

THESE*présentée devant***L'INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE TOULOUSE***en vue de l'obtention du***DOCTORAT**Spécialité : **Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bio ingénieries**Filière : **Microbiologie et Biocatalyse industrielle***par***SORO Yadé René**

Docteur troisième cycle

**Purification et caractérisation de l'alpha-glucosidase du
suc digestif de *Archachatina ventricosa* (Achatinidae) ;
Application à la synthèse de polyglucosylfructosides**

Soutenue à Toulouse le 16 novembre 2007 devant la commission d'examen

<u>Alain MARTY</u>	Professeur, INSA de Toulouse
Marianne GRABER	Maître de Conférences HDR, Université de la Rochelle
Claude RABILLER	Professeur, Université de Nantes
Didier COMBES	Professeur, INSA de Toulouse
René-Marc WILLEMOT	Professeur, INSA de Toulouse
Koré Jacques DIOPOH	Professeur, Université de Cocody, Abidjan (RCI)

Cette thèse a été préparée au Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés de l'INSA de Toulouse (UMR CNRS 5504, UMR INRA 792) et au Laboratoire de Biotechnologies, UFR Biosciences, Université de Cocody (Abidjan, Côte d'Ivoire) dans le cadre de l'Ecole Doctorale SEVAB.

NOM : SORO**Prénoms** : Yadé René**Titre** : Purification et caractérisation de l'alpha-glucosidase du suc digestif de *Archachatina ventricosa* (Achatinidae) ; Application à la synthèse de polyglucosylfructosides, 183 pages**Spécialité** : Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bio ingénieries**Filière** : Microbiologie et Biocatalyse industrielle**Année** : 2007**Lieu** : INSA de Toulouse**N° d'ordre** : 890**RESUME** :

Les enzymes actives sur le saccharose ont depuis longtemps suscité un intérêt pour leur utilisation potentielle dans l'hydrolyse du saccharose ou la production de dérivés du saccharose à plus forte valeur ajoutée. Dans ce contexte, cette thèse avait pour objectifs de purifier à homogénéité et caractériser l'enzyme responsable de l'activité invertasique du suc digestif de l'escargot *Archachatina ventricosa* ainsi que la détermination d'une application potentielle de cette enzyme.

Les techniques classiques de purification par chromatographie liquide sur différents gels n'ont pas permis de purifier l'enzyme. Nous avons donc eu recours à une combinaison entre une chromatographie d'échange d'ions et l'électrophorèse préparative en gel de polyacrylamide avec la détection spécifique de l'activité enzymatique *in situ* dans le gel de polyacrylamide par l'hydrolyse d'un substrat chromogène. L'enzyme isolée est une glycoprotéine homodimérique dont l'activité hydrolasique indique qu'il s'agit d'une α -glucosidase.

La cinétique de l'hydrolyse du saccharose par l'enzyme purifiée est caractéristique d'une réaction de transglycosylation ou d'une inhibition par excès de substrat. L'analyse des produits de l'hydrolyse du saccharose indique la synthèse d'oligosaccharides par le transfert de résidus glucosyles. Ces oligosaccharides sont constitués de maltooligosaccharides de tailles variables liés au glucosyle du saccharose par une liaison osidique $\alpha(1\rightarrow4)$ (les polyglucosylfructosides de DP3 à DP8) et de disaccharides (maltose, isomaltose, nigerose) en quantité moindre. L'identification des produits a permis de proposer un schéma réactionnel pour leur synthèse à partir du saccharose.

MOTS CLES :

α -glucosidase, purification, caractérisation, transglucosylation, saccharose, polyglucosylfructosides, spectrométrie RMN, escargot, *Archachatina ventricosa*.

JURY : Alain MARTY,

Marianne GRABER,

Claude RABILLER,

Didier COMBES,

René-Marc WILLEMOT,

Koré Jacques DIOPOH,

Professeur, INSA Toulouse

Maître de Conférences HDR, Université de la Rochelle

Professeur, Université de Nantes

Professeur, INSA Toulouse

Professeur, INSA Toulouse

Professeur, Université de Cocody, Abidjan (RCI)

Soutenue le 16 novembre 2007

Cette thèse a été préparée au Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés de l'INSA de Toulouse (UMR CNRS 5504, UMR INRA 792) et au Laboratoire de Biotechnologies, UFR Biosciences, Université de Cocody (Abidjan, Côte d'Ivoire) dans le cadre de l'Ecole Doctorale SEVAB.

PUBLICATION

Soro Y R, Diopoh J K, Willemot R-M, Combes D. (2007). Enzymatic synthesis of polyglucosylfructosides from sucrose alone by a novel α -glucosidase isolated from the digestive juice of *Archachatina ventricosa* (Achatinidae). *Enzyme and Microbial Technology*. **42**: 44-51.

A

Feu SORO Pébaniniana Benoît,

SORO Tieholo,

SORO Natogoma née YEO, Roland, Serge, Victoire, Ange-Michel, Marie-Christelle ...

« *Quelque soit la longueur du serpent, il a toujours une tête !* » (Proverbe Ivoirien). *La voilà donc dans mon cas, cette ... tête (la thèse) soutenue après de longues années d'épreuves et de joies partagées avec une équipe, des amis, une famille.*

Je voudrais exprimer ma gratitude à René-Marc et Diomandé qui m'ont donné la chance de faire cette thèse et qui m'honorent de leur amitié.

J'exprime ma reconnaissance à Didier qui a spontanément accepté de m'encadrer à la suite de René-Marc. Sa disponibilité malgré ses nombreuses responsabilités, son humilité et ses conseils m'ont édifié.

Je remercie mon père spirituel Diopoh pour sa confiance constante, sa disponibilité et ses conseils.

A Pierre qui m'a accepté dans son équipe puis avec son épouse m'ont honoré en m'adoptant comme un fils, je renouvelle mes remerciements et les assure de mon filial attachement.

Merci à Magali pour sa chaleur humaine, sa disponibilité, ses conseils et sa rigueur au travail.

Je remercie Alain d'avoir accepté de présider mon jury de thèse, de m'avoir ouvert les portes de sa maison, ainsi que pour l'amitié dont il m'honore et je lui exprime toute ma reconnaissance.

J'ai été sensible à l'honneur que m'ont fait M. Claude RABILLER et Mme Marianne GRABER, en acceptant d'être les rapporteurs de ma thèse. Je les remercie pour leurs pertinentes critiques.

J'ai apprécié l'accueil, le soutien, l'amitié et/ou l'aide multiformes de chacun de vous. Je voudrais ici exprimer ma gratitude à tous et à toutes. A défaut de pouvoir adresser un mot à chacun, je remercie ...

- à l'INSA de Toulouse :

Nick, Claude, Mike, (les) David, Sandrine, Gabry, Sandra, Isabelle, Jean-Christophe, Philippe, Pierre (Peco), Laurence, Hélène, Nathalie, Gaëtan, Emeline, Claire, (les) Sophie, Elise, Stéphane, Florence, Miguel, Youri, (les) Etienne, Marine, Vincent, Yoann, Régis, Matthieu, Clément, Reinaldo, Romain, François, Kaïs et Faten, Nelly, Lena ...

- les parents, amis et connaissances en France :

Daouda et Esther, Moussa, Lucien (Tiani), Fabrice (Brico) et Flora, Suzanne, Jacqueline et Gérard, Louise et Guy, Mélanie, Doba et Fatou, Père Desiré, Ségui et Mme, Sylvie, Nguyen, Diallo, Bamba, Martine, Bernadette, Laurence (Lolo), Annick, Destinée, Koré, Toussaint et Mme, Jean-Guy et Mme, Rodolphe, Sylvain, Louise-Marie, Ballo, Germaine, Sarah, Hubert, Parfait, François, Rachelle ...

- à l'Université de Cocody, Abidjan :

Yeboua, Adom, Karou et Mme, Séa et Mme, Niamké, Mme Yévi, Saké, Kra, Prof Guédé-Guina et son équipe, Prof AGBO et son équipe, Tano, Kati-Koulibaly, Koua et Mme, Irène, Djaman et Mme, Coulibaly et Bamba, N'doumé, Mme Batcho, Rosemondé, Laeticia, Kalambri, Agré ...

- les parents, amis et connaissances en Côte d'Ivoire :

Mémé Nindè, Tonton Issa et Mme, Tantie Sali, Tantie Tchawa, Mary-Desiré, Angéline, Denise, Honoré, Jacques, Maïmouna, Tenin, Assétou et son époux, Mr et Mme Nabané, Mr et Mme Beugré, Mr et Mme Coulibaly, Souleymane, Bakary et Mme, Yanou et Mariam, Nahouo (NAC) et Mme, Kounontoho et Mme, Jérémie et Mme, Soungalo et Mme, Valy, Nawa, Ousmane, Blandine, Brahim et Minata ...

- le Gouvernement Français et l'Agence Universitaire de la Francophonie (AUF)

- tous ceux et toutes celles qui de près ou de loin ont contribué à l'aboutissement de cette thèse.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	16
I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	22
PARTIE A : LES ENZYMES ACTIVES SUR LES GLUCIDES	25
1. Les glycosides hydrolases (GH)	26
2. Les glycosynthases	27
3. Les glycosyltransferases (GT).....	28
4. Les carbohydrates estérases	31
5. Les polysaccharides lyases (4.2.2.-)	31
6. Les modules de liaison aux glucides	31
PARTIE B : LES ENZYMES ACTIVES SUR LE SACCHAROSE	33
I. LE SACCHAROSE	33
II. LES ENZYMES SPECIFIQUES DU TRANSFERT DU GLUCOSE.....	34
1. Les principales réactions catalysées	34
2. Les enzymes des familles 13 et 70 des GH	35
2.1. Les α -glucosidases (EC 3.2.1.20)	35
2.2. Les glucanesaccharases (GS).....	38
2.2.1. Présentation des enzymes	38
2.2.1.1. Les amylosaccharases (AS) (EC 2.4.1.)	39
2.2.1.2. Les dextrane-saccharases (EC 2.4.1.5).....	39
2.2.1.3. Les mutane-saccharases (EC 2.4.1.5).....	40
2.2.1.4. Les alternane-saccharases (EC 2.4.1.140)	40
2.2.2. La structure des GS	40
2.3. Les sucrose-phosphorylases (EC 2.4.1.7)	42
3. Les sucrases-isomaltases (EC 3.2.1.48)/(3.2.1.10)	43
3.1. La description des enzymes	43
3.2. La structure des sucrases-isomaltases	44
III. LES ENZYMES SPECIFIQUES DU TRANSFERT DU FRUCTOSE	45
1. Les principales réactions catalysées	45
2. Les enzymes de la famille 32 des GH	46
2.1. La structure des enzymes	46
2.2. La présentation des enzymes	47
2.1.1. Les invertases (EC 3.2.1.26).....	47
2.1.2. Les exo-inulases (EC. 3.2.1.80).....	48
2.1.3. Les saccharose : saccharose-1- fructosyltransférases (EC 3.2.1.99)	48
3. Enzymes de la famille 68 des GH	48
3.1. La structure des enzymes	48
3.2. La description des enzymes	49
3.1.1. Les β -D- fructofuranosidases (EC 3.2.1.26)	49
3.1.2. Les levanesucrases (EC 2.4.1.10).....	49
3.1.3. Les inulinesucrases (EC 2.4.1.9).....	49
OBJECTIFS DE LA THESE	50

II. MATERIELS ET METHODES	52
1. La source enzymatique	53
2. Dosage de l'activité hydrolasique	54
2.1. <i>Dosage du glucose par le kit enzymatique BioMérieux</i>	54
2.2. <i>Dosage de l'activité pNPasique</i>	54
2.3. <i>Dosage des sucres réducteurs au DNS</i>	55
3. Le dosage des protéines	56
4. La purification de l'enzyme	56
4.1. Les chromatographies	56
4.1.1. <i>L'équipement</i>	56
4.1.2. <i>Colonne de Q Sepharose</i>	56
4.1.3. <i>Colonne de Concanavalline-A-Sepharose 4B</i>	57
4.1.4. <i>Colonne Hi-Trap FF (5ml)</i>	57
4.1.5. <i>Colonne Superose 12</i>	58
4.2. Electrophorèse préparative	58
4.2.1. <i>Préparation du gel et migration</i>	58
4.2.2. <i>Localisation de l'enzyme dans le gel de polyacrylamide</i>	59
4.2.3. <i>Extraction de l'enzyme</i>	59
5. L'ultrafiltration	60
6. L'électrophorèse analytique	60
6.1. <i>Préparation des gels et migration</i>	60
6.2. <i>Les colorations après l'électrophorèse</i>	61
6.2.1. <i>Les protéines</i>	61
6.2.2. <i>L'activité enzymatique</i>	61
7. Poids moléculaire en gel filtration	62
8. La teneur en sucres neutres	62
9. La détermination de la séquence N-terminale	63
9.1. <i>Le transfert de l'enzyme (western-blot)</i>	63
9.2. <i>La coloration et le séchage</i>	64
10. Activité hydrolasique et stabilité en fonction du pH	64
11. Activité hydrolasique et stabilité en fonction de la température	64
12. Action des effecteurs	65
12.1 <i>Influence des ions sur l'activité hydrolasique</i>	65
12.2. <i>Influence de l'EDTA, du Tris et du SDS sur l'activité hydrolasique</i>	65
13. Spécificité de l'activité hydrolasique	66
14. Activité hydrolasique en fonction de la concentration en substrat	66
15. Paramètres cinétiques (Km, Vm et Ks)	67
16. Inhibition par les produits de la réaction	67
17. L'activité de transglucosylation	68
17.1. <i>Influence du pH sur l'activité transférasique</i>	68
17.2. <i>Influence de la concentration en substrat sur l'activité transférasique</i>	68
17.3. <i>Cinétique de la réaction de transglucosylation</i>	68
17.4. <i>Synthèse des oligosaccharides à partir du saccharose</i>	69
18. Analyse des produits de la transglucosylation	69
18.1. <i>Analyses qualitatives par HPLC</i>	69
18.2. <i>Identification des produits</i>	70
18.3. <i>La purification des oligosaccharides</i>	71
18.4. <i>Concentration et lyophilisation des oligosaccharides</i>	71
18.5. <i>Les analyses structurales des oligosaccharides</i>	71
18.5.1. <i>L'hydrolyse enzymatique</i>	72

18.5.2. La spectrométrie de Masse (MS).....	72
18.5.3. La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).....	72
III. RESULTATS ET DISCUSSIONS	74
PARTIE A : PURIFICATION ET PROPRIETES PHYSICO CHIMIQUES DE L'ENZYME.....	75
I : LA PURIFICATION.....	75
1. Les chromatographies	75
2. L'électrophorèse préparative	78
2.1. Migration	78
2.2. Coloration de l'activité	78
2.3. Extraction de l'enzyme	80
II. LES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES ET MOLECULAIRES	82
1. Détermination de la masse moléculaire	82
1.1. Par gel filtration.....	82
1.2. Par électrophorèse	83
2. La séquence N-terminale	84
3. Le dosage des sucres neutres	84
4. Activité hydrolasique et stabilité en fonction du pH	84
5. Activité invertasique et stabilité en fonction de la température.....	86
6. Action de quelques effecteurs sur l'enzyme purifiée.....	88
6.1. Influence des cations	88
6.2. Influence de l'EDTA, du SDS et du Tris	89
7. Spécificité de substrat.....	90
8. Activité invertasique en fonction de la concentration en substrat	91
9. Paramètres cinétiques	93
10. Test de l'hypothèse d'inhibition par excès de substrat	94
11. Inhibition de l'enzyme par les produits de la réaction.....	96
12. Activité transférasique en fonction de la concentration en substrat	98
DISCUSSION.....	101
PARTIE B : LA REACTION DE TRANSGLUCOSYLATION	109
1. Influence du pH sur l'activité transférasique	109
2. Activité transférasique en fonction de la concentration en substrat	109
3. Cinétique de la réaction de transglucosylation	111
4. Analyse des produits de synthèse par chromatographie.....	113
5. Caractérisation des oligosaccharides	115
5.1. Purification des oligosaccharides	115
5.2. Hydrolyse enzymatique par une invertase	116
5.3. Détermination de la masse moléculaire en spectrométrie de masse (MS) ..	117
5.4. Détermination de la structure des oligosaccharides en RMN	118
5.4.1. Le composé DP3	119
5.4.1.1. Le spectre du carbone (¹³ C RMN 1D).....	119
5.4.1.2. Le spectre du proton (¹ H)	122
5.4.1.3. Le spectre HSQC RMN 2D.....	123
5.4.1.4. Le spectre HMBC RMN 2D.....	125
5.4.2. Le composé DP 4.....	127
5.4.2.1. Les spectres de RMN monodimensionnelle (¹ H et ¹³ C).....	127
5.4.2.2. Les spectres de RMN bidimensionnelle (HSQC et HMBC).....	130

5.4.3. <i>Les autres produits de la réaction de transglucosylation</i>	133
5.4.3.1. Le test de corrélation	133
5.4.3.2. Les structures des composés inconnus	134
DISCUSSION	136
IV. CONCLUSION	143
V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	146
VI. ANNEXES	162

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Mécanisme d'action des GH à rétention de configuration.....	26
Figure 2: Mécanisme d'action des GH à inversion de configuration.....	27
Figure 3: Mécanisme d'action des glycosynthases (mutant nucléophile).....	28
Figure 4: Modes de repliement des structures tridimensionnelles des GT.....	29
Figure 5: Exemples de structures modulaires des GT.....	30
Figure 6: Structures tridimensionnelles de quelques CBM (A) et d'une xylanase modulaire de <i>S. olivaceoviridis</i> (B).....	32
Figure 7: Structure du saccharose.....	33
Figure 8: Les différentes destinations possibles du résidu glucosyle.....	35
Figure 9: Structure résolue de l'oligo-1,6 glucosidase de <i>Bacillus cereus</i>	37
Figure 10 : Schéma de la structure primaire générale des glucane-saccharases.....	38
Figure 11 : Structure tridimensionnelles de l'amylosaccharase de <i>N. polysaccharea</i>	41
Figure 12: Régions conservées de la séquence de l'amylosaccharase de <i>N. polysaccharea</i> et de quelques enzymes des familles 13 et 70 des glycoside-hydrolases.....	42
Figure 13 : Structure de l' α -glucosidase de <i>Sulfolobus sulfataricus</i> (Mal A).....	44
Figure 14 : Schéma des réactions catalysées par la levanesaccharase de <i>L. sanfranciscensis</i> TMW1.392 à partir du saccharose.....	46
Figure 15: Structure de l'exo-inulase de <i>Aspergillus awamori</i>	47
Figure 16: Structure de la levanesucrase de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	49
Figure 17 : Photo de l'escargot <i>Archachatina ventricosa</i>	53
Figure 18: Chromatographie d'échange d'ions sur gel Q Sepharose (Pharmacia).....	76
Figure 19: Schéma de la combinaison des gels de chromatographie.....	77
Figure 20: PAGE des extraits chromatographiques et coloration de l'activité invertasique au TTC.....	78
Figure 21 : Coloration au TTC (a : avant coloration; b : après coloration).....	79
Figure 22: Coloration de l'activité enzymatique dans le gel par les deux méthodes.....	80
Figure 23: Extraction et broyage de la bande de gel colorée par la libération du pNP.....	80
Figure 24 : Electrophorèse analytique de l'enzyme.....	81
Figure 25: Détermination du poids moléculaire de l'enzyme native.....	82
Figure 26: Détermination du poids moléculaire par SDS-PAGE.....	83
Figure 27: Activité et stabilité de l'activité invertasique en fonction du pH.....	85
Figure 28 : Activité hydrolasique en fonction de la température.....	86
Figure 29: Stabilité thermique de l'enzyme à 30°C, 35°C, 45°C.....	87
Figure 30 : Détermination de l'énergie d'activation pour l'hydrolyse du saccharose.....	88
Figure 31: Influences de l'EDTA, du SDS et du Tris sur l'activité hydrolasique.....	90
Figure 32: Activité hydrolasique en fonction de la concentration en substrat.....	92
Figure 33: Activité hydrolasique en fonction de la concentration en saccharose.....	93
Figure 34: Détermination des paramètres cinétiques de l' α -glucosidase.....	94
Figure 35: Détermination graphique de K_s	95
Figure 36: Comparaison des vitesses observées et calculées en fonction de la concentration du saccharose (M).....	96
Figure 37: Effet du glucose sur l'hydrolyse du pNP α -D-glucopyranoside.....	97
Figure 38: Effet du fructose sur l'hydrolyse du saccharose.....	98
Figure 39: Analyse des milieux réactionnels en fonction du temps sur colonne K^+	99
Figure 40: Analyse du milieu réactionnel à 1 M en sucrose sur colonne C_{18}	100
Figure 41: Influence du pH sur la réaction de transglucosylation.....	110
Figure 42: Influence de la concentration en saccharose sur la transglucosylation.....	111

Figure 43: Analyse des milieux réactionnels en fonction du temps sur la colonne Potassium.....	112
Figure 44: Cinétique de la synthèse des oligosaccharides.....	113
Figure 45: Analyse du milieu de synthèse sur colonne C ₁₈	114
Figure 46: Analyse du milieu de synthèse sur colonne CarboPac 100 par HPAEC-PAD.....	115
Figure 47: Hydrolyse des oligosaccharides DP 3 et DP 4 par l'invertase de levure	117
Figure 48 : Spectres de masse des composés DP3 et DP4 par LSI-MS	118
Figure 49: Spectres ¹³ C RMN 1D du saccharose et des composés DP3 et DP4.	121
Figure 50: Structure du maltotriosylfructoside.....	121
Figure 51: Spectre RMN ¹ H du saccharose et du G2F.....	123
Figure 52: Spectres HSQC montrant les couplages ¹ J _{C-H} du saccharose et du G2F	124
Figure 53: Agrandissement de la zone encadrée du spectre HSQC du G2F pour la mise en évidence des couplages ¹ J _{C-H}	125
Figure 54: Spectres HMBC montrant les couplages ³ J _{C-H} du saccharose et du G3F.....	126
Figure 55: Spectres ¹³ C RMN du saccharose et des composés DP3 et DP4	128
Figure 56: Structure du maltotriosylfructoside.....	129
Figure 57: Spectre RMN ¹ H à 400 MHz du saccharose et du G3F.....	130
Figure 58: Spectres HSQC montrant les couplages ¹ J _{C-H} du saccharose et du G3F.....	131
Figure 59: Spectres HMBC montrant les couplages ³ J _{C-H} du saccharose et du G3F.....	132
Figure 60: Courbe de corrélation entre les temps de rétention par HPAEC des PGF et les masses moléculaires.	134
Figure 61: Structure générale des polyglucosylfructosides (n=0 à 5)	135
Figure 62: Schéma des réactions catalysées par l'α-glucosidase purifiée	141
Figure 63 : Répartition géographique des trois principales espèces d' <i>Archachatina</i> en Afrique de l'Ouest.	163
Figure 64: Schéma d'extraction et de clarification des enzymes	165
Figure 65: Différentes étapes d'une chromatographie d'échange d'ions	171
Figure 66: Interactions hydrophobes entre les ligands et les fonctions de la matrice	172
Figure 67: Interaction de solutés avec un support typique de phase inverse.....	173
Figure 68: Différentes étapes de la chromatographie d'affinité	174
Figure 69: les étapes de la chromatographie en lit expansé	176
Figure 70: Schéma de passage de diverses molécules en gel filtration	178
Figure 71: La préparation et les trois phases de la purification.....	179

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Séquences consensus de la famille 13 des GH.....	37
Tableau 2: Séquences consensus des enzymes de la famille 31 des GH.....	44
Tableau 3: Composition du réactif de dosage au DNS.....	55
Tableau 4: Composition des gels et du tampon de migration	59
Tableau 5: Solutions de coloration et de décoloration des protéines	61
Tableau 6: Les substrats testés pour la spécificité d'hydrolyse de l'enzyme	66
Tableau 7 : Bilan de la purification	81
Tableau 8: Activité invertasique du saccharose en fonction des ions.	89
Tableau 9 : Etude de la spécificité de substrat	91
Tableau 10: Déplacements chimiques (^{13}C) des carbones du saccharose et du composé DP3.	119
Tableau 11: Déplacements chimiques (^{13}C) des carbones du saccharose et des oligosaccharides purifiés.	127
Tableau 12: Modes de cassage des cellules selon la source enzymatique.....	166
Tableau 13: Exemples de paramètres de filtration	167

ABBREVIATIONS

BSA	: albumine de sérum bovin
C	: carbone
°C	: degré Celsius
CGTase	: cyclodextrine Glucosyltransférase
Cm	: centimètre
δ	: déplacement chimique en ppm
DP	: degré de polymérisation
D ₂ O	: deutérium oxide
DNS	: acide 3,5 di-nitro salicylique
DSR	: dextransaccharase
EDTA	: éthylène diamine tetra acétate
F	: fructose
FPLC	: Fast protein liquid chromatography
G	: glucose
GH	: glucoside-hydrolase
GS	: glucanesaccharase
GT	: glucosyltransférase
H	: proton
HMBC	: Heteronuclear multiple bonds correlation
HPAEC	: High performance anion exchange chromatography
HPLC	: High performance liquid chromatography
HSQC	: Heteronuclear secondary quantum correlation
K	: température en Kelvin
kDa	: kilodalton
K _m	: constante de Michaelis
LSI-MS	: Liquid secondary ionization-mass spectrum
m/v	: rapport masse/volume
mg	: milligramme
Mhz	: megahertz
min	: minute
ml	: millilitre
M (mM)	: molaire (millimolaire)
μ l	: microlitre
μ m	: micromètre
MOS	: maltooligosaccharide
NaCl	: chlorure de sodium
NaOH	: hydroxyde de sodium
nm	: nanomètre
oNP	: ortho Nitrophenol
PAGE	: polyacrylamide gel electrophoresis
PGF	: polyglucosylfructosides

PM	: poids moléculaire
pNP	: para Nitrophenol
%	: pourcentage
ppm	: partie par million
RMN	: résonance magnétique nucléaire
RMN 1D	: RMN monodimensionnelle
RMN 2D	: RMN bidimensionnelle
S	: concentration en substrat
SDS	: Sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE	: Electrophorèse sur gel de polyacrylamide avec SDS
SM	: spectrométrie de masse
TSPd4	: acide tri-silyl-propionique tetradeutééré
TTC	; tri phenyl-tetrazolium chloride
UA	: unité arbitraire
UI	: unité internationale
UV	: Ultra-violet
v/v	: rapport volume à volume
V _m	: vitesse maximale

INTRODUCTION

Les enzymes sont les catalyseurs des réactions chimiques dans le monde vivant. Leurs propriétés catalytiques sont exploitées par l'homme depuis des siècles pour la panification, la production de fromage, de yaourt, de vin, de vinaigre etc. (Dordick, 1991). Contrairement aux applications de l'activité enzymatique, l'étude des enzymes est plus récente et aurait «officiellement commencée» en 1833 avec la mise en évidence d'une «diastase» de l'avoine capable de produire des composés sucrés à partir de l'amidon (Payen et Persoz, 1833). Pasteur (1857) attribua à des «ferments» c'est-à-dire des cellules vivantes, la capacité de transformation des sucres. Quelques années plus tard, Kuhne (1877) introduit le nom d'enzyme («dans la levure») pour désigner les principes actifs à l'origine de ces réactions.

Faute de connaître la nature des enzymes et leur mode d'action pendant près d'un siècle, l'enzymologie et plus particulièrement sa composante industrielle, restèrent empiriques. Cependant, ceci n'empêcha pas la mise au point de préparations enzymatiques aux utilisations diverses. Dans ce domaine, la première révolution intervint avec l'apparition des enzymes de fermentation. Takamine fut le premier, en 1894, avec l' α -amylase d'*Aspergillus oryzae* obtenue par une fermentation de type Koji, suivi en 1913 par Boidin et Effront qui mirent au point les conditions de production et d'utilisation de la première enzyme thermostable : l' α -amylase de *Bacillus subtilis* capable de liquéfier l'amidon à 87°C, c'est-à-dire au-dessus de sa température de gélatinisation ce qui fut à l'origine d'une révolution technologique. Enfin, c'est en 1897 que les premières purifications d'enzymes furent réalisées à partir de cellules de levures, mettant en évidence que ces catalyseurs sont capables de fonctionner seuls en dehors de la cellule (Sicard, 1997). Depuis lors, un grand nombre d'enzymes responsables de la synthèse, de la modification et de la dégradation des molécules organiques (glucides, lipides, protides...) ont été isolées et caractérisées de sources animales,

microbiennes et végétales. Elles ont trouvé de nombreuses applications dans les industries alimentaire, médicale, chimique et pharmaceutique. C'est ainsi que des enzymes comme les amylases, les carboxymethylcellulases, les lipases, les protéases etc. sont déjà largement utilisées dans l'industrie pour la fabrication d'aliments, de médicaments, de boissons de même que dans le textile, le traitement du cuir, des eaux usées etc. (Dordick, 1991).

A partir des années 60, la mise au point de techniques plus performantes de production des enzymes par fermentation, de mutagenèse dirigée et/ou de criblages sophistiqués a permis l'isolement de souches microbiennes productrices de nouvelles activités, entraînant un développement considérable de l'industrie des enzymes (Mehu, 1989 ; Soupe, 1997). La glycobiologie, domaine d'activité qui recouvre la production et la transformation de glucides divers a bénéficié de ces progrès successifs. Ainsi, la valorisation de l'amidon, du saccharose et du lactose pour ne citer que les principaux glucides utilisés, a connu un développement important. Ce mouvement s'est encore amplifié durant ces dernières années, grâce à la mise en œuvre de programmes de recherches aux Etats-Unis, au Japon et en Europe en sorte qu'au delà des traditionnelles réactions d'hydrolyse, il est maintenant possible d'effectuer de nombreuses réactions d'oxydoréduction, de transfert, de condensation ou d'isomérisation qui ont considérablement enrichi la palette des valorisations possibles des glucides (Sicard, 1997; Monsan et Willemot, 1997).

Dans ce contexte, l'équipe de Catalyse et Ingénierie Moléculaire enzymatiques du Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP) de l'INSA de Toulouse s'est investie depuis quelques années, dans l'étude des glucanesaccharases (GS), enzymes microbiennes qui catalysent la synthèse de polysaccharides, d'oligosaccharides et de

glucoconjugués ayant des propriétés fonctionnelles à partir du saccharose. Ce substrat est utilisé seul ou en présence de composés dits «accepteurs» sans ajouter de sucre activé de type nucléotide-sucre. Rappelons que le saccharose est une agro ressource peu onéreuse, renouvelable et disponible dont la production annuelle dépasse les 140 millions de tonnes par an. Connue comme le sucre de consommation courante, l'usage du saccharose est de plus en plus controversé à cause des caries dentaires, du diabète de type II ou de l'obésité qu'il induirait entre autres effets. D'autre part, l'OMC a récemment demandé que son prix ne soit plus subventionné par l'Union Européenne (UE) ce qui devrait faire baisser sa valeur (500 Euros la tonne dans la zone UE contre 200 Euros dans le reste du monde) (Moulis, 2006). Le saccharose est en outre concurrencé par l'isoglucose et d'autres édulcorants intenses (Monsan et Willemot, 1997).

Les travaux en cours au LISBP sur la bioconversion du saccharose par les GS et ses applications portent sur la purification des enzymes, les bases moléculaires du mécanisme réactionnel, l'amélioration des propriétés catalytiques par ingénierie moléculaire, l'optimisation des réactions, etc. en vue de l'utilisation optimale de ces enzymes dans les procédés de synthèse. Ces travaux ont déjà permis une meilleure connaissance des bases moléculaires de la synthèse des α -glucanes par les GS de *Neisseria polysaccharea* et de plusieurs souches de *Leuconostoc mesenteroides*. Les résultats (certains sont des brevets) ont abouti à la production d'enzymes modifiées par ingénierie moléculaire pour synthétiser des polysaccharides, des oligosaccharides et des glucoconjugués de taille, de liaisons osidiques et de ramifications contrôlées (Willemot, 1993 ; Bozonnet et coll., 2002 ; Albenne et coll., 2003 ; Joucla 2003, Fabre et coll., 2005 ; Richard, 2004 ; Moulis, 2006).

L'alternative enzymatique s'avère donc prometteuse, dans le cadre de la recherche de nouvelles voies de valorisation du saccharose. A cet effet, en plus des glucanesaccharases microbiennes étudiées à ce jour au LISBP, le présent travail se situe dans le cadre de la quête de nouvelles enzymes en vue d'élargir éventuellement la gamme des produits de synthèse à partir du saccharose. Il porte sur une activité invertasique mise en évidence du suc digestif de l'escargot *Archachatina ventricosa* (Colas, 1977). Nous nous intéressons à l'espèce *Archachatina ventricosa* parce que son suc digestif contient un équipement enzymatique varié et très actif pour l'hydrolyse de nombreuses matières organiques et qu'elle est facilement disponible (Colas et Attias, 1975, 1977 ; Colas, 1977 ; Leparoux et coll., 1997 ; Niamke et coll., 1999 ; Soro et coll., 2001).

Plusieurs questions se posent concernant l'activité invertasique mise en évidence chez l'escargot *A. ventricosa*. En effet, cette activité enzymatique correspond-t-elle à une invertase ou s'agit-il d'un autre type d'enzyme active sur le saccharose? Quelles sont les caractéristiques moléculaires et cinétiques de cette enzyme? Enfin, cette enzyme est-elle capable de synthétiser des polymères de glucose et/ou de fructose à partir du seul saccharose? La recherche des réponses à ces interrogations a été formulée en objectifs qui constituent la trame de notre travail de thèse.

Après l'introduction, la première partie de ce document est consacrée à la revue bibliographique (chapitre I). Elle est suivie de la présentation des matériels et méthodes utilisés au cours de nos manipulations (chapitre II). Nous avons ensuite le chapitre des résultats et discussions (chapitre III) qui est scindé en deux parties ; la première porte sur la purification de l'enzyme et la détermination de quelques propriétés cinétiques et moléculaires de l'enzyme purifiée (Partie A). La synthèse de polymères ou d'oligosaccharides à partir du saccharose et la caractérisation (la taille, le type de liaisons

osidiques et la composition en ose(s)) du (des) polymère(s)) constituent la partie B du chapitre des résultats et discussions. La conclusion et les perspectives, les références bibliographiques et les annexes terminent ce document.

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Les biocatalyseurs offrent, en plus de la catalyse, plusieurs avantages comme la sélectivité (stéréo sélectivité, régiosélectivité, énantiosélectivité) et fonctionnent sous des conditions de température, de pH et de pressions relativement douces (Johannes et Zhao, 2006). La découverte d'enzymes actives dans les conditions extrêmes de pH, de température, de salinité etc. favorise des applications de plus en plus nombreuses (Dordick, 1991 ; Demirjian et coll., 2001, van der Burg, 2003). De nombreuses enzymes responsables de la synthèse (glycosyltransférases), de la modification (carbohydate estérases et polysaccharide lyases) et de la dégradation (glycoside-hydrolases) des glucides sont aujourd'hui connues. Le récent séquençage de plusieurs génomes a permis de révéler que les gènes dédiés aux seules fonctions de synthèse et de dégradation des sucres occupaient de 1 à 3 % du patrimoine génétique d'un organisme (Davies et coll., 2005). Au niveau spécifique de la glycobiotecnologie, l'utilisation des enzymes dans la production de sucres de synthèse et la glycosylation de composés accepteurs constituent une excellente illustration des nouvelles réactions que permettent les catalyseurs enzymatiques. Les résultats obtenus jusqu'alors sont déjà impressionnants, tant sur les quantités de glucides valorisées grâce à des technologies enzymatiques, que sur la diversité des fonctionnalités auxquelles il est possible d'accéder et qui trouvent leur plein emploi dans divers domaines (Sicard, 1997 ; Monsan et Willemot, 1997, Delzenne, 2003).

Les possibilités d'association des oses concordent bien avec l'impressionnante diversité des fonctionnalités des glucides et leurs dérivés. En effet, alors que 3 différents acides aminés ou nucléotides permettent respectivement la synthèse de 6 différents peptides ou nucléotides, 3 différentes unités d'hexopyranose donnent 720 différents trisaccharides (Schmidt, 1986). Ce potentiel suscite la recherche d'enzymes toujours plus performantes pour l'hydrolyse ou la synthèse de glucides et de glycoconjugués ayant des propriétés fonctionnelles (Scigelova et coll., 1999 ;

Kren et Martinkova, 2001 ; Ning et coll., 2003 ; Richard, 2004, Moulis, 2006).

Les travaux exposés dans ce document portent sur l'étude d'une enzyme hydrolysant le saccharose. Cette activité invertasique correspond à des enzymes appartenant potentiellement à différentes familles de glycoside-hydrolases (GH) dont certaines sont de simples hydrolases tandis que d'autres catalysent aussi la synthèse de polysaccharides, d'oligosaccharides et de glycoconjugués par transglycosylation. Afin de situer l'activité invertasique dans l'univers des enzymes, nous présentons dans la première partie (partie A) de l'étude bibliographique les enzymes agissant sur les glucides tandis que la partie B est consacrée aux principales enzymes actives sur le saccharose non activé.

PARTIE A : LES ENZYMES ACTIVES SUR LES GLUCIDES

Les enzymes sont classées par l'EC de l'IUBMB sur la base du type de réactions catalysées, de la spécificité de substrat, et occasionnellement de leur(s) mécanisme(s) moléculaire(s). Selon cette classification les enzymes actives sur les sucres sont classées parmi les glycoside-hydrolases (E.C.3.2.1.x) et les glycosyltransférases (E.C.2.4.x.y). Une telle classification, bien qu'essentielle dans un souci d'homogénéisation de la nomenclature des enzymes, n'est pas appropriée aux enzymes telles que les glycoside-hydrolases et les glycosyltransférases qui présentent un large spectre de spécificités et d'activités. Pour répondre à ces limites et en complément à cette convention, Henrissat a proposé une nouvelle classification des enzymes agissant sur les sucres, basée sur les homologies de séquences et de structures en découlant.

Cette classification, d'abord proposée en 1991 pour les glycoside-hydrolases (Henrissat, 1991 ; Henrissat et Bairoch, 1993, 1996 ; Davies et Henrissat, 1995), a ensuite été élargie aux autres classes d'enzymes (glycosyltransférases, carbohydate estérases et polysaccharide lyases) (Campbell et coll., 1997) et récemment aux modules de liaison aux glucides (Coutinho et Henrissat, 1999b). L'ensemble des données de cette classification est disponible sur le serveur URL : <http://www.cazy.org>, régulièrement mis à jour.

Cette classification regroupe en familles des enzymes ayant une même structure tridimensionnelle globale (résolue ou prédite) et un mécanisme analogue. Des enzymes avec une même spécificité de substrats peuvent appartenir à des familles distinctes ; à l'inverse, une même famille peut contenir des enzymes de numéros E.C. différents.

1. Les glycosides hydrolases (GH)

Elles hydrolysent principalement les liaisons osidiques (glycosidases) et certaines sont aussi capables de former des liaisons osidiques (transglycosidases). Elles se distinguent par la formation d'un intermédiaire covalent glycosyl-enzyme à partir duquel le résidu glycosyle peut être transféré de manière préférentielle à l'eau (hydrolases) ou sur un autre accepteur (transglycosidases). Selon leurs familles, les GH hydrolysent les liaisons glycosidiques avec rétention ou inversion de la configuration anomérique. Les enzymes à rétention de configuration opèrent par un mécanisme à double déplacement (Figure 1) qui conduit à la rétention de la configuration du carbone anomère (McCarter et Withers, 1994 ; Davies et Henrissat, 1995).

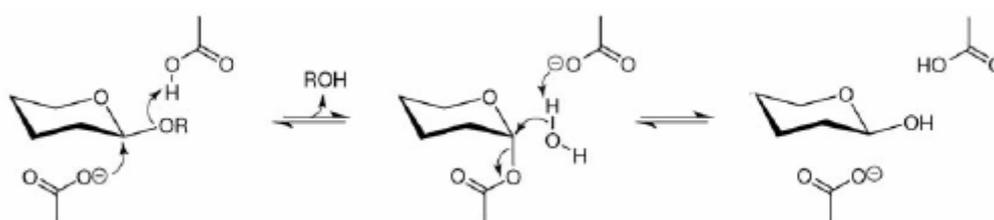


Figure 1: Mécanisme d'action des GH à rétention de configuration

(Hancock et coll., 2006)

Dans le cas des enzymes à inversion de configuration, l'hydrolyse de la liaison osidique entraîne une inversion de la configuration du carbone anomère via un unique déplacement (S_N1 -like). Ainsi, l'hydrolyse d'une liaison β -glucosidique donne un produit avec une configuration α et vice-versa (figure 2) (McCarter et Withers, 1994 ; Davies et Henrissat, 1995). Le site actif des GH est composé d'une triade d'acides aminés catalytiques. L'un des acides aminés joue le rôle du donneur de proton, un autre celui de nucléophile et le troisième acide intervient dans la stabilisation de

l'intermédiaire covalent glucosyl-enzyme (Mosi et coll., 1997; Uitdehaag et coll., 1999; Yoshioka et coll., 1997). Un cas particulier de mécanisme d'hydrolyse de liaisons osidiques utilisant un cofacteur minéral a été récemment décrit (Rajan, 2004).

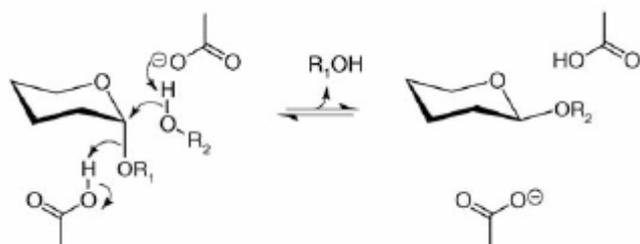


Figure 2: Mécanisme d'action des GH à inversion de configuration

(Hancock et coll., 2006)

A ce jour, on dénombre 110 familles de GH dont certaines sont regroupées en clans (14 clans à ce jour : GH-A à GH-N) lorsqu'elles renferment des enzymes apparentées d'un point de vue structural, résultant du fait que les structures des protéines sont mieux conservées que les séquences. Les familles GH 21, 40, 41 60 et 69 ont été supprimées et leurs enzymes reclassées. On compte également quelques enzymes non encore classées dans l'une des familles définies.

2. Les glycosynthases

Les GH ont été très utiles pour la synthèse des carbohydrates. Cependant, leur utilisation est limitée d'une part, par la difficulté à diriger la réaction dans un sens thermodynamique défavorable et d'autre part, par la dégradation enzymatique des produits de la réaction (Monsan et Paul, 1995). Pour remédier à ces effets, le résidu catalytique nucléophile des glycosidases est muté en résidu non nucléophile par ingénierie des protéines (Mac Kenzie et

coll., 1998). Les glycosidases ainsi mutées sont désignées « glycosynthases » ; elles perdent la capacité d'hydrolyse et catalysent la formation d'une liaison β -glycosidique en utilisant les α -glycosylfluorures comme substrat (figure 3). Les produits de la transglycosylation s'accumulent donc dans le milieu réactionnel et peuvent se recouvrer avec un haut rendement (Hancock et coll., 2006 ; Murata et Usui, 2006).

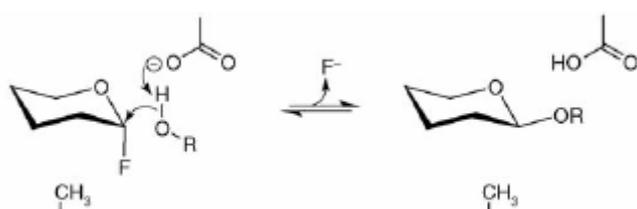


Figure 3: Mécanisme d'action des glycosynthases (mutant nucléophile)

(Hancock et coll., 2006)

La première glycosynthase décrite a été obtenue en remplaçant le résidu Glu 358 de la β -glucosidase de *Agrobacterium sp* par un résidu alanine. Le mutant qui en résulte, une β -glycosynthase conduit à la synthèse efficace d'oligosaccharides avec un rendement de plus de 80% (Mac Kenzie et coll., 1998). Une stratégie similaire a été utilisée pour développer des β -galactosynthases (Jakeman et Withers, 2002), β -mannosynthases (Hrmova et coll., 2002) et α -glycosynthases (Okuyama et coll., 2002).

3. Les glycosyltransferases (GT)

Les glycosyltransférases (GT) sont les enzymes responsables de la synthèse de la majeure partie des disaccharides, oligosaccharides et polysaccharides rencontrés dans la nature. La biosynthèse par les transglycosidases du groupe des GH est très minoritaire. Les GT catalysent le transfert de résidus

osidiques issus d'un sucre activé (par un groupement phosphate, nucleotide-phosphate ou lipide-phosphate) sur des accepteurs spécifiques glucidiques ou non. A ce jour on estime que 1% des cadres ouverts de lectures (ORFs) de chaque génome serait dédié à la synthèse de liaisons osidiques assurée pour la plupart par les glycosyltransférases (Coutinho et coll., 2003 ; Davies et coll., 2005). Les glycosyltransférases ont, jusqu'à la fin des années 1990, fait l'objet de peu d'études de structure et de mécanisme réactionnels, rendues difficiles du fait que nombre de ces enzymes sont associées aux membranes. Depuis une dizaine d'années, le séquençage de nombreux génomes permet d'y remédier progressivement (Keegstra et Raikhel, 2001).

Contrairement aux GH qui adoptent des formes variées, les GT semblent adopter un nombre réduit de structures, avec seulement 2 types répertoriés à ce jour, nommés GT-A et GT-B, en référence à la notion de clans adoptée pour les GH. Il s'agit de structures protéiques de type α/β déployant des arrangements différents (Figure 4) (Unligil et Rini, 2000).

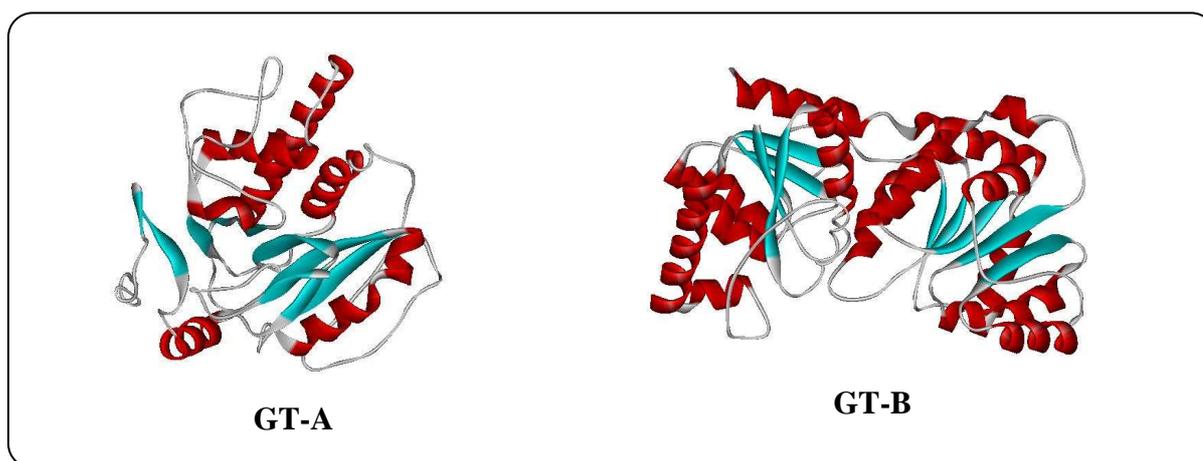


Figure 4: Modes de repliement des structures tridimensionnelles des GT

GT-A : α -1,3-galactosyltransferase (famille GT-6)

GT-B : β -1,4-N-acetylglucosaminyltransferase MurG (famille GT-28)

(Unligil et Rini, 2000)

Les GT sont aussi des enzymes modulaires (figure 5). De nombreuses enzymes de ce groupe possèdent en effet un domaine de liaison aux sucres (CBM) ou d'autres modules accessoires non catalytiques pouvant potentiellement faciliter une reconnaissance du substrat et/ou des interactions protéine/protéine (Coutinho et coll., 2003). Ainsi, certaines GT notamment

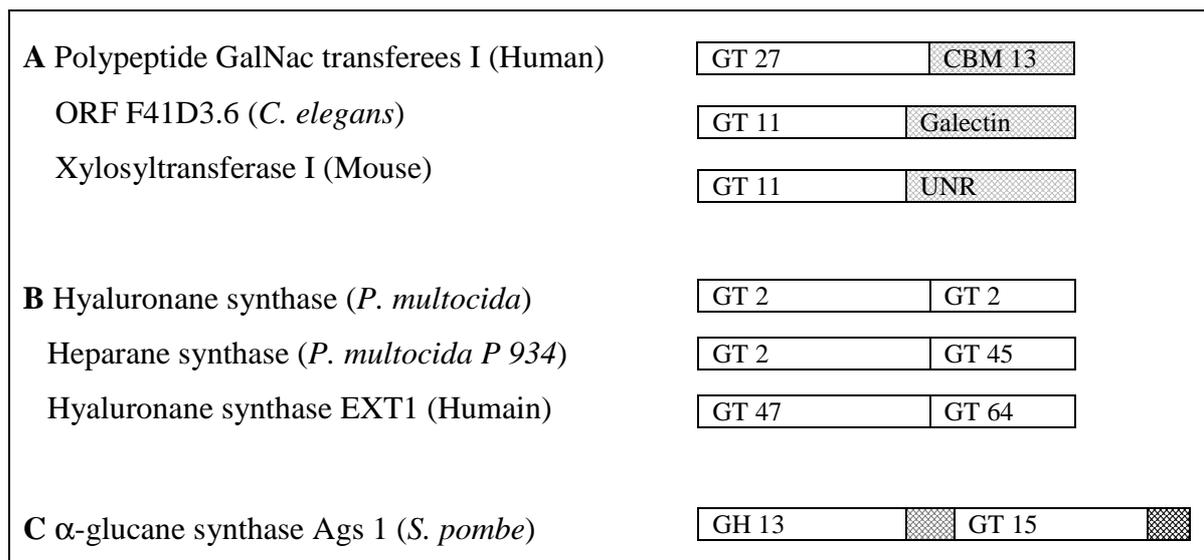


Figure 5: Exemples de structures modulaires des GT

(Coutinho et coll., 2003)

A, GT associée des modules non catalytiques ; **B**, tandem de deux GT sur un même polypeptide ;

C, GT associée à une transglucosidase

celles impliquées dans la synthèse de motifs alternés comme l'héparine, la chondroïtine ou la hyaluronane sont souvent organisées en tandem pour la synthèse. C'est le cas de la hyaluronane synthase de *Pasteurella multocida* composée de deux enzymes de la famille GT-2 (Jing et de Angelis, 2000).

Dans des cas plus rares les GT modulaires peuvent comporter une partie GH/transglucosidase (Hochstenbach et coll., 1998). A ce jour, 89 familles de GT sont répertoriées bien que beaucoup d'entre elles soient encore putatives. Environ 130 enzymes restent non classées dans les familles actuelles. Certaines seraient apparentées et la notion de clan a été proposée pour ces

familles d'enzymes (Coutinho et coll., 2003) mais la base de données ne les mentionne pas encore.

4. Les carbohydrates estérases

Elles catalysent les réactions de O- ou de N-acétylations des sucres. Puisqu'un ester correspond à l'association d'un acide et d'un alcool, deux classes sont considérées. Celles pour lesquelles le sucre joue le rôle de l'acide, comme les esters de methylpectines et celles pour lesquelles le sucre se comporte en alcool comme dans les xylanes acétylés. A ce jour 14 familles d'enzymes sont formées sur la base des similarités des séquences primaires (site www.cazy.org, 2007).

5. Les polysaccharides lyases (4.2.2.-)

Ces enzymes hydrolysent les chaînes de polysaccharides via un mécanisme de β -élimination entraînant la formation d'une double liaison au niveau de la nouvelle extrémité non réductrice formée. A ce jour 18 familles sont déterminées en fonction de la similarité de leurs séquences d'acides aminés (site www.cazy.org, 2007).

6. Les modules de liaison aux glucides

De nombreuses GH et GT possèdent une organisation modulaire, probablement adoptée au cours de l'évolution afin d'interagir efficacement avec leurs substrats (Henrissat et Davies, 2000). Ces modules, récemment regroupés sous le terme de « carbohydrate binding modules » (CBM) ou modules de liaison aux glucides, n'ont pas de propriété catalytique propre mais permettent dans de nombreux cas d'augmenter l'efficacité catalytique

des enzymes auxquelles ils sont associés, en particulier en favorisant les contacts entre les domaines catalytiques et les substrats insolubles (Tomme et coll., 1995 ; Bolam et coll., 1998). A ce jour, 49 familles de CBM sont répertoriées pour environ 2600 modules et certaines sont regroupées en superfamilles (Sunna et coll., 2001). Cependant, le rôle de nombre d'entre eux demeure inconnu (Coutinho et Henrissat, 1999b). Les CBM adoptent principalement des repliements de type β -protéine (Figure 6) (Bourne et Henrissat, 2001).

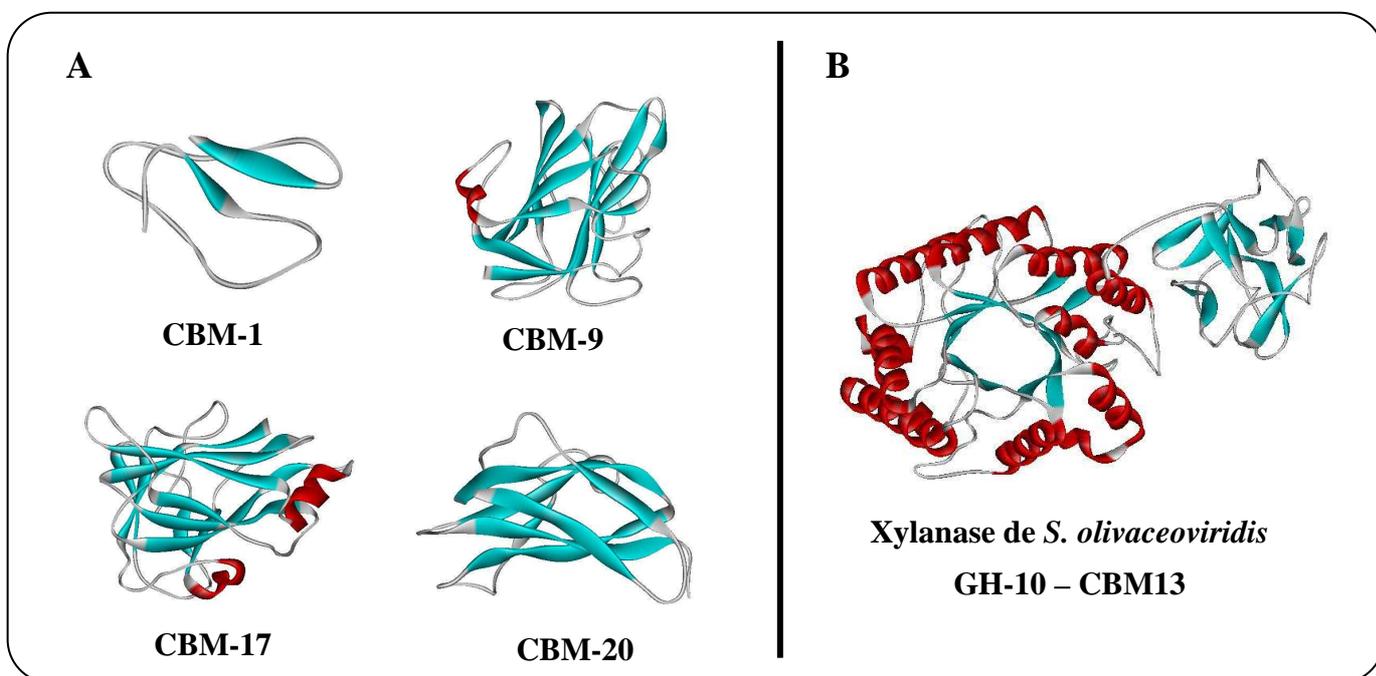


Figure 6: Structures tridimensionnelles de quelques CBM (A) et d'une xylanase modulaire de *S. olivaceoviridis* (B)
(Bourne et Henrissat, 2001)

PARTIE B : LES ENZYMES ACTIVES SUR LE SACCHAROSE

Compte tenu de la grande diversité des GH, nous nous limitons dans cette étude aux enzymes actives sur le saccharose et qui ne nécessitent pas de substrat activé.

I. LE SACCHAROSE

Le saccharose ou α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-fructofuranoside est un glucide extrait de la canne à sucre (zone tropicale) ou de la betterave sucrière (climat tempéré). C'est un disaccharide (figure 7) formé d'une molécule de glucose et d'une molécule de fructose liées par une liaison oside-oside β (1 \rightarrow 2). Il se présente sous forme de cristaux de couleur brune (sucre brut) ou de couleur blanche (sucre raffiné).

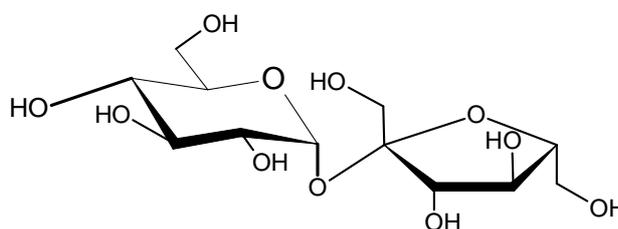


Figure 7: Structure du saccharose

L'hydrolyse enzymatique du saccharose a été observée pour la première fois par Berthelot (1860) alors qu'il isolait l'invertase de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Les enzymes actives sur le saccharose sont pour la plupart classées dans les familles 13, 31, 32, 68 et 70 des GH. En fonction de leur mode d'action, ces enzymes vont essentiellement catalyser les réactions d'hydrolyse et/ou de transfert. Les GH actives sur cette liaison osidique sont spécifiques soit de la molécule de glucose, soit de celle de fructose. Cette propriété permet de les distinguer en deux groupes : les enzymes spécifiques du transfert du glucose et les enzymes spécifiques du transfert du fructose.

II. LES ENZYMES SPECIFIQUES DU TRANSFERT DU GLUCOSE

1. Les principales réactions catalysées

Les enzymes spécifiques du glucose catalysent le transfert du résidu glucosyle provenant du clivage du saccharose. La première étape de la catalyse est la formation d'un complexe covalent glucosyl-enzyme (i), avec libération concomitante de fructose (Mooser et Iwaoka, 1989). En fonction de la destination de cette unité glucosyle, différents produits sont synthétisés:

- l'unité glucosyle peut être transférée sur un glucane en formation (ii), pour aboutir à un polymère d'unités α -D-glucospyranosyle de masse moléculaire élevée.
- l'unité glucosyle peut être transférée sur une molécule « acceptrice », endogène ou apportée en supplément au milieu réactionnel (iii). Les produits issus de cette réaction peuvent par la suite eux-mêmes jouer le rôle d'accepteur. C'est la « réaction d'accepteur », aboutissant à la synthèse d'oligosaccharides de faible masse moléculaire (Koepsell et coll., 1953).
- une molécule d'eau attaque l'unité glucosyle (iv), le glucose est libéré dans le milieu réactionnel. Globalement, c'est une hydrolyse du saccharose.
- enfin le glucosyle peut également être re-transféré sur une molécule de fructose (v), aboutissant à la reformation du saccharose lorsque le transfert a lieu sur l'hydroxyle en position 2 d'un fructofuranose. On parle alors d'échange isotopique. Lorsque le transfert a lieu sur l'hydroxyle en position 5 d'un fructopyranose, c'est une molécule de leucrose qui est synthétisée. La synthèse d'autres isomères du saccharose est également possible en fonction de l'enzyme qui catalyse la réaction (figure 8).

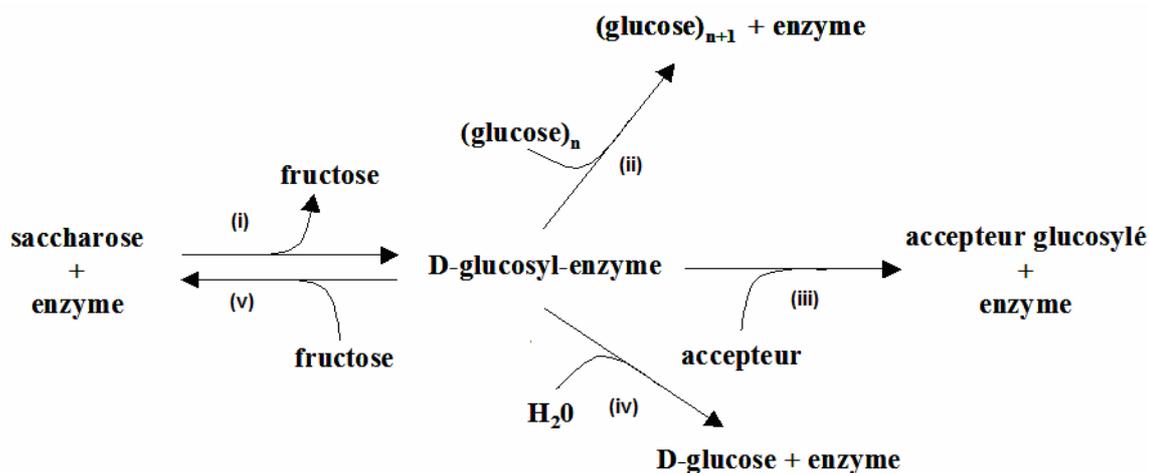


Figure 8: Les différentes destinations possibles du résidu glucosyle.

(Monchois et coll., 1999b)

2. Les enzymes des familles 13 et 70 des GH

2.1. Les α -glucosidases (EC 3.2.1.20)

Les α -glucosidases [EC 3.2.1.20 ; α -D-glucoside glucohydrolase] sont des exo-carbohydrolases qui catalysent l'hydrolyse des liaisons α -glucosidiques à l'extrémité non réductrice terminale de leur substrat ainsi que la réaction de transglucosylation pour synthétiser des composés α -glucosylés et des glucooligosaccharides de différentes tailles et liaisons osidiques (Chiba, 1979 ; Kato et coll., 2002 ; Kobayashi et coll., 2003). Ces enzymes ont différentes spécificités de substrats qui permettent de les classer dans deux familles d' α -glucosidases (familles I et II) et en trois types (I, II et III) respectivement en fonction de leur structure primaire et leur spécificité de substrat (Chiba, 1988, 1997 ; Kimura et coll., 2004). Les enzymes qui appartiennent à la famille I hydrolysent mieux les substrats hétérogènes comme les aryl- α -D-glucosides et le saccharose par rapport au maltose (type I). Les enzymes appartenant à la famille II sont très actives en présence des substrats homogènes et sont groupés par convention dans les types II et III.

Les α -glucosidases de types II et III sont très proches les unes des autres par rapport à la spécificité de substrat, mais celles de type III sont les seules capables de bien hydrolyser les α -glucanes comme l'amidon soluble, le glycogène ainsi que les maltooligosaccharides (Chiba, 1997 ; Frandsen et Svensson, 1998). Selon la classification en familles des glycosides-hydrolases, les α -glucosidases sont classées dans les familles 4, 13, 31 et 97. Les α -glucosidases des familles I et II correspondent respectivement aux familles 13 et 31 des GH (Henrissat, 1991 ; Henrissat et Davies, 1995). Différents types d' α -glucosidases sont isolées des tissus animaux, des plantes et des microorganismes (Chiba, 1988). Notre substrat étant le saccharose, nous ne considérons dans cette étude que les α -glucosidases de la famille I qui hydrolysent de préférence les substrats hétérogènes comme le saccharose et les aryl-glucosides par rapport aux substrats homogènes (le maltose, les oligosaccharides et les glucanes). En plus de la réaction d'hydrolyse, certaines α -glucosidases catalysent les réactions de transglucosylation. Cette réaction de transglucosylation est utilisée pour la production d'oligosaccharides et pour conjuguer des résidus glucosyles à d'autres composés biologiques utiles dans le but d'améliorer leurs propriétés chimiques et leurs fonctions physiologiques (Murase et coll., 1997 ; Yamamoto et coll., 1990).

Les α -glucosidases de la famille I ont les mêmes caractéristiques que toutes les autres enzymes de la famille 13 des GH ou famille des α -amylases. Cette famille d'enzymes renferme environ 30 activités différentes. Elles sont caractérisées par un mécanisme de réaction avec rétention de la configuration α , une structure multimodulaire avec un domaine catalytique en forme de tonneau (β/α)₈ (figure 9), quatre séquences consensus et la triade catalytique (1 Glu et 2 Asp) comprenant un résidu donneur de proton (Glu) et un nucléophile (le premier Asp) (MacGregor et coll., 2001).

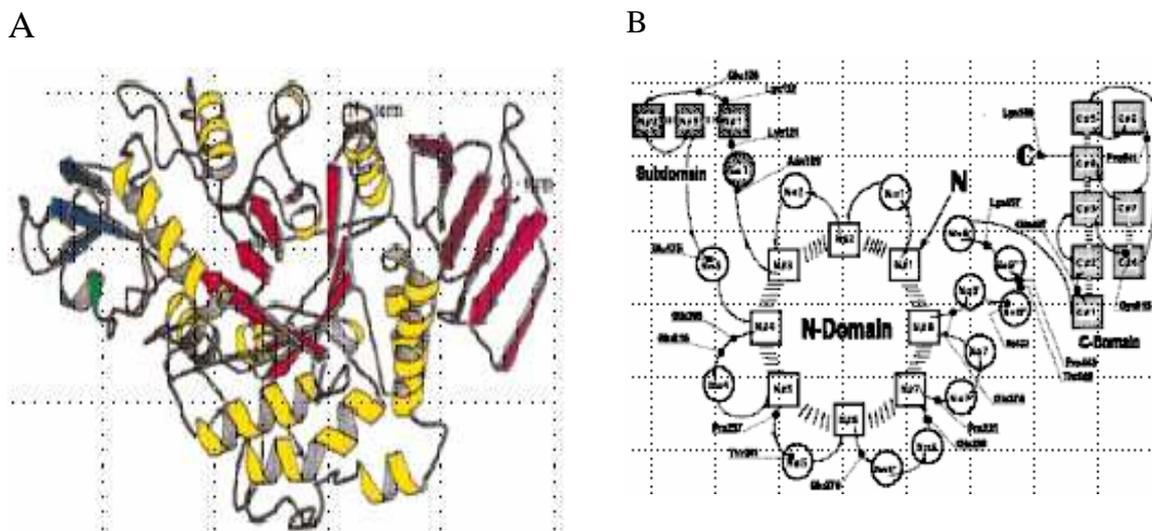


Figure 9: Structure résolue de l'oligo-1,6-glucosidase de *Bacillus cereus*

A : représentation en rubans ; B : représentation schématique
(Watanabe et coll., 1997)

Les enzymes de la famille 13 des GH ont également plusieurs régions bien définies dont les séquences en amino-acides sont hautement conservées. La recherche d'homologies de séquences a notamment permis de révéler dans les séquences des α -glucosidases de cette famille, les quatre séquences consensus (Tableau I) de la famille des α -amylases (Kimura, 2000).

Tableau 1: Séquences consensus de la famille 13 des GH

(Kimura, 2000)

Enzyme	Région I	Région II	Région III	Région IV
<i>S. cerevisiae</i>	106_DLVI NH	210_GFR I DTAGL	276_EVAH	344_Y I ENHD
<i>B. sp</i> (SAM 1606)	113_DLVANH	210_GFRMDV INA	271_ETGG	340_YWTNHD
HBGase I	116_DLVPNH	225_GFR I DAVPH	298_EAFS	355_VMGNHD
HBGase II	118_DFVPNH	218_GFR I DA INH	291_EAYT	348_VS GNHD
HBGase III	119_DFVPNH	219_GFRV DALPY	286_EAYT	343_VP GNHD
A amylase (<i>A. oryzae</i>)	117_DVVANH	202_GLR I DTVKH	230_EVLD	292_FV ENHD

2.2. Les glucanesaccharases (GS)

2.2.1. Présentation des enzymes

Les GS sont produites par des bactéries lactiques, GRAM positif, telles que *Streptococcus* sp, *Lactobacillus* sp et *Leuconostoc mesenteroides* à l'exception des amylosaccharases (AS). Elles renferment en moyenne 1500 acides aminés et présentent une masse moléculaire élevée, comprise entre 150 et 180 kDa. L'analyse de la séquence primaire de ces enzymes révèle que, comme toutes les grandes protéines, les GS possèdent plusieurs domaines fonctionnels désignés peptide signal, région variable, domaine catalytique, et domaine de liaison au glucane (figure 11) (Ferreti et coll., 1987 ; Russell, 1990 ; Giffard et coll., 1993 ; Simpson et coll., 1995 a,b ; Vickerman et Clewel, 1997).

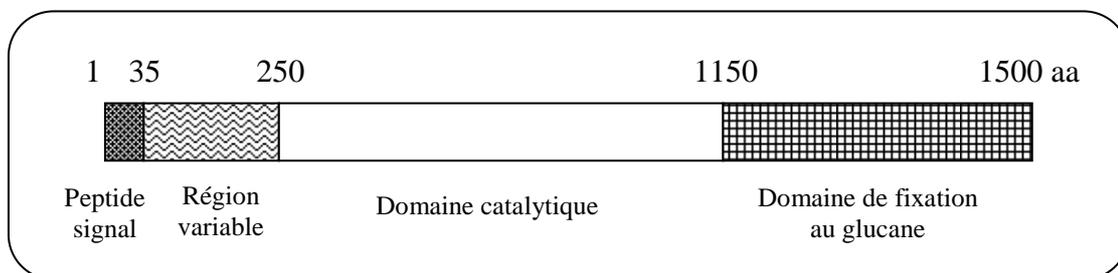


Figure 10 : Schéma de la structure primaire générale des glucanesaccharases

(Monchois et coll., 1999d)

Elles catalysent le transfert de résidus glucosyles provenant du clivage du saccharose en passant par la formation du complexe covalent glucosyl-enzyme (Mooser et Iwata, 1989), avec libération concomitante du fructose. Il existe de grandes variations de structure parmi les polymères synthétisés par les différentes souches selon la destination de l'unité glucosyle. En fonction du polymère qu'elles produisent, les GS peuvent être classées en 4 groupes.

2.2.1.1. Les amylosaccharases (AS) (EC 2.4.1.)

Ce sont des enzymes remarquables du fait de leur position à l'interface de plusieurs familles d'enzymes. En effet, elles appartiennent par leur structure à la famille 13 des GH (famille des α -amylases) et sont les seules enzymes de cette famille dotées d'une activité polymérase. Cette capacité à former un polymère à partir du saccharose les rapproche des GS qui constituent la famille 70 des GH. Enfin, la spécificité de synthèse des liaisons $\alpha(1\rightarrow4)$ unique chez les GS, s'apparente à celle des enzymes d'élongation de l'amidon et du glycogène. L'AS se distingue néanmoins de ces GT par sa capacité à utiliser le saccharose et non un sucre activé de type ADP ou UDP-glucose comme donneur d'unités glucosyles pour former un homopolymère dont les unités sont liées par des liaisons osidiques $\alpha(1\rightarrow4)$ avec la libération concomitante du fructose (Potocki de Montalk et coll., 2000). Les séquences des AS de *Neisseria polysaccharea* et *Deinococcus radiodurans* sont connues et leurs activités caractérisées. Ce sont des enzymes de 71 et 72 kDa respectivement pour *D. radiodurans* et *N. polysaccharea* (Potocki de Montalk et coll., 1999; Pizzut-Serrin et coll., 2005). Dans la famille des GS, l'organisation structurale de l'AS fait figure d'exception. L'étude de la séquence primaire de la seule AS recombinante produite à ce jour (celle de *Neisseria polysaccharea*) a révélé l'absence de zone variable et de GBD (Skov et coll., 2001).

2.2.1.2. Les dextrane-saccharases (EC 2.4.1.5)

Ces enzymes élaborent un polymère dénommé « dextrane ». Il présente dans la chaîne principale au moins 50% de liaisons osidiques $\alpha(1\rightarrow6)$ successives et contient des ramifications en $\alpha(1\rightarrow2)$, $\alpha(1\rightarrow3)$ et/ou $\alpha(1\rightarrow4)$. Le taux de

ramification ainsi que leur arrangement spatial varient suivant l'enzyme productrice. Les études de structure-fonction ont permis de localiser les résidus critiques pour la formation des liaisons osidiques par la DSR-E (Fabre et coll., 2005) et ceux déterminant la longueur des dextranes produits par la DSR-S (Moullis, 2006).

2.2.1.3. Les mutane-saccharases (EC 2.4.1.5)

Le polymère synthétisé par ces enzymes est constitué majoritairement de liaisons $\alpha(1\rightarrow3)$ consécutives dans la chaîne principale. Ils sont appelés mutanes et sont généralement insolubles dans l'eau. Ces polymères sont élaborés par les mutane-saccharases de certaines souches de *Streptococcus sp.* ainsi que par *L. mesenteroides* NRRL B-523 et NRRL B-1149 (Sidebotham, 1974; Mooser, 1992).

2.2.1.4. Les alternane-saccharases (EC 2.4.1.140)

Ces enzymes synthétisent un glucane appelé « alternane ». Il présente dans la chaîne principale des liaisons osidiques $\alpha(1\rightarrow6)$ et $\alpha(1\rightarrow3)$ qui sont alternées, et possède des ramifications également liées en $\alpha(1\rightarrow3)$. Trois souches productrices d'alternane ont été mises en évidence : *L. mesenteroides* NRRL B-1355, NRRL B-1501 et NRRL B-1498 (Jeanes *et coll.*, 1954 ; Seymour et Knapp, 1980 a,b).

2.2.2. La structure des GS

La structure tridimensionnelle de l'AS de *N. polysaccharea* contenant une molécule de Tris liée au site actif est la seule structure de GS connue. Elle indique (Figure 10) que la forme de la chaîne polypeptidique de l'AS dans

l'espace lui confère une organisation structurale en 5 domaines, nommés N, A, B, B' et C (Skov et coll., 2001). Les domaines A, B et C sont communs à ceux des enzymes de la famille des α -amylases (Skov et coll., 2001) (Figure 11).

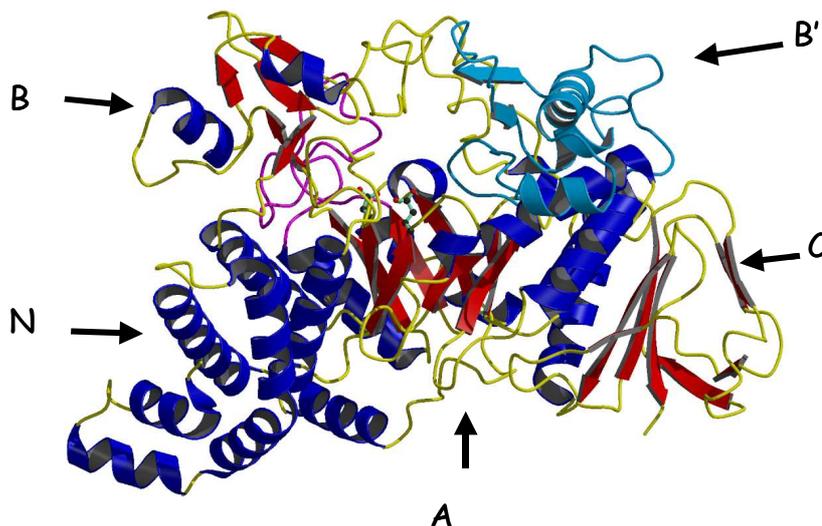


Figure 11 : Structure tridimensionnelles de l'amylosaccharase de *N. polysaccharea*
(Skov et coll., 2001).

Des homologies de séquence (figure 12) repérées entre les GS et les enzymes de la famille 13 des GH (famille des α -amylases), laissaient présager l'existence de similitudes structurales (Ferretti et coll., 1987 ; Mooser et coll., 1991 ; Devulapalle et coll., 1997).

Les homologies ainsi mises en évidence révèlent que les enzymes de la famille des GS possèdent elles aussi un tonneau $(\beta/\alpha)_8$, qui présenterait cependant une permutation circulaire (Mc Gregor et coll., 1996) : le premier élément de structure secondaire serait l'hélice α_3 , suivie des éléments équivalents à β_4 , α_4 , β_5 , α_5 ... α_8 , puis suivrait une séquence de 160 résidus de structure inconnue, et enfin les éléments β_1 , α_1 , ... β_3 du tonneau $(\beta/\alpha)_8$ (Monchois et coll., (1999a)). C'est notamment l'existence de cette permutation circulaire qui a conduit à classer les GS dans une famille

distincte de celle des α -amylases dans la classification des GH (Coutinho et Henrissat, 1999a).

Enzyme	Région VI β 2	Région I β 3	Région V domaine B	Région II β 4	Région III β 5	Région IV β 7	Région VII β 8
AS	126_GLTYLHLM-P	182_DFIFNH	254_QWDLN	282_ILRMDAVAF	328_EAIV	388_YVR--SHD	480_GLPLIYLGD
<i>Enzymes de la famille des α-amylases</i>							
TAKA	56_GFTAIWIT-P	117_DVVANH	173_LPDLN	202_GLRIDTVKH	230_EVLD	292_FVE--NHD	323_GIPIIYAGQ
AMY1	34_GVYHVWLP-P	88_DIVINH	150_IDHLN	176_AWRIDFARG	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_GWRIDVANE	626_ELWG	698_LLG--SHD	745_GMPSIYYGD
AM	106_GLLKMEEL-P	252_DVWANK	290_LYDWK	317_EFRIDHFRG	368_EDLG	416_YTG--THD	485_NIPATQFGN
CGT	70_GVTALWISQP	135_DFAPNH	197_LADFN	225_GIRVDAVKH	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_GVDCLWVP-P	108_DFVMNH	178_QPDLN	206_GFRIDAVPY	252_EANQ	322_FLR--NHD	385_GSPVLYYGD
<i>Glucane-saccharases</i>							
GTF-S	849_GITQFEMA-P	915_DLVPNQ	395_ANDVD	433_GVRVDAVDN	475_EAWS	542_FIR--AHD	614_TVTRVYYGD
GTF-D	894_GVTSFEMA-P	959_DWVPDQ	423_ANDID	461_GCRVDAVDN	503_EAWS	579_FIR--AHD	649_SITRLYYGD
DSR-B	939_GITSFQLA-P	1004_DWVPDQ	491_ANDVD	529_GIRVDAVDN	571_EQWS	639_FVR--AHD	709_TVPRVYYGD
DSR-S	958_GVTSFQLA-P	1023_DWVPDQ	509_ANDVD	547_GIRVDAVDN	589_EDWS	657_FVR--AHD	727_TVPRVYYGD

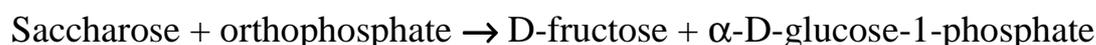
Figure 12: Régions conservées de la séquence de l'amylosaccharase de *N. polysacchara* et de quelques enzymes des familles 13 et 70 des glycoside-hydrolases (respectivement alpha-amylases et glucanesaccharases). Rouge : résidus strictement conservés (triade catalytique) ; Bleu : 4 résidus additionnels 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.

2.3. Les sucrose-phosphorylases (EC 2.4.1.7)

Elles catalysent de façon réversible la conversion du saccharose et de l'acide phosphorique en D-fructose et α -D-glucose-1-phosphate. La réaction se déroule avec la formation d'un intermédiaire glucosyl-enzyme qui réagit à son tour avec les accepteurs pour former les produits (Silverstein et coll., 1967).

La réaction catalysée est la suivante :



La structure résolue de la sucrose-phosphorylase de *Bifidobacterium adolescentis* montre que l'enzyme est composée de quatre domaines (A, B, B' et C). Les domaines A et B sont communs à ceux des membres de la famille des α -amylases et les résidus (Asp 192, Glu 232) du site actif catalytique sont localisés aux extrémités des feuillets β_4 et 5 du tonneau $(\beta/\alpha)_8$. La topologie du domaine B' est plus spécifique. Elle défavorise la liaison des oligosaccharides et réduit la taille du canal d'accès des substrats par rapport aux autres membres de la famille 13 des GH, soulignant le rôle de ce domaine dans la modulation de la fonction de ces enzymes. Il est remarquable que la forme du domaine C-terminal n'est observée dans aucune autre hydrolase de la famille 13 des GH. Les sucrose-phosphorylases sont sous forme homodimérique dans le cristal (Sprogoe et coll., 2004).

3. Les sucrares-isomaltases (EC 3.2.1.48)/(3.2.1.10)

3.1. La description des enzymes

Les sucrares-isomaltases font partie des enzymes de la famille GH 31. Ces enzymes hydrolysent la liaison osidique avec une rétention de la configuration anomérique α via un mécanisme de catalyse acide-base à double déplacement impliquant un intermédiaire covalent glucosyl-enzyme. Deux résidus d'acide aspartique (Asp) sont identifiés comme étant les acides aminés catalytiques nucléophile et acide/base respectifs. Elles hydrolysent le saccharose et l'isomaltose. La principale différence avec les enzymes de la famille 13 est la préférence donnée à l'hydrolyse des glucanes. Les génomes des animaux (l'homme y compris) ne codent pas pour une invertase. Ils utilisent donc l'enzyme inhabituelle qu'est la sucrares-isomaltase pour hydrolyser le saccharose. C'est une enzyme digestive intestinale qui hydrolyse le saccharose et joue un rôle important dans la dernière étape de la

digestion des hydrates de carbone (Ernst et coll., 2006). L'étude de l'inhibition de l'activité sucrase-isomaltase permet d'identifier des composés utilisés dans le traitement du diabète sucré comme l'acarbose, le miglitol et bien d'autres (Weaver et coll., 1997 ; Azuma et coll., 2006).

3.2. La structure des sucrares-isomaltases

Les enzymes de cette famille sont subdivisées en 4 sous-groupes selon les homologues de séquences. Les sucrares-isomaltases sont classées dans le sous-groupe I (Ernst et coll., 2006). Le monomère de MalA (sous-groupe I) compte un domaine catalytique central (A), avec la topologie du tonneau (β/α)₈ (figure 13) et deux séquences consensus caractéristiques de cette famille (Tableau 2) (Kimura, 2000).

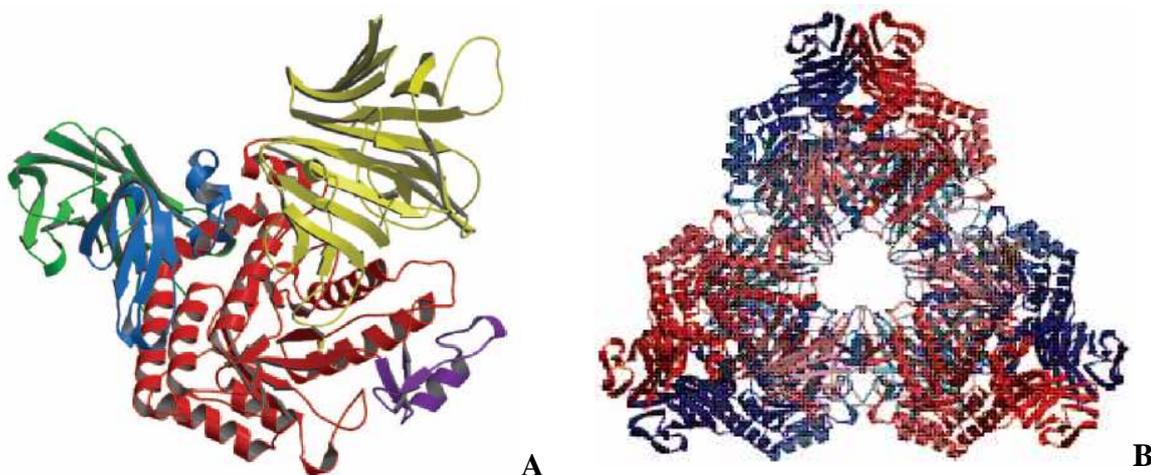


Figure 13 : Structure de l'α-glucosidase de *Sulfolobus sulfataricus* (Mal A)

(A : monomère ; B : trimère de dimères) (Ernst et coll., 2006)

Tableau 2: Séquences consensus des enzymes de la famille 31 des GH

(Kimura, 2000)

Enzyme	Région A	Région B
Human lysosomal acid	513__DGMWIDMNEPSNF	610__AGHWTGDVWSSW
Rabbit intestinal (isomaltose)	500__DGL WIDMNEVSSF	598__AAHWLGDNTATW
Rabbit intestinal (sucrase)	1389_DGL WIDMNEPSSF	1494__AGHWLGDNYARW
SBGase	464__DG I WIDMNEASN	562__TAHWTGDNAATW
Barley	433__DGL WIDMNE ISNF	510__TAYWTGDNAATW

III. LES ENZYMES SPECIFIQUES DU TRANSFERT DU FRUCTOSE

1. Les principales réactions catalysées

Le mécanisme de réaction élucidé dans les années 1950 et 1960 a été remis à jour (Gänzle et Schwabs, 2005). Il indique que ces enzymes agissent avec un mécanisme moléculaire à rétention de configuration anomérique passant par un intermédiaire fructosyl-enzyme avec libération de la molécule de glucose (Alberto et coll., 2004). Le résidu fructosyle est ensuite transféré sur l'eau, un accepteur hydrate de carbone ou une chaîne de polymère en croissance. Les résidus catalytiques nucléophile/base et donneur de protons sont respectivement Asp et Glu. En plus du saccharose, les fructosyltransférases (Ftfs) utilisent le raffinose comme donneur de fructose. Deux types de fructanes sont synthétisés par les Ftfs des *Lactobacilli*. Le lévane a des liaisons osidiques $\beta(1\rightarrow6)$ avec un degré de branchement variable en $\beta(1\rightarrow2, 6)$ et l'inuline a des liaisons osidiques $\beta(2\rightarrow1)$ et des points de branchement en $\beta(2\rightarrow1, 6)$ (van Hijum et coll., 2002, 2004 ; Tieking et coll., 2005a). La synthèse des fructanes est invariablement associée à celle des fructooligosaccharides (FOS). Lors de la synthèse des FOS, le saccharose agit comme un donneur de fructosyles ou un accepteur de fructosyles pour former du 1-kestose (1-kestotriose), avec des réactions successives de transfert qui vont donner les FOS croissants comme le nystose (1,1-kestotetraose GF3) et 1,1,1-kestopentaose (GF4) (figure 14). D'autres composés peuvent servir d'accepteurs pour donner des hétérooligosaccharides. Les enzymes de ce groupe sont classées dans les familles GH32 et GH68.

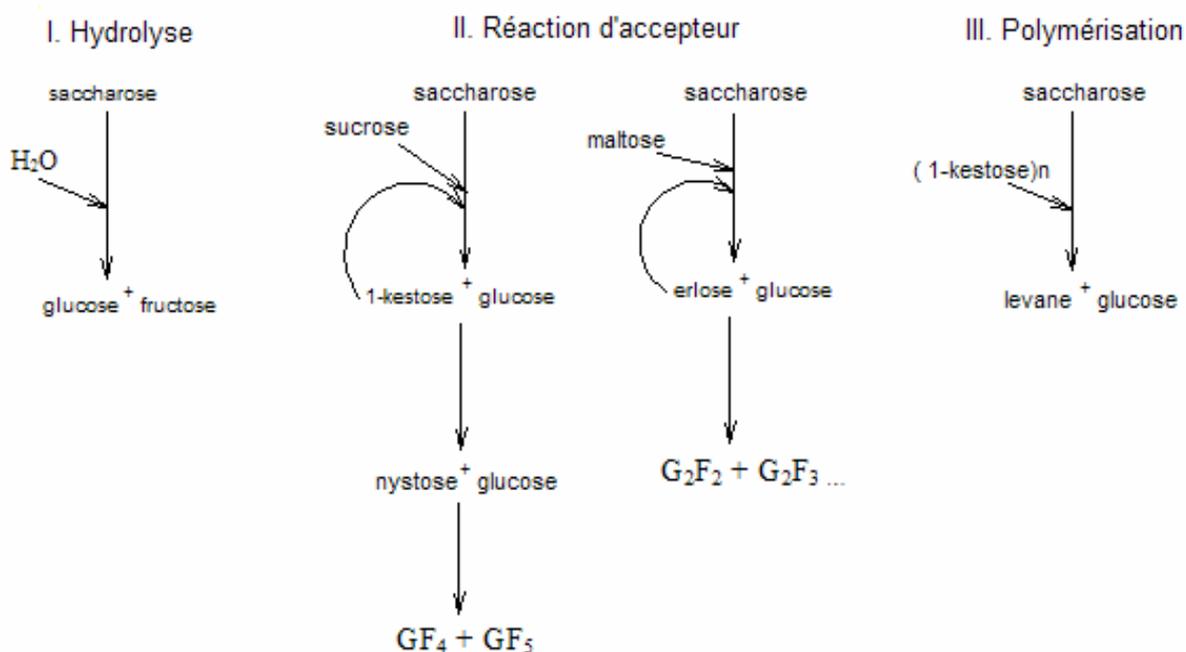


Figure 14 : Schéma des réactions catalysées par la levanesaccharase de *L. sanfranciscensis* TMW1.392 à partir du saccharose

(Tieking et coll., 2005a, b)

2. Les enzymes de la famille 32 des GH

2.1. La structure des enzymes

La structure des enzymes classées dans cette famille des GH sur la base des homologies de séquences (Alberto et coll., 2004) a été résolue à partir de l'exo-inulase d'*Aspergillus awamori* (Nagem et coll., 2004). Elle indique que l'enzyme est constituée de deux domaines (N et C-terminaux). Le domaine N-terminal montre une rare conformation en 5 lames de pales β avec une profonde poche centrale chargée négativement. Les modules de 5 feuilletts sont disposés en ordre successif avec 5 repliements pseudosymétriques autour d'une cavité centrale. Le domaine C-terminal est constitué de repliements de feuilletts β . Les deux domaines sont reliés par un court lien peptidique avec les positions et les orientations relatives des deux domaines stabilisées par de multiples liaisons hydrogène et interactions hydrophobes (figure 15). Lors de

l'hydrolyse du saccharose, le résidu fructosyle de l'intermédiaire fructosyl-enzyme est fixé entre les 5 lames en forme de pales β et dans l'axe central du domaine N-terminal (décrite ci-dessous). Les résidus catalytiques nucléophile/base et donneur de protons sont respectivement Asp 41 et Glu 241 (structure de l'Exo-inulase) et confirmés sur l'invertase de levure, un autre membre de la famille 32 (Reddy et Maley, 1990, 1996).

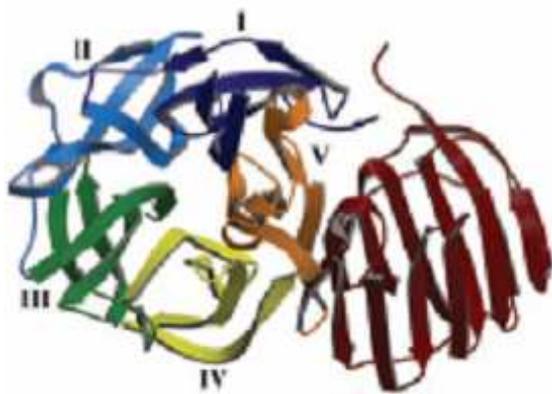


Figure 15: Structure de l'exo-inulase de *Aspergillus awamori*
(Nagem et coll., 2004).

2.2. La présentation des enzymes

2.1.1. Les invertases (EC 3.2.1.26)

Les invertases catalysent l'hydrolyse irréversible du saccharose en glucose et fructose. Elles sont couramment utilisées pour la production de sucre inverti dans l'industrie alimentaire (Tanriseven et Dogan, 2001). Le sucre inverti a l'avantage d'être incolore contrairement aux produits obtenus par l'hydrolyse chimique (Monsan et Combes, 1984). Cependant ces enzymes ne font pas qu'hydrolyser le saccharose. Dans certaines conditions elles sont capables de catalyser la transfructosylation pour produire des FOS (Nguyen et coll., 2005).

2.1.2. Les *exo-inulases* (EC. 3.2.1.80)

Egalement connues comme les *exo-β-D-fructosidases*, elles hydrolysent les résidus *β-D-fructofuranoses* non réducteurs terminaux des fructanes liés en $\beta(2\rightarrow1)$, $\beta(2\rightarrow6)$ avec une libération concomitante du *β-D-fructose*. Les substrats naturels des *exo-inulases* incluent l'*inuline*, le *lévane* et le *saccharose* (Nagem et coll., 2004).

2.1.3. Les *saccharose : saccharose-1-fructosyltransférases* (EC 3.2.1.99)

Elles convertissent le *saccharose* en *1-kestose* avec des rendements élevés mais elles ne peuvent pas synthétiser les fructanes à haut degré de polymérisation. Elles se retrouvent le plus souvent au niveau des plantes ou elles catalysent la synthèse des FOS (Vijn et Smeekins, 1999).

3. Enzymes de la famille 68 des GH

3.1. La structure des enzymes

La résolution de la structure des *levanesucrases* de *Bacillus subtilis* et de *Gluconacetobacter diazotrophicus* indique la conformation en 5 lames de pales β identique au module N-terminal des enzymes de la famille GH 32. La structure de l'enzyme est stabilisée par un resserrement entre le N-terminal et le C-terminal du polypeptide (figure 16). Au niveau de *Bacillus subtilis*, trois résidus d'acides-amino conservés de la poche centrale sont critiques pour la catalyse et sont présumés fonctionner comme le nucléophile (Asp 86) et l'acide/base (Glu 342) ou stabiliser l'état de transition (Asp 247). Un résidu arginine (Arg 360) essentiel à l'activité polymérase se trouve dans un site adjacent à la poche centrale et exposé au solvant (Meng et Futterer, 2003).

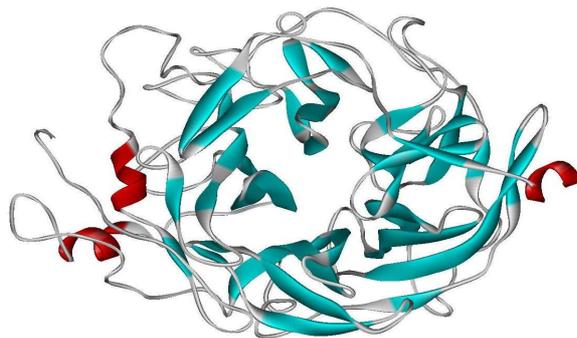


Figure 16: Structure de la levanesucrase de *Gluconacetobacter diazotrophicus*

(Martines-Fleites et coll., 2005)

3.2. La description des enzymes

3.1.1. Les β -D- fructofuranosidases (EC 3.2.1.26)

Elles hydrolysent le résidu β -D-fructofuranose à l'extrémité non réductrice des β -D-fructofuranosides. Elles catalysent également des réactions de transfert de résidus fructosyles (Nguyen et coll., 2005).

3.1.2. Les levanesucrases (EC 2.4.1.10)

Ces enzymes catalysent l'hydrolyse du saccharose et la synthèse de polymères de fructose de type lévane (liaisons $\beta(2\rightarrow6)$). Elles réalisent le transfert de l'unité fructosyle du sucrose à un certain nombre d'accepteurs comprenant l'eau, le saccharose et le polymère de fructane. Les lévanes sont linéaires ou branchés au niveau du C1 (Tieking et coll., 2005 a,b)

3.1.3. Les inulinesucrases (EC 2.4.1.9)

Elles catalysent l'hydrolyse du saccharose et la synthèse d'un polymère de fructose de type inuline (liaisons $\beta(2\rightarrow1)$). Elles réalisent le transfert de

l'unité fructosyle du sucrose à un certain nombre d'accepteurs comme l'eau, le saccharose et le polymère de fructane (Tieking et coll., 2005 a,b).

OBJECTIFS DE LA THESE

Cette étude bibliographique montre l'étendue relative de l'activité invertasique dans l'univers des enzymes actives sur les sucres. De même, la complexité et l'originalité de certaines glycoside-hydrolases impliquées dans la biosynthèse des dérivés du saccharose ainsi que la variabilité des produits de synthèse et leurs potentialités ont été évoquées. Dans ce contexte de valorisation par voie enzymatique du saccharose, les glucanesaccharases, les α -glucosidases, les invertases, les inulinesaccharases, les lévanesaccharases etc. capables de catalyser des réactions de transglycosylation pour la synthèse de composés glycosylés et/ou de polymères de glucose ou fructose à partir de ce substrat, suscitent un intérêt particulier car :

a) Elles ne nécessitent pas de substrat activé, contrairement à la majorité des enzymes de biosynthèse des polysaccharides de la biosphère. Ceci leur confère un réel attrait économique, puisque le saccharose, agroressource renouvelable et disponible, est nettement meilleur marché que les substrats activés des glycosyltransférases.

b) Elles possèdent une grande diversité de spécificités et permettent donc de synthétiser des polymères de structures variées, déployant un éventail de propriétés.

c) Elles peuvent être modifiées à façon par ingénierie rationnelle (troncatures de domaines ou mutations spécifiques) ou par approche aléatoire (création de banques de variants de la protéine choisie et isolement du variant le plus performant pour la propriété choisie, par des étapes de sélection et/ou de criblage) pour adapter leurs propriétés à l'obtention de composés spécifiques.

Depuis la mise en évidence de l'activité invertasique du suc digestif de l'escargot *A. ventricosa* lors de la purification d'autres enzymes, aucun essai de purification de l'enzyme responsable de cette activité n'a été entrepris. Pour approfondir les connaissances sur cette enzyme en vue de son utilisation éventuelle, l'étape de la purification était un préalable incontournable. A cet effet, nous avons à répondre aux questions suivantes dans le cadre de nos travaux de thèse :

- Sachant que la purification d'autres enzymes de la même source a été jalonnée de nombreuses difficultés, peut-on facilement purifier en quantité suffisante l'enzyme responsable de l'activité invertasique en utilisant les méthodes classiques de chromatographie liquide ?
- Quelles sont les principales caractéristiques moléculaires, structurales et cinétiques de l'enzyme purifiée ? Cette enzyme est-elle une invertase ou une autre molécule enzymatique hydrolysant le saccharose ?
- L'enzyme purifiée hydrolyse-t-elle simplement le saccharose ? Est-elle capable de synthétiser un polymère à partir du saccharose seul ? Quels sont les structures (composition, taille, liaisons osidiques) et le mécanisme de polymérisation des composés éventuellement synthétisés par l'enzyme purifiée ?

II. MATERIELS ET METHODES

1. La source enzymatique

La source enzymatique est le suc digestif de l'escargot *Archachatina ventricosa*, un mollusque gastéropode comestible (figure 17) qui se retrouve dans une grande partie de l'Afrique sub-saharienne humide (Annexe 1). Il appartient à l'ordre des stylomatophores, la famille des *Achatinidea* et au genre *Archachatina* (Hodasi, 1984). Le suc digestif est extrait selon une méthode adaptée de celle de Colas (1977). Les escargots sont gardés à jeun pendant trois jours afin de permettre la digestion de toute la matière organique ingérée. Les coquilles sont ensuite cassées. Le tube digestif est isolé de la masse viscérale et placé au-dessus d'un entonnoir contenant de la gaze afin de recueillir le suc digestif débarrassé de tout mucus et de tout débris de coquille. Le suc digestif recueilli est centrifugé (20 000 g, 30 minutes, 4°C). Le surnageant conservé à 4°C avec de l'azote de sodium (0,02 %; m/v) constitue l'extrait brut.



Figure 17 : Photo de l'escargot *Archachatina ventricosa*

2. Dosage de l'activité hydrolasique

L'activité est déterminée selon le cas par le dosage du glucose (kit enzymatique Biomérieux), le dosage du para-Nitrophenol libéré du pNP α -D-glucopyranoside et/ou le dosage des sucres réducteurs au DNS.

2.1. Dosage du glucose par le kit enzymatique BioMérieux

L'activité hydrolasique est déterminée par une méthode adaptée de celle du fabricant. Le volume réactionnel de 100 μ l est composé de 25 μ l d'enzyme, 50 μ l de tampon et 25 μ l de substrat. Le mélange est incubé à 37°C pendant 5 minutes. La réaction est arrêtée par chauffage au bain marie à 95°C pendant 3 minutes. Après refroidissement des tubes, ils sont à nouveau incubés à 37°C pendant 20 minutes après l'ajout du réactif du kit de dosage enzymatique du glucose (1ml) par tube. Un volume de 100 μ l est ensuite prélevé de chaque tube et mis dans un puits d'une plaque de lecture. La densité optique est enfin déterminée à 505 nm dans chaque puits avec un lecteur de plaque (Versamax). Une solution de glucose à 1 mg/ml sert d'étalon. La valeur de la densité optique est divisée par deux dans le calcul de l'activité hydrolasique du maltose pour tenir compte de la libération de deux unités glucosyles par molécule de maltose hydrolysée. L'activité enzymatique est exprimée en unité internationale (UI) correspondant au nombre de micromoles de glucose libérées par minute dans les conditions expérimentales.

2.2. Dosage de l'activité pNPasique

L'activité d'hydrolyse enzymatique du pNP α -D-glucopyranoside est déterminée dans un volume réactionnel de 100 μ l composé de 25 μ l d'enzyme, 50 μ l de tampon et 25 μ l de substrat. Le mélange est incubé à 37°C

pendant 5 minutes. La réaction est arrêtée par ajout de 200 μ l de carbonate de sodium à 1 M. Un prélèvement de 100 μ l de milieu réactionnel est mis dans un puits d'une plaque de lecture. La densité optique est déterminée à 405 nm par le lecteur de plaque (Versamax). Un étalon est réalisé avec une solution de pNP à 1 mM. L'activité (UI) est exprimée en micromoles de pNP libérées par minute dans les conditions expérimentales.

2.3. Dosage des sucres réducteurs au DNS

L'activité enzymatique est déterminée selon la méthode de Miller (1959) dans un volume réactionnel de 100 μ l composé de 25 μ l d'enzyme, 50 μ l de tampon et 25 μ l de substrat. L'incubation est faite à 37°C pendant 5 minutes. La réaction est arrêtée par ajout de 100 μ l de DNS. Le mélange est chauffé au bain marie à 95°C pendant 5 minutes. Après refroidissement dans un bain de glace, un prélèvement de 100 μ l de milieu réactionnel est mis dans un puits d'une plaque de lecture. La densité optique est déterminée à 540 nm par le lecteur de plaque (Versamax). Un étalon est réalisé avec une solution de glucose à 1 mg/ml. L'activité (UI) est exprimée en micromoles d'équivalent glucose libérés par minute dans les conditions expérimentales. (Dans le calcul d'activité, la DO est divisée par deux pour tenir compte du fait que deux molécules de sucres réducteurs sont libérées par molécule de saccharose hydrolysée).

Tableau 3: Composition du réactif de dosage au DNS

Acide 3-5 dinitrosalicylique	10 g/l
Tartrate double de sodium et potassium	300 g/l
NaOH	16 g/l

3. Le dosage des protéines

Les protéines sont dosées par la méthode de Bradford (micro-bradford plus précisément) (Bradford, 1976). Le test de micro-Bradford consiste à ajouter 0,2 ml de réactif de Bradford à 0,8 ml d'échantillon. Le mélange est homogénéisé (sans faire de mousse) et laissé au repos pendant au moins 15 min à la température ambiante. L'absorbance à 595 nm est déterminée. Une solution d'albumine de sérum bovin (BSA) à 0,2 mg/ml sert à réaliser la gamme étalon. La teneur en protéines est également dosée par la mesure en continu de l'absorbance à 280 nm pendant les chromatographies sur la chaîne FPLC (Akta Pharmacia).

4. La purification de l'enzyme

4.1. Les chromatographies

4.1.1. L'équipement

Les chromatographies sont réalisées sur une chaîne FPLC (Akta Pharmacia) composée de deux pompes isocratiques, un mixeur de gradient, un détecteur UV et un collecteur de fractions. L'acquisition et le traitement des données se font par le logiciel UNICORN 3.

4.1.2. Colonne de Q Sepharose

Le gel Q Sepharose est coulé dans une colonne XK 16 de Pharmacia (1,6 x 8 cm) et équilibré par plusieurs lavages avec le tampon citrate-phosphate 20 mM (pH 5,0). Un échantillon d'extrait brut (0,75 ml) dilué de moitié dans le tampon citrate-phosphate 20 mM (pH 5,0) est ensuite déposé sur la colonne.

Les protéines non retenues sont éluées avec le tampon de lavage puis un gradient par paliers de NaCl dans le tampon citrate-phosphate 20 mM (pH 5,0) est appliqué comme suit :

- Palier 1 : élution à 4 % NaCl 1 M jusqu'au retour de la ligne de base à zéro
- Palier 2 : élution à 100 % NaCl 1 M jusqu'au retour de la ligne de base à zéro.

Le débit est de 2 ml/min et des fractions de 4 ml sont collectées.

4.1.3. Colonne de Concanavoline-A-Sepharose 4B

Les fractions actives obtenues après la chromatographie sur Q Sepharose sont concentrées à 2 ml par ultrafiltration (§ 5) et dessalées sur une colonne PD-10 de Pharmacia (selon les indications du fabricant). L'échantillon de protéines concentré est déposé sur une colonne de Concanavoline-A-Sepharose 4B (1,6 x 3 cm) équilibrée avec le tampon citrate-phosphate 20 mM, pH 5,5 contenant du NaCl 0,5 M ou sans NaCl. Le débit est de 1 ml/min et des fractions de 2 ml sont collectées. Les protéines non fixées sont éluées lors du lavage. Les protéines fixées sont éluées soit par un gradient (0 à 1 M) de NaCl seul, soit par un gradient de méthyl α -D-mannopyranoside (0 à 0,25 M) seul, soit enfin par un gradient mixte de méthyl α -D-mannopyranoside (0 à 0,25 M) et de NaCl (0,5 M) dans le tampon citrate-phosphate 20 mM, pH 5,5.

4.1.4. Colonne Hi-Trap FF (5ml)

Les fractions actives issues de la chromatographie sur Q Sepharose ou de la Concanavoline A Sepharose sont concentrées par ultrafiltration (item 5) puis dessalées sur une colonne PD-10 de Pharmacia (selon les indications du fabricant). L'échantillon dessalé est déposé sur la colonne Hi-Trap fast flow (Pharmacia). La colonne d'un volume de 5 ml est prête à l'emploi et sa

matrice comporte les mêmes groupements fonctionnels que le gel Q Sepharose mais elle donne une meilleure résolution. Elle est équilibrée avec le tampon citrate-phosphate 20 mM, pH 5,5. Le débit est de 1 ml/min et des fractions de 2 ml sont collectées. Les protéines fixées sont éluées par un gradient en NaCl de 0 à 2% en 2 min puis de 2 à 5% de NaCl en 50 minutes et enfin un palier à 100% NaCl 1 M jusqu'au retour de la ligne de base à zéro.

4.1.5. Colonne Superose 12

Les fractions actives sont concentrées par ultrafiltration (item 5) puis déposées sur une colonne Superose 12 (Pharmacia) équilibrée avec le tampon citrate-phosphate 0,1 M pH 5,0 contenant 0,15 M NaCl. Le débit est de 0,25 ou de 0.5 ml/min et des fractions de 0,5 ou 1 ml sont collectées.

4.2. Electrophorèse préparative

4.2.1. Préparation du gel et migration

Les fractions actives de trois cycles de chromatographies sur Q Sepharose (3 x 20 ml) sont concentrées à 0,3 ml par ultrafiltration (item 5). L'électrophorèse préparative en gel de polyacrylamide est réalisée dans les conditions natives selon la méthode des gradients discontinus de Laemmli (1970). Le gel de résolution est à 10 % (m/v) pH 8,0 et le gel de concentration à 4% (m/v) en acrylamide. Les gels d'une épaisseur de 1,5 mm sont coulés dans les plaques sans mettre de peigne au-dessus de manière à obtenir un seul grand puits haut de 10 mm environ sur toute la largeur du gel pour y déposer l'échantillon (environ 11 mg de protéine). La migration se fait à 150 volts pendant 4 heures sur la mini-cuve « Mighty small II SE 250/SE260 » (Hoefel Scientific) refroidie par une circulation d'eau à 4°C.

Tableau 4: Composition des gels et du tampon de migration

<i>Gel de concentration</i>	
Acrylamide/bis-acrylamide (37,5 :1)	4%
Tris/HCl pH 6,8	125 mM
TEMED	0,15 % (m/v)
Persulfate d'ammonium	0,1 % (m/v)
<i>Gel de séparation</i>	
Acrylamide/bis-acrylamide (37,5 :1)	10 %
Tris/HCl pH 8,8	375 mM
TEMED	0,08 % (m/v)
Persulfate d'ammonium	0,1 % (m/v)
<i>Tampon de migration 10 X</i>	
Tris base	30,2 g/l
Glycine	144 g/l

4.2.2. Localisation de l'enzyme dans le gel de polyacrylamide

Au terme de la migration, le gel entier est rincé deux fois à l'eau distillée, puis il est lavé trois fois (10 minutes par lavage) dans du tampon citrate-phosphate 20 mM pH 5,5 avec agitation basculante douce et changement du tampon à chaque fois. Le gel est ensuite incubé dans une solution de pNP α -D-glucopyranoside (10 mM dans le tampon citrate-phosphate 20 mM pH 5.5) jusqu'à observation d'une bande de couleur jaune (environ 3 à 5 minutes).

4.2.3. Extraction de l'enzyme

La bande de gel de polyacrylamide colorée en jaune est découpée (ne pas déborder) puis réduite en pâte fine. Le broyat est mis en suspension et homogénéisé dans 10 ml de tampon citrate-phosphate 20 mM pH 5,5. La suspension est ensuite centrifugée à 20 000g pendant 20 minutes à 4°C. Le surnageant est récupéré et filtré (sartorius 0,2 μ m). Le pNP est éliminé par

deux ou trois cycles de concentration à 0,3 ml par ultrafiltration intercalés avec des reprises dans 5 ml de tampon. Un contrôle du pNP résiduel est réalisé par le carbonate de sodium 1M avec pour référence une solution tampon citrate-phosphate (100 µl d'extrait ou de tampon et 200 µl de réactif).

5. L'ultrafiltration

Les échantillons de protéines sont concentrés dans des tubes Amicon Ultra-4 (Millipore) dont les filtres ont un seuil de coupure de 100 kDa, à 7500 g dans une centrifugeuse (Beckman) réfrigérée à 4°C.

6. L'électrophorèse analytique

6.1. Préparation des gels et migration

L'électrophorèse analytique en gel de polyacrylamide dans les conditions natives (PAGE) et dénaturantes (SDS-PAGE) est réalisée selon la méthode de Laemmli (1970). En conditions natives, le gel de résolution à 8 % (m/v) et le gel de concentration à 4% en acrylamide sont utilisés. La migration est faite à 150 volts sur la mini-cuve « Mighty small II SE 250/SE260 » de Hoefer refroidie par circulation d'eau à 0-4°C. Le kit des marqueurs de taille (Pharmacia) est composé de la thyroglobuline (669), la ferritine (440 kDa), la catalase (232 kDa), la lactate aldolase (140 kDa) et l'albumine (67 kDa).

En conditions dénaturantes, le système « NOVEX mini-cell » de Invitrogen est utilisé avec les gels précoulés (BIS-TRIS, Invitrogen) à 10% en acrylamide. Les kits (Invitrogen) de solutions de dénaturation des protéines, du tampon de migration et des marqueurs de masses moléculaires (25 à 200 kDa) sont utilisés.

6.2. Les colorations après l'électrophorèse

6.2.1. Les protéines

Les gels de polyacrylamide sont colorés pendant 3 heures dans une solution au bleu de Coomassie R-250 (0,2 % m/v ; méthanol ; acide acétique glacial; eau). La décoloration des gels est ensuite réalisée par diffusion en immergeant les gels dans une solution de méthanol-acide acétique-eau dont la composition est indiquée ci-dessous (tableau 5).

Tableau 5: Solutions de coloration et de décoloration des protéines

Solution de coloration	
Bleu de coomassie R-250	0,25 g
Méthanol	30 ml
Acide acétique	10 ml
Eau milli Q	QSP 100 ml
Solution de décoloration	
Méthanol	30 ml
Acide acétique	10 ml
Eau milli Q	QSP 100 ml

6.2.2. L'activité enzymatique

L'activité enzymatique est révélée in situ dans le gel (PAGE) par la coloration au 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) (Rehm et coll., 1998), ou par l'hydrolyse du pNP α -D-glucopyranoside. Les morceaux de gel (1 cm de large) coupés à cet effet sur les bords du gel sont rincés deux fois avec de l'eau distillée, puis lavés trois fois (10 minutes par lavage) dans du tampon citrate-phosphate 20 mM pH 5,5 avec agitation douce et changement du tampon à chaque fois. Les bandes de gel sont ensuite incubées :

- soit dans une solution à 10 mM de pNP α -D-glucopyranoside jusqu'à observation de la couleur jaune (environ 3 à 5 minutes),
- soit dans une solution de saccharose 0,5 M dans le même tampon à 37°C pendant 30 minutes. Le gel incubé dans le saccharose est ensuite rincé trois fois à l'eau distillée puis plongé dans une solution de TTC à 0,5% (m/v) dans le NaOH 0,5 M et porté au bain-marie à 95°C. Dès l'apparition (1 à 3 min) de bandes rouges de formazan (chromophore formé par le glucose libéré dans le gel en se combinant au TTC), la solution de TTC est éliminée et la coloration est arrêtée par l'acide acétique à 5% (v/v).

7. Poids moléculaire en gel filtration

Le poids moléculaire apparent de l'enzyme a été déterminé par filtration à travers une colonne de Superdex 200 HR 10/30 (Pharmacia) équilibrée avec le tampon citrate phosphate 0,1 M pH 5,0 contenant 0,15 M de NaCl. Les protéines sont repérées dans les éluats (V_e) par leur absorption à 280 nm. L'étalonnage de la colonne est réalisé avec des protéines étalons. La masse moléculaire de l'enzyme est estimée en comparant son temps de rétention à celui des protéines du kit des marqueurs de taille (Pharmacia) composé de la thyroglobuline (669 kDa), la ferritine (440 kDa), la catalase (232 kDa), la lactate aldolase (140 kDa) et l'albumine (67 kDa).

8. La teneur en sucres neutres

La teneur en sucres neutres de l'enzyme est déterminée par la méthode au phénol-sulfurique (Dubois et coll., 1956). Le dosage est réalisé directement sur l'enzyme sans hydrolyse préalable et permet d'estimer la quantité totale de sucres neutres. Sous l'action de l'acide sulfurique concentré à chaud, les sucres se dégradent pour donner des dérivés du furfural. Condensés avec le

phénol, ils donnent naissance à des chromophores dont l'absorbance est mesurée à 480 nm. Un échantillon d'enzyme contenant 50 µg d'enzyme (dosage au Bradford) est ajusté à 0,2 ml avec le tampon. Le phénol (0,2 ml à 5% (m/v)) puis l'acide sulfurique concentré (1 ml) sont successivement ajoutés. Le mélange est homogénéisé pendant 5 minutes au bain marie à 95°C puis laissé à température ambiante dans l'obscurité jusqu'à refroidissement. L'absorbance est lue à 480 nm. La courbe d'étalonnage est établie avec une solution de glucose à 1 mg/ml.

9. La détermination de la séquence N-terminale

9.1. Le transfert de l'enzyme (western-blot)

Après l'électrophorèse en SDS-PAGE, l'enzyme purifiée est transférée sur une membrane Immobilon-PSQ (Millipore). La membrane est au préalable trempée dans du méthanol 100% (15 secondes). Elle est ensuite rincée trois fois avec de l'eau milli Q (1 à 2 minutes) puis équilibrée dans le tampon de transfert (Tris-base 50 mM, Acide borique 50 mM, méthanol 20% (v/v), SDS 0,01% (m/v)) où elle reste jusqu'à son utilisation. Le gel d'électrophorèse est également équilibré pendant 10 min dans le tampon de transfert.

Le gel est ensuite placé en sandwich dans un module (Xcell II blot module, Invitrogen) selon les indications du fabricant de telle sorte qu'il soit en contact avec la membrane. Le module contenant le sandwich est rempli du tampon de transfert tandis le reste de la cuve est rempli à l'eau distillée. Le transfert se fait à 30 volts pendant 1 heure.

9.2. La coloration et le séchage

La membrane est rincée trois fois à l'eau Milli Q et colorée pendant 15 secondes dans une solution d'Amido black (colorant : 0,1% (m/v), acide acétique 1% (v/v) et méthanol 40% (v/v)). La décoloration se fait par rinçage à l'eau milli Q jusqu'à l'absence de la couleur bleue dans l'eau de décoloration. La membrane est séchée à température ambiante puis la bande colorée contenant l'enzyme est découpée et envoyée à l'Institut Pasteur de Paris pour le séquençage. La séquence N-terminale est déterminée selon la méthode de dégradation d'Edman par un séquenceur de protéines ABI 473A (Applied Biosystem, Foster city, CA, USA).

10. Activité hydrolasique et stabilité en fonction du pH

L'influence du pH sur l'activité hydrolasique du saccharose est étudiée dans la gamme de pH 3 à 7 du tampon citrate-phosphate 0,1 M. Aux différents pH, 25 µl d'enzyme, 50 µl de tampon et 25 µl de saccharose 0,1 M dans le tampon correspondant sont incubés. L'incubation se fait à 37°C et l'activité enzymatique est déterminée dans les conditions habituelles de dosage du glucose sur 50 µl de milieu réactionnel. La stabilité de l'enzyme est déterminée aux différents pH après une pré-incubation à 4°C pendant 24 heures. Un aliquote est dilué au ¼ dans le tampon citrate-phosphate 0,2 M pH 5,5 puis l'activité résiduelle est déterminée à pH 5,5 dans les conditions habituelles.

11. Activité hydrolasique et stabilité en fonction de la température

La température optimale d'activité est déterminée par l'étude de l'activité hydrolasique du saccharose sur une gamme de température de 25 à 60 °C. Le

milieu réactionnel composé de 25 µl d'enzyme, 50 µl de tampon citrate-phosphate 20 mM, pH 5,5 et 25 µl de saccharose 0,1 M (à pH 5.5) est incubé à chaque température. L'activité est déterminée dans les conditions habituelles avec le kit de dosage du glucose. La thermostabilité de l'enzyme est étudiée en pré-incubant l'enzyme à 45, 35 et 30°C. Des aliquotes sont prélevés par intervalles de temps, rapidement refroidis dans un bain de glace puis l'activité résiduelle de l'enzyme pré-incubée est déterminée à 37°C dans les conditions habituelles et exprimée en pourcentage de l'activité de l'enzyme non chauffée.

12. Action des effecteurs

12.1 Influence des ions sur l'activité hydrolasique

L'enzyme est incubée en présence d'une concentration de 5 mM d'ions (Ca^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Hg^+ , K^+ , Mg^{2+} ou Mn^{2+}) sous forme de chlorures en solution dans le tampon citrate-phosphate 20 mM (pH ajusté à 5,5 si nécessaire). L'incubation se fait à 37°C pendant 5 minutes. L'activité invertasique résiduelle est déterminée et exprimée en pourcentage de l'activité enzymatique dans un milieu réactionnel sans ion.

12.2. Influence de l'EDTA, du Tris et du SDS sur l'activité hydrolasique

Dans un volume réactionnel de 100 µl, l'enzyme (25 µl) est ajoutée à 50 µl de tampon contenant l'EDTA, le SDS ou le Tris et 25 µl de saccharose (0.1 M) dans le tampon citrate-phosphate 20 mM pH 5,5 pour avoir la concentration en effecteur de 0 à 150 mM. Le mélange est incubé 5 minutes à 37°C. L'activité est déterminée en dosant la quantité de sucres réducteurs libérés au DNS.

13. Spécificité de l'activité hydrolasique

L'activité hydrolasique de l'enzyme est testée sur des substrats repartis dans les trois groupes de produits que sont les glycosides, les oligosaccharides et les polysaccharides. Les substrats sont testés dans le tampon citrate-phosphate 20 mM pH 5,5 à des concentrations de 5 mM, 50 mM ou 1% (m/v). L'activité est déterminée par le dosage du pNP (ou oNP) libéré pour les substrats synthétiques et par le dosage du glucose (méthode enzymatique) ou des sucres réducteurs (DNS) pour les autres cas. L'activité sur le raffinose* est dosée par le kit enzymatique de dosage du glucose et au DNS (tableau 6).

Tableau 6: Les substrats testés pour la spécificité d'hydrolyse de l'enzyme

Substrat
pNP α -D-Glc (5 mM)
pNP β -D-Glc (5 mM)
Méthyle α -D-Glc (50 mM)
Méthyle β -D-Glc (50 mM)
oNP β -D-Gal (5 mM)
Cellobiose (50 mM)
Lactose (50 mM)
Leucrose (50 mM)
Maltose (50 mM)
Saccharose (50 mM)
Trehalose (50 mM)
*Raffinose (50 mM)
Amylose (1% m/v)
Inuline (1% m/v)
Cellulose (1% m/v)

14. Activité hydrolasique en fonction de la concentration en substrat

L'activité hydrolasique est étudiée à cet effet sur une gamme de concentration de 0 à 15 mM en maltose, pNP α -D-glucopyranoside et saccharose puis de 0 à

1,5 M en saccharose uniquement. Les vitesses initiales sont déterminées dans les conditions habituelles avec le kit de dosage enzymatique du glucose.

15. Paramètres cinétiques (Km, Vm et Ks)

L'activité hydrolasique est déterminée en mesurant la quantité de glucose libéré pour des concentrations en saccharose de 0,005 à 1,5 M. Les paramètres cinétiques (Km et Vm) sont déterminés graphiquement par la représentation de Lineweaver-Burk (1934). La constante Ks est également déterminée graphiquement par l'extrapolation de la courbe $1/v = f([\text{Sac}])$. Les valeurs théoriques de l'activité dans le cas d'une inhibition par excès de substrat sont calculées à partir des vitesses initiales observées en appliquant la transformation de l'équation de Michaelis-Menten :

$$v = \frac{V_m \cdot S}{S + K_m + \frac{S^2}{K_s}}$$

16. Inhibition par les produits de la réaction

Les produits de l'hydrolyse enzymatique du saccharose sont le glucose et le fructose. Le type d'inhibition de ces composés sur l'hydrolyse du pNP α -D-glucopyranoside et ou celle du saccharose est déterminé. Le glucose ou le fructose (0, 10, 100 mM) sont ajoutés au milieu réactionnel contenant le pNP α -D-glucopyranoside (0,2 à 1 mM) ou le saccharose (1-15 mM) et l'activité résiduelle est déterminée.

17. L'activité de transglucosylation

17.1. Influence du pH sur l'activité transférasique

L'activité transférasique est étudiée dans la gamme de pH 3 à 7 avec le tampon citrate-phosphate 0,1 M. Le volume réactionnel est de 1 ml. Aux différents pH, l'enzyme (0,5 UI/ml) est incubée avec le saccharose (1 M) dans le tampon citrate-phosphate 0,1 M pH 5,5. L'incubation se fait à 35°C pendant 6 heures sous agitation. Un prélèvement (100 µl) du milieu réactionnel est chauffé au bain marie à 95°C pendant 3 minutes, dilué au 1/100^e dans l'eau milli Q, filtré (membrane 0,45 µm) et analysé par HPLC.

17.2. Influence de la concentration en substrat sur l'activité transférasique

L'influence de la concentration en substrat sur la réaction de transfert de glucosyles est étudiée en incubant l'enzyme (1 UI/ml) avec des concentrations en saccharose de 0,075 à 1,5 M pendant 12 heures à 35°C dans le tampon citrate-phosphate 0,1 M pH 5,5 et sous agitation. Un prélèvement (100 µl) du milieu réactionnel est chauffé au bain marie à 95°C pendant 3 minutes, dilué au 1/100^e dans l'eau milli Q, filtré (filtre 0,45 µm) et analysé par HPLC.

17.3. Cinétique de la réaction de transglucosylation

Le milieu réactionnel constitué de substrat (saccharose 1,5 M), de tampon citrate-phosphate 0,1 M et d'enzyme (1 UI/ml) est incubé à 35°C sous agitation. A des intervalles de temps définis, un prélèvement (100 µl) du milieu réactionnel est chauffé au bain marie à 95°C pendant 3 minutes, dilué au 1/100^e dans l'eau milli Q, filtré (membrane 0,45 µm) et analysé par HPLC.

17.4. Synthèse des oligosaccharides à partir du saccharose

Le milieu réactionnel de 50 ml est composé de saccharose (1,5 M) et d'enzyme (1 UI/ml) à pH 5,5 dans le tampon citrate-phosphate 0,1 M. L'incubation se fait à 35°C et le mélange est agité en continu pendant 72 heures. La réaction est arrêtée par chauffage du milieu réactionnel au bain marie à 95°C pendant 10 minutes. Un échantillon (10 µl) est prélevé, dilué (1/100 et 1/20000) et filtré avant l'analyse des produits.

18. Analyse des produits de la transglucosylation

Plusieurs techniques analytiques de sensibilités différentes ont été utilisées selon le niveau de séparation souhaité et les observations à faire afin de réduire les temps d'analyse et les dilutions successives nécessaires au dosage de tous les composés présents dans les milieux réactionnels. Les colonnes Potassium et C₁₈ sont utilisées pour suivre l'évolution des réactions par l'observation des produits et le changement des profils chromatographiques. La chromatographie liquide d'échange d'ions à haute performance est utilisée pour identifier les composés (monosaccharides, oligosaccharides, polysaccharides).

18.1. Analyses qualitatives par HPLC

Les produits de la réaction de transglucosylation sont analysés sur un chromatographe Hewlett Packard série 1050 composé d'un système de dégazage en ligne, d'une pompe, d'un passeur automatique d'échantillons, d'un four à colonne et d'un réfractomètre. Selon l'analyse à réaliser, une colonne Potassium (oses simples et disaccharides) ou C₁₈ (polymères) est branchée à l'HPLC. Pour la colonne C₁₈ (4 x 250 mm, Ultrasep, Bischoff

Chromatography) la température d'analyse est fixée à 30°C, le débit à 0,5 ml/min et l'éluant est de l'eau Milli Q. Pour la colonne Potassium (300 x 7,8 mm, Aminex HPX-87K column, Phenomenex) l'analyse est faite à 85°C, le débit est de 0,5 ml/min et l'éluant est l'eau milli Q. Les échantillons de 10 µl ayant une concentration en sucre initiale ≤ 5 g/l sont injectés. L'acquisition et le traitement des données se font par le logiciel « Chroméléon ». Des solutions de saccharose, fructose, glucose en gamme de concentrations de 1 à 5 g/l sont utilisées comme étalon.

18.2. Identification des produits

La séparation et l'identification des mono, di et oligosaccharides synthétisés sont réalisés par HPAEC-PAD, sur un système Dionex DX-500 (Dionex, Sunnyvale, CA) composé d'une pompe à gradient GP-50, un détecteur électrochimique ED-40, une colonne CarboPac PA100 (4 x 25 mm, Dionex) et une précolonne du même support permettant de séparer et identifier les sucres de taille inférieure ou égale à DP 20. La phase mobile est une solution de soude à 150 mM dans l'eau milli Q à un débit de 1ml/min. Les sucres sont élués par un gradient linéaire d'acétate de sodium (6 à 600 mM) en 30 minutes dans la soude à 150 mM. La colonne est maintenue à 30°C. Des solutions de glucose, fructose, saccharose, maltose, isomaltose, nigerose, tréhalose, isomaltotriose, isomaltotetraose et des maltooligosaccharides (DP3 à 8) sont utilisées comme références. Les échantillons et les solutions de référence sont préparés dans de l'eau milli Q à une concentration inférieure ou égale à 25 mg/l. L'acquisition et le traitement des données sont faits par le logiciel « Chromeleon » (Dionex).

18.3. La purification des oligosaccharides

Les oligosaccharides synthétisés sont purifiés par chromatographie liquide sur une colonne C₁₈ préparative (120-10-C₁₈ Prontosyl Eurobond (10 µM)) à compression axiale (4 x 24 cm) connectée à une chaîne HPLC composée d'une pompe (HPLC ICS) et d'un détecteur RI (RI 8120 ICS). La purification se fait à température ambiante avec pour éluant l'eau milli Q à un débit de 25 ml/min. Le milieu réactionnel est dilué de moitié (équivalent à 250 g/l de saccharose initial) et des échantillons de 5 ml sont injectés par cycle de purification. Des fractions de 25 ml sont collectées et leur composition est déterminée par chromatographie sur colonne C₁₈ analytique. Les fractions contenant des produits non purs sont concentrées au Rotavapor et reinjectées sur la colonne préparative C₁₈. Les fractions contenant les composés purs sont conservées.

18.4. Concentration et lyophilisation des oligosaccharides

Les échantillons purs sont concentrés par évaporation sous vide au rotavapor. Les fractions sont concentrées dans un ballon plongé dans un bain-marie à 95°C jusqu'à un volume final d'environ 5 à 10 ml. Elles sont ensuite congelées à -80°C. Les fractions concentrées et congelées sont lyophilisées pendant 24 heures (lyophilisateur Christ alpha 2-4, Germany). Les échantillons lyophilisés sont stockés dans un dessiccateur.

18.5. Les analyses structurales des oligosaccharides

Les analyses structurales des oligosaccharides purifiés ont été faites par hydrolyse enzymatique, spectrométrie de masse et spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).

18.5.1. L'hydrolyse enzymatique

Les échantillons des composés DP3 et DP4 (20 mM) sont soumis à l'hydrolyse enzymatique d'une invertase grade VII (3.2.1.26) (0,5 UI/ml) de levure (Sigma) dans le tampon citrate-phosphate 20 mM pH 4,5 à 45 °C pendant 1 heure. La réaction est arrêtée par chauffage à 95°C pendant 5 minutes. Un aliquote est dilué pour obtenir une concentration correspondant au plus à 25 mg/ml de saccharose initial, filtré (0,20 µm) puis analysé par chromatographie d'échange d'ions HPAEC-PAD.

18.5.2. La spectrométrie de Masse (MS)

La masse moléculaire des produits purifiés est déterminée par la méthode LSI-MS (Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry) au CESAMO (C. Absalon) de l'Université de Bordeaux I (France). Cette méthode permet l'étude de composés fragiles comme les sucres. L'équipement utilisé est un spectrophotomètre de masse Autospec de géométrie EBE (Micromas, Manchester, GB) qui fonctionne à une tension accélératrice de 8 kV en mode positif. L'échantillon (1 ml) est mélangé au bout de la sonde avec une matrice de dithiothreitol/dithioerythritol. Les ions $[M+Na^+]$ sont enregistrés.

18.5.3. La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les expériences de RMN utilisées pour l'étude structurale des oligosaccharides ont été réalisées au service commun de RMN de l'Université Paul Sabatier de Toulouse (M. Vedrenne). Nous avons réalisé d'une part, les expériences de RMN monodimensionnelles du proton (1H à 400,13 Mhz) et du carbone (^{13}C à 100,61 Mhz) et d'autre part, les expériences de RMN bidimensionnelles ($^1J_{C-H}$, $^1H/^{13}C$ à 100,61 Mhz) HSQC (heteronuclear single

quantum coherence) et ($^3J_{C-H}$, $^1H/^{13}C$ à 100,61 Mhz) HMBC (heteronuclear multiple bond correlation) qui montrent les corrélations entre des noyaux de natures différentes. Les spectres ont été obtenus sur un spectromètre Bruker-ARX 400 équipé d'un système Ultrashim. Les échantillons sont préparés à partir du lyophilisât à une concentration de 70 g.l^{-1} dans du D_2O contenant de l'acide trisilyl-propionique tetradeutééré (TSPd4, 1 mM) comme référence.

III. RESULTATS ET DISCUSSIONS

PARTIE A : PURIFICATION ET PROPRIETES PHYSICO CHIMIQUES DE L'ENZYME

I : LA PURIFICATION

L'extrait brut du suc digestif de *A. ventricosa* est riche en protéines (cf introduction) visqueux et coloré. La purification de l'activité invertasique nécessite donc l'élimination préalable des pigments et des substances visqueuses ainsi que le fractionnement des protéines. Parmi les méthodes de fractionnement utilisées à cet effet, la précipitation au sulfate d'ammonium entraîne une inactivation irréversible de l'enzyme, la filtration sur gel (Sephacryl S 300) ne sépare pas les pigments des protéines de même que les gels d'échange d'ions (DEAE-Sephadex A 25, DEAE Sephacell). Seul le gel Q Sepharose permet une fixation des protéines et leur élution sans pigment. Ce gel est donc retenu pour le schéma de purification.

1. Les chromatographies

Le fractionnement par la chromatographie d'échange d'ions sur Q Sepharose (figure 18) permet de recouvrer environ la moitié (49%) de l'activité enzymatique initiale dans le palier à 4% de NaCl 1 M. Les fractions actives collectées qui contiennent le plus d'activité (20 ml) sont claires et limpides. Une augmentation du palier de gradient à 5% de NaCl 1 M permet d'améliorer le rendement en activité enzymatique mais ce taux de NaCl élue aussi certains pigments. L'étape du fractionnement sur Q Sepharose représente donc un compromis entre la perte d'une partie de l'activité et l'élimination de nombreux pigments et protéines non actives sur le saccharose.

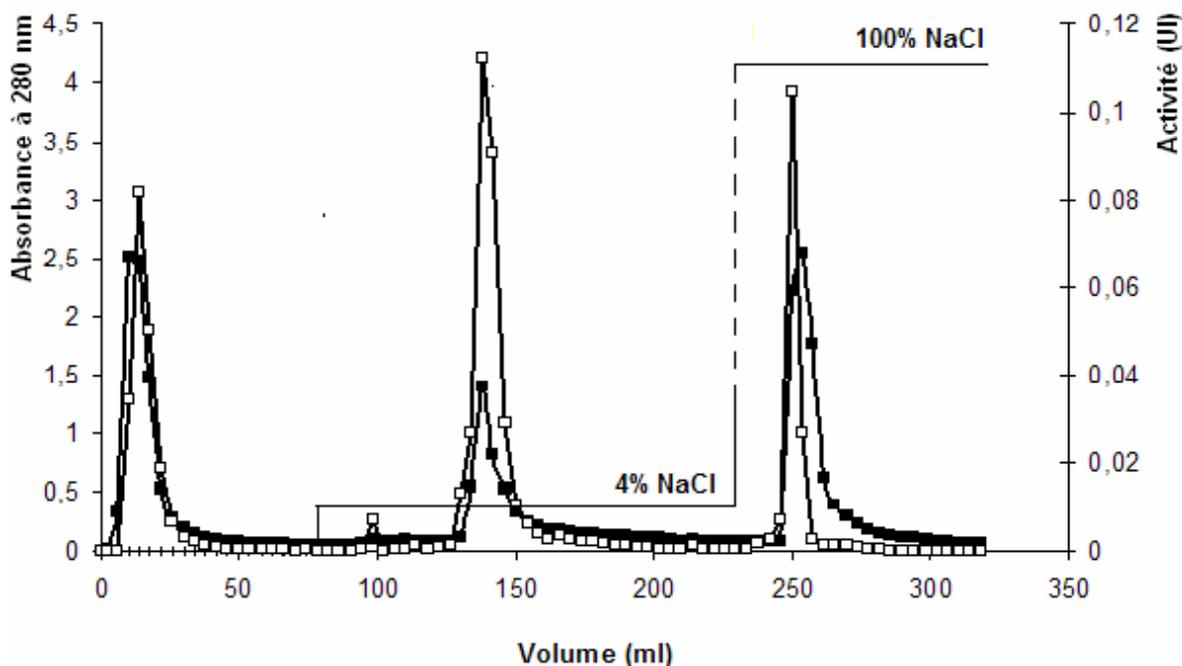


Figure 18: Chromatographie d'échange d'ions sur gel Q Sepharose (Pharmacia)

Les protéines non fixées sont éluées par le tampon de lavage. Le gradient de NaCl est ensuite appliqué par paliers à 4 % puis à 100% de NaCl 1 M. Débit 2 ml/min, Fractions de 4 ml. (■) protéine. (□) activité.

Suite au fractionnement sur Q Sepharose, la combinaison des autres supports de chromatographies envisagés pour terminer la purification est résumée ci-dessous (figure 19) :

Elle conduit aux résultats respectifs suivants:

- Superose 12 : obtention de deux pics accolés qui donnent deux bandes en PAGE
- Hi-trap et Superose 12 : obtention d'un grand pic qui donne deux bandes protéiques en PAGE
- Concanavaleine A Sepharose 4B et Superose 12 : selon les modes d'éluion adoptés on obtient soit un grand pic qui donne deux bandes en PAGE, soit deux pics accolés qui donnent deux bandes en PAGE.
- Concanavaleine A, Hi-Trap et Superose 12 : obtention de deux pics accolés qui donnent deux bandes en PAGE.

Toutes ces combinaisons ont abouti en PAGE (figure 20 A) aux deux mêmes bandes protéiques. Seules les proportions relatives des bandes de protéines

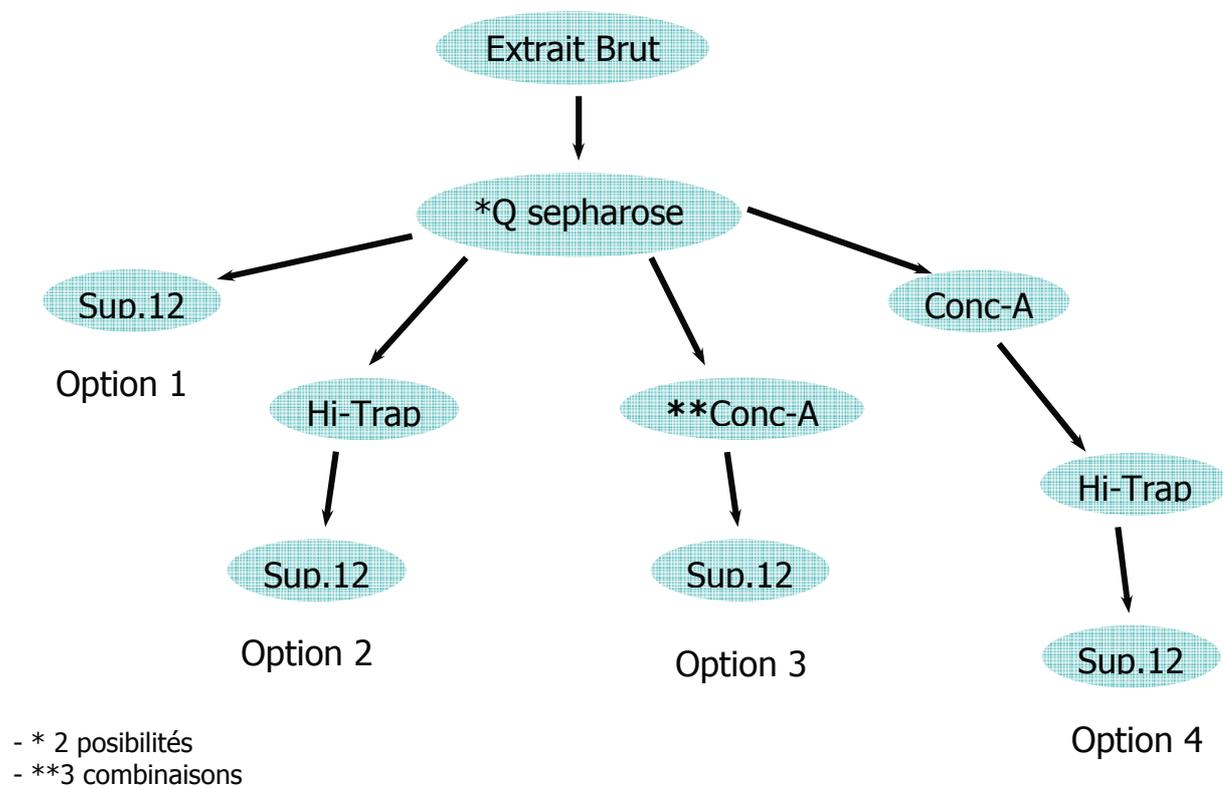


Figure 19: Schéma de la combinaison des gels de chromatographie

Sup 12 : La colonne Superose 12

Conc-A : La colonne concanavoline-A-sepharose-4B

Hi-Trap : La colonne HiTrap FF

changent. Les extraits contiennent donc deux protéines ayant des propriétés physico-chimiques très proches qui rendent difficile leur séparation par les méthodes chromatographiques utilisées. Afin de déterminer si les deux protéines sont actives sur le saccharose, l'activité hydrolasique du saccharose est révélée in situ dans le gel de PAGE par la coloration au Triphenyl Tetrazolium Chloride (TTC). La coloration est positive pour une seule des deux bandes protéiques (figure 20 B). L'électrophorèse (PAGE) permet donc de séparer l'enzyme de la protéine inconnue qui a plusieurs caractéristiques proches. L'électrophorèse est donc intégrée au protocole de purification.

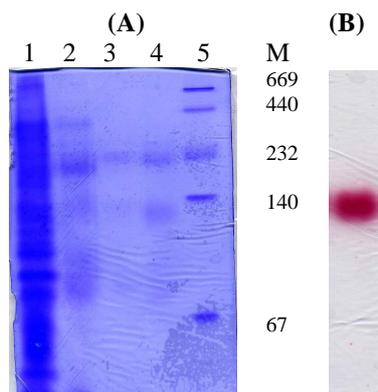


Figure 20: PAGE des extraits chromatographiques et coloration de l'activité invertasique au TTC

Gel A : Coloration des protéines au bleu de coomassie R-250. ligne 1, extrait brut ; ligne 2 , extrait sur Q Sepharose ; ligne 3, extrait après Concanavaline-A Sepharose 4-B ; ligne 4, extrait après Superose 12.
Gel B. Coloration de l'activité invertasique au TTC.

2. L'électrophorèse préparative

2.1. Migration

En électrophorèse native, la fraction active issue de la chromatographie sur Q Sepharose donne des bandes bien séparées (figure 20 A). Les fractions actives de trois cycles de chromatographie sur Q Sepharose sont concentrées par ultrafiltration à 0,3 ml et soumises à l'électrophorèse préparative (gel de 10% en acrylamide). Le taux de 10% en acrylamide permet une migration de l'enzyme en une bande fine tandis que la durée de 4 heures (au lieu de 2 heures 30 minutes maximum en PAGE analytique) augmente l'écart entre les bandes de protéines.

2.2. Coloration de l'activité

Au terme de la migration des protéines de l'extrait concentré, deux bandes de gel (1 cm de large) découpées verticalement sur les bords du gel sont colorées au TTC pour détecter l'activité enzymatique et en déduire la position de

l'enzyme. Les bandes sont repositionnées à leurs places initiales et l'enzyme est ainsi localisée dans le reste du gel (figure 21).

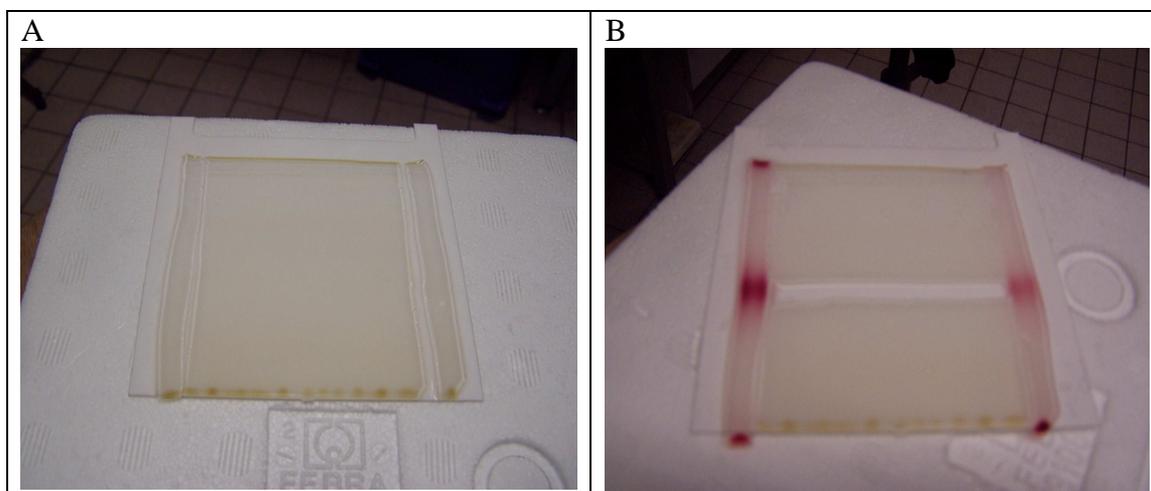


Figure 21 : Coloration au TTC (a : avant coloration; b : après coloration)

Cette méthode bien que permettant de localiser la position de l'enzyme dans le gel présente de nombreuses difficultés (perte d'enzyme dans le gel colorée au TTC, précision limitée de la localisation, nombreuses étapes, longue durée, nombreux produits utilisés etc.). En vue de faciliter et améliorer la localisation de l'enzyme dans le gel, nous avons testé le pNP α -D-glucopyranoside dont l'hydrolyse donne un chromophore jaune (le pNP) et du glucose. Nous observons que la bande protéique correspondant à l'enzyme qui hydrolyse le saccharose dans le gel (coloration au TTC) réalise aussi de façon spécifique l'hydrolyse du pNP α -D-glucopyranoside à 37°C en donnant une coloration jaune dans le gel (couleur du pNP libéré) (figure 22). La localisation de l'enzyme directement dans le gel par l'hydrolyse du pNP α -D-glucopyranoside est plus précise, plus aisée à mettre en œuvre (elle compte moins d'étapes, dure moins longtemps et nécessite peu de produits par rapport à la coloration au TTC). Cette méthode est donc retenue pour la suite de la manipulation.

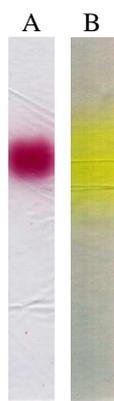


Figure 22: Coloration de l'activité enzymatique dans le gel par les deux méthodes

Bande A : coloration au TTC indiquant l'hydrolyse du saccharose

Bande B : coloration au pNP indiquant l'hydrolyse du pNP α -D-glucopyranoside

2.3. *Extraction de l'enzyme*

Après la migration et les différents lavages, l'incubation du gel d'électrophorèse préparative en présence de pNP α -D-glucopyranoside permet de localiser directement l'enzyme (figure 23 a). L'enzyme est extraite de la bande de gel colorée en jaune après les étapes de broyage, suspension, centrifugation, filtration et élimination du pNP (figures 23 b et c).

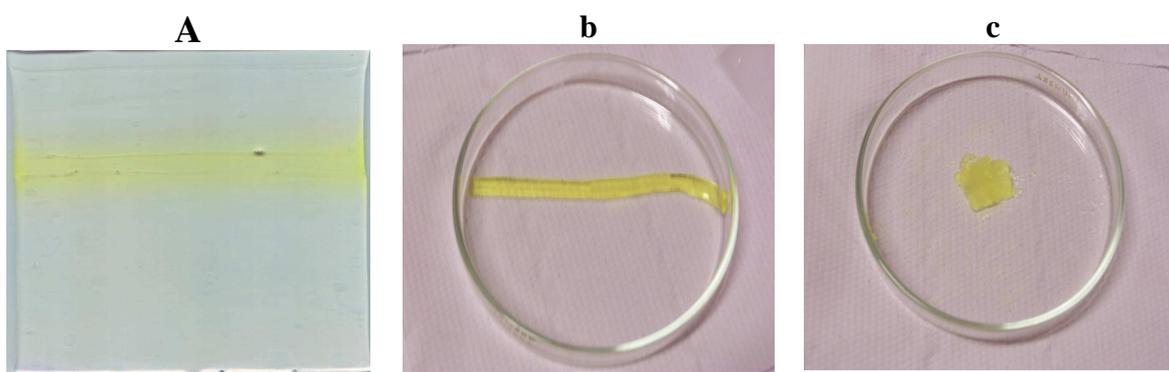


Figure 23: Extraction et broyage de la bande de gel colorée par la libération du pNP

a). Localisation de l'enzyme dans le gel par la présence du pNP libéré de l'hydrolyse du pNP α -D-glucopyranoside

b). bande de gel coupée contenant l'enzyme (couleur jaune)

c). broyat de la bande de gel contenant l'enzyme

L'extrait d'enzyme ainsi purifiée est homogène car il donne une seule bande en PAGE (figure 24 a) native et en SDS-PAGE (figure 24 b). Cet extrait contient donc une seule forme protéique. Le rendement de purification est de 6,5 % et l'activité spécifique de l'enzyme est de 19,7 UI/mg de protéines lorsque le saccharose est utilisé comme substrat. Le bilan de la purification est résumé dans le tableau 7.

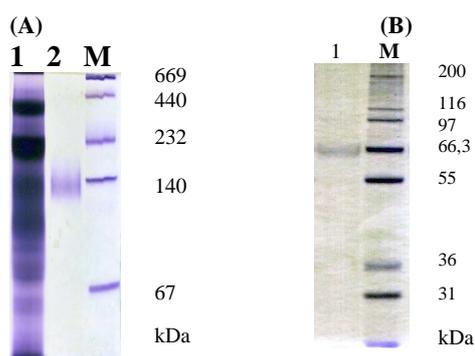


Figure 24 : Electrophorèse analytique de l'enzyme

Gel A. PAGE native : ligne 1-Enzyme native, ligne 2-Fractions actives de la chromatographie sur Q Sepharose, ligne M-marqueurs de taille en kDa

Gel B. SDS-PAGE : ligne 1-enzyme dénaturée, ligne M- marqueurs de taille en kDa

Tableau 7 : Bilan de la purification

Etape	Protéine (mg)	Activité totale (UI)	Activité spécifique (UI/mg)	Rendement (%)	Facteur de purification
Extrait brut	109,1	47,45	0,435	100	1
Q Sepharose	4,76	23,32	4,9	49,2	11,26
Electrophorèse	0,156	3,09	19,7	6,5	45,28

Les protéines sont dosées par la méthode de Bradford

L'activité spécifique est exprimée en μ moles de glucose/min/mg de protéines

II. LES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES ET MOLECULAIRES

1. Détermination de la masse moléculaire

1.1. Par gel filtration

La filtration sur gel permet une estimation rapide du poids moléculaire des protéines. Ainsi la masse moléculaire apparente de l'enzyme purifiée a été estimée par gel filtration sur une colonne Superdex 200 HR 10/30 (Amersham Biosciences Corp., NJ, USA). La colonne est équilibrée et éluée par le tampon citrate-phosphate 0,1 M pH 5,0 contenant du NaCl à 0,15 M avec un débit de 0,5 ml/min. La masse moléculaire de l'enzyme déterminée par comparaison de son temps de rétention avec les temps de rétention de protéines standards que sont la thyroglobuline (669 kDa), la ferritine (440 kDa), la catalase (232 kDa), la lactate aldolase (140 kDa) et l'albumine (67 kDa) est d'environ 138000 Da (figure 25).

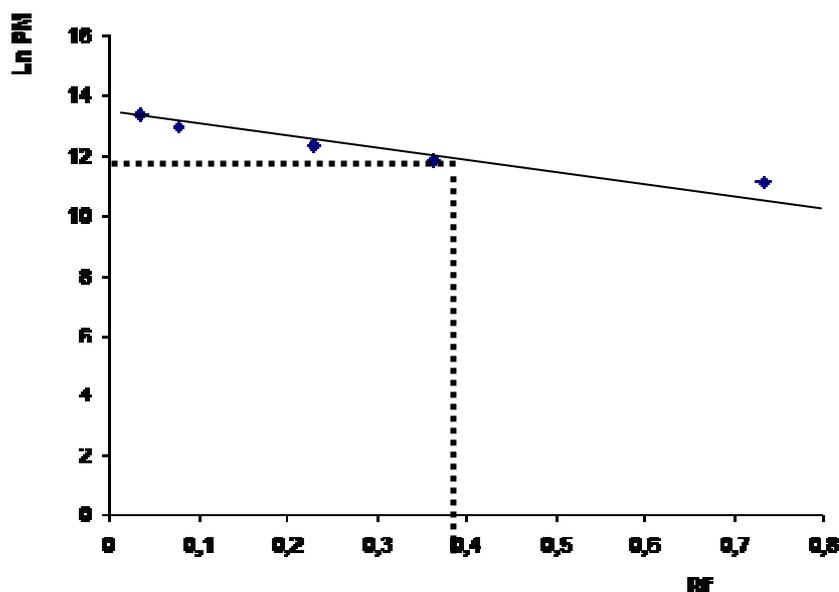


Figure 25: Détermination du poids moléculaire de l'enzyme native

1.2. Par électrophorèse

Le dodécyle sulfate de sodium (SDS) est un puissant détergent ionique largement utilisé pour dissocier les complexes protéiques solubles. Il dénature les protéines en annulant la charge propre à chacune d'elles. Les chaînes polypeptidiques éventuellement reliées par des ponts dissulfures peuvent être dissociées par l'utilisation simultanée de mercaptoéthanol ; rendues anioniques elles peuvent être alors séparées par électrophorèse, leur mobilité étant strictement fonction de leur poids moléculaire.

Pour qu'il en soit ainsi, la charge par unité de masse doit être approximativement constante et les propriétés hydrodynamiques fonction de la seule longueur de la chaîne polypeptidique. L'électrophorèse en gel de polyacrylamide de l'enzyme en présence de SDS donne une seule bande homogène. Le poids moléculaire des sous-unités déterminé selon la méthode de Webber et Osborn (1969) après SDS-PAGE est d'environ 66 kDa (figure 26).

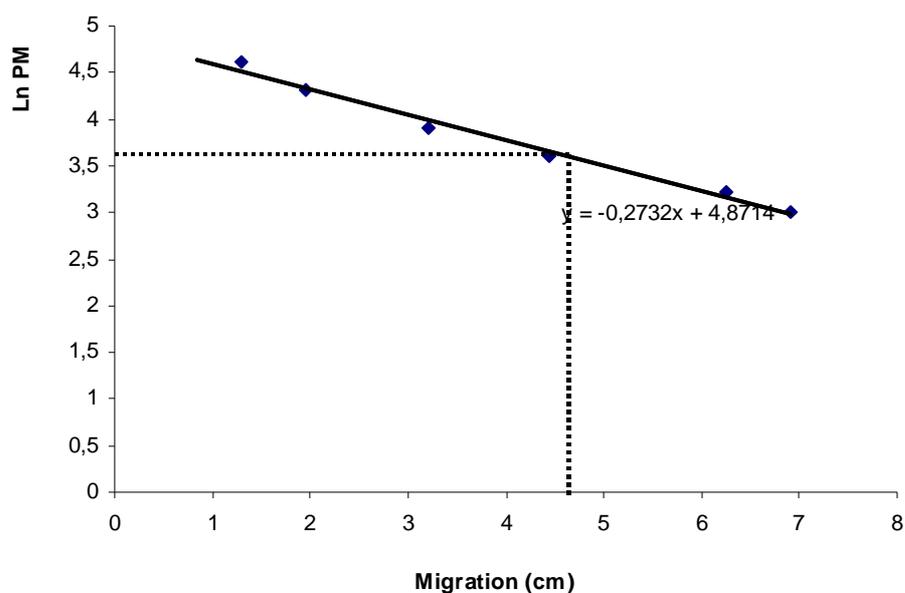
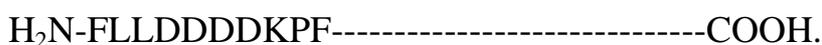


Figure 26: Détermination du poids moléculaire par SDS-PAGE

2. La séquence N-terminale

L'analyse a été faite sur des échantillons provenant de trois purifications différentes. Vue la sensibilité de la méthode utilisée, la présence des mêmes acides aminés confirme aussi la pureté de l'enzyme analysée. La séquence des dix premiers acides aminés de l'extrémité N-terminale déterminée selon la méthode des dégradations successives d'Edman est :



3. Le dosage des sucres neutres

Lors de la purification par chromatographie d'affinité, l'activité invertasique a été retenue sur la Concanavaleine-A-Sepharose 4B ce qui suppose que l'enzyme doit avoir au moins du glucose et/ou du mannose dans sa structure (Pharmacia, 2003). Le dosage des oses neutres par la méthode au phénol-sulfurique (Dubois et coll., 1956) sur une masse de 50 µg d'enzyme donne une teneur de 25% de sucres avec l'étalon glucose. L'enzyme comporte donc effectivement une fraction glucidique dans sa structure et est de ce fait une glycoprotéine.

4. Activité hydrolasique et stabilité en fonction du pH

Les réactions enzymatiques sont sensibles au pH du milieu car ce facteur influence le degré d'ionisation du substrat, du co-substrat et de la molécule enzymatique. Au niveau de la molécule enzymatique, cet effet dépend des groupements ionisables participant à la fixation du substrat, à l'acte catalytique et/ou au maintien des structures secondaire et tertiaire de la protéine; ce qui peut être favorable ou défavorable à l'activité enzymatique.

L'influence du pH sur l'activité invertasique donne une allure globale classique en forme de cloche. L'activité hydrolase est très faible à pH 3. Elle est ensuite croissante jusqu'à pH 5,5. Au-delà du pH 5,5 qui est la valeur optimale l'activité décroît (figure 27).

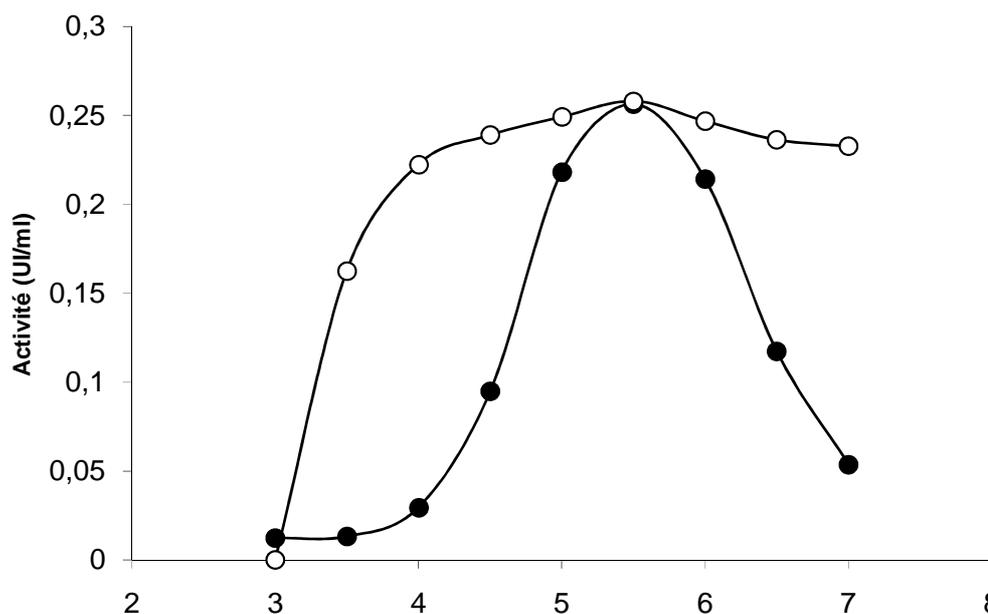


Figure 27: Activité et stabilité de l'activité invertasique en fonction du pH
 activité (●) stabilité (○)

L'étude de la stabilité en fonction du pH montre une dénaturation irréversible de l'enzyme aux pH très acides (inférieur ou égal à pH 3). L'activité résiduelle déterminée après 24 heures de préincubation aux différents pH à 4°C (figure 27), indique que l'enzyme est peu affectée pour les pH de 4,5 à pH 7 avec une activité résiduelle de 90% au moins (maximum de 100% à pH 5,5). L'enzyme reste donc plus stable aux pH neutres par rapport aux pH acides.

5. Activité invertasique et stabilité en fonction de la température

La température optimale est un compromis entre l'effet de la température sur l'activité catalytique et la stabilité de la protéine enzymatique. Dans le cas de l'enzyme purifiée, l'influence de la température est étudiée dans l'intervalle de 25°C à 60°C, dans le tampon citrate phosphate 20 mM à pH 5,5 et en présence de 25 mM de substrat. Nous observons une augmentation progressive de l'activité saccharase en fonction de la température entre 25 et 45 °C. Cette activité est optimale à 45°C (figure 28) puis baisse rapidement après 50°C et l'enzyme est totalement inactive à partir de 55°C.

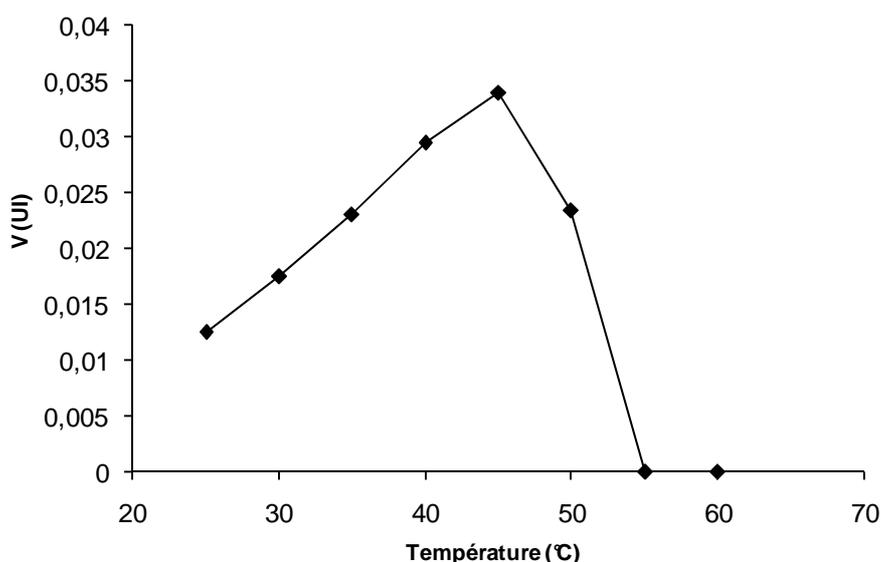


Figure 28: Activité invertasique en fonction de la température

La dénaturation des enzymes par la chaleur s'accompagne le plus souvent d'une perte d'activité qui est d'autant plus grande que la structure tertiaire de la protéine est complexe. L'étude de la dénaturation de l'enzyme est reprise pour différentes températures. Incubée à trois différentes températures (30, 35 et 45°C), l'enzyme reste stable pendant 5 heures à 30°C et elle conserve 96% de son activité après 4 heures à 35°C tandis qu'à 45°C il ne reste plus que

49% d'activité résiduelle après 40 minutes. Cependant, l'enzyme conserve encore 60% et 40 % de son activité initiale après 72 heures à 30°C et 35°C et 45°C respectivement (figure 29).

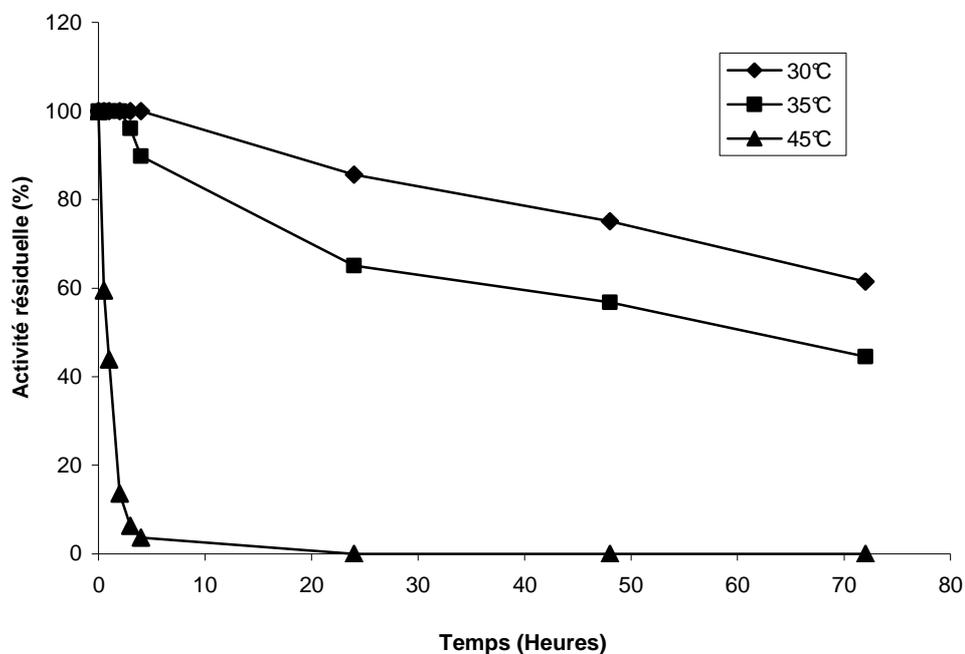


Figure 29: Stabilité thermique de l'enzyme à 30°C, 35°C, 45°C
30°C (♦), 35°C (■), 45°C (▲)

L'énergie d'activation de la réaction catalysée par l'enzyme est liée à son activité en présence de températures variables et peut se déterminer par la loi d'Arrhénius. A cet effet, nous avons représenté graphiquement (figure 30) le logarithme de l'activité relative de l'enzyme en fonction de l'inverse de la température (en K). La pente de la droite obtenue est directement liée à la valeur de l'énergie d'activation (E_a). Dans notre cas nous trouvons une énergie d'activation de $12404 \text{ cal.mol}^{-1}$.

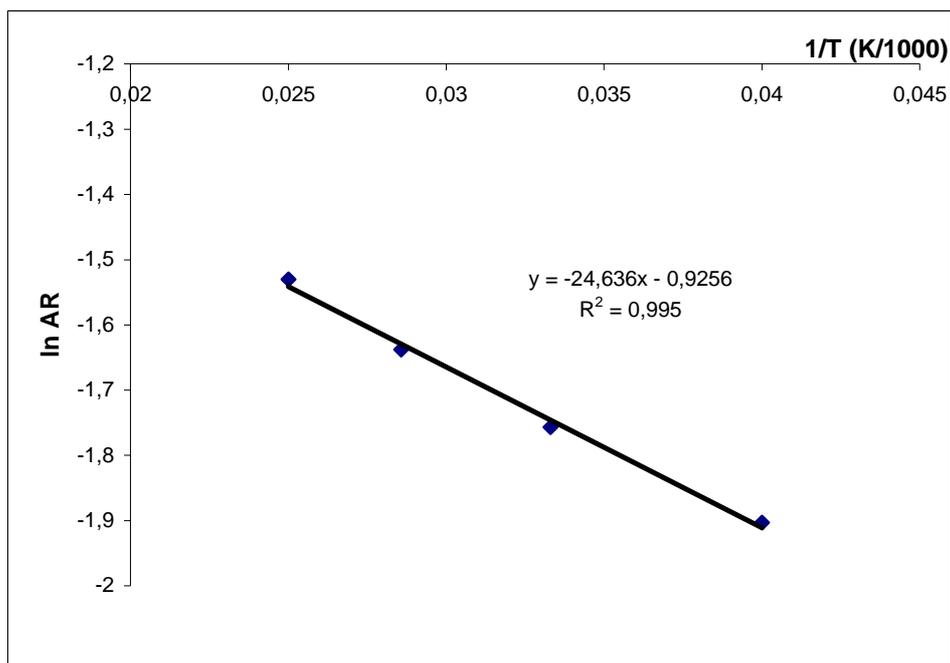


Figure 30: Détermination de l'énergie d'activation pour l'hydrolyse du saccharose

6. Action de quelques effecteurs sur l'enzyme purifiée

Les effecteurs sont des composés chimiques qui modifient plus ou moins les réactions enzymatiques. Ils peuvent jouer un rôle important dans la régulation des métabolismes et permettre d'acquérir d'importantes informations sur la structure et le mode d'action des enzymes (Kruh, 1982 ; Richard, 1984).

6.1. Influence des cations

L'étude de l'effet des ions métalliques sous forme de chlorures sur l'activité invertasique a été faite à une concentration finale de 5 mM. L'activité résiduelle en présence des différents ions est exprimée en pourcentage de l'activité sans ions (tableau 8). Nous observons que l'activité invertasique de l'enzyme est plus importante en présence des ions Mn^{2+} et Co^{2+} par rapport au contrôle sans ion. Cependant, l'activité n'est pas modifiée lorsque le milieu

contient les cations Ca^{2+} , K^+ et Mg^{2+} tandis que les autres ions (Cu^{2+} , Fe^{2+} et Hg^{2+}) exercent un effet inhibiteur. L'inhibition de l'activité enzymatique est partielle avec les ions Cu^{2+} (90% d'inhibition), les ions Fe^{2+} (70 %) et totale (100% d'inhibition) pour l'ion Hg^{2+} (Tableau 8).

Tableau 8: Activité invertasique du saccharose en fonction des ions.

Ion (5 mM)	Activité Résiduelle (%)
Sans ion	100
Co^{2+}	200
Mn^{2+}	187
Ca^{2+}	100
K^+	100
Mg^{2+}	100
Fe^{2+}	30
Cu^{2+}	10
Hg^{2+}	00

6.2. Influence de l'EDTA, du SDS et du Tris

L'action de chélation des ions bivalents par l'EDTA a été testée. Les résultats obtenus (figure 31) indiquent une baisse constante de l'activité invertasique en fonction de la concentration en EDTA. Cette baisse est de 10% environ en présence de 150 mM d'EDTA. L'effet inhibiteur de l'EDTA semble modéré mais l'allure de la courbe indique qu'il peut être plus élevé aux fortes concentrations en EDTA.

Le Tris est un inhibiteur de l'activité de nombreuses glycosidases. De 0 à 5 mM le Tris n'a pas d'effet sensible sur l'activité enzymatique. Au-delà de cette concentration en Tris, l'activité résiduelle baisse progressivement. Toutefois la baisse de l'activité résiduelle est de moins en moins importante à partir de 50 mM en Tris (figure 31).

Le SDS est un détergent ionique qui détruit les liaisons hydrogènes, hydrophobes et ioniques. Son action dénature les protéines et entraîne généralement la perte de l'activité enzymatique. A faible concentration (0,25 mM) ce détergent semble avoir un léger effet activateur sur l'enzyme. L'activité enzymatique est ensuite inhibée en présence du SDS à partir de 0,5 mM. L'activité résiduelle chute à 10% à 1 mM et l'enzyme n'est plus active à partir de 4 mM (figure 31).

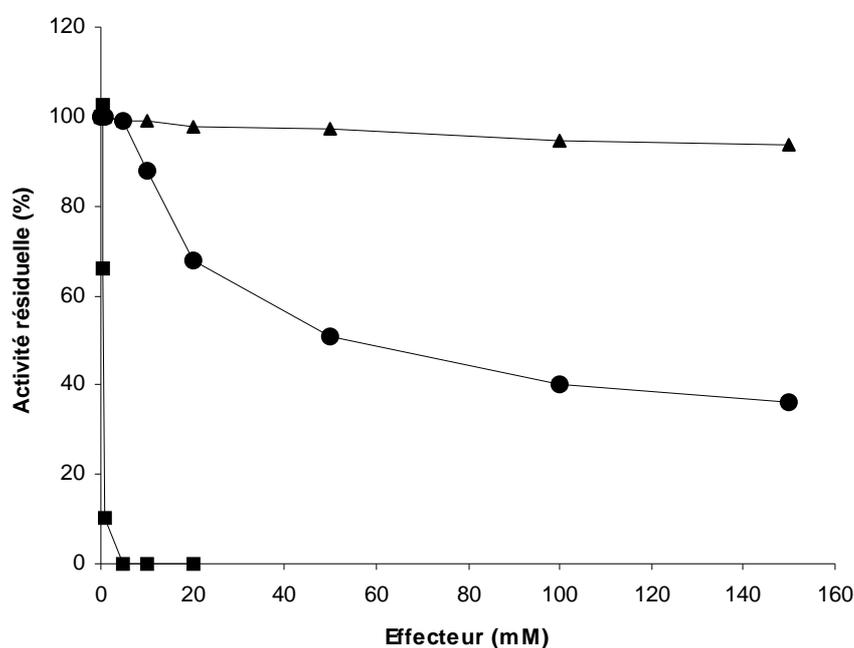


Figure 31: Influences de l'EDTA, du SDS et du Tris sur l'activité invertasique

EDTA (▲) ; SDS (■) ; Tris (●).

7. Spécificité de substrat

Une enzyme peut agir sur un substrat unique ou plusieurs substrats. Afin de déterminer le groupe auquel correspond l'enzyme purifiée, sa capacité d'hydrolyse est testée sur différents substrats en dosant selon les cas, le pNP (oNP pour oNP β -D-galactoside) libéré pour les substrats synthétiques ou le glucose libéré pour les autres. Parmi les substrats testés l'enzyme libère du

glucose à partir du saccharose et du maltose, du pNP et du glucose à partir du pNP α -D-glucopyranoside. Cependant, le maltose est moins bien hydrolysé que le saccharose et le pNP α -D-glucopyranoside. Aucune molécule de glucose ou de fructose n'est libérée des polysides (amidon, cellulose, inuline). Ils ne sont donc pas hydrolysés, de même que le cellobiose, le pNP β -D-glucopyranoside, le leucrose, le trehalose (tableau 9). Dans le cas particulier du raffinose, aucune molécule de glucose, de galactose ou de fructose n'est obtenue suite aux tests de dosage avec le kit Biomerieux ou au DNS.

Tableau 9 : Etude de la spécificité de substrat

Substrat	Activité	Activité relative (%)
pNP α -D-Glc (5 mM)	+	60
pNP β -D-Glc (5 mM)	-	-
Méthyle α -D-Glc (50 mM)	-	-
Méthyle β -D-Glc (50 mM)	-	-
ONP β -D-Gal (5 mM)	-	-
Cellobiose (50 mM)	-	-
Lactose (50 mM)	-	-
Leucrose (50 mM)	-	-
Maltose (50 mM)	+	51
Saccharose (50 mM)	+	100
Trehalose (50 mM)	-	-
*Raffinose (50 mM)	-	-
Amylose (1% m/v)	-	-
Inuline (1% m/v)	-	-
Cellulose (1% m/v)	-	-

8. Activité invertasique en fonction de la concentration en substrat

L'activité de l'enzyme est testée sur des concentrations variables des trois substrats hydrolysés (pNP α -D-glucopyranoside, maltose, saccharose) (figure 32). L'allure générale des courbes obtenues est identique pour les trois substrats. L'enzyme semble adopter un comportement Michaélien jusqu'à une

concentration en substrat pour laquelle la vitesse initiale est maximale. Au-delà de cette concentration en substrat la vitesse initiale baisse pour tous les trois substrats. Chaque substrat est mieux hydrolysé que les autres dans un intervalle de concentration donnée. Ainsi de 0 à 2 mM le maltose est le substrat le mieux hydrolysé puis le pNP α -D-glucoyranoside de 4 à 15 mM et enfin le saccharose à partir de 15 mM (figure 32).

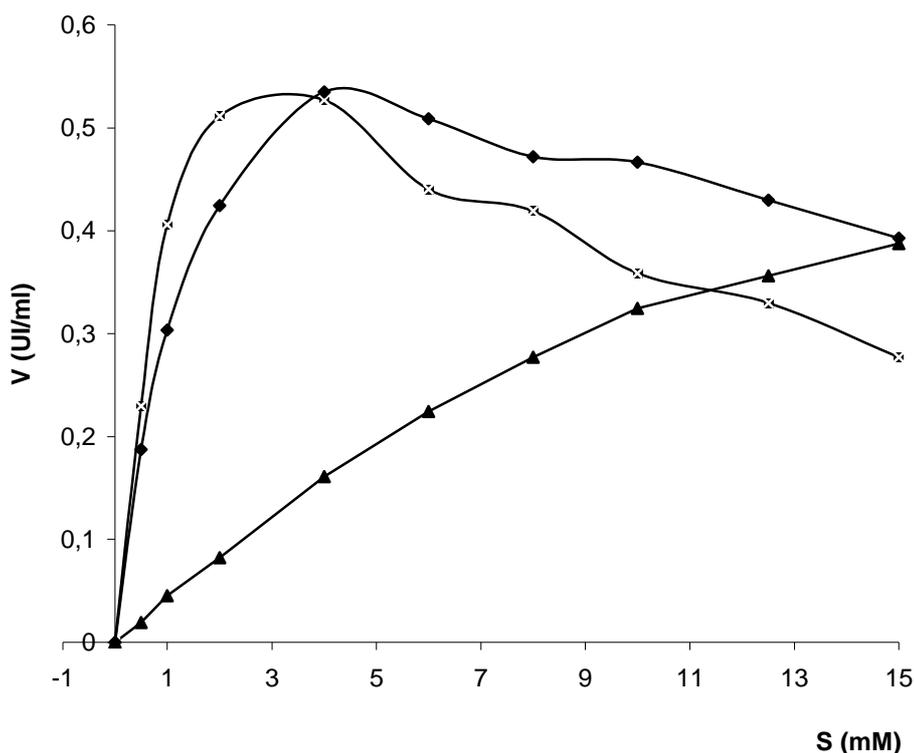


Figure 32: Activité invertasique en fonction de la concentration en substrat

Conditions : Substrat (0,00 à 15 mM), enzyme (0,5 UI/ml), tampon citrate-phosphate pH 5,5, incubation pendant 5 min à 37°C. L'activité est déterminée par le dosage enzymatique du glucose libéré. maltose (◆), saccharose (▲), pNP (x)

Dans l'intervalle de concentration de 0 à 16 mM, le saccharose donne une courbe en vitesse initiale croissante. Nous augmentons donc la concentration en saccharose jusqu'à 1,5 M pour mieux observer la cinétique de la réaction par rapport à ce substrat (figure 32). L'activité hydrolasique maximale de l'enzyme est ainsi obtenue à des concentrations différentes pour les trois

substrats (2 mM pour le maltose, 4 mM pour le pNP α -D-glucopyranoside (figure 32) et 50 mM pour le saccharose (figure 33).

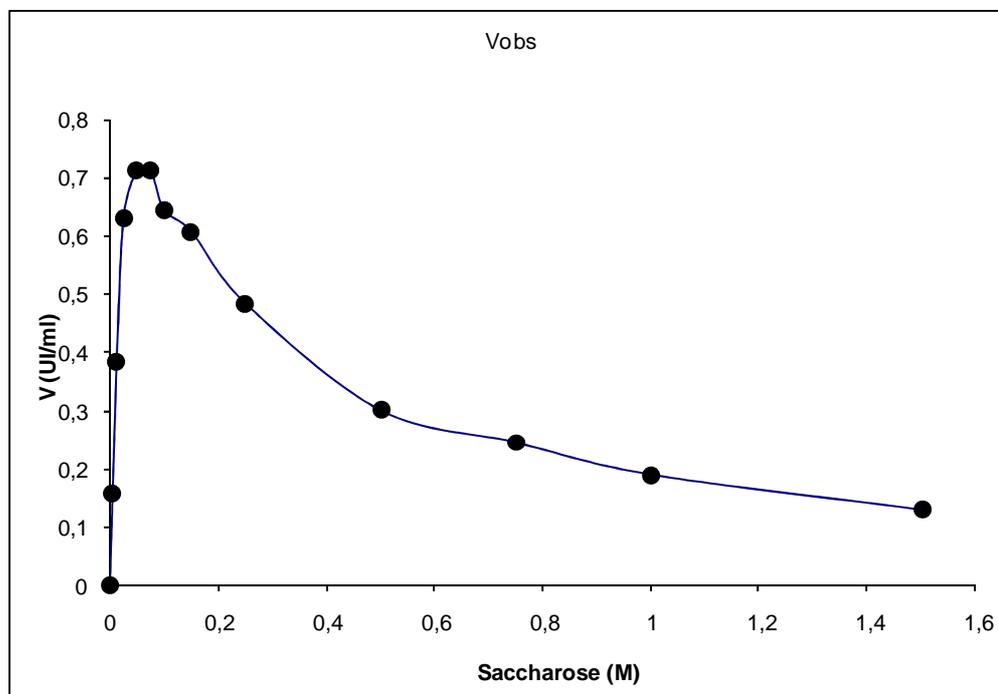


Figure 33: Activité hydrolasique en fonction de la concentration en saccharose

Conditions : Saccharose (0,005 à 1,5 M), enzyme (0,5 UI/ml), tampon citrate-phosphate pH 5,5, incubation pendant 5 min à 37°C. L'activité est déterminée par le dosage enzymatique du glucose libéré

9. Paramètres cinétiques

Le profil de l'activité hydrolasique de l'enzyme purifiée en fonction de la concentration en saccharose est ascendant jusqu'à une valeur maximale puis diminue. Son tracé en coordonnées inverses de Lineweaver et Burk (1934) pour déterminer les paramètres cinétiques n'est pas totalement linéaire mais présente une partie en rupture de pente avec une inflexion vers le haut aux fortes concentrations en substrat (figure 34). Les valeurs de K_m et V_m pour l'hydrolyse du saccharose sont donc déterminées par extrapolation de la courbe en utilisant la partie linéaire. Les résultats obtenus dans ces conditions

sont $K_m = 50 \text{ mM}$ et $V_{max} = 1,40 \text{ } \mu\text{mol/min/ml}$ (correspondant à 20.06 UI/mg de protéines).

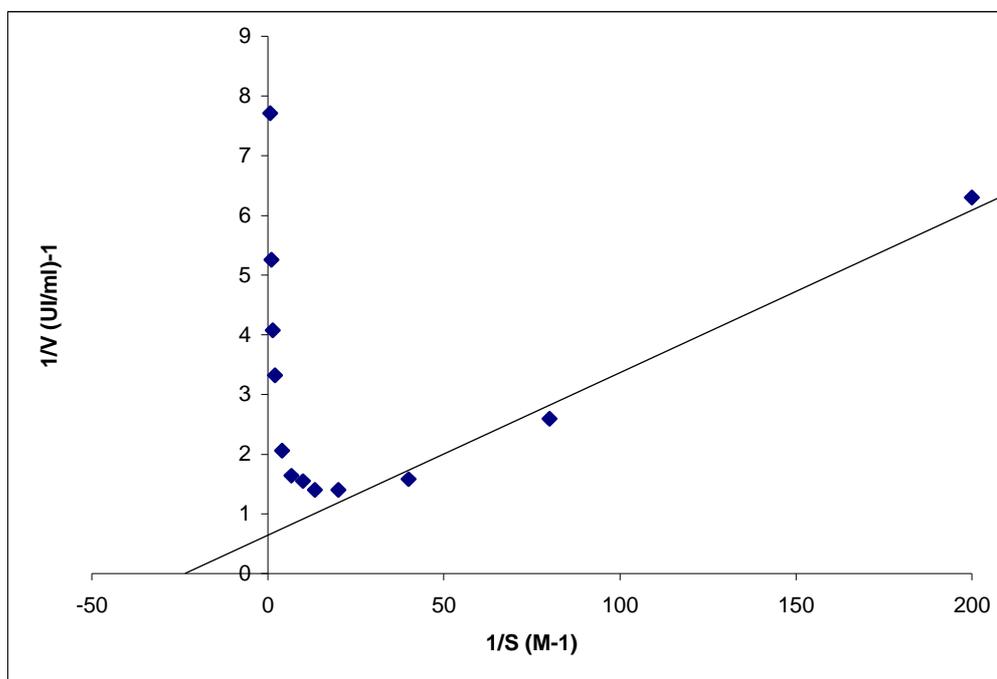


Figure 34: Détermination des paramètres cinétiques de l'α-glucosidase

10. Test de l'hypothèse d'inhibition par excès de substrat

L'allure de la courbe d'activité de l'enzyme purifiée pour l'hydrolyse du saccharose ne correspond pas à celle d'une cinétique michaelienne classique. Nous avons voulu vérifier si cette cinétique est conforme à un modèle d'inhibition par excès de substrat. Les valeurs théoriques sont calculées à partir des valeurs expérimentales par la transformation de l'équation de

$$\text{Michaelis et Menten suivante : } v = \frac{V_m \cdot S}{S + K_m + \frac{S^2}{K_s}}$$

Le facteur K_s de cette relation est déterminé par la représentation graphique (figure 34) de $1/V = f(S)$. La partie linéaire de la courbe (de $0,075$ à $1,5 \text{ M}$)

est utilisée à cet effet. Par extrapolation, l'intersection de la courbe avec l'axe des abscisses donne la valeur de K_s ($K_s = 0,2 \text{ M}$).

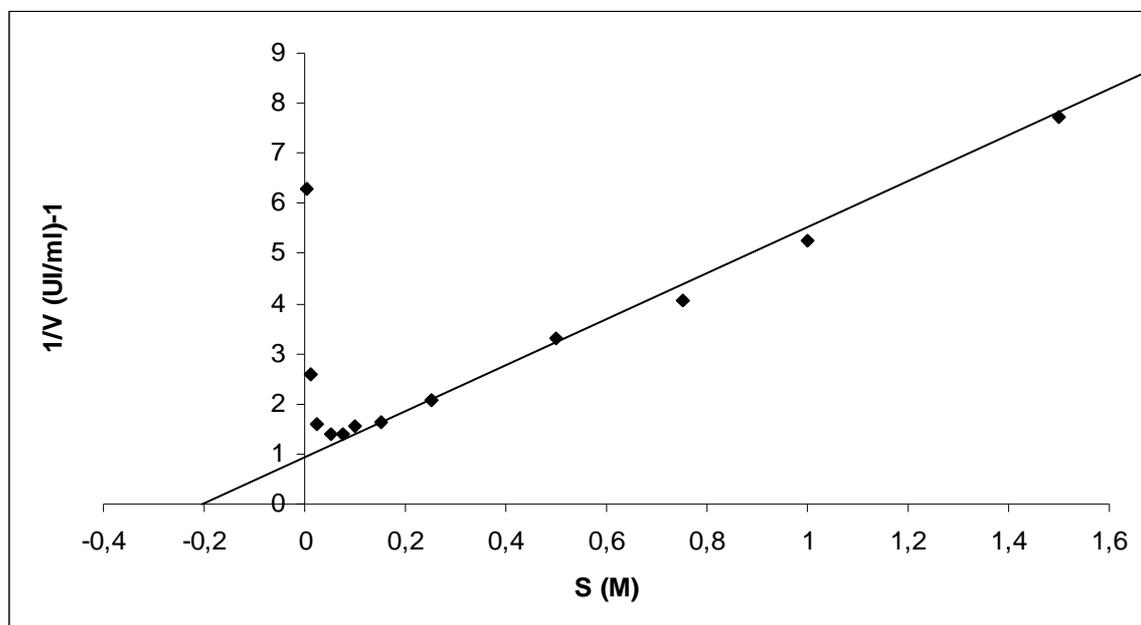


Figure 35: Détermination graphique de K_s

La représentation graphique de la courbe des valeurs calculées de l'activité relative par la relation ci-dessus en fonction de la concentration en substrat donne une courbe croissante jusqu'à une concentration de 0,100 M en substrat. Elle décroît ensuite lorsque la concentration en substrat augmente jusqu'à 1,5 M. En comparant la courbe obtenue pour les valeurs observées et celle obtenue pour les valeurs calculées dans le cas d'une inhibition par excès de substrat, nous notons une évolution similaire. Les deux courbes sont quasiment superposées (figure 36). La cinétique de la réaction d'hydrolyse observée est donc conforme à une inhibition par excès de substrat.

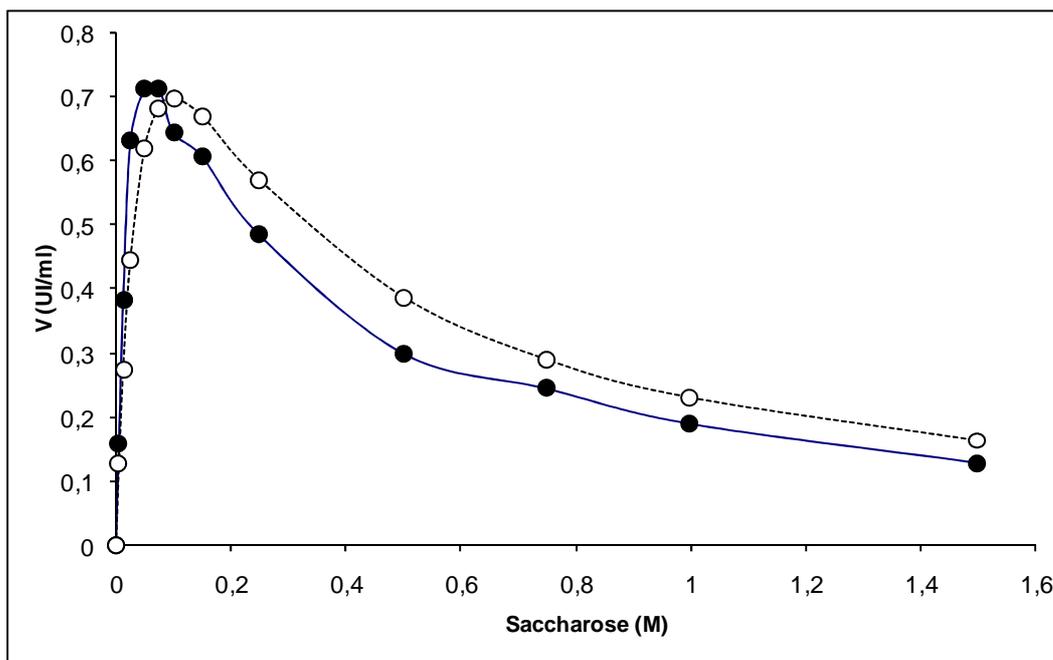


Figure 36: Comparaison des vitesses observées et calculées en fonction de la concentration du saccharose (M)

activité observée : ● ; activité calculée : ○

11. Inhibition de l'enzyme par les produits de la réaction

L'inhibition par les produits de l'hydrolyse du saccharose (glucose et fructose) est faite en deux parties. L'influence du glucose ou du fructose est déterminée en utilisant le pNP α -D-glucopyranoside comme substrat. Le dosage du pNP libéré en présence de concentrations variables du glucose permet d'éviter l'interférence que donnerait le dosage enzymatique du glucose (celui ajouté et celui hydrolysé) dans le cas du saccharose. En présence de concentrations fixes de glucose ajouté au milieu, on observe par extrapolation un croisement des différentes courbes en un même point (V_{max}) sur l'axe des ordonnées alors que toutes les courbes sont divergentes sur l'axe des abscisses. Nous en déduisons que le V_m de la réaction ne change pas alors que le K_m varie (figure 37). Ces observations sont caractéristiques d'une inhibition compétitive. Le glucose exerce donc un effet inhibiteur de

type compétitif pour l'hydrolyse enzymatique du pNP α -D-glucopyranoside. En présence du fructose aucune variation n'est observée ;

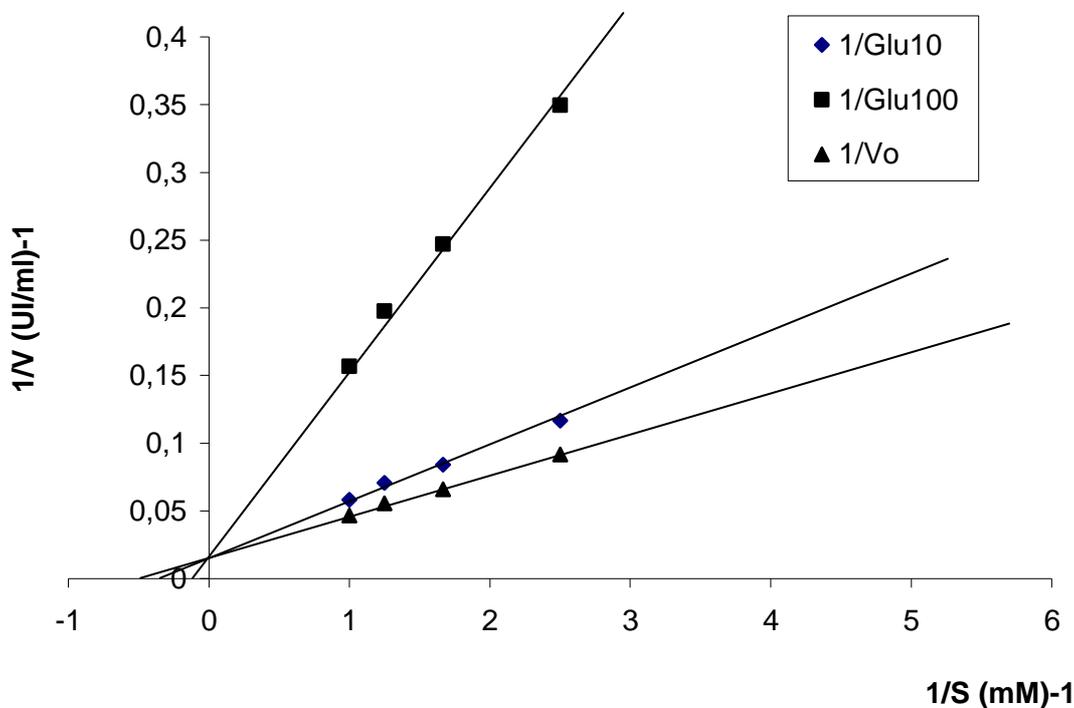


Figure 37: Effet du glucose sur l'hydrolyse du pNP α -D-glucopyranoside

L'enzyme (25 μ l) est incubée avec le pNP α -D-glucopyranoside (0,4 à 1 mM) en présence de glucose (0, 10 et 100 mM) dans un volume réactionnel de 100 μ l pendant 5 min à 37°C, pH 5,5 dans le tampon citrate phosphate 20 mM. La réaction est arrêtée par ajout de 200 μ l de carbonate de sodium à 1 M. Le pNP libéré est dosé.

ce qui indique que le fructose n'a pas d'influence sur l'activité de l'enzyme. L'effet du fructose sur l'activité de l'enzyme est également déterminé en présence du saccharose. Dans ce cas des concentrations fixes de fructose sont ajoutées au milieu réactionnel et le dosage enzymatique du glucose n'interfère pas avec le fructose ajouté. L'activité enzymatique est donc déterminée en dosant le glucose. Nous observons dans ces conditions (différentes concentrations de fructose) que le K_m et le V_m de la réaction d'hydrolyse enzymatique du saccharose (figure 38) sont les mêmes dans les différents cas.

Ces observations montrent que le fructose n'exerce aucun effet inhibiteur sur l'hydrolyse du saccharose.

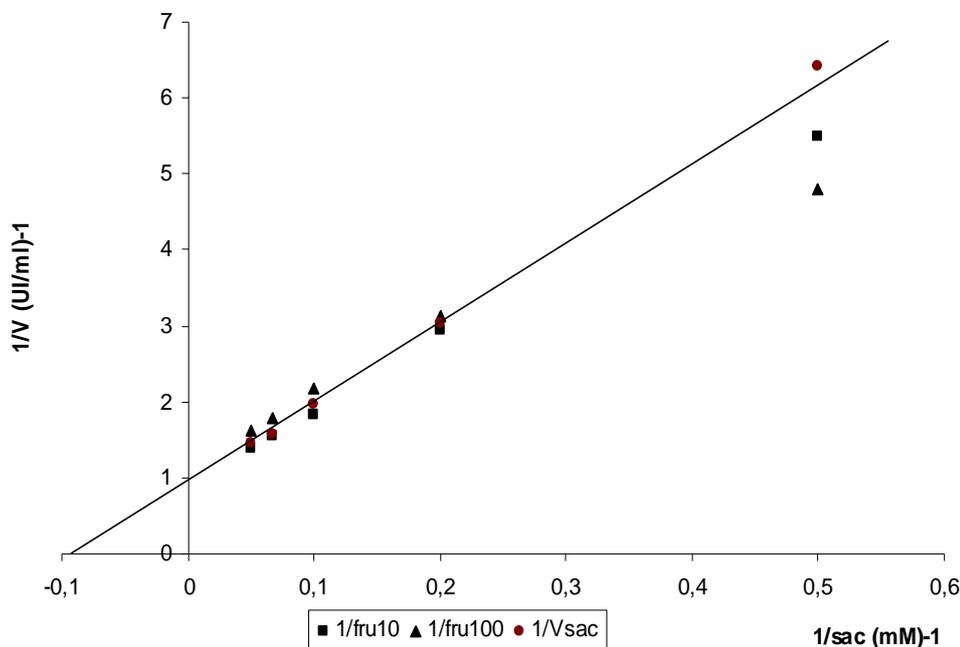


Figure 38: Effet du fructose sur l'hydrolyse du saccharose

L'enzyme (25 μl) est incubée avec le saccharose (2 à 10 mM) en présence de fructose (0, 10 et 100 mM) dans un volume réactionnel de 100 μl pendant 5 min à 37°C, pH 5,5 dans le tampon citrate phosphate 20 mM. La réaction est arrêtée par chauffage à 95°C. Le glucose libéré est dosé par le kit Biomérieux.

12. Activité transférasique en fonction de la concentration en substrat

En présence de concentrations variables de saccharose, l'analyse en HPLC des milieux réactionnels (après incubation) permet de faire les observations suivantes: (i) l'action de l'enzyme sur le saccharose libère du glucose et du fructose, (ii) la taille du pic de glucose est plus petite que celle du fructose et devient de plus en plus basse que celle du fructose au fur et à mesure que la concentration initiale en saccharose augmente, (iii) des pics de composés ayant une masse moléculaire plus grande que celle du saccharose sont formés (figure 39). Une proportion de plus en plus grande de glucose libéré de l'hydrolyse du saccharose sert donc à former de nouveaux produits dont le

poids moléculaire est supérieur à celui du saccharose. La taille de ces pics augmente également en fonction de la concentration initiale en saccharose du

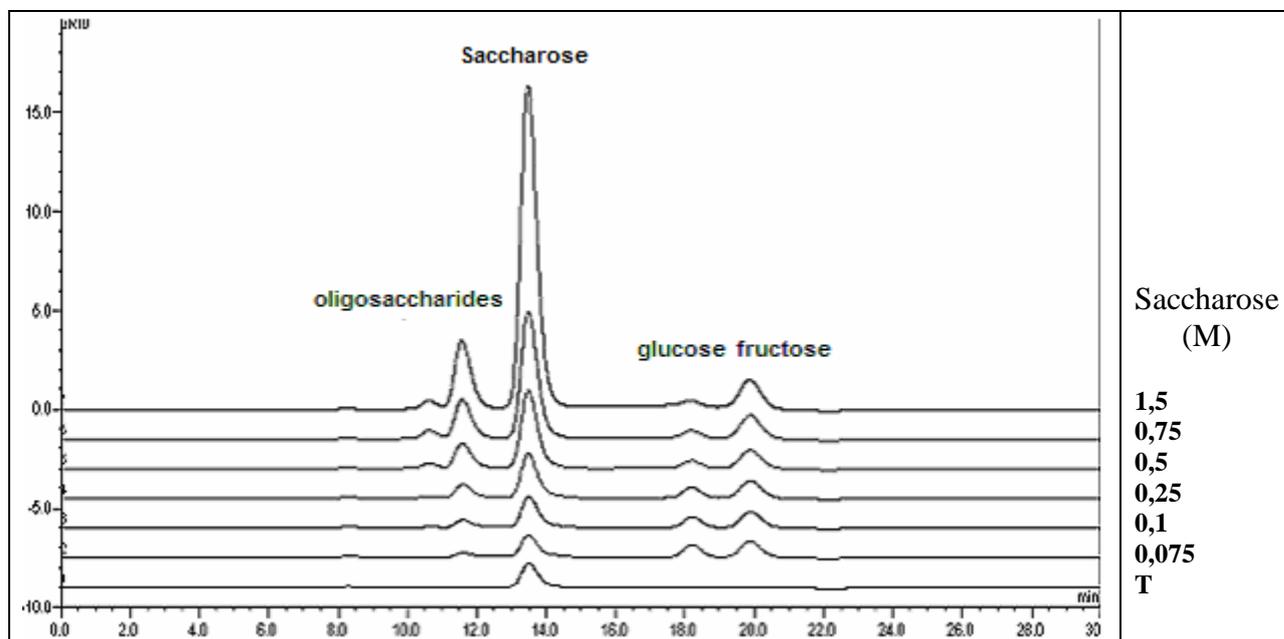


Figure 39: Analyse des milieux réactionnels en fonction du temps sur colonne K^+ .

L'enzyme (0,5 UI/ml) est incubée avec le sucrose (1,5 M) dans le tampon citrate-phosphate 20 mM pH 5,5 à 35°C sous agitation. Un prélèvement (100 μ l) de milieu réactionnel à intervalles de temps définis est chauffé à 95°C pendant 3 minutes, dilué au 1/100 dans l'eau milli Q, filtré (membrane 0,2 μ m) et analysé par HPLC sur une colonne Potassium. Eluant : Eau milli Q, Débit : 0,5 ml/min, Echantillon : 5 μ l

milieu réactionnel. L'analyse du milieu réactionnel à 1,0 M en saccharose initial sur la colonne C_{18} indique d'une part, l'existence d'au moins deux pics de produits de transglucosylation et d'autre part, que ces pics sont élués avec des temps de rétention relativement faibles. Dans nos conditions d'analyse sur la colonne C_{18} , ces pics représentent donc des molécules d'oligosaccharides. En prolongeant le temps d'analyse au-delà des pics des oligosaccharides obtenus aucun autre pic n'est observé (figure 40). Le temps d'éluion étant en corrélation avec la taille des molécules éluées, cela signifie qu'il n'y a pas de composé de haut poids moléculaire. L'enzyme purifiée ne synthétise donc pas de polysaccharides à haut poids moléculaire.

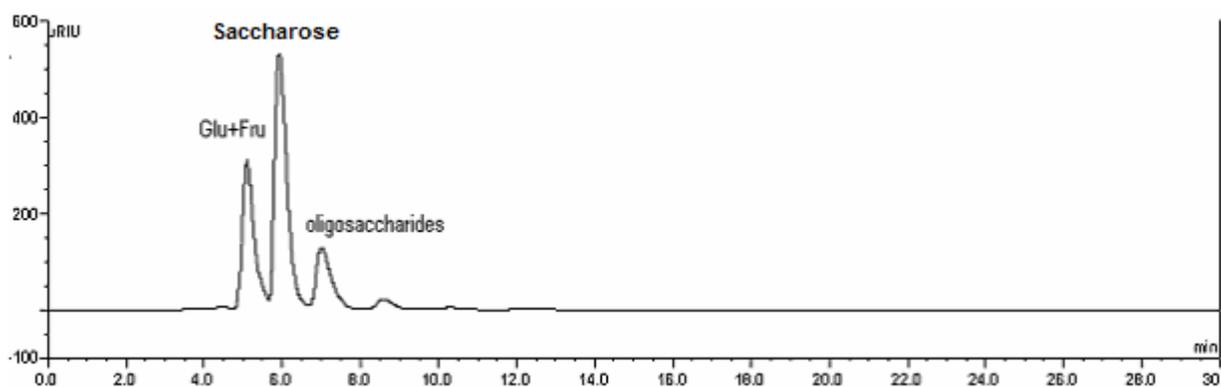


Figure 40: Analyse du milieu réactionnel à 1 M en sucrose sur colonne C₁₈

L'enzyme (0,5 UI/ml) est incubée avec le sucrose à 1 M dans le tampon citrate-phosphate pH 5,5 à 35°C pendant 12 heures sous agitation. Un prélèvement (100 µl) de milieu réactionnel est chauffé à 95°C pendant 3 minutes, dilué au 1/100 dans l'eau déionisée, filtré (membrane 0,2 µm) et analysé par HPLC sur une colonne C₁₈.

DISCUSSION

L'enzyme responsable de l'activité invertasique mise en évidence du suc digestif de l'escargot *Archachatina ventricosa* (Colas, 1977) a été purifiée au cours de cette étude. La combinaison des chromatographies par échange d'ions, gel filtration et chromatographie d'affinité n'a pas permis de purifier l'enzyme. Les difficultés de purification des glycosidases d'origine animale par les méthodes chromatographiques ont été aussi rencontrées lors de la purification de deux β -glycosidases du suc digestif de l'escargot *Achatina balteata* (Colas, 1977). L'auteur rappelait alors les problèmes spécifiques de la purification des enzymes d'origine animale. En effet, les glycosidases forment souvent des complexes peu dissociables tout au long des processus de chromatographies. Ainsi, lors de la purification de l' α -glucosidase de l'intestin de la grenouille *Rana japonica*, les auteurs ont obtenu un pic symétrique de protéines et d'activité enzymatique après une série de chromatographies d'échange d'ions, d'affinité et de gel filtration. Cependant, en électrophorèse le pic se scinde en deux bandes de tailles différentes (Takesue et Takesue, 1996) correspondant à des enzymes différentes. Au niveau des microorganismes, des difficultés du même ordre indiquent que les enzymes sont parfois éluées en pics asymétriques, collés, typiques de la dispersion des glycoprotéines (Zarate et Belda, 1996 ; L'Hocine et coll., 2000). Dans ces conditions, l'électrophorèse des extraits des différentes chromatographies permet souvent de séparer l'enzyme des autres protéines et de la localiser dans le gel grâce à une coloration spécifique de son activité enzymatique (Rehm et coll., 1998). Dans certains cas, l'extrait brut est soumis à l'électrophorèse et la portion de gel correspondant à l'activité est ensuite découpée pour étudier les propriétés de l'enzyme (Pereira et Sivakami, 1989 ; Fabre, 2004). Dans d'autres cas, l'électrophorèse est l'étape finale de la purification après une série de chromatographies et la portion de gel

correspondant à l'activité enzymatique est broyée, mise en suspension, filtrée et centrifugée pour obtenir l'enzyme pure (Flanagan et Forstener, 1978 ; Yamasaki et coll., 2005 ; Gul-Guven et coll., 2007). Nous avons ainsi pu purifier l'activité invertasique du suc digestif de l'escargot *A. ventricosa* en combinant la chromatographie d'échanges d'ions sur Q Sepharose et l'électrophorèse préparative en gel de polyacrylamide. L'enzyme a été localisée dans le gel par la couleur jaune du pNP qu'elle libère en hydrolysant le pNP α -D-glucoopyranoside. Le rendement de purification (6,5%) est supérieur à celui de 1% obtenu par Yamasaki et coll. (2005), relativement proche de celui obtenu par Gul-Guven et coll. (2007) et faible par rapport à ceux de nombreux autres travaux de purifications par chromatographies. Il peut encore être amélioré par l'électroélution de l'enzyme qui reste incluse dans le gel. Cependant, Flanagan et Forstener (1978) ont obtenu par cette méthode de purification un rendement de plus de 16% qui montre que cette méthode peut atteindre des rendements aussi élevés sinon plus élevés que ceux des méthodes chromatographiques classiques. L'efficacité de l'électrophorèse dans cette méthode de purification est liée à l'action synergique de la filtration (mailles du gel) et du champ électrique (charge de la protéine) qui confèrent une capacité de résolution plus grande en amplifiant les différences alors qu'en chromatographie classique ces deux facteurs distinctifs interviennent séparément.

La masse moléculaire de l'enzyme native (138 kDa), comparée à celle obtenue en conditions dénaturantes (66 kDa) indique que l'enzyme purifiée est un dimère formé de deux monomères identiques. Elle doit en outre comporter des ponts dissulfures qui sont rompus en présence de SDS. En SDS-PAGE, cette enzyme a une masse moléculaire proche de celle de l' α -glucosidase de *Geobacillus sp. HTA-462* (65 kDa en SDS-PAGE et 130 kDa sous forme native, Hung et coll., 2005) ou celle de *Aplysia fasciata* (69 kDa

en SDS et une structure native tétramérique de 255 kDa, Andreotti et coll., 2006). Cependant, cette masse moléculaire est plus faible que celles de l' α -glucosidase des grains de millet (80 kDa en gel filtration et 86 kDa en SDS-PAGE (Yamasaki et coll., 2005) et celle de l' α -glucosidase de *Acremonium implicatum* (Yamamoto et coll., 2004) mais reste inférieure à celle de *Schizosaccharomyces pombe* (Okuyama et coll., 2005). Comme observé avec l' α -glucosidase de *Chaetomium thermophilum*, la présence de résidus osidiques dans la molécule enzymatique peut expliquer les écarts entre le poids moléculaire natif de l'enzyme et la somme des poids moléculaires des sous-unités en SDS-PAGE (Giannesi et coll., 2006).

La séquence des 10 acides aminés de l'extrémité N-terminale de l'enzyme (FLLDDDDKPF), déterminée selon la méthode d'Edman, commence par la phénylalanine. Comme dans le cas des deux β -glycosidases de la même source (Colas, 1977) ou de l' α -glucosidase II de *B. thermoamylolyquefaciens* (Suzuki et coll., 1997), le premier acide aminé est différent de l'acide aminé du codon d'initiation classique des séquences protéiques (Met). Par ailleurs, aucune séquence homologue n'a été obtenue à ce jour en la comparant à celles d'autres organismes déjà en stock dans les bases de données de « NCBI protein databank » selon la méthode de comparaison de séquences « BLAST ». Ceci n'est pas surprenant car l'homologie entre les différentes enzymes se limite le plus souvent à des séquences consensus de faible longueur (Kimura, 2000) de préférence autour des acides aminés catalytiques et pas à l'extrémité. A signaler cependant que pour certains procaryotes, le peptide signal qui occupe cette position est relativement bien conservé avec une homologie de 40% environ pour les GS (von Heijne, 1990 ; Monchois et coll., 1999d). La présence de sites d'hydrolyse trypsique observés au niveau des séquences des régions N-terminales des α -glucosidases de la canne à sucre (Yoshiki et Suzuki, 1980), de l'orge (Sun et Henson, 1990), de l'épinard

(Sugimoto et coll., 1995) et du riz (Nakai et coll., 2007) indiquent que des protéolyses post-transcriptionnelles dans cette région sont responsables de la production des formes multiples de la même enzyme chez les végétaux (Nakai et coll., 2007).

La fixation de l'enzyme sur le gel d'affinité (Concanavalline-A-Sepharose 4B) indique qu'elle comporte comme beaucoup d'autres enzymes d'origine animale, une partie glucidique contenant au moins des résidus de mannose et de glucose. Il s'agit donc d'une glycoprotéine (Copeland, 1990 ; Goldstein, 1976 ; Pharmacia, 2003). La teneur en oses estimée à 25 % du poids de l'enzyme est une valeur approchée car d'une part, nous avons utilisé comme référence le glucose alors que le dosage au phénol-sulfurique n'est pas spécifique du glucose, et d'autre part tous les sucres n'ont pas la même intensité de réponse (Dubois et coll., 1956). La teneur en ose de l'enzyme purifiée est semblable à celle (24,5%) de *Acremonium implicatum* (Yamamoto et coll., 2004), plus élevée que celle trouvée pour les deux β -glucosidases de *A. balteata* (Colas, 1977) mais est très inférieure à celle de l' α -glucosidase hyperglycosylée (88%) de *Schizosaccharomyces pombe* (Okuyama et coll., 2005).

Le pH optimal d'activité hydrolasique du saccharose par l'enzyme purifiée est de 5,5. Il est identique à celui de *Aspergillus nidulans* (Kato et coll., 2002), supérieur à celui de l' α -glucosidase (pH 4,5) du riz (Iwata et Suzuki, 2003) et inférieur au pH optimum (pH 6,0) de l' α -glucosidase neutre du rein humain (de Burllet et Sudaka, 1977). L'étroite zone de stabilité en fonction du pH (pH 4-7) est proche de celle (pH 3-8) de l' α -glucosidase de *Schizosaccharomyces pombe* (Okuyama et coll., 2005) ou de celle (pH 4-8) de la β -glucosidase purifiée de *Trichoderma viride* (Kono et coll., 1999). La température optimale de l'enzyme purifiée (45 °C), est comparable à celle de l' α -glucosidase de la

crevette *Penaeus vannamei* (Le Chevalier et van Worhmodt, 1998) et inférieure à celles observées (50°C) pour l' α -glucosidase de la blatte *Periplaneta americana* (Kouamé et coll., 2005) et (81°C) pour l' α -glucosidase de *Bacillus thermoamyloliquefaciens* KP1071 (Suzuki et coll., 1997). En comparaison avec les organismes des habitats extrêmes (températures, pH, pression, salinité) qui produisent des enzymes résistantes à la température, à la salinité ou aux pH extrêmes, la faible température optimale de l' α -glucosidase de l'escargot peut être corrélée à la fraîcheur et à l'humidité de son habitat naturel. La présence de carbohydrates dans la structure de la molécule enzymatique peut aussi expliquer sa stabilité puisque certains travaux ont montré que la glycosylation avait un effet général de stabilisation sur la conformation et la stabilité des protéines (Okuyama et coll., 2005). La détermination de l'énergie d'activation ($E_a = 12404$ cal/mol) indique une valeur proche de celle de l'invertase du malt (13000 cal/mol) ou de l'invertase de levure (11000 cal/mol) (Dixon et Webb, 1979).

En présence de certains effecteurs comme l'EDTA l'activité de l'enzyme est atténuée. Ce résultat qui traduit une certaine interaction entre ce composé et un éventuel métal, indique que cette enzyme serait de nature métalloprotéique (Vallee et Wacker, 1970). La faiblesse de l'atténuation de l'activité suggère cependant que l'ion métallique a une très forte affinité pour l'enzyme ou que l'ion est difficilement accessible au dosage à cause de contraintes stériques ou de résidus amino-acides car l'effet inhibiteur de ce composé dépend de la stabilité relative du complexe EDTA-ION par rapport à celle du complexe ion-enzyme (Whitaker, 1972). L'inhibition totale de l'activité hydrolasique par l'ion Hg^{2+} ou ses dérivés suppose la présence d'un ou plusieurs groupements thiols indispensables à l'activité enzymatique. En effet, selon Webb (1966), l'inhibition de l'activité enzymatique par l'ion Hg^{2+} ou les

dérivés mercuriques serait caractéristique de la présence de fonctions thiols essentielles. Cette hypothèse doit être confirmée par d'autres approches.

Testée sur plusieurs types de substrats (glucosides, oligosaccharides, polymères), l'enzyme hydrolyse le maltose et pas le cellobiose, le pNP α -D-glucopyranoside et pas le pNP β -D-glucopyranoside, le saccharose et pas le leucrose ou le raffinose etc. L'enzyme reconnaît donc de façon spécifique la liaison osidique α des résidus glucosyles situés à l'extrémité non réductrice des substrats. Cette spécificité est confirmée par l'étude de l'inhibition par les produits de la réaction d'hydrolyse montrant que le glucose est un inhibiteur compétitif des substrats hydrolysés alors que le fructose ne l'est pas. De même, le fait que le raffinose dans lequel le glucose terminal du saccharose est bloqué par un galactose ne soit pas hydrolysé souligne que l'enzyme ne reconnaît ni le fructose ni le galactose. Il en découle que l'enzyme purifiée hydrolyse le saccharose en reconnaissant uniquement le glucose. L'enzyme purifiée est donc une α -glucosidase.

L'activité de l'enzyme est également influencée par la concentration en substrat. A cet effet, la représentation graphique de l'activité hydrolasique donne des droites linéaires classiques aux faibles concentrations en substrat tandis qu'aux fortes concentrations une déviation non michaélienne des courbes est observée. Le seuil de la concentration en substrat entraînant cette modification de la cinétique est de 2 mM, 4 mM et 50 mM respectivement pour le maltose, le pNP α -D-glucopyranoside et le saccharose. Une telle déviation de la cinétique michaélienne a été observée pour l' α -glucosidase neutre du rein humain (De Burlet et Sudaka, 1977) et pour les β -glycosidases du suc digestif de l'escargot *A. balteata* (Colas, 1977) mais le seuil de concentration diffère selon les enzymes et les substrats. La première

hypothèse pour expliquer ce phénomène serait une baisse de la vitesse initiale à cause de l'inhibition par excès de substrat (Combes et Monsan, 1983 ; L'Hocine et coll., 2000). Cette hypothèse est d'ailleurs vérifiée par la relation appropriée de la transformation de l'équation de Michaelis et Menten (figure 44). Cependant, Il est également admis que cette hypothèse n'explique pas à elle seule la baisse d'activité observée. En effet, la réaction de transglucosylation qui a été confirmée par l'allure typique des courbes en représentation de Lineweaver et Burk est aussi désignée comme responsable de la cinétique observée (de Burlet et Sudaka, 1977). Cet aspect est abordé dans la suite de l'étude au niveau de l'influence de la concentration en substrat sur l'activité transférasique. A partir de 2 mM en substrat, l'activité hydrolasique de l'enzyme est relativement plus importante pour les substrats hétérogènes (pNP α -D-glucopyranoside et saccharose) par rapport au maltose. Les polymères (amylose, cellulose, inuline) ne sont pas du tout hydrolysés soulignant ainsi la préférence de l'enzyme pour les substrats oligosaccharides hétérogènes comme l' α -glucosidase de *Aplysia fasciata* (Andreotti et coll., 2006). Selon la classification des α -glucosidases en deux familles (I et II) sur la base de leur spécificité de substrat et de leur structure primaire, l' α -glucosidase purifiée correspond aux enzymes typiques de la famille I des α -glucosidases, appartenant à la famille 13 des glycosides-hydrolases (Chiba, 1997, Yamamoto et coll., 2004 ; Okuyama et coll., 2005). Cependant, seule la détermination de sa structure primaire permettra d'identifier les séquences consensus et de confirmer ou non cette hypothèse.

En conditions de vitesse initiale, la représentation graphique de l'activité enzymatique (hydrolyse du saccharose) selon Lineweaver et Burk a les caractéristiques d'une inhibition par excès de substrat (vérifiée par la transformation de Michaelis-Menten). La ligne droite habituellement observée

n'est obtenue que pour les concentrations en saccharose inférieures à 0,075 mM. Ces phénomènes ont été souvent observés pour les cinétiques d'activité d'autres α -glucosidases et sont considérés comme étant causés par une baisse de la vitesse initiale dépendante de la transglucosylation (Malo et coll., 1999 ; Yamamoto et coll., 2004). La concentration quasi équivalente en glucose et fructose observée pour les faibles concentrations en saccharose indique que l'hydrolyse est favorisée dans ces conditions. Cela montre également que, comparé à l'eau, le saccharose a un faible pouvoir accepteur qui est compensé lorsque ce substrat est en excès (Monthieu et coll., 2003). L'analyse des milieux réactionnels en présence du saccharose seul indique la synthèse de composés de poids moléculaires plus grands que celui du saccharose. En corrélant cette observation avec la différence de hauteur observée entre les pics de glucose et de fructose d'une part et la spécificité de l'enzyme pour le glucose d'autre part, cela implique que les nouveaux composés sont synthétisés par l' α -glucosidase en transférant une partie du glucose libéré de l'hydrolyse enzymatique du saccharose. L'enzyme purifiée possède donc une activité transférasiq ue comme de nombreuses autres α -glucosidases (Henrissat et Bairoch, 1993, Andreotti et coll., 2006). Comme bien d'autres α -glucosidases également, l'activité transférasiq ue de l'enzyme purifiée en présence du saccharose se limite à la synthèse d'oligosaccharides et n'aboutit pas à l'obtention de polysaccharides à haut poids moléculaire (Kato et coll., 2002 ; Kobayashi et coll., 2003) probablement en rapport avec sa capacité d'hydrolyse. En effet, la synthèse d'une liaison glycoside (transglucosylation) et son hydrolyse étant les deux variantes d'un même processus catalytique, cela implique qu'une enzyme qui n'a pas la capacité d'hydrolyser un polysaccharide, ne pourra pas également en catalyser la synthèse (Ferrer et coll., 2005).

PARTIE B : LA REACTION DE TRANSGLUCOSYLATION

Après la purification de l' α -glucosidase, nous avons mis en évidence l'activité transglucosidasique qui pourrait justifier son intérêt. Cette seconde partie est consacrée à l'étude de certains aspects de l'activité transférasique notamment l'influence des paramètres réactionnels (pH et concentration en substrat), la cinétique de synthèse et la caractérisation des produits obtenus en utilisant le saccharose comme donneur et accepteur de glucosyles.

1. Influence du pH sur l'activité transférasique

Nous avons déjà observé dans la précédente partie que le changement de pH influence la réaction d'hydrolyse du saccharose par l'enzyme. Dans cette seconde partie nous étudions également l'influence du pH sur la capacité de l'enzyme purifiée à transférer des résidus glucosyles (transglucosylation) dans l'intervalle de pH 3 à pH 7. Les résultats indiquent que l'activité transférasique est complètement inhibée à pH 3. Elle augmente fortement entre les pH 3 et 3,5 puis atteint son maximum à pH 4. Sur l'intervalle de pH 4 à pH 6,5 l'activité transférasique est maximale et stable puis elle baisse ensuite au-delà du pH 6,5 (figure 41).

2. Activité transférasique en fonction de la concentration en substrat

Nous avons observé que la réaction de transglucosylation s'accompagne de la libération de fructose et de glucose (monosaccharides). La présente étude a pour objet de déterminer les quantités relatives de monosaccharides et d'oligosaccharides à différentes concentrations en saccharose et de vérifier si une corrélation peut être établie entre leurs différentes proportions. Les résultats (figure 42) indiquent que lorsque la teneur en sucre varie de 0,075 M

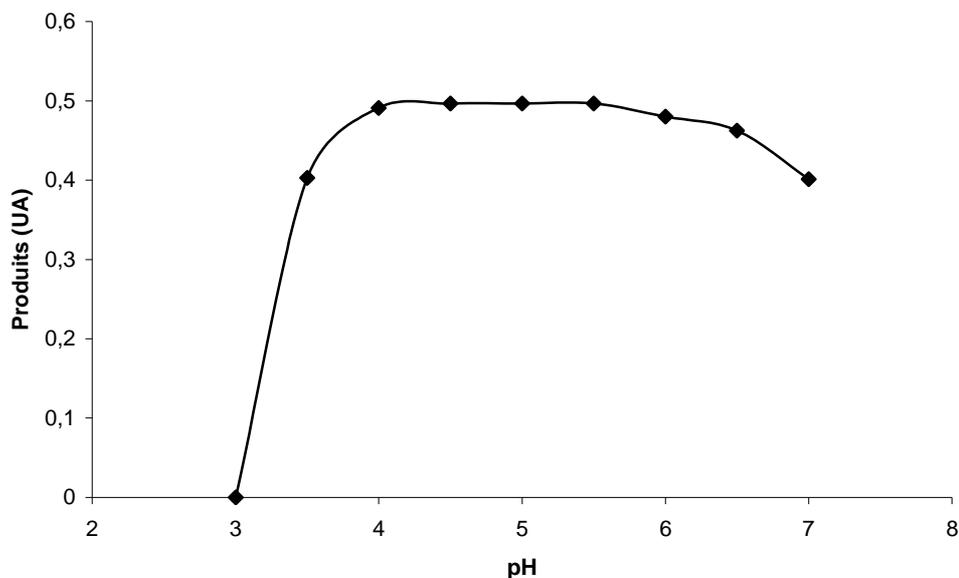


Figure 41: Influence du pH sur la réaction de transglucosylation

L'enzyme (0,5 UI/ml) est incubée avec le sucrose 1 M à chaque pH dans le tampon citrate-phosphate 20 mM. Les mélanges sont incubés à 35°C pendant 12 heures sous agitation. Un prélèvement (100 µl) de milieu réactionnel est chauffé à 95°C pendant 3 minutes, dilué au 1/100 dans l'eau milli Q, filtré (membrane 0,2 µm) et analysé par HPLC sur une colonne Potassium. Eluant : Eau milli Q, Débit : 0,5 ml/min, Echantillon : 10 µl

à 1,5 M, les quantités d'oligosaccharides synthétisées et de monosaccharides libérés changent aussi mais pas dans les mêmes proportions. En effet, alors que la teneur en oligosaccharides est faible aux basses concentrations en saccharose, elle augmente progressivement en suivant la même évolution que celui-ci. Concernant la teneur en monosaccharides libérés, elle atteint dès 0,075 M en saccharose une valeur qui varie peu en comparaison avec les proportions de l'augmentation en substrat. Ainsi, la teneur en oligosaccharides qui était la plus faible aux basses concentrations en substrat (de 0 à 0,50 M) devient plus importante que celle des monosaccharides au-delà de 0,6 M en substrat. La teneur en monosaccharides libérés n'évolue donc pas de la même façon que celle des oligosaccharides lorsque la concentration en substrat varie. Ces résultats nous ont conduit à réaliser la réaction de transglucosylation à 1,5 M en saccharose pour laquelle nous avons le niveau de transfert le plus élevé.

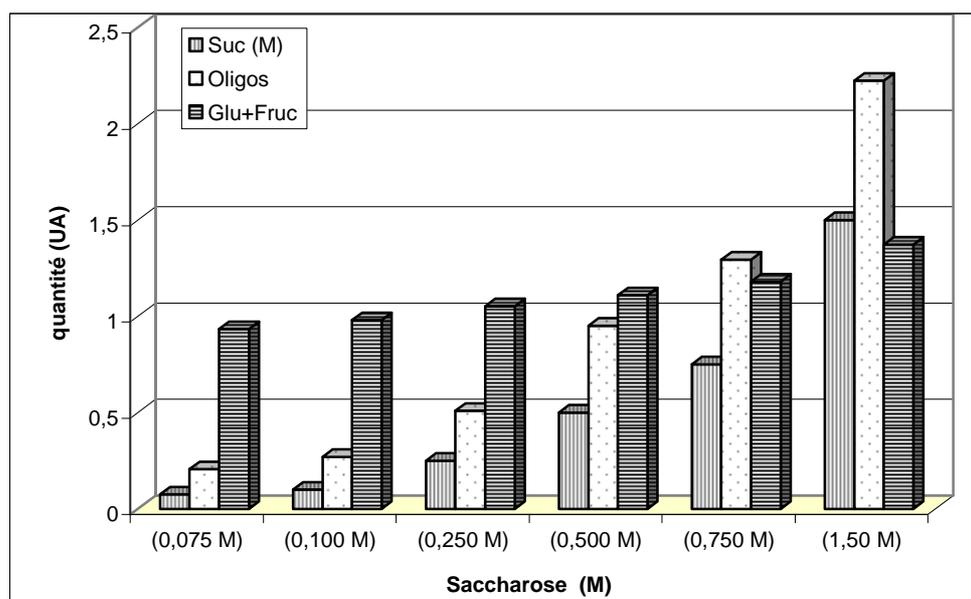


Figure 42: Influence de la concentration en saccharose sur la transglucosylation

L'enzyme (1 UI/ml) est incubée avec le sucrose à chaque concentration dans le tampon citrate-phosphate 20 mM pH 5,5 à 35°C pendant 12 heures sous agitation. Un prélèvement (100 µl) de milieu réactionnel est chauffé à 95°C pendant 3 minutes, dilué au 1/100 dans l'eau milli Q, filtré (membrane 0,2 µm) et analysé par HPLC sur une colonne Potassium. Eluant : Eau milli Q, Débit : 0,5 ml/min, Echantillon : 5 µl (Sac : saccharose ; oligos : oligosaccharides ; monos : glucose+fructose).

3. Cinétique de la réaction de transglucosylation

Au cours de la réaction de synthèse, la concentration en saccharose baisse fortement pendant les premières 24 heures, indiquant une utilisation importante puis elle diminue plus lentement par la suite. La cinétique de production des oligosaccharides par l'enzyme est suivie pour mieux cerner leur formation. Le premier pic indiquant la synthèse des oligosaccharides augmente rapidement pendant les premières heures de réaction puis apparaît un autre plus petit indiquant la synthèse de composés d'un poids moléculaire plus élevé. La forme et la taille des pics se modifient ensuite pour former des épaulements de part et d'autre des pics initiaux (figure 43). Chaque pic correspondant à un composé donné, les modifications observées impliquent donc un changement dans la composition des produits de la réaction qui

constituent ces pics. Ces résultats suggèrent également la formation d'autres composés à partir de la modification des produits précédents.

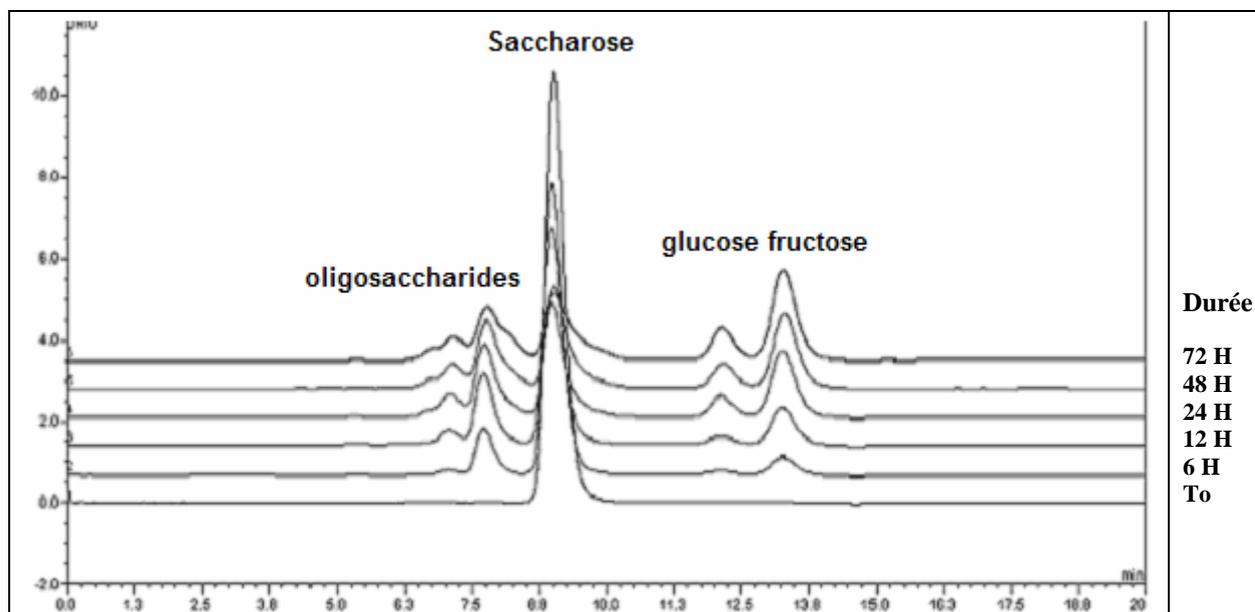


Figure 43: Analyse des milieux réactionnels en fonction du temps sur la colonne Potassium.

L'enzyme (1 UI/ml) est incubée avec le sucrose (1,5 M) dans le tampon citrate-phosphate 0.1 mM pH 5,5 à 35°C sous agitation. Un prélèvement (100 µl) de milieu réactionnel à intervalles de temps définis est chauffé à 95°C pendant 3 minutes, dilué au 1/100 dans l'eau milli Q, filtré (membrane 0,2 µm) et analysé par HPLC sur la colonne Potassium. Eluant : Eau milli Q, Débit : 0,5 ml/min, Echantillon : 5 µl

Le glucose et le fructose qui sont absents au départ de la réaction sont observés par la suite et leurs teneurs augmentent progressivement avec le temps. Cependant, la teneur en glucose est toujours plus faible que la teneur en fructose, de même que l'écart entre les concentrations de ces deux composés augmente avec le temps (figure 44). En poursuivant plus longtemps la réaction nous observons que le pic de saccharose contient également un autre composé néosynthétisé et non identifié.

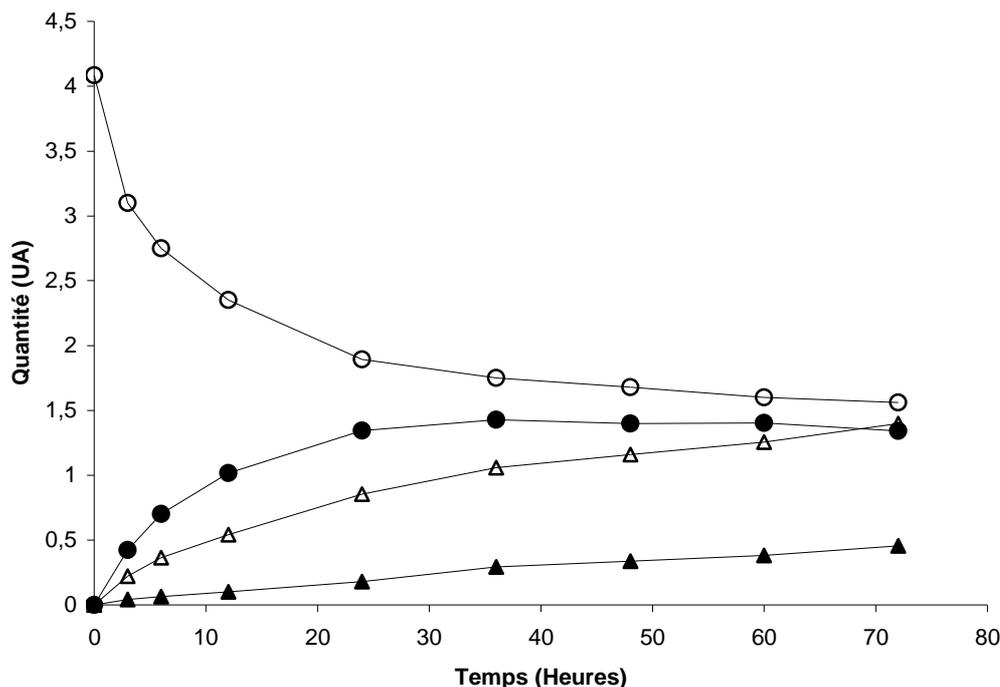


Figure 44: Cinétique de la synthèse des oligosaccharides

L'enzyme (1 UI/ml) est incubée avec le sucrose (1,5 M) dans le tampon citrate-phosphate 0,1 M pH 5,5 à 35°C sous agitation. Un prélèvement (100 µl) de milieu réactionnel à intervalles de temps définis est chauffé à 95°C pendant 3 minutes, dilué au 1/100 dans l'eau milli Q, filtré (membrane 0,2 µm) et analysé par HPLC sur la colonne Potassium. Eluant : Eau milli Q, Débit : 0,5 ml/min, Echantillon : 5 µl
 saccharose (○), glucose (▲), fructose (△), oligosaccharides (●)

4. Analyse des produits de synthèse par chromatographie

A l'arrêt de la réaction de synthèse après 72 heures d'incubation, l'analyse du milieu réactionnel (colonne C₁₈) indique des produits de transglucosylation qui apparaissent en plusieurs pics distincts ou accolés et de tailles variables (figure 45). L'identification des produits de synthèse est donc envisagée par la HPAEC-PAD qui est plus résolutive. L'analyse par HPAEC-PAD du même milieu de synthèse permet effectivement de mieux séparer les différents composés et même d'en identifier quelques uns. On distingue ainsi le glucose, le fructose et le saccharose résiduel dont le pic comporte un épaulement suggérant la présence d'un autre composé. Les produits de synthèse sont également mieux séparés et se distinguent en deux groupes.

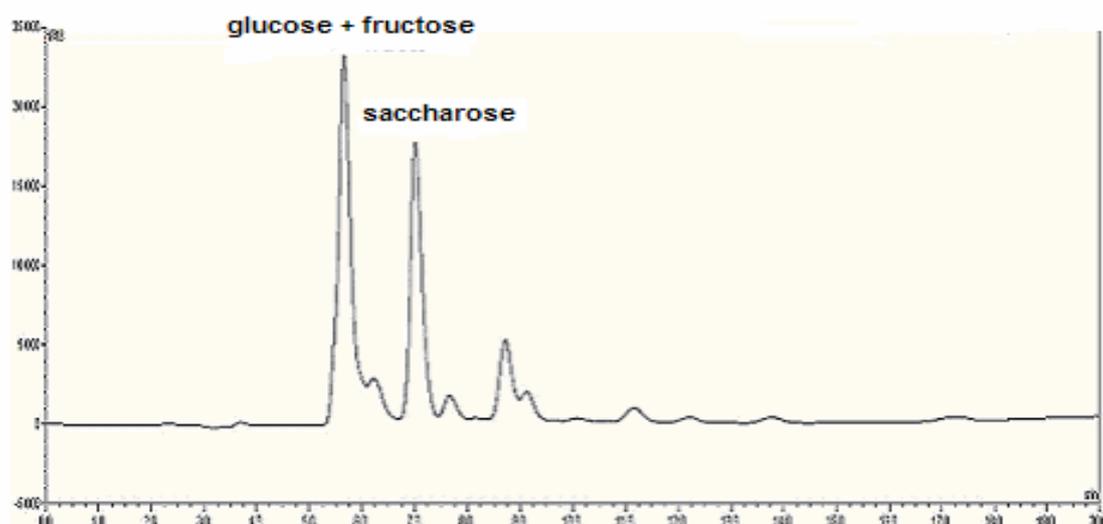


Figure 45: Analyse du milieu de synthèse sur colonne C₁₈

L'enzyme (1 UI/ml) est incubée avec le sucrose (1,5 M) dans le tampon citrate-phosphate 0,1 M pH 5,5 à 35°C sous agitation pendant 72 heures. La réaction est arrêtée par chauffage du milieu réactionnel à 95°C pendant 10 min. Un prélèvement (10 µl) est dilué au 1/100 dans l'eau milli Q, filtré (membrane 0,2 µm) et analysé par HPLC sur une colonne C₁₈. Eluant : Eau milli Q, Débit : 0,5 ml/min, Echantillon : 10 µl

Un groupe est constitué par le maltose et ses isomères (isomaltose, nigérose) ainsi que deux composés inconnus. L'autre groupe est formé de composés se distinguant par un DP croissant de 3 à 8 et dont la quantité relative dans le milieu baisse de façon progressive avec l'augmentation du DP des produits (figure 46). Ce résultat confirme également l'absence de produits de haut poids moléculaire dans le milieu réactionnel malgré la durée (72 heures) de la réaction. Le saccharose résiduel est de 0,619 M ce qui correspond à une baisse d'environ 0,881 M (58,73%) de sa concentration initiale. Le glucose et le fructose sont respectivement à 54 et 176 g/l. Aucun produit à haut poids moléculaire n'est observé.

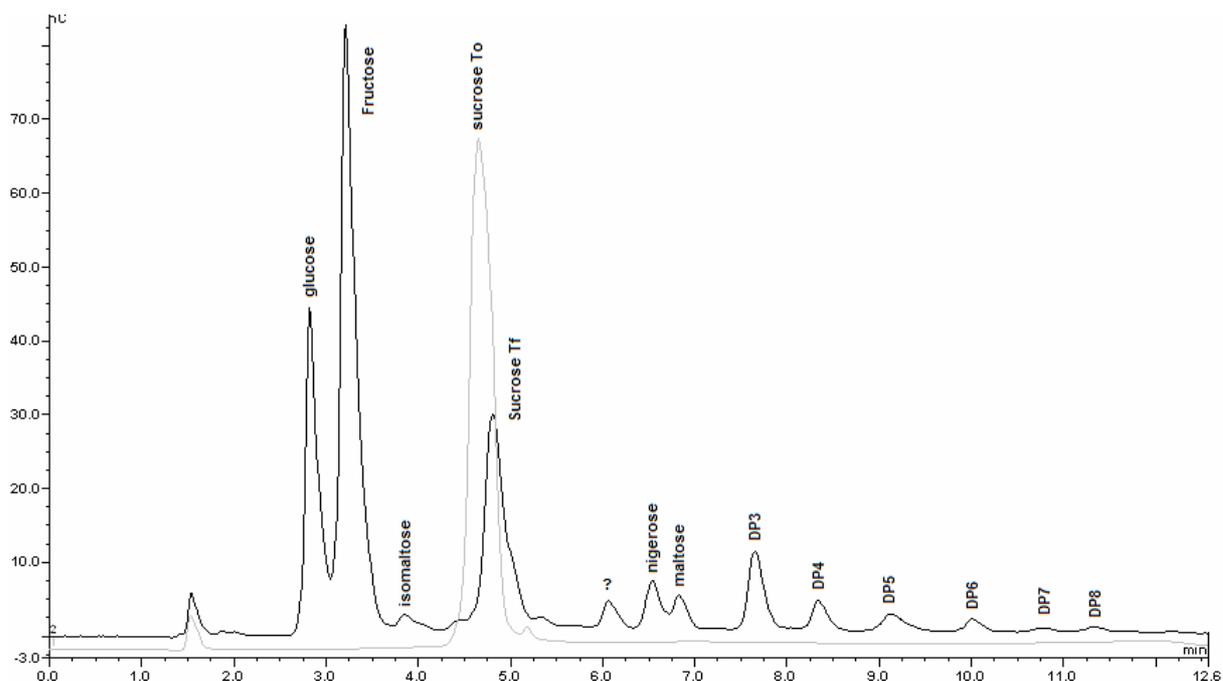


Figure 46: Analyse du milieu de synthèse sur colonne CarboPac 100 par HPAEC-PAD.

L'enzyme (1 UI/ml) est incubée avec le sucrose (1,5 M) dans le tampon citrate-phosphate 0,1 M pH 5,5 à 35°C sous agitation pendant 72 heures. Elution : NaOH 150 mM dans eau milli Q, Gradient : Acétate de sodium (6 à 600 mM en 30 min) dans NaOH 150 mM. Débit : 1 ml/min, Echantillon : saccharose initial, 5 μ l ; milieu de synthèse, 10 μ l.

5. Caractérisation des oligosaccharides

Les produits de synthèse désignés DP3 et DP4 par HPAEC-PAD ont été purifiés par chromatographie liquide sur une colonne C₁₈ préparative. Leurs masses moléculaires sont déterminées par spectrométrie de masse et les DP théoriques observés par HPAEC-PAD sont vérifiés. Les résidus et les liaisons osidiques qui les lient sont ensuite déterminés par hydrolyse enzymatique et Résonance Magnétique Nucléaire.

5.1. Purification des oligosaccharides

La colonne C₁₈ préparative utilisée pour la purification des produits de la réaction de transglucosylation distingue le glucose et le fructose (un seul et même pic), les disaccharides (en un pic) et les autres oligosaccharides (en

plusieurs pics). Cependant, sa résolution est moins bonne que la chromatographie d'échange ionique (HPAEC-PAD). Nous avons néanmoins pu purifier du milieu réactionnel les deux principaux produits (composés DP3 et DP4) de la réaction de transglucosylation après plusieurs passages sur la colonne C₁₈ préparative. La pureté est contrôlée par analyse chromatographique sur une colonne C₁₈ analytique. Les autres composés n'ont pas pu être isolés à cause de la limite de résolution de la colonne. Nous obtenons en moyenne 437,2 mg de lyophilisât du composé DP3 et 226,4 mg de lyophilisât du composé DP4. Notons cependant que ces masses ne représentent pas la masse totale des composés DP3 et DP4 dans le milieu réactionnel. Un contrôle par HPAEC indique qu'une partie des produits (DP3 ou DP4) reste mélangée à d'autres composés dans certaines fractions.

5.2. Hydrolyse enzymatique par une invertase

L'action hydrolasique de l'invertase libère à partir du composé DP3 deux pics de molécules correspondant en HPAEC-PAD au fructose et au maltose. A partir du composé DP4 les deux molécules également libérées sont le fructose et le maltotriose. Ce résultat indique que les composés DP3 et DP4 sont constitués d'unités glucosidiques liées entre elles par une liaison $\alpha(1\rightarrow4)$ et de fructose (figure 47). Les produits de l'hydrolyse des composés DP3 et DP4 par l'invertase impliquent aussi que dans la structure de ces molécules le fructose est situé à une extrémité et que son hydroxyle anomère est engagé dans une liaison osidique.

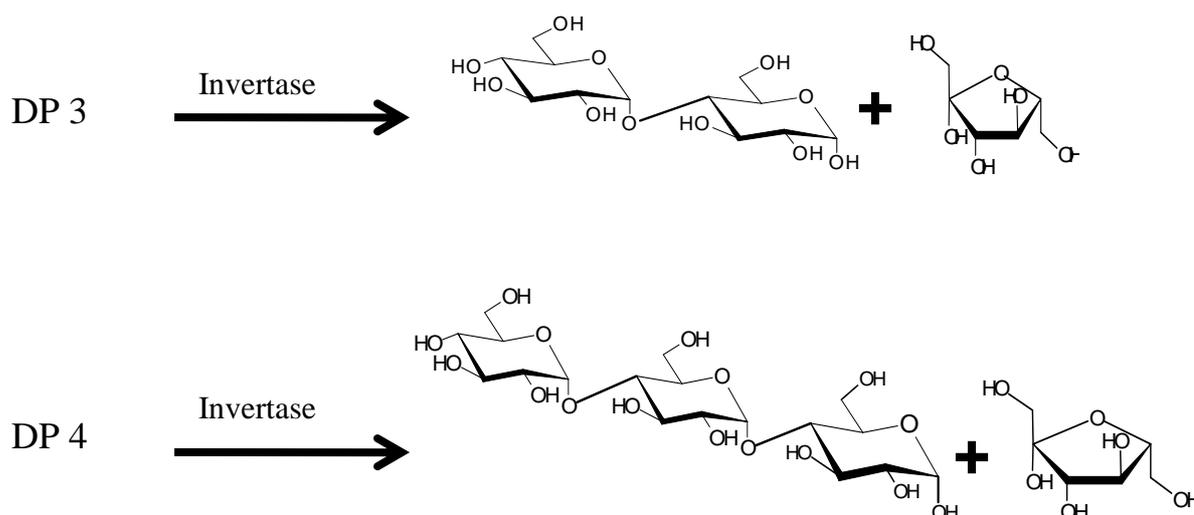


Figure 47: Hydrolyse des oligosaccharides DP 3 et DP 4 par l'invertase de levure

5.3. Détermination de la masse moléculaire en spectrométrie de masse (MS)

L'analyse par spectrométrie de masse du composé DP3 par LSI-MS (Liquid Secondary Ionization-Mass Spectrum) met en évidence (figure 48) un pic caractéristique d'un ion ($M+Na^+$) de masse m/z : 527,3. Ces valeurs indiquent que le composé DP3 a une masse moléculaire de 504 grammes qui correspond à un trisaccharide ($C_{18}H_{32}O_{16}$). Quand au composé DP4, son analyse par la même méthode donne (figure 49) un pic caractéristique d'un ion ($M+Na^+$) de masse m/z : 689,3 correspondant à un tetrasaccharide ($C_{24}H_{42}O_{21}$) de masse moléculaire 666 grammes. Ces masses confirment que les valeurs de DP observées par la chromatographie d'échange d'ions (HPAEC-PAD) sont correctes. L'augmentation de la masse molaire entre les composés DP3 et DP4 d'une valeur de 162 g/mol confirme également que ces composés diffèrent d'une unité glucosyle et pourraient appartenir à une même famille.

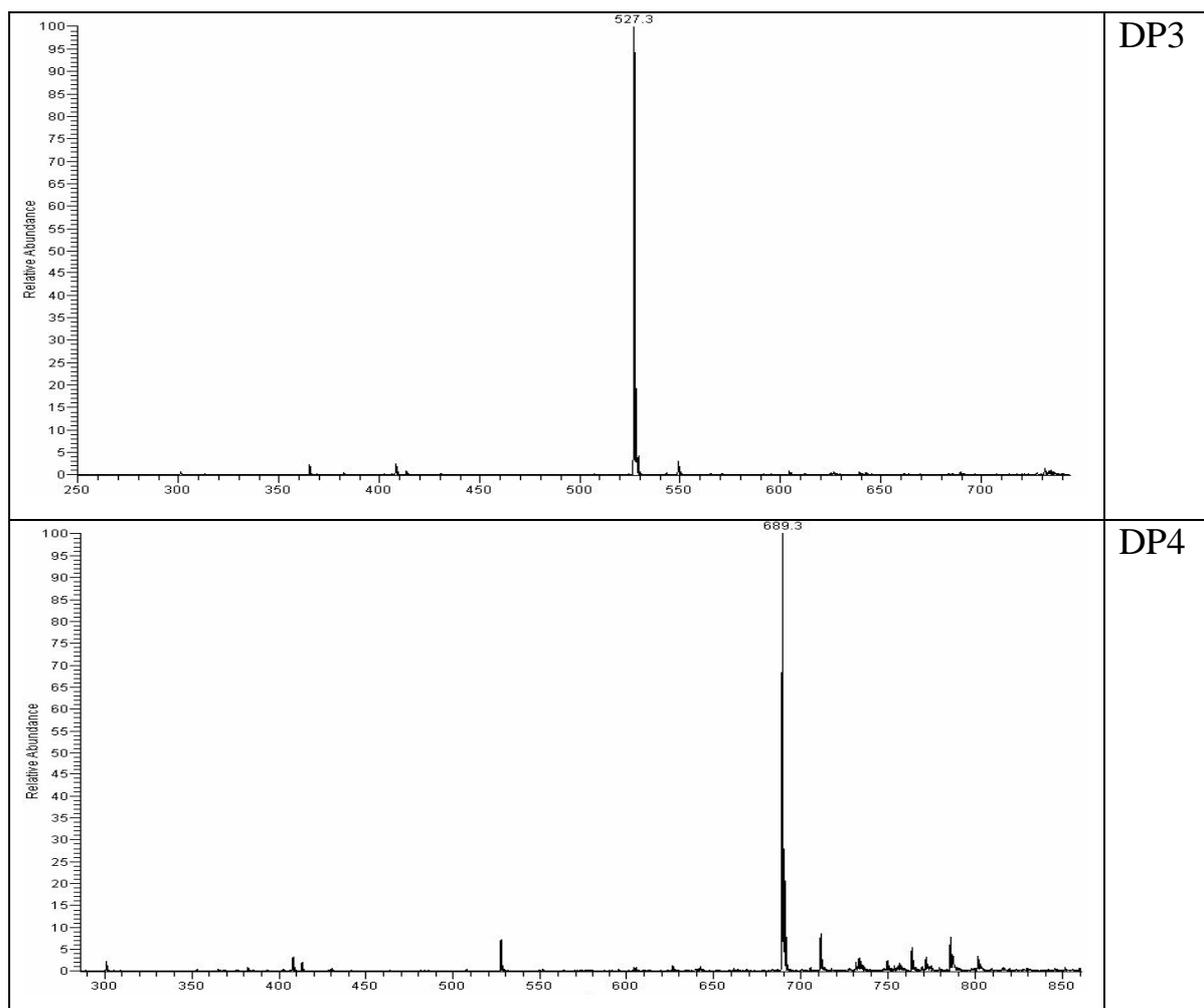


Figure 48: Spectres de masse des composés DP3 et DP4 par LSI-MS

5.4. Détermination de la structure des oligosaccharides en RMN

Les composés DP3 et DP4 sont analysés par des expériences de RMN monodimensionnelles du proton (^1H) et du carbone (^{13}C) ainsi que des expériences bidimensionnelles de corrélation hétéronucléaire ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$) HSQC et ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$) HMBC. Les spectres obtenus sont d'abord comparés à ceux du saccharose puis à ceux de composés de référence.

5.4.1. Le composé DP3

5.4.1.1. Le spectre du carbone (^{13}C RMN 1D)

L'attribution des déplacements chimiques des atomes de carbone du composé DP3 (confirmé par l'hydrolyse enzymatique et la spectrométrie de masse) est faite en comparant son spectre ^{13}C à ceux du saccharose et du maltosylfructoside de référence (Bock et coll., 1984). La comparaison des déplacements chimiques du spectre (^{13}C) du composé DP3 à celui du saccharose montre que tous les atomes de carbone du saccharose sont contenus dans le spectre du DP3. Le composé DP3 est donc constitué d'une molécule de saccharose sur laquelle est fixé un glucose supplémentaire. Les valeurs des déplacements chimiques des carbones du saccharose et du composé DP3 sont résumées dans le tableau ci-dessous (Tableau 10).

Tableau 10: Déplacements chimiques (^{13}C) des carbones du saccharose et du composé DP3.

Les valeurs des déplacements (δ) sont exprimés en ppm

Composé	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Saccharose						
α -glc-(1 \rightarrow 2)-	92,9	71,9	73,4	70,0	73,2	61,0
β -fru	62,2	104,5	77,3	74,8	82,2	63,2
G ₂ F						
α -glc-(1 \rightarrow 4)-	100,6	72,6	73,8	70,2	73,5	61,3
α -glc-(1 \rightarrow 2)-	92,8	71,7	73,7	77,7	71,8	61,1
β -fru	62,2	104,5	77,3	74,8	82,2	63,2

Les déplacements chimiques des carbones du DP3 correspondent aux valeurs de références publiées pour le maltosylfructoside (Bock et coll., 1984). Nous observons notamment des déplacements chimiques caractéristiques du C'1 lié ($\delta = 100,6$ alors que $\delta = 92,8$ ppm pour le même C1 libre) et celui du C'4 libre ($\delta = 70,2$ ppm) du glucose ajouté par l'enzyme. Nous notons également

que le déplacement chimique du C4 de l'unité glucosyle du saccharose passe de 70,0 ppm à 77,7 ppm. Ce changement de déplacement chimique dit « deblindage » est dû à sa liaison avec le C1 du glucose que l'enzyme ajoute. De plus les valeurs des déplacements chimiques de ces deux atomes de carbone sont typiques d'une liaison $\alpha(1\rightarrow4)$ glucosidique (la liaison $\beta(1\rightarrow4)$ est caractérisée par $\delta C1 = 103,6$ ppm et $\delta C4 = 79,6$ ppm). Ce que confirme le résultat de l'hydrolyse du composé DP3 par l'invertase qui donne du fructose et du maltose. Les déplacements chimiques des différents carbones (^{13}C NMR) regroupés dans le tableau 10 permettent les attributions des différents carbones (Figure 49).

Tous les résultats obtenus par chromatographie HPAEC-PAD, hydrolyse enzymatique, SM et RMN 1D ^{13}C sont concordants et indiquent que le composé DP3 est un maltosylfructoside de formule chimique $\alpha\text{-D-glucopyranosyl-(1}\rightarrow\text{4)} \alpha\text{-D-glucopyranosyl-(1}\rightarrow\text{2)} \beta\text{-D-fructofuranoside (G2F)}$ (figure 50).

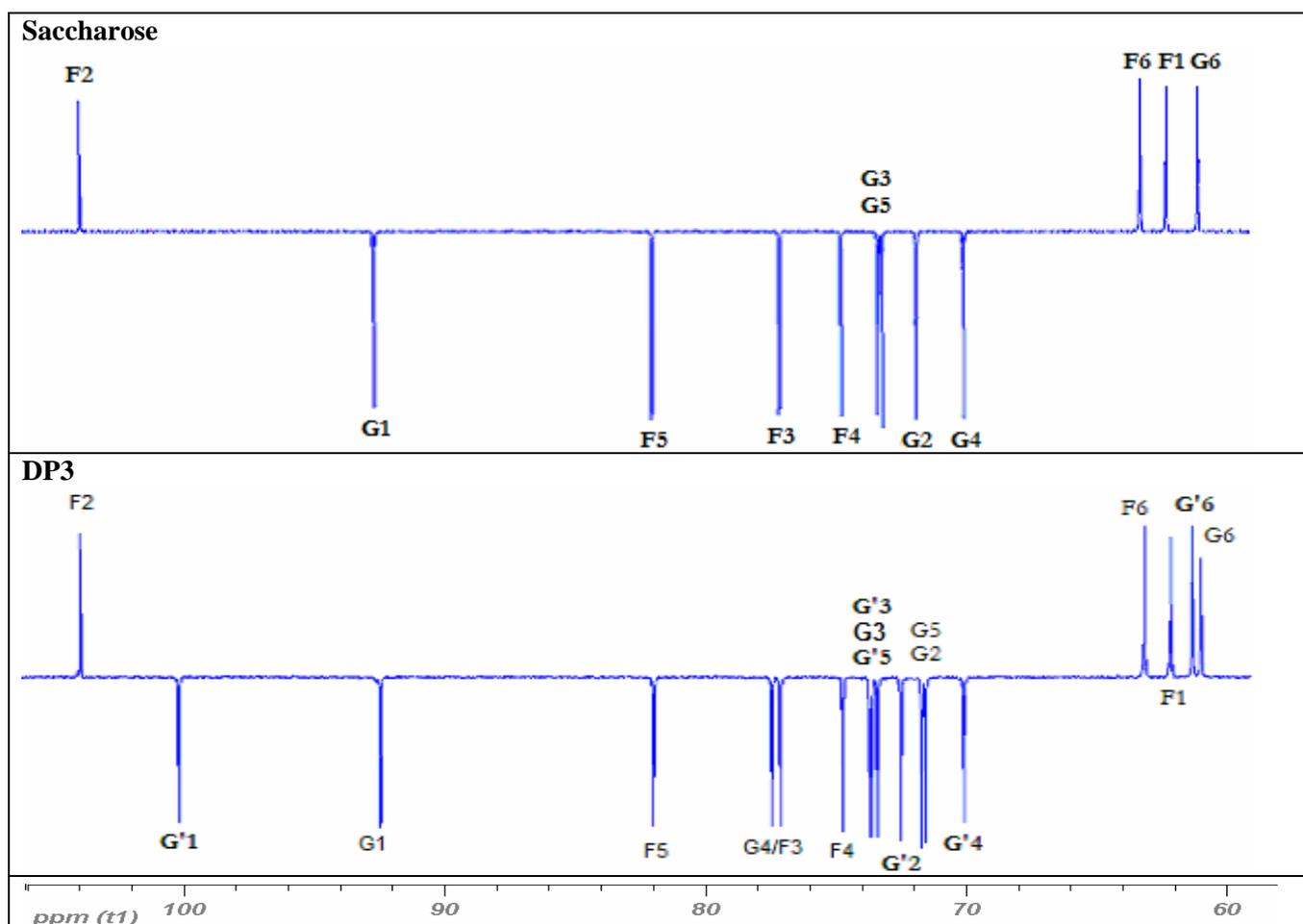


Figure 49: Spectres ^{13}C RMN 1D du saccharose et du composé DP3

F : fructose du saccharose ; G : glucose du saccharose ; G' : premier glucose ajouté par l' α -glucosidase ; Les chiffres désignent la position du carbone.

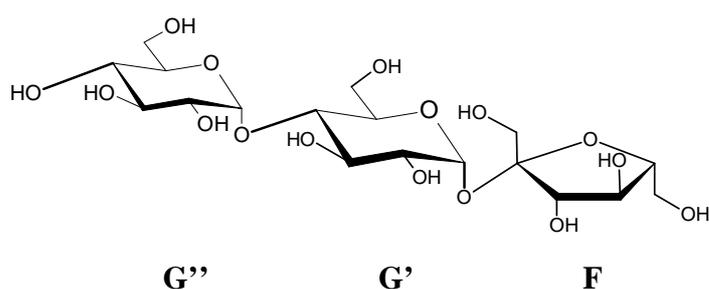


Figure 50: Structure du maltotriosylfructoside

L'analyse des résultats des expériences monodimensionnelles de RMN 1D ^1H et des expériences bidimensionnelles de corrélations hétéronucléaires est ensuite réalisée pour confirmer la structure obtenue.

5.4.1.2. Le spectre du proton (^1H)

A partir des données de référence sur les déplacements chimiques des protons du maltotriosylfructoside (Monthieu et coll., 2003) nous avons pu identifier certains signaux caractéristiques sur le spectre RMN 1D ^1H du composé DP3 :

- à $\delta = 3,33$ ppm le signal du proton H'4 porté par le C'4 libre du glucosyle ajouté par l'enzyme
- à $\delta = 5,32$ ppm le signal des protons H1 et H'1 portés par les deux carbones C1 et C'1 respectifs du glucosyle du saccharose et du glucosyle ajouté par l'enzyme

Le nombre de protons résonnant à chacune de ces fréquences est déterminé par l'intégration des signaux observés. Nous obtenons par intégration que le signal à $\delta = 3,33$ Mhz correspond à un seul proton alors que celui à $\delta = 5,32$ Mhz correspondant à deux protons. D'autre part, sachant que l'environnement d'un proton influence l'intensité et le nombre de raies qui constituent son signal, cette observation permet de vérifier l'attribution des signaux. Dans la structure du DP3, on note que les protons H1 et H'1 possèdent chacun dans leur environnement un proton avec lequel ils couplent (H2 et H'2 respectivement). Leurs signaux doivent donc être constitués d'un doublet composé de deux raies d'égale intensité. Nous observons effectivement deux raies d'égale intensité pour le signal à 5,32 Mhz (figure 51). Enfin, le spectre du proton (^1H) permet de distinguer les signaux spécifiques des protons anomères qui se situent dans la zone de $\delta = 4,4$ à 5,5 Mhz (Bubb, 2003). Ainsi, le signal observé à $\delta = 5,32$ Mhz correspond aux deux protons anomères (H1 et H'1) des résidus glucosyles du DP3 (figure 51). L'expérience monodimensionnelle (RMN 1D ^1H) confirme la structure chimique du maltosylfructoside.

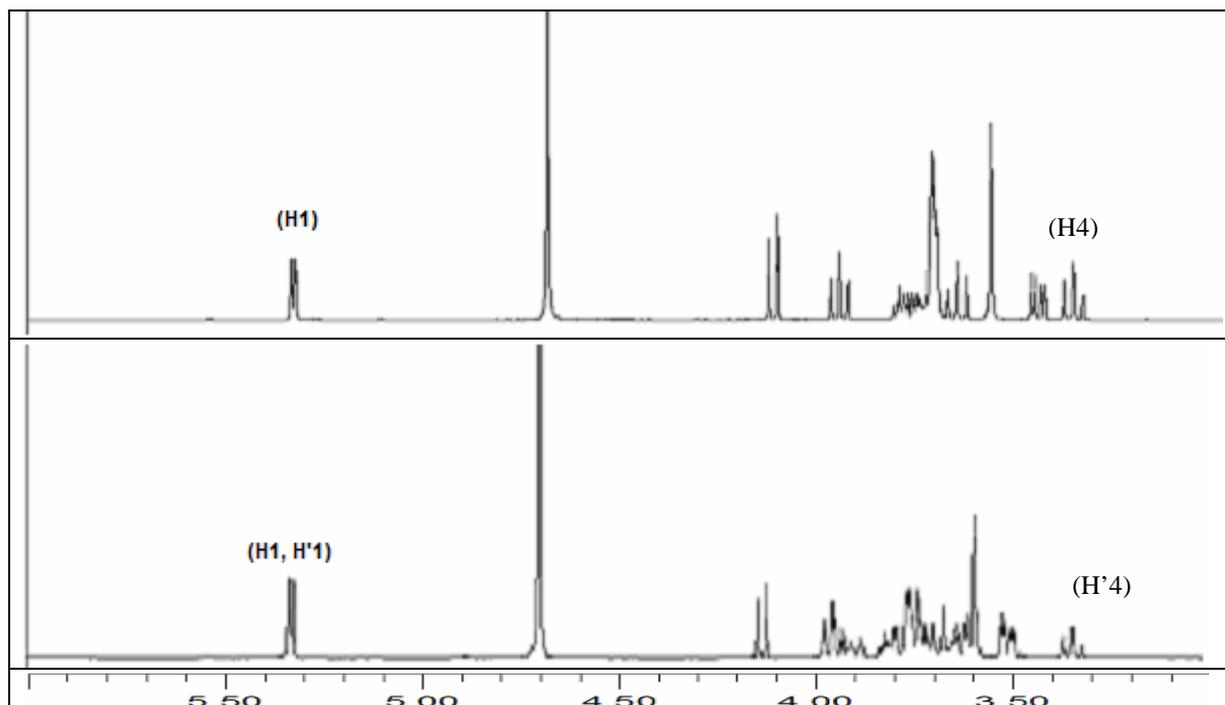


Figure 51: Spectre RMN ^1H du saccharose et du G2F

(spectre du haut : saccharose ; spectre du bas : DP3)

5.4.1.3. Le spectre HSQC RMN 2D

En RMN bidimensionnelle, nous avons analysé les spectres de corrélations hétéronucléaires obtenus par des expériences HSQC et HMBC. Sur le spectre RMN 2D HSQC, les corrélations sont représentées par des taches correspondant au couplage entre les atomes de carbone (RMN 1D ^{13}C en position verticale) et les protons qu'ils portent (RMN 1D ^1H en position horizontale). En comparant le spectre HSQC du DP3 à celui du saccharose, on distingue aisément les taches de corrélation hétéronucléaires entre les carbones anomères et les protons respectifs des résidus glucosyles (C1/H1) du saccharose et du composé DP3 (C1/H1 et C'1/H'1). On distingue également les taches de corrélations hétéronucléaires (C4/H4) entre le carbone C4 du glucosyle du saccharose et son proton ainsi que (C'4/H'4) entre le carbone C'4 du glucosyle ajouté par l'enzyme et son proton H'4. Ce résultat confirme

que le signal observé à $\delta = 5,32$ ppm est bien celui des protons des carbones anomères du glucose (figure 52).

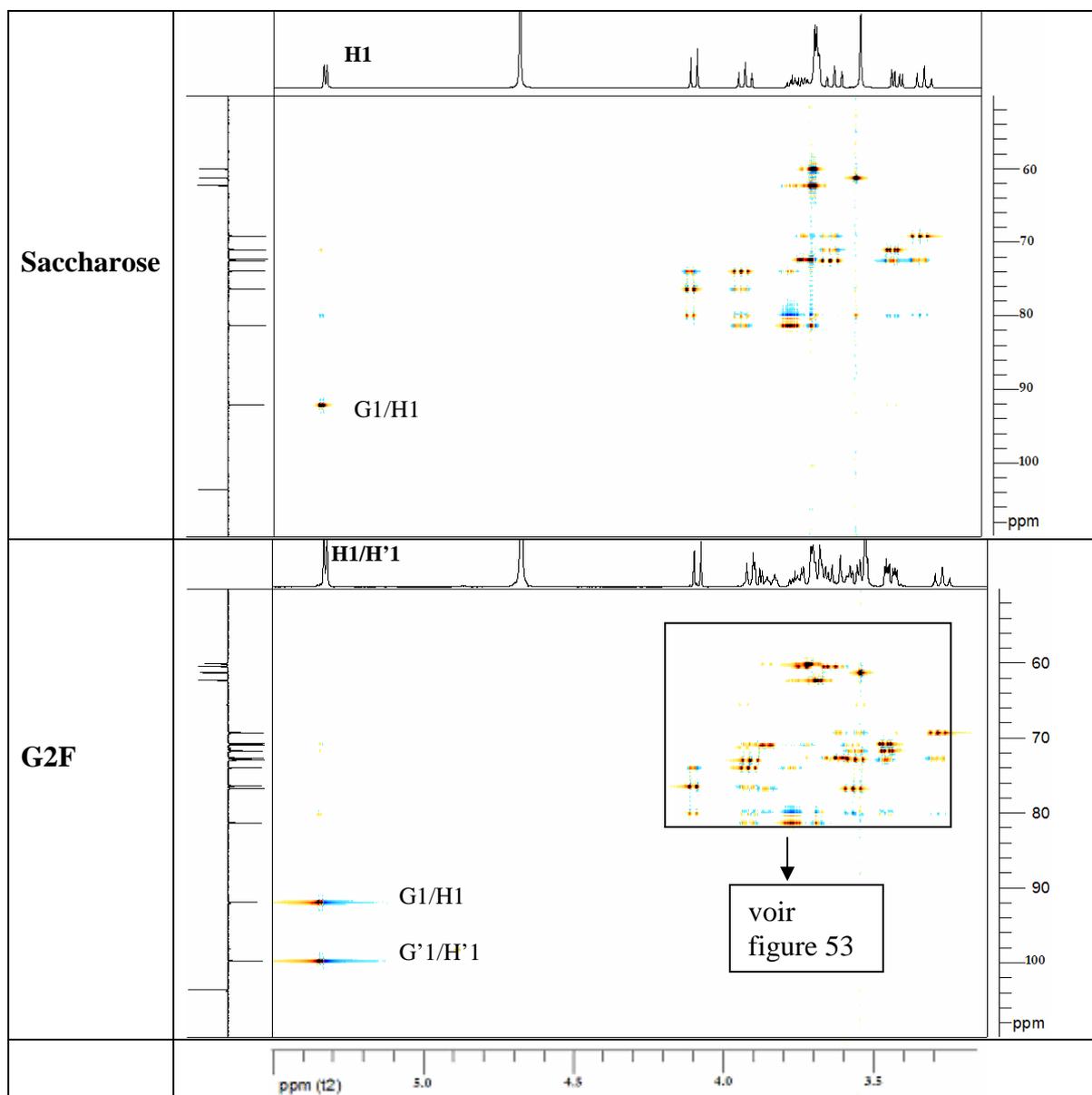


Figure 52: Spectres HSQC montrant les couplages $^1J_{C-H}$ du saccharose et du G2F

(G : glucosyle du saccharose ; G' : premier glucosyle fixé par l'enzyme ; G'' : deuxième glucosyle fixé)

L'agrandissement de la zone encadrée du spectre HSQC du G3F permet d'attribuer toutes les autres taches de corrélations (figure 53).

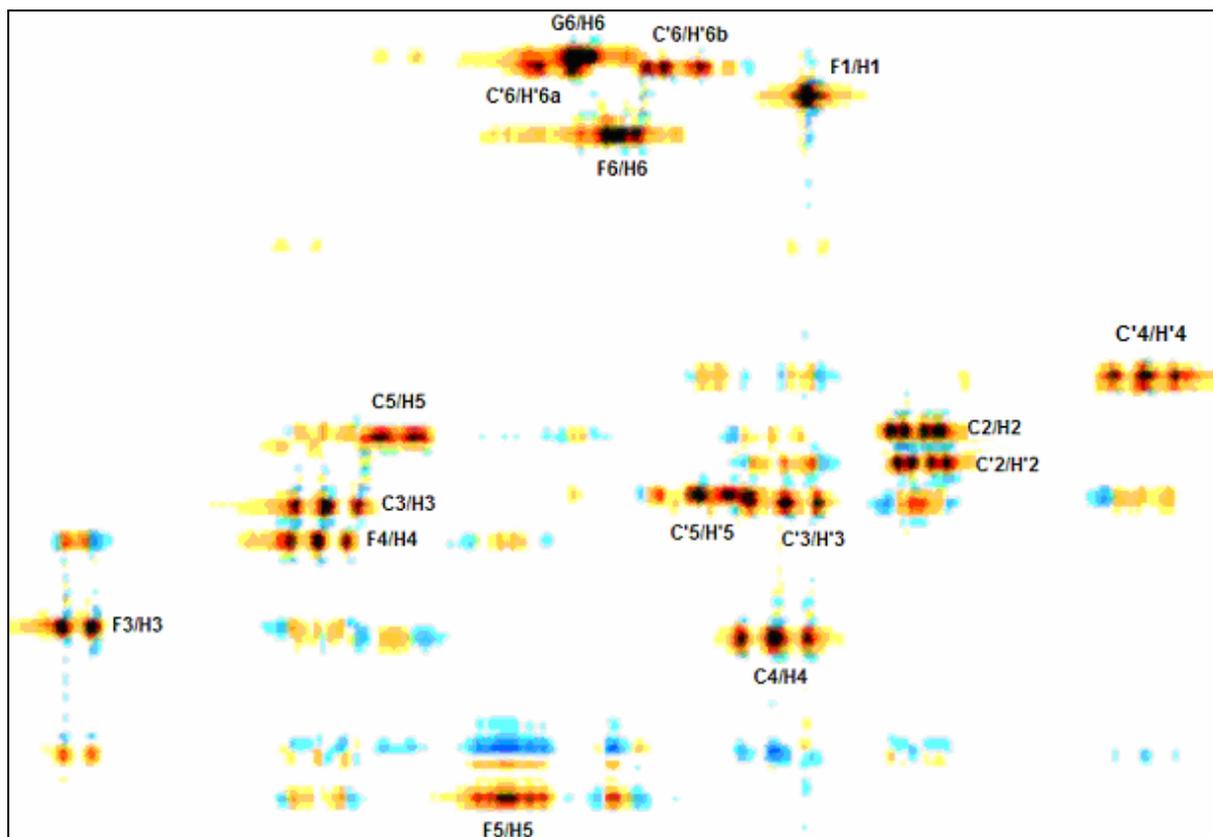


Figure 53: Agrandissement de la zone encadrée du spectre HSQC du G2F pour la mise en évidence des couplages $^1J_{C-H}$

(Les carbones sont désignés par Fx : fructose du saccharose; Cx : glucosyle du saccharose; C'x : premier glucosyle fixé par l'enzyme et les protons par le numéro du carbone qui les porte)

5.4.1.4. Le spectre HMBC RMN 2D

Nous avons ensuite analysé les résultats des expériences bidimensionnelles hétéronucléaires (HMBC). Dans ce cas, les taches de corrélations ($^3J_{C-H}$) visibles sur le spectre 2D correspondent aux couplages entre les atomes de carbones (RMN 1D ^{13}C en ordonnée) et le(s) proton(s) (1H). Le spectre du saccharose indique aisément des taches de corrélations entre les protons anomères et les carbones C2 du fructose et C4 du glucose. Quand au spectre du composé G2F, il indique une autre tache de corrélation entre le carbone C4 du glucose et le pic des protons anomères en plus des taches de corrélation du saccharose. La seule différence entre les deux molécules (saccharose et G2F)

étant le glucosyle ajouté, la nouvelle tache de corrélation observée indique donc que ce glucosyle est lié par son hydroxyle anomère au C4 du glucose du saccharose par une liaison osidique $\alpha(1\rightarrow4)$ (figure 54). Les résultats obtenus par les différentes expériences RMN 2D HSQC et HMBC confirment que le composé DP3 est le maltosylfructoside de formule α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4) α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2) β -D-fructofuranoside.

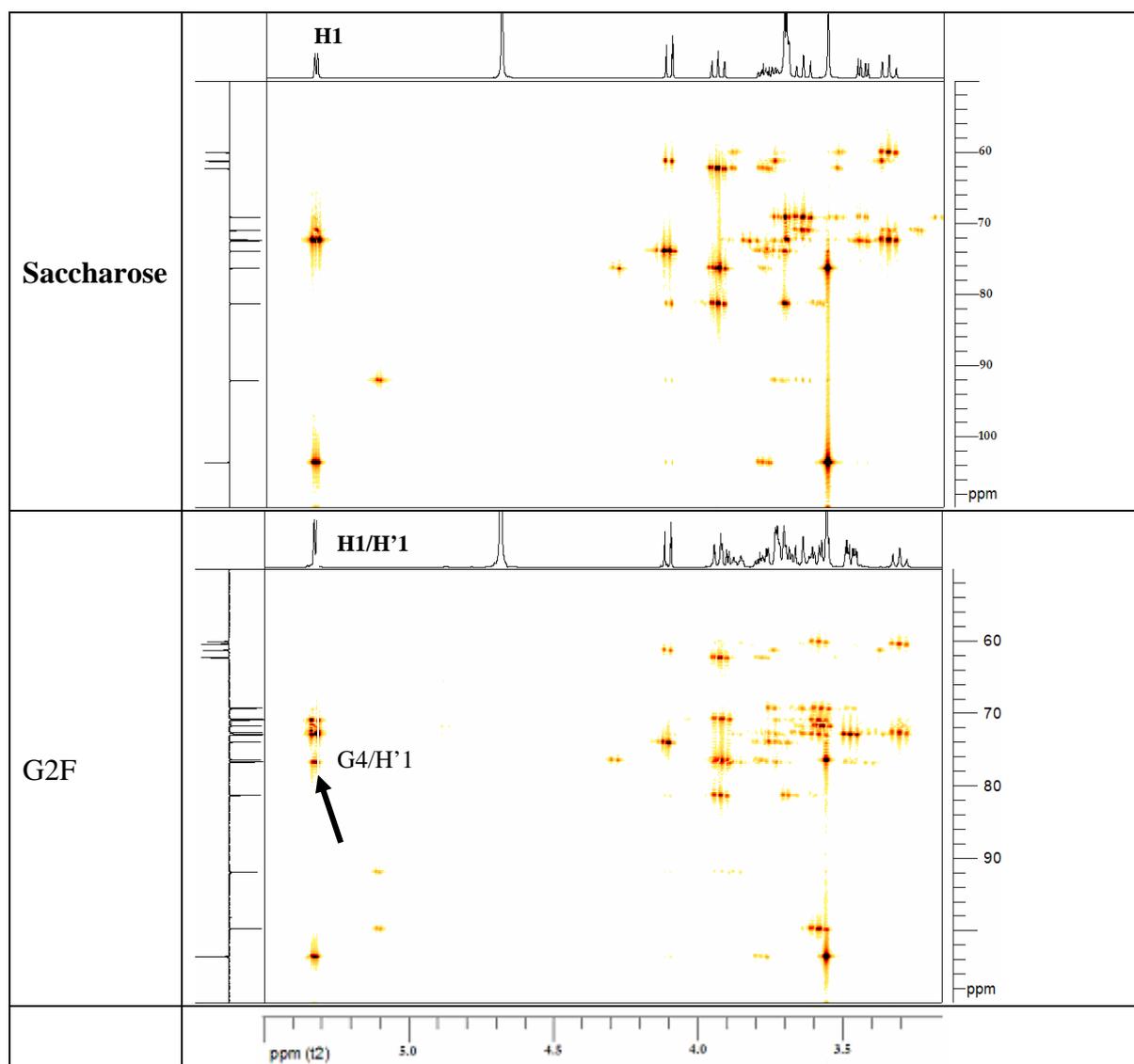


Figure 54: Spectres HMBC montrant les couplages $^3J_{C-H}$ du saccharose et du G2F

(G : glucosyle du saccharose ; G' : premier glucosyle fixé par l'enzyme)

5.4.2. Le composé DP 4

5.4.2.1. Les spectres de RMN monodimensionnelle (^1H et ^{13}C)

Nous avons utilisé la même chronologie d'analyse que pour les spectres du composé G2F. L'attribution des déplacements chimiques des carbones (^{13}C) du composé DP4 est effectuée en comparant le spectre du composé DP4 à ceux du saccharose, du composé G2F et des valeurs de référence du maltotriosylfructoside. Les valeurs des déplacements chimiques des carbones (^{13}C) sont résumées ci-dessous (tableau 11).

Tableau 11: Déplacements chimiques (^{13}C) des carbones du saccharose et des oligosaccharides purifiés.

Les valeurs des déplacements (δ en ppm)

Composé	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Saccharose						
α -glc-(1 \rightarrow 2)-	92,9	71,9	73,4	70,0	73,2	61,0
β -fru	62,2	104,5	77,3	74,8	82,2	63,2
DP3						
α -glc-(1 \rightarrow 4)-	100,6	72,6	73,8	70,2	73,5	61,3
α -glc-(1 \rightarrow 2)-	92,8	71,7	73,7	77,7	71,8	61,1
β -fru	62,2	104,5	77,3	74,8	82,2	63,2
DP4						
α -glc-(1 \rightarrow 4)-	100,6	72,6	73,8	70,2	73,5	61,3
α -glc-(1 \rightarrow 4)-	100,4	72,4	74,2	77,8	72,1	61,3
α -glc-(1 \rightarrow 2)-	92,8	71,7	73,7	77,7	71,8	61,1
β -fru	62,2	104,5	77,3	74,8	82,2	63,2

Tous les signaux de carbone ont été ainsi identifiés et attribués sur le spectre (^{13}C) (figure 55).

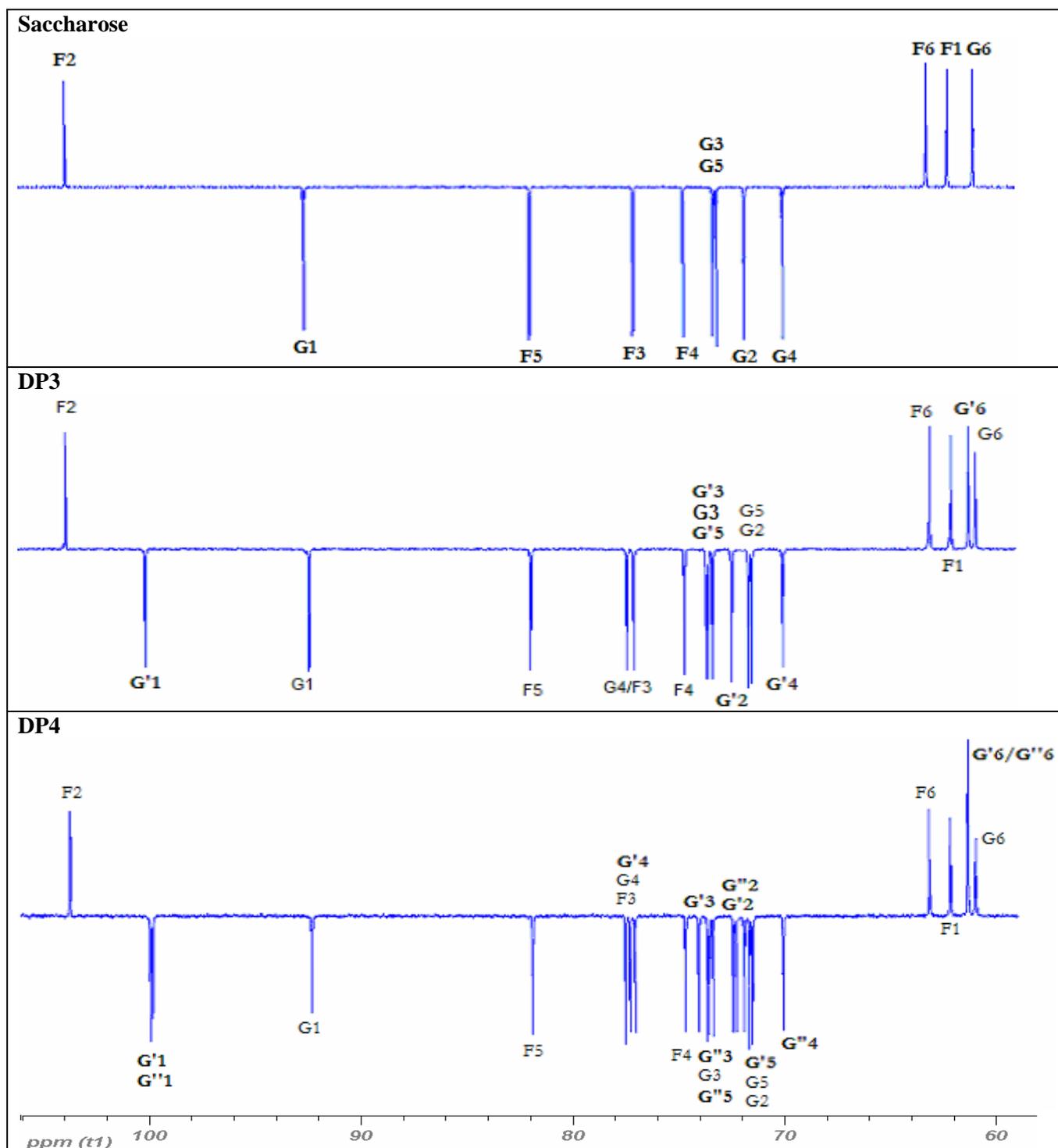


Figure 55 : Spectres ^{13}C RMN du saccharose et des composés DP3 et DP4

F : fructose du saccharose ; G : glucose du saccharose ; G' et G'' : premier et second glucose ajoutés

Sur le spectre ^{13}C du composé DP4, ces résultats concordent avec ceux obtenus lors de l'analyse par HPAEC, hydrolyse enzymatique et

spectrométrie de masse. Ils indiquent que le composé analysé est formé de 4 unités osidiques (3 glucoses et un fructose) dont la structure correspond à un composé G2F auquel une unité glucosyle est ajoutée. Des déplacements chimiques caractéristiques sont observés à $\delta = 100,6$ ppm, $\delta = 77,8$ ppm et $70,2$ ppm. Ils indiquent qu'un autre glucosyle (G'') est lié par son carbone anomère (C''1) au résidu G' du G2F par une liaison osidique $\alpha(1\rightarrow4)$ et que le carbone C''4 de ce glucosyle ajouté est libre. Nous notons également d'une part, que les pics des carbones C'1 et C''1 respectivement liés aux carbones C4 et C'4 sont bien distincts et d'autre part, que le pic du C'4 du glucose terminal du G2F ($\delta=70,2$ ppm) est déblindé et passe à $\delta = 77,8$ ppm à cause de sa liaison au C''1 du nouveau glucosyle ajouté. Ces résultats concordent avec les valeurs de références publiées (Bock et coll., 1984 ; Monthieu, 2002 ; Martin et coll., 2004). Ils indiquent que la formule du composé DP4 est : α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4) α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4) α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2) β -D-fructofuranoside ou maltotriosylfructoside (figure 56).

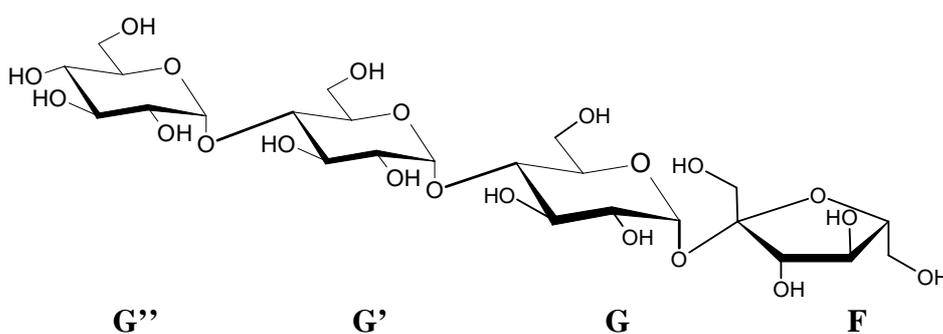


Figure 56 : Structure du maltotriosylfructoside

L'intégration du spectre ^1H en RMN 1D permet de confirmer la présence des protons anomères de trois résidus glucose. Le proton H''4 est aussi bien distinct et libre (figure 57).

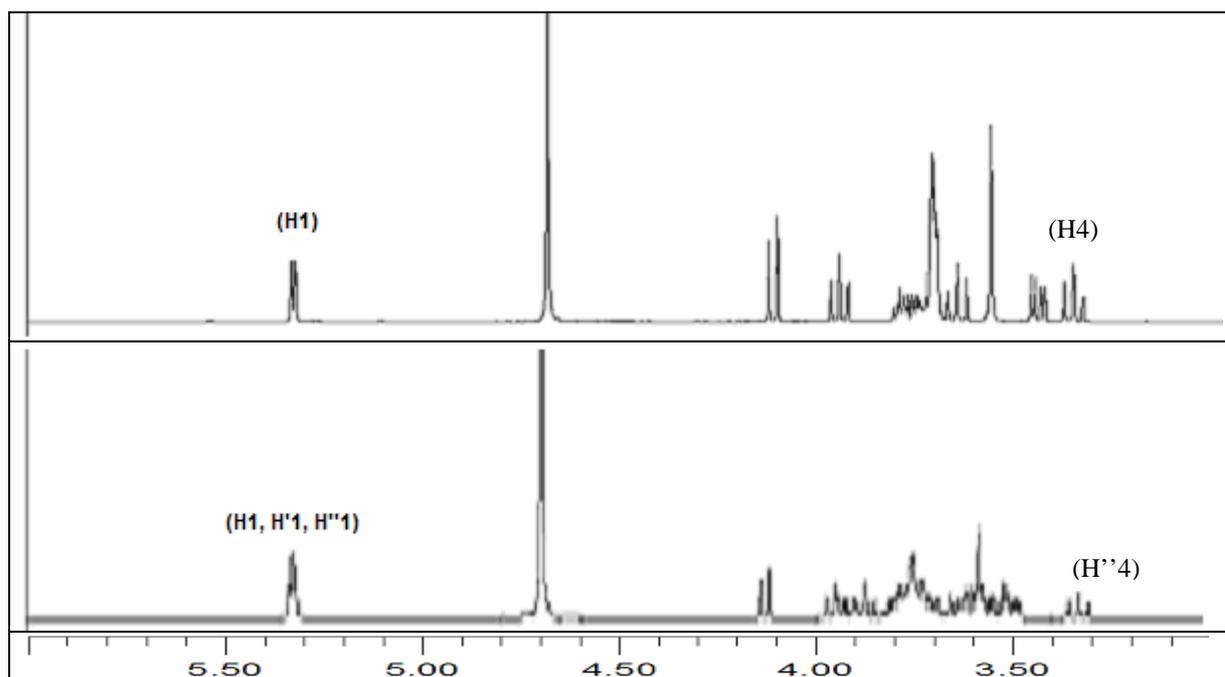


Figure 57: Spectre RMN ^1H à 400 MHz du saccharose et du G3F

(spectre du haut : saccharose ; spectre du bas : DP4)

5.4.2.2. Les spectres de RMN bidimensionnelle (HSQC et HMBC)

Dans un souci de concision nous avons focalisé l'analyse des résultats sur l'observation d'éléments caractéristiques comme la présence de taches de corrélation sur les spectres HSQC et HMBC. Ainsi, sur le spectre de RMN bidimensionnelle ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$) HSQC, nous observons une tache de corrélation entre les carbones C'1 et C''1 d'une part et les protons anomères du glucose d'autre part (figure 58). Ce résultat indique que le proton anomère supplémentaire observé (figure 57) est bien celui du carbone C''1 du glucosyle ajouté au G2F.

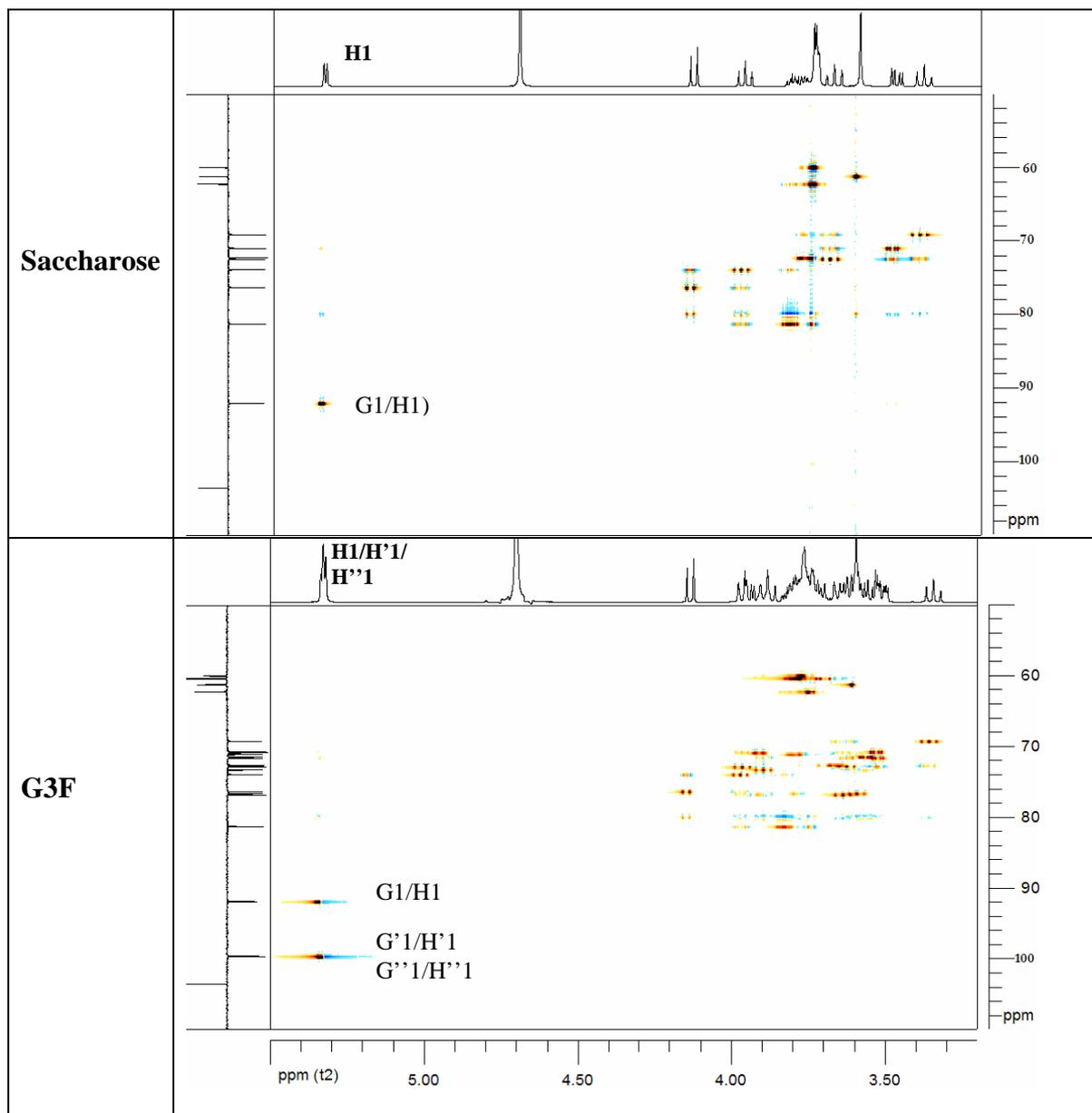


Figure 58 : Spectres HSQC montrant les couplages $^1J_{C-H}$ du saccharose et du G3F

Saccharose : couplage 1J impliquant le proton H1 anomère (G)

G3F : couplage 1J entre les protons (H'1, H''1) et les carbones (G'1 et G''1) anomères

(G : glucosyle du saccharose ; G' : premier glucosyle fixé par l'enzyme ; G'' : deuxième glucosyle fixé)

Concernant le spectre bidimensionnel ($^1H/^{13}C$) HMBC du composé DP4, son analyse révèle comme pour le G2F une tache de corrélation caractéristique entre les protons anomères des résidus de glucose et les carbones déblindés (C4 et C'4) des unités glucosyles, contrairement au spectre du saccharose

(figure 59). Le glucosyle ajouté au G2F est donc lié par son hydroxyle anomère au carbone C'4 du DP3 par une liaison osidique $\alpha(1\rightarrow4)$. Tous ces résultats confirment que le composé DP4 est bien le maltotriosylfructoside.

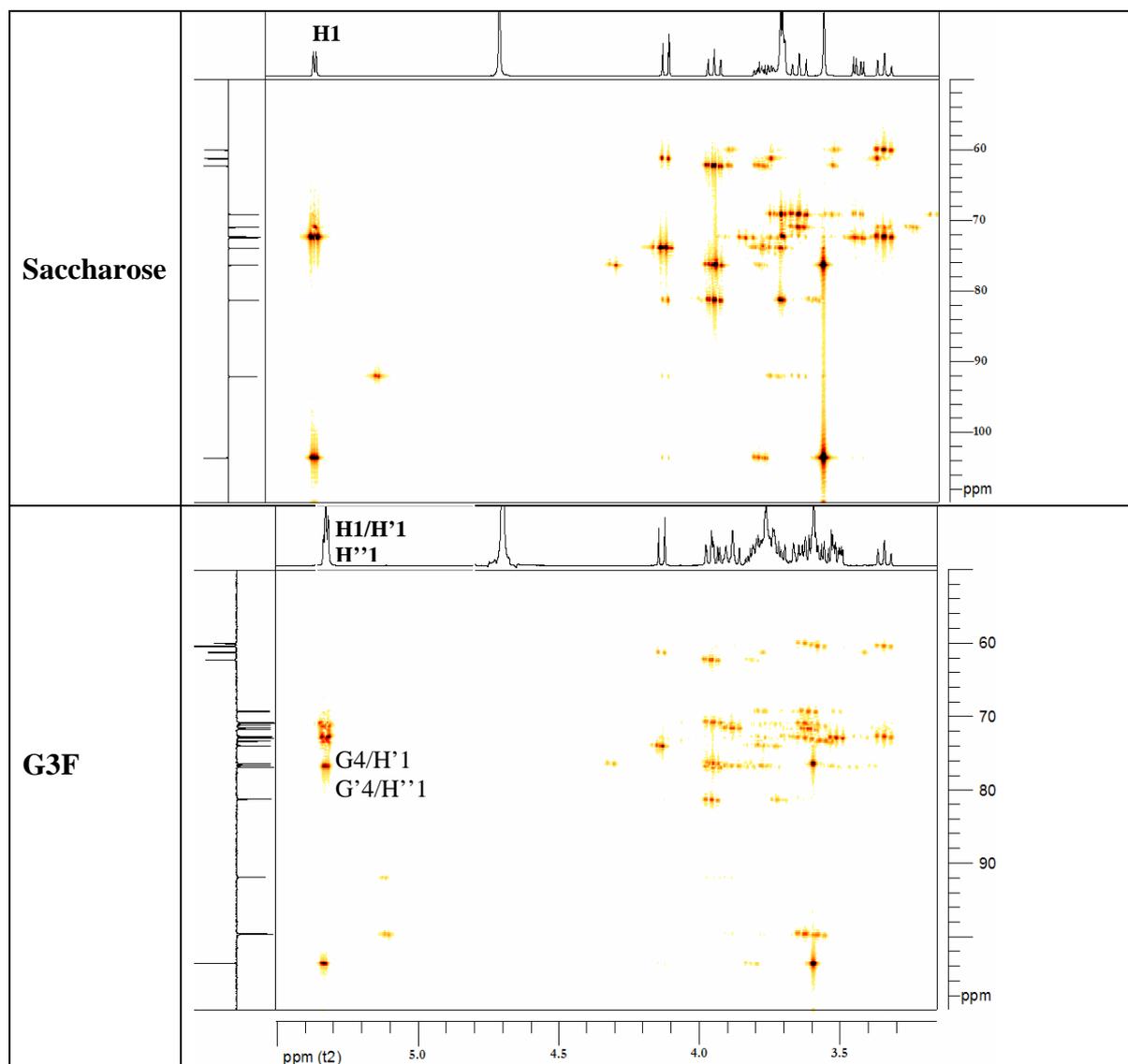


Figure 59: Spectres HMBC montrant les couplages $^3J_{C-H}$ du saccharose et du G3F

Saccharose : pas de couplage 3J impliquant le C4 (G); DP4 : couplage 3J entre le C'4 (G') et le H''1 (G'')
(G : glucosyle du saccharose ; G' : premier glucosyle fixé par l'enzyme ; G'' : deuxième glucosyle fixé)

5.4.3. *Les autres produits de la réaction de transglucosylation*

Après la purification et la caractérisation du maltosylfructoside (DP3) et du maltotriosylfructoside (DP4), nous cherchons à déterminer la structure des autres composés (DP5 à DP8) du milieu réactionnel que nous n'avons pas pu purifier. Nous utilisons une méthode basée sur l'analyse en chromatographie ionique (HPAEC-PAD) des maltooligosaccharides. Des travaux précédents indiquent qu'en HPAEC-PAD les polyglucosylfructosides ont un comportement chromatographique (séparation par DP croissants) similaire à celui des maltooligosaccharides permettant de les séparer et de les identifier même au-delà d'un DP 7 (Monthieu, 2002 ; Monthieu et coll., 2003). Les composés DP3 et DP4 ayant la structure des PGFs, nous allons vérifier si une telle relation peut être établie entre eux et les autres produits de la réaction.

5.4.3.1. Le test de corrélation

Les résultats de l'analyse par HPAEC-PAD permettent la représentation graphique de l'évolution des temps de rétention des différents produits de la réaction en fonction de leur masse moléculaire (selon le DP donné par l'analyse HPAEC-PAD et confirmé par MS pour le DP3 et le DP4). Parmi tous les produits de la réaction, nous observons que seuls les composés de DP 5 à DP8 se distinguent. Ils (DP5 à DP8) sont parfaitement alignés avec le G2F et le G3F sur une même courbe avec un haut coefficient de corrélation ($r^2=0,9963$) (figure 60).

5.4.3.2. Les structures des composés inconnus

Par analogie avec les observations de Monthieu et coll. (2002) nous pouvons déduire de la corrélation observée entre les composés de DP3 à DP8 (figure 60) que les composés DP5 à DP8 appartiennent à la même famille

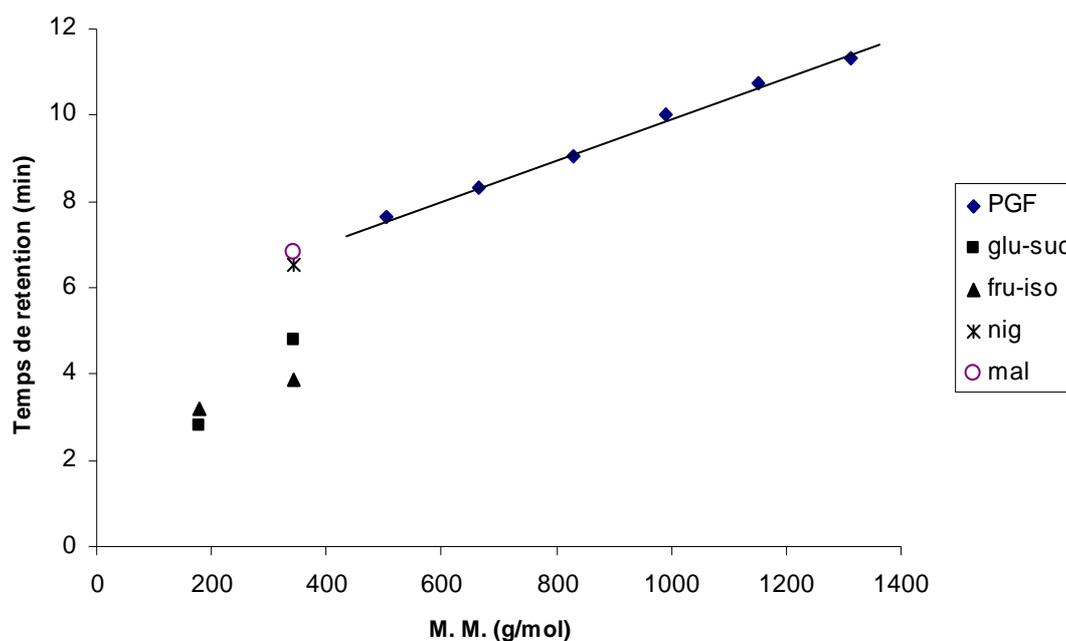


Figure 60: Courbe de corrélation entre les temps de rétention par HPAEC des PGF et les masses moléculaires.

(élution par un gradient d'acétate de sodium 600 mM de 1% à 100% en 30 min dans la soude 150 mM)

d'oligosaccharides que le maltosylfructoside (DP3) et le maltotriosylfructoside (DP4). Tous ces produits ont donc la même formule générale GnF et se distinguent par le nombre d'unités glucosyles liées entre elles et au glucose du saccharose par des liaisons osidiques $\alpha(1\rightarrow4)$. Cette observation implique que les composés inconnus de DP5 à DP8 sont respectivement formés par l'ajout successif de 3, 4, 5 et 6 unités glucosyles au résidu glucose du saccharose par des liaisons osidiques $\alpha(1\rightarrow4)$. Ces différents composés peuvent être représentés selon la figure suivante (figure 61).

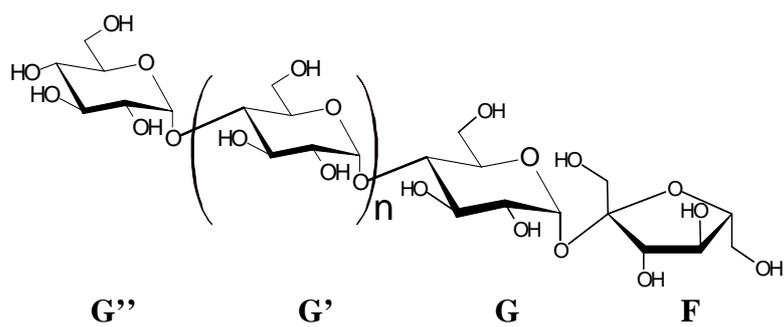


Figure 61: Structure générale des polyglucosylfructosides ($n = 0$ à 5)

DISCUSSION

La purification de l' α -glucosidase du suc digestif de l'escargot *A. ventricosa* a permis de mettre en évidence sa capacité de transglucosylation. L'influence du pH sur cette activité de transglucosylation est différente de celle observée pour l'hydrolyse. En effet, alors que le pH d'hydrolyse du saccharose est optimal à pH 5,5 l'activité de transglucosylation est optimale sur une gamme plus large (pH 4 à 5,5). L' α -glucosidase de la blatte présente également une différence entre le pH optimal d'hydrolyse et celui de la réaction de transglucosylation (Kouamé et coll., 2005). La présence du substrat en excès semble exercer un effet protecteur qui stabilise l'enzyme sur une gamme de pH plus large que lorsqu'elle est dans les solutions diluées de substrat.

La production des oligosaccharides par l' α -glucosidase de *A. ventricosa* varie en fonction de la concentration en saccharose. En effet, aux faibles concentrations en saccharose, le transfert du glucosyle sur l'eau (l'hydrolyse) est favorisé et le rendement de transglucosylation est faible. La situation s'inverse lorsque la synthèse se fait en présence d'une augmentation progressive de substrat avec une corrélation entre l'augmentation de la teneur en substrat et le rendement de transglucosylation contrairement au taux de monosaccharide qui semble limité autour d'un seuil. Ce type de profil a été obtenu avec la levanesucrase de *Lactobacillus reuteri* (van Hijum et coll., 2004) ainsi que celle de *L. sanfranciscensis* TMW 1.392 (Tieking et coll., 2005a) pour lesquelles une stagnation voir une baisse de l'hydrolyse sont notées alors que l'activité de transglycosylation est corrélée à la hausse de la concentration en substrat. La non saturation des glucosyltransférases aux fortes concentrations a été noté de même que le fait qu'une concentration en saccharose supérieure à 100 mM favorise les réactions de transfert par rapport à l'hydrolyse du saccharose (Kralj et coll., 2004). Une des explications est que l'eau en excès entre en compétition avec l'accepteur et déplace ainsi

l'équilibre de la réaction vers l'hydrolyse (Scigelova et coll., 1999). Pour favoriser la réaction dans le sens de la synthèse, il faut donc soit augmenter la concentration du(des) substrat(s), diminuer l'activité de l'eau ou extraire les produits de la réaction. Des gluco-, manno- et galactooligosaccharides ont été synthétisés par cette approche (Monsan et coll., 1989). Cela explique pourquoi nous avons utilisé de fortes concentrations initiales de saccharose pour la synthèse des oligosaccharides.

Dans nos conditions expérimentales, l'analyse du milieu de synthèse montre une variation de sa composition au fil du temps. La formation successive de différents pics de composés, ainsi que les différents changements de l'intensité des pics observés suggèrent la synthèse progressive de produits de masses moléculaires différentes. L'analyse de ce milieu permet d'expliquer la variation de la composition en oligosaccharides au fil du temps par des réactions de transferts intermoléculaires que l'enzyme réalise entre les différents produits de la réaction. Le profil des courbes de la cinétique de transglucosylation est en effet comparable à celui obtenu avec l' α -glucosidase de *Paecylomyces lilacinus* ou de *Acremonium implicatum* en utilisant le maltose comme seul substrat. Ces enzymes produisent des oligosaccharides de DP3 aux premières heures de la réaction de transglucosylation puis les hydrolysent ensuite pour libérer du glucose ou former des DP4, DP5 et les autres oligosaccharides à DP supérieur en moindre quantité lorsque la réaction est prolongée à plusieurs heures (Kobayashi et coll., 2003 ; Yamamoto et coll., 2004). Lors de la production des PGFs par la CGTase, une réutilisation des GnF ayant un DP supérieur à 4 unités a été observée ; plus le DP d'un produit est grand, plus tôt il est reconsommé (Monthieu et coll., 2003). Enfin, l'augmentation de l'affinité de l'enzyme pour les donneurs de glucosyles en fonction de leur DP a été également notée (Bender, 1988) confirmant ainsi que le saccharose est un mauvais accepteur et que cette défaillance est compensée lorsqu'il est en excès (van Hijum et coll., 2002 ; Tieking et coll.,

2005a). Les PGF de plus haut DP deviennent ainsi des donneurs de glucosyles à cause de l'excès de saccharose ce qui aboutit principalement à la formation de maltosylfructoside et maltotriosylfructoside. Ces observations expliquent pourquoi les produits que nous obtenons dans nos conditions expérimentales (excès de substrat et longue durée) sont en majorité le DP3 et DP4. Les oligosaccharides de DP5 à DP8 sont présents en moindre quantité. La production d'un mélange plus homogène de PGFs de différents DP dépend donc de plusieurs facteurs. Entre autres, elle nécessite une optimisation qui se traduira par un compromis entre la concentration initiale en substrat et la durée de la réaction en tenant compte uniquement de la composition des produits et non de la consommation totale du substrat.

L'analyse des constituants du milieu réactionnel par HPAEC-PAD a permis de les subdiviser en deux groupes. Le maltose, l'isomaltose et le nigerose qui sont formés par deux résidus successifs de glucose forment le premier sous-groupe. L'autre sous-groupe est constitué de composés non identifiés formant une série de DP3 à DP8. Les composés à DP3 (le plus abondant) et DP4 (le suivant en quantité) de la série de DP3 à DP8 ont été purifiés. Les structures de ces deux principaux produits de la réaction de transglucosylation ont été ensuite déterminées par hydrolyse enzymatique, spectrométrie de masse et RMN. Ces analyses ont établi que le composé DP3 est le maltosylfructoside (G2F), tandis que le composé DP4 est le maltotriosylfructoside (G3F). Les composés G2F et G3F sont constitués d'une molécule de saccharose dont le glucosyle porte par le biais d'une liaison osidique $\alpha(1\rightarrow4)$ une molécule de glucose (cas de G2F) ou deux molécules de glucose elles-mêmes liées entre elles par des liaisons osidiques $\alpha(1\rightarrow4)$ (cas de G3F). Ces structures sont en parfaite concordance avec les valeurs de référence rapportées par d'autres auteurs (Bock et coll., 1984 ; Monthieu et coll., 2003 ; Bubb, 2003 ; Martin et coll., 2004). Cependant, tous les composés n'ayant pu être purifiés, la recherche d'une corrélation entre les différents produits a montré (par la

chromatographie d'échange d'ions HPAEC-PAD) que les composés de la série de DP3 à DP8 sont de la même famille que le G2F (DP3) et le G3F (DP4) purifiés. Ils appartiennent donc à la famille des polyglucosylfructosides (PGF) dont la structure est caractéristique. Elle est constituée de maltooligosaccharides de différentes tailles liés au glucosyle du saccharose par une liaison $\alpha(1\rightarrow4)$. En RMN (^{13}C), l'attribution des déplacements chimiques des carbones du maltosylfructoside (G2F), du maltotriosylfructoside (G3F) et du saccharose montre que les carbones C1, C'1 et C''1 ainsi que les carbones C4 et C'4 liés des glucosyles ne sont pas superposés. Cela implique que les carbones de ces glucosyles subissent des environnements différents. Cependant, sur les spectres ^{13}C de G2F et G3F les signaux des carbones occupant des positions similaires (exemples sur G3F : G'1 et G''1 ; G'2 et G''2 ; G3, G'3 et G''3 etc.) sur les différents résidus glucose sont proches. Cette observation également faite par Monthieu et coll. (2003) qui ont purifié les polyglucosylfructosides (PGF) jusqu'à DP8, indique que les signaux de ces carbones finissent par fusionner ce qui donne trois types d'environnements moléculaires pour les résidus de glucose lorsque le DP augmente. On distingue ainsi les déplacements chimiques spécifiques des carbones respectifs du glucose lié au fructose, des glucoses intermédiaires et du glucose de l'extrémité des GnF ainsi que ceux du fructose. Finalement les pics des carbones des glucosyles intermédiaires ayant les mêmes liaisons et les mêmes positions dans la structure des PGF augmentent spécifiquement car ils correspondent chacun à la somme de déplacements chimiques de plusieurs carbones. Le rapprochement de ces observations avec la corrélation entre les composés inconnus et ceux purifiés indique que la distribution en série de certains produits de la réaction de transglucosylation concorde avec leur appartenance à la même famille des PGF (Monthieu et coll., 2003 ; Martin et coll., 2004). L' α -glucosidase purifiée du suc digestif de l'escargot catalyse

donc la synthèse des PGFs de DP3 à DP8 à partir du saccharose utilisé seul comme donneur et accepteur de glucosyles.

Les produits de la réaction de disproportionation du saccharose permettent ainsi de déduire certaines réactions catalysées par l' α -glucosidase purifiée. Ce sont : (i) la formation du glucosyl-enzyme avec libération du fructose, (ii) le transfert du glucosyle sur l'eau (hydrolyse), (iii) le transfert du glucosyle sur le glucose précédemment libéré par hydrolyse du saccharose pour donner le maltose (a), le nigérose (b), l'isomaltose (c), (iv) le transfert du glucosyle sur le saccharose pour donner le maltosylfructoside, (v) le transfert successif de résidus glucosyles sur le saccharose ou certains PGFs pour former d'autres PGFs de tailles différentes (figure 62).

La comparaison des proportions relatives de ces différents produits dans le mélange réactionnel indique la préférence de l'enzyme pour la formation des liaisons $\alpha(1\rightarrow4)$ (PGFs et maltose) par rapport aux liaisons $\alpha(1\rightarrow3)$ (nigérose) et aux liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$ (isomaltose) pour les produits identifiés. L'anomérisation α de tous les produits formés implique que l'enzyme catalyse les différentes réactions avec une rétention de la configuration α du résidu glucosyle du saccharose. Ce résultat implique également que la spécificité des groupes hydroxyles glycosylés par la réaction de transglucosylation ne dépend pas toujours de la spécificité de l'hydrolyse (Chiba, 1979). La multiplicité des types de liaisons osidiques des produits de transglucosylation se retrouve aussi dans les produits des α -glucosidases de sarrasin (Chiba et coll., 1985), de *Paecylomyces lilacinus* (Kobayashi et coll., 2003) et de l' α -glucosidase IV de l'épinard (Sugimoto et coll., 2003). L'obtention des isomères est d'ailleurs l'un des facteurs limitants de la réaction de transglucosylation catalysée par les glycosidases (Ajisaka et coll., 1987, Malà et coll., 1999).

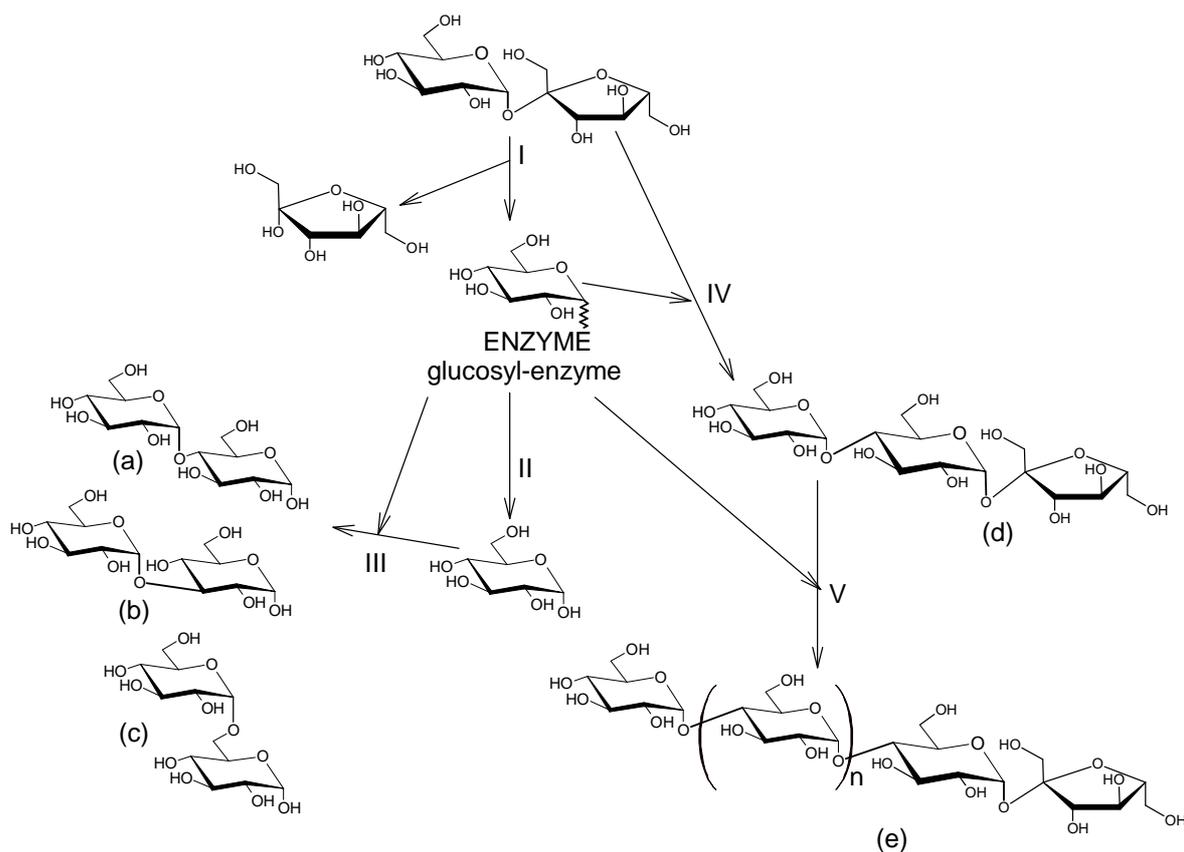


Figure 62: Schéma des réactions catalysées par l' α -glucosidase purifiée

(i) la formation du glucosyl-enzyme avec libération du fructose, (ii) le transfert du glucosyle sur l'eau (hydrolyse), (iii) le transfert du glucosyle sur le glucose précédemment libéré par hydrolyse du saccharose pour donner le maltose (a), le nigérose (b), l'isomaltose (c), (iv) le transfert du glucosyle sur le saccharose pour donner le maltosylfructoside (d), (v) le transfert successif de résidus glucosyles sur le saccharose ou les PGFs pour former d'autres PGFs (e).

Le mélange des produits de la réaction de disproportionation du saccharose par l' α -glucosidase purifiée de *A. ventricosa* comportant des PGFs, du maltose et ses isomères, du saccharose résiduel ainsi que du glucose et du fructose est semblable à celui de certaines préparations commerciales (Crittenden et Playne, 1996 ; Yamamoto et coll., 1990). C'est le cas des PGFs obtenus par l'action d'une CGTase sur un mélange amidon/saccharose et commercialisé par la société Malysienne STEVIAN sous le nom de «Olitose-FTO» (FTO : Fructo-Terminated Oligosaccharides) (site : www.stevianbiotech.com).

Les α -glucosidases d'autres sources (un mollusque marin (Andreotti et coll., 2006) ou l'épinard (Sugimoto et coll., 2003)) ont aussi permis la synthèse de PGFs à partir d'un mélange de pNP α -D-glucopyranoside ou maltose et de saccharose. L' α -glucosidase de *Bacillus sp* SAM 1606 est également utilisée pour synthétiser le glucosylsucrose et le 6-O-glucosylsucrose à partir du saccharose (Okada et coll., 2002). Cependant, l'obtention des PGFs à partir du seul saccharose par l'action de l' α -glucosidase purifiée de l'escargot *A. ventricosa* demeure particulière. A notre connaissance, c'est la première fois que la synthèse des PGFs de DP3 à DP8 à partir du seul saccharose comme donneur et accepteur de glucosyles est rapportée. Ce résultat peut aussi indiquer que dans d'autres cas de synthèse de PGFs, l'enzyme ne nécessitait pas forcément la présence d'un mélange de deux substrats.

IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La purification de l'enzyme du suc digestif de l'escargot *Archachatina ventricosa* catalysant l'hydrolyse du saccharose n'a pas pu se faire par les méthodes classiques de chromatographies. L'implication de l'électrophorèse préparative et la coloration spécifique de l'activité enzymatique dans le gel de polyacrylamide par l'hydrolyse du pNP α -D-glucoopyranoside ont permis de localiser l'enzyme et d'atteindre l'objectif de purification à homogénéité. Quelques caractéristiques physico-chimiques de l'enzyme déterminées après sa purification, indiquent que l'enzyme purifiée est une α -glucosidase qui hydrolyse de préférence les substrats hétérogènes comme le saccharose et le pNP α -D-glucoopyranoside par rapport aux substrats homogènes (glucooligosaccharides ou gluco polysaccharides). L'enzyme est aussi une glycoprotéine de 138 kDa constituée de deux monomères identiques de 66 kDa chacun. Elle a un pH optimal d'activité hydrolasique de 5,5, une température optimale de 45°C et elle transfère des résidus glucosyles à partir du saccharose.

Les essais de synthèse de polymères à partir du saccharose par l' α -glucosidase purifiée du suc digestif de l'escargot *Archachatina ventricosa* ont abouti à l'obtention de plusieurs oligosaccharides. Les analyses par HPAEC, hydrolyse enzymatique, spectrométrie de masse (MS) et RMN révèlent qu'il s'agit du maltose, de l'isomaltose, du nigérose et d'une série de polyglucosylfructosides de DP3 à DP8 formés d'oligosaccharides de glucose liés entre eux et au résidu glucosyle du saccharose par des liaisons osidiques $\alpha(1\rightarrow4)$. Les proportions de ces différents composés dans le mélange réactionnel montrent que l'enzyme forme de préférence les liaisons osidiques $\alpha(1\rightarrow4)$ et dans une moindre mesure les liaisons osidiques $\alpha(1\rightarrow3)$ et $\alpha(1\rightarrow6)$.

Rappelons que les PGFs sont utilisés, entre autres, comme agents édulcorants non cariogènes, gustatifs et anticristallisants dans de nombreuses catégories

d'aliments comme les boissons, la confiserie et les médicaments (Okada et coll., 1974 et 1979). Ils sont essentiellement commercialisés sous les noms de «coupling sugars» (usine de Hayashibara, Japon) ou «Olitose-FTO» (usine de Stevian, Malaisie) qui les produisent par des méthodes de synthèse enzymatique nécessitant deux substrats différents. D'autres α -glucosidases utilisent le saccharose seul mais ne synthétisent que le DP 3, le DP 4 et leurs isomères. La synthèse enzymatique des PGFs (DP 3 à DP 8) par l' α -glucosidase de *Archachatina ventricosa* à partir du saccharose utilisé seul comme donneur et accepteur de glucosyles est donc particulière et souligne le potentiel de cette enzyme. A notre connaissance c'est la première fois que les PGFs (DP 3 à DP 8) sont ainsi obtenus. L' α -glucosidase purifiée de *A. ventricosa* permet donc d'envisager d'autres perspectives dans la méthode de synthèse de ces dérivés du saccharose ou d'autres composés glucosylés. Cependant, compte tenu des difficultés de l'étape de purification de l'enzyme, elle paraît uniquement indiquée pour l'étape d'évaluation des potentialités de l'enzyme. Nous suggérons de cloner et de surexprimer l' α -glucosidase de l'escargot *A. ventricosa* dans un organisme hôte approprié. Cela permettra l'étude des relations structure/fonction de l'enzyme clonée et l'amélioration de ces performances (rendement de transfert, spécificité de la réaction, stabilité) par évolution dirigée.

V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Alberto F., Bignon C., Sulzenbacher G., Henrissat B., Czjzek M. (2004). The three-dimensional structure of invertase (β -fructosidase) from *Thermotoga maritime* reveals a bimodular arrangement and an evolutionary relationship between retaining and inverting glycosidases. *J Biol Chem.* **279**: 18903-18910

Ajisaka K., Nishida H., Fujimoto H. (1987). The synthesis of oligosaccharides by the reverse hydrolysis reaction of β -glucosidase at high substrate concentration and at high temperature. *Biotechnol Lett.* **9**: 243-248

Albenne C., Skov L. K., Mirza O., Gajhede M., Feller G., D'Amico S., Andre G., Potocki-Veronese G., Van Der Veen B. A., Monsan P., Remaud-Simeon M. (2003) Molecular basis of the amylose-like polymer formation catalyzed by *Neisseria polysaccharea* amylosucrase. *J Biol Chem.* **279**: 726-734.

Amersham Biosciences, (2003). Protein separations' handbook collection CD ROM.

Andreotti G., Giordano A., Tramice A., Mollo E., Trincone A. (2006) Hydrolases and transglycosylations performed by purified α -D glucosidase of the marine mollusc *Aplysia fasciata*. *J Biotechnol.* **122**: 274-284.

Asenjo H. A. (1990). Separation processes in biotechnology. Marcel Dekker Inc./New York. 801 pages.

Azuma K., Toyofuku Y., Iesaki T., Otsuka A., Tanaka A., Mika T., Hirose T., Tanaka Y., Daida H., Kawamori R., Watada H. (2006). Ascarbose, an α -glucosidase inhibitor, improves endothelial dysfunction in Goto-Kakizaki rats exhibiting repetitive blood glucose fluctuation. *Biochem Biophys Res Commun.* **345**: 688-693

B

Banner D. W., Bloomer A. C., Petsko G. A., Philips D. C., Pogson C. I., Wilson I. A., Corran P. H., Furth A. J., Milman J. D., Offord R. E., Priddle J. D., Waley S. G. (1975). Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined by crystallography at 2.5 angstrom resolution using amino acid sequence data. *Nature*, **255**: 609-613

Bender H. (1988) "Studies on the reaction mechanism of cyclodextrin glycosyltransferases : subsite analysis" In : Huber O. and SZEJTLI J., eds, Proceedings of the fourth International Symposium on cyclodextrin (Kluwer, Germany), pp. 19-26

Berthelot (1860) cité par Sicard P. Valorisation enzymatique des glucides d'origine agricole. In : *Enzymes en agro-alimentaire*. Lavoisier Tech et Doc (Eds), Paris. 1997. 380 Pages

Bock K., Pedersen C., Pedersen H. (1984); "Carbon 13 nuclear magnetic resonance data for oligosaccharides". *Adv Carbohydr Chem Biochem.* **42**: 193-225

Boidin et Effront (1913) cité par Sicard P. Valorisation enzymatique des glucides d'origine agricole. In : *Enzymes en agro-alimentaire*. Lavoisier Tech et Doc (Eds), Paris. 1997. 380 Pages

Bolam D. N., Ciruela A., McQueen-Mason S., Simpson P., Williamson M. P., Rixon J. E., Boraston A., Hazlewood G. P., Gilbert H. J. (1998). *Pseudomonas* cellulose-binding domains mediate their effects by increasing enzyme substrate proximity. *Biochem J.* **331**: 775-781

Bourne Y., Henrissat B. (2001). Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: families and functional modules. *Curr Opin Struct Biol.* **11**: 593-600

Bozonnet S., Dols-Laffargue M., Fabre E., Pizzut S., Remaud-Simeon M., Monsan P., Willemot R-M. (2002). Molecular characterization of DSR-E, an alpha-1,2 linkage-synthesizing dextransucrase with two catalytic domains. *J Bacteriol.* **184**: 5753-5761

Bradford M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**: 248-254

Bubb W. A. (2003). NMR Spectroscopy in the study of carbohydrates: Characterizing the structural complexity. *Concepts Magn Reson.* Part A, **19A**: 1-19

C

Campbell J. A., Davies G. J., Bulone V., Henrissat B. (1997). A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J.* **326**: 929-939

Chia J. S., Shiau Y. S., Huang P. T., Shiau Y. Y., Tsai Y. W., Chou H. C., Tseng L. J., Wu W. T., Hsu P. J., Lou K. L. (2003). Structural analysis of the functional influence of the surface peptide Gtf-P1 on *Streptococcus mutans* glucosyltransferase C activity. *J Mol Model.* **9**: 153-158

Chiba S. (1979). Transglucosylation of α -glucosidase. *J Jpn Soc Starch Sci.* **26**: 59-67

Chiba S. (1988) α -Glucosidases. In : *Handbook of Amylases and related enzymes* (The Amylase Research Society of Japan, éd.). Pergamon Press, Oxford, U.K. pp 104-116

Chiba S. (1997). Molecular mechanism in alpha-glucosidase and glucoamylase. *Biosci Biotechnol Biochem.* **61**: 1233-1239

Chiba S., Kimura A., Kobori T., Saitoh K. (1985). Quantitative determination of disaccharides produced from soluble starch through transglucosylation of buckwheat α -glucosidase. *J Jpn Soc Starch Sci.* **32**: 213-216

Colas B. (1977). Purification, propriétés cinétiques et moléculaires de deux β -glucosidases du suc digestif de *Achatina balteata*. *Thèse de doctorat d'Etat*. Université de Provence. France

Colas B., Attias J. (1975). Characterization of some hydrolase activities in the digestive juice of *Achatina balteata*. *Biochimie*. **57**: 1019-1027

Colas B., Attias J. (1977). Purification of two β -glycosidases from the digestive juice of *Achatina balteata*. *Biochimie*. **59**: 577-585

Combes D., Monsan P. (1983). Sucrose hydrolysis by invertase. Characterization of products and substrate inhibition. *Carbohydr Res*. **117**: 215-228

Copeland L. (1990). Enzymes of sucrose metabolism. In P.J. LEA (Ed). UK academic press, London. *Methods plant Biochem*. **3**: 73-85

Coutinho P. M., Henrissat B. (1999a). Carbohydrate-active enzymes : an integrated database approach, p. 3, Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering. The Royal Society of Chemistry, Cambridge

Coutinho P. M., Henrissat B. (1999b). Carbohydrate-Active Enzymes server, <http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/index.html>

Coutinho P. M., Deleury E., Davies G. J., Henrissat B. (2003). An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *J Mol Biol*. **328**: 307-317

Crittenden R. G., Playne M. J. (1996). Production, properties and applications of food grade oligosaccharides. *Trends Food Sci Technol*. **7**: 353-361

D

Davies G., Henrissat B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*. **3**, 853-859

Davies G., Gloster T. M., Henrissat B. (2005). Recent structural insights into the expanding world of carbohydrate-active enzymes. *Curr Opin Struct Biol*. **15**: 1-9

de Burlet G., Sudaka P. (1977). Propriétés catalytiques de l' α -glucosidase neutre du rein humain. *Biochimie*. **59**: 7-14

Delzenne N. M. (2003). Oligosaccharides: state of the art. *Proc Nutr Soc*. **62**: 177-182

Demirjian C. D., Moris-V. D., Cassidy S. C. (2001). Enzymes from extremophiles. *Curr Opin Chem Biol*. **5**: 144-151

Devulapalle K. S., Goodman S. D., Gao Q., Hemsley A., Mooser G. (1997). Knowledge-based model of a glucosyltransferase from the oral bacterial group of mutans streptococci. *Protein Sci*. **6**: 2489-2493

Dixon M., Webb E. C. (1979). Enzyme Inhibition by high substrates concentrations. Academic press Inc. N.Y. (Dixon and Webb éd.). 3rd éd., 126-136

Dordick J. S. (1991). Biocatalysts for industry. Plenum Press, New York. 330 pages

Dubois M., Gilles K., Hamilton J., Rebers P., Smith F. (1956). Colorimetric methods for determination of sugar and related substances. *Anal Chem.* **28**: 350-356

E

Ernst H.A., Leggio L.L., Willemoes M., Leonard G., Larsen S. (2006). Structure of the *Sulfolobus solfataricus* α -glucosidase: implications for domain conservation and substrate recognition in GH31. *J Mol Biol.* **358**: 1106-1124

F

Fabre E. (2004) Caractérisation de la dextrane-saccharase DSR-E de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 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., Remaud-Siméon M. (2005). Role of the two catalytic domains of DSR-E Dextranesucrase and their involvement in the formation of a highly α -1,2 branched dextran. *J Bacteriol.* **187**: 296-303

Ferrer M., Golyshina V. O., Plou J. F., Timmis N. K., Golyshin N. P. (2005). A novel α -glucosidase from the acidophilus *Archaeon ferroplasma acidiphilum* strain Y with high transglycosylation activity and an unusual catalytic nucleophile. *Biochem J.* **391**: 269-276

Ferretti J. J., Gilpin M. L., Russell R. R. (1987). Nucleotide sequence of a glucosyltransferase gene from *Streptococcus sobrinus* MFe28. *J Bacteriol.* **169**: 4271-4278

Flanagan P. R., Forstener G. G. (1978) Purification of rat intestinal maltase/glucoamylase and its anomalous dissociation either by heat or by low pH. *Biochem J.* **173**: 553-563

Frandsen T. P., Svensson B. (1998). Plant α -glucosidases of the glucosidase family 31. Molecular properties, substrate specificity, reaction mechanism, and comparison with family members of different origin. *Plant Mol Biol.* **37**: 1-13

G

Ganzle M. G., Schwab C. (2005) Exopolysaccharide production by intestinal lactobacilli in « Probiotics and prebiotics : Scientific aspects. G. W. Tannock eds. Caister Academic Press. Norfolk, UK. 230 pages

Giannesi G. C., Polizeli M. L. T. M., Terenzi H. F., Jorge J. A. (2006). A novel α -glucosidase from *Chaetomium thermophilum* var *coprophilum* that converts maltose into trehalose: Purification and partial characterization of the enzyme. *Proc Biochem.* **41**: 1729-1735

Giffard P. M., Allen D. M., Milward C. P., Simpson C. L., Jacques N. A. (1993). Sequence of the *gtfK* gene of *Streptococcus Salivarius* ATCC 25975 and evolution of the *gtf* genes of oral *Streptococci*. *J Gen Microbiol.* **139**: 1511-1522

Goldstein J. I. (1976). Carbohydrate binding specificity of concanavalin A. In Bittiger H., SCHENEBI H.P. (Eds). Wiley, London. 55-68

Gul-Guven R., Guven K., Poli A., Nicolaus B. (2007). Purification and some properties of a β -galactosidase from the thermoacidophilic *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *Rittmannii* isolated from antartica. *Enz Microb Technol.* **40**:1570-1577

H

Hancock M. S., Vaughan D. M., Withers G. S. (2006). Engineering of glycosidases and glycosyltransferases. *Curr Opin Chem Biol.* **10**: 509-519

Henrissat B. A. (1991). Classification of glycosylhydrolases based on amino-acid sequence similarities. *Biochem J.* **280**: 309-316

Henrissat B., Bairoch A. (1993). New families in the classification of glycosylhydrolases based on amino-acid sequence similarities. *Biochem J.* **293**: 781-788

Henrissat B., Bairoch A. (1996). Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem J.* **316**: 695-696

Henrissat B., Davies G. (1995). Structural and sequence based classification of glycoside hydrolase. *Curr Opin Struct Biol.* **7**: 637-644

Henrissat B., Davies G. J. (2000). Glycoside hydrolases and glycosyltransferases. Families, modules, and implications for genomics. *Plant Physiol.* **124**: 1515-1519

Hochstenbach F., Klis F. M., van den Ende H., van Donselaar E., Peters P. J., Klausner R. D. (1998). Identification of a putative alpha-glucan synthase essential for cell wall construction and morphogenesis in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**: 9161-9166

Hodasi J. K. M. (1984). Some observations on the edible giant snail of west Africa. *World Animal Rev.* **52**: 24-28

Hrmova M., Imai T., Rutten S. J., Fairweather J. K., Pelosi L., Bulone V., Driguez H., Fincher G. B. (2002). Mutated barley (1 \rightarrow 3) β -D-glucan endohydrolases synthesize crystalline (1 \rightarrow 3) β -D-glucans. *J Biol Chem.* **277**: 30102-30111

Hung V.S., Hatada Y., Goda S., Lu J., Hidaka Y., Li Z., Akita M., Ohta Y., Watanabe K., Matsui H., Ito S., Horikoshi K. (2005). α -glucosidase from a strain of deep-sea *Geobacillus* : a potential enzyme for the synthesis of complex carbohydrates. *Appl Microbiol Biotechnol.* **68**: 757-765

I

Iwata H., Suzuki T., Aramaki I. (2003). Purification and characterization of rice α -glucosidase, a key enzyme for alcohol fermentation of rice polish. *J Biosci Bioeng.* **95**: 106-108

J

Jakemen D. L., Withers S. G. (2002). On expanding the repertoire of glycosynthases: mutant β -galactosidases forming β (1,6) linkages. *Can J Chem.* **80**: 866-870

Janecek S. (1997). Alpha amylase family: Molecular biology and evolution. *Prog Biophys Mol Biol.* **67**: 67-97

Jeanes A., Haynes W., Williams C., Rankin J., Melvin E., Austin M., Cluskay J., Fisher B., Tsuchiya H. Rist C. (1954). Characterisation and classification of dextrans from ninety-six strains of bacteria. *J Am Chem Soc.* **76**: 5041-5052

Jing W., De Angelis P. L. (2000). Dissection of the two transferase activities of the *Pasteurella multocida* hyaluronan synthase : two active sites exist in one polypeptide. *Glycobiology.* **10**: 883-889

Johannes W. T., Zhao H. (2006). Directed evolution of enzymes and biosynthetic pathways. *Curr Opin Microb.* **9**: 261-267

Joucla G. (2003). Caractérisation de l'alternane-saccharase de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355 : Approche rationnelle et aléatoire pour la conception de nouvelles glucane-saccharases. *Thèse de doctorat, INSA Toulouse.* France

K

Kato N., Suyama S., Shirokane M., Kato M., Kobayashi T., Tsukagoshi N. (2002) Novel α -glucosidase from *Aspergillus nidulans* with strong transglucosylation activity. *Appl Environ Microbiol.* **68**: 1250-1256

Keegstra K., Raikhel N. (2001). Plant glycosyltransferases. *Curr Opin Plant Biol.* **4**: 219-224

Kimura A. (2000). Molecular anatomy of α -glucosidase. *Trends Glycosc Glycotech.* **68**: 373-380

Kimura A., Lee J-H., Lee I-S., Lee H-S., Park K-H., Chiba S., Kim D. (2004). Two potent competitive inhibitors discriminating α -glucosidase family I from family II. *Carbohydr Res.* **339**: 1035-1040

Kobayashi I., Tokuda M., Hashimoto H., Konda T., Nakano H., Kitahata S. (2003). Purification and characterization of a new type of α -glucosidase from *Paecilomyces lilacinus* that has transglucosylation activity to produce α 1-3 and α 1-2 linked oligosaccharides. *Biosci Biotechnol Biochem.* **67**: 29-35

Koepsell H. J., Tsuchiya H. M., Hellman N. N., Kasenko A., Hoffmen C. A., Sharpe E. S, Jackson R. W. (1953). Enzymatic synthesis of dextran. Acceptor specificity and chain initiation. *J Biol Chem.* **200**: 793-801

Kono H., Kawano S., Tajima K., Erata T., Takai M. (1999). Structural analyses of new tri- and tetrasaccharides produced from disaccharides by transglycosylation of purified *Trichoderma viride* β -glucosidase. *Glycoconj J.* **16**: 415-423

Kouamé L. P., Dué E. A., Niamké L. S., Kouamé A. F., Kamenan A. (2005). Synthèse de néoglucoconjugués catalysées par l' α -glucosidase purifiée de la blatte *Periplaneta Americana* (Linnaeus). *Biotechnol Agron Soc Environ.* **9**: 35-42

Kralj S., van Geel-Schurren G. H., van der Maarel M. H. E. C., Dijkhuizen L. (2004) Biochemical and molecular characterization of *Lactobacillus reuteri* 121 reuteranase. *Microbiology.* **150**: 2099-2112

Kren V., Martinkova L. (2001). Glycosides in medicine : "the role of glycosidic residue in biological activity". *Curr Med Chem.* **8**: 1313-1338

Kruh J. (1982). Biochimie I : Biologie cellulaire et moléculaire. Hermann éditeur, Paris. (Vol I). 253 pages

Kuhne (1877) cite par Larrete-Garde V. Avant-Propos. In : *Enzymes en agro-alimentaire.* Lavoisier Tech et Doc (Eds), Paris. 1997. 380 Pages

L

Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685

le Chevalier P., van Worhmodt A. (1998). Alpha-glucosidase from the Hepatopancreas of the Shrimp, *Penaeus vannamei* (Crustacea-Decapoda). *J Exp Zool.* **280**: 384-394

Leparoux S., Padrines M., Placier G., Colas B. (1997). Characterization of a strictly specific acid β -galactosidase from *Achatina achatina*. *Biochim Biophys Acta.* **1336**: 522-532

L'Hocine L., Wang Z., Jiang B., Xu S. (2000). Purification and partial characterization of fructosyltransferase and invertase from *Aspergillus niger* AS0023. *J Biotechnol.* **81**: 73-84

Lineweaver H., Burk D. (1934). The determination of enzyme dissociation constants. *J Am Chem Soc.* **56**: 658-666

M

Mac Gregor E. A., Jespersen H. M., Svensson B. (1996). A circularly permuted [alpha]-amylase-type [alpha]/[beta]-barrel structure in glucan-synthesizing glucosyltransferases. *FEBS Lett.* **378**: 263-266

MacGregor A. E., Janecek S., Svensson B. (2001). Relationship of sequence and structure to specificity in the α -amylase family of enzymes. *Biochim Biophys Acta.* **1546**: 1-20

MacKenzie L. F., Wang Q., Warren R. A. J., Withers S. G. (1998). Glycosynthases: mutant glycosidases for oligosaccharide synthesis. *J Am Chem Soc.* **120**: 5583-5584

McCarter J. D., Withers S. G. (1994). Mechanism of enzymatic glycoside hydrolysis. *Curr Opin Struct Biol.* **4**: 885-892

Malà S., Dvorakovà H., Hrabal R., Kralovà B. (1999). Towards regioselective synthesis of oligosaccharides by use of α -glucosidases with different substrate specificity. *Carbohydr. Res.* **322**: 209-218

Martin M. T., Cruces M. A., Alcalde M., Plou F. J., Bernabe M., Ballesteros A. (2004). Synthesis of maltooligosylfructofuranosides catalyzed by immobilized cyclodextrin glycosyltransferase using starch as donor. *Tetrahedron.* **60**: 529-534

Martinez-Fleites C., Ortiz-Lombardia M., Pons T., Tarbouriech N., Taylor E. J., Arrieta J. G., Hernandez L., Davies G. (2005). Crystal structure of levansucrase from the Gram-negative bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Biochem J.* **390**: 19-27

Mehu J. (1989). Adieu présure, bonjour chymosyne? *RIA.* **423**: 52-53

Meng G., Futterer K. (2003). Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Nat Struct Biol.* **10**: 935-941

Miller G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic reagent for determination of reducing sugars. *Anal Chem.* **31**: 426-428

Monchois V., Vignon M., Russell R. R. (1999a). Isolation of key amino acid residues at the N-terminal end of the core region *Streptococcus downei* glucanase GTF-I. *Appl Microbiol Biotechnol.* **52**: 660-665

Monchois V., Willemot R-M., Monsan P. (1999b). Glucanases: mechanism of action and structure-function relationships. *FEMS Microb Rev.* **23**: 131-151

Monsan P., Combes D. (1984). Application of immobilized invertase to continuous hydrolysis of concentrated sucrose solution. *Biotechnol Bioeng.* **26**: 347-351

Monsan P., Paul F. (1995). Enzymatic synthesis of oligosaccharides. *FEMS Microbiol Rev.* **16**: 187-192

Monsan P., Paul F., Remaud-Siméon M., Lopez A. (1989). Novel enzymatic synthesis of oligosaccharides. *Food Biotechnol.* **3**: 11-29

Monsan P. Willemot R-M. (1997). L'utilisation des enzymes dans la production des sucres de synthèse. In : *Enzymes en agro-alimentaire*. Lavoisier Tech et Doc (Eds), Paris. pp 224-242

Monthieu C. (2002) Synthèse de polyglucosyl-fructosides par une Cyclodextrine Glucosyl-Transférase. Caractérisation des produits. *Thèse de Doctorat*. INSA de Toulouse. France

Monthieu C., Guibert A., Taravel F. R., Nardin R., Combes D. (2003). Purification and characterization of polyglucosyl-fructosides produced by means of cyclodextrin Glucosyl Transférase. *Biocatal Biotransf.* **21**: 7-15

Mooser G., Iwaoka K. R. (1989). Sucrose 6-alpha-D-glucosyltransferase from *Streptococcus sobrinus*: characterization of a glucosyl-enzyme complex. *Biochemistry.* **28**: 443-449

Mooser G., Hefta S. A., Paxton R. J., Shively J. E., Lee T. D. (1991). 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. (1992). Glycosidases and glycosyltransferases. *The enzymes*. Academic Press Inc. **XX**: 187-221

Mosi R., He S., Uitdehaag J., Dijkstra B. W., Withers S. G. (1997). Trapping and characterization of the reaction intermediate in cyclodextrin glycosyltransferase by use of activated substrates and a mutant enzyme. *Biochemistry.* **36**: 9927-9934

Moulis C. (2006). Ingénierie rationnelle de la dextrane-saccharase Dsr-S : Compréhension du mécanisme de polymérisation pour la synthèse de dextrans de taille contrôlée. *Thèse de Doctorat*. INSA Toulouse. France

Murase H., Yamauchi R., Kato K., Kunieda T., Terao J. (1997). Synthesis of a novel vitamin-E derivative, 2-(α -D-glucopyranosyl) methyl-2,5,7,8-tetramethylchroman-6-ol, by α -glucosidase catalysed transglycosylation. *Lipids.* **32** : 73-78

Murata T., Usui T. (2006). Enzymatic synthesis of oligosaccharides and neoglucoconjugates. *Biosci Biotechnol Biochem.* **70**: 1049-1059

N

Nagem R. A. P., Rojas A. L., Golubev A. M., Korneeva O. S., Eneyskaya E. V., Kulmiskaya A. A., Neustroev K. N., Polikarpov I. (2004). Crystal structure of exo-inulase from *Aspergillus awamori*: The enzyme fold and structural determinants of substrate recognition. *J Mol Biol.* **344**: 471-480

Nakai H, Ito T, Hayashi M, Kamiya K, Yamamoto T, Matsubara K, Kim Y-M, Jintanart W, Okuyama M, Mori H, Chiba S, Sano Y, Kimura A. (2007). Multiple forms of α -glucosidases in rice seeds (*Oryza sativa* L., var Nipponbare). *Biochimie*. **89**: 49-62

Nguyen Q. D., Rezessy-Szabo J. M., Bhat M. K., Hoshke A. (2005). Purification and some properties of β -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* IMI 303386. *Proc. Biochem*. **40**: 2461-2466

Niamke S., Sine J. P., Guinie O., Colas B. (1999). A novel endopeptidase with a strict specificity for threonine residue at the P1' position. *Biochem. Biophys Res Commun*. **256**: 307-312

Nierman W. C., Feldblyum T. V., Laub M. T., Paulsen I. T., Nelson 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., Fraser C. M. (2001). Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* **98**: 4136-4141

Ning J., Zang W., Yi Y., Yang G., Wu Z., Yi J., Kong F. (2003). Synthesis of β -(1,6) branched β -(1,3) glucohexaose and its analogues containing an α -(1,3) linked bond with antitumor activity. *Bioorg Med Chem*. **11**: 2193-2203

O

Obenland D. M., Simmen U., Boller T., Wiemken A. (1993). Purification and characterization of three soluble invertases from Barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves, *Plant physiol*. **101**: 1331-1339

Okada S., Kitaha S., Yoshikawa S., Miyake K. (1974). Sirops contenant des oligosaccharides terminés par du fructose. Brevet N° 3 819 484, USP

Okada S., Tsuyama N., Mitshuhashi M., Ogasawara J. (1979). Process for preparing sucrose starch sweetner free from reducing sugar. Brevet N° 79 06121, JP

Okada M., Nakayama T., Noguchi A., Yano M., Hemmi H., Nishino T., Ueda T. (2002) Site-specific mutagenesis at positions 272 and 273 of the *Bacillus sp.* SAM 1606 α -glucosidase to screen mutants with altered specificity for oligosaccharide production by transglucosylation. *J Mol Catal B Enzym*. **16**: 265-274

Okuyama M., Mori H., Watanabe K., Kimura A., Chiba S. (2002) α -glucosidase mutant catalyzes " α -glycosynthase" type reaction. *Biosci Biotechnol Biochem*. **66**: 928-933

Okuyama M., Tanimota Y., Ito T., Anzai A., Mori H., Kimura A., Matsui H., Chiba S. (2005). Purification and characterization of the hyper-glycosylated extracellular α -glucosidase from *Schizosaccharomyces pombe*. *Enz Microb Technol*. **37**: 472-480

Olivares-Illana V., Lopez-Munguia A., Olvera C. (2003). Molecular characterization of inulosucrase from *Leuconostoc citreum*: a fructosyltransferase within a glucosyltransferase. *J Bacteriol.* **185**: 3606-3612

P

Pereira B., Sivakami S. (1989). Neutral maltase/glucoamylase from rabbit renal cortex. *Biochem J.* **261**: 43-47

Pasteur (1857) cité par Larrete-Garde V. Avant-Propos. In : *Enzymes en agro-alimentaire*. Lavoisier Tech et Doc (Eds), Paris. 1997. 380 Pages

Payen et Persoz (1833) cité par Sicard P. Valorisation enzymatique des glucides d'origine agricole. In : *Enzymes en agro-alimentaire*. Lavoisier Tech et Doc (Eds), Paris. 1997. 380 Pages

Pizzut-Serin S., Potocki-Veronese G., van der Veen B. A., Albenne C., Monsan P., Remaud-Siméon M. (2005). Characterisation of a novel amylosucrase from *Deinococcus radiodurans*. *FEBS Lett.* **579**: 1405-1410

Potocki De Montalk G., Remaud-Simeon M., Willemot R. M., Planchot V., Monsan P. (1999b). 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., Sarcabal P., Planchot V., Monsan P. (2000b). Amylosucrase from *Neisseria polysaccharea*: novel catalytic properties. *FEBS Lett.* **471**: 219-223

R

Rajan S.S., Yang X., Collart F., Yip V.L., Withers S.G., Varrot A., Thompson J., Davies G.J., Anderson W.F. (2004). Novel catalytic mechanism of glycoside hydrolysis based on the structure of an NAD⁺/Mn²⁺ dependent phospho-alpha-glucosidase from *Bacillus subtilis*. *Structure.* **12**: 1619-1629

Reddy A., Maley F. (1990). Identification of an active-site residue in yeast invertase by affinity and site-directed mutagenesis. *J Biol Chem.* **265**: 10817-10820

Reddy A., Maley F. (1996). Studies on identifying the catalytic role of Glu-203 in the active site of yeast invertase. *J Biol Chem.* **271**: 13953-13958

Rehm J., Willmitzer L., Heyer A. G. (1998). Production of 1-kestose in Transgenic Yeast Expressing a Fructosyltransferase from *Aspergillus foetidus*. *J Bacteriol.* **180**: 1305-1310

Richard H. (1984). Enzymologie et biocatalyse. in *Biotechnologie, Techniques et Documentation* Lavoisier éditeur, Paris. 662 pages

Richard G. (2004). Synthèse de dérivés glucosylés du 1,5-anhydro-D-fructose à l'aide de glucane-saccharases natives et recombinantes. *Thèse de doctorat*. INSA Toulouse. France

Russell R. R. (1990). Molecular genetics of glucan metabolism in oral streptococci. *Arch Oral Biol.* **35**: 53S-58S

S

Sarcabal P., Remaud-Simeon M., Willemot R., Potocki D. M., Svensson B., Monsan P. (2000). Identification of key amino acid residues in *Neisseria polysaccharea* amylosucrase. *FEBS Lett.* **474**: 33-37

Schmidt R. R. (1986). New methods for the synthesis of glycosides and oligosaccharides. Are there alternatives to the Koenings-Knorr method? *Angew Chem Int Ed Engl.* **25**: 212-235

Scigelova M., Singh S., Crout D.H.G. (1999). Glycosidases a great synthetic tool. *J Mol Catal B Enzym.* **6**: 483-494

Seymour F. R., Knapp R. D. (1980a). Structural analysis of dextrans from strains of *Leuconostoc* and related genera, that contain 3-O- α -glucosylated-D-glucopyranosyl residues at the branched points, or in consecutive, linear position. *Carbohydr Res.* **81**: 105-129

Seymour F. R., Knapp R. D. (1980b). Structural analysis of α -D-glucans by ^{13}C -nuclear magnetic resonance, spin-lattice relaxation studies. *Carbohydr Res.* **81**: 67-103

Sicard P. (1997). Valorisation enzymatique des glucides d'origine agricole. In : *Enzymes en agro-alimentaire*. Lavoisier Tech et Doc (Eds), Paris. 380 Pages

Sidebotham R. L. (1974). Dextrans. *Adv Carbohydr Chem Biochem.* **30**: 371-444

Silverstein R., Voet J., Reed D., Abeles R. H. (1967). Purification and mechanism of action of sucrose phosphorylase. *J Biol Chem.* **242**: 1338-1346

Simpson C. L., Cheetham N. W., Giffard P. M., Jacques N. A. (1995a). Four glucosyltransferases, GtfJ, GtfK, GtfL and GtfM, from *Streptococcus salivarius* ATCC 25975. *Microbiology.* **141**: 1451-1460

Simpson C. L., Giffard P. M., Jacques N. A. (1995b). *Streptococcus salivarius* ATCC 25975 possesses at least two genes coding for primer-independent glucosyltransferases. *Infect Immun.* **63**: 609-621

Skov L. K., Mirza O., Henriksen A., Potocki De Montalk G., Remaud-Simeon M., Sarcabal P., Willemot R.-M., Monsan P., Gajhede M. (2001). Amylosucrase, a glucan synthesizing enzyme from the α -amylase family. *J Biol Chem.* **276**: 25273-25278

Soro Y. R., Diomande M., Kouame L. P., Diopoh K. J. (2001). Purification et caractérisation des cellulases du suc digestif de l'escargot *Archachatina ventricosa* (Achatinidae, Achatinaceae). *Rev Ivoir Sc Technol.* **2**: 103-107

Soupe J. (1997). La production d'enzymes pour l'agroalimentaire. In : *Enzymes en Agroalimentaire*. Lavoisier Tech et Doc (Eds), Paris. 380 Pages.

Sprogoe Desirée., van den Broek L. A. M., Mirza O., Kastrup J. S., Voragen A. G. J., Gajhede M., Skov L. K. (2004). Crystal structure of sucrose phosphorylase from *Bifidobacterium adolescentis*. *Biochemistry*. **43**: 1156-1162

Sugimoto S., Furui S., Suzuki Y. (1995). Multiple molecular forms of α -glucosidase from spinach seeds *Spinacia oleracea L.* *Biosci Biotechnol Biochem*. **59**: 673-677

Sugimoto M., Furui S., Sasaki K., Suzuki Y. (2003). Transglucosylation activities of multiple forms of α -glucosidase from spinach. *Biosci Biotechnol Biochem*. **67**: 1160-1163

Sun Z., Henson C. A. (1990). Degradation of native starch granules by barley α -glucosidases. *Plant Physiol*. **94**: 320-327

Sunna A., Gibbs M. D., Bergquist P. L. (2001). Identification of novel beta-mannan- and beta-glucan-binding modules: evidence for a superfamily of carbohydrate-binding modules. *Biochem J*. **356**: 791-798

Suzuki Y., Nobiki M., Matsuda M., Sawai T. (1997). *Bacillus thermoamyloliquefaciens* KP1071 α -glucosidase II is a thermostable Mr 540000 homohexameric α -glucosidase with both exo- α -1,4-glucosidase and oligo-1,6-glucosidase activities. *Eur J Biochem*. **245**: 129-136

T

Takamine (1894) cité par Dordick J S. *Biocatalysts for industry*. Plenum Press, New York. 1991. 330 pages.

Takesue Y., Takesue S. (1996). Purification and characterization of α -glucosidase complex from the intestine of the frog, *Rana japonica*. *Biochim Biophys Acta*. **1296**: 152-158.

Tanriseven A., Dogan S. (2001). Immobilization of invertase within alginate gel capsules. *Proc Biochem*. **36**: 1081-1083

Tieking M., Ehrmann M. A., Vogel R. F., Gänzle M. G. (2005a). Molecular and functional characterization of a levanesucrase from *Lactobacillus sanfranciscensis*. *Appl Microbiol Biotechnol*. **66**: 655-663

Tieking M., Kühnl W., Gänzle M.G. (2005b). Evidence for formation of heterooligosaccharides by *Lactobacillus sanfranciscensis* during growth in wheat sourdough. *J Agric Food Chem*. **53**: 2456-2461

Tomme P., Warren R. A., Gilkes N. R. (1995). Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Adv Microb Physiol*. **37**: 1-81

U

Unligil U. M., Rini J. M. (2000). Glycosyltransferase structure and mechanism. *Curr Opin Struct Biol.* **10**: 510-517

Uitdehaag J. C., Mosi R., Kalk K. H., Van Der Veen B. A., Dijkhuizen L., Withers S. G. Dijkstra B. W. (1999). X-ray structures along the reaction pathway of cyclodextrin glycosyltransferase elucidate catalysis in the alpha-amylase family. *Nat Struct Biol.* **6**: 432-436.

V

Vallee B. L., Wacker W. E. C. (1970). Metalloproteins. In "*The proteins their structure and composition*", Academic press, New York. Ed Neurath. Vol V.

van der Burg B. (2003). Extremophiles as a source for novel enzymes. *Curr Opin Microbiology.* **6**: 213-218

Van der Veen B. A., Uitdehaag J. C. M, Dijkstra B. W., Dijkhuizen L. (2000). Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity. *Biochim Biophys Acta.* **1543**: 336-360

van Hijum S. A. F. T., van Geel-Schutten G. H., Rahaoui H., van der Maarel M. J., Dijkhuizen L. (2002). Characterization of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* that synthesizes high-molecular-weight inulin and inulin oligosaccharides. *Appl Environ Microbiol.* **68**: 4390-4398

van Hijum S. A. F. T., Szalowska E., van der Maarel M. J. E.C., Dijkhuizen L. (2004). Biochemical and molecular characterization of a levanesucrase from *Lactobacillus reuteri* *Microbiology.* **150**: 621-630

Vickerman M. M., Clewell D. B. (1997). Deletions in the carboxyl-terminal region of *Streptococcus gordonii* glycosyltransferase affect cell-associated enzyme activity and sucrose-associated accumulation of growing cells. *Appl Environ Microbiol.* **63**: 1667-1673.

Vijn I., Smeekins S. (1999). Fructan: more than a reserve carbohydrate? *Plant Physiol.* **120**: 351-360

von Heijne G. (1990). The signal peptide. *J Membr Biol.* **115**: 195-201

W

Watanabe K., Hata Y., Kizaki H., Katsube Y., Suzuki Y. (1997). The refined crystal structure of *Bacillus cereus* oligo-1,6-glucosidase at 2.0 Å resolution: Structural characterization of proline-substitution sites for protein thermosabilization. *J Mol Biol.* **269**: 142-153

Weaver G. A., Tangel C. T., Krause J. A., Parfitt M. M., Jenkins P. L., Rader J. M., Lewis B. A., Miller T. L., Wolin M. J. (1997). Acarbose enhances human colonic butyrate production. *J Nutr.* **127**: 717-723

Webb J. L. (1966). Enzyme and metabolic inhibitor. Academic press, New York., Vol II, 830 pages

Webber K., Osborn M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polayacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem.* **244**: 4406-4412

Whitaker I. R. (1973). Principles of enzymology. Some new technology for the food science. *Food Technol.* **April**: 16-21

Willemot R-M. (1993). Etude de la dextrane-saccharase de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Thèse de doctorat.* INSA Toulouse. France

Y

Yamamoto T., Muto N., Nagata E., Nakamura T., Suzuki T. (1990). Formation of a stable l-ascorbic acid α -glucoside by mammalian α -glucosidase catalyzed transglucosylation. *Biochim Biophys Acta.* **1035**: 44-50

Yamamoto K., Urushibata T., Konishi Y., Tsujii M. (2000). Japan Kokai Tokkyo Koho, 1891001 (June 11, 2000)

Yamamoto T., Unno T., Watanabe Y., Yamamoto M., Okuyama M., Mori H., Chiba S., Kimura A. (2004). Purification and characterization of *Acremonium implicatum* α -glucosidase having regioselectivity for α -1,3-glucosidic linkage. *Biochim Biophys Acta.* **1700**: 189-198

Yamasaki Y., Fujimoto M., Kariya J., Konno H. (2005). Purification of an α -glucosidase from germinating millet seeds. *Phytochemistry.* **66**: 851-857.

Yoshiki Y., Suzuki Y. (1980). Two forms of α -glucosidases from sugar-beet seeds. *Plants.* **148**: 354-361

Yoshioka Y., Hasegawa K., Matsuura Y., Katsube Y., Kubota M. (1997). Crystal structures of a mutant maltotetraose-forming exo-amylase cocrystallized with maltopentaose. *J Mol Biol.* **271**: 619-628

Z

Zarate V., Belda F. (1996). Characterization of the heterologous invertase produce by *Schizosaccharomyces pombe* from SUC2 gene of *saccharomyces cereviciae*. *J Appl Bacteriol.* **80**: 45-52

VI. ANNEXES

ANNEXE A

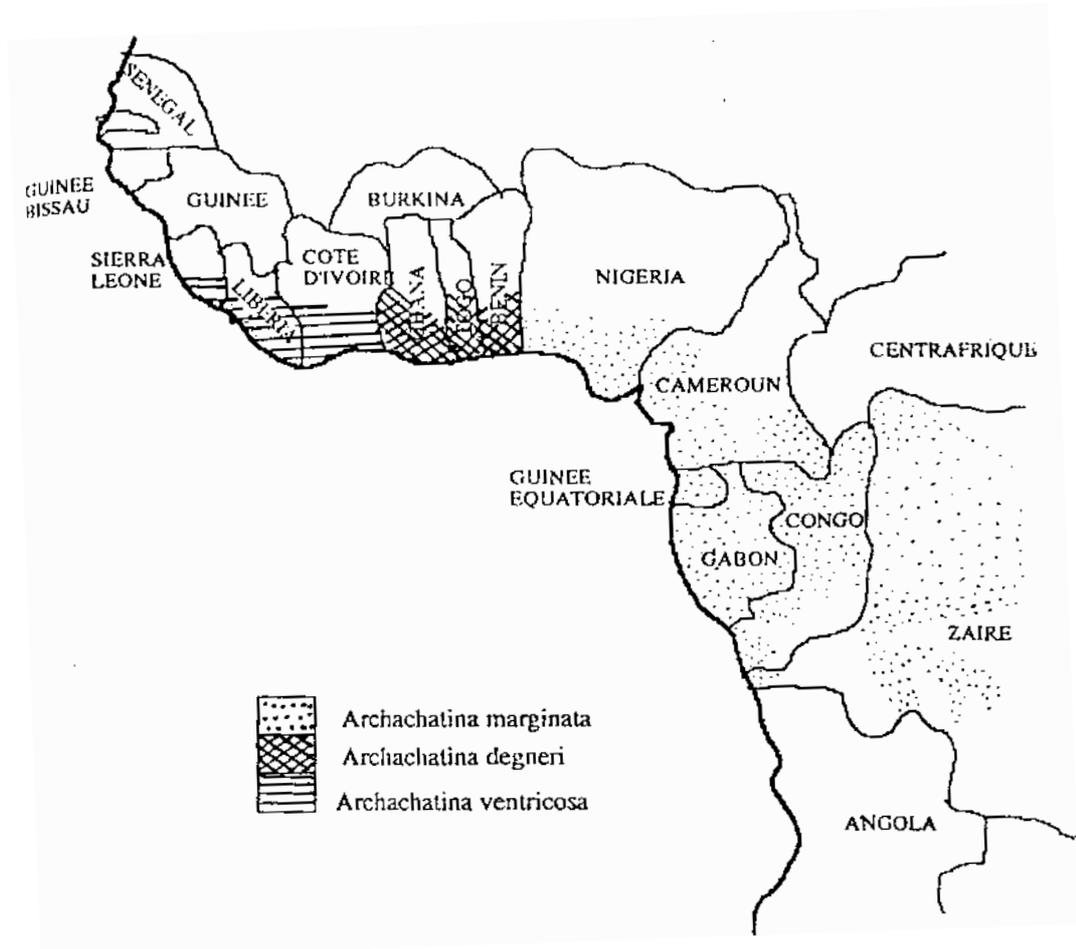


Figure 63 : Répartition géographique des trois principales espèces d'*Archachatina* en Afrique de l'Ouest.
(Hodasi, 1984)

ANNEXE B : LA PURIFICATION DES ENZYMES

(Asenjo, 1990 ; Dordick, 1991 ; Pharmacia, 2003)

Les sources enzymatiques (origine animale, végétale ou microbienne), sont généralement des mixtures complexes de biomasses, de macromolécules et d'électrolytes. Elles peuvent contenir une centaine voir plus d'enzymes différentes. Si dans quelques cas il est possible d'utiliser des tests suffisamment spécifiques pour étudier des enzymes non purifiées, dans la plupart des cas les autres enzymes du milieu interfèrent en attaquant le substrat, le coenzyme ou l'enzyme elle-même ou en transformant le produit de la réaction. En vue d'étudier les propriétés et le comportement d'une enzyme comme catalyseur, il est donc nécessaire de l'avoir aussi pure que possible. La complexité des sources enzymatiques rend difficile l'isolement et la concentration des enzymes qui sont souvent diluées, ont des caractéristiques physico-chimiques semblables aux autres molécules et sont sensibles à divers traitements. La purification a pour objectif d'obtenir à partir de ces extraits plus ou moins complexes une protéine « pure » en quantité suffisante tout en préservant ses propriétés physiologiques (structure et activité). Les procédés de purification doivent donc tenir compte de la grande instabilité de certaines protéines et utiliser des conditions douces. Les méthodes classiques de la chimie ne sont pas toujours adaptées à cette exigence. Pour cette raison, des méthodes spécifiques ont été développées pour la plupart des biomolécules. Elles utilisent les propriétés intrinsèques des protéines à savoir : (i) la taille, (ii) la solubilité, (iii) la charge et (iv) l'affinité.

I. L'EXTRACTION

Elle constitue une étape toujours en amont du cycle de purification et sa procédure est choisie en fonction de la source enzymatique (microbienne,

végétale, animale) et du mode de sécrétion (intracellulaire ou extracellulaire). Elle regroupe l'ensemble des actions nécessaires pour obtenir à partir de la source enzymatique un extrait brut contenant le plus fort taux de molécules enzymatiques solubles (figure 64).

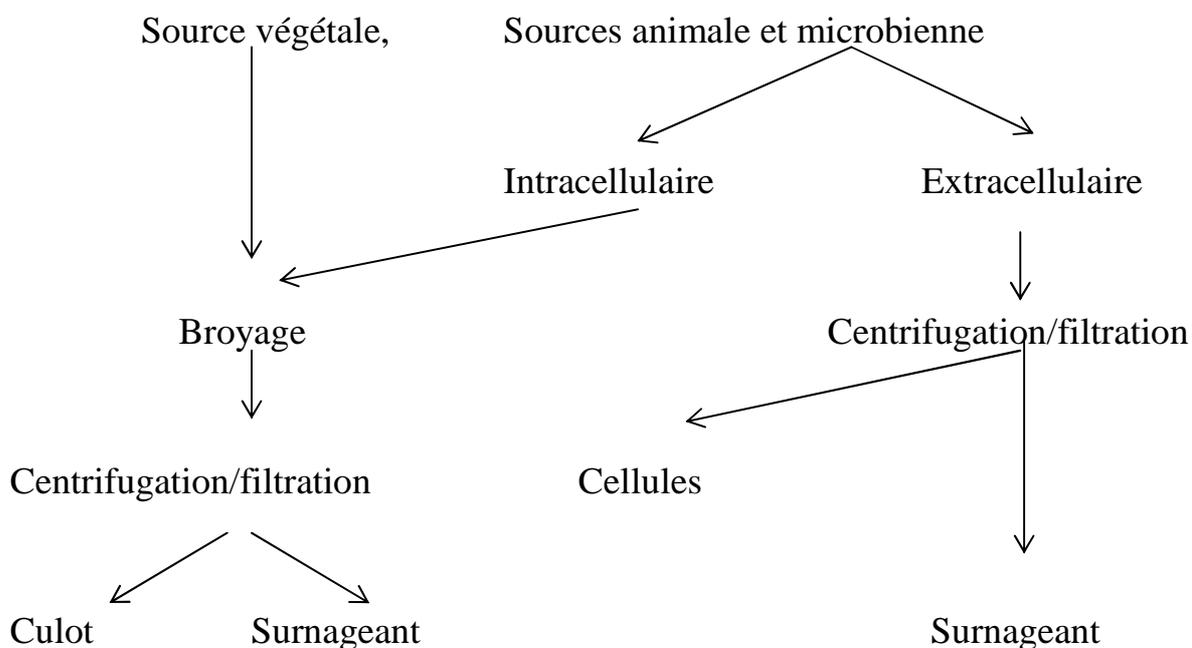


Figure 64: Schéma d'extraction et de clarification des enzymes

Les opérations de l'extraction doivent se faire rapidement et dans les conditions les plus douces possibles afin d'éviter la dénaturation des protéines. A cet effet, l'échantillon est stabilisé en travaillant à une température douce et en présence d'un tampon qui permet de maintenir constants le pH et la force ionique. Selon les sources d'enzymes, quelques exemples d'extraction sont donnés dans le tableau suivant (tableau 12).

L'extrait contenant l'enzyme contient aussi de nombreux autres composés ayant des grandes et des petites masses moléculaires. La purification consistera en une série de fractionnement qui permettent de séparer la

protéine enzymatique des autres protéines du milieu. L'ordre dans lequel les différentes méthodes sont utilisées est déterminé par des essais.

Tableau 12: Modes de cassage des cellules selon la source enzymatique

Action	Procédé	Source
Douce	Lyse cellulaire (choc osmotique)	Erythrocytes, E. coli
	Lyse enzymatique	Bactéries
	Homogénéisation manuelle	Tissus vivants
	Broyage	Muscle
Modérée	Homogénéiseur à lames	La plupart des tissus animaux et végétaux
	Broyage avec un abrasif (sable)	Bactéries et tissus végétaux
Vigoureuse	Ultrasonication	Suspension cellulaire
	Presse de French	Bactéries, cellules végétales

II. LES PROCÉDES DE SEPARATION

1. Les procédés membranaires

Ces procédés sont des moyens de séparation et de concentration par le passage sélectif à travers une barrière poreuse de molécules ou de particules. La dimension des pores de la barrière détermine un « seuil de coupure » qui désigne la taille limite des molécules ou des particules qui peuvent traverser. Les membranes ont permis d'améliorer les performances de la filtration en passant à l'ultrafiltration et à l'hyperfiltration. Selon les éléments à retenir, on distingue la microfiltration (particules en suspension), l'ultrafiltration (macromolécules), la nanofiltration (sucres, sels divalents, acides dissociés), l'osmose inverse (sels monovalents, acides non dissociés).

La filtration peut être frontale ou tangentielle selon que le flux d'échantillon est respectivement perpendiculaire ou parallèle à la membrane. Cette dernière est utilisée pour éviter la tendance à colmater les pores par les molécules et les particules pendant la filtration directe. A pression ambiante, le passage à travers les membranes devient de plus en plus difficile au fur et à mesure que la taille des pores diminue. L'opération est accélérée par l'action d'une force sous forme de pression. Les conditions expérimentales de certaines applications sont résumées ci-dessous (tableau 13) :

Tableau 13: Exemples de paramètres de filtration

Procédé	Taille des pores	exemples	Pression
Microfiltration	1 à 100 μm	Virus, pollen	0,1 à 1 bar
Ultrafiltration	10 à 1000 A°	Glucose, albumine	1 à 100 bars
Hyperfiltration (Osmose inverse)	1 à 10 A°	Eau, NaCl	100-1000 bars

Remarque : La dialyse est un cas particulier de procédé membranaire permettant des échanges liquide/liquide selon la taille des pores de la membrane de dialyse. Les échanges se font par simple diffusion selon le gradient de concentration ou spécifiquement dans le cas des ions par l'application d'un gradient de voltage à travers une membrane adaptée.

2. La précipitation

Elle est utilisée pour réaliser des séparations par la conversion de solutés en solides qui peuvent être ensuite enlevés par une étape de séparation solide/liquide. Les protéines en solution présentent des surfaces comportant des régions de charges négative et positive tout le long avec des régions hydrophiles, polaires, non chargées et des régions hydrophobes non polaires.

Les interactions complexes entre la surface de la protéine et le solvant qui l'entoure déterminent sa solubilité. La protéine reste en solution quand il est thermodynamiquement plus favorable qu'elle soit entourée par le solvant plutôt que de s'agréger avec les autres molécules de protéines en une phase solide. La protéine est rendue insoluble en changeant soit les caractéristiques de la surface de la protéine elle-même ou en changeant de solvant. Plusieurs variantes de précipitation existent selon les conditions opératoires choisies. On distingue ainsi la précipitation par le changement de pH, par les sels, par les solvants organiques, par les polyélectrolytes, par les polymères non ioniques ou par la dénaturation thermique dans le cas où la protéine cible est thermostable. La stabilité des agrégats est améliorée par l'agitation et la durée de l'opération. Les méthodes de précipitation offrent une haute sélectivité dans les mixtures complexes. Les précipitants peuvent être choisis pour ne pas dénaturer les molécules biologiques comme les protéines.

3. La centrifugation

Tout corps en solution subit l'action de son poids dirigé vers le bas et de la poussée d'Archimède dirigée vers le haut. Selon sa densité, supérieure ou égale à celle du milieu, la force résultante sera dirigée vers le bas ou vers le haut et le corps va descendre ou remonter dans le liquide. Les molécules biologiques réagissent de la même façon. Cependant, étant très petites, leur poids est faible et le phénomène de sédimentation risquerait de durer longtemps. Pour accélérer ce processus, des machines ont été conçues pour générer par rotation (plusieurs milliers de rotations par minute (rpm)) autour d'un axe des accélérations de l'ordre de milliers de g. Soumises à ces conditions, les particules ou les molécules sédimentent en quelques minutes ou quelques heures selon leur densité et les paramètres du milieu. La vitesse de sédimentation est mesurée en Svedberg (S). Les centrifugeuses peuvent se

distinguer par leur puissance (de quelques centaines de rpm pour les appareils de paillasse à plus de 100000 rpm pour les ultracentrifugeuses). Certaines sont munies de systèmes de réfrigération et/ou de vide pour éviter l'échauffement des échantillons. La centrifugation est un puissant outil de séparation qui est utilisé pour clarifier les extraits bruts en éliminant les particules en suspension, pour concentrer des molécules cibles que l'on fait précipiter spécifiquement ou pour éliminer les molécules dont on ne veut pas afin d'avoir les molécules d'intérêt dans le surnageant. Plusieurs variantes de centrifugation existent selon que l'échantillon est séparé seul ou dans un tube contenant un gradient.

III. PRINCIPALES METHODES DE CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE

La chromatographie liquide est une technique de séparation basée sur une différence de migration de molécules soumises à un déplacement dans une phase fixe (support solide) et une phase mobile. Plus l'affinité des molécules pour la phase fixe sera grande, plus elles seront retenues (retard de migration) pendant la migration. La nature de la phase fixe détermine la méthode de séparation qui peut être basée sur (i) la taille (chromatographie d'exclusion moléculaire), (ii) la charge (chromatographie d'échange d'ions), (iii) l'affinité (chromatographie d'affinité) et (iv) l'hydrophobicité (chromatographie hydrophobe et de phase inverse). On distingue la chromatographie liquide à basse pression (classique) et la chromatographie liquide à haute pression ou HPLC (plus récente). La chromatographie HPLC (High Performance Liquid Chromatography) utilise des supports qui résistent à de fortes pressions et offrent une plus forte résolution.

1. La chromatographie d'échange d'ions

La séparation par chromatographie d'échange d'ions dépend de l'adsorption réversible des solutés de molécules chargées sur des groupes échangeurs d'ions de charges opposées fixés sur des supports inertes. On distingue les échangeurs de cations et les échangeurs d'anions selon que les molécules échangées sont de charge respectivement positive ou négative. La charge globale, facteur déterminant la fixation d'une molécule sur un groupement échangeur d'ions est fonction du pH_i de la molécule et du pH du tampon de manipulation. Lorsque le pH de manipulation est inférieur au pH_i de la molécule celle-ci a une charge globale positive qui permet la fixation sur un échangeur de cations et si le pH de manipulation est supérieur au pH_i d'une molécule celle-ci est chargée négativement et peut se fixer sur un échangeur d'anions. Les molécules dont le pH_i équivaut au pH de manipulation sont de charge globale nulle et ne peuvent donc être fixées sur un échangeur d'ions à ce pH. Plus l'écart entre le pH_i d'une molécule et le pH de manipulation est grand, plus la liaison établie sera forte. En pratique, la plupart des manipulations d'échange d'ions sont réalisées en 5 étapes qui sont schématisées ci-dessous (figure 65).

La première étape est l'équilibrage qui consiste à amener l'échangeur d'ion à un état initial en termes de pH et de force ionique. Les groupes échangeurs sont associés à ce stade aux contre-ions échangeables (généralement de simples anions et cations, comme le chlorure ou le sodium).

La seconde étape est le dépôt et l'adsorption pendant laquelle les molécules de soluté comportant une charge appropriée déplacent les contre-ions et se fixent de façon réversible au gel. Les composés non fixés sont enlevés de l'échangeur par le tampon de départ au cours du lavage.

Dans la troisième étape, les composés fixés sont détachés de la colonne d'échangeurs en changeant la phase mobile de sorte à rendre les conditions

défavorables aux liaisons. Ceci inclut normalement l'augmentation de la force ionique du tampon d'éluion ou le changement du pH. Les protéines les moins fixées sont éluées les premières alors que les plus fortement retenues sont éluées avec les fortes concentrations de NaCl ou de fortes modifications de pH. Les quatrième et cinquième étapes consistent à détacher de la colonne les composés non élués par les conditions expérimentales prévues notamment en augmentant les concentrations en NaCl ou la modification du pH et de ré-équilibrage de la colonne aux conditions initiales pour l'étape suivante.

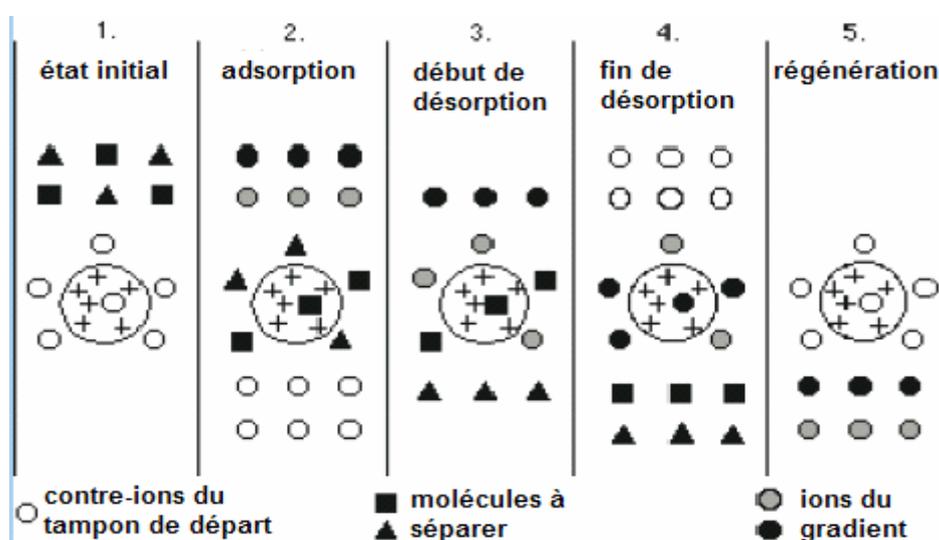


Figure 65: Différentes étapes d'une chromatographie d'échange d'ions

2. La chromatographie d'interaction hydrophobe (HIC)

Cette technique de séparation exploite les propriétés hydrophobes des protéines dans un environnement plus polaire et pas dénaturant. Elle est basée sur les interactions solvants-groupes non polaires accessibles (parties hydrophobes) à la surface des biomolécules et des ligands hydrophobes (groupes alkyls ou aryls) attachés de façon covalente au gel de la matrice. Le degré de substitution des absorbants des HIC est en général dans l'ordre de

10-50 $\mu\text{mol/ml}$ de gel de ligands alkyles C2-C8 ou simples aryles. La fixation des protéines aux adsorbants est conduite en présence de fortes concentrations en sels pour favoriser les interactions hydrophobes. L'un des principes admis est que les molécules d'eau autour du ligand et du soluté sont organisées en structure ordonnée formant une sorte de bouclier. Le sel ajouté interagit fortement avec les molécules d'eau ordonnées laissant peu de molécules disponibles pour faire l'effet de bouclier. Cela facilite l'interaction entre le ligand et la partie hydrophobe du soluté. L'élution est réalisée par un gradient décroissant linéaire ou par paliers de la concentration en sel du tampon d'élution (figure 66). Le pH et la température influencent la fixation des solutés et il est important d'en déterminer les conditions adéquates lors des séparations. Le sel couramment utilisé est le sulfate d'ammonium.



Figure 66: Interactions hydrophobes entre les ligands et les fonctions de la matrice

3. La chromatographie en phase inverse

Elle est basée sur les interactions solvants-groupes non polaires accessibles (parties hydrophobes) à la surface des biomolécules et des ligands hydrophobes (groupes alkyls) attachés de façon covalente au gel de la matrice. Cette technique de chromatographie est proche de celle de la chromatographie d'interactions hydrophobes dont elle se différencie par la densité des adsorbants qui est en général de l'ordre de centaines de $\mu\text{moles/ml}$ de gel et leur hydrophobicité accrue (C4-C18). En conséquence, les protéines sont liées par des liaisons relativement fortes aux adsorbants et

nécessitent l'utilisation de solvants non-polaires pour leur élution. La partie non polaire des alcools et des détergents entre en compétition avec les protéines liées aux sites d'adsorption de la matrice ce qui entraîne la désorption des protéines (figure 67). Cette technique est particulièrement utilisée dans les applications analytiques et préparatives pour les peptides et les protéines stables dans les mélanges eau-solvants organiques.

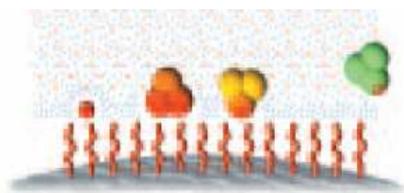


Figure 67: Interaction de solutés avec un support typique de phase inverse

4. La chromatographie d'affinité

Cette technique est idéale pour finir ou servir d'étape intermédiaire dans un protocole de purification et peut être utilisée dès qu'un ligand approprié est disponible pour la protéine recherchée. En effet, le succès d'une purification d'affinité nécessite un ligand biospécifique qui peut être attaché de façon covalente à une matrice de chromatographie. Les interactions biologiques entre le ligand et la molécule cible peuvent être des interactions électrostatiques ou hydrophobiques, des forces de Van Der Waals et/ou des liaisons hydrogènes. Le ligand doit maintenir sa liaison spécifique d'affinité pour la molécule cible après l'élimination par lavage des autres molécules. Pour éluer la molécule cible du milieu d'affinité l'interaction peut être renversée soit spécifiquement en utilisant un ligand compétitif, soit non spécifiquement en changeant le pH, la force ionique ou la polarité. En une étape, la purification par affinité peut ainsi éviter de perdre beaucoup de temps par rapport aux procédures en plusieurs étapes peu sélectives. Tout composé peut être utilisé comme un ligand pour purifier son partenaire

correspondant. Les molécules cibles peuvent être purifiées de mélanges biologiques complexes et des composés en faible quantité peuvent être purifiés d'extraits à fortes concentrations en substances contaminantes. L'effet de concentration permet d'utiliser de larges volumes d'échantillon et d'obtenir la molécule cible sous forme pure et concentrée. Des degrés de purification de l'ordre de plusieurs centaines de fois peuvent être atteints avec un fort taux de recouvrement (figure 68).

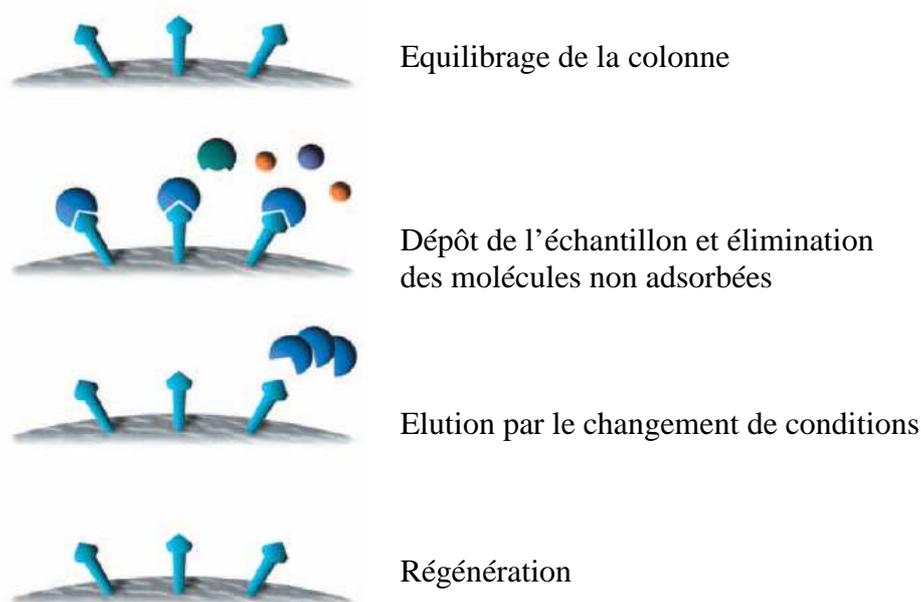


Figure 68: Différentes étapes de la chromatographie d'affinité

Quelques interactions biologiques typiques fréquemment utilisées en chromatographie d'affinité sont : (i) Les enzymes / les analogues de substrat, les inhibiteurs, les cofacteurs ; (ii) Le Glutathion / la Glutathion S transférase et la GST protéine de fusion ; (iii) les ions métalliques / les protéines de fusion poly (His), protéines natives avec histidine, cystéine et/ou tryptophane native sur leurs surfaces etc.

5. La chromatographie par adsorption en lit expansé

C'est une technique particulière de chromatographie par adsorption réversible de la molécule cible sur un adsorbant en suspension. La matrice portant le ligand n'est pas compacte mais est maintenue en expansion dans la colonne par le débit continu de l'éluant. Le lit fluidisé est stable quand les particules d'adsorbant sont en équilibre par la compensation entre la vitesse de sédimentation des particules d'adsorbant et la vitesse du flot d'éluant ascendant. Par cette méthode, les protéines cibles sont purifiées en un seul passage des extraits bruts ou de solutions contenant des particules sans clarification, concentration et purification initiale préalables. L'expansion du lit d'adsorbant crée une distance entre les particules d'adsorbant permettant le passage sans gêne de cellules, de débris cellulaires ou d'autres particules lors du dépôt de l'extrait brut sur la colonne.

Un cycle de manipulation comporte plusieurs étapes (figure 69). Il débute par (a,b) l'expansion et la stabilisation du lit en suspension caractérisées par la formation de petits mouvements circulaires des adsorbants. L'extrait brut non clarifié est ensuite déposé (c) sur la colonne par le même flux que celui utilisé pour l'expansion et l'équilibrage. Les molécules cibles sont adsorbées (d) alors que les éléments faiblement adsorbés comme les cellules, les débris cellulaires, les particules et les contaminants traversent sans encombre et sont éliminés par le courant d'éluant ascendant. Lorsque tous les éléments non fixés ou faiblement fixés ont été éliminés du lit expansé, le flot d'éluant est arrêté et les particules d'adsorbant se déposent rapidement dans la colonne. L'adaptateur de la hauteur de colonne est abaissé au sommet du dépôt des particules d'adsorbant. Le flux de l'éluant est renversé. Les protéines fixées (e) sont éluées en utilisant les conditions de tampon appropriées. L'éluât contient la protéine cible concentrée, partiellement purifiée, clarifiée et prête à être mieux purifiée par les chromatographies sur les gels compacts classiques.

Le lit est ensuite régénéré (f) sous sa forme sédimentée par un flot descendant de tampon spécifique du type de chromatographie réalisée. Cette régénération élue les protéines plus fortement fixées qui ne sont pas détachées par les conditions d'élution de la manipulation.

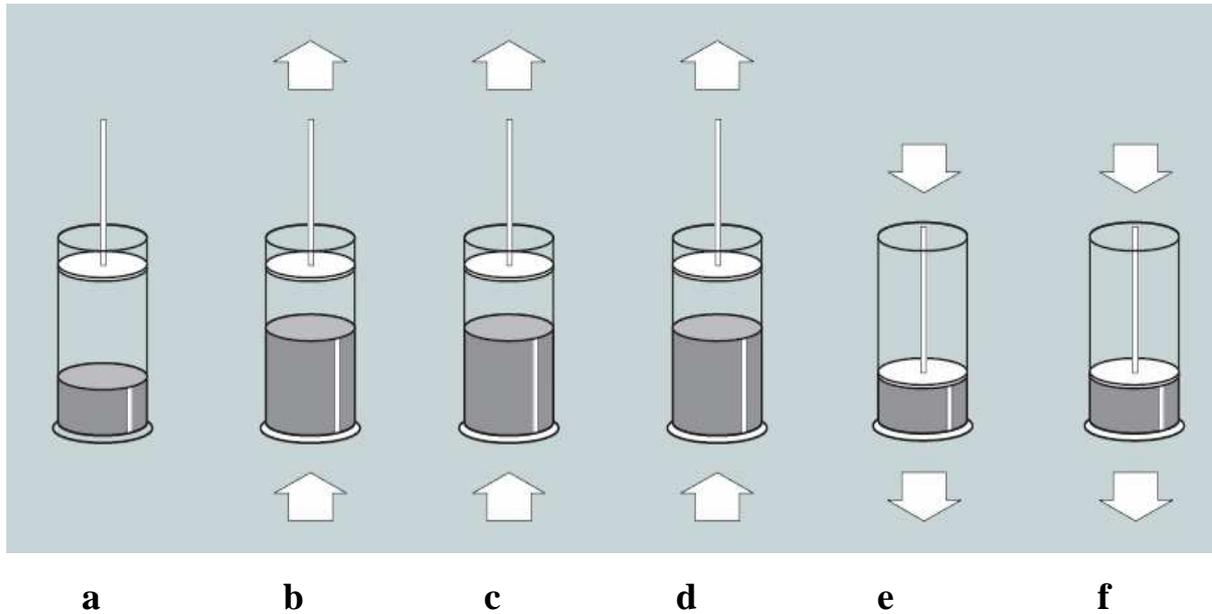


Figure 69: les étapes de la chromatographie en lit expansé

Enfin une procédure de lavage en place est appliquée pour enlever toutes les substances non spécifiquement liées, précipitées ou dénaturées du lit et lui restaurer ces performances initiales. La stabilité de la colonne est déterminée par le calcul du nombre de plateaux théoriques ($N = t^2/\sigma^2$ avec t : temps moyen de résidence et σ = déviation standard entre $t_{0.15}$ et les points 15,85% et 84,15% du signal UV maximal de la solution étalon) dont l'écart ne doit pas dépasser $\pm 20\%$ entre deux essais.

6. La chromatographie de gel filtration

Cette technique de chromatographie sépare les molécules en fonction de leur poids moléculaire. Le support de séparation est une matrice poreuse sous forme de particules sphériques choisie pour sa stabilité chimique et physique ainsi que son inertie. La séparation se fait en tampon isocratique souvent en présence de NaCl pour éliminer les éventuels effets de charge. Cette chromatographie est également utilisée pour changer de tampon ou pour dessaler un échantillon. Après le dépôt, les molécules dont la taille dépasse celle des pores de la matrice sont éluées les premières dans le « volume mort » désigné V_0 car elles passent par les espaces entre les billes et la paroi de la colonne à la même vitesse que le tampon. Les molécules ayant un accès partiel aux pores de la matrice sont éluées par ordre de poids moléculaires décroissants et sont caractérisées par leur « volume d'éluion » (V_e). Les molécules ayant un accès total aux pores de la matrice traversent la colonne mais ne sont pas séparées les unes des autres. Elles sont généralement éluées juste avant le « volume total » de la colonne (V_t) (figure 70).

A partir de ces volumes on détermine pour chaque protéine éluee une variable $K_{av} = (V_0 - V_e) / (V_t - V_0)$ dite coefficient de partition et qui est corrélé au PM ($0 \leq K_{av} \leq 1$). Attention toutefois au volume d'échantillon à déposer qui doit être le plus petit possible ($\leq 3\%$ du volume de V_t). Chaque colonne est déterminée par sa résolution qui dépend à la fois de la capacité à distinguer entre les molécules (sélectivité) et de sa capacité à séparer les pics distincts les plus proches (efficacité).

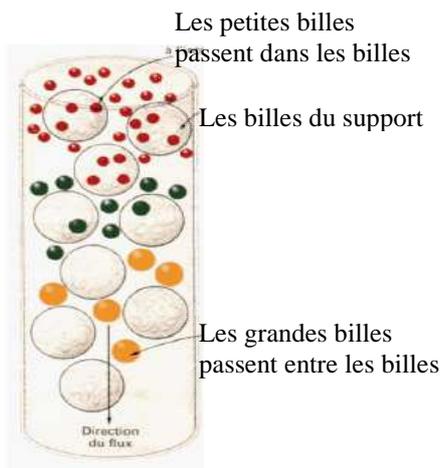


Figure 70: Schéma de passage de diverses molécules en gel filtration

(Les molécules diffusent dans et en dehors de la matrice selon leur taille ; les grosses molécules ne diffusent pas dans la matrice et passent à travers la colonne)

IV. L'ELECTROPHORESE

L'électrophorèse est une technique de séparation basée sur le déplacement de molécules chargées dans un champ électrique en fonction de leur charge, de leur taille et des mailles du support utilisé. Les supports les plus fréquents sont l'agarose (polymère de α -D-Gal-3,6 anhydro L-Gal-) et le gel de polyacrylamide. Elle permet de séparer les protéines en fonction de leurs différences en masses moléculaires, mobilité électrophorétique, points isoélectriques ou des combinaisons variables de ces propriétés. Au laboratoire, c'est l'une des plus performantes techniques applicables à la purification des molécules biologiques actives. De nombreuses variantes (en présence de SDS, en gradient de pH, en gradient de polyacrylamide, migration bidirectionnelle) de cette technique sont largement utilisées par les biochimistes pour les travaux analytiques et préparatifs.

Même si un grand nombre de paramètres est à considérer, la purification des protéines varie d'une procédure en une simple étape de précipitation aux processus de production validés à grande échelle. Cependant, quelque soit le

procédé choisi, il est toujours influencé par le matériel biologique de départ, les éléments à éliminer, les contraintes physico-chimiques et enfin les ressources et l'équipement disponibles. Le plus souvent il faut plusieurs étapes pour atteindre la pureté désirée. La méthode courante comporte des étapes d'extraction et de clarification, de capture, de purification intermédiaire et de polissage (figure 71).

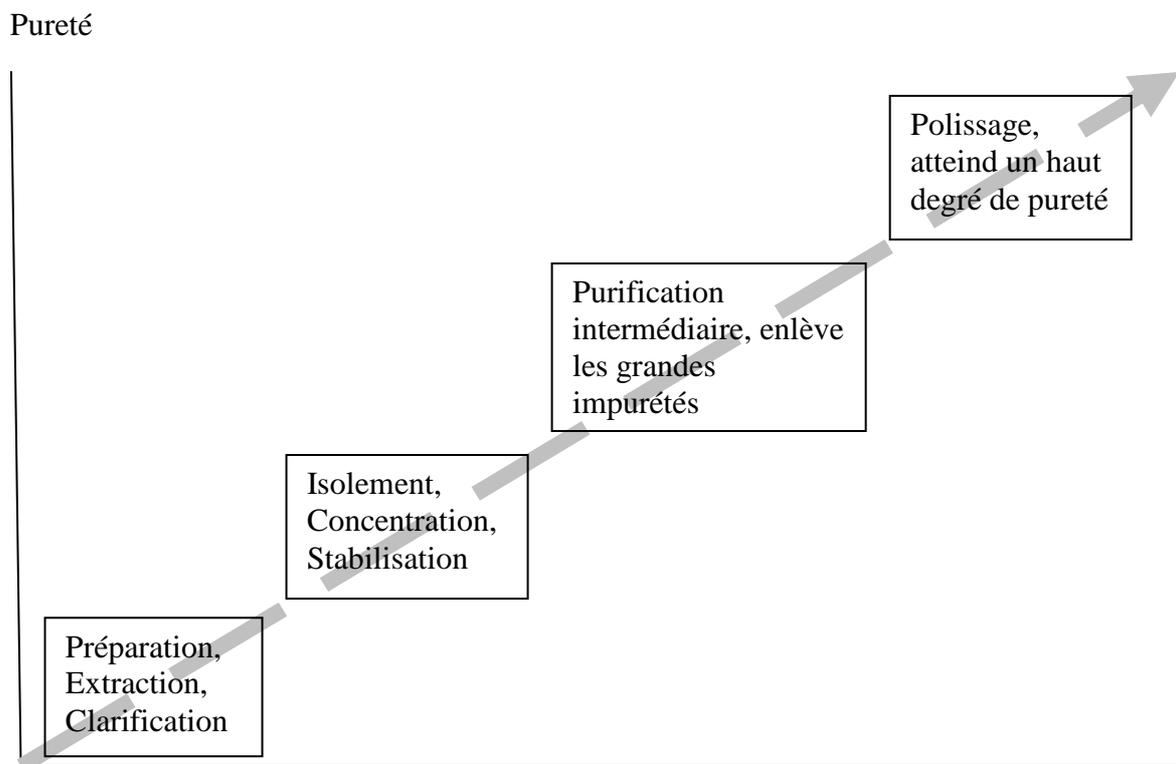


Figure 71: La préparation et les trois phases de la purification

Ce nombre est variable selon l'enzyme à purifier. La clé du succès et de l'efficacité de la purification des protéines est de sélectionner les techniques les plus appropriées, d'optimiser leurs performances selon les conditions expérimentales et de les combiner en une logique pour maximiser les rendements et réduire le nombre d'étapes nécessaires.

ANNEXE C : PRINCIPE D'ANALYSE DES SPECTRES

1. La spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une méthode qui permet de déterminer la masse moléculaire d'un composé. Elle permet également d'obtenir, par fragmentation, des informations structurales caractéristiques des molécules étudiées. C'est une méthode d'ionisation très sensible qui permet de travailler au niveau de la picomole.

La spectrométrie de masse utilise des champs électriques et magnétiques qui exercent leurs forces sur des particules chargées (ions) dans le vide. Le composé à analyser doit être chargé (ionisé) et introduit dans la phase gazeuse du système à vide de l'appareil. Il existe différentes méthodes d'ionisation et de désorption des composés qui ne sont pas volatiles et/ou qui sont thermiquement labiles. L'échantillon est dissous dans une matrice liquide et placé sur une double à l'intérieur de l'appareil. La cible est bombardée avec un faisceau d'atomes rapides (exemple les atomes de Xénon à 8 keV) qui désorbent l'ion pseudo-moléculaire $[M+Na]^+$ et les fragments de l'échantillon ainsi que ceux de la matrice (qui correspondent au bruit de fond). La masse précise d'un pic peut être déterminée à l'aide du ratio de la masse approximative de ce pic et de celle d'un pic de référence. La masse moléculaire exacte (m/z) de l'échantillon est calculée à l'aide de l'ion pseudo-moléculaire $[M+Na]^+$. Les PGF ont été analysés par la technique LSI-MS.

2. La spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les noyaux de certains atomes qui ont soit un nombre de masse impair soit un nombre atomique impair, possèdent un spin, c'est-à-dire un moment angulaire. Ces noyaux peuvent être étudiés par RMN. Assimilables à des

sphères chargées, ces noyaux peuvent tourner autour de leur axe et engendrer un dipôle magnétique tel un petit aimant. Cet aimant possède un moment magnétique μ et un moment cinétique p . Ces derniers sont colinéaires.

$\mu = \gamma p$ ou γ est le rapport gyromagnétique du noyau considéré

Quand un champ magnétique constant H_0 est appliqué, l'aimant tend à aligner son moment magnétique dans la direction de H_0 et son axe de rotation décrit un mouvement de précession autour de H_0 à la vitesse angulaire ω . Il existe $2I+1$ orientations possibles pour un noyau, I représentant le nombre quantique de spin. Pour le proton, I est égal à $1/2$ et seules deux orientations sont possibles. La première correspond à un niveau de basse énergie (orientation dans le même sens que H_0). Et la seconde à un niveau de haute énergie (orientée dans le sens opposé à H_0). L'énergie nécessaire au passage du niveau de basse énergie vers le niveau de haute énergie correspond à un quantum d'énergie $h\nu$. D'où la relation de Larmor : $\Delta E = h\nu = \gamma H_0 / 2\pi$ d'où la $2\pi\nu = \gamma H_0$.

L'application d'un champ magnétique supplémentaire H_1 oscillant à la fréquence ν (choisie de telle sorte à atteindre la vitesse angulaire du mouvement de précession du noyau c'est-à-dire la relation $2\pi\nu = \omega$) et perpendiculaire à H_0 permet au noyau d'absorber l'énergie nécessaire pour basculer dans le niveau de haute énergie. C'est le phénomène de résonance. Chaque type de noyau (^1H , ^{13}C , ...) résonne à une fréquence qui lui est propre et qui dépend de son environnement électronique. Différents processus permettent ensuite aux noyaux excités de revenir à leur état d'équilibre. Les expériences de RMN ne sont pas possibles sans mécanismes de retour des noyaux à l'état de basse énergie. Ces mécanismes sont désignés par le terme général de relaxation. L'enregistrement du signal est effectué au moment de la relaxation des noyaux. Le signal se présente sous forme d'une ou d'une superposition de sigmoïdes amorties (FID : Free Induction Decay)

représentant l'évolution de l'amplitude du signal en fonction du temps. Une opération mathématique est ensuite appliquée au FID, la transformée de Fourier (TF) et permet ainsi l'acquisition du signal RMN représentant l'évolution de l'amplitude du signal en fonction de la fréquence sous forme d'un spectre.

Déplacement chimique (δ en ppm), cas du proton :

Tous les protons présents dans une molécule ne donnent pas un signal unique. Les fréquences de résonance des protons dans la molécule dépendent de leur environnement nucléaire. Cet environnement peut créer un champ magnétique induit supplémentaire au niveau du noyau. Ceci peut avoir deux effets sur le déplacement chimique du noyau considéré :

- un blindage du proton lorsqu'il est dans le sens contraire du H_0 qui correspond à un déplacement du δ de ce proton vers de plus faibles valeurs.
- Un déblindage du proton lorsqu'il est dans le même sens de H_0 qui correspond à un déplacement du δ de ce proton vers de plus fortes valeurs

Surface des pics :

Elle est indicatrice du nombre de protons équivalents qui résonnent à une fréquence donnée (et apparaissent donc sur le spectre à un δ donné).

Couplage spin-spin :

Quand des protons sont portés par des atomes de carbone voisins, il peut se produire entre eux une interaction appelée couplage de spin. Ainsi un proton

Ha est soumis au champ H_0 mais aussi au champ induit par ses voisins. Le signal de Ha ne correspond plus à un seul pic (cas d'un proton isolé ou de protons magnétiquement identiques) mais à plusieurs raies d'intensités variables. D'une manière générale si n désigne le nombre de protons équivalents voisins de Ha, le nombre de raies du signal de Ha est égal à $n+1$. On parle alors de multiplet. Les intensités des raies qui composent ce multiplet sont données par le triangle de Pascal, sont caractéristiques et dépendent de n :

$n = 1$, le signal est un doublet, les intensités ont un rapport de 1 : 1

$n = 2$ le signal est un triplet, les intensités ont un rapport de 1 : 2 : 1 et ainsi de suite. La présence de plusieurs protons voisins de Ha décuplent d'autant le nombre de raies de son signal. Ainsi, si Ha possède deux voisins non équivalents Hb et Hc, il donne un doublet avec chacun d'entre eux et le signal final est un doublet dédoublé. Le nombre de raies totales est donc égal à la multiplication entre les raies de chacun des couplages.

Constante de couplage :

Elle désigne l'écart entre les composants de multiplets. Elle est indépendante de H_0 et est exprimée en Hertz (Hz). Il y a au sein d'un signal autant de constantes de couplages que de couplages proprement dit. Ainsi, si un proton couple avec deux voisins non équivalents, il existera deux constantes de couplage.

De nombreuses tables de références de déplacements chimiques et de constantes de couplages sont disponibles. Elles constituent une aide précieuse lors des dépouillements des spectres.