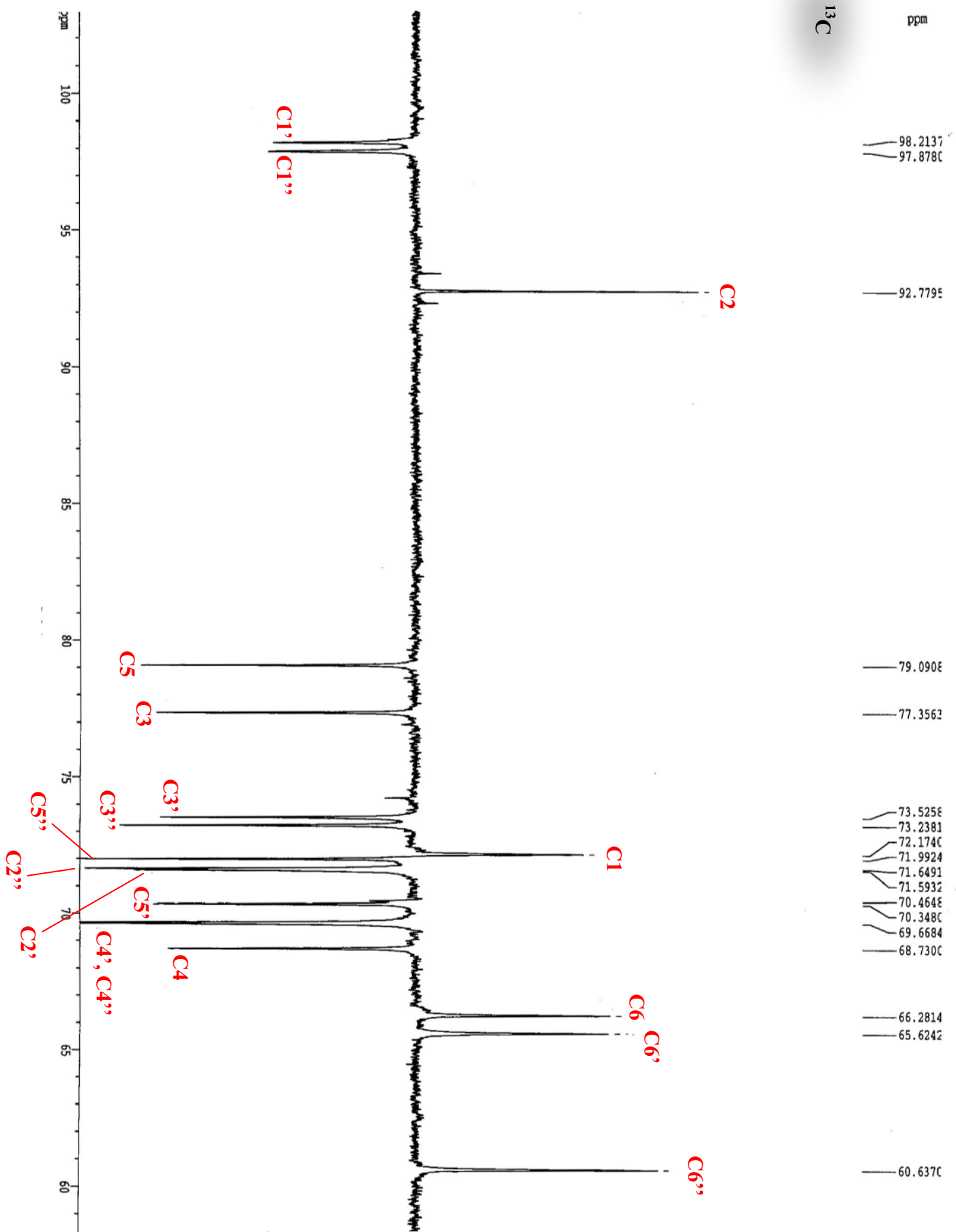


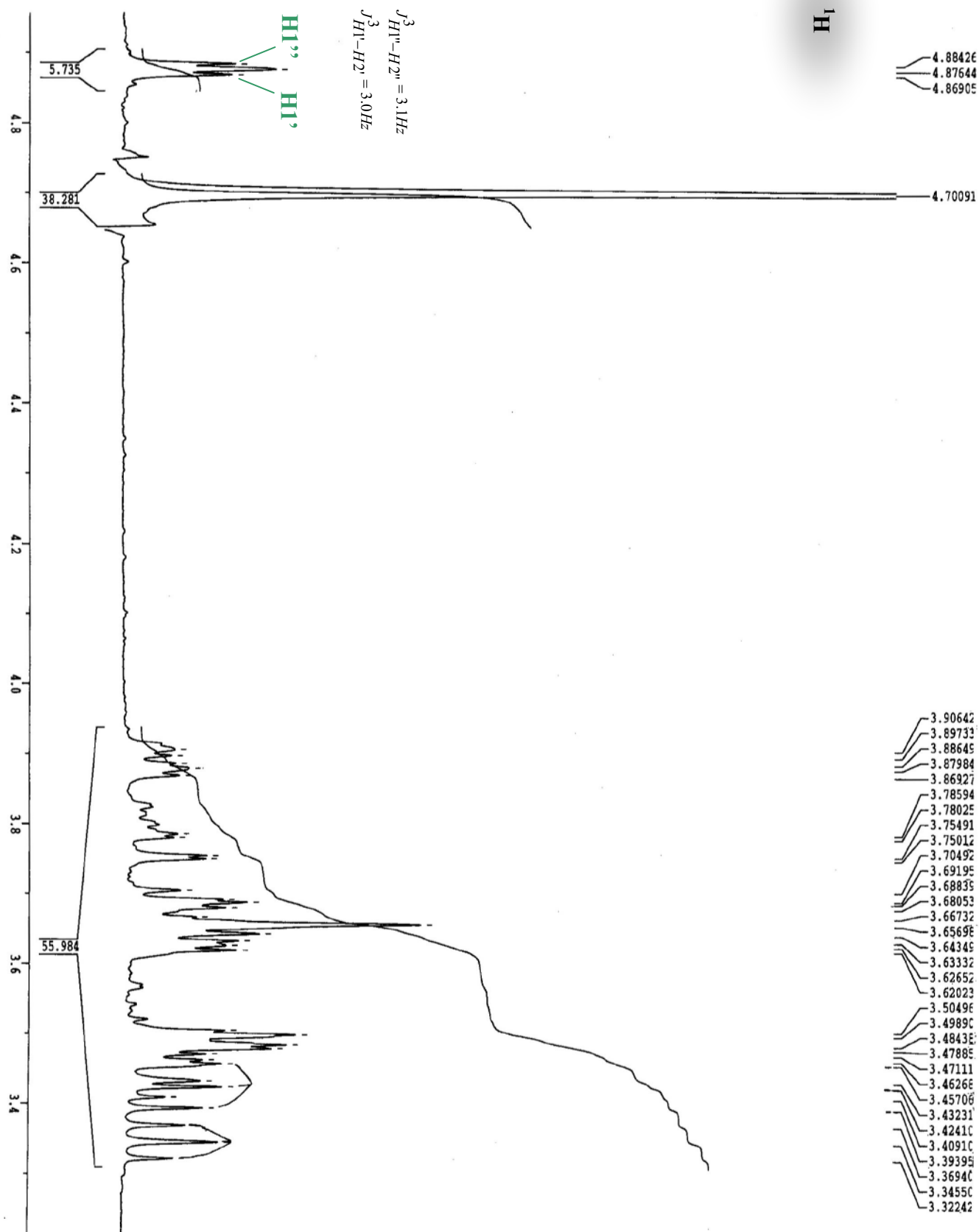
α -(1,6) ANHYDRO-D-FRUCTO-GLUCOPYRANOSE DP 3

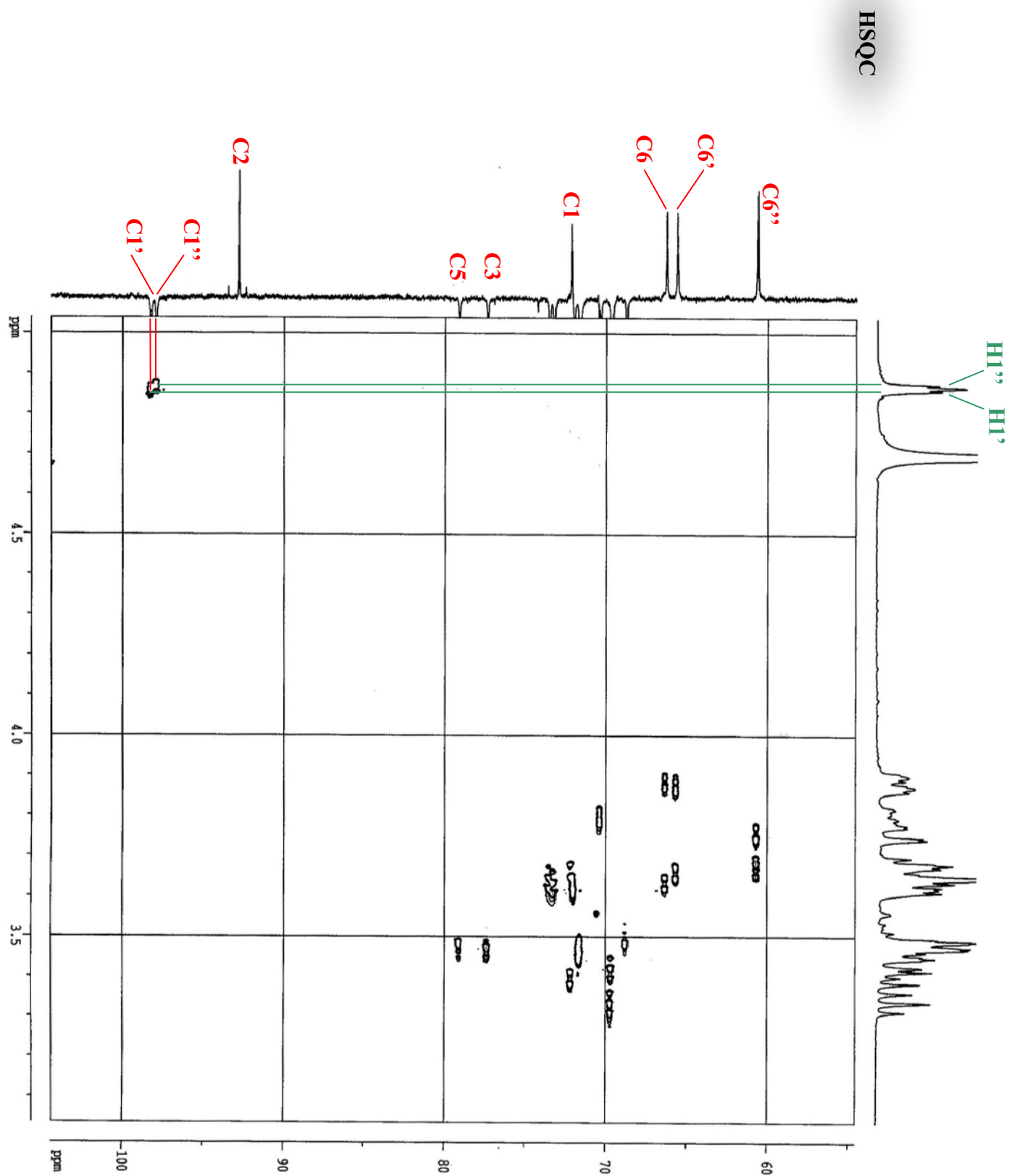
α -(1,6) AFGOS DP 3

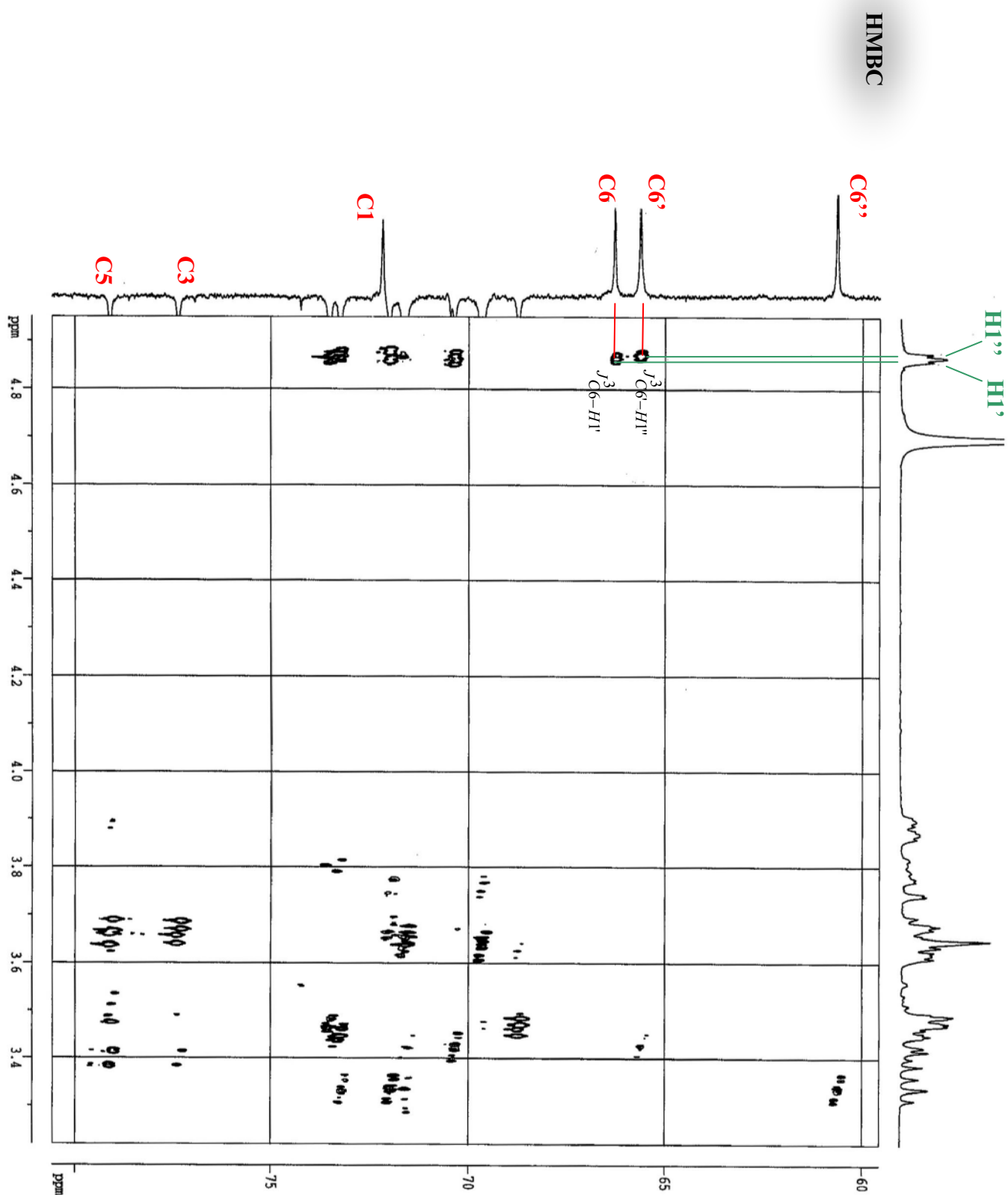


Résidu ^a		Déplacement chimique (δ , ppm)							
		1		2	3	4	5	6	
		1a	1b					6a	6b
AF	¹ H	3,41	3,67	-	3,47	3,48	3,48	3,64	3,89
	¹³ C	72,2		92,8	77,4	68,7	79,1	66,3	
Glc I	¹ H	4,88	3,48	3,64	3,42	3,81	3,67	3,88	
	$J_{1-2}=3,0$ Hz ¹³ C	98,2	71,6	73,5	69,7	70,3	65,6		
Glc II	¹ H	4,87	3,48	3,63	3,35	3,64	3,68	3,77	
	$J_{1-2}=3,1$ Hz ¹³ C	97,9	71,7	73,2	69,7	72,0	60,6		



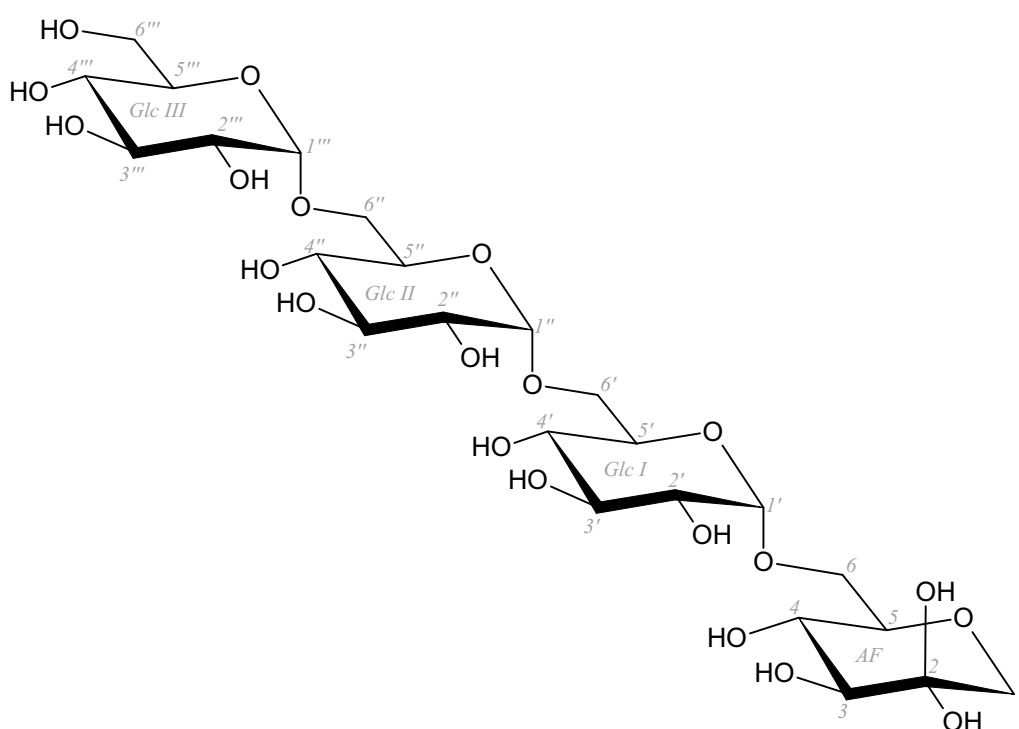




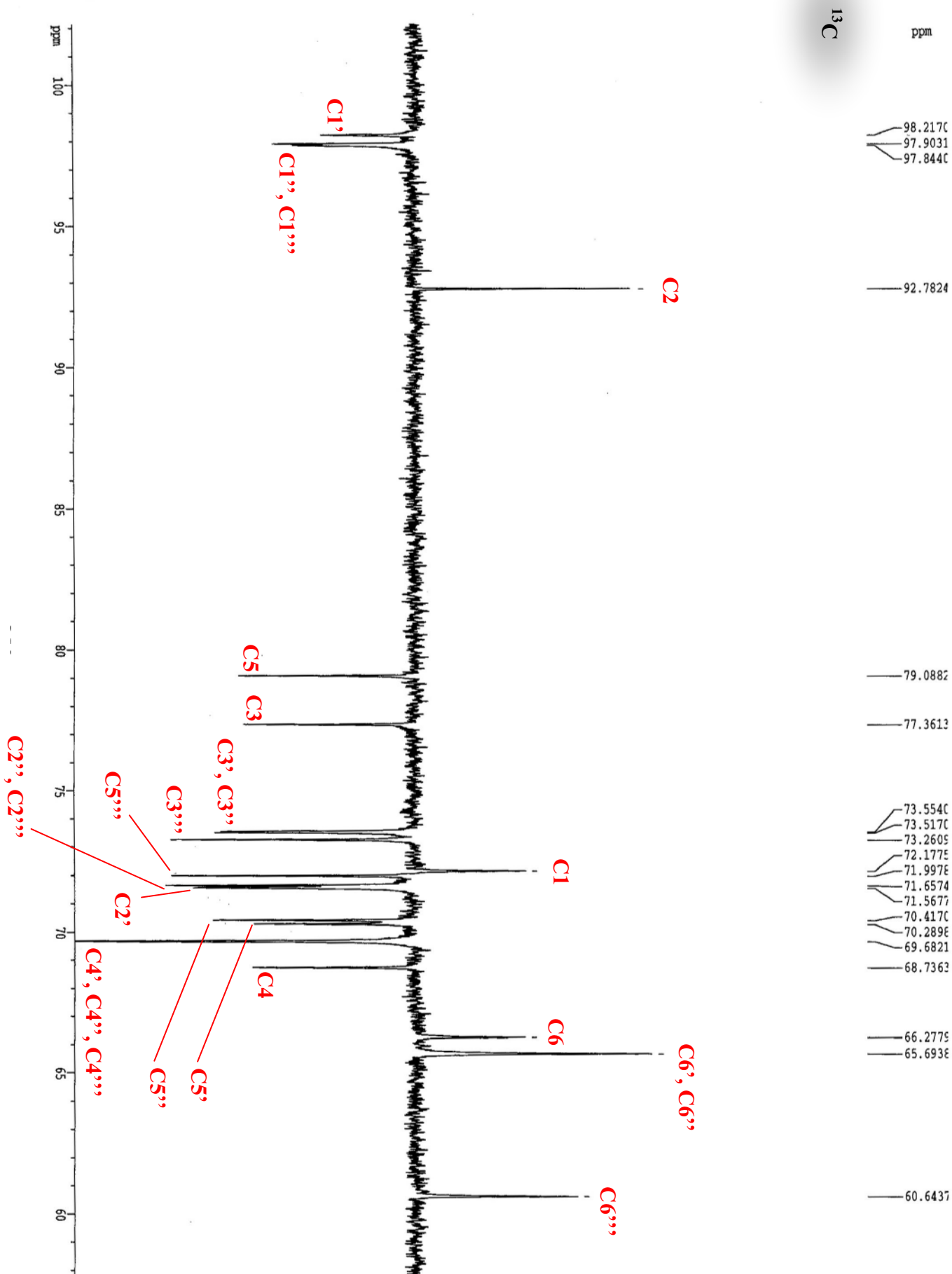


α -(1,6) ANHYDRO-D-FRUCTO-GLUCOPYRANOSE DP 4

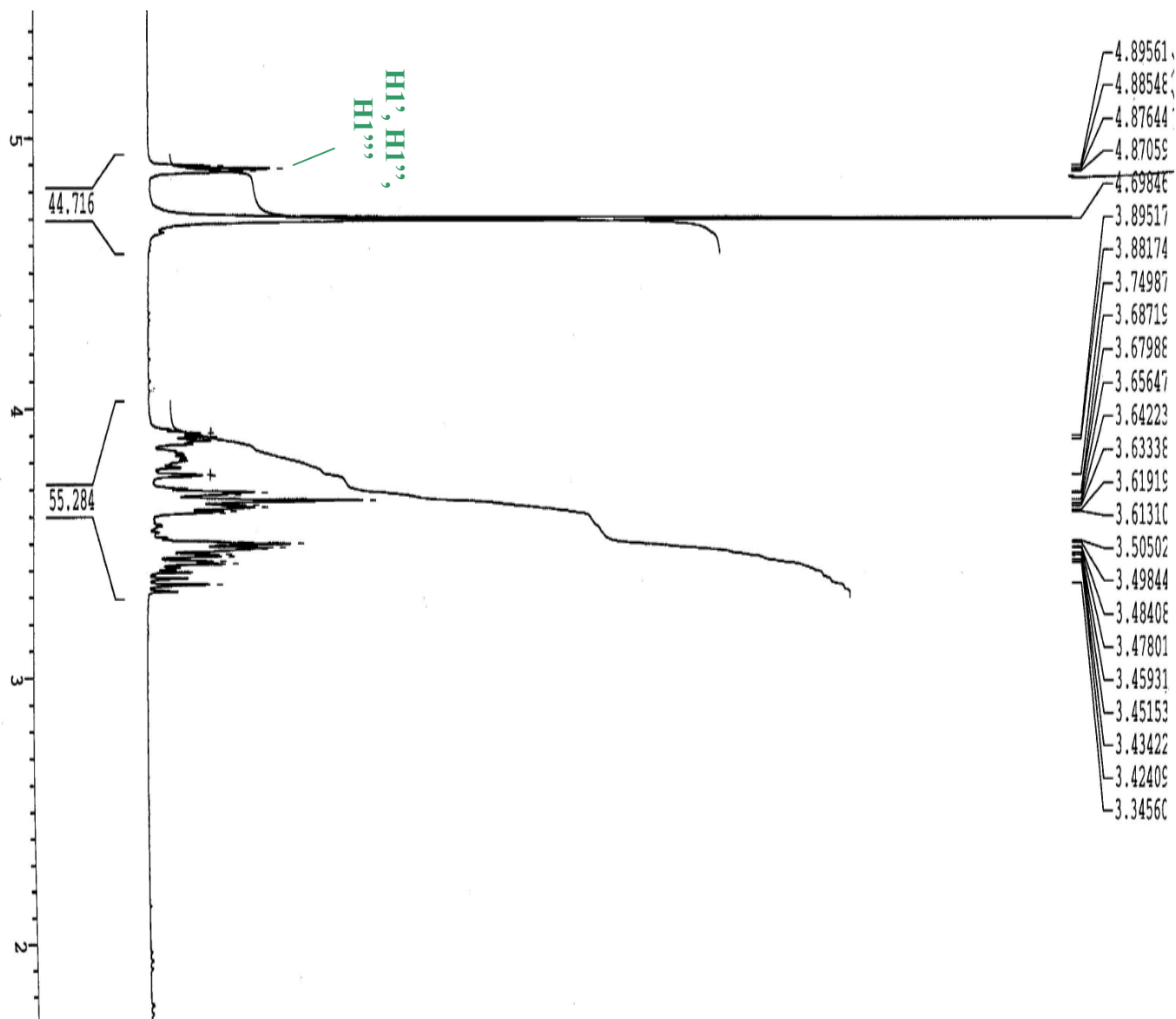
α -(1,6) AFGOS DP 4



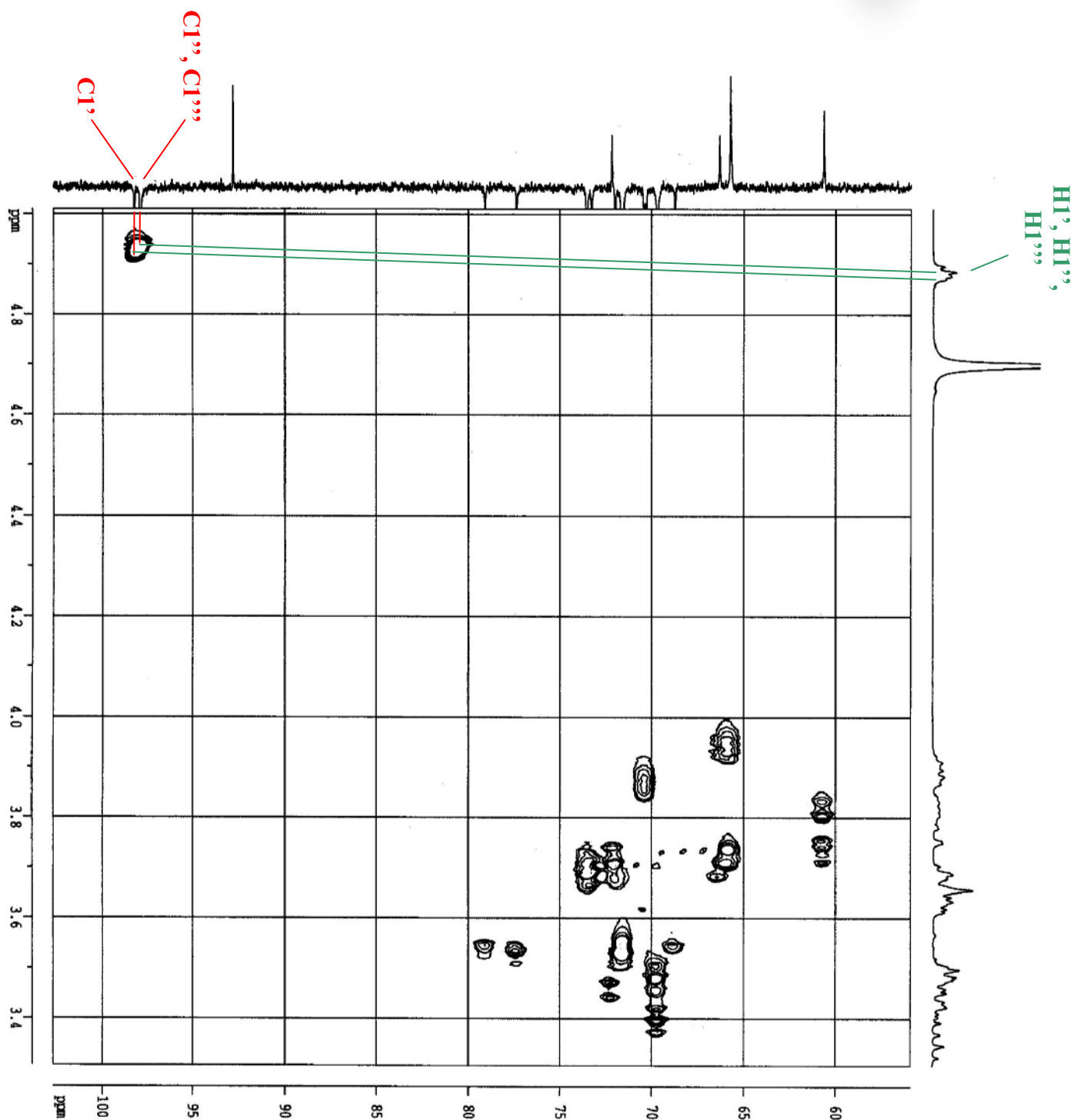
Résidu ^a		Déplacement chimique (δ , ppm)							
		1		2	3	4	5	6	
		1a	1b					6a	6b
AF	¹ H	3,46	3,66	-	3,50	3,51	3,51	3,65	3,90
	¹³ C	72,2		92,8	77,4	68,7	79,1	66,3	
Glc I	¹ H	4,87		3,51	3,66	3,43	3,82	3,89	3,69
	¹³ C	98,2		71,6	73,5	69,7	70,3	65,7	
Glc II	¹ H	4,88		3,51	3,66	3,43	3,82	3,69	3,89
	¹³ C	97,8		71,7	73,5	69,7	70,4	65,7	
Glc III	¹ H	4,88		3,51	3,65	3,34	3,66	3,70	3,76
	¹³ C	97,9		71,7	73,3	69,7	72,0	60,6	

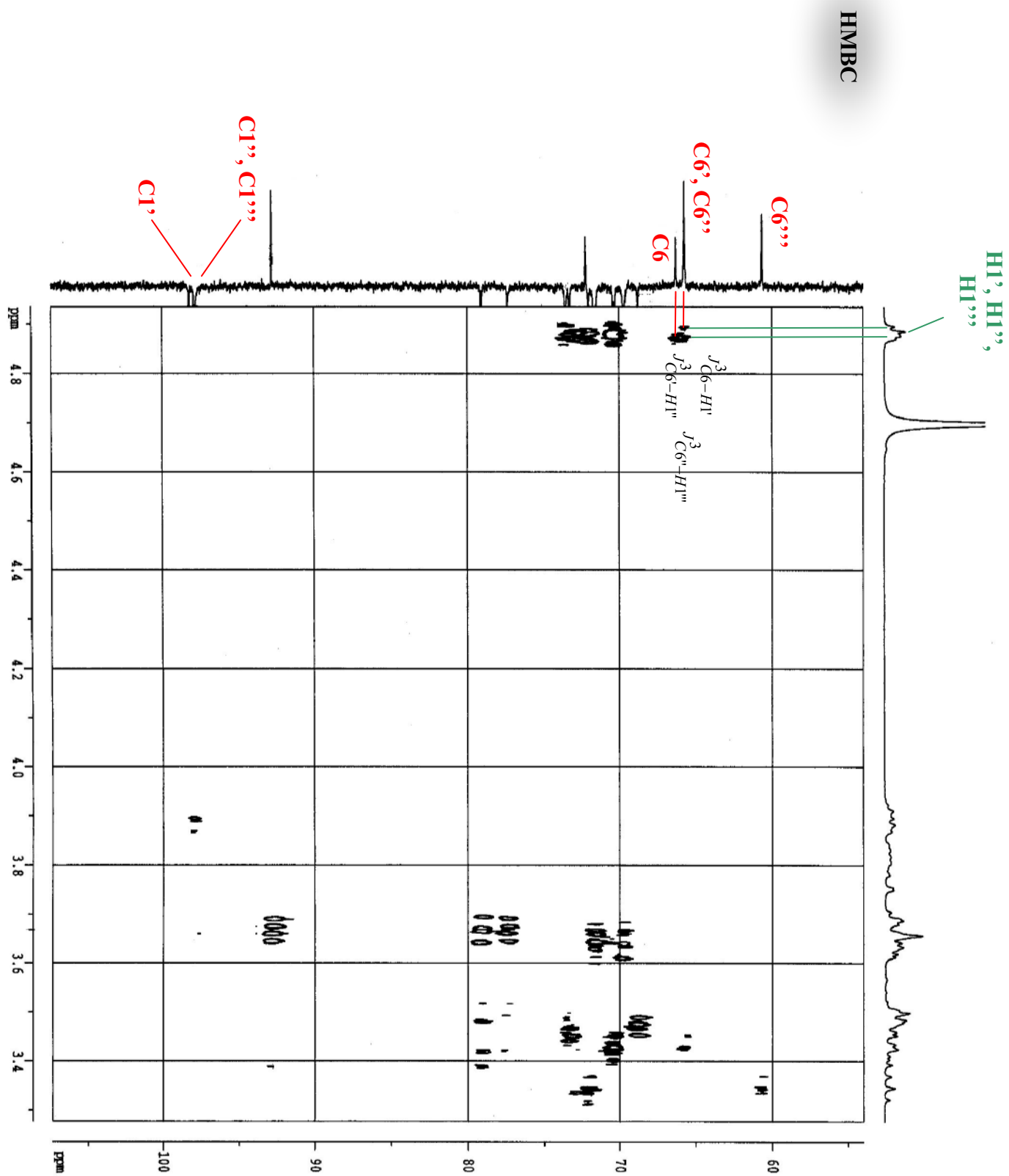


H₁



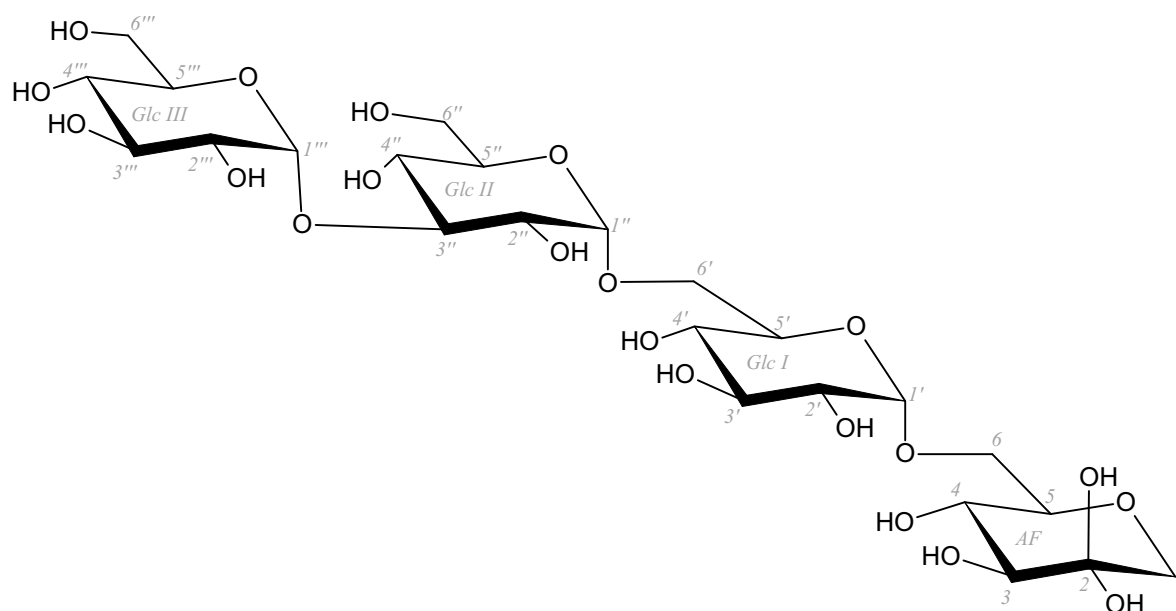
HSQC



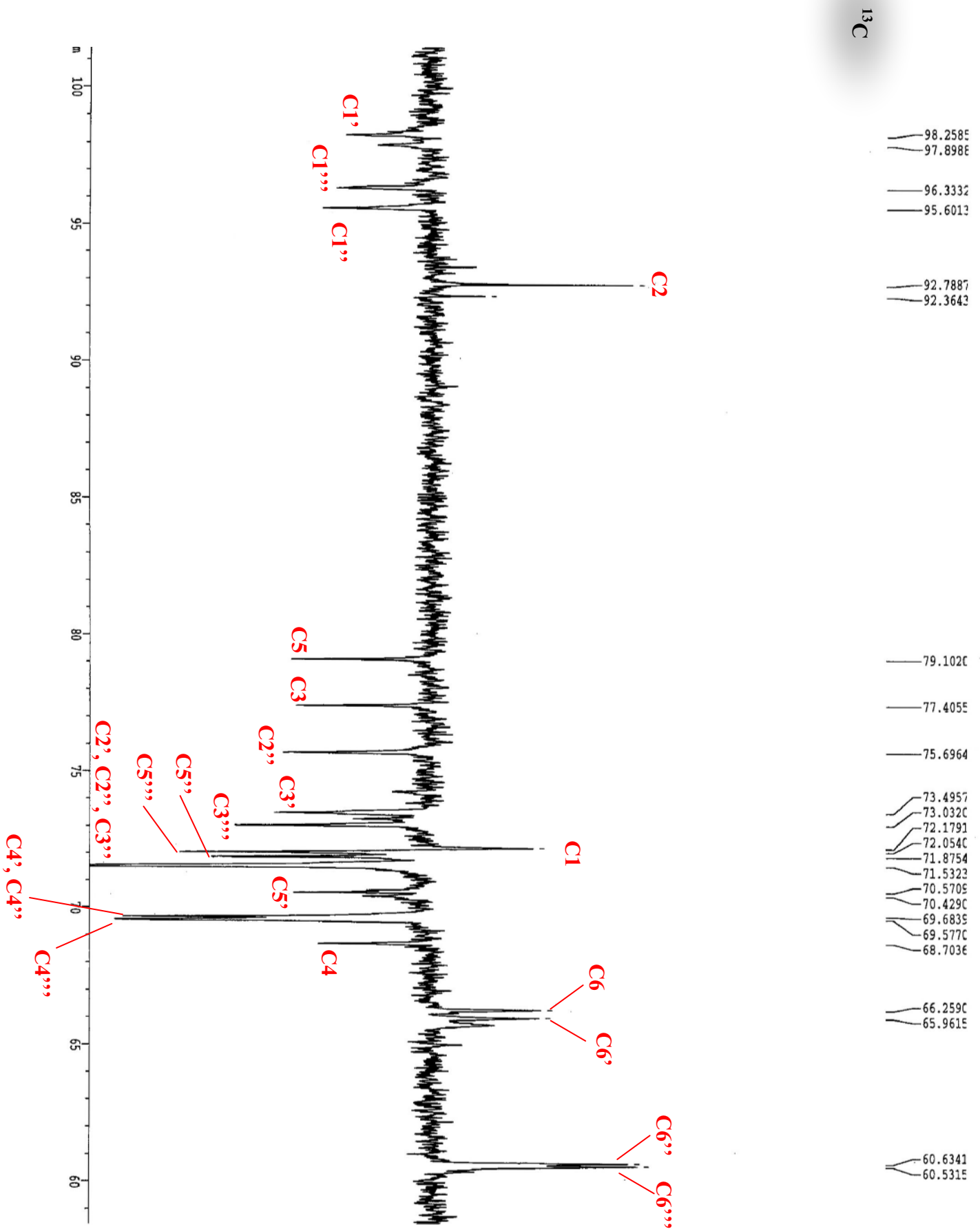


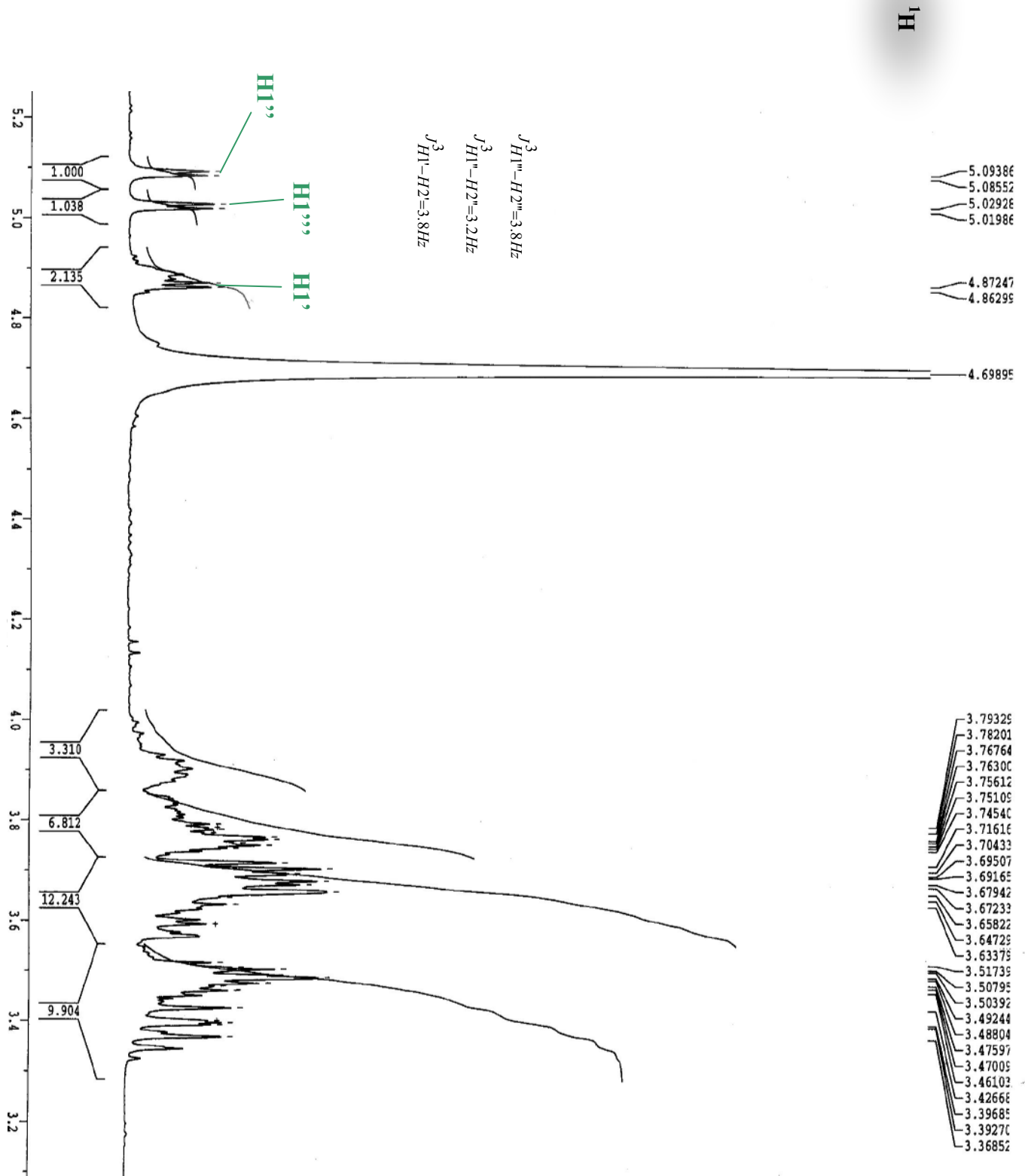
α -(1,2) ANHYDRO-D-FRUCTO-GLUCOPYRANOSE DP 4

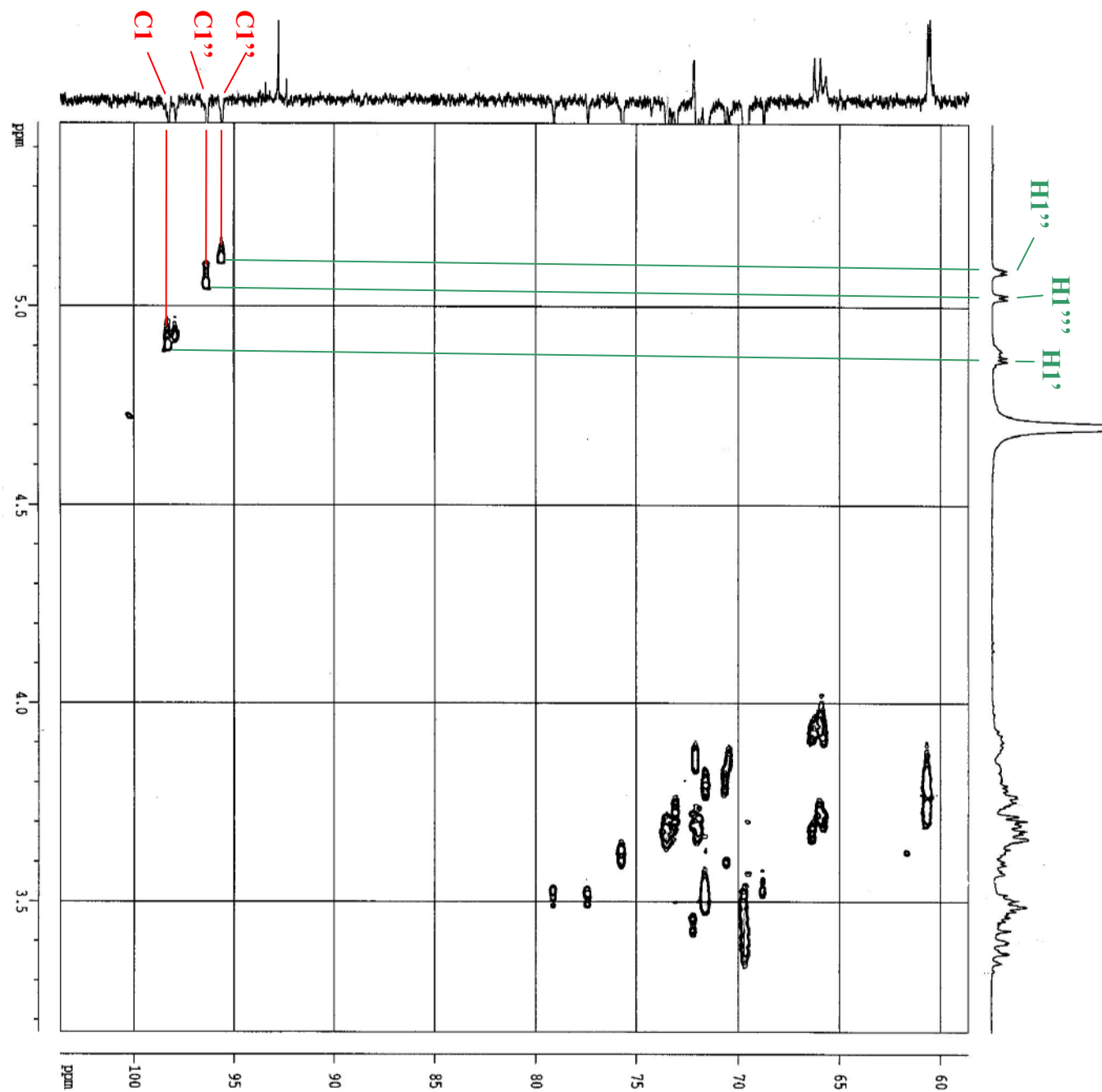
α -(1,2) AFGOS DP 4



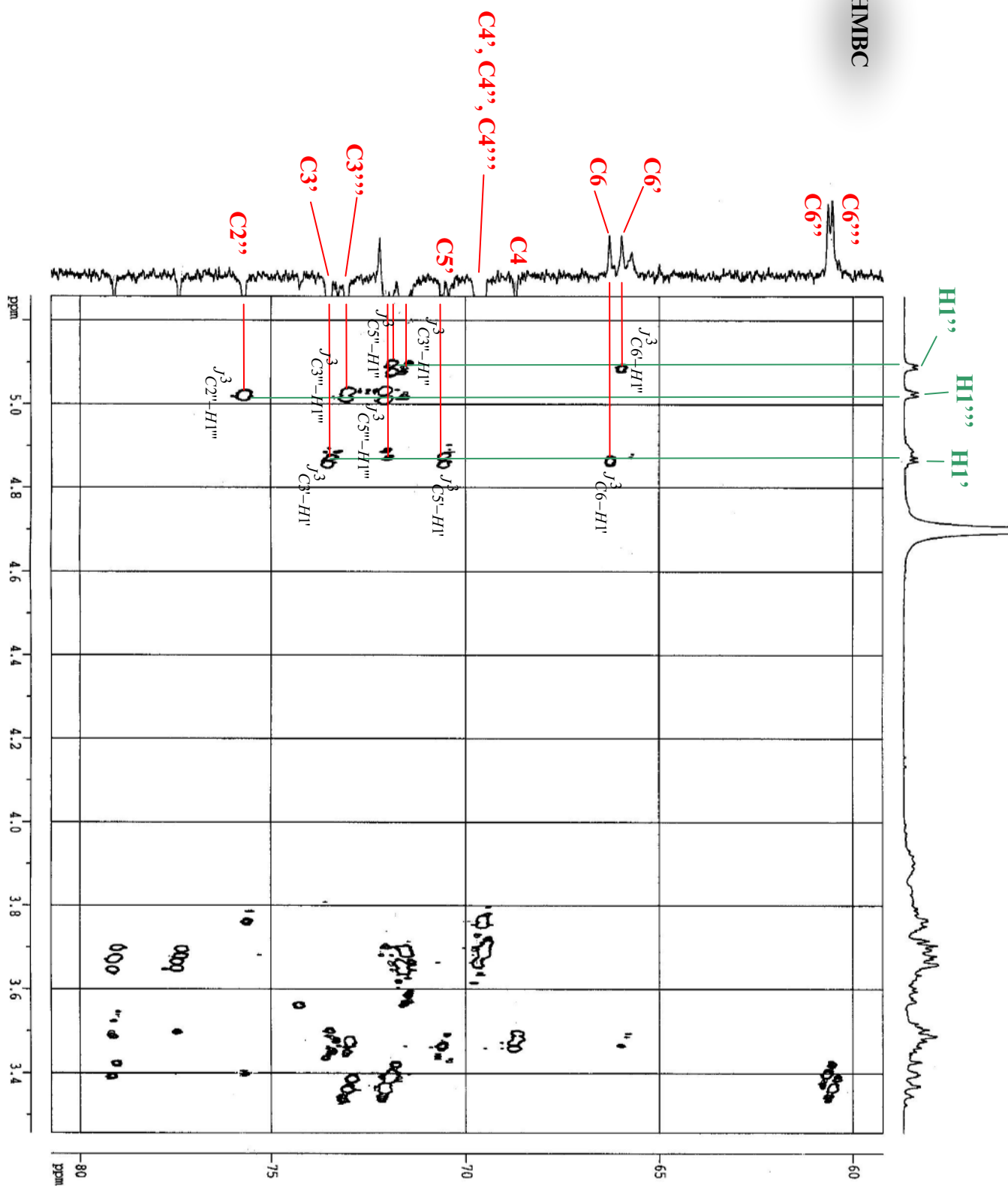
Résidu ^a		Déplacement chimique (δ , ppm)							
		1		2	3	4	5	6	
		1a	1b					6a	6b
AF	¹ H	3,68	3,40	-	7,10	3,02	3,03	3,65	3,89
	¹³ C	72,2		92,8	77,4	68,7	79,1	66,3	
Glc I	¹ H	4,87	$J_{1,2}=3,8$ Hz	3,49	3,65	3,39	3,79	3,67	3,90
	¹³ C	98,2		71,5	73,5	69,7	70,6	66,0	
Glc II	¹ H	5,09	$J_{1,2}=3,3$ Hz	3,60	3,77	3,39	3,66	3,71	3,77
	¹³ C	95,6		75,7	71,5	69,7	71,9	60,6	
Glc III	¹ H	5,03	$J_{1,2}=3,8$ Hz	3,46	3,69	3,36	3,83	3,71	3,77
	¹³ C	96,3		71,5	73,0	69,6	72,0	60,5	





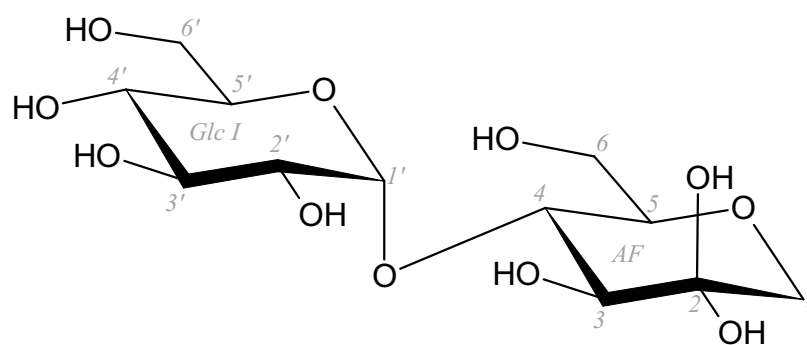


HMBC



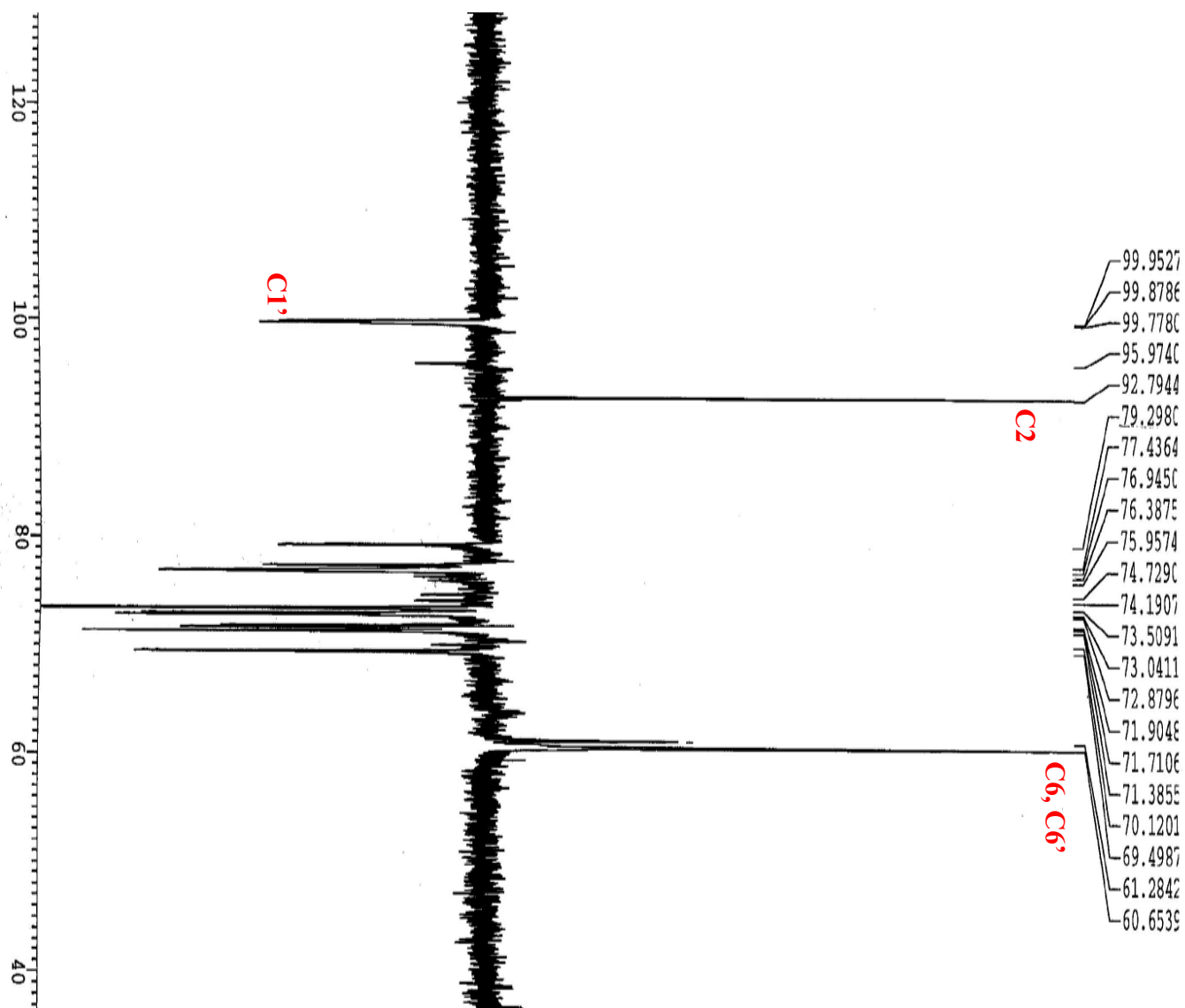
α -(1,4) ANHYDRO-D-FRUCTO-GLUCOPYRANOSE DP 2

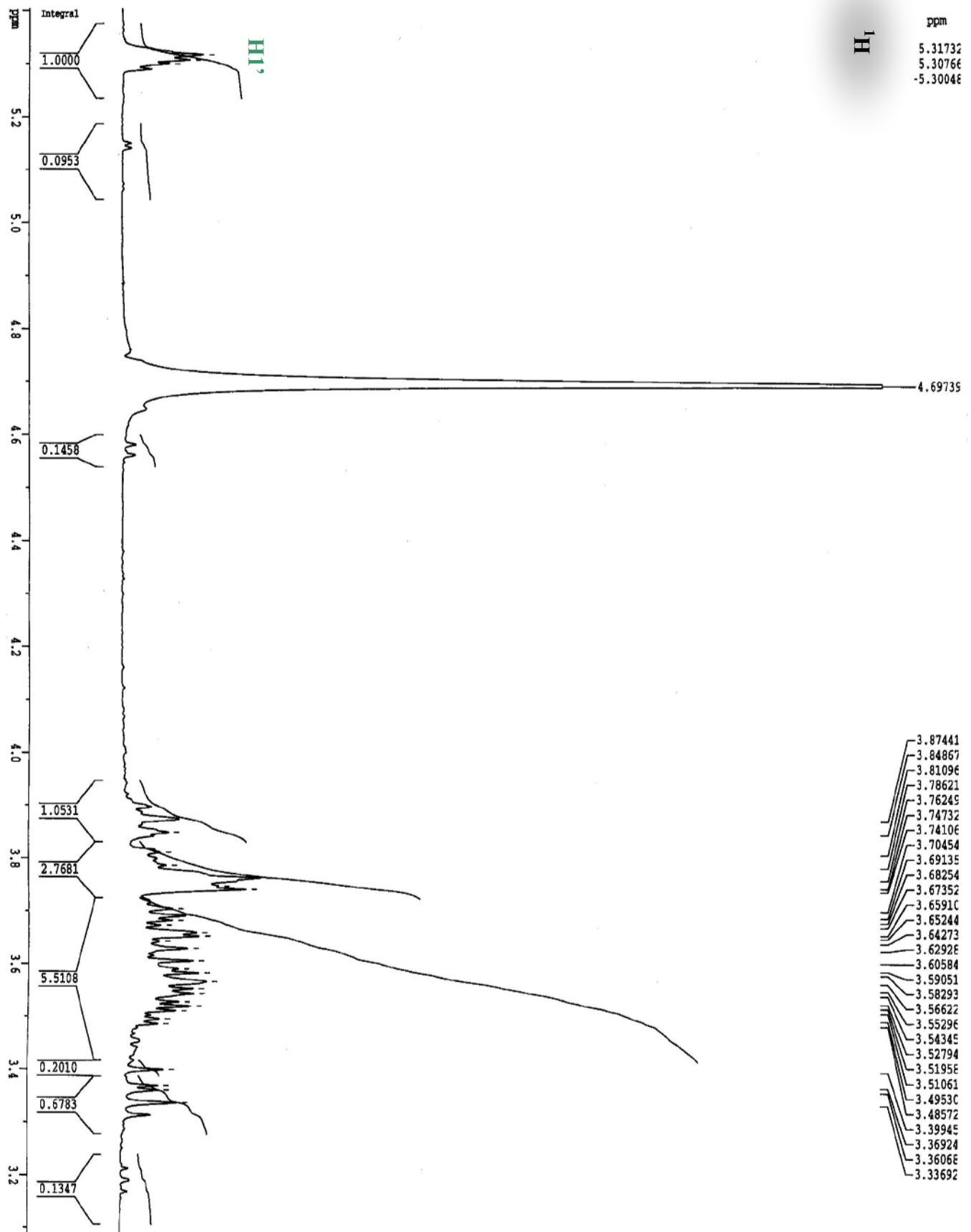
α -(1,4) AFGOS DP 2

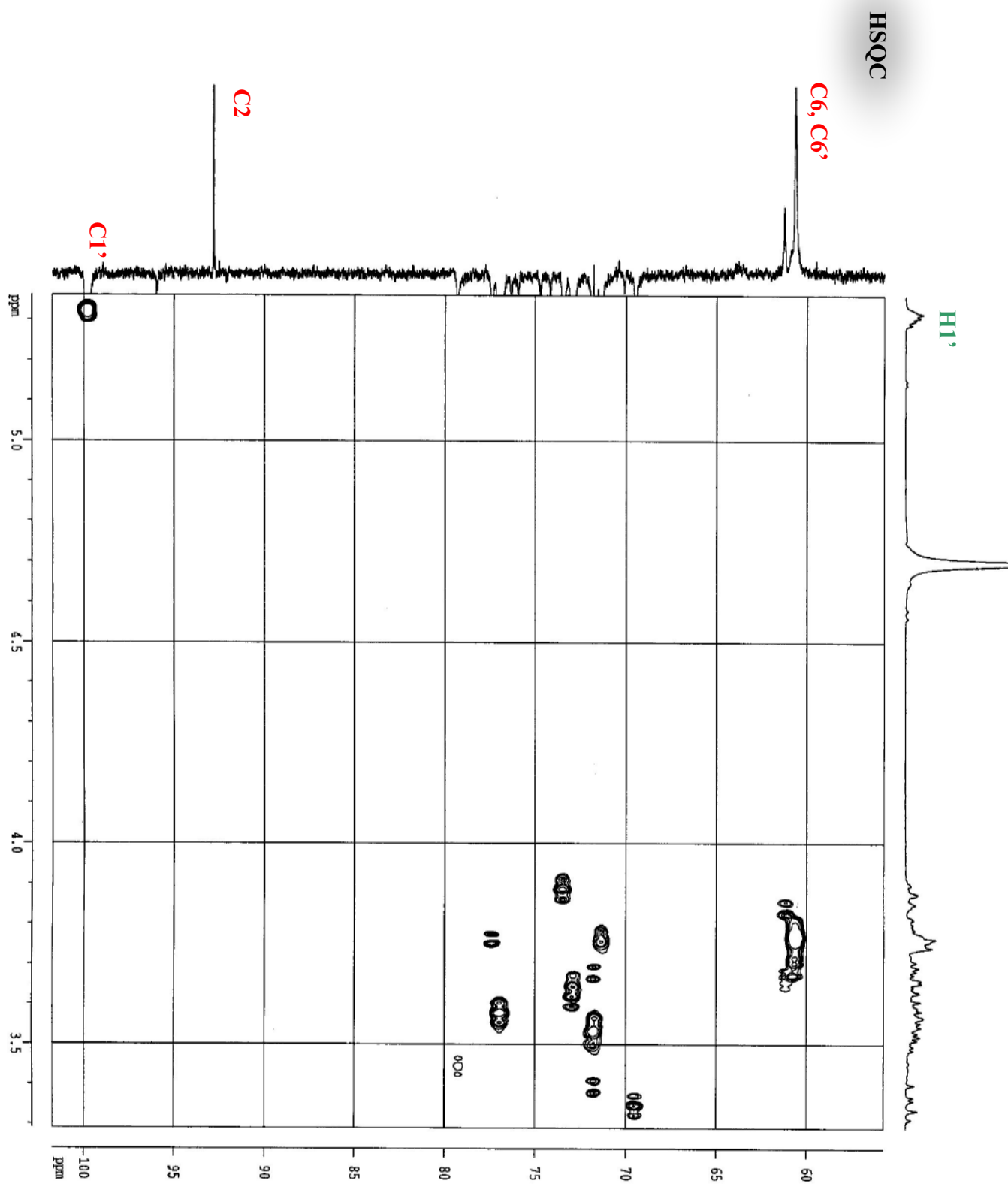


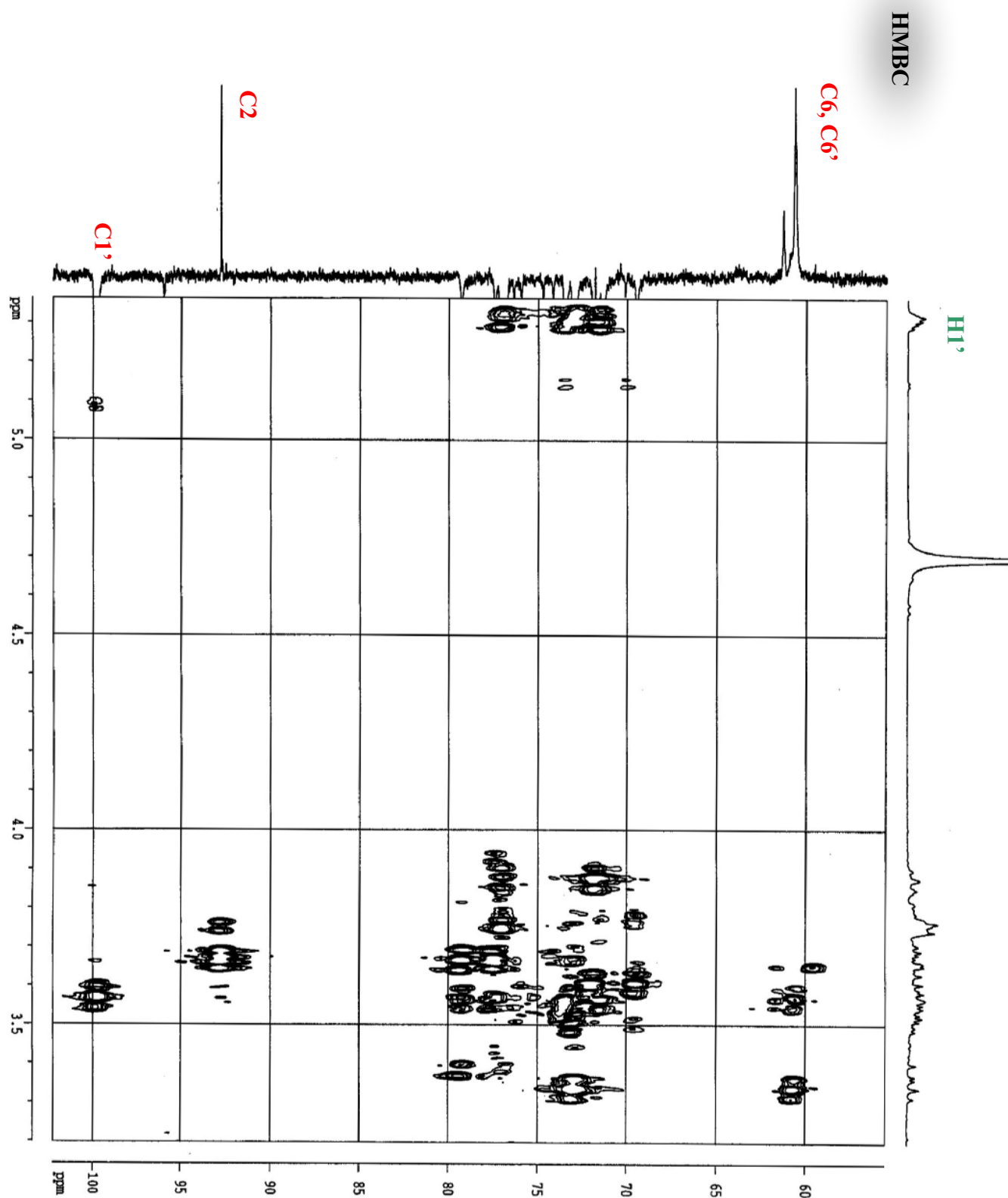
Tous les déplacements chimiques n'ont pas été attribués à l' α -(1,4) AFGOS de DP 2. Cependant, la présence d'une liaison α -(1,4) est confirmée, ainsi que la présence d'une unité AF à l'extrémité réductrice.

Rq : le pic correspondant
au C1 est absent du
spectre car « compensé »
par un pic négatif.









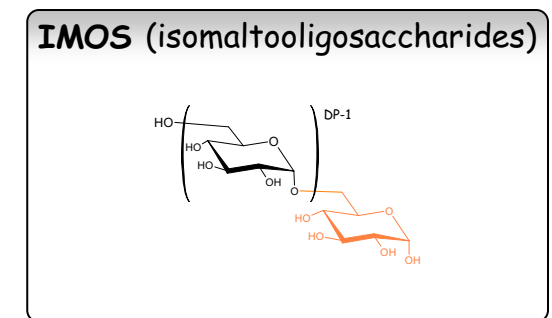
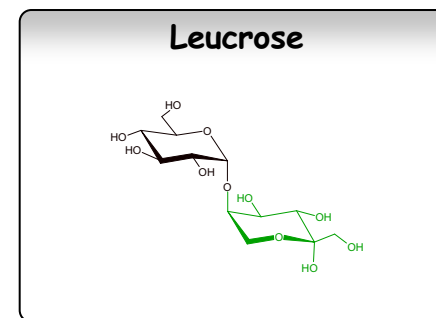
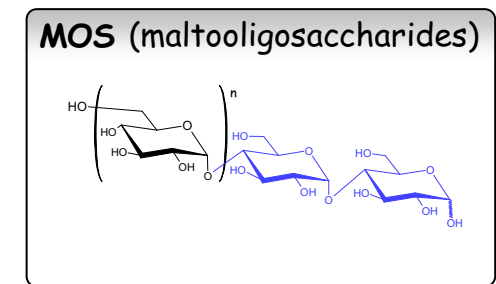
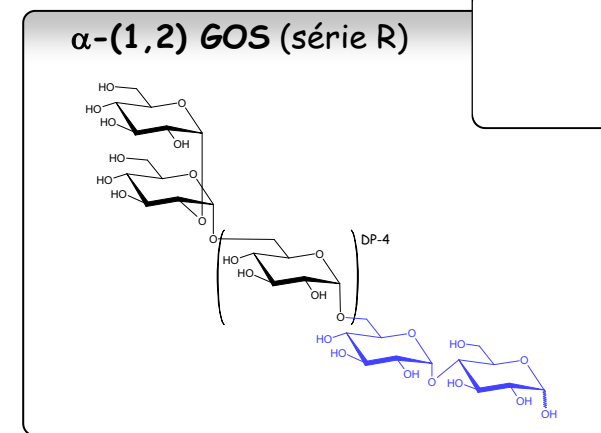
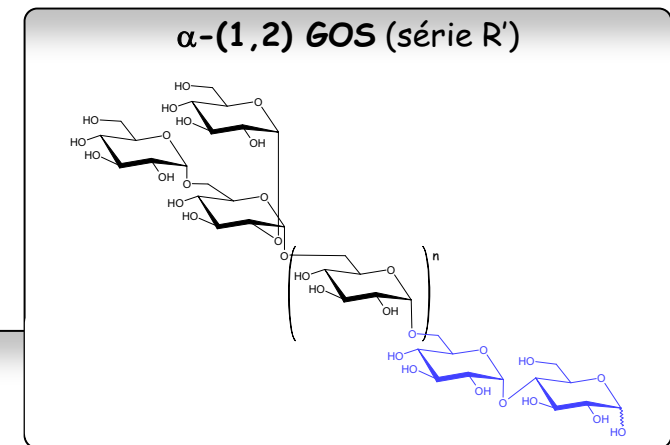
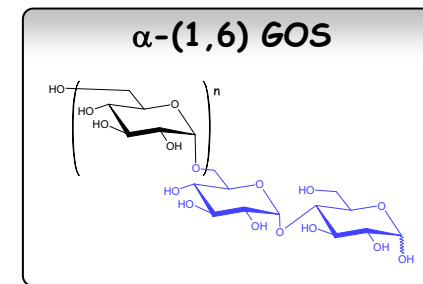
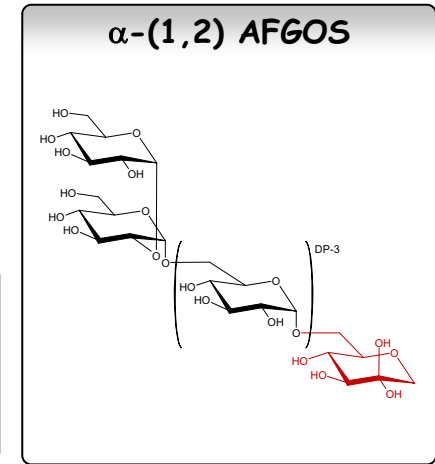
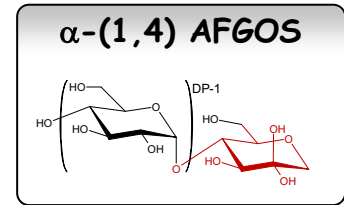
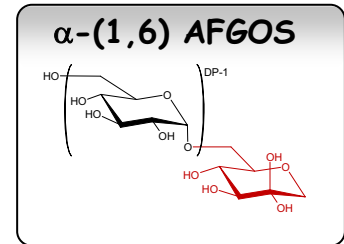
Accepteurs

1,5-anhydro-D-fructose

maltose

glucose

fructose



Structure des sucres

Volet rabattable