

Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse*

Discipline ou spécialité : *Ingénieries microbienne et enzymatique*

Présentée et soutenue par *Yoann BRISON*

Le 20 septembre 2010

Titre :

*CONTRIBUTION À LA COMPRÉHENSION DU MÉCANISME DE FORMATION DE
DEXTRANES OU GLUCO-OLIGOSACCHARIDES RAMIFIÉS EN α -(1→2) PAR
L'ENZYME GBD-CD2 : ÉTUDES CINÉTIQUE ET STRUCTURALE*

JURY

M. Richard HASER	Directeur de Recherches CNRS, IBCP, Lyon	Rapporteur
M. Charles TELLIER	Professeur, Université de Nantes	Rapporteur
M. Bauke W. DIJKSTRA	Professeur, Université de Groningen, Pays-Bas	Examineur
M. Samuel TRANIER	Maître de Conférences, Université Paul Sabatier, Toulouse	Examineur
Mme Magali REMAUD-SIMEON	Professeur, INSA Toulouse	Présidente
M. Pierre MONSAN	Professeur, INSA Toulouse	Directeur de thèse

École doctorale : *Sciences Écologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries de Toulouse*

Unité de recherche : *Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés
UMR5504 CNRS/INSA, UMR792 INRA/INSA*

*Collaborations avec le laboratoire « Protein Crystallography Group » de l'Université de Groningen aux
Pays-Bas et avec le laboratoire de Biophysique Structurale de l'IPBS à Toulouse*

Directeur de Thèse : *Pierre MONSAN*

Rapporteurs : *Richard HASER, Charles TELLIER*



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse*

Discipline ou spécialité : *Ingénieries microbienne et enzymatique*

Présentée et soutenue par *Yoann BRISON*

Le 20 septembre 2010

Titre :

*CONTRIBUTION À LA COMPRÉHENSION DU MÉCANISME DE FORMATION DE
DEXTRANES OU GLUCO-OLIGOSACCHARIDES RAMIFIÉS EN α -(1→2) PAR
L'ENZYME GBD-CD2 : ÉTUDES CINÉTIQUE ET STRUCTURALE*

JURY

M. Richard HASER	Directeur de Recherches CNRS, IBCP, Lyon	Rapporteur
M. Charles TELLIER	Professeur, Université de Nantes	Rapporteur
M. Bauke W. DIJKSTRA	Professeur, Université de Groningen, Pays-Bas	Examineur
M. Samuel TRANIER	Maître de Conférences, Université Paul Sabatier, Toulouse	Examineur
Mme Magali REMAUD-SIMEON	Professeur, INSA Toulouse	Présidente
M. Pierre MONSAN	Professeur, INSA Toulouse	Directeur de thèse

École doctorale : *Sciences Écologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries de Toulouse*

Unité de recherche : *Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés
UMR5504 CNRS/INSA, UMR792 INRA/INSA*

*Collaborations avec le laboratoire « Protein Crystallography Group » de l'Université de Groningen aux
Pays-Bas et avec le laboratoire de Biophysique Structurale de l'IPBS à Toulouse*

Directeur de Thèse : *Pierre MONSAN*

Rapporteurs : *Richard HASER, Charles TELLIER*

Nom : BRISON

Prénom : Yoann

Titre : Contribution à la compréhension du mécanisme de formation de dextrans ou gluco-oligosaccharides ramifiés en α -(1→2) par l'enzyme GBD-CD2 : études cinétique et structurale.

Filière : Ingénieries microbienne et enzymatique

Directeur de thèse : Pr. Pierre MONSAN

Année : 2010 (20 Septembre)

Lieu : Toulouse

N° ordre : 1044

Pages : 251

RÉSUMÉ :

Issue de la troncature de la dextrane-saccharase DSR-E, l' α -(1→2) transglucosidase recombinante GBD-CD2 catalyse à partir de saccharose le branchement de molécules acceptrices tels que les dextrans, les isomalto-oligosaccharides ou les gluco-oligosaccharides (GOS ; [6)- α -D-Glcp-(1→)_n- α -D-Glcp-(1→4)-D-Glcp, avec 1<n<9). L'objet de cette étude a porté sur la compréhension des relations structure-activité de GBD-CD2 afin d'investiguer les facteurs structuraux responsables de la synthèse des liaisons osidiques de type α -(1→2). La troncature rationnelle du domaine de liaison au glucane (GBD) de l'enzyme GBD-CD2 (192 kDa) a abouti à l'isolement de trois formes tronquées actives, de masses moléculaires égales à 180, 147 et 123 kDa. Après purification de GBD-CD2 et de ΔN_{123} -GBD-CD2 (123 kDa), des études cinétiques ont permis de mettre en évidence que les enzymes présentent la même régiospécificité. L'activité d'hydrolyse du saccharose peut être modélisée par le modèle de Michaelis – Menten (k_{cat} respectifs de 109 et 76 s⁻¹). En présence de dextrane accepteur, ces enzymes sont activées. L'activité d' α -(1→2) glucosylation suit un modèle Ping Pong Bi Bi (k_{cat} respectifs de 970 et 947 s⁻¹). En modulant le ratio molaire entre le donneur d'unités glucosyle et l'accepteur de ces unités ([saccharose]/[dextrane]), il est possible de synthétiser des dextrans dont le pourcentage de liaisons α -(1→2) est contrôlé et varie de 10% à 40%. La caractérisation des produits de la réaction menée en présence de saccharose et de GOS a permis d'isoler et de caractériser pour la première fois des GOS arborant des unités glucosyle branchées en α -(1→2) sur les unités glucosyle adjacentes de la chaîne principale. Enfin, la résolution de la structure de ΔN_{123} -GBD-CD2 à 3,2 Å révèle que cette enzyme adopte le repliement original « en U » similaire à celui décrit pour GTF180- ΔN . La comparaison des gorges catalytiques des deux dextrane-saccharases cristallisées apporte des éléments pouvant expliquer la régiospécificité singulière de ΔN_{123} -GBD-CD2, et ouvre la voie à des travaux de mutagenèse visant à investiguer le rôle de résidus potentiellement clés.

MOTS-CLÉS :

Dextrane-saccharase, α -(1→2) glucosylation, DSR-E, dextrans branchés en α -(1→2), GOS branchés en α -(1→2), purification, structures.

JURY :

Mme Magali REMAUD-SIMÉON, Professeur, INSA Toulouse, Présidente de Jury

M. Richard HASER, Directeur de Recherche CNRS, IBCP, Lyon, Rapporteur

M. Charles TELLIER, Professeur, Université de Nantes, Rapporteur

M. Bauke W. DIJKSTRA, Professeur, Université de Groningen, Pays-Bas,

M. Samuel TRANIER, Maîtres de Conférences, IPBS, Toulouse,

M. Pierre MONSAN, Professeur, INSA Toulouse, Directeur de Thèse

Soutenance prévue le 20 Septembre 2010 à l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse

École doctorale : SEVAB (Sciences Écologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries)

Laboratoire : Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés UMR5504, UMR792.

Last name: BRISON

First name: Yoann

Title: Contribution to the understanding of the α -(1 \rightarrow 2) branching mechanism of dextrans and gluco-oligosaccharides by GBD-CD2 enzyme: kinetic and structural studies.

Specialty: Enzymatic and microbial engineering

Supervisor: Pr. Pierre MONSAN

Year: 2010 (September 20th)

Place: Toulouse

Pages: 251

Abstract:

GBD-CD2 is a recombinant α -(1 \rightarrow 2) transglucosidase constructed by truncation of the DSR-E dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. From sucrose, GBD-CD2 catalyses the α -(1 \rightarrow 2) branching reaction onto acceptor molecules such as dextrans, isomalto-oligosaccharides or gluco-oligosaccharides (GOS; [6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow)]_n- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)-D-Glcp, 1<n<9). This work has been focused on structure activity relationship studies. Rational truncations of the glucan binding domain (GBD) led to the expression in *E. coli* of three active enzymes, showing molecular masses of 180, 147 and 123 kDa. After purification of the recombinant GBD-CD2 and Δ N₁₂₃-GBD-CD2, we showed that both enzymes display the same regiospecificity. Steady-state kinetics revealed that the activity of sucrose hydrolysis displays a Michaelis Menten type of kinetics (k_{cat} 109 s⁻¹ and 76 s⁻¹, respectively). In the presence of dextran acceptor, these enzymes are activated. The α -(1 \rightarrow 2) transglucosidase activity from sucrose onto dextrans was modelled by a Ping Pong Bi Bi mechanism (k_{cat} 970 s⁻¹ and 947 s⁻¹, respectively). When varying the molar ratio between the glucosyl donor and the acceptor ([sucrose]/[dextran]), the percentage of α -(1 \rightarrow 2) linkages in dextrans can be controlled from 10% to 40%. Additionally, from reactions in the presence of GOS and sucrose, we isolated and characterized new α -(1 \rightarrow 2) branched GOS with contiguous α -(1 \rightarrow 2) branchings along linear GOS chains. Finally, the X-ray structure of Δ N₁₂₃-GBD-CD2 at 3.2 Å resolution revealed that this enzyme has a very original "U folding" similar to that described for GTF180- Δ N. Study of the residues lining the catalytic gorges of the two crystallized enzymes revealed the structural determinants possibly involved in the singular regiospecificity of Δ N₁₂₃-GBD-CD2. Our work opens the way to mutagenesis work for discovering key structural determinants of Δ N₁₂₃-GBD-CD2.

Keywords:

Dextranucrase, α -(1 \rightarrow 2) glucosylation, DSR-E, α -(1 \rightarrow 2) branched dextrans, α -(1 \rightarrow 2) branched GOS, purification, structures.

JURY :

Mrs Magali REMAUD-SIMÉON, Professor, INSA Toulouse, France

Mr Richard HASER, Research Scientist CNRS, IBCP, Lyon, France

Mr Charles TELLIER, Professor, University of Nantes, France

Mr Bauke W. DIJKSTRA, Professor, University of Groningen, The Netherlands

Mr Samuel TRANIER, Lecturer, IPBS, Toulouse, France

Mr Pierre MONSAN, Professor, INSA Toulouse, France

PhD Defense planned September, the 20th 2010 at the National Institute of Applied Sciences in Toulouse

Doctorate School: SEVAB (Ecological, Veterinary and Agronomic Sciences and Bioengineering)

Laboratory: Laboratory for Biosystems and Chemical Engineering UMR5504 CNRS/INSA, UMR792 INRA/INSA

Publication dans des journaux à comité de lecture

Synthesis of dextrans with controlled amounts of α -(1→2) linkages using the transglucosidase GBD-CD2. Y. Brison¹, E. Fabre¹, C. Moulis, J.-C. Portais, P. Monsan, M. Remaud-Siméon (¹ co-auteurs.). Applied Microbiology and Biotechnology. (2010), 86(2), pp. 545-554.

Structural characterization of gluco-oligosaccharides and dextrans produced by the α -(1→2) branching enzyme GBD-CD2. Y. Brison, F. Lefoulon, S. Morel, N. Monties, G. Potocki-Véronèse, P. Monsan, M. Remaud-Siméon. (2010). *En préparation*

Structural and functional characterizations an α -(1→2) branching enzyme derived from DSR-E dextransucrase. Y. Brison, T. Pijning, S. Tranier, E. Fabre, L. Mourey, S. Morel, G. Potocki - Véronèse, P. Monsan, M. Remaud-Siméon, B. W. Dijkstra. (2010). *En préparation.*

Communication nationale

Les glucane-saccharases et la synthèse de biopolymères et de prébiotiques. Y. Brison, C. Moulis, S. Emond, M. Remaud-Siméon, P. Monsan. Biofutur. (2008), vol 27/288, pp. 29-33.

Conférences

How to synthesize the rare α -(1→2) glucosidic linkage with an enzyme derived from a GH70 family glucansucrase ? Y. Brison & M. Remaud-Siméon. (Septembre 2007). 3rd Symposium on the α -Amylase Family, Smolenice, Slovaquie.

Synthesis of prebiotic α -(1→2) branched gluco-oligosaccharides and dextrans with an enzyme derived from a glucansucrase. Y. Brison, S. Morel, N. Monties, E. Fabre, P.

Monsan, G. Potocki-Véronèse, M. Remaud-Siméon. (Avril 2010). *4th Symposium on Biocatalysis for the Food and Drink Industries, INSA, Toulouse.*

Communications par affiche

DSR-E: the sole enzyme synthesizing the rare α -(1→2) linkage. Y. Brison, E. Fabre, S. Bozonnet, P. Monsan, G. Potocki-Véronèse & M. Remaud-Siméon. (Septembre 2007). *3rd Symposium on the α -Amylase Family, Smolenice, Slovaquie.*

Directed evolution to enlarge glucansucrase potentialities. S. Emond, R. Irague, Y. Brison, I. André, G. Potocki-Véronèse, P. Monsan, M. Remaud-Siméon. (Janvier 2008). *Workshop "Directed evolution approaches in structural biology", EMBL Grenoble Outstation, Grenoble.*

DSR-E: a glucansucrase synthesizing the rare α -(1→2) linkage. Y. Brison, E. Fabre, G. Potocki-Véronèse, M. Remaud-Siméon & P. Monsan. (Mai 2008). *Groupe Français des Glucides, Ax-les-Thermes.*

Glucansucrase molecular engineering for novel oligosaccharide and polysaccharide synthesis. Y. Brison, R. Irague, C. Moulis, E. Champion, S. Emond, S. Pizzut-Serin, I. Andre, G. Véronèse, S. Morel, P. Monsan, M. Remaud-Siméon. (Décembre 2008). *Colloque Chimie Verte : Journées Biopolymères, Biomatériaux, Chimie Verte, La Baule.*

How to control the amount of α -(1→2) linkages in dextran using GBD-CD2 transglucosidase. Y. Brison, E. Fabre, N. Monties, P. Escalier, S. Morel, G. Véronèse, P. Monsan, M. Remaud-Siméon. (Mai 2009). *8th Carbohydrate Bioengineering Meeting, Ischia- Italie.*

Engineering glucansucrases from family 70 of glycoside-hydrolases for the synthesis of novel polysaccharides. R. Irague, J. Lima, C. Moulis, Y. Brison, S. Emond, S. Massou, I. André, P. Monsan, M. Remaud-Siméon & G. Potocki Véronèse. (Août 2009). *Congrès annuel de la SFBBM, Nancy*

«Toute culture naît du mélange, de la rencontre, des chocs».

OCTAVIO PAZ

«L'homme est un éternel chercheur. Il aspire à l'infini, il trouve le fini.»

JEAN-CHARLES HARVEY - *Les demi-civilisés*.

«On peut définir la science-fiction comme la branche de la littérature qui se soucie des réponses de l'être humain aux progrès de la science et de la technologie.»

ISAAC ASIMOV - Extrait de la préface de *David Starr, justicier de l'espace*.

Remerciements

Je voudrais par ces quelques mots témoigner ma reconnaissance envers les différentes personnes qui ont participé de près ou de loin à ce travail.

Émeline, je crois que c'est à toi que je dois le goût que j'ai acquis pour la recherche. Et tu as toujours été au cours des six mois de stage de Master Recherche d'une bonne humeur et d'un entrain indéfectibles.

Pierre, vous qui m'avez offert l'opportunité de réaliser ce travail, je vous dois un grand merci. Magali, je tiens à te remercier chaleureusement pour les corrections du manuscrit, des papiers, pour la réflexion sur GBD-CD2 et son action. Ce travail, je le dois aussi à vous deux, Gaby et Sandrine pour les relectures, la RMN, la biomol, l'enzymo !

Ah, la cristallographie de GBD-CD2 !

Bauke, merci de m'avoir enseigné les bases théoriques de cristallographie des protéines. J'ai commencé avec toi, Tjaard, à apprendre les aspects concrets de la cristallographie. Merci à vous deux pour nous avoir fait confiance !

Merci à toi Samuel, on a poursuivi et testé nombre de traitements afin de tirer le meilleur de ce jeu de données à 3,2 Å... Merci, Lionel de m'avoir permis de poursuivre le travail débuté aux Pays-Bas. Je crois que je n'oublierai pas de sitôt les nombreuses heures passées devant la station graphique à reconstruire et à interpréter les cartes de densité électronique...Mais, au final, ce fût génial.

Mais avant de faire cristalliser GBD-CD2, il a fallu de nombreux essais pour la purifier. Alors, Péco, maître es purification, je te remercie. On a passé un certain nombre d'heures à tester différentes colonnes, protocoles...

Nelly, tu m'as aidé ou as réalisé une partie du travail rapporté dans ce manuscrit. Je ne sais pas combien de fois on a purifié, cristallisé, réalisé des cinétiques, des tests...Alors, un immense merci à toi. Merci également à Carla Compte-Stevens et à Anne-Sophie Paris, deux stagiaires de choc !

Merci à toute l'équipe C.I.M.E.S. passée ou présente : Sandra, Stéphan, Sabrina, Élise, Vincent, Romain, Juliette, Laurence, Manue, Florence, Etienne, Olivier, Fred, Sophie Ba., Faten, Claire et à tous les autres...

Merci à Charles Tellier et à Richard Haser pour avoir évalué ce travail en tant que rapporteurs. Je remercie également les autres membres du jury.

Enfin, un énorme merci à ma famille et à mes amis !

Sommaire

SOMMAIRE	17
INTRODUCTION	23
CHAPITRE I : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	29
I. LES MOLÉCULES PRÉBIOTIQUES, DES INGRÉDIENTS FONCTIONNELS	31
I.A. DÉFINITION D'UNE MOLÉCULE PRÉBIOTIQUE.....	31
I.B. RÉVISION RÉCENTE DU CONCEPT DE PRÉBIOTIQUE	32
I.C. PRINCIPAUX PRÉBIOTIQUES COMMERCIALISÉS	33
I.D. EFFETS DES PRÉBIOTIQUES	35
I.E. DES PRÉBIOTIQUES INNOVANTS : LES GLUCO-OLIGOSACCHARIDES BRANCHÉS EN α -(1→2)	35
II. LES GLUCANE-SACCHARASES	40
II.A. PRÉSENTATION DES GLUCANE-SACCHARASES	40
II.A.1. Biodiversité des micro-organismes producteurs de glucane-saccharases.....	40
II.A.2. Diversité des réactions catalysées par les glucane-saccharases	42
II.A.3. Classification des glucane-saccharases.....	43
II.A.3.a. Selon la classification Carbohydre Active Enzymes (CAZy).....	43
II.A.3.b. Selon la classification E.C.....	43
II.B. RELATIONS STRUCTURE-ACTIVITÉ DES GLUCANE-SACCHARASES	44
II.B.1. Homologies structurales des glucane-saccharases.....	44
II.B.2. L'amylosaccharase de <i>Neisseria polysaccharea</i> (GH13).....	47
II.B.2.a. Structure tri-dimensionnelle.....	47
II.B.2.b. Mécanisme catalytique.....	50
II.B.2.c. Mécanisme de polymérisation.....	52
II.B.3. Glucane-saccharases de la famille GH70.....	52
II.B.3.a. Séquences consensus des GS de la famille GH70	52
II.B.3.b. Mécanisme catalytique.....	55
II.B.3.c. Mécanisme de polymérisation.....	55
II.B.3.d. Mécanisme des réactions d'accepteur	56
II.B.3.e. Modèles cinétiques pour les réactions de polymérisation et d'accepteurs.....	57
II.C. STRUCTURE 3D DE LA DEXTRANE-SACCHARASE GTF180- Δ N DE <i>LACTOBACILLUS REUTERI</i> 180.....	58
II.C.1. Repliement global.....	58
II.C.2. Une organisation en domaines surprenante	59
II.C.3. Site actif en présence de saccharose.....	61
II.C.4. Sites de fixation du maltose.....	64
III. GBD-CD2 : UNE α-(1→2) TRANSGLUCOSIDASE ISSUE DE LA DEXTRANE-SACCHARASE DSR-E	66

III.A. LES PRODUITS SYNTHÉTISÉS PAR L'ACTIVITÉ DEXTRANE-SACCHARASE DE LEUCONOSTOC MESENTEROIDES NRRL B-1299.....	66
III.B. LA DEXTRANE-SACCHARASE DSR-E.....	67
III.C. CARACTÉRISATIONS DES MUTANTS TRONQUÉS DE DSR-E.....	68
III.C.1. Effets des délétions de domaines sur la synthèse de polymère.....	69
III.C.2. Effets des délétions de domaines sur la réaction d'accepteur en présence de maltose	70
III.C.3. Caractérisation du mutant GBD-CD2.....	73
IV. OBJECTIFS DE LA THÈSE	75
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	77
CHAPITRE II : SYNTHÈSE PAR LA TRANSGLUCOSIDASE GBD-CD2 DE DEXTRANES AVEC UN TAUX CONTRÔLÉ DE LIAISONS α-(1→2)	93
SUMMARY.....	97
I. INTRODUCTION	97
II. RESULTS	100
II.A. KINETIC STUDIES.....	100
II.B. KINETIC MODELLING OF α -(1→2) TRANSGLUCOSYLATION.....	101
II.C. CONTROL OF THE α -(1→2) BRANCHING DEGREE.....	103
III. DISCUSSION	107
IV. MATERIALS AND METHODS	109
IV.A. CLONING AND PRODUCTION OF THE TRANSGLUCOSIDASE GBD-CD2.....	109
IV.B. PURIFICATION OF GBD-CD2	110
IV.C. ENZYMATIC ACTIVITY ASSAY.....	110
IV.D. DATA ACQUISITION FOR STEADY-STATE KINETICS	111
IV.E. α -(1→2) BRANCHING OF DEXTRANS, AND PURIFICATION.....	111
IV.F. NMR ANALYSIS OF POLYMERS.....	112
V. ACKNOWLEDGEMENTS	113
REFERENCES	115
CHAPITRE III : MODE D'α-(1→2) GLUCOSYLATION DES DEXTRANES ET DES GLUCO-OLIGOSACCHARIDES PAR GBD-CD2.....	121
I. SUMMARY	125
II. INTRODUCTION	126
III. RESULTS	127
III.A. ANALYSIS OF THE GLUCOSYLATION PATTERN OF PURE COMPOUND 1 AND COMPOUND 4.....	127

III.A.1.	<i>Analysis of acceptor reaction products onto compound 1</i>	128
III.A.1.a.	Structure of compound 1	129
III.A.1.b.	Structure of compound 2	130
III.A.1.c.	Structure of compound 3	133
III.A.2.	<i>Analysis of acceptor reaction products onto compound 4</i>	135
III.A.2.a.	Structure of compound 4	136
III.A.2.b.	Structures of compounds 5a, 5b and 5c	137
III.A.2.c.	Structures of compounds 6a and 6b	138
III.A.2.d.	Structure of compound 7	140
III.A.3.	<i>Acceptor reaction with heptasaccharides 6a and 6b</i>	141
III.B.	ANALYSIS OF ACCEPTOR REACTION PRODUCTS ONTO 1.5 KDA AND 10 KDA DEXTRANS	143
III.B.1.	<i>Analysis of branched dextrans before and after Aspergillus niger amyloglucosidase hydrolysis</i>	144
III.B.1.a.	Branched dextrans produced from 1.5 kDa linear dextran	144
III.B.1.b.	Branched dextrans produced from 10 kDa linear dextran	145
III.B.2.	<i>Analysis of α-(1\rightarrow2) branched dextrans digested by Chaetomium gracile endodextranase</i>	146
III.C.	DISCUSSION	148
III.D.	MATERIALS AND METHODS	150
III.D.1.	<i>Production and purification of the GBD-CD2 α-(1\rightarrow2) transglucosidase and of DSR-S dextranucrase</i>	150
III.D.2.	<i>Enzymatic activity assay of the GBD-CD2 α-(1\rightarrow2) transglucosidase</i>	151
III.D.3.	<i>Large scale production and purification of compound 1 and compound 4</i>	151
III.D.4.	<i>Large-scale production and purification of α-(1\rightarrow2) branched compound 1 and compound 4</i>	152
III.D.5.	<i>Small-scale acceptor reactions onto compound 1 and compound 4</i>	152
III.D.6.	<i>Enzymatic synthesis of dextrans with controlled amounts of α-(1\rightarrow2) linkages</i>	152
III.D.7.	<i>Enzymatic degradations of α-(1\rightarrow2) branched compound 4 and dextrans</i>	153
III.D.8.	<i>Analytic chromatography</i>	153
III.D.8.a.	GOS analysis by HPLC and LC-MS	153
III.D.8.b.	HPLC assays of glucose and fructose for initial velocity determinations	154
III.D.8.c.	HPAEC-PAD analysis	154
III.D.9.	<i>1D and 2D NMR analyses</i>	155
III.D.10.	<i>High-resolution mass spectrometry</i>	155
IV.	ACKNOWLEDGEMENTS	156
	REFERENCES	157
	CHAPITRE IV : CARACTÉRISATIONS STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE DE LA TRANSGLUCOSIDASE ΔN₁₂₃-GBD-CD2 SPÉCIFIQUE DE LA FORMATION DE LIAISONS α-(1\rightarrow2) GLUCOSIDIQUES	163
I.	SUMMARY	167

II. INTRODUCTION	168
III. RESULTS AND DISCUSSION	172
III.A. CONSTRUCTION AND EXPRESSION OF TRUNCATED GBD-CD2 ENZYMES	172
III.B. PURIFICATIONS OF GBD-CD2 AND ΔN_{123} -GBD-CD2	174
III.C. COMPARISON OF ΔN_{123} -GBD-CD2 WITH THE FULL LENGTH GBD-CD2	174
III.D. KINETIC STUDIES OF ΔN_{123} -GBD-CD2	181
III.E. DESCRIPTION OF ΔN_{123} -GBD-CD2 STRUCTURE	183
III.E.1. Overall fold	183
III.E.2. Individual domain descriptions	184
III.E.3. Catalytic core architecture	189
III.E.3.a. Sucrose specificity: structural analysis of subsites -1 and +1	189
III.E.3.b. Product specificity of ΔN_{123} -GBD-CD2	191
III.E.3.c. Loops at the upper part of the catalytic gorge	195
IV. EXPERIMENTAL PROCEDURES.....	199
IV.A. RATIONAL TRUNCATIONS OF THE GLUCAN BINDING DOMAIN OF GBD-CD2	199
IV.B. PRODUCTION OF RECOMBINANT GBD-CD2 AND OF ITS TRUNCATED VARIANTS	200
IV.C. PURIFICATION OF GBD-CD2 AND ΔN_{123} -GBD-CD2 MUTANTS	200
IV.D. STANDARD ACTIVITY ASSAY IN STANDARD CONDITIONS	202
IV.E. PRODUCT ANALYSES	202
IV.E.1. Reaction conditions	202
IV.E.1.a. Analytical techniques	203
IV.F. KINETIC PARAMETER DETERMINATION FOR ΔN_{123} -GBD-CD2	204
IV.G. EFFECT OF CALCIUM ON ΔN_{123} -GBD-CD2	204
IV.H. CRYSTALLIZATION AND DATA COLLECTION	205
IV.I. PRIMARY SEQUENCE ALIGNMENT OF GLUCANSUCRASES FROM GH70	206
IV.J. STRUCTURE DETERMINATION AND REFINEMENT	206
V. ACKNOWLEDGMENTS	208
REFERENCES	209
CONCLUSION	215
ANNEXES	229
TABLES DES ILLUSTRATIONS.....	243
FIGURES	245
ABBRÉVIATIONS	255

Introduction

Les pays occidentaux doivent faire face à une augmentation de la prévalence de pathologies chroniques majeures telles que l'obésité, le diabète ou encore les maladies cardio-vasculaires. La recrudescence de ces pathologies est étroitement corrélée à nos modes de vie sédentaires et à nos régimes alimentaires. La prise de conscience des consommateurs et des pouvoirs publics concernant les effets de l'alimentaire sur la santé des populations incite de plus en plus les industriels de l'agro-alimentaire à développer de nouvelles gammes d'aliments ou d'ingrédients fonctionnels permettant de prévenir les maladies liées à l'alimentation et d'améliorer la santé digestive.

Parmi ces ingrédients, les fibres occupent une place privilégiée et leur effet santé est le plus souvent associé à leur propriété « prébiotique ». En effet, certaines d'entre elles résistent à l'action des enzymes digestives et favorisent la croissance des bactéries bénéfiques et le bon équilibre du microbiote intestinal dont le rôle sur la santé est de plus en plus décrit et reconnu. C'est notamment le cas des gluco-oligosaccharides (GOS) branchés en α -(1→2) dont les propriétés prébiotiques ont été décrites dès 1992. Ils sont synthétisés à partir de saccharose par la dextrane-saccharase de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 à l'échelle de 50 tonnes par an par la société SOLABIA.

En effet, l'activité dextrane-saccharase produite par la bactérie lactique *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 est responsable de la synthèse, à partir de saccharose, d'un polymère d'unités glucopyranosyle associées par des liaisons α -(1→6) glucosidiques dans la chaîne principale et présentant des taux élevés de liaisons α -(1→2) aux points de branchement. L'utilisation de cette enzyme en présence de saccharose et d'accepteur maltose est à l'origine de la production de différentes séries de gluco-oligosaccharides dont certaines présentent uniquement des liaisons α -(1→6) et d'autres présentent en plus des liaisons α -(1→2).

Afin de comprendre le mode de formation des liaisons glucosidiques α -(1→2) et d'optimiser la synthèse des GOS branchés en α -(1→2), l'équipe CIMES au sein de laquelle j'ai réalisé ma thèse, a entrepris le clonage du gène codant pour l'enzyme responsable de la formation de dextrane riche en liaisons α -(1→2) qui fut nommée DSR-E.

La recherche du gène codant pour l'enzyme responsable de la synthèse des liaisons glucosidiques de type α -(1→2) a conduit au clonage du gène *dsr-E* codant pour une enzyme de 313 kDa. L'étude des relations structure-fonction de DSR-E a ensuite révélé que

l'enzyme est une glucane-saccharase très originale appartenant à la famille 70 des glycoside-hydrolases (GH70). Elle possède, en effet, deux domaines catalytiques nommés CD1 et CD2. Ces deux domaines sont séparés par un domaine putatif de liaison au glucane (GBD). La construction et l'expression recombinante chez *E. coli* de mutants tronqués de DSR-E a permis de préciser le rôle de chaque domaine. Le mutant CD1-GBD synthétise, en présence de saccharose, un dextrane dépourvu de liaisons α -(1→2). Ce même mutant produit, en présence de saccharose et de maltose, des GOS n'ayant pas de liaisons α -(1→2). De façon surprenante, le mutant GBD-CD2 est incapable de synthétiser un dextrane ou des GOS à partir de saccharose et ne catalyse que le clivage de la molécule. Toutefois, lorsque des molécules acceptrices, de type dextrans, isomalto-oligosaccharides ou gluco-oligosaccharides sont présentes dans le milieu réactionnel, GBD-CD2 catalyse à partir du saccharose le transfert en α -(1→2) d'unités glucosyle sur ces accepteurs. Ce mutant classé parmi les enzymes de la famille GH70 est singulier.

À notre connaissance, GBD-CD2 est la seule enzyme caractérisée de la famille GH70 qui synthétise uniquement des liaisons osidiques de type α -(1→2). Elle est également unique à d'autres égards. Contrairement à la majorité des enzymes de la famille GH70, GBD-CD2 est dépourvue d'activité de synthèse de glucane ou d'oligosaccharides à partir de saccharose seul.

Au cours du travail de thèse présenté dans ce manuscrit, nous avons poursuivi et approfondi l'étude des relations structure – activité de GBD-CD2, avec pour objectifs principaux la compréhension du mécanisme de formation des GOS, des dextrans branchés en α -(1→2) et l'optimisation du procédé de synthèse de ces molécules.

Le premier chapitre de cette thèse est consacré à la présentation des éléments bibliographiques permettant de situer le contexte dans lequel s'inscrivent les travaux présentés. Il sera suivi de la présentation de nos travaux scindés en trois chapitres correspondant à trois articles. Le premier article traite i) de l'étude cinétique de la réaction catalysée par GBD-CD2 en présence de saccharose seul ou de saccharose et de dextrans accepteurs et ii) de la mise en œuvre de l'enzyme pour la synthèse de dextrane présentant des taux contrôlés de liaisons α -(1→2). Le deuxième est consacré à la caractérisation structurale

approfondie des GOS branchés en α -(1→2) permettant d'éclairer le potentiel catalytique de cette enzyme. Enfin, le troisième article est dédié à la description de la structure tridimensionnelle résolue par cristallographie des rayons X d'un mutant tronqué de GBD-CD2.

Chapitre I : Étude bibliographique

Ce chapitre est consacré aux éléments bibliographiques permettant de situer le contexte de notre étude et à l'exposé des connaissances sur les glucane-saccharases lorsque nous avons débuté nos travaux. La première partie présente succinctement les molécules prébiotiques ainsi que leurs effets physiologiques. La deuxième partie est consacrée à la description des connaissances sur les glucane-saccharases. Enfin, la dernière partie de cette introduction bibliographique aborde l'ensemble des travaux antérieurs portant sur l' α -(1 \rightarrow 2) transglucosidase GBD-CD2.

I. Les molécules prébiotiques, des ingrédients fonctionnels

Le mode de vie sédentaire des populations occidentalisées associé au changement progressif de leurs habitudes alimentaires provoquent de nombreuses pathologies métaboliques (diabète, obésité) et inflammatoires (maladies chroniques de l'intestin). Ces problèmes de santé publique génèrent un engouement croissant des consommateurs et des industriels de l'agroalimentaire pour les aliments et ingrédients fonctionnels, qui améliorent le bien-être et/ou peuvent prévenir l'apparition de certaines maladies. La mise sur le marché d'aliments fonctionnels nécessite des 'allégations santé', délivrées par l'European Food Safety Authority (EFSA), qui impose des contraintes réglementaires grandissantes. La communauté scientifique s'investit donc de plus en plus dans l'amélioration de la compréhension et de la justification scientifique des effets de la consommation des aliments et ingrédients fonctionnels sur la santé.

Parmi les aliments fonctionnels commercialisés, les produits contenant des prébiotiques tiennent une place non négligeable. Le marché européen des prébiotiques a été estimé à 296 millions d'euros en 2008. Les prévisions pour 2015 sont de l'ordre de 767 millions d'euros (Frost and Sullivan, 2008)

I.A. Définition d'une molécule prébiotique

Le concept de prébiotiques est apparu au Japon dans les années 1980. Il fut formalisé une quinzaine d'années plus tard, et défini comme suit : « les prébiotiques sont des ingrédients alimentaires non-digestibles qui influencent de façon bénéfique l'hôte en stimulant

sélectivement la croissance et/ou l'activité d'un groupe ou d'un nombre limité de groupes bactériens dans le côlon, et qui améliorent ainsi la santé de l'hôte » (Gibson and Roberfroid, 1995). Les critères que doivent respecter ces ingrédients pour être classés en tant que prébiotiques sont au nombre de trois. Ils doivent arriver intacts ou faiblement dégradés dans l'intestin, être le substrat privilégié de certaines bactéries du côlon et orienter le métabolisme de la flore colique favorable à la santé de l'hôte (Gibson and Roberfroid, 1995; Roberfroid, 2007).

Les prébiotiques sont donc à distinguer :

- i) des probiotiques, qui sont des « micro-organismes vivants qui lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquate produisent un effet bénéfique pour la santé de l'hôte » (Gilliland *et al.*, Oct. 2001; Holzapfel *et al.*, 1998; Reid *et al.*, 2003; Smolyansky *et al.*, 2010)
- ii) des synbiotiques qui associent prébiotiques et probiotiques (Gibson and Roberfroid, 1995; Gupta and Garg, 2009).

Depuis que ce concept a été défini, de nombreux travaux traitant de la caractérisation des prébiotiques et de leurs effets sur la santé ont été publiés, attirant l'intérêt de l'industrie agro-alimentaire.

I.B. Révision récente du concept de prébiotique

En 2007, onze ans après l'introduction du concept de prébiotique, Roberfroid M. a précisé la définition des prébiotiques (Roberfroid, 2007). Bien que la définition et les trois critères caractérisant les prébiotiques soient sensiblement les mêmes, l'auteur remet en cause la méthodologie et la validité d'un certain nombre d'études portant sur la caractérisation des effets des candidats prébiotiques. En effet, selon Roberfroid M., la fermentation *in vitro* des prébiotiques par des mélanges de souches coliques et le suivi d'un certain nombre de marqueurs, notamment le suivi de la production d'Acides Gras à Courtes Chaînes (AGCC), des productions de gaz et d'enzymes hydrolytiques, ne constituent pas une démonstration irréfutable de leurs effets puisque la complexité de l'écosystème intestinal et des interactions bactériennes n'est pas prise en compte. De plus, même dans le cas où les inocula proviennent de fèces humaines, la production d'AGCC, de gaz ou d'enzymes hydrolytiques ne constitue pas des biomarqueurs de genres bactériens spécifiques. Les études conduisant à la

démonstration d'un effet prébiotique devraient donc, selon l'auteur, être désormais menées autant que possible *in vivo* en utilisant des méthodologies validées visant à démontrer que chaque candidat prébiotique doit :

- ✓ Ne pas être hydrolysé par l'acidité gastrique et les enzymes hydrolytiques de l'hôte,
- ✓ Ne pas être absorbé par la muqueuse intestinale,
- ✓ Être fermenté par la microflore intestinale,
- ✓ Stimuler la croissance sélective et/ou l'activité des bactéries intestinales.

On pourra se référer à l'article de Roberfroid *et al.* pour les propositions de méthodologies à mettre en œuvre, afin de démontrer les points énumérés ci-dessus (Roberfroid, 2007).

I.C. Principaux prébiotiques commercialisés

À ce jour, les molécules commercialisées décrites comme présentant des activités prébiotiques sont exclusivement de type glycosidique (Cummings and Macfarlane, 2002). La plupart des prébiotiques sont des oligosaccharides, c'est-à-dire des enchainements de pentoses ou d'hexoses comprenant de 2 à 20 résidus (Delzenne, 2003). Une liste des principaux prébiotiques commerciaux est présentée dans la Table 1.

Les fructo-oligosaccharides (FOS) peuvent être produits par synthèse enzymatique ou encore par hydrolyse enzymatique partielle de l'inuline végétale (Fishbein *et al.*, 1988; Hidaka and Hirayama, 1991). L'inuline, un polymère d'unités fructosyle, est naturellement présente dans certains végétaux de l'ordre des *Asterales* tels que la chicorée ou l'artichaut (Heinz and Vogel, 1991; Ritsema and Smeekens, 2003). Pour plus de détails sur les fructo-oligosaccharides et plus généralement sur les molécules prébiotiques produites à partir de saccharose on peut se référer à Monsan & Ouarné (Monsan and Ouarné, 2009).

Les galacto-oligosaccharides sont extraits de végétaux et plus particulièrement du soja, ou produits par synthèse enzymatique (Coulier *et al.*, 2009; Minami *et al.*, 1983). La société japonaise Yakult synthétise en utilisant une β -galactosidase et à partir de lactose, des trans- β -galacto-oligosaccharides (TOS). Les amidons résistants, c'est-à-dire la fraction de l'amidon qui n'est pas digéré par les enzymes humaines dans la partie supérieure du tube digestif, présentent aussi des propriétés prébiotiques (Englyst *et al.*, 1992). Les isomalto-oligosaccharides sont produits à partir d'amidon par synthèse enzymatique catalysée par une

amyloglucosidase (Monsan, 1993; Rycroft *et al.*, 2001). Enfin, le lactulose (4-O- β -D-galactopyranosyl-D-fructofuranose) est produit par voie chimique (Tuohy *et al.*, 2002).

Table 1: Exemples de composés prébiotiques commercialisés. Adapté de (Rousseau, 2004).

Prébiotique	Nom	Structure simplifiée	Fournisseur
Inuline	Frutalift [®]	Fru _n ; β -(1→2)	Sensus (Hollande)
Inuline	Fibruline [®]	Fru _n ; β -(1→2)	Cosucra (Belgique)
Oligofructoses	Frutalone [®]	Fru _n ; β -(1→2)	Sensus (Hollande)
Oligofructoses	Raftilose [®]	Fru-Fru _n + Glc-Fru _n ; β -(1→2)	Orafti (Belgique)
Oligofructoses	Fibrulose [®]	Fru _n ; β -(1→2)	Cosucra (Belgique)
Fructo-oligosaccharides	Actilight [®]	Glc-Fru _n ; β -(1→2)	Beghin Meiji Industries (France)
Trans-galacto-oligosaccharides	Vivinal [®] GOS	Gal _n -Glc ; β -(1→4)	Borculo Domo Ingredients (Pays-Bas)
Lactulose	MLS-50 [®]	Gal-Fru ; β -(1→4)	Morinaga (Japon)
Oligosaccharides de soja	Soya-Oligo	Gal _n -Glc-Fru (principalement raffinose et stachyose)	Calpis (Japon)
Isomalto-oligosaccharides	IMO 900	Glc _n ; α -(1→6)	Showa Sangyo (Japon)
Gluco-oligosaccharides	Bioecolia [®]	Glc _n ; α -(1→2), α -(1→4) et α -(1→6)	Solabia (France)
Amidon résistant	Actistar	Glc _n ; α -(1→4) et α - (1→6)	Cargill (USA)
Manno-oligosaccharides	Bio-MOS [®]	Man _n ; β -(1→4)	Alltech Biotechnology (USA)
Xylo-oligosaccharides	Xylo-oligo	Xyl _n ; β -(1→4)	Suntory (Japon)

I.D. Effets des prébiotiques

L'essentiel des effets décrits *in vitro*, sur modèles animaux et même, dans certains cas, chez l'Homme, sont liés à la métabolisation spécifique des molécules prébiotiques par des bactéries du microbiote intestinal (notamment des genres *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* et *Bacteroides*) qui produisent de l'acide lactique et des AGCC. Ces derniers ont notamment des propriétés anti-inflammatoires et cicatrisantes sur la muqueuse intestinale (Roediger and Rae, 1982; Wong *et al.*, 2006). Par ailleurs, la diminution de pH associée notamment à la production d'acide lactique crée des conditions défavorables à la croissance des bactéries potentiellement pathogènes. De nombreux autres effets liés à la consommation de prébiotiques ont été décrits, avec plus ou moins de cohérence selon les études chez l'Homme et l'animal : abaissement de la cholestérolémie, renforcement de la barrière intestinale, meilleure assimilation des minéraux, voire prévention et traitement du cancer du côlon, du diabète de type II et de l'hypercholestérolémie (Cashman, 2003; Coudray *et al.*, 2003; Cummings and Macfarlane, 2002; Cummings *et al.*, 2001; Djouzi and Andlueux, 1997; Flickinger *et al.*, 2000; Hidaka and Hirayama, 1991b; Macfarlane *et al.*, 2006; Sakata, 1986; Sanz *et al.*, 2005a). Les allégations ou évidences scientifiques des effets des prébiotiques dépendent grandement des méthodologies employées au sein des études. Pour plus de détails concernant les effets des prébiotiques, on pourra se référer aux revues citées ci-après (Macfarlane *et al.*, 2008; Monsan and Ouarné, 2009; Rastall *et al.*, 2005; Rastall and Maitin, 2002; Swennen *et al.*, 2006).

I.E. Des prébiotiques innovants : les gluco-oligosaccharides branchés en α (1→2)

En 1992, Paul *et al.* proposèrent de nouveaux gluco-oligosaccharides (GOS) potentiellement prébiotiques (Paul *et al.*, 1992). Ils sont synthétisés à partir de saccharose et de maltose, en utilisant l'activité enzymatique de la souche *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 (Figure 1) (Dols *et al.*, 1997c; Remaud-Siméon *et al.*, 1994).

Ils sont constitués de trois séries structurellement distinctes de GOS, de degrés de polymérisation compris entre 3 et 11 et de mono- et disaccharides (glucose et fructose,

saccharose et leucrose) représentant environ 15% du mélange (m/v). Pour les GOS des trois séries, une molécule de maltose est présente à l'extrémité réductrice de chaque chaîne.

- ✓ Hormis ce résidu maltose, la première série, appelée oligodextrane (OD), est constituée d'unités glucosyle uniquement liées en α -(1→6) ; $[6)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{)]}_n\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{4)-D-Glcp}$ avec $1 < n < 9$.
- ✓ La seconde série (R) présente des unités glucosyle branchées en α -(1→2) sur les chaînes principales dont les unités glucosyle sont liées en α -(1→6). Ces ramifications sont uniquement présentes à l'extrémité non réductrice de la chaîne principale ; $\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{2)-[6)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{)]}_n\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{4)-D-Glcp}$ avec $1 < n < 8$.
- ✓ La troisième série, telle que décrite par Dols *et al.* présente une ramification en α -(1→2) sur l'avant dernière position de la chaîne oligosaccharidique, côté non-réducteur (Figure 1). Il s'agit de la série R' ; $\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{6)-[}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{2)-[6)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{)]}_n\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{4)-D-Glcp}$ avec $1 < n < 8$ (Dols *et al.*, 1997c)

Seulement trois structures de GOS branchés en α -(1→2) ont été établies avec certitude. Il s'agit des molécules numérotées 3, 4 et 5 (R4, R5 et R'6) représentées sur la Figure 1 (Dols *et al.*, 1997c; Remaud-Siméon *et al.*, 1994).

À l'heure actuelle, les GOS branchés en α -(1→2) sont produits par la société française Solabia. La production industrielle de ces GOS branchés en α -(1→2) se déroule en trois étapes :

- ✓ L'activité dextrane-saccharase de la souche *Ln. mesenteroides* NRRL B-1299 est produite à partir d'une culture réalisée sur un milieu contenant du saccharose. Le niveau d'activité est de 4 U.mL^{-1} et 90% de l'activité reste liée aux cellules (fraction enzymatique insoluble) et est récupérée par centrifugation.
- ✓ L'enzyme liée aux cellules est ensuite simplement immobilisée avec un rendement de 93% dans des billes d'alginate présentant une activité spécifique de $4,1 \text{ U.mL}^{-1}$ de gel.
- ✓ Enfin, la synthèse des GOS branchés en α -(1→2) s'opère dans un réacteur à lit fixe en présence de saccharose et de maltose. Le rendement en GOS branchés en α -(1→2) est d'environ 40% pour une conversion de 100% du saccharose (Dols *et al.*,

1997b). Le paramètre clé de ce procédé est le ratio saccharose/maltose qui détermine à la fois le rendement en GOS et le degré de polymérisation des produits. Ces prébiotiques sont produits à hauteur d'environ 60 tonnes par an et sont commercialisés pour des applications dermo-cosmétiques (Bioecolia[®]) (Lamothe *et al.*, 1992).

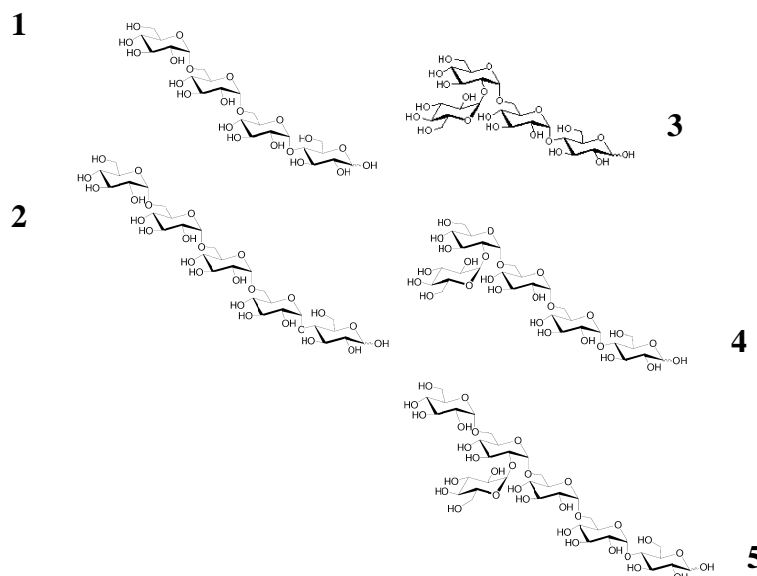


Figure 1 : Exemples de structures des GOS produits à partir de saccharose et de maltose par l'activité dextrane-saccharase de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 (Dols *et al.*, 1997c; Remaud-Siméon *et al.*, 1994).

- 1 : α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→4)-D-Glcp (série OD ; OD4)
- 2 : α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→4)-D-Glcp (série OD ; OD5)
- 3 : α -D-Glcp-(1→2)- α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→4)-D-Glcp (série R ; R4)
- 4 : α -D-Glcp-(1→2)- α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→4)-D-Glcp (série R ; R5)
- 5 : α -D-Glcp-(1→6)-[α -D-Glcp-(1→2)]- α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→4)-D-Glcp (série R' ; R'6)

Depuis 1992, de nombreuses études ont porté sur l'étude des propriétés de ces nouvelles molécules de structure innovante, possédant des liaisons α -(1→2) rarement présentes dans la nature. Le premier constat, établi sur des modèles murins axéniques¹ et canins, a mis en évidence que les liaisons α -(1→2) de ces GOS branchés sont résistants à la

¹ dépourvu de flore intestinale

digestion dans la partie supérieure du tractus digestif (Flickinger *et al.*, 2000; Valette *et al.*, 1993).

Par ailleurs, Sanz *et al.* ont montré que la liaison osidique α -(1→2) du kojibiose (α -D-Glcp-(1→2)-D-Glcp) conférait à ce disaccharide l'index prébiotique le plus élevé (21,62) parmi les disaccharides testés. L'index prébiotique a été défini comme étant « la relation entre les changements des éléments « bénéfiques » ou « indésirables » de la microflore, chaque élément étant rapporté à son niveau de départ ». Cet index a été déterminé *in vitro* au cours de la fermentation des disaccharides par une flore fécale humaine provenant d'individus sains (Sanz *et al.*, 2005b).

Toutefois, les résultats des différentes études portant sur les propriétés prébiotiques des GOS branchés en α -(1→2) sont contrastés. La consommation de ces GOS induit une diminution du pH fécal chez les rats trixéniques² et gnotobiotiques³ ce qui a un effet bactériostatique sur les bactéries potentiellement pathogènes (Djouzi and Andlueux, 1997; Flickinger *et al.*, 2000). Par ailleurs, la production d'AGCC n'est pas modifiée ni pour les rats trixéniques² ni pour les rats gnotobiotiques³ par une alimentation complémentée en GOS. Cependant, dans le cadre de ces études, les dosages d'AGCC peuvent ne pas être représentatifs de leur production luminale, puisqu'ils sont absorbés à 90% au niveau de la paroi intestinale (Djouzi and Andlueux, 1997; Djouzi *et al.*, 1995; Flickinger *et al.*, 2000). Enfin, la numération de trois souches, appartenant aux espèces *Clostridium butyricum*, *Bacteroides thetaiotamicron* et *Bifidobacterium breve* chez les rats trixéniques révèle que l'équilibre de leur flore intestinale n'est pas modifié par la supplémentation en GOS à hauteur de 2% (m/m) (Djouzi and Andlueux, 1997; Djouzi *et al.*, 1995; Flickinger *et al.*, 2000). Pourtant, la culture combinée en fermenteur de ces trois mêmes souches révèle que les clostridies ne sont plus détectables après 4 h de culture en présence de GOS. Ces résultats témoignent des différences qui peuvent être observées entre les études réalisées *in vivo* et *in vitro*.

² Inoculés avec une flore intestinale composée des trois souches bactériennes *Clostridium butyricum*, *Bacteroides thetaiotamicron* et *Bifidobacterium breve*

³ Inoculés avec une flore intestinale d'origine humaine

Enfin, l'étude la plus encourageante porte sur les effets de la consommation des GOS branchés en α -(1→2) pour la prévention du diabète de type II, aussi appelé diabète non insulino-dépendant. Il s'agit d'une maladie complexe qui affecte principalement les populations occidentalisées et sédentaires. L'une des manifestations de cette maladie consiste en une augmentation de la concentration du glucose sanguin. En 2003, chez des femelles souris surnourries, obèses et dont le régime alimentaire est excédentaire en lipides, Boucher *et al.* ont montré que l'administration de ces GOS à hauteur de $1,5 \text{ g.kg}^{-1}.\text{jour}^{-1}$ avait deux effets principaux. Pour les souris dans un état pré-diabétique, c'est-à-dire pour lesquelles la glucosurie et la glycémie sont normales à jeun, une diminution de l'intolérance au glucose est constatée suite à une injection péritonéale de glucose par rapport au groupe test. Pour les souris étant déjà diabétiques, une administration aigüe de GOS induit une diminution significative du glucose sanguin après administration de glucose (Boucher *et al.*, 2003). Le mécanisme d'action des GOS serait lié à l'effet bénéfique qu'ils auraient sur la production d'incrétines, hormones peptidiques sécrétées par la muqueuse intestinale après la prise de glucides, stimulant la sécrétion d'insuline.

Il faut noter que les études portant sur les effets prébiotiques des GOS branchés en α -(1→2) ont été réalisées sur le produit commercialisé par Solabia qui contient non seulement lesdits GOS branchés en α -(1→2) mais aussi des GOS de la série OD ne comportant pas de liaisons α -(1→2) glucosidiques (Figure 1). Les études résumées ci-avant ne portent donc pas sur un produit pur mais sur un mélange. Ainsi, au regard des positions récentes de l'EFSA notamment quant aux « allégations santé », il serait très intéressant de pouvoir caractériser, notamment chez l'Homme, les effets prébiotiques des seuls GOS branchés en α -(1→2). Cela impliquerait nécessairement de mettre au point un procédé permettant de produire et purifier les GOS branchés en α -(1→2).

II. Les glucane-saccharases

Les glucane-saccharases sont des transglucosidases qui catalysent à partir de saccharose la synthèse de polymères d'unités α -D-glucosyle appelés glucanes. Par ailleurs, si des accepteurs exogènes sont ajoutés au milieu réactionnel, ces enzymes produisent des oligosaccharides ou des glucoconjugués. Ainsi, c'est l'activité glucane-saccharase de la souche *Ln. mesenteroides* NRRL B-1299 qui est utilisée pour la synthèse des GOS branchés en α -(1 \rightarrow 2), en présence de l'accepteur maltose et de saccharose. Les glucane-saccharases ne requièrent pas de sucres activés comme les glycosyltransférases de type Leloir, mais puisent l'énergie nécessaire à la synthèse des liaisons glucosidiques dans la rupture de la liaison osidique du saccharose ($\sim 27,6 \text{ kJ.mol}^{-1}$), une agro-ressource abondante et peu onéreuse (422 €/t – bourse de Londres – 09/2009) (CEDUC, 2010) au regard des sucres activés (André *et al.*, 2010).

II.A. Présentation des glucane-saccharases

II.A.1. Biodiversité des micro-organismes producteurs de glucane-saccharases

Les glucane-saccharases sont principalement produites par des bactéries lactiques à coloration de GRAM positif. Ces bactéries appartiennent aux genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Oenococcus*⁴, *Exiguobacterium*⁵ et *Weissella*.

Certains streptocoques sécrètent en effet des glucane-saccharases qui ont été largement étudiées depuis les années 1980 pour leur implication dans le processus de cariogénèse. Le glucane qu'ils synthétisent favorise l'adhésion des bactéries à la surface des

⁴ Une seule glucane-saccharase GH70 provenant de la souche *Exiguobacterium sibiricum* 255-15 est répertoriée dans CAZy sans que l'activité de cette protéine soit connue

⁵ Une seule glucane-saccharase GH70 provenant de la souche *Oenococcus oeni* PSU-1 est répertoriée dans CAZy sans que l'activité de cette protéine soit connue.

dents et la formation des caries. Les souches de lactobacilles productrices de glucanes ont été répertoriées dès 1974 (Sidebotham, 1974). Enfin, les glucane-saccharases synthétisées par les bactéries du genre *Leuconostoc* ont fait l'objet de nombreux travaux portant sur la synthèse d' α -glucanes, d'oligosaccharides ou encore de glucoconjugués (Monsan *et al.*, 2010). Le dextrane produit par la souche *Ln. mesenteroides* NRRL B-512F fut le premier polymère d'origine microbienne à être commercialisé et utilisé pour des applications pharmaceutiques (substitut de plasma sanguin), chromatographiques (support de chromatographie) (Moulis, 2006).

Il est à noter qu'une seule souche peut produire plusieurs de ces enzymes. À titre d'exemple, trois glucane-saccharases, DSR-E, DSR-A et DSR-B, ont été clonées à partir de la souche *Ln. mesenteroides* NRRL B-1299 (Bozonnet *et al.*, 2002; Monchois *et al.*, 1998a; Monchois *et al.*, 1996a). Au même titre que la souche *Ln. mesenteroides* NRRL B-1299, les souches *Ln. mesenteroides* NRRL B-1298, B-1396, B-1399, les souches *Lb. spp* G-77 et *Ln. citreum* E497 ont été décrites comme produisant des dextrans branchés en α -(1 \rightarrow 2) (Dueñas-Chasco *et al.*, 1998; Kobayashi *et al.*, 1985; Maina *et al.*, 2008; Slodki *et al.*, 1986).

Il faut ajouter que des glucane-saccharases sont également produites par des bactéries à coloration de GRAM négatif appartenant aux genres *Deinococcus*, *Neisseria* ou encore *Alteromonas* (André *et al.*, 2010; Monchois *et al.*, 1999c; van Hijum *et al.*, 2006). Il s'agit des amylosaccharases qui synthétisent à partir de saccharose un polymère de type amylose. En 1946, Hehre et Hamilton découvrirent une glucane-saccharase intracellulaire, appelée amylosaccharase, produite par *Neisseria perflava* (Hehre *et al.*, 1946). D'autres souches productrices d'amylosaccharases ont été identifiées (*Neisseria polysaccharea*, *Deinococcus geothermalis*, *Deinococcus radiodurans*) et certains gènes codant pour ces enzymes ont été clonés (Buttcher *et al.*, 1997; Emond *et al.*, 2008; Pizzut-Serin *et al.*, 2005). Par ailleurs, en 2009, Ha *et al.* ont cloné deux autres gènes codant pour deux amylosaccharases putatives issues d'*Alteromonas macleodii* et d'*Alteromonas addita*, seule celle d'*A. macleodii* s'est révélée active et capable de synthétiser un polymère de type amylose (Ha *et al.*, 2009).

II.A.2. Diversité des réactions catalysées par les glucane-saccharases

Les glucane-saccharases clivent le saccharose et catalysent le transfert d'unités glucosyle sur une molécule acceptrice dont la nature est variable, en libérant de façon concomitante une molécule de fructose. La rupture de la liaison osidique se produit selon un mécanisme d' α -rétention de la configuration via la formation d'un intermédiaire covalent β -D-glucosyl-enzyme à partir du saccharose (Jensen *et al.*, 2004; Mooser and Iwaoka, 1989). En présence de saccharose seul, la réaction principale est très souvent celle de polymérisation conduisant à la synthèse d' α -D-glucane. Si la molécule acceptrice est l'eau et non pas une chaîne de glucane en cours d'élongation, le saccharose est hydrolysé. Par transfert du glucose sur le fructose libéré au cours de la réaction, des isomères du saccharose, de type leucrose, turanose ou tréhalulose ou le saccharose lui-même (échange isotopique) peuvent être synthétisés.

Enfin, si un accepteur exogène, le plus souvent de type osidique est présent dans le milieu réactionnel, il peut être glucosylé. Il s'agit de la réaction d'accepteur. Les produits de cette réaction peuvent être à leur tour glucosylés, la réaction aboutissant alors à la formation d'oligosaccharides (André *et al.*, 2010).

L'ensemble des réactions catalysées par les glucane-saccharases et décrites ci-dessus sont représentées sur la Figure 2.

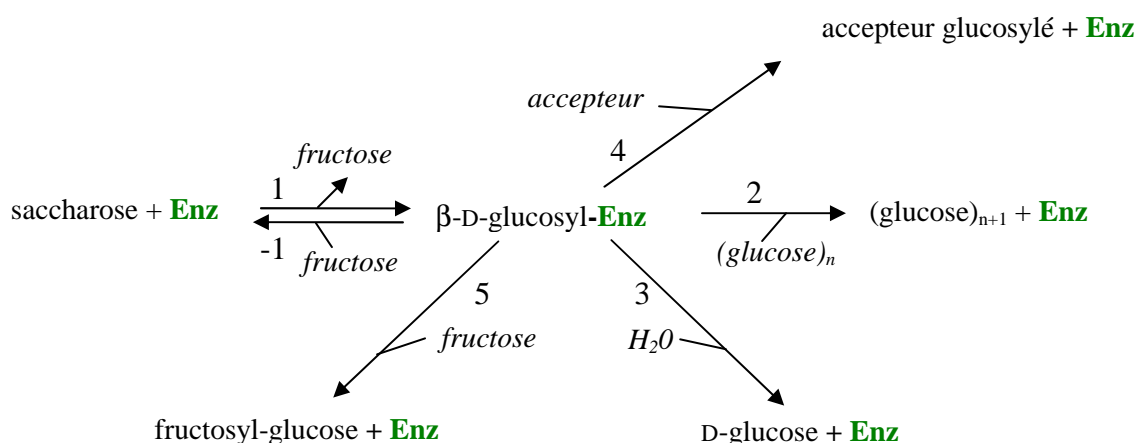


Figure 2 : Réactions catalysées par les glucane-saccharases. +1 : formation du complexe β -D-glucosyl-enzyme ; -1 : échange isotopique ; 2 : réaction de polymérisation ; 3 : hydrolyse ; 4 : réaction d'accepteur ; 5 : isomérisation du saccharose.

II.A.3. Classification des glucane-saccharases

II.A.3.a. Selon la classification Carbohydrate Active Enzymes (CAZy)

Selon la classification CAZy qui est basée sur les homologies structurales et mécanistiques, les glucane-saccharases appartiennent aux familles 13 et 70 des Glycoside-Hydrolases (<http://www.cazy.org/Home.html>). Les amylosaccharases sont les seules glucane-saccharases classées dans la famille GH13, qui regroupe principalement les enzymes intervenant dans la biotransformation de l'amidon dont notamment les α -amylases.

Toutes les autres glucane-saccharases produites par des bactéries lactiques sont classées au sein de la famille GH70 (Cantarel *et al.*, 2009; Henrissat and Davies, 1997). Ces deux familles, avec la famille GH77, constituent le clan GH-H.

II.A.3.b. Selon la classification E.C.

Selon la classification proposée par l'Enzyme Commission (E.C.) les glucane-saccharases sont regroupées dans la classe E.C. 2.4.1.-. Ce sont des transférases (classe 2), qui transfèrent des unités glucosyle (sous classe 4), et plus précisément des unités hexosyle (sous sous classe 1). Le dernier chiffre permet de classer ces enzymes en fonction de la structure du polysaccharide qu'elles synthétisent. De plus, l'étude des α -D-glucanes par RMN ^1H et ^{13}C , chromatographie, méthylation couplée à de la chromatographie en phase gazeuse, acétolyse, oxydation périodique et par dégradation enzymatique permet d'analyser leurs structures. Des travaux récents combinant certaines de ces techniques ont permis de mettre au point une méthodologie visant à proposer des modèles composites structuraux pour les dextranes produits par *Lb. reuteri* 180 et *Lb. reuteri* 121 (van Leeuwen *et al.*, 2009; van Leeuwen *et al.*, 2008a; van Leeuwen *et al.*, 2008b, 2008c; van Leeuwen *et al.*, 2008d). Ces analyses permettent de distinguer :

- ✓ Les **dextrane-saccharases** (GH70 ; E.C. 2.4.1.5) synthétisent des dextranes, c'est-à-dire un polymère dont au moins 50% des unités glucosyle sont liées par des liaisons

de type α -(1→6). Les ramifications sont de type α -(1→2), α -(1→3) ou encore α -(1→4) et leurs taux fluctuent en fonction de l'enzyme synthétisant le dextrane (Ebert and Schenk, 1968).

- ✓ Les **mutane-saccharases** (GH70 ; E.C. 2.4.1.5) produisent un polymère appelé mutane, pour lequel au moins 50% des liaisons de la chaîne principale sont de type α -(1→3) (Guggenheim, 1970; Mooser, 1992; Russell *et al.*, 1987; Sidebotham, 1974).
- ✓ Les **alternane-saccharases** (GH70 ; E.C. 2.4.1.140) ont la capacité de synthétiser de l'alternane, un polymère où les liaisons de type α -(1→6) et α -(1→3) sont alternées dans la chaîne principale (Côté and Robyt, 1982; Jeanes *et al.*, 1954; Seymour *et al.*, 1979b).
- ✓ Les **reuterane-saccharases** (GH70 ; E.C. 2.4.1.5) catalysent la synthèse d'un polymère appelé reuterane dont plus de 50% des unités glucosyle sont liées en α -(1→4), le reste étant lié par des liaisons α -(1→6) (Kralj *et al.*, 2005; Kralj *et al.*, 2002).
- ✓ Enfin, les **amylosaccharases** (GH13 ; E.C. 2.4.1.4) produisent un polymère semblable à de l'amylose, c'est-à-dire constitué uniquement de liaisons glucosidiques de type α -(1→4) (Buttcher *et al.*, 1997; Emond *et al.*, 2008; Ha *et al.*, 2009; Hehre and Hamilton, 1946; Pizzut-Serin *et al.*, 2005).

Les gènes codant pour certaines de ces enzymes ont été clonés, ils sont répertoriés dans le tableau présenté en Annexe I.

II.B. Relations structure-activité des glucane-saccharases

II.B.1. Homologies structurales des glucane-saccharases

Les glucane-saccharases de la famille GH70 sont des enzymes de poids moléculaire compris entre 150 et 180 kDa, soit environ 1500 acides aminés (Remaud-Siméon *et al.*, 2000). L'analyse de leurs structures primaires a conduit à suggérer une organisation en trois domaines : une zone variable peu homologue entre les glucane-saccharases, un domaine

catalytique et un domaine de liaison aux glucanes (nommé GBD pour Glucan Binding Domain).

Les structures primaires des domaines catalytiques ont des pourcentages d'identité variant de 99% à 41% (par rapport à DSR-S produite par *Ln. mesenteroides* B-512F). Le domaine de liaison au glucane (GBD) participe à la fixation des chaînes de glucane (Abo *et al.*, 1991; Arguello-Morales *et al.*, 2000; Monchois *et al.*, 1999a; Monchois *et al.*, 1997; Monchois *et al.*, 1996a; Suwannarangsee *et al.*, 2007). Ce domaine est constitué d'unités répétées caractéristiques dont la taille et la répétitivité varient en fonction de l'enzyme (Banas *et al.*, 1990; Giffard and Jacques, 1994; Monchois *et al.*, 1997; Russell, 1990). Plusieurs autres fonctions ont été décrites pour ce domaine, parmi lesquelles,

- ✓ Une modulation de l'équilibre entre synthèse de glucane et hydrolyse du saccharose, une fixation aux chaînes de dextrane, stimulant l'activité catalytique (Monchois *et al.*, 1998b)
- ✓ Une variation du type de liaisons osidiques introduites dans le glucane (Vickerman *et al.*, 1996)
- ✓ Une localisation des glucane-saccharases au niveau de la surface bactérienne (Kato and Kuramitsu, 1991)
- ✓ Une adhésion inter-bactéries ou bactérie-surface favorisée (Ferretti *et al.*, 1987)

Notons que cette organisation en domaines alors admise en l'absence de structure cristallographique pour la famille GH70 a été remise en cause par la résolution de la structure de GTF180- Δ N, dextrane-saccharase produite *Lb. reuteri* 180 (cf. § II.C.2).

Les amylosaccharases de la famille GH13 ont quant à elles un poids moléculaire d'environ 70 kDa et présentent les trois domaines structuraux fréquemment rencontrés dans cette famille. Le cœur catalytique est organisé en un tonneau (β/α)₈ correspondant à la succession alternée de huit feuillets β , formant la partie intérieure du tonneau et de huit hélices α , reliés par des boucles de tailles variables (Potocki De Montalk *et al.*, 1999). La boucle 3 entre le feuillet β ₃ et l'hélice α ₃ constitue à elle seule le domaine B. Il serait impliqué dans la fixation au substrat, la diversité fonctionnelle et la stabilité des enzymes de la famille GH13 (Belshaw and Williamson, 1993; Declerck *et al.*, 1990; Matsuura *et al.*, 1984). Un troisième domaine, appelé domaine C, est situé à l'extrémité C-terminale de

l'enzyme. Il ne participe pas à la catalyse (cf. § II.B.2.a.i, pour une description des domaines).

Des analogies structurales et mécanistiques entre glucane-saccharases des familles GH13 et GH70 ont été révélées par Ferretti, Funane et Mooser (Ferretti *et al.*, 1987; Funane *et al.*, 1993; Mooser *et al.*, 1991) et ont été confortées en 1996 par les travaux de Mac Gregor *et al.* (MacGregor *et al.*, 1996). En effet, à partir d'une analyse des structures secondaires des tonneaux catalytiques des glucane-saccharases, ces auteurs proposèrent que le tonneau des enzymes de la famille GH70 soit issu d'une permutation circulaire. Les éléments $\beta 1, \alpha 1, \beta 2, \alpha 2, \beta 3$ se situeraient en aval des éléments $\alpha 3, \beta 4, \alpha 4, \beta 5, \alpha 5, \beta 6, \alpha 6, \beta 7, \alpha 7, \beta 8, \alpha 8$ (Figure 3). Cette prédiction fut confortée par les travaux de modélisation du domaine catalytique de la glucane-saccharase de *S. mutans* et par les analyses de dichroïsme circulaire menées sur glucane-saccharase GTF-I de *S. downei* (Monchois *et al.*, 1999b; Tsai *et al.*, 2000). Ces résultats sont aujourd'hui définitivement admis grâce à la résolution de la première structure de glucane-saccharase de la famille GH70, GTF180- ΔN produite par *Lactobacillus reuteri* 180 (Pijning *et al.*, 2008; Vujicic-Zagar, 2007).

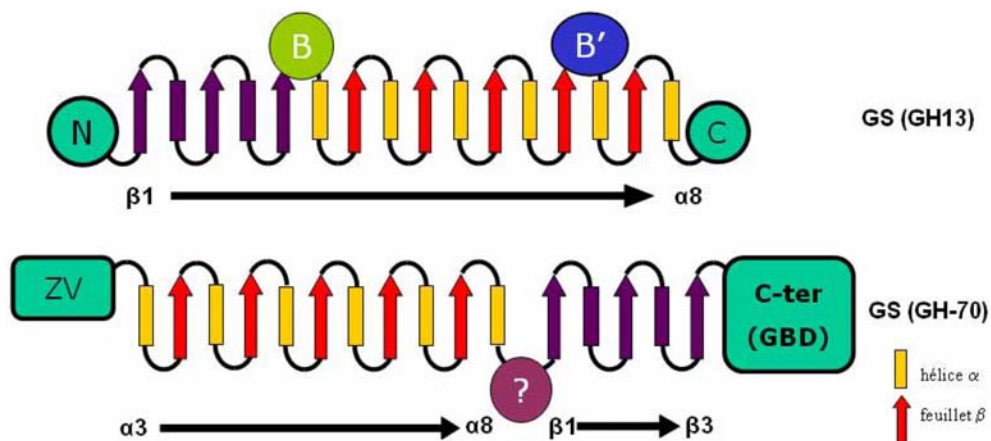


Figure 3 : Représentation schématique de la prédiction de l'organisation du tonneau (β/α)₈ entre les glucane-saccharases des familles GH13 et GH70. Les domaines notés N, B, B' et C sont ceux de l'exemple de l'amylosaccharase de *Neisseria polysaccharea*. ZV : zone variable ; GBD : « glucan binding domain ». (Moulis, 2006).

II.B.2. L'amylosaccharase de *Neisseria polysaccharea* (GH13)

II.B.2.a. Structure tri-dimensionnelle

II.B.2.a.i Repliement global

La structure de l'amylosaccharase de *Neisseria polysaccharea* (ASNp) a été résolue en 2001 par Skov *et al.* (Skov *et al.*, 2001; Skov *et al.*, 2000). Une unique chaîne polypeptidique adopte une conformation en cinq domaines appelés N, A, B, B' et C. Trois de ces domaines, c'est-à-dire, A, B et C sont rencontrés chez les α -amylases (Figure 4). Le domaine A adopte une conformation en tonneau (β/α)₈ comparable à celui décrit pour les α -amylases. Il inclut les résidus 98 à 184, 261 à 395 et 461 à 550. La boucle 3, comprenant les résidus 185 à 260, est particulièrement longue et constitue, à elle seule, un module à part entière appelé domaine B. Les résidus 395 à 460 constituent quant à eux le domaine B' (boucle 7) qui n'a pas d'équivalent chez les α -amylases. Le domaine N-terminal (résidu 1 à 90) n'a d'homologie significative avec aucun autre domaine d'après une recherche avec le serveur DALI (Holm and Rosenstrom, 2010). Il est uniquement constitué d'hélices α qui sont au nombre de six. Enfin, le domaine C comprenant les résidus 555 à 628 est une succession de brins β antiparallèles formant un motif de clé grecque. Aucun ion calcium n'est présent dans la structure.

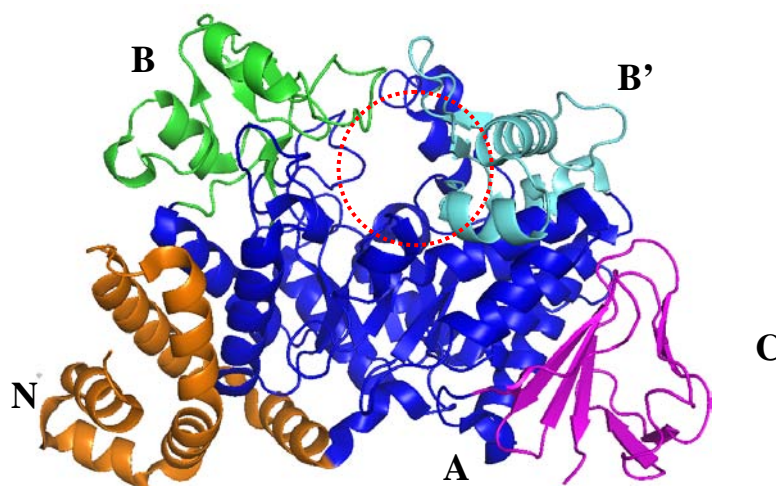


Figure 4 : Structure tridimensionnelle de l'amylosaccharase de *N. polysaccharea* (Code PDB : 1G5A). Légende des domaines : N (orange), A (bleu), B' (cyan), B (vert) et C (magenta). Le cercle rouge figure la zone du site catalytique.

II.B.2.a.ii Topologie du site actif

Le site actif de l'amylosaccharase de *N. polysaccharea* est situé au fond d'une poche étroite recouverte par les domaines B et B' et fermée par un pont salin (Arg509 - Asp144) qui limite donc les sous-sites de la partie glycone au sous-site -1 (Figure 5).

L'analyse structurale de l'amylosaccharase en complexe avec le maltoheptaose, le saccharose et le glucose a permis d'identifier plusieurs sous-sites de fixation aux produits, sous-sites numérotés suivant la nomenclature proposée par Davies *et al.* de -1 à +6 (Davies *et al.*, 1997) (Figure 5). Cette analyse révèle que l'arrimage du résidu glucose du saccharose ou de celui situé à l'extrémité non-réductrice du maltoheptaose est assuré par un réseau de liaison hydrogène et un double « stacking » impliquant les résidus aromatiques (Tyr147 et Phe250).

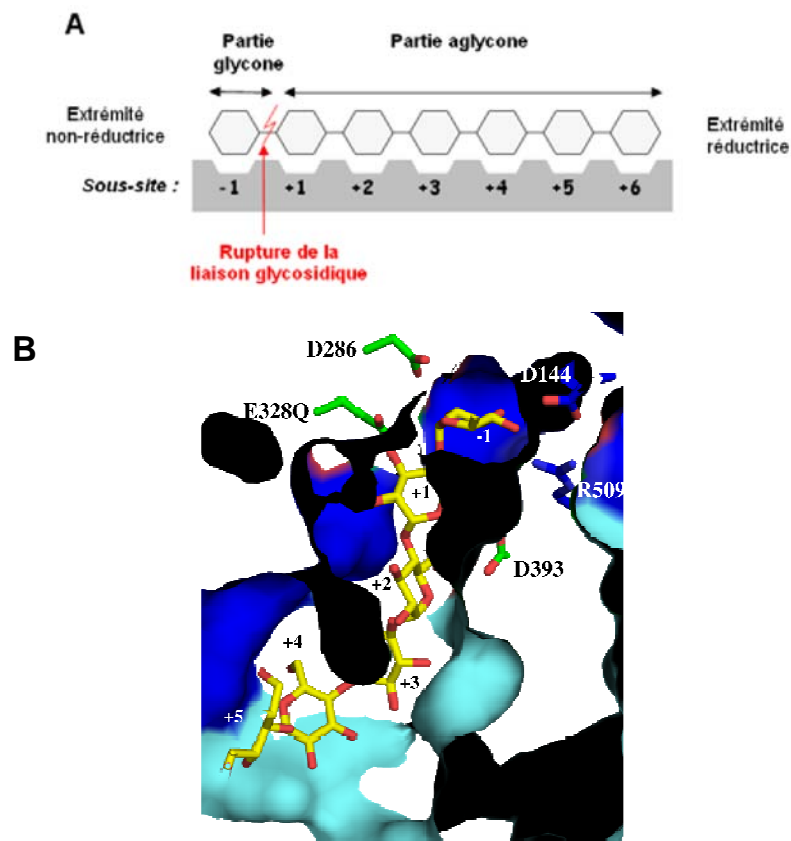


Figure 5 : Représentation des sous-sites de liaison aux oligosaccharides de l'ASNp. A : Représentation schématique d'après la nomenclature proposée par Davies *et al.* (Davies *et al.*, 1997). (Champion, 2008). B : Représentation du site actif de l'amylosaccharase de *N. polysaccharea* en présence de maltoheptaose (Codes PDB : 1MW0 et 1MVY). Légende : Domaine A (bleu) ; Domaine B' (cyan) ; résidus de la diade catalytique et l'acide aspartique stabilisateur (vert) ; résidus du pont salin (en bleu) ; les sous-sites de fixation sont notés de -1 à +5.

La cristallisation de divers complexes de l'ASNp a fourni de précieuses informations. La structure du mutant Glu328Gln en complexe avec du saccharose ainsi que la structure de l'intermédiaire β -D-glucosyl-enzyme ont montré que les résidus impliqués dans la fixation de l'unité glucosyle et ceux responsables de l'hydrolyse du saccharose sont strictement conservés au sein de la famille GH13 (Jensen *et al.*, 2004; Mirza *et al.*, 2001).

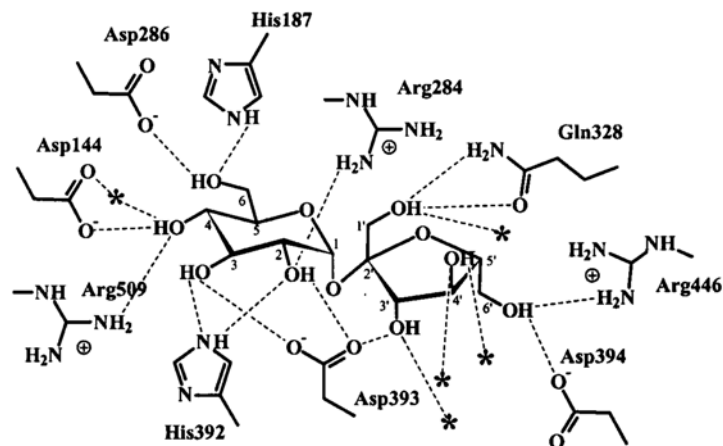


Figure 6 : Représentation schématique des interactions entre le mutant inactif Glu328Gln et le saccharose. (Mirza *et al.*, 2001).

Enfin, la structure de ce même mutant en complexe avec le maltoheptaose a permis de cartographier les sous-sites de fixation du maltoheptaose de -1 à +6 (Figure 5) (Skov *et al.*, 2002).

L'ASNp synthétise un polymère semblable à de l'amylose. Étant donnée la conformation du site actif, après la formation de l'intermédiaire β -D-glucosyl-enzyme, l'unité fructosyle doit sortir du site actif avant que la chaîne d'amylose en cours d'élongation n'y entre pour être glucosylée. Une étude de la dynamique moléculaire de l'enzyme a montré que la boucle en épingle à cheveux constituée des résidus 443 à 449 (domaine B') jouerait un rôle important dans les mouvements associés à l'élongation des amorces polysaccharidiques de glycogène, selon un mécanisme probablement semi-processif (Albenne *et al.*, 2007).

II.B.2.b. Mécanisme catalytique

Les enzymes de la famille 13 partagent toutes un même mécanisme de rétention de configuration sous forme α impliquant une diade catalytique Asp – Glu. La configuration finale du produit est identique à celle du substrat. Ce mécanisme a notamment été bien étudié pour l'ASNp ou la CGTase de *Bacillus circulans*.

Au cours d'une première étape (glycosylation), le nucléophile correspondant au premier aspartate catalytique attaque le carbone C1 du résidu glucosyle du saccharose (Figure 7). C'est ce résidu qui est engagé dans la formation de l'intermédiaire covalent β -D-glucosyl-enzyme (Mooser *et al.*, 1991; Mooser and Iwaoka, 1989). Simultanément, le résidu acide/base protone l'oxygène glycosidique du saccharose. Ceci aboutit au relargage du fructose et à la formation de l'intermédiaire covalent. L'existence de cet intermédiaire est aujourd'hui largement admise. Il a été piégé pour l'ASNp; la structure cristalline du complexe β -D-glucosyl-enzyme de l'ASNp a en effet été résolue par Jensen *et al.* (Jensen *et al.*, 2004).

Lors de la seconde étape (déglycosylation), le résidu acide/base déprotoné joue le rôle de base pour activer une molécule d'eau venant attaquer l'intermédiaire β -D-glucosyl-enzyme. Si un sucre ou une autre molécule hydroxylée est activée à la place de la molécule d'eau, la réaction de transglucosylation rentre en compétition avec celle d'hydrolyse.

Le second acide aspartique stabiliserait l'état de transition de l'intermédiaire covalent β -D-glucosyl-enzyme (Mosi *et al.*, 1997; Uitdehaag *et al.*, 1999; Yoshioka *et al.*, 1997). Au cours de la réaction catalytique, des états de transition de type oxocarbonium apparaissent (Sinnott, 1990). Ces ions présentent une double liaison partielle entre les atomes O5 et C1 sur lesquels une charge positive est délocalisée. Cet ion est caractérisé par une configuration plane des atomes C1, C2, O5 et C5. Cet état est défini comme la structure de plus haute énergie durant la réaction, et est donc hautement instable (Jencks, 1976).

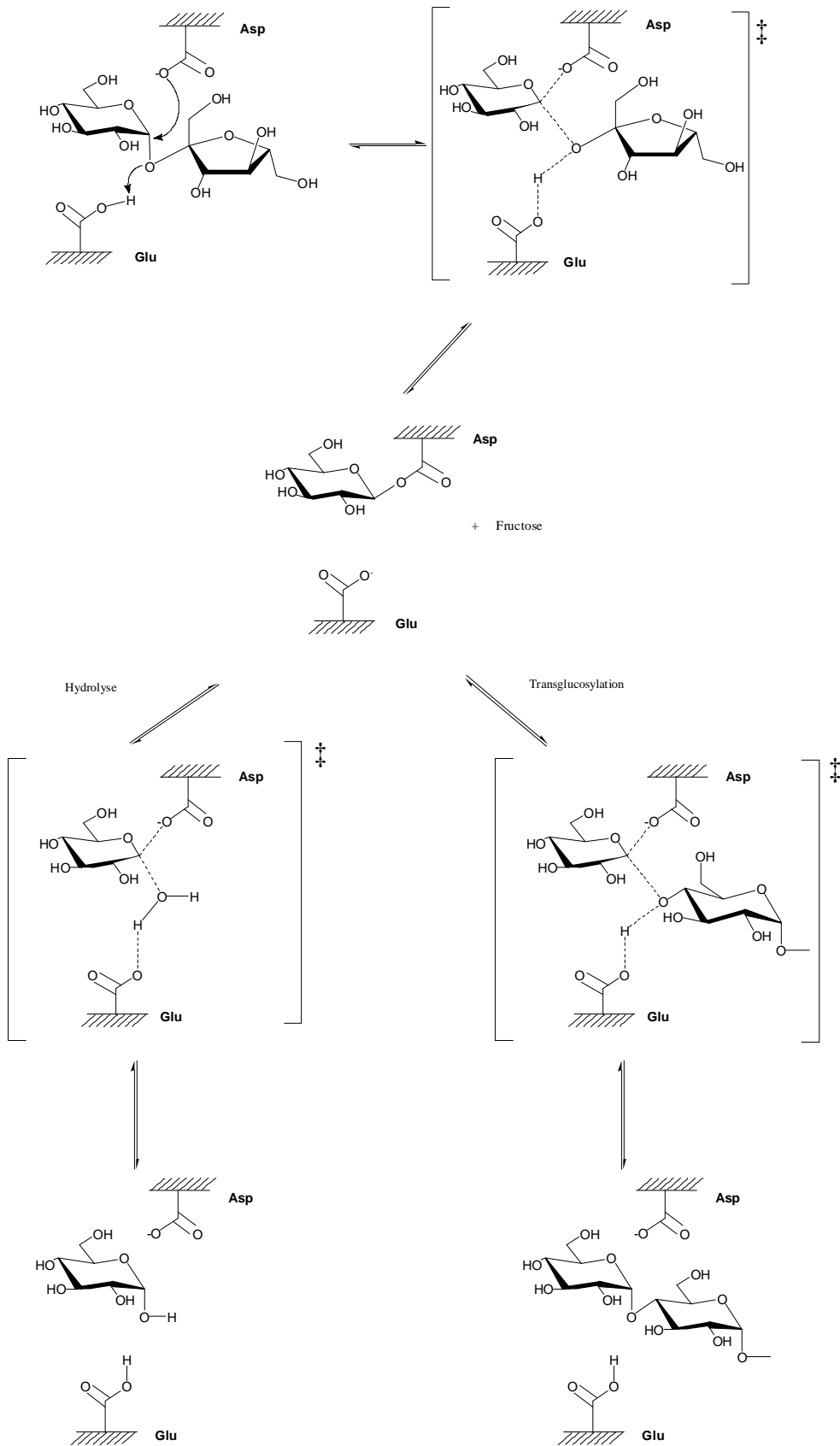


Figure 7 : Schéma du mécanisme catalytique des amylosaccharases, d'après le mécanisme d'arrétion de configuration décrit par Skov et al. (Skov et al., 2001).

II.B.2.c. Mécanisme de polymérisation

Avec la résolution de la structure 3D de l'amylosaccharase de *N. polysaccharea* et sa caractérisation biochimique détaillée, Albenne *et al.* ont décrit avec précision les étapes conduisant à la formation du polymère d'amylose. Lors des premiers instants de la réaction enzymatique le résidu glucosyle du β -D-glucosyl-enzyme est transféré sur une molécule d'eau. Puis, le glucose relargué est utilisé comme accepteur aboutissant à la formation de maltose qui est à son tour accepteur et donne lieu à la formation progressive de malto-oligosaccharides de tailles croissantes. Lors d'une seconde phase de la synthèse, les malto-oligosaccharides de degré de polymérisation supérieur à 3 sont préférentiellement rallongés par leurs extrémités non réductrices, conduisant à la formation de polymère (amylose) (Albenne *et al.*, 2004). La résolution de la structure du mutant inactif Glu328Gln de l'ASNp en complexe avec du maltoheptaose a confirmé que l'extrémité non-réductrice de la chaîne oligosaccharidique est située au fond de la poche à proximité des résidus catalytiques. Le mécanisme de formation de l'amylose est donc clairement non-processif (ou multi-chaîne) et le transfert des unités glucosyle s'opère par l'extrémité non réductrice des chaînes.

II.B.3. Glucane-saccharases de la famille GH70

II.B.3.a. Séquences consensus des GS de la famille GH70

À ce jour, cent huit gènes codant pour les enzymes de la famille GH70 sont répertoriés dans la classification CAZy et quarante quatre enzymes ont été caractérisées (Annexe I). Dès 1996, sept motifs conservés ont été identifiés. Ils regroupent les résidus proches de la diade catalytique et ceux entourant les résidus conservés entre les familles GH13 et GH70 (MacGregor *et al.*, 1996; Monchois *et al.*, 1999c).

Nous avons comparé les séquences protéiques correspondant aux domaines catalytiques des quarante quatre glucane-saccharases grâce au programme MUSCLE (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/muscle/index.html>) (Edgar, 2004). Cet alignement a été ensuite soumis au logiciel WebLogo qui permet d'obtenir une représentation visuelle de la séquence consensus (<http://weblogo.berkeley.edu/>) (Figure 8 A et B) (Crooks *et al.*, 2004).

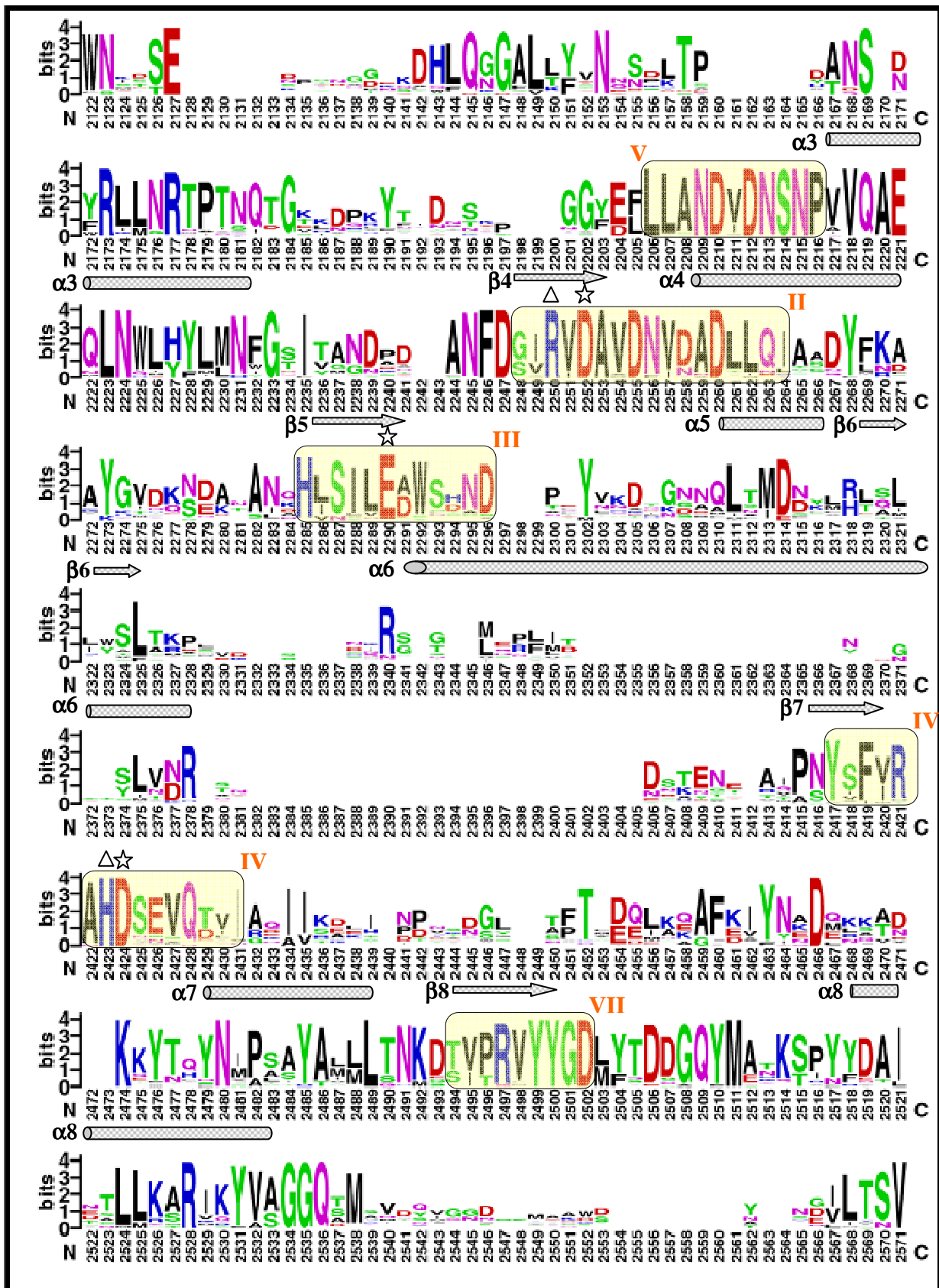
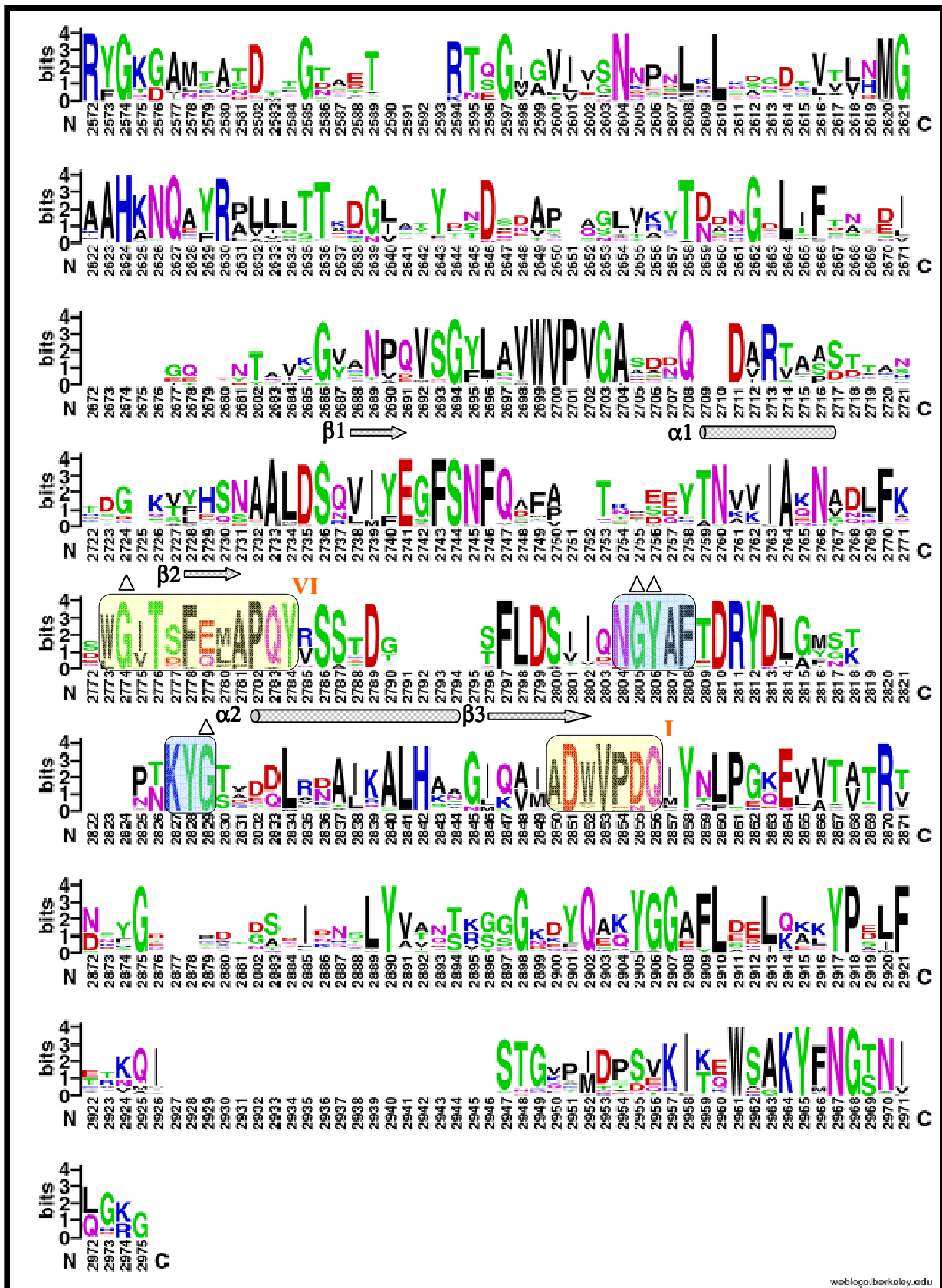


Figure 8A: Séquence logo des glucane-saccharases de la famille GH70, obtenue par comparaison des séquences protéiques des domaines A, B et C des 44 glucane-saccharases caractérisées et répertoriées dans CAZy. Les motifs I à VII caractéristiques de la famille GH70 sont surlignées en jaune, ceux conservés entre les enzymes GH13 et GH70 sont surlignés en bleu. Les résidus de la diade catalytique et l'acide aspartique stabilisateur de l'intermédiaire covalent sont surmontés d'une étoile. Ceux conservés entre les familles GH13 et GH70 sont surmontés d'un triangle. Les prédictions des hélices α et feuillettes β du tonneau $(\beta/\alpha)_8$ sont respectivement représentés par des cylindres et des flèches. Adapté de (MacGregor et al., 1996; Monchois et al., 1999c).



weblogo.berkely.edu

Figure 8B : Séquence logo des glucane-saccharases de la famille GH70, obtenue par comparaison des séquences protéiques des domaines A, B et C des 44 glucane-saccharases caractérisées et répertoriées dans CAZy. Les motifs I à VII caractéristiques de la famille GH70 sont surlignées en jaune, ceux conservés entre les enzymes GH13 et GH70 sont surlignés en bleu. Les résidus de la diade catalytique et l'acide aspartique stabilisateur de l'intermédiaire covalent sont surmontés d'une étoile. Ceux conservés entre les familles GH13 et GH70 sont surmontés d'un triangle. Les prédictions des hélices α et feuillets β du tonneau (β/α)₈ sont respectivement représentés par des cylindres et des flèches. Adapté de (MacGregor et al., 1996; Monchois et al., 1999c).

II.B.3.b. Mécanisme catalytique

Les alignements de séquences des domaines catalytiques des enzymes de la famille GH13 et GH70 ont mis en évidence six des sept résidus les mieux conservés au sein de la famille GH13 (Devulapalle *et al.*, 1997; MacGregor *et al.*, 1996). On y retrouve notamment les résidus de la diade catalytique et l'acide aspartique probablement stabilisateur de l'intermédiaire covalent. L'implication directe de ces résidus dans la catalyse a été confirmée par des expériences de mutagenèse dirigée, montrant qu'ils sont essentiels à la catalyse. Leurs mutations entraînent une perte totale d'activité (Kato *et al.*, 1992; Monchois *et al.*, 1997).

Par ailleurs, Mooser *et al.* ont caractérisé l'intermédiaire glucosyl-enzyme de la glucane-saccharase de *Streptococcus mutans*, démontrant que la catalyse se produit via cet intermédiaire (Mooser *et al.*, 1991). Le mécanisme catalytique des enzymes de la famille GH70 est apparenté à celui des enzymes de la famille GH13, ce qui est appuyé par la résolution récente de la structure du complexe GTF180- Δ N – saccharose (cf. II.C.3).

II.B.3.c. Mécanisme de polymérisation

Deux mécanismes de polymérisation ont été proposés. Le premier, défendu par Robyt *et al.* repose sur un modèle impliquant une diade catalytique autorisant l'élongation de la chaîne par l'extrémité réductrice de la chaîne (Robyt *et al.*, 1974; Robyt *et al.*, 2008).

Le second au contraire défendu par Tsuchya *et al.*, Mooser *et al.* et plus récemment par Moulis *et al.* ne fait intervenir qu'un seul site catalytique. Par une analyse cinétique détaillée de la formation des produits, Moulis *et al.* ont proposé que la réaction débute par l'hydrolyse du saccharose. Dans un second temps, le glucose produit est à son tour glucosylé, et cela successivement pour conduire à la formation du polymère. Ces auteurs proposent aussi que le saccharose, lui-même, puisse jouer le rôle d'initiateur de polymérisation lorsqu'il est présent en forte concentration. Dans ces conditions, des oligosaccharides sont produits au détriment de la synthèse de polymère. En outre la caractérisation des produits formés par l'action d'enzymes tronquées de leur domaine de fixation au glucane indique que ce domaine intervient dans l'élongation des chaînes, favorisant la formation de longues chaînes.

En résumé, l'ensemble de ces travaux permet aujourd'hui de conclure que l'élongation fait intervenir un seul site catalytique avec des initiateurs de la synthèse de polymère (saccharose et glucose) et que l'élongation des chaînes se produit via l'extrémité non-réductrice.

II.B.3.d. Mécanisme des réactions d'accepteur

Les réactions d'accepteur correspondent au transfert par les glucane-saccharases d'unités glucosyle sur des molécules acceptrices exogènes ayant une ou plusieurs fonctions hydroxyle. Cette réaction aboutit à la formation de glycosides ou d' α -D-glucoconjugués (Koepsell *et al.*, 1953). Parmi les molécules acceptrices reconnues par les glucane-saccharases on retrouve :

- ✓ Des sucres (galactose, xylose, D-tagatose, L-rhamnose, L-glucose, N-acétyl-glucosamine, gentiobiose, α -méthyl-D-glucopyranoside, β -méthyl-D-glucopyranoside, α -butyl-D-glucopyranoside, α -octyl-D-glucopyranoside, raffinose et dérivés d'1,5 anhydro-D-fructose) (Champion *et al.*, 2009; Côté *et al.*, 2005; Côté *et al.*, 2009; Demuth *et al.*, 2002; Richard *et al.*, 2003; Richard *et al.*, 2005; Seo *et al.*, 2005).
- ✓ Des composés aromatiques (catéchine, quercitine, lutéoline, myricétine, épigallocatechine gallate, arbutine, saliciline) (Bertrand *et al.*, 2006; Jung *et al.*, 2009; Meulenbeld and Hartmans, 2000; Seo *et al.*, 2005).
- ✓ Des alcools (alcool salicylique, alcools primaires de différentes longueurs de chaînes) (Seibel *et al.*, 2006; Yoon and Robyt, 2002).
- ✓ Des dérivés d'acide aminé (Seibel *et al.*, 2006).

Les enzymes GH70 transfèrent les unités glucosyle provenant du saccharose sur l'extrémité non réductrice des accepteurs glucosidiques (Côté and Robyt, 1984; Germaine and Schachtele, 1976; Jung and Mayer, 1981; Mukasa *et al.*, 2001).

Par ailleurs, les accepteurs peuvent être classés en deux catégories :

- ✓ Les accepteurs forts qui regroupent ceux conduisant à la formation d'oligosaccharides au détriment de la formation de polymère. L'isomaltose et le maltose sont parmi les accepteurs les plus forts pour les glucane-saccharases.

- ✓ Les accepteurs faibles, difficilement reconnus, et qui conduisent généralement à la formation de produits mono- ou diglucosylés (Côté and Dunlap, 2003; Devulapalle and Mooser, 1994; Koepsell *et al.*, 1953; Robyt and Eklund, 1983).

II.B.3.e. Modèles cinétiques pour les réactions de polymérisation et d'accepteurs.

Bien que la littérature soit assez riche à propos de la caractérisation des produits des réactions d'accepteur et de polymérisation, des enzymes de la famille GH70, les études cinétiques des réactions enzymatiques catalysées par les glucane-saccharases sont moins nombreuses. En 1985, Mooser *et al.* étudièrent la cinétique de la réaction catalysée par la dextrane-saccharase de la souche cariogène *Streptococcus mutans*. Leurs résultats ont permis de conclure que le transfert des unités glucosyle sur les chaînes de dextrane en cours d'élongation suit un mécanisme séquentiel, toutefois, difficile à modéliser par un mécanisme Ping Pong (Mooser *et al.*, 1985).

Plus tard, Kitoaka *et al.* étudièrent les réactions de polymérisation et d'accepteur en présence de maltose, catalysées par l'activité dextrane-saccharase de *Ln. mesenteroides* B-512FMC en présence de saccharose. Selon ces auteurs, les réactions de polymérisation et d'accepteur se produisent via un mécanisme Ping Pong Bi Bi avec des k_{cat} respectifs de 641 s^{-1} et de 1070 s^{-1} indiquant une forte activation en présence d'accepteurs (Kitoaka and Robyt, 1999).

Plus récemment, l'étude cinétique de la reuterane-saccharase GTFA-CHis₆ a mis en évidence que les activités hydrolytique et de transglucosylation peuvent être modélisées par deux modèles michaeliens. Les k_{cat} respectifs pour les activités de transglucosylation lors de la synthèse de reuterane et lors de la réaction d'accepteur en présence de maltose sont de $36,8 \pm 1,0$ et de 293 s^{-1} (Kralj *et al.*, 2004b).

Enfin, pour la dextrane-saccharase DSR-S, Moulis *et al.* ont montré que la formation de polymère suit un modèle michaelien pour lequel le k_{cat} est égal à 584 s^{-1} (Moulis, 2006).

II.C. Structure 3D de la dextrane-saccharase GTF180-ΔN de *Lactobacillus reuteri* 180

En 2007, Pijning T. et Vujcic-Zagar A. ont résolu la structure de GTF180-ΔN. Il s'agit de la première structure cristalline d'une glucane-saccharase de la famille GH70. GTF180-ΔN correspond à la forme tronquée en N-terminal de GTF180, une enzyme de 197 kDa produite par *Lactobacillus reuteri* 180 (Pijning *et al.*, 2008; Vujcic-Zagar, 2007). Cette enzyme catalyse la synthèse d'un dextrane ramifié en α -(1→3) à hauteur de 26%. Nous allons nous attacher dans ce paragraphe à décrire les trois structures cristallines apo de cette enzyme, la structure du complexe mutant inactif (Asp1025Asn) obtenue en présence de saccharose, et l'enzyme active en complexe avec du maltose, résolues respectivement à 1,7, 2,3 et à 2,0 Å.

II.C.1. Repliement global

L'enzyme adopte une forme « étirée » au sein des cristaux appartenant au groupe d'espace $P1$, cristaux pour lesquels l'unité asymétrique contient une seule molécule. Une seconde forme cristalline a été observée dans la même condition de cristallisation, avec deux molécules dans l'unité asymétrique (groupe d'espace $P1$). L'enzyme y adopte également une forme « étirée ». Cependant, la superposition de ces deux formes permet de constater que seuls les domaines V (GBD) ne se superposent pas. Ils sont décalés de 7 Å (Figure 9 A). Par ailleurs, au sein de cette seconde forme cristalline, le domaine V de la seconde molécule de l'unité asymétrique est intrinsèquement désordonné et n'a pu être reconstruit, même manuellement. Finalement, une troisième forme cristalline (groupe d'espace $P2_12_12_1$) a été observée pour la condition I-44 du crible « Structure Screen » (Molecular Dimensions). Les protéines y adoptent une forme plus globulaire pour laquelle le domaine V est rabattu sur la gorge catalytique, la position des autres domaines entre eux, restant identique (Figure 9 B).

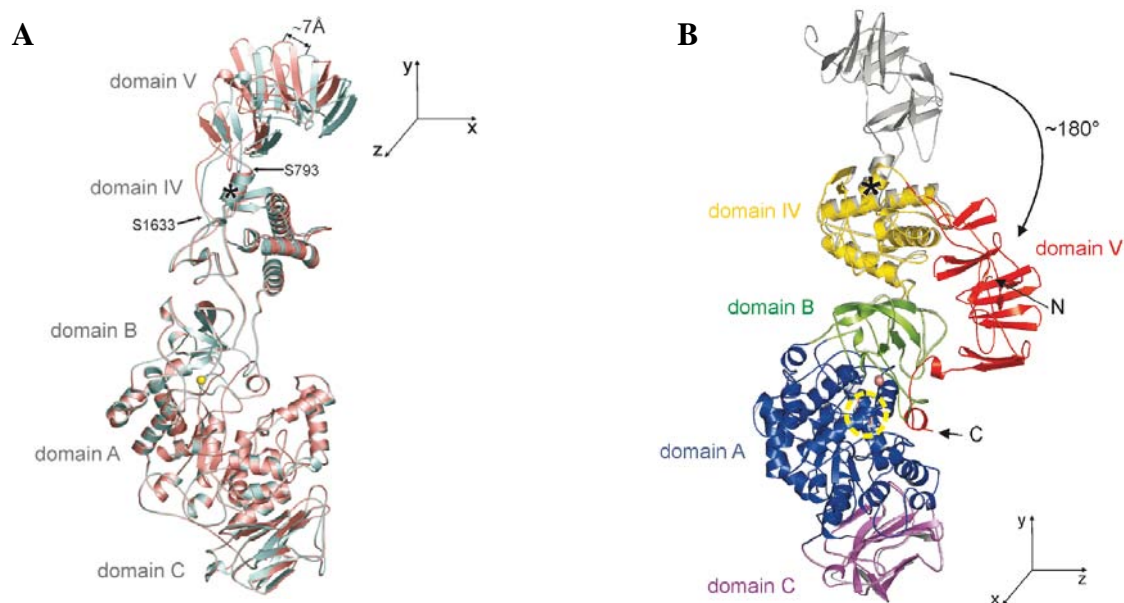


Figure 9 : Comparaison des trois structures apo de GTF180- Δ N (Codes PDB : 3KLK et 3HQ3). A : Superposition des deux formes cristallines obtenues pour les cristaux tricliniques (P1). Les deux structures se superposent jusqu'au résidu Ser1633 du domaine IV. * indique la position approximative de l'axe de rotation perpendiculaire au plan xy autour duquel pivote le domaine V. La sphère jaune représente l'ion calcium. B : Superposition des structures obtenues pour les cristaux triclinique (P1) et orthorhombique (P2₁2₁2₁) de GTF180- Δ N. Le cercle en pointillé jaune indique l'emplacement du site catalytique. Les extrémités N- et C-terminale sont indiquées. D'après (Vujicic-Zagar, 2007).

II.C.2. Une organisation en domaines surprenante

Pour ces trois formes apo, une seule chaîne polypeptidique de 1006 résidus adopte un repliement en cinq domaines distincts. Trois de ces domaines dénommés A, B et C partagent une analogie structurale avec les domaines respectifs A, B et C de l'ASNp et des enzymes de la famille GH13 plus généralement. Deux autres domaines appelés IV et V ne partagent aucune homologie structurale avec les enzymes de la famille GH13 (Figure 4 ; Figure 10).

De façon surprenante les cinq domaines ne se sont pas consécutivement arrangés le long de la chaîne polypeptidique. Les domaines V, IV, B et A sont constitués pour chacun d'eux de deux segments polypeptidiques, l'un provenant de la partie N-terminale de la chaîne, l'autre de la partie C-terminale de la protéine. Le repliement global ressemble donc à celui d'un U dont les branches sont constituées des quatre domaines cités précédemment, le domaine C correspondant à la base du U (Figure 10 A et B). Ceci ne ressemble en rien à la prédiction en domaine donnée par la Pfam (Figure 10 C).

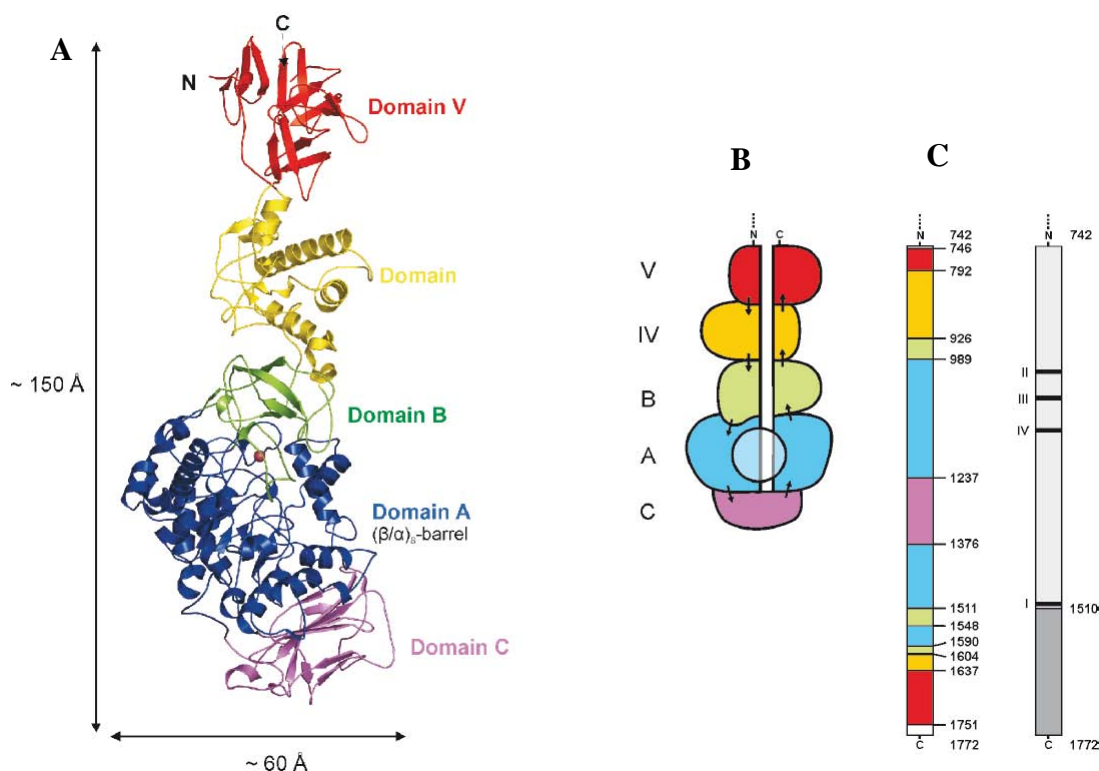


Figure 10 : Repliage global de la forme triclinique de GTF180- Δ N (Code PDB : 3KLK). A : Structure de GTF180- Δ N, les extrémités N- et C-terminales sont indiquées. La sphère jaune représente l'ion calcium. B : Représentation schématique du repliage en « U », le code couleur correspond également à celui employé pour la Figure 4. C : En gris, prédiction de l'organisation en domaine, et motifs caractéristiques de la superfamille des α -amylases indiqués par des rectangles noirs. Ces motifs (de I à IV) sont aussi repérés sur la Figure 8 (weblogo). (Vujicic-Zagar, 2007).

Le domaine C est constitué de huit feuillets β organisés en sandwich et incluant un motif de clé grecque modifiée. Sa fonction pour les enzymes de la famille GH70 reste inconnue.

Le domaine A comprend le tonneau (β/α)₈ circulairement permuté par rapport à celui des enzymes de la famille GH13 (résidus 990-1237, 1377-1511) conformément aux prévisions de structures secondaires, et une longue boucle incluant trois hélices (résidus 1549-1591). Cette boucle provient du domaine B mais participe à la formation du domaine A (Figure 11). Par ailleurs, entre le feuillet β 7 et l'hélice α 7 du tonneau, une longue boucle contenant deux hélices, appelées H1 et H2, participe à la formation de la gorge catalytique. Cette boucle occupe la même position relative au sein du tonneau que le domaine B' de l'ASNp, mais ne partage aucune analogie structurale avec ce domaine.

Associé au domaine A, le domaine B forme le cœur catalytique de l'enzyme. Il contient cinq feuillets β vrillés. Ce domaine est inséré à la même position relative,

comparativement aux enzymes de la famille GH13. Trois boucles du domaine B participent à la topologie en gorge du site actif. De plus, entre les domaines A et B, un ion calcium heptacoordiné est présent. Les résidus impliqués dans le site de fixation de cet ion calcium sont Asp1508, Glu979, Asp985 et Asn1029 (Figure 13).

D'après une analyse avec le serveur DALI, le domaine IV ne partage aucune homologie structurale significative avec un autre domaine protéique répertorié dans la PDB. C'est un domaine principalement hélicoïdal. Sa fonction est inconnue.

Le domaine V correspond au GBD. Il adopte une conformation en β -solénoïde triangulaire. Deux feuillets β antiparallèles en épingle à cheveux forment un côté de spire triangulaire, trois de ces sous-unités forment un tour de solénoïde. La partie N-terminale du GBD inclut une seule épingle à cheveux. Ce segment polypeptidique vient s'accoler à la partie C-terminale du domaine V. Ce type de topologie en β -solénoïde fut décrit pour la première fois pour la partie C-terminale de l'autolysine A de *Streptococcus pneumoniae* (Fernandez-Tornero *et al.*, 2001).

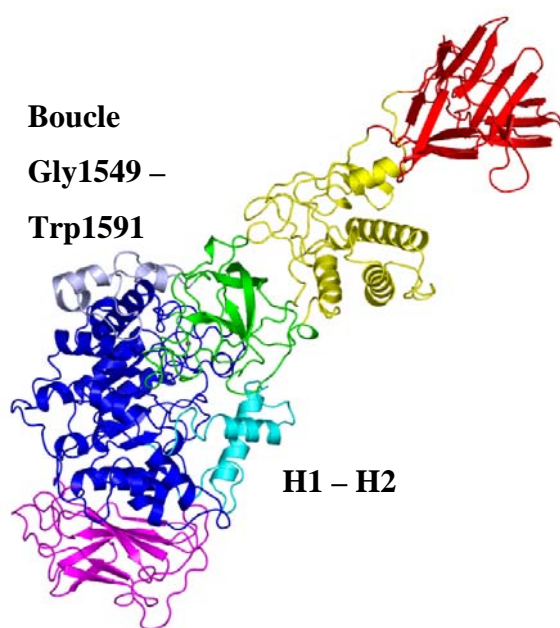


Figure 11 : Organisation en domaines de GTF180- Δ N (Code PDB : 3KLLK). Légende : Domaine A (bleu), domaine C (magenta), domaine B (vert), domaine IV (jaune), domaine V (rouge). Boucle 7 (hélices H1 et H2) en cyan. Boucle en gris incluant trois hélices participant au domaine A mais provenant du domaine B.

I.A.1. Site actif en présence de saccharose

Le site actif de la glucane-saccharase GTF180- Δ N est une gorge au fond de laquelle se trouve une poche où vient se fixer le saccharose. Celui-ci occupe les sous-sites -1 et +1,

l'unité glucosyle établit notamment des interactions de « stacking » avec la Tyr1465 du sous-site -1. L'unité fructosyle occupe le sous-site +1. Parmi les huit résidus des sous-sites -1 et +1 structurellement et strictement conservés au sein de la famille GH13, sept le sont également pour les enzymes de la famille GH70 (Arg1023, **Asp1025**, **Glu1063**, His1135, **Asp1136**, Tyr1465, Asp1504) ; le huitième est l'histidine du motif I chez les enzymes GH13 qui est remplacé par la glutamine 1509 dans GTF180- Δ N (Figure 12 B). Ce résidu glutamine est strictement conservé au sein de la famille GH70. Sa mutation en acide glutamique, acide aspartique, alanine, histidine ou encore asparagine entraîne une diminution de la valeur du k_{cat} (Monchois *et al.*, 2000). Par ailleurs, Asp1458 est conservé parmi les glucane-saccharases des familles GH13 et GH70 alors qu'il ne l'est pas pour les autres enzymes de la famille GH13 ; il établit une interaction avec la fonction hydroxyle du carbone C4 du résidu glucosyle.

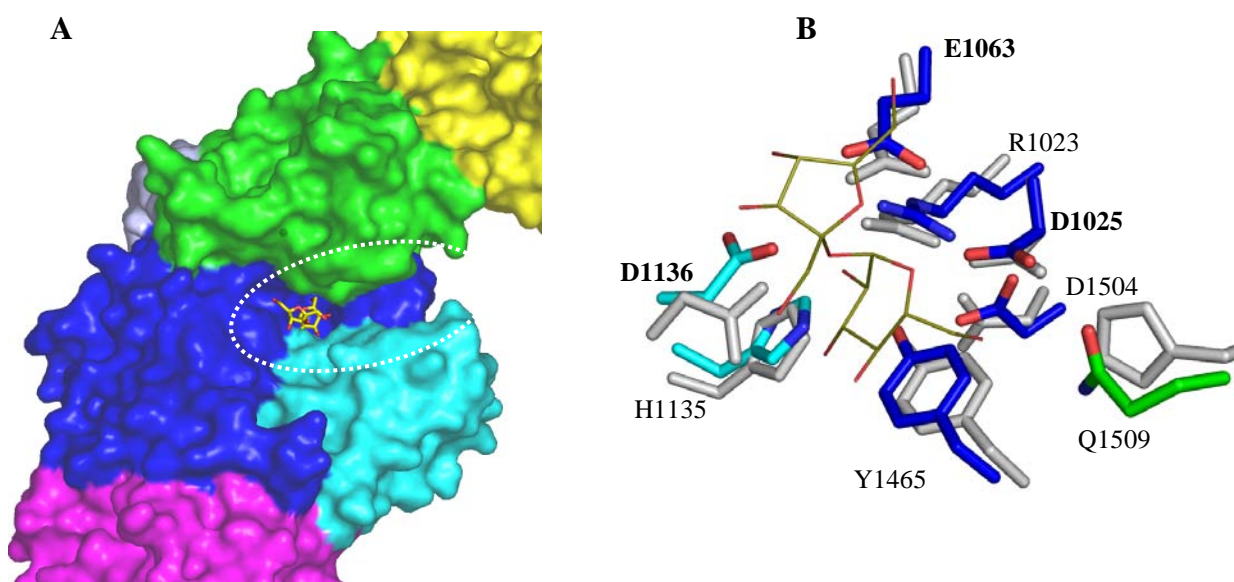


Figure 12 : **A** : Topologie du site actif de la glucane-saccharase GTF180- Δ N en présence de saccharose représenté en jaune (Code PDB : 3HZ3). Légende : Domaine A (bleu), domaine C (magenta), domaine B (vert), domaine IV (jaune), boucle 7 (hélices H1 et H2) en cyan. L'ellipse figure la position de la gorge catalytique. **B** : Résidus conservés des sous-sites -1 et +1, entre l'ASNp (gris) et GTF180- Δ N. Seul Q1509 n'est pas conservé. Les résidus en bleu, en cyan et en vert appartiennent respectivement aux domaines A, à la boucle 7 et au domaine B. La numérotation des résidus correspond à celle de GTF180- Δ N ; ceux de la diade catalytique et l'acide aspartique stabilisateur sont indiqués en gras. Le saccharose du complexe GTF180- Δ N : saccharose est représenté couleur olive.

La diade catalytique et l'acide aspartique stabilisateur de l'intermédiaire covalent font partie de ces sept résidus. Les résidus catalytiques Glu1063 et Asp1025/Asn sont

favorablement orientés vers l'oxygène glycosidique et le carbone anomérique C1 de l'unité glucosyle. Ces résidus sont respectivement le donneur de proton et le nucléophile. Le troisième résidu catalytique Asp1136 est le stabilisateur de l'intermédiaire covalent. À la différence des enzymes de la famille GH13, ce résidu adopte une conformation inattendue. Au lieu d'établir des liaisons hydrogène avec les carbones C2 et C3 de l'intermédiaire β -D-glucosyl-enzyme pour stabiliser l'intermédiaire covalent, il pointe vers l'arginine 1023 avec laquelle il établit des liaisons hydrogène médiées par une molécule d'eau. Cependant, le mutant Asp1136Asn a une activité catalytique clairement diminuée, indiquant son rôle crucial dans la catalyse.

Outre ces sept résidus interagissant directement avec la molécule de saccharose, cinq autres résidus établissent cinq liaisons hydrogène avec le résidu β -D-fructosyle du saccharose. Il s'agit d'Asn1029, **Glu1063**, Trp1065, **Asp1136** et Gln1140 (Figure 13). Des interactions de van der Waals ont également été constatées entre le résidu β -D-fructosyle et les résidus hydrophobes Leu981 et Leu982 du domaine B. Ces résidus ne sont pas strictement conservés au sein des enzymes de la famille GH70.

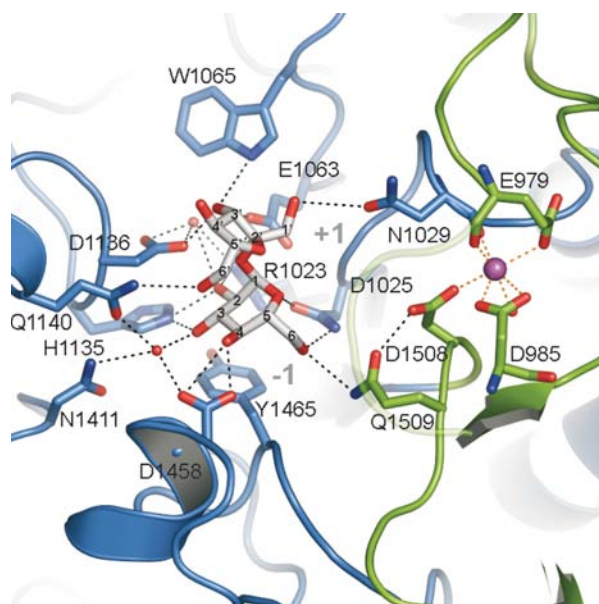


Figure 13 : Vue des sous-sites -1 et +1 du site actif de GTF180- Δ N en complexe avec du saccharose (Code PDB : 3HZ3). Légende : domaine B (vert), domaine A (bleu) ; Sphère violette, ion calcium. Petites sphères rouges, molécules d'eau ; Par souci de clarté, la boucle (résidus 980 – 984) est représenté en cartoon transparent. D'après (Vujicic-Zagar, 2007).

II.C.3. Sites de fixation du maltose

La structure de la glucane-saccharase GTF180-ΔN en complexe avec du maltose a été résolue à 1,75 Å. Le maltose est classé parmi les accepteurs forts des glucane-saccharases, il est glucosylé et donne lieu à la formation d'une série de GOS aux dépens de la synthèse de polymère. Pour GTF180-ΔN, les liaisons osidiques entre les résidus glucosyle de ces GOS sont de type α -(1→6), sauf bien sûr pour le résidu maltose présent à l'extrémité réductrice de la chaîne oligosaccharidique.

Quatre sites de fixation du maltose ont été identifiés (Figure 14 A). Deux sites, nommés M3 et M4 sont distants du site actif et se trouvent respectivement à la surface des domaines A et B. Les deux autres sites appelés M1 et M2 se situent dans la gorge catalytique. La molécule de maltose présente en M2 est en mesure d'établir des liaisons hydrogène avec la chaîne latérale de Asp1028, Trp1065 et Trp1067 ainsi qu'avec la fonction carbonyle de la chaîne principale de Ala978. Le résidu glucosyle du maltose M1 en +2 établit des interactions de van der Waals avec la chaîne latérale du Trp1065. Le glucosyle en +1 de la molécule de maltose est intercalé entre les résidus Trp1065, Leu938 et Leu981, avec le C6 de ce glucosyle pointant vers l'acide/base Glu1063. Les autres résidus impliqués dans l'interaction avec ce résidu glucosyle en +1 sont Ala978 et Asn1029. La molécule de maltose en M1 semble donc être favorablement positionnée dans le site actif pour réagir avec le β -D-glucosyl-enzyme et donner lieu à la formation du plus petit des oligosaccharides synthétisés par cette enzyme, c'est-à-dire le panose (α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→4)-D-Glcp).

Notons que le tryptophane 1065 est strictement conservé au sein des enzymes de la famille GH70, sauf pour le second domaine catalytique de la dextrane-saccharase DSR-E où il est substitué par une glycine. Des travaux de mutagenèse à saturation sur ce résidu indiquent qu'il semble être important pour l'activité polymérase des glucane-saccharases. Le mutant Trp1065Phe a conservé une activité polymérase tandis que les mutants Trp1065Gln, Pro, Asn, Met, Leu, Arg et Gly ont perdu cette activité polymérase à la faveur de la synthèse d'oligosaccharides. Cette activité polymérase est caractéristique d'une très grande majorité des glucane-saccharases. (Kralj *et al.*, 2009b).

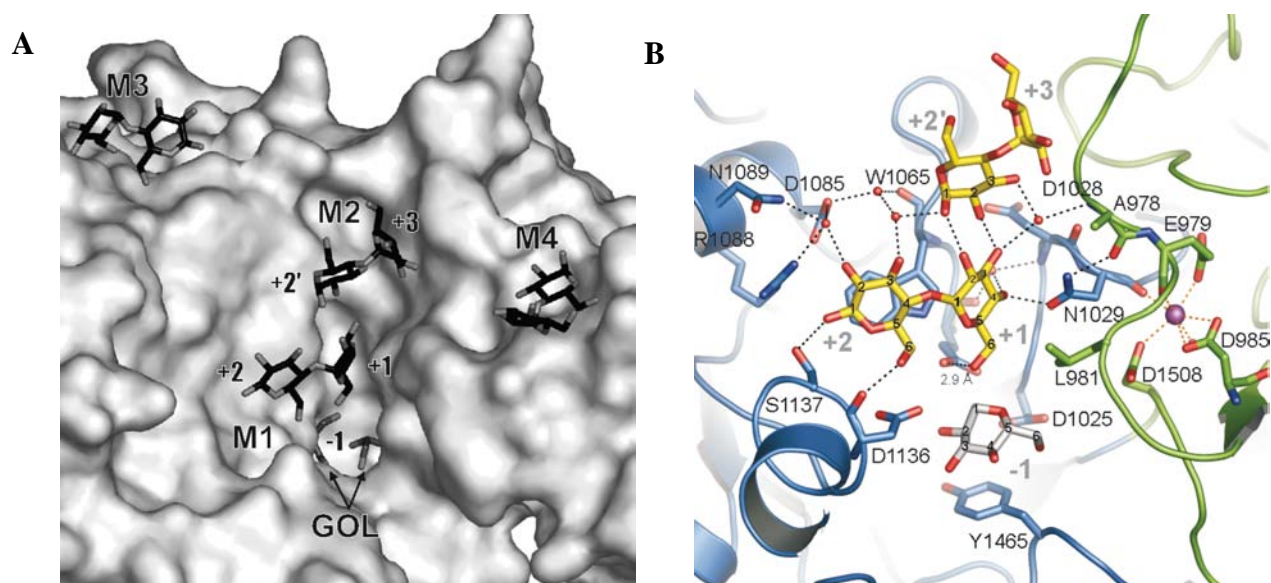


Figure 14 : Sites de fixation du maltose (Code PDB : 3KLL). **A** : Représentation de surface de GTF180-ΔN avec les quatre sites de fixation de maltose notés de M1 à M4. Deux molécules de glycérol sont présentes dans le sous-site -1. **B** : Représentation des molécules de maltose M1 et M2 présentes respectivement dans les sous-sites [+1 ; +2] et [+2' ; +3]. Le glucose en -1 provient du complexe saccharose – GTF180-ΔN. Légende : domaine B (vert), domaine A (bleu) ; Sphère violette, ion calcium. Petites sphères rouges, molécules d'eau. D'après (Vujicic-Zagar, 2007).

La résolution de la structure 3D de GTF180-ΔN représente une avancée majeure pour l'ensemble des chercheurs s'intéressant aux glucane-saccharases de la famille GH70. Elle va permettre de mieux analyser les liens de parenté entre GH13 et GH70 et de proposer un schéma évolutif. D'ores et déjà, cette structure permet de répondre à de nombreuses questions en particulier sur le mode de liaison et la spécificité pour le saccharose et le maltose. Elle ouvre aussi des perspectives dans le domaine de l'ingénierie de ces enzymes.

Cependant, de nombreuses questions restent en suspens. Quels sont les facteurs structuraux impliqués dans la régiospécificité de GTF180-ΔN? Quels sont les mécanismes à l'origine de la reconnaissance des différents et nombreux accepteurs connus ? Pour répondre à ces questions et notamment approfondir les connaissances entre structure et activité pour cette famille d'enzymes, il est indispensable de disposer des structures 3D d'enzymes de régiospécificité différente comme GBD-CD2.

III. GBD-CD2 : une α -(1→2) transglucosidase issue de la dextrane-saccharase DSR-E

III.A. Les produits synthétisés par l'activité dextrane-saccharase de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299

L'analyse structurale du dextrane produit par la souche *Ln. mesenteroides* NRRL B-1299 mit en évidence qu'il s'agissait d'un dextrane fortement ramifié possédant un taux liaison en α -(1→2) compris entre 11% et 35% (Kobayashi *et al.*, 1973; Seymour *et al.*, 1976). Selon Kobayashi *et al.* et Watanabe *et al.*, ces unités liées en α -(1→2) ne seraient pas seulement situées aux points de branchement. Ces auteurs rapportent que des liaisons α -(1→2) seraient présentes également dans les chaînes linéaires (Kobayashi *et al.*, 1973; Watanabe *et al.*, 1980). La longueur des ramifications au niveau des points de branchement est variable selon les études ; l'analyse des fragments après acétolyse indique la présence de kojitriose (α -D-Glcp- α -(1→2)-D-Glcp- α -(1→2)-D-Glcp) (Watanabe *et al.*, 1980). Par ailleurs, le dextrane natif produit par la souche NRRL B-1299 contient de 0 à 27% de liaisons α -(1→2) selon les fractions isolées, les techniques employées et les auteurs (Bourne *et al.*, 1972; Dols *et al.*, 1997a; Kobayashi *et al.*, 1973; Seymour *et al.*, 1976; Seymour *et al.*, 1979a).

Les principaux produits de la réaction d'accepteur, en présence de saccharose et de maltose catalysée par l'activité dextrane-saccharase de *Ln. mesenteroides* NRRL B-1299, ont été décrits par Remaud-Siméon *et al.* et par Dols *et al.* (Dols *et al.*, 1997c; Remaud-Siméon *et al.*, 1994). Trois familles d'oligosaccharides sont obtenues : une famille alors appelée OD, pour oligodextranes, est uniquement linéaire et composée d'unités glucosyle liées en α -(1→6), hormis pour le résidu maltose présent à l'extrémité réductrice. La seconde famille appelée R présente une unité glucosyle liée en α -(1→2) à l'extrémité non-réductrice de la chaîne. Enfin, la troisième famille (R') contient une unité liée en α -(1→2) sur l'avant dernière unité glucosyle de la chaîne principale, du côté non-réducteur (Figure 1). Il faut noter que les molécules des familles R et R' sont décrites comme n'étant pas acceptrices *a contrario* de celles de la famille OD (Dols *et al.*, 1997c).

III.B. La dextrane-saccharase DSR-E

Monchois *et al.* tentèrent d'isoler le gène codant pour la glucane-saccharase responsable de la synthèse des liaisons α -(1→2) en se basant sur une stratégie d'amorces dégénérées correspondantes à des zones de séquence très conservées de la partie N-terminale de ces enzymes. Ces travaux ont abouti au clonage de deux gènes codant pour les dextrane-saccharases DSR-A et DSR-B qui ne synthétisent pas de liaisons α -(1→2) (Monchois *et al.*, 1998a; Monchois *et al.*, 1996a). Ultérieurement, Bozonnet *et al.* appliquèrent une stratégie différente. Les auteurs analysèrent par SDS-PAGE les protéines produites par *Ln. mesenteroides* NRRL B-1299. Après révélation par détection d'activité *in situ* (zymogramme), la bande de plus haute masse moléculaire fut excisée et microséquencée. Quatre peptides furent séquencés, deux provenant probablement du GBD, les autres étant spécifiques de la glucane-saccharase en question. Un jeu d'amorces dégénérées permit d'isoler un fragment d'ADN dont la séquence présentait 35% d'homologie avec DSR-S. Ce fragment fut utilisé comme sonde radioactivement marquée pour cribler par Southern Blot des banques d'ADN génomique créées par digestion *Hind*III de l'ADN génomique de *Ln. mesenteroides* NRRL B-1299. Un fragment de 5,6 kb fut alors isolé. Le clonage du gène entier conduit à isoler un gène, nommé *dsr-E*, de taille très élevée, c'est-à-dire 8508 pb (Bozonnet *et al.*, 2002). L'analyse de la structure primaire a révélé que ce gène code pour une protéine de 2835 résidus, avec une masse moléculaire prédite de 313 267 Da. Cette observation est directement liée à la structure originale de cette enzyme qui se caractérise par la présence d'un deuxième domaine catalytique situé à l'extrémité C-terminale (Figure 15). Le gène codant pour cette enzyme ainsi que les formes tronquées par domaine furent clonées dans *E. coli* et caractérisées.

III.C. Caractérisations des mutants tronqués de DSR-E

La caractérisation de l'enzyme recombinante DSR-E mit en évidence que cette enzyme est capable de synthétiser un dextrane contenant 5% de liaisons α -(1→2) à partir de saccharose (Fabre *et al.*, 2005). Pour comprendre le rôle de chaque domaine, Fabre *et al.* ont réalisé des troncutures par domaine de l'enzyme DSR-E, exprimées chez *E. coli*. Les auteurs ont ensuite étudié l'activité de chaque mutant tronqué recombinant, en présence de saccharose seul ou de saccharose et d'accepteurs tels que les dextrans, le maltose ou les GOS. L'ensemble des mutants tronqués créés est représenté sur la Figure 15.

Nom du mutant	Protéine produite	Masse moléculaire
DSR-E		313 kDa
Δ (ZV)		291 kDa
Δ (CD2)		217 kDa
CD1		103 kDa
GBD-CD2		192 kDa
CD2		98 kDa

Figure 15 : Représentation schématique de l'organisation putative en domaines de DSR-E et des mutants tronqués par domaine. ZV, zone variable ; CD1, domaine catalytique 1 ; GBD, domaine de liaison au glucane ; CD2, domaine catalytique 2. D'après (Fabre, 2004).

III.C.1. Effets des délétions de domaines sur la synthèse de polymère

À partir des extraits enzymatiques correspondant à chaque forme tronquée, les synthèses de dextrane ont été réalisées en présence de 100 g.L⁻¹ de saccharose. Les dextranses ont été ensuite purifiés par précipitation à l'éthanol 50% (v/v). Leur analyse quantitative par ¹³C -RMN a permis de déterminer le pourcentage relatif de chaque type de liaison. Les résultats de synthèse sont répertoriés dans la Table 2. Les mutants CD1 et CD2 ne sont pas suffisamment actifs pour permettre la détection d'éventuels produits de la réaction enzymatique. Par ailleurs, bien que le mutant GBD-CD2 soit suffisamment actif, aucune synthèse de polymère n'a été constatée en présence de saccharose seul. Tous les glucanes synthétisés par les autres mutants sont des dextranses puisqu'ils présentent plus de 50% de liaisons de type α -(1→6). L'activité dextrane-saccharase de la souche *Ln. mesenteroides* NRRL B-1299 est responsable de la synthèse d'un dextrane contenant 61% de liaisons α -(1→6), 28% de liaisons α -(1→2) et 12% de liaisons α -(1→3). De façon surprenante, l'enzyme recombinante DSR-E synthétise un dextrane ne contenant plus que 5% de liaisons de type α -(1→2) ; le taux de liaison α -(1→6) augmente de 20% et celui des liaisons α -(1→3) diminue de 2%. Par ailleurs, tous les dextranses synthétisés par les enzymes recombinantes contiennent 2 à 3% de liaisons de type α -(1→4). Le mutant Δ (VZ) produit un dextrane très similaire à celui synthétisé par DSR-E, seul l'équilibre entre les pourcentages d' α -(1→2) et d' α -(1→3) est modifié de 4 à 5%. Enfin, le mutant Δ (CD2) catalyse la synthèse d'un dextrane totalement dépourvu de liaisons α -(1→2). Notons que le type d'analyse réalisée ne permet pas de déterminer les positions relatives des unités glucosyle liées le long de la chaîne (Fabre *et al.*, 2005).

Table 2 : Composition en type de liaisons osidiques des dextrans synthétisés par les différents mutants de DSR-E déterminée par RMN du ^{13}C . Les réactions ont été menées en présence de 100 g.L^{-1} de saccharose, avec $0,5 \text{ U.mL}^{-1}$ d'enzyme recombinante non purifiée, en présence de tampon acétate de sodium 20 mM à $\text{pH} = 5,4$ supplémenté avec $0,34 \text{ mM}$ de CaCl_2 . (Fabre, 2004).

Protéine	Type de liaison et proportion			
	% α -(1→6)	% α -(1→2)	% α -(1→3)	% α -(1→4)
Dextrane-saccharases natives de <i>Ln. mesenteroides</i> NRRL B-1299	61	28	12	0
DSR-E	81	5	10	3
$\Delta(\text{VZ})$	82	10	6	2
$\Delta(\text{CD2})$	86	0	11	3

III.C.2. Effets des délétions de domaines sur la réaction d'accepteur en présence de maltose

Des réactions semblables à celles décrites dans le paragraphe précédent ont été réalisées en présence de 200 g.L^{-1} de saccharose et de 100 g.L^{-1} de maltose avec les différents mutants tronqués. Tous les mutants hormis CD1, CD2 et GBD-CD2 ont synthétisé des gluco-oligosaccharides avec des rendements totaux variant de 57,3% à 84,2% pour CD1 et $\Delta(\text{CD2})$ respectivement. Comme en témoignent la Figure 16 et la Table 3, parmi les mutants synthétisant des GOS seulement trois produisent des GOS branchés en α -(1→2). Les mutants en question possèdent tous le CD2. Pourtant, les mutants CD2 et GBD-CD2 n'en synthétisent pas, car ils sont dépourvus d'activité polymérase (cf. § précédent). Ils ne peuvent donc pas synthétiser les GOS de la série OD, c'est-à-dire de structure suivante : $[\text{6-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{)]}_n\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{4)-D-Glcp}$.

Table 3 : Rendements de synthèse en α -(1→6) GOS, en GOS α -(1→2) branchés et en GOS totaux pour les différents mutants tronqués de DSR-E. Les réactions ont été menées en présence de 200 g.L⁻¹ de saccharose, 100 g.L⁻¹ de maltose, avec 0,5 U.mL⁻¹ d'enzyme recombinante non purifiée, dans du tampon acétate de sodium 20 mM à pH = 5,4, à 30°C. (Fabre, 2004).

Protéines	Rendements :		Rendements en GOS totaux (1)	Consommation du saccharose
	R _{α-(1→6) GOS} (1)	R _{α-(1→2) GOS} (1)		
Dextrane-saccharases natives de <i>Ln. mesenteroides</i> NRRL B-1299	32,6 %	26,4%	59 %	100 %
DSR-E	68,2 %	11,7 %	79,9 %	100 %
Δ (VZ)	59,2 %	21,4 %	80,6 %	100 %
Δ (CD2)	84,2 %	0,0 %	84,2 %	100 %
CD1	57,3 %	0,0 %	57,3 %	20 %
GBD-CD2	0,0 %	0,0 %	0,0 %	73 %
CD2	0,0 %	0,0 %	0,0 %	7 %

(1) R_{GOS} = masse finale de GOS / (162/342 x masse de saccharose consommé + masse d'accepteur consommé)

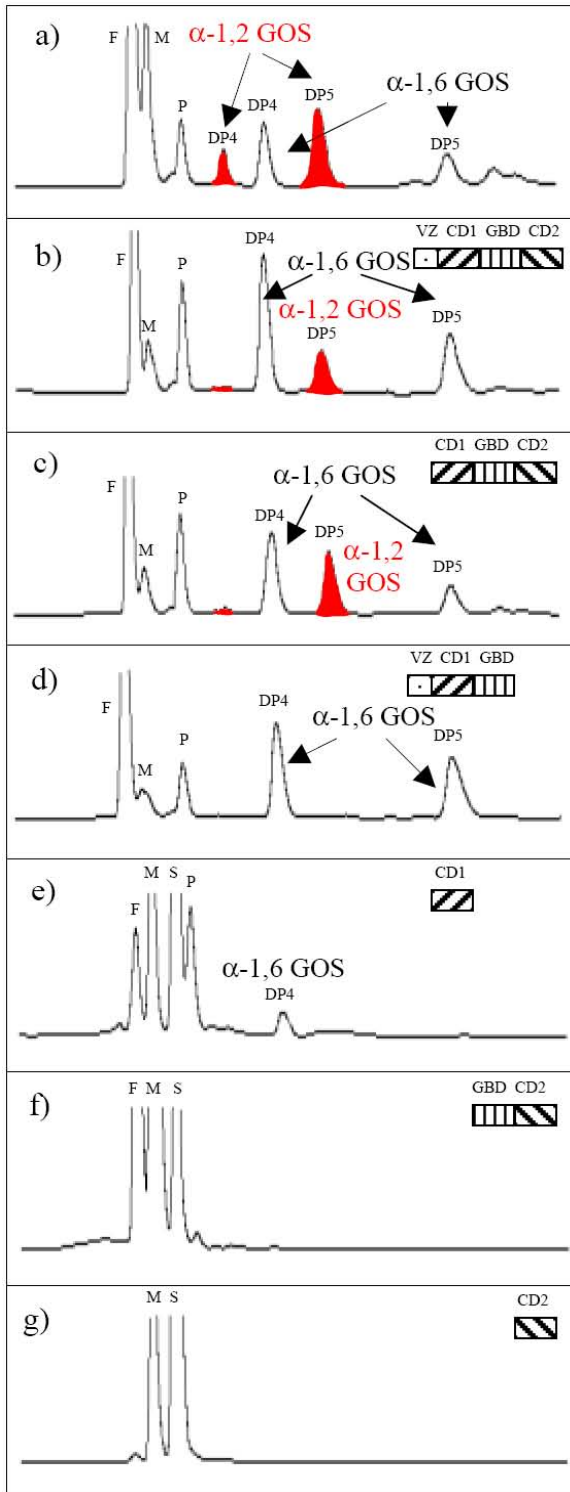


Figure 16 : Chromatogrammes obtenus par HPLC C18 des oligosaccharides synthésisés en présence de maltose et de saccharose par les différents mutants tronqués de DSR-E. (saccharose 200 g.L⁻¹ ; maltose 100 g.L⁻¹). D'après (Fabre, 2004).

Légende : Une représentation schématique de chaque mutant tronqué est figurée à côté du chromatogramme correspondant, sauf pour a) qui correspond à l'activité dextrane-saccharase de DSR-E.

F : fructose

M : maltose

S : saccharose

P : panose (α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→4)-D-Glcp)

α -(1→6) GOS DP4 : α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→4)-D-Glcp

α -(1→6) GOS DP5 : α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→4)-D-Glcp

α -(1→2) GOS DP4 : α -D-Glcp-(1→2)- α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→4)-D-Glcp

α -(1→2) GOS DP5 : α -D-Glcp-(1→2)- α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→4)-D-Glcp

En conclusion, la synthèse de dextrane et de GOS n'est catalysée que par les mutants possédant au moins le CD1. Le premier domaine catalytique est responsable de la synthèse des liaisons de type α -(1→6). Le second domaine catalytique (CD2) est donc responsable de la synthèse des liaisons α -(1→2). De plus, les mutants pourvus des deux domaines catalytiques CD1 et CD2 produisent des dextranses et des GOS branchés en α -(1→2) en fonction des conditions réactionnelles. Par ailleurs, le mutant GBD-CD2 est actif, capable d'hydrolyser le saccharose mais incapable de synthétiser du dextrane ou des GOS.

III.C.3. Caractérisation du mutant GBD-CD2

Le mutant GBD-CD2 a été caractérisé par Fabre *et al.*. Cette enzyme est produite sous forme de corps d'inclusion chez *E. coli*. Fabre *et al.* ont mis au point un procédé de purification par affinité sur résine de nickel. Ce protocole permet de récupérer une fraction purifiée ayant une activité spécifique comprise entre 5 et 16 U.mg⁻¹ et qui contient des formes dégradées de l'enzyme. La température optimale de catalyse de GBD-CD2 purifiée est de 40°C. À 35°C et 45 °C, les vitesses maximales relatives sont respectivement d'environ 52% et 62%. Le pH optimum pour l'activité de GBD-CD2 est compris entre 5,5 et 6,0. Par ailleurs, une étude de stabilité de GBD-CD2 a montré que l'enzyme purifiée présente un temps de demi-vie de 10h à 30°C et inférieur à 15 min à 40°C. Ce mutant est donc peu stable à sa température optimale d'activité. La température retenue pour l'étude de ce mutant est donc de 30°C (Fabre, 2004).

En présence de saccharose seul, le mutant GBD-CD2 agit comme une hydrolase et libère du glucose et du fructose (Table 4). Il est aussi capable de transférer les unités glucosyle sur la fonction hydroxyle du C5 du fructopyranose, synthétisant du leucrose. En présence de saccharose et de dextrane, ce mutant catalyse le transfert des unités glucosyle sur le dextrane accepteur uniquement au travers de liaisons α -(1→2). De même, en présence de GOS et de saccharose, GBD-CD2 transfère en α -(1→2) les unités glucosyle du saccharose, sur les résidus glucosyle liés en α -(1→6) des gluco-oligosaccharides. Enfin, quand le ratio saccharose / GOS est augmenté, la fraction de GOS branchés en α -(1→2)

passé de 60% à 89%. Toutefois, cette augmentation s'accompagne d'une répartition différente des co-produits (Table 4).

Table 4 : Produits formés par le mutant tronqué GBD-CD2. Les différentes réactions ont été menées en présence d'extrait brut à 0,5 U.mL⁻¹ excepté pour la réaction utilisant du dextrane (1 U.mL⁻¹). Les produits ont été identifiés et quantifiés par HPAEC-PAD et HPLC. Lorsque le total des pourcentages d'unités glucosyle diffère de 100%, de faibles quantités d'isomère du saccharose et/ou de maltose ont été identifiées mais non quantifiées. D'après (Fabre, 2004).

Concentrations initiales en substrat (g.L ⁻¹)	saccharose	100	200	200	75	100
	maltose	-	100	-	-	-
	GOS	-	-	50	122	-
	dextrane (70 kDa)	-	-	-	-	50
% d'unités glucosyle transférées sur :	H ₂ O (hydrolyse) (1)	78%	65%	32%	19%	30%
	fructose (synthèse de leucrose) (2)	16%	25%	28%	23%	-
	GOS (3) ou dextrane (4)	-	-	40%	58%	70%
Composition finale en α-(1→2) GOS du milieu réactionnel (en masse) (5)		-	0%	89%	60%	-
Rendement réel de synthèse en GOS branchés en α-(1→2) R _{α-(1→2) GOS} (6)		-	0%	31%	72%	-
Rendement apparent de synthèse en α-(1→2) GOS R* _{α-(1→2) GOS} (7)		-	0%	27%	47%	-

(1) % d'unités glucosyle transférées sur de l'eau = 100 × glucose (en mM) / saccharose consommé (en mM).

(2) % d'unités glucosyle transférées sur du fructose = 100 × leucrose (en mM) / saccharose consommé (en mM).

(3) % d'unités glucosyle transférées sur des α-(1→6) GOS = 100 × α-(1→2) GOS (en mM) / saccharose consommé (en mM).

(4) % d'unité glucosyle transférées sur du dextran = 100 - % of d'unité glucosyle transférées sur de l'eau.

(5) composition en α-(1→2) GOS = 100 × masse d' α-(1→2) GOS / masse totale des GOS.

(6) R_{α-(1→2) GOS} = masse finale d'α-(1→2) GOS / (162/342 × masse de saccharose consommé + masse d'accepteur consommé).

(7) R*_{α-(1→2) GOS} = masse finale d'α-(1→2) GOS / (162/342 × masse de saccharose initial + masse d'accepteur initial).

En conclusion, l'enzyme DSR-E recombinante produit un dextrane avec 5% de liaisons α -(1→2) alors que l'activité dextrane-saccharase de la souche *Ln. mesenteroides* NRRL B-1299 synthétise un dextrane contenant 28% de liaisons α -(1→2). L'étude des mutants tronqués de DSR-E a permis de montrer que les mutants possédant le CD1 sont responsables de la synthèse de dextrane ramifié en α -(1→3) et en α -(1→4). *A contrario*, le mutant GBD-CD2 ne peut pas produire de dextrane en présence de saccharose seul. De même, ce mutant n'utilise pas le maltose comme accepteur alors qu'il s'agit d'un accepteur fort pour bon nombre de glucane-saccharases.

Toutefois, le mutant GBD-CD2 transfère en α -(1→2) les résidus glucosyle du saccharose sur des accepteurs tels que les GOS ou les dextrans. Le CD2 est donc spécifique de la synthèse des liaisons de type α -(1→2). GBD-CD2 n'est pas *stricto sensu* une glucane-saccharase puisque ce mutant est dépourvu d'activité polymérase. Il s'agit plus, comme l'a défini Fabre *et al.* d'une enzyme de branchement en α -(1→2) du dextrane.

IV. Objectifs de la thèse

En dépit des nombreuses applications des produits synthétisés par les glucane-saccharases, l'étude approfondie des relations structure-activité a été limitée par le manque d'informations structurales liées aux difficultés de purification et de cristallisation de ces protéines. La première structure de glucane-saccharase de la famille GH70 a été dévoilée en 2007, et reste à ce jour la seule glucane-saccharase disponible depuis juillet 2010 dans la Protein Data Bank (PDB). En particulier, les facteurs structuraux contrôlant la spécificité de liaison des GH70 sont toujours inconnus. L'enzyme de branchement GBD-CD2 appartenant à la famille GH70 est un cas d'étude unique puisque cette enzyme est dépourvue d'activité polymérase, contrairement à la majorité des autres glucane-saccharases, et elle est, à notre connaissance, la seule glucane-saccharase caractérisée synthétisant uniquement des liaisons de type α -(1→2).

Les objectifs de cette thèse sont d'une part, de maîtriser l'utilisation de GBD-CD2 afin de développer les applications des produits qu'elle synthétise, notamment prébiotiques, et d'autre part, d'identifier les facteurs structuraux impliqués dans la catalyse et responsables

de la spécificité très originale de cette enzyme. Dans ce contexte, plusieurs questions émergent auxquelles nous nous proposons de répondre.

- i) Quel mécanisme régit la synthèse de dextrans branchés en α -(1→2) ? Peut-on moduler et contrôler le taux de branchement en α -(1→2) des dextrans synthétisés ?
- ii) Quelles sont les structures des GOS synthétisés par GBD-CD2 ? Obtient-on des produits similaires à ceux des trois séries obtenues avec l'activité dextransaccharase native de *Ln. mesenteroides* NRRL B-1299 ? Quel est le mécanisme de branchement des GOS ?
- iii) Quelle est la structure cristallographique de cette enzyme ? Est-elle proche de celle de GTF180-ΔN ? Quels sont les facteurs structuraux déterminant la spécificité de cette enzyme ?

Les premiers éléments permettant d'apporter des réponses à ces questionnements sont présentés dans les trois articles suivants.

Références bibliographiques

A

Abo, H., Matsumura, T., Kodama, T., Ohta, H., Fukui, K., Kato, K., Kagawa, H., 1991. Peptide sequences for sucrose splitting and glucan binding within *Streptococcus sobrinus* glucosyltransferase (water-insoluble glucan synthetase). *J Bacteriol* 173, 989-996.

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., 2004. Molecular basis of the amylose-like polymer formation catalyzed by *Neisseria polysaccharea* amylosucrase. *J Biol Chem* 279, 726-734.

Albenne, C., Skov, L.K., Tran, V., Gajhede, M., Monsan, P., Remaud-Siméon, M., André-Leroux, G., 2007. Towards the molecular understanding of glycogen elongation by amylosucrase. *Proteins Struct Funct Bioinf* 66, 118-126.

André, I., Potocki-Véronèse, G., Morel, S., Monsan, P., Remaud-Siméon, M., 2010. Sucrose-Utilizing Transglucosidases for Biocatalysis, in: Springer (Ed.), *Top Curr Chem*. Berlin - Heidelberg, pp. 1-24.

Arguello-Morales, M.A., Remaud-Simeon, M., Pizzut, S., Sarcabal, P., Willemot, R., Monsan, P., 2000. Sequence analysis of the gene encoding alternansucrase, a sucrose glucosyltransferase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355. *FEMS Microbiol Lett* 182, 81-85.

B

Banas, J.A., Russell, R.R., Ferretti, J.J., 1990. Sequence analysis of the gene for the glucan-binding protein of *Streptococcus mutans* Ingbritt. *Infect Immun* 58, 667-673.

Belshaw, N.J., Williamson, G., 1993. Specificity of the binding domain of glucoamylase 1. *Eur J Biochem* 211, 717-724.

Bertrand, A., Morel, S., Lefoulon, F., Rolland, Y., Monsan, P., Remaud-Simeon, M., 2006. *Leuconostoc mesenteroides* glucansucrase synthesis of flavonoid glucosides by acceptor reactions in aqueous-organic solvents. *Carbohydr Res* 341, 855-863.

Boucher, J., Daviaud, D., Simeon-Remaud, M., Carpenne, C., Saulnier-Blache, J.S., Monsan, P., Valet, P., 2003. Effect of non-digestible gluco-oligosaccharides on glucose sensitivity in high fat diet fed mice. *J Physiol Biochem* 59, 169-173.

Bourne, E.J., Sidebotham, R.L., Weigel, H., 1972. Studies on dextrans and dextranases. X. Types and percentages of secondary linkages in the dextrans elaborated by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. *Carbohydr Res* 22, 13-22.

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 dextranase with two catalytic domains. *J Bacteriol* 184, 5753-5761.

Buttcher, V., Welsh, T., Willmitzer, L., Kossmann, J., 1997. Cloning and characterization of the gene for amylosucrase from *Neisseria polysaccharea*: production of a linear alpha-(1→4)-glucan. *J Bacteriol* 179, 3324-3330.

C

Cantarel, B.L., Coutinho, P.M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., Henrissat, B., 2009. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucl Acids Res* 37, D233-238.

Cashman, K., 2003. Prebiotics and calcium bioavailability. *Curr Issues Intest Microbiol* 4, 21-32.

CEDUC, 2010. Sucre et autres débouchés - Mémo statistique, www.lesucre.com

Champion, E., 2008. Glucane-saccharases optimisées pour la glycosylation de molécules intervenant dans la composition de vaccins. Thèse de doctorat, INSA, Toulouse.

Champion, E., Andre, I., Mulard, L., Monsan, P., Remaud-Simeon, M., Morel, S., 2009. Synthesis of L-Rhamnose and N-Acetyl-D-Glucosamine Derivatives Entering in the Composition of Bacterial Polysaccharides by Use of Glucansucrases. *J Carbohydr Chem* 28, 142-160.

Côté, G.L., Dunlap, C.A., 2003. Alternansucrase acceptor reactions with methyl hexopyranosides. *Carbohydr Res* 338, 1961-1967.

Côté, G.L., Dunlap, C.A., Appell, M., Momany, F.A., 2005. Alternansucrase acceptor reactions with D-tagatose and L-glucose. *Carbohydr Res* 340, 257-262.

Côté, G.L., Dunlap, C.A., Vermillion, K.E., 2009. Glycosylation of raffinose via alternansucrase acceptor reactions. *Carbohydr Res* 344, 1951.

Côté, G.L., Robyt, J.F., 1982. Isolation and partial characterization of an extracellular glucansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355 that synthesizes an alternating (1,6), (1,3)- α -D-glucan. *Carbohydr Res* 101, 57-74.

Côté, G.L., Robyt, J.F., 1984. The formation of α -D-(1,3) branch linkages by a D-glucansucrase from *Streptococcus mutans* 6715 producing a soluble D-glucan. *Carbohydr Res* 127, 95-107.

Coudray, C., Tressol, J.C., Gueux, E., Rayssiguier, Y., 2003. Effects of inulin-type fructans of different chain length and type of branching on intestinal absorption and balance of calcium and magnesium in rats. *Eur J Nutr* 42, 91-98.

Coulier, L., Timmermans, J., Bas, R., Van Den Dool, R., Haaksman, I., Klarenbeek, B., Slaghek, T., Van Dongen, W., 2009. In-depth characterization of prebiotic galacto-oligosaccharides by a combination of analytical techniques. *J Agric Food Chem* 57, 8488-8495.

Crooks, G.E., Hon, G., Chandonia, J.M., Brenner, S.E., 2004. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res* 14, 1188-1190.

Cummings, J.H., Macfarlane, G.T., 2002. Gastrointestinal effects of prebiotics. *Br J Nutr* 87 Suppl 2, 145-151.

Cummings, J.H., Macfarlane, G.T., Englyst, H.N., 2001. Prebiotic digestion and fermentation. *Am J Clin Nutr* 73, 415-420.

D

Davies, G.J., Wilson, K.S., Henrissat, B., 1997. Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochem J* 321 (Pt 2), 557-559.

Declerck, N., Joyet, P., Gaillardin, C., Masson, J.M., 1990. Use of amber suppressors to investigate the thermostable *Bacillus stearothermophilus* α -amylase. Amino acid at 6 histidine residues reveal a critical position. *J Biol Chem* 265, 15481-15488.

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

Demuth, K., Jordening, H.J., Buchholz, K., 2002. Oligosaccharide synthesis by dextransucrase: new unconventional acceptors. *Carbohydr Res* 337, 1811-1820.

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.

Devulapalle, K.S., Mooser, G., 1994. Subsite specificity of the active site of glucosyltransferases from *Streptococcus sobrinus*. *J Biol Chem* 269, 11967-11971.

Djouzi, Z., Andlueux, C., 1997. Compared effects of three oligosaccharides on metabolism of intestinal microflora in rats inoculated with a human faecal flora. *Br J Nutr* 78, 313-324.

Djouzi, Z., Andrieux, C., Pelenc, V., Somarriba, S., Popot, F., Paul, F., Monsan, P., Szylit, O., 1995. Degradation and fermentation of alpha-gluco-oligosaccharides by bacterial strains from human colon: in vitro and in vivo studies in gnotobiotic rats. *J Appl Microbiol* 79, 117-127.

Dols, M., Chraïbi, W., Remaud-Simeon, M., Lindley, N.D., Monsan, P.F., 1997a. Growth and energetics of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 during metabolism of various sugars and their consequences for dextranucrase production. *Appl Environ Microbiol* 63, 2159-2165.

Dols, M., Remaud-Simeon, M., Vignon, M., Monsan, P., 1997b. Characterisation of dextranucrases from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. *App Biochem Biotechnol* 62, 47-59.

Dols, M., Simeon, M.R., Willemot, R.M., Vignon, M.R., Monsan, P.F., 1997c. Structural characterization of the maltose acceptor-products synthesized by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 dextranucrase. *Carbohydr Res* 305, 549-559.

Dueñas-Chasco, M.T., Rodríguez-Carvajal, M.A., Tejero-Mateo, P., Espartero, J.L., Irastorza-Iribas, A., Gil-Serrano, A.M., 1998. Structural analysis of the exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* spp. G-77. *Carbohydr Res* 307, 125-133.

E

Ebert, K.H., Schenk, G., 1968. Mechanisms of biopolymer growth: the formation of dextran and levan. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 30, 179-221.

Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32, 1792-1797.

Emond, S., Mondeil, S., Jaziri, K., Andre, I., Monsan, P., Remaud-Simeon, M., Potocki-Veronese, G., 2008. Cloning, purification and characterization of a thermostable amylosucrase from *Deinococcus geothermalis*. *FEMS Microbiol Lett* 285, 25-32.

Englyst, H.N., Kingman, S.M., Cummings, J.H., 1992. Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. *Eur J Clin Nutr* 46 Suppl 2, S33-50.

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-Simeon, M., 2005. Role of the two catalytic domains of DSR-E dextranucrase and their involvement in the formation of highly alpha-(1→2) branched dextran. *J Bacteriol* 187, 296-303.

Fernandez-Tornero, C., Lopez, R., Garcia, E., Gimenez-Gallego, G., Romero, A., 2001. A novel solenoid fold in the cell wall anchoring domain of the pneumococcal virulence factor LytA. *Nat Struct Biol* 8, 1020-1024.

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.

Fishbein, L., Kaplan, M., Gough, M., 1988. Fructooligosaccharides: a review. Vet Hum Toxicol 30, 104-107.

Flickinger, E.A., Wolf, B.W., Garleb, K.A., Chow, J., Leyer, G.J., Johns, P.W., Fahey, G.C., Jr., 2000. Glucose-based oligosaccharides exhibit different in vitro fermentation patterns and affect in vivo apparent nutrient digestibility and microbial populations in dogs. J Nutr 130, 1267-1273.

Frost, Sullivan, 2008. Strategic Analysis of the European Human Food and Beverage Prebiotics Markets, <http://www.frost.com/prod/servlet/report-toc.pag?repid=M1AC-01-00-00>

Fujiwara, T., Hoshino, T., Ooshima, T., Sobue, S., Hamada, S., 2000. Purification, characterization, and molecular analysis of the gene encoding glucosyltransferase from *Streptococcus oralis*. Infect Immun 68, 2475-2483.

Funane, K., Mizuno, K., Takahara, H., Kobayashi, M., 2000. Gene encoding a dextransucrase-like protein in *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. Biosci Biotechnol Biochem 64, 29-38.

Funane, K., Shiraiwa, M., Hashimoto, K., Ichishima, E., Kobayashi, M., 1993. An active-site peptide containing the second essential carboxyl group of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* by chemical modifications. Biochemistry 32, 13696-13702.

G

Germaine, G.R., Schachtele, C.F., 1976. *Streptococcus mutans* dextransucrase: mode of interaction with high molecular weight dextran and role in cellular aggregation. Infect Immun 13, 365-372.

Gibson, G.R., Roberfroid, M.B., 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. J Nutr 125, 1401-1412.

Giffard, P.M., Jacques, N.A., 1994. Definition of a fundamental repeating unit in streptococcal glucosyltransferase glucan-binding regions and related sequences. J Dent Res 73, 1133-1141.

Gilliland, S.E., Morelli, L., Reid, G., Oct. 2001. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations - World Health Organization, American Córdoba Park Hotel, Córdoba, Argentina, pp. 1-34.

Gilmore, K.S., Russell, R.R., Ferretti, J.J., 1990. Analysis of the *Streptococcus downei* *gtfS* gene, which specifies a glucosyltransferase that synthesizes soluble glucans. Infect Immun 58, 2452-2458.

Guggenheim, B., 1970. Enzymatic hydrolysis and structure of water-insoluble glucan produced by glucosyltransferases from a strain of streptococcus mutans. Helv Odontol Acta 14, Suppl 5:89+.

Gupta, V., Garg, R., 2009. Probiotics. Indian J Med Microbiol 27, 202-209.

H

Ha, S.J., Seo, D.H., Jung, J.H., Cha, J., Kim, T.J., Kim, Y.W., Park, C.S., 2009. Molecular cloning and functional expression of a new amylosucrase from *Alteromonas macleodii*. Biosci Biotechnol Biochem 73, 1505-1512.

Hanada, N., Fukushima, K., Nomura, Y., Senpuku, H., Hayakawa, M., Mukasa, H., Shiroza, T., Abiko, Y., 2002. Cloning and nucleotide sequence analysis of the *Streptococcus sobrinus* *gtfU* gene that produces a highly branched water-soluble glucan. *Biochim Biophys Acta* 1570, 75-79.

Hanada, N., Isobe, Y., Aizawa, Y., Katayama, T., Sato, S., Inoue, M., 1993. Nucleotide sequence analysis of the *gtfT* gene from *Streptococcus sobrinus* OMZ176. *Infect Immun* 61, 2096-2103.

Hee-Kyoung, K., Jong-Suk, O., Doman, K., 2009. Molecular characterization and expression analysis of the glucansucrase DSRWC from *Weissella cibaria* synthesizing a α -(1 \rightarrow 6) glucan. *FEMS Microbiol Lett* 292, 33-41.

Hee-Kyoung, K., Kim, Y.M., Kim, D., 2008. Functional, Genetic, and Bioinformatic Characterization of Dextranucrase (DSRBCB4) Gene in *Leuconostoc mesenteroides* B-1299CB4. *J Microbiol Biotechnol* 18, 1050-1058.

Hehre, E.J., Hamilton, D.M., 1946. Bacterial synthesis of an amylopectin-like polysaccharide from sucrose. *J Biol Chem* 166, 777-778.

Heinz, F., Vogel, M., 1991. Process for preparing a low glucose, fructose and sucrose inulino-oligosaccharide product, European Patent 0440074 A1.

Henrissat, B., Davies, G., 1997. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr Opin Struct Biol* 7, 637.

Hidaka, H., Hirayama, M., 1991. Useful characteristics and commercial applications of fructo-oligosaccharides. *Biochem Soc Trans* 19, 561-565.

Holm, L., Rosenstrom, P., 2010. Dali server: conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Res* 38 Suppl, W545-549.

Holzappel, W.H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., Huis in't Veld, J.H., 1998. Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol* 41, 85-101.

Honda, O., Kato, C., Kuramitsu, H.K., 1990. Nucleotide sequence of the *Streptococcus mutans* *gtfD* gene encoding the glucosyltransferase-S enzyme. *J Gen Microbiol* 136, 2099-2105.

J

Jeanes, A., Haynes, W., Williams, C., Rankin, J., Melvin, E., Austin, M., Clusray, 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.

Jencks, W.P., 1976. Binding energy, specificity, and enzymic catalysis: the Circe effect. *Adv Enzymol* 43, 219-410.

Jensen, M.H., Mirza, O., Albenne, C., Remaud-Simeon, M., Monsan, P., Gajhede, M., Skov, L.K., 2004. Crystal structure of the covalent intermediate of amylosucrase from *Neisseria polysaccharea*. *Biochemistry* 43, 3104-3110.

Jung, J.H., Seo, D.H., Ha, S.J., Song, M.C., Cha, J., Yoo, S.H., Kim, T.J., Baek, N.I., Baik, M.Y., Park, C.S., 2009. Enzymatic synthesis of salicin glycosides through transglycosylation catalyzed by amylosucrases from *Deinococcus geothermalis* and *Neisseria polysaccharea*. *Carbohydr Res* 344, 1612-1619.

Jung, S.M., Mayer, R.M., 1981. Dextranucrase: donor substrate reactions. *Arch Biochem Biophys* 208, 288-295.

K

Kang, H.-K., Seo, E.-S., Robyt, J.F., Kim, D., 2003. Directed evolution of a dextransucrase for increased constitutive activity and the synthesis of a highly branched dextran. *J Mol Catal B-Enzym* 26, 167.

Kang, M.S., Chung, J., Kim, S.M., Yang, K.H., Oh, J.S., 2006. Effect of *Weissella cibaria* isolates on the formation of *Streptococcus mutans* biofilm. *Caries Res* 40, 418-425.

Kato, C., Kuramitsu, H.K., 1991. The carboxyl terminal domain of *Streptococcus mutans* glucosyltransferases prevents secretion in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 81, 107-110.

Kato, C., Nakano, Y., Lis, M., Kuramitsu, H.K., 1992. Molecular genetic analysis of the catalytic site of *Streptococcus mutans* glucosyltransferases. *Biochem Biophys Res Commun* 189, 1184-1188.

Kitaoka, M., Robyt, J.F., 1999. Mechanism of the action of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC dextransucrase: kinetics of the transfer of -glucose to maltose and the effects of enzyme and substrate concentrations. *Carbohydr Res* 320, 183-191.

Kobayashi, I., Shishido, K., Kikuchi, T., Matsuda, K., 1973. Methylation analysis of fractions from the *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 dextran. *Agr Biol Chem* 37, 2763-2769.

Kobayashi, M., Yokoyama, I., Matsumada, K., 1985. Effectors differently modulating the dextransucrase activity of *Leuconostoc mesenteroides*. *Agric Biol Chem* 49, 3189-3195.

Koepsell, H.J., Tsuchiya, H.M., Hellman, N.N., Kazenko, A., Hoffman, C.A., Sharpe, E.S., Jackson, R.W., 1953. Enzymatic synthesis of dextran; acceptor specificity and chain initiation. *J Biol Chem* 200, 793-801.

Konishi, N., Torii, Y., Yamamoto, T., Ohta, H., Fukui, K., Ohta, H., Hanamoto, S., Matsuno, H., Komatsu, H., Kodama, T., Katayama, E., 1999. Structure and enzymatic properties of genetically truncated forms of the water-insoluble glucan-synthesizing glucosyltransferase from *Streptococcus sobrinus*. *Journal of Biochemistry (Tokyo)* 126, 287.

Kralj, S., Grijpstra, P., van Leeuwen, S., Kamerling, J.P., Dijkhuizen, L., 2009a. Characterisation of a dextransucrase (DSRP) with two catalytic domains from *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293, 8th Carbohydrate Bioengineering Meeting, Ischia, Naples, Italy.

Kralj, S., Stripling, E., Sanders, P., van Geel-Schutten, G.H., Dijkhuizen, L., 2005. Highly hydrolytic reuteransucrase from probiotic *Lactobacillus reuteri* strain ATCC 55730. *Appl Environ Microbiol* 71, 3942-3950.

Kralj, S., van Geel-Schutten, G.H., Dondorff, M.M., Kirsanovs, S., van der Maarel, M.J., Dijkhuizen, L., 2004a. Glucan synthesis in the genus *Lactobacillus*: isolation and characterization of glucansucrase genes, enzymes and glucan products from six different strains. *Microbiology* 150, 3681-3690.

Kralj, S., van Geel-Schutten, G.H., Rahaoui, H., Leer, R.J., Faber, E.J., van der Maarel, M.J., Dijkhuizen, L., 2002. Molecular characterization of a novel glucosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* strain 121 synthesizing a unique, highly branched glucan with α -(1 \rightarrow 4) and α -(1 \rightarrow 6) glucosidic bonds. *Appl Environ Microbiol* 68, 4283-4291.

Kralj, S., van Geel-Schutten, G.H., van der Maarel, M.J., Dijkhuizen, L., 2004b. Biochemical and molecular characterization of *Lactobacillus reuteri* 121 reuteransucrase. *Microbiology* 150, 2099-2112.

Kralj, S., Vujicic-Zagar, A., Pijning, T., Tietema, M., Dijkstra, B.W., Dijkhuizen, L., 2009b. The role of conserved W1065 in acceptor subsite +2 on glucansucrase activity and specificity, 8th Carbohydrate Bioengineering Meeting, Ischia, Naples, Italy.

L

Lamothe, J.H.G., Marchenay, Y.G., Monsan, P.F., Paul, F.M.B., Pelenc, V., 1992. Use of cosmetic compositions containing oligosaccharides, European patent

M

Macfarlane, G.T., Steed, H., Macfarlane, S., 2008. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *J Appl Microbiol* 104, 305-344.

Macfarlane, S., Macfarlane, G.T., Cummings, J.H., 2006. Review article: prebiotics in the gastrointestinal tract. *Aliment Pharmacol Ther* 24, 701-714.

MacGregor, E.A., Jespersen, H.M., Svensson, B., 1996. A circularly permuted α -amylase-type (α/β)-barrel structure in glucan-synthesizing glucosyltransferases. *FEBS Lett* 378, 263-266.

Maina, N.H., Tenkanen, M., Maaheimo, H., Juvonen, R., Virkki, L., 2008. NMR spectroscopic analysis of exopolysaccharides produced by *Leuconostoc citreum* and *Weissella confusa*. *Carbohydr Res* 343, 1446-1455.

Matsuura, Y., Kusunoki, M., Harada, W., Kakudo, M., 1984. Structure and possible catalytic residues of Taka-amylase A. *J Biochem (Tokyo)* 95, 697-702.

Meulenbeld, G.H., Hartmans, S., 2000. Transglycosylation by *Streptococcus mutans* GS-5 glucosyltransferase-D: acceptor specificity and engineering of reaction conditions. *Biotechnol Bioeng* 70, 363-369.

Minami, Y., Yazawa, K., Tamura, Z., Tanaka, T., Yamamoto, T., 1983. Selectivity of utilization of galactosyl-oligosaccharides by bifidobacteria. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 31, 1688-1691.

Mirza, O., Skov, L.K., Remaud-Simeon, M., Potocki de Montalk, G., Albenne, C., Monsan, P., Gajhede, M., 2001. Crystal structures of amylosucrase from *Neisseria polysaccharea* in complex with D-glucose and the active site mutant Glu328Gln in complex with the natural substrate sucrose. *Biochemistry* 40, 9032-9039.

Monchois, V., Arguello-Morales, M., Russell, R.R., 1999a. Isolation of an active catalytic core of *Streptococcus downei* MFe28 GTF-I glucosyltransferase. *J Bacteriol* 181, 2290-2292.

Monchois, V., Lakey, J.H., Russell, R.R., 1999b. Secondary structure of *Streptococcus downei* GTF-I glucansucrase. *FEMS Microbiol Lett* 177, 243-248.

Monchois, V., Remaud-Simeon, M., Monsan, P., Willemot, R.M., 1998a. Cloning and sequencing of a gene coding for an extracellular dextransucrase (DSRB) from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 synthesizing only a alpha (1-6) glucan. *FEMS Microbiol Lett* 159, 307-315.

Monchois, V., Remaud-Simeon, M., Russell, R.R., Monsan, P., Willemot, R.M., 1997. Characterization of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextransucrase (DSRS) and identification of amino-acid residues playing a key role in enzyme activity. *Appl Microbiol Biotechnol* 48, 465-472.

Monchois, V., Reverte, A., Remaud-Simeon, M., Monsan, P., Willemot, R.M., 1998b. Effect of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextransucrase carboxy-terminal deletions on dextran and oligosaccharide synthesis. *Appl Environ Microbiol* 64, 1644-1649.

Monchois, V., Vignon, M., Escalier, P.C., Svensson, B., Russel, R.R., 2000. Involvement of Gln 937 of *Streptococcus downei* GTF-I glucansucrase in transition-state stabilisation. *Eur J Biochem* 2000, 4127-4136.

Monchois, V., Willemot, R.-M., Remaud-Simeon, M., Croux, C., Monsan, P., 1996a. Cloning and sequencing of a gene coding for a novel dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 synthesizing only α -(1-6) and α -(1-3) linkages. *Gene* 182, 23-32.

Monchois, V., Willemot, R.M., Monsan, P., 1999c. Glucansucrases: mechanism of action and structure-function relationships. *FEMS Microbiol Rev* 23, 131-151.

Monchois, V., Willemot, R.M., Remaud-Simeon, M., Croux, C., Soucaille, P., Monsan, P., 1996b. Primary structure of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. Comparison with dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 799, 151-156.

Monsan, P., 1993. Oligosaccharides ou oligosaccharines. *Biofutur* 125, 29-30.

Monsan, P., Remaud-Siméon, M., André, I., 2010. Transglucosidases as efficient tools for oligosaccharide and glucoconjugate synthesis. *Curr Opin Microbiol* 13, 293-300.

Monsan, P.F., Ouarné, F., 2009. Oligosaccharides Derived from Sucrose, in: Charalampopoulos, D., Rastall, R.A. (Eds.), *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*. Springer, New York, pp. 293-336.

Mooser, G., 1992. Glycosidases and glycosyltransferases, *The enzymes Vol. XX*. Academic Press Inc., p. 187.

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 sobrinus* alpha-glucosyltransferases. *J Biol Chem* 266, 8916-8922.

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., Shur, D., Lyou, M., Watanabe, C., 1985. Kinetic studies on dextransucrase from the cariogenic oral bacterium *Streptococcus mutans*. *J Biol Chem* 260, 6907-6915.

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 dextransaccharase DRS-S: Compréhension du mécanisme de polymérisation pour la synthèse de dextranses de taille contrôlée. Thèse de doctorat, INSA, Toulouse.

Mukasa, H., Tsumori, H., Shimamura, A., 2001. Dextran acceptor reaction of *Streptococcus sobrinus* glucosyltransferase GTF-I as revealed by using uniformly ¹³C-labeled sucrose. *Carbohydr Res* 333, 19-26.

N

Neubauer, H., Bauche, A., Mollet, B., 2003. Molecular characterization and expression analysis of the dextransucrase DsrD of *Leuconostoc mesenteroides* Lcc4 in homologous and heterologous *Lactococcus lactis* cultures. *Microbiology* 149, 973-982.

O

Olvera, C., Fernandez-Vazquez, J.L., Ledezma-Candanoza, L., Lopez-Munguia, A., 2007. Role of the C-terminal region of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ in cell anchoring. *Microbiology* 153, 3994-4002.

P

Paul, F., Lopez-Mungia, A., Remaud, M., Pelenc, V., Monsan, P., 1992. Method for the production of α -(1 \rightarrow 2) oligodextranes using *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299, US Patent 5 141 858.

Pijning, T., Vujicic-Zagar, A., Kralj, S., Eeuwema, W., Dijkhuizen, L., Dijkstra, B.W., 2008. Biochemical and crystallographic characterization of a glucansucrase from *Lactobacillus reuteri* 180. *Biocatal Biotransfor* 26, 12-17.

Pizzut-Serin, S., Potocki-Veronese, G., van der Veen, B.A., Albenne, C., Monsan, P., Remaud-Simeon, 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., 1999. Sequence Analysis of the Gene Encoding Amylosucrase from *Neisseria polysaccharea* and Characterization of the Recombinant Enzyme. *J Bacteriol* 181, 375-381.

R

Rastall, R.A., Gibson, G.R., Gill, H.S., Guarner, F., Klaenhammer, T.R., Pot, B., Reid, G., Rowland, I.R., Sanders, M.E., 2005. Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: an overview of enabling science and potential applications. *FEMS Microbiol Ecol* 52, 145-152.

Rastall, R.A., Maitin, V., 2002. Prebiotics and synbiotics: towards the next generation. *Curr Opin Biotechnol* 13, 490-496.

Reid, G., Sanders, M.E., Gaskins, H.R., Gibson, G.R., Mercenier, A., Rastall, R., Roberfroid, M., Rowland, I., Cherbut, C., Klaenhammer, T.R., 2003. New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. *J Clin Gastroenterol* 37, 105-118.

Remaud-Simeon, M., Lopez-Munguia, A., Pelenc, V., Paul, F., Monsan, P., 1994. Production and use of glucosyltransferases from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 for the synthesis of oligosaccharides containing α -(1 \rightarrow 2) linkages. *Appl Biochem Biotechnol* 44, 101-117.

Remaud-Simeon, M., Willemot, R.-M., Sarçabal, P., Potocki de Montalk, G., Monsan, P., 2000. Glucansucrases: molecular engineering and oligosaccharide synthesis. *J Mol Catal B: Enzym* 10, 117-128.

Richard, G., Morel, S., Willemot, R.M., Monsan, P., Remaud-Simeon, M., 2003. Glucosylation of alpha-butyl- and alpha-octyl-D-glucopyranosides by dextransucrase and alternansucrase from *Leuconostoc mesenteroides*. *Carbohydr Res* 338, 855-864.

Richard, G., Yu, S., Monsan, P., Remaud-Simeon, M., Morel, S., 2005. A novel family of glucosyl 1,5-anhydro-d-fructose derivatives synthesised by transglucosylation with dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Carbohydr Res* 340, 395-401.

Ritsema, T., Smeekens, S., 2003. Fructans: beneficial for plants and humans. *Curr Opin Plant Biol* 6, 223-230.

Roberfroid, M., 2007. Prebiotics: the concept revisited. *J Nutr* 137, 830S-837S.

Robyt, J.F., Eklund, S.H., 1983. Relative, quantitative effects of acceptors in the reaction of *Leuconostoc mesenteroides* B-512F dextransucrase. *Carbohydr Res* 121, 279-286.

Robyt, J.F., Kimble, B.K., Walseth, T.F., 1974. The mechanism of dextransucrase action: Direction of dextran biosynthesis. *Arch Biochem Biophys* 165, 634-640.

Robyt, J.F., Yoon, S.-H., Mukerjea, R., 2008. Dextransucrase and the mechanism for dextran biosynthesis. *Carbohydr Res* 343, 3039-3048.

Roediger, W.E., Rae, D.A., 1982. Trophic effect of short chain fatty acids on mucosal handling of ions by the defunctioned colon. *Br J Surg* 69, 23-25.

Rousseau, V., 2004. Evaluation d'oligosaccharides à effet prébiotique vis-à-vis de la microflore vaginale. Thèse de doctorat, Génibio, INSA, Toulouse.

Russell, R.R.B., 1990. Molecular genetics of glucan metabolism in oral *Streptococci*. *Arch.Oral Biol.* 35, 53S.

Russell, R.R.B., Gilpin, M.L., Mukasa, H., Dougan, G., 1987. Characterization of glucosyltransferase expressed from a *Streptococcus sobrinus* gene cloned in *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* 133, 935-944.

Rycroft, C.E., Jones, M.R., Gibson, G.R., Rastall, R.A., 2001. A comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. *J Appl Microbiol* 91, 878-887.

S

Sakata, T., 1986. Effects of indigestible dietary bulk and short chain fatty acids on the tissue weight and epithelial cell proliferation rate of the digestive tract in rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 32, 355-362.

Sanz, M.L., Cote, G.L., Gibson, G.R., Rastall, R.A., 2005a. Prebiotic properties of alternansucrase maltose-acceptor oligosaccharides. *J Agric Food Chem* 53, 5911-5916.

Sanz, M.L., Gibson, G.R., Rastall, R.A., 2005b. Influence of disaccharide structure on prebiotic selectivity in vitro. *J Agric Food Chem* 53, 5192-5199.

Seibel, J., Hellmuth, H., Hofer, B., Kicinska, A.M., Schmalbruch, B., 2006. Identification of new acceptor specificities of glycosyltransferase R with the aid of substrate microarrays. *Chembiochem* 7, 310-320.

Seo, E.S., Lee, J.H., Park, J.Y., Kim, D., Han, H.J., Robyt, J.F., 2005. Enzymatic synthesis and anti-coagulant effect of salicin analogs by using the *Leuconostoc mesenteroides* glucansucrase acceptor reaction. *J Biotechnol* 117, 31-38.

Seymour, F.R., Knapp, R.D., Bishop, S.H., 1976. Determination of the structure of dextran by ¹³C-nuclear resonance spectroscopy. *Carbohydr Res* 51, 179-194.

Seymour, F.R., Knapp, R.D., Bishop, S.H., Jeanes, A., 1979a. High-temperature enhancement of ¹³C-N.M.R. chemical-shifts of unusual dextrans, and correlation with methylation structural analysis. *Carbohydr Res* 68, 123-140.

Seymour, F.R., Knapp, R.D., Chen, E.C.M., Bishop, S.H., Jeanes, A., 1979b. Structural analysis of leuconostoc dextrans containing 3-O-[alpha]-glucosylated [alpha]-glucosyl residues in both linear-chain and branch-point positions, or only in branch-point positions, by methylation and by ¹³C-N.M.R. spectroscopy. *Carbohydrate Research* 74, 41-62.

Shimamura, A., Nakano, Y.J., Mukasa, H., Kuramitsu, H.K., 1994. Identification of amino acid residues in *Streptococcus mutans* glucosyltransferases influencing the structure of the glucan product. *J Bacteriol* 176, 4845-4850.

Shiroza, T., Ueda, S., Kuramitsu, H.K., 1987. Sequence analysis of the *gtfB* gene from *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* 169, 4263-4270.

Sidebotham, R.L., 1974. Dextrans. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 30, 371-444.

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

Sinnott, M.L., 1990. Catalytic mechanisms of glycosyl transfer. *Chem Rev* 90 (7), 1171-1202.

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

Skov, L.K., Mirza, O., Henriksen, A., Potocki de Montalk, G., Remaud-Siméon, M., Sarçabal, P., Willemot, R.M., Monsan, P., Gajhede, M., 2000. Crystallization and preliminary X-ray studies of recombinant amylosucrase from *Neisseria polysaccharea*. *Acta Crystallogr D* 56, 203-205.

Skov, L.K., Mirza, O., Sprogøe, D., Dar, I., Remaud-Simeon, M., Albenne, C., Monsan, P., Gajhede, M., 2002. Oligosaccharide and sucrose complexes of amylosucrase. Structural implications for the polymerase activity. *J Biol Chem* 277, 47741-47747.

Slodki, M.E., England, R.E., Plattner, R.D., Dick Jr, W.E., 1986. Methylation analyses of NRRL dextrans by capillary gas-liquid chromatography. *Carbohydr Res* 156, 199-206.

Smolyansky, J., Ronald Ross, W., Victor, R.P., 2010. Probiotics: A Historical Perspective, Bioactive Foods in Promoting Health. Academic Press, Boston, p. 43.

Suwannarangsee, S., Moulis, C., Potocki-Veronese, G., Monsan, P., Remaud-Simeon, M., Chulalaksananukul, W., 2007. Search for a dextransucrase minimal motif involved in dextran binding. *FEBS Lett* 581, 4675-4680.

Swennen, K., Courtin, C.M., Delcour, J.A., 2006. Non-digestible oligosaccharides with prebiotic properties. *Crit Rev Food Sci Nutr* 46, 459-471.

T

Tsai, Y.W., Chia, J.S., Shiau, Y.Y., Chou, H.C., Liaw, Y.C., Lou, K.L., 2000. Three-dimensional modelling of the catalytic domain of *Streptococcus mutans* glucosyltransferase GtfB. *FEMS Microbiol Lett* 188, 75-79.

Tuohy, K.M., Ziemer, C.J., Klinder, A., Knöbel, Y., Pool-Zobel, B.L., Gibson, G.R., 2002. A Human Volunteer Study to Determine the Prebiotic Effects of Lactulose Powder on Human Colonic Microbiota. *Microb Ecol Health Dis* 14, 165 - 173.

U

Ueda, S., Shiroza, T., Kuramitsu, H.K., 1988. Sequence analysis of the *gtfC* gene from *Streptococcus mutans* GS-5. *Gene* 69, 101-109.

Uitdehaag, J.C.M., 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

Valette, P., Pelenc, V., Djouzi, Z., Andrieux, C., Paul, F., Monsan, P., Szylit, O., 1993. Bioavailability of new synthesised glucooligosaccharides in the intestinal tract of gnotobiotic rats. *J Sci Food Agric* 62, 121-127.

van Hijum, S.A., Kralj, S., Ozimek, L.K., Dijkhuizen, L., van Geel-Schutten, I.G., 2006. Structure-function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 157-176.

van Leeuwen, S.S., Kralj, S., Eeuwema, W., Gerwig, G.J., Dijkhuizen, L., Kamerling, J.P., 2009. Structural Characterization of Bioengineered α -D-Glucans Produced by Mutant Glucansucrase GTF180 Enzymes of *Lactobacillus reuteri* Strain 180. *Biomacromolecules* 10(3), 580-588.

van Leeuwen, S.S., Kralj, S., Gerwig, G.J., Dijkhuizen, L., Kamerling, J.P., 2008a. Structural analysis of bioengineered α -D-glucan produced by a triple mutant of the Glucansucrase GTF180 enzyme from *Lactobacillus reuteri* strain 180: generation of α -(1,4) linkages in a native (1,3)(1,6)- α -D-glucan. *Biomacromolecules* 9, 2251-2258.

van Leeuwen, S.S., Kralj, S., van Geel-Schutten, I.H., Gerwig, G.J., Dijkhuizen, L., Kamerling, J.P., 2008b. Structural analysis of the α -D-glucan (EPS35-5) produced by the *Lactobacillus reuteri* strain 35-5 glucansucrase GTFA enzyme. *Carbohydr Res* 343, 1251-1265.

van Leeuwen, S.S., Kralj, S., van Geel-Schutten, I.H., Gerwig, G.J., Dijkhuizen, L., Kamerling, J.P., 2008c. Structural analysis of the α -D-glucan (EPS180) produced by the *Lactobacillus reuteri* strain 180 glucansucrase GTF180 enzyme. *Carbohydr Res* 343, 1237-1250.

van Leeuwen, S.S., Leeftang, B.R., Gerwig, G.J., Kamerling, J.P., 2008d. Development of a ^1H NMR structural-reporter-group concept for the primary structural characterisation of α -D-glucans. *Carbohydr Res* 343, 1114-1119.

Vickerman, M.M., Sulavik, M.C., Minick, P.E., Clewell, D.B., 1996. Changes in the carboxyl-terminal repeat region affect extracellular activity and glucan products of *Streptococcus gordonii* glucosyltransferase. *Infect.Immun.* 64, 5117 - 5128.

Vickerman, M.M., Sulavik, M.C., Nowak, J.D., Gardner, N.M., Jones, G.W., Clewell, D.B., 1997. Nucleotide sequence analysis of the *Streptococcus gordonii* glucosyltransferase gene, *gtfG*. *DNA Seq* 7, 83-95.

Vujcic-Zagar, A., 2007. Structural and functional investigations of *Lactobacillus reuteri* glucansucrase. with crystallographic studies on an α -amylase and a prolyl endoprotease from *Aspergillus niger*. PhD Thesis, Rijkuniversiteit Groningen, Groningen.

W

Watanabe, T., Chiba, M., Matsuda, Y., Sakurai, F., Kobayashi, M., Matsuda, K., 1980. Acetolysis of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 dextran. Isolation and characterization of oligosaccharides containing secondary linkages from the borate-soluble fraction. *Carbohydr Res* 83, 119.

Wong, J.M., de Souza, R., Kendall, C.W., Emam, A., Jenkins, D.J., 2006. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol* 40, 235-243.

Y

Yalin, Y., Jin, L., Jianhua, W., Da, T., Zigang, T., 2008. Expression and characterization of dextransucrase gene *dsrX* from *Leuconostoc mesenteroides* in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 133, 505 - 512.

Yi, A.-R., Lee, S.-R., Jang, M.-U., Park, J.-M., Eom, H.-J., Han, N.S., Kim, T.-J., 2009. Cloning of Dextransucrase Gene from *Leuconostoc citreum* HJ-P4 and Its High-Level Expression in *E. coli* by Low Temperature Induction. *J Microbiol Biotechnol* 19, 829-835.

Yoon, S.H., Robyt, J.F., 2002. Synthesis of acarbose analogues by transglycosylation reactions of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC and B-742CB dextransucrases. *Carbohydr Res* 337, 2427-2435.

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

Zhang, H., Hu, Y., Zhu, C., Zhu, B., Wang, Y., 2008. Cloning, sequencing and expression of a dextransucrase gene (dex YG) from *Leuconostoc mesenteroides*. *Biotechnol Lett* 30, 1441-1446.

Chapitre II : Synthèse par la transglucosidase GBD-CD2 de dextranes avec un taux contrôlé de liaisons α -(1→2)

Ce chapitre a été publié dans *Applied Microbiology and Biotechnology*.

Synthesis of dextrans with controlled amounts of α -(1→2) linkages using the transglucosidase GBD-CD2.

Brison Y.¹, Fabre E.¹, Moulis C., Portais J.C., Monsan P., Remaud-Siméon M. (2010). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, pp 545-554. (¹ co-auteurs)

Le premier objectif de cette thèse a été de déterminer les modèles cinétiques reflétant les activités enzymatiques de l'enzyme GBD-CD2. Nous savons que cette enzyme clive le saccharose pour libérer du glucose et fructose par hydrolyse. Dans un second temps elle produit du leucrose et du kojibiose lorsque fructose et glucose sont respectivement en concentrations suffisantes. Lorsqu'un accepteur tel que du dextrane est ajouté dans le milieu réactionnel, l'enzyme catalyse préférentiellement le transfert du glucose sur l'accepteur par formation de liaisons α -(1→2) glucosidiques au détriment de la réaction d'hydrolyse. Nous avons donc tout d'abord effectué l'analyse cinétique à l'état stationnaire des réactions d'hydrolyse et de transglucosylation.

La détermination des vitesses initiales d'hydrolyse du saccharose lorsque celui-ci est le seul substrat, nous a permis de montrer que la cinétique d'hydrolyse du saccharose suit un modèle de type michaelien dont les paramètres cinétiques k_{cat} et $K_{m_{SucH}}$ ont été respectivement évalués à 109 s^{-1} et $10,8 \pm 0,8 \text{ mM}$.

L'analyse de la réaction de transglucosylation a ensuite été réalisée par détermination des vitesses initiales de transfert de glucose obtenues pour des concentrations de dextrane et de saccharose variant de 31 à 617 mM et de 10 à 300 mM. Dans ces conditions les données enregistrées ont été modélisées par un modèle de type Ping Pong Bi Bi. Les paramètres cinétiques ont été calculés grâce à l'algorithme nls (régression non-linéaire) du logiciel de statistiques et de modélisation R et sont les suivants : $k_{cat} = 970 \text{ s}^{-1}$, $K_{m_{SacT}} = 42 \pm 2 \text{ mM}$ et $K_{m_{DexT}} = 75 \pm 3 \text{ mM}$. Ils révèlent que GBD-CD2 est fortement activée en présence de dextrane accepteur.

L'activité de transglucosylation étant régie par un mécanisme Ping Pong Bi Bi, nous avons supposé qu'en jouant sur le ratio molaire donneur d'unités glucosyle sur accepteur ($[\text{sucrose}]/[\text{dextrane}]$), nous pourrions moduler le taux de branchement en α -(1→2) des dextrans. Ainsi, en faisant varier ce ratio de 0,12 à 4,74 nous avons synthétisé des dextrans dont le taux de branchement en α -(1→2) varie de 13% à 40%, et ce pour des masses moléculaires initiales (M_w) de dextrans variant de 10 à 2 000 kDa. Le procédé proposé permet donc de synthétiser des dextrans dont la masse molaire et le taux de branchement sont contrôlés.

Synthesis of dextrans with controlled amounts of α -(1→2) linkages using the transglucosidase GBD-CD2

Yoann Brison, Emeline Fabre, Claire Moulis, Jean-Charles Portais, Pierre Monsan, Magali Remaud-Siméon

Summary

GBD-CD2 is an α -(1→2) transglucosidase engineered from DSR-E, a glucansucrase naturally produced by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. This enzyme catalyzes from sucrose, the α -(1→2) transglucosylation of glucosyl moieties onto α -(1→6) dextran chains. Steady-state kinetic studies showed that hydrolysis and transglucosylation reactions occurred at the early stage of the reaction in the presence of 70 kDa dextran as acceptor and sucrose. The transglucosylation reaction catalysed by GBD-CD2 follows a Ping-Pong Bi Bi mechanism with a high k_{cat} value of 970 s^{-1} . The amount of the synthesized α -(1→2) side-chains was found to be directly dependent on the initial molar concentration ratio [Sucrose]/[Dextran]. Dextrans with controlled α -(1→2) linkage contents ranging from 13 to 40% were synthesized. The procedure resulted in the production of dextrans with the highest content of α -(1→2) linkages ever reported.

I. Introduction

The demand for biodegradable polysaccharides and oligosaccharides produced by environmentally safe processes from renewable natural resources is currently increasing. The natural diversity and high complexity of these molecules due to the monomer composition, the type of osidic linkages and the degree of polymerization made them difficult to synthesize by chemistry (Seeberger PH 2008). Microbial or *in vitro* enzymatic synthesis is a

very promising alternative. However, tailoring polymer structures to meet the required specification for a targeted application in food, feed, cosmetics, chemical or medical fields is still a challenging task. Progress in recombinant enzyme over-expression and engineering offers new possibilities to improve the enzyme performances. For example, rational and combinatorial engineering are developing in an attempt to change glycoside-hydrolases into synthesizing enzymes (Shaikh and Withers 2008). Among glycoside-hydrolases, glucansucrases belonging to GH family 70 are quite remarkable as they naturally possess a high transferase activity (Monchois *et al.*, 1999). They synthesize homopolymers of glucose from sucrose and without any nucleotide activated sugars. In addition, these transglucosidases also produce oligosaccharides and glycoconjugates in the presence of acceptors (Böker *et al.*, 1994; Côté, 2009; Robyt and Walsteh, 1978; Demuth *et al.*, 2002; Hellmuth *et al.*, 2007; Koepsell *et al.*, 1953; Remaud-Simeon *et al.*, 2000). Depending on glucansucrase specificity, glucans and glucooligosaccharides of different sizes and types of linkages can be synthesized, thus giving access to a large variety of products (Remaud-Simeon *et al.*, 2000). When using the exocellular glucansucrase of *Ln. mesenteroides* NRRL B-742, it was demonstrated that the percentage of α -(1→3) branch points in dextran can be modulated by varying the reaction conditions (Côté *et al.*, 1983). Moreover, glucansucrase engineering has recently proved to be efficient for tailoring the size of glucans and modifying enzyme regiospecificity (Funane *et al.*, 2005; Hellmuth *et al.*, 2008; Kralj *et al.*, 2005; Moulis *et al.*, 2006a; Moulis *et al.*, 2006b).

As a member of GH family 70 enzymes, the dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 is original as it catalyses, from sucrose, the synthesis of a highly branched dextran, which is composed of an α -(1→6) linked glucosyl backbone with 35% of α -(1→2) side-linked glucosyl units (Seymour *et al.*, 1977, Coutinho and Henrissat, 1999; Remaud-Simeon *et al.*, 1994). In the presence of maltose as the acceptor, the enzyme produces a mixture of glucooligosaccharides (Dols *et al.*, 1999). However, only 50% (w/w) of the synthesized glucooligosaccharides (GOS) possess an α -(1→2) linked glucosyl unit, the others containing only α -(1→6) linkages. Due to the presence of the α -(1→2) linkage, rare in nature and highly resistant to digestive enzymes, such α -(1→2) GOS were shown to possess prebiotic properties, which are of interest for food and feed applications (Boucher *et al.*, 2003; Djouzi *et al.*, 1995; Sanz *et al.*, 2006). To better control the α -(1→2) content in glucans and oligosaccharides, the mode of synthesis of both the α -(1→2) and α -(1→6)

linkages was investigated. The gene encoding the enzyme responsible for the synthesis of the α -(1→2) branched dextran was cloned and sequenced (Bozonnet *et al.*, 2002). The protein product named DSR-E was characterized. Its ability to catalyse both α -(1→2) and α -(1→6) glucosidic bonds was found to be related to a structure, characterized by the presence of two catalytic domains (CD1 and CD2) linked by a glucan binding domain (GBD). Sequence analyses revealed that both domains belong to GH family 70 (Fabre *et al.*, 2005). The rational construction of several truncated forms of DSR-E (*i.e.* DSR-E- Δ (CD2) further showed that the catalytic domain CD1 was responsible for the synthesis of a dextran polymer containing 86% α -(1→6) linkages, 11% α -(1→3) linkages, 3% α -(1→4) linkages but no α -(1→2) linkages. On the other hand, the truncated form of the first catalytic domain, named GBD-CD2 (Δ (VZ-CD1)-DSR-E), did not act as a polymerase and was only able to catalyse hydrolysis reaction in the presence of sucrose alone. With sucrose as the donor and isomaltoligosaccharides as acceptors, the sucrose hydrolysis activity was drastically reduced and GBD-CD2 essentially catalysed transglucosylation reaction of glucosyl moieties by formation of α -(1→2) linkages. Consequently, the α -(1→2) transglucosylation activity of DSR-E was attributed to the additional catalytic domain CD2 (Fabre *et al.*, 2005). Like all the catalytic domains of GH-family 70 enzymes, CD2 was predicted to i) adopt a $(\beta/\alpha)_8$ barrel folding, ii) possess a catalytic triad composed of two aspartic acids and one glutamic acid iii) proceed via an α -retaining mechanism involving the formation of β -D-glucosyl enzyme intermediate.

The ability of GBD-CD2 to specifically synthesize the α -(1→2) glucosidic bond makes this engineered enzyme particularly attractive for the synthesis of α -(1→2) branched dextrans and the development of new prebiotic products. The objective of this study was to optimize the α -(1→2) transglucosylation reaction in order to control α -(1→2) branching of already existing dextran or oligodextran molecules. Steady-state kinetics of α -(1→2) transglucosylation reaction onto 70 kDa dextran were first performed and a kinetic model for this reaction was proposed. The data were exploited to provide a new enzymatic method for controlling the α -(1→2) branching of dextrans.

II. Results

II.A. Kinetic studies

In order to investigate the kinetic mechanism of α -(1→2) transglucosylation by steady-state kinetics, GBD-CD2 transglucosidase was incubated with sucrose at initial concentrations varying from 10 to 600 mM and 70 kDa-dextran as acceptor at initial concentrations ranging from 31 to 617 mM. During the early stages of the reaction (when less than 5% of sucrose was consumed), only two reaction products were identified by HPLC: i) fructose, which was released at the same rate as sucrose was consumed, ii) glucose, which was less and less produced as dextran concentration was increased.

Initial hydrolysis velocities (v_{iH}) were directly obtained by measuring glucose production rates and initial α -(1→2) transglucosylation velocities (v_{iT}) were calculated by subtracting sucrose hydrolysis rates to sucrose consumption rates.

v_{iT} and v_{iH} observed at fixed dextran concentrations were plotted versus sucrose concentrations (Figure 17) v_{iH} strongly decreases as initial dextran concentrations are increased. The variations of v_{iT} are contrary to those of v_{iH} , and v_{iT} reaches a maximal value of 235 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ of purified enzyme, at 617 mM of dextran and 300 mM of sucrose. In these conditions, v_{iT} exceeds 28-fold v_{iH} (8.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ of purified enzyme). Moreover, v_{iT} decreases for initial sucrose concentrations above 300 mM indicating an inhibition by sucrose. v_{iH} is not affected by high sucrose concentrations.

In addition, in the absence of dextran, initial velocities of sucrose hydrolysis fit a Michaelis-Menten model with a Km_H of 9.7 mM and a $Vmax_H$ of 34.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ of purified enzyme.

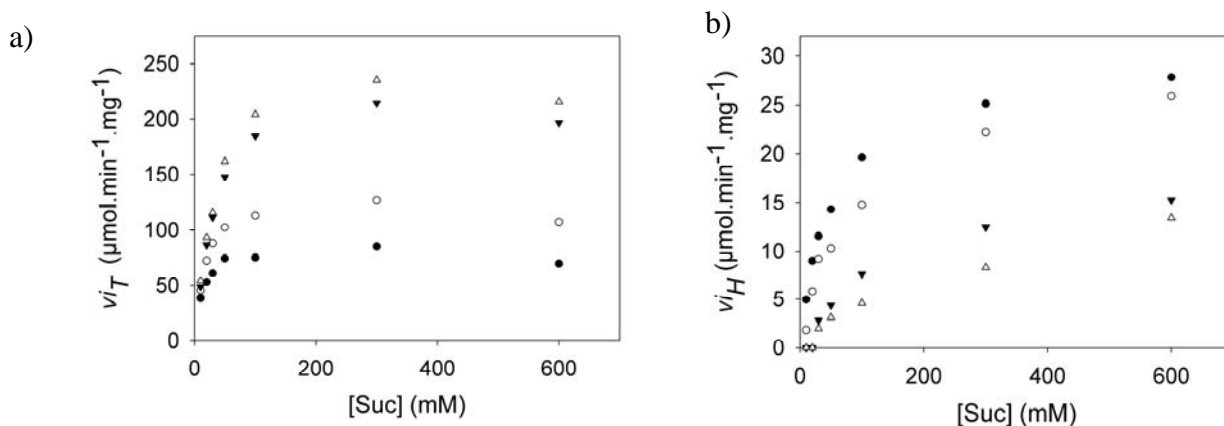


Figure 17 : Initial velocities for a) α -1,2 transglucosylation and for b) sucrose hydrolysis in the presence of sucrose (from 10 mM to 600 mM) and for several dextran concentrations: (●) 31 mM; (○) 62 mM; (▼) 309 mM and (Δ) 617 mM (dextran concentrations expressed as glucosyl unit equivalents)

II.B. Kinetic modelling of $\alpha(1\rightarrow2)$ transglucosylation

The double reciprocal plots $1/v_{iT}$ versus $1/[Suc]$ at fixed $[Dex]$ and $1/v_{iT}$ versus $1/[Dex]$ at fixed $[Suc]$ were first plotted (Figure 18). For sucrose concentrations ranging from 10 to 300 mM, these plots describe two sets of parallel straight lines, characteristic of a Ping Pong Bi Bi model (Segel 1993). However, v_{iT} decreases with the increase of sucrose concentrations above 300 mM, thus indicating an inhibition by sucrose (Figure 17). Using the King Altman procedure we derived kinetic equations from a variety of kinetic models taking into account both Ping Pong Bi Bi mechanism (Segel 1993) and the inhibition by sucrose for concentrations above 300 mM. However, none of them correctly fitted the data at such high sucrose concentrations. Thus, the modelling was restricted to sucrose concentration comprised between 10 and 300 mM. As shown in Figure 18c, which is typical of the King-Altman representation used for the Ping Pong Bi Bi model, fructose and $\alpha(1\rightarrow2)$ dextran (Dex_{n+1}) concentrations were considered low enough at the beginning of the reaction to neglect reverse reactions 2 and 4. The rate equation is shown in equation (1).

$$v_{iT} = \frac{V \max_T [Suc][Dex]}{K m_{SucT} [Dex] + K m_{DexT} [Suc] + [Suc][Dex]} \quad (1)$$

Where V_{max_T} is the maximal velocity, $K_{m_{SucT}}$ and $K_{m_{DexT}}$ are the Michaelis constants for sucrose and dextran respectively, $[Suc]$ and $[Dex]$ are the concentrations of sucrose and dextran, respectively.

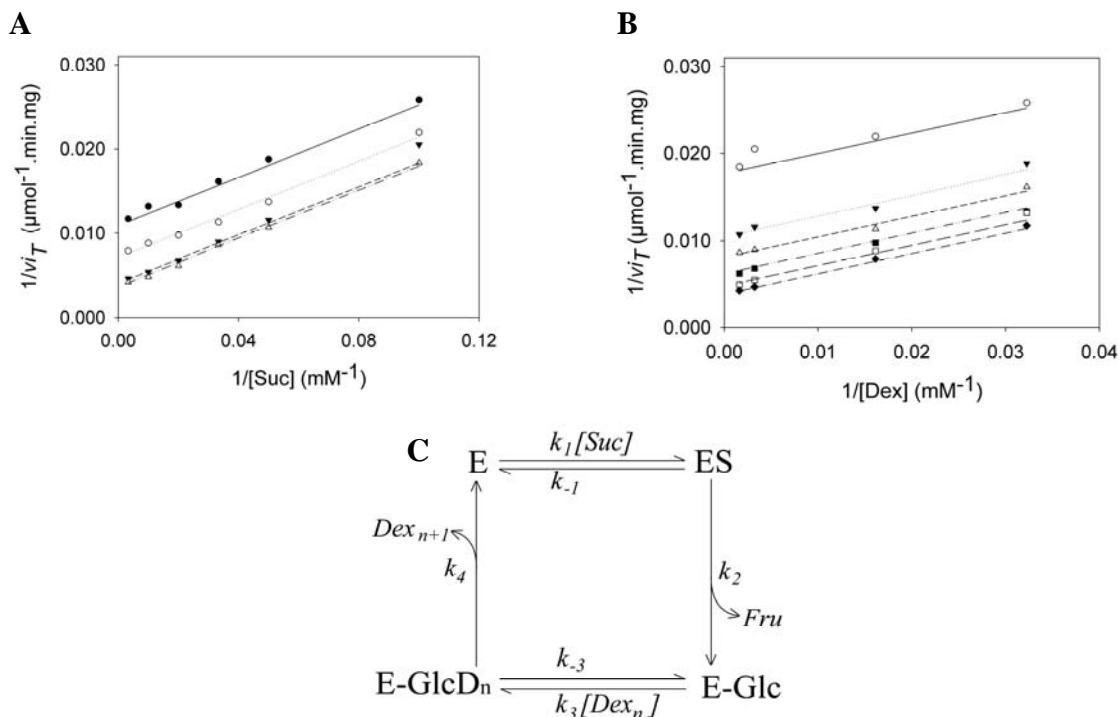


Figure 18: Double reciprocal plots obtained for the α -1,2 transglucosylation considered a) for sucrose concentrations ranging from 10 to 300 mM and dextran concentrations of (●) 31 mM; (○) 62 mM; (▼) 309 mM and (Δ) 617 mM b) for dextran concentrations equal to 31, 62, 309 and 617 mM and sucrose concentrations (○) 10 mM; (▼) 20 mM; (Δ) 30 mM; (■) 50 mM, (□) 100 mM and (◆) 300 mM. Straight lines correspond to the Ping Pong Bi Bi model c) King-Altman diagram for the α -1,2 transglucosylation catalysed by GBD-CD2

All the kinetic constants are defined according to the Cleland nomenclature. The values of V_{max_T} , $K_{m_{SucT}}$, and $K_{m_{DexT}}$ were first roughly evaluated from double-reciprocal plots. The value refinements and standard error calculations were performed with nl2sol algorithm of R software (Table 1). As observed in Figure 18a and b, the model fitted well with the experimental data. The computed values of V_{max_T} , $K_{m_{SucT}}$ and $K_{m_{DexT}}$ are $303 \pm 5 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ of purified enzyme ($k_{cat} 970 \text{ s}^{-1}$), $42 \pm 2 \text{ mM}$ and $75 \pm 3 \text{ mM}$ (of anhydroglucosyl units within the dextran) respectively. When expressed in mM of 70 kDa dextran, $K_{m_{DexT}}$ value is $0.174 \pm 0.008 \text{ mM}$ (Table 5).

Table 5: Kinetic parameters computed for the α -(1→2) transglucosylation of dextran catalysed by GBD-CD2

Kinetic parameter	Rate constant	
V_{max_T} ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ of purified enzyme)	$k_2k_4/(k_2 + k_4)$	303 ± 5
Km_{SucT} (mM)	$k_4(k_{.1} + k_2)/k_1(k_2 + k_4)$	42 ± 2
Km_{DexT} (mM of anhydroglucosyl unit equivalents)	$k_2(k_{.3} + k_4)/k_3(k_2 + k_4)$	75 ± 3
Km_{DexT} (mM)	$k_2(k_{.3} + k_4)/k_3(k_2 + k_4)$	0.174 ± 0.008

II.C. Control of the α -(1→2) branching degree

As the α -(1→2) transglucosylation proceeds via a Ping Pong Bi Bi mechanism, we reasoned that varying the initial molar [Suc]/[Dex] ratio should enable the percentage of α -(1→2) branching in dextran to be controlled. Thus, we carried out acceptor reactions using a fixed sucrose concentration (292 mM) and various concentrations of 70 kDa dextran as acceptor. After sucrose depletion, percentages of glucosyl residues incorporated in α -(1→2) dextrans and by-products were determined. As shown in Figure 19, all the glucosyl residues are transferred onto dextrans at low initial molar ratios (*i.e.* 0.12 and 0.24). At higher initial molar [Suc]/[Dex] ratios, the formation of α -(1→2) linkage decreased, a higher part of the glucosyl residues being transferred onto fructose to produce leucrose (α -D-Glcp-(1→5)-D-Frup) or released in the medium producing glucose (hydrolysis). Leucrose production increases at the end of the reaction due to the high concentration of fructose in the medium.

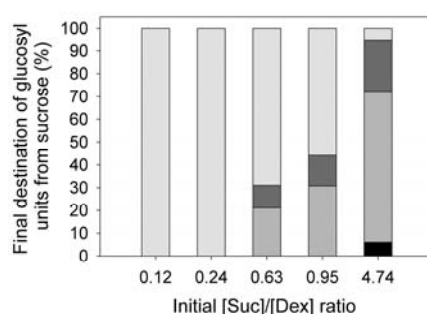


Figure 19: Main destination of the glucosyl units from sucrose, at the end of the dextran α -1,2 branching reaction obtained for different initial [Suc]/[Dex] ratios (0.12, 0.24, 0.63, 0.95, 4.74; glucosyl unit equivalents) (HPLC analysis). Black, glucosyl units in residual sucrose; Grey, glucose (from sucrose hydrolysis); Dark grey, glucosyl units transferred onto fructose (leucrose); Light grey, glucosyl units transferred by α -1,2 transglucosylation onto α -1,6 dextran

The amount of α -(1→2)-linked D-Glcp in the acceptor reaction product was determined by both ^{13}C and ^1H NMR. As seen in Figure 20c and d, spectrum of the acceptor reaction products in the presence of dextran displays two additional peaks named B and C, located at 96.2 and 97.0 ppm respectively. As previously reported (Dols *et al.*, 1998; Fabre *et al.*, 2005; Maina *et al.*, 2008; Seymour *et al.*, 1980), peak B is assigned to the C1 of the 1→2,6- α -D-Glcp-1→6 units in linear chain (Figure 20c, d and e), and peak C to the C1 of α -D-Glcp1→2 units (named C on Figure 20c, d and e). The intensity of peaks B and C are equivalent, thus indicating that the side-chains are composed of only one glucosyl unit. The peaks of the corresponding protons were also detected at 5.49 and 5.55 ppm, respectively, in ^1H -NMR spectra (Figure 20d).

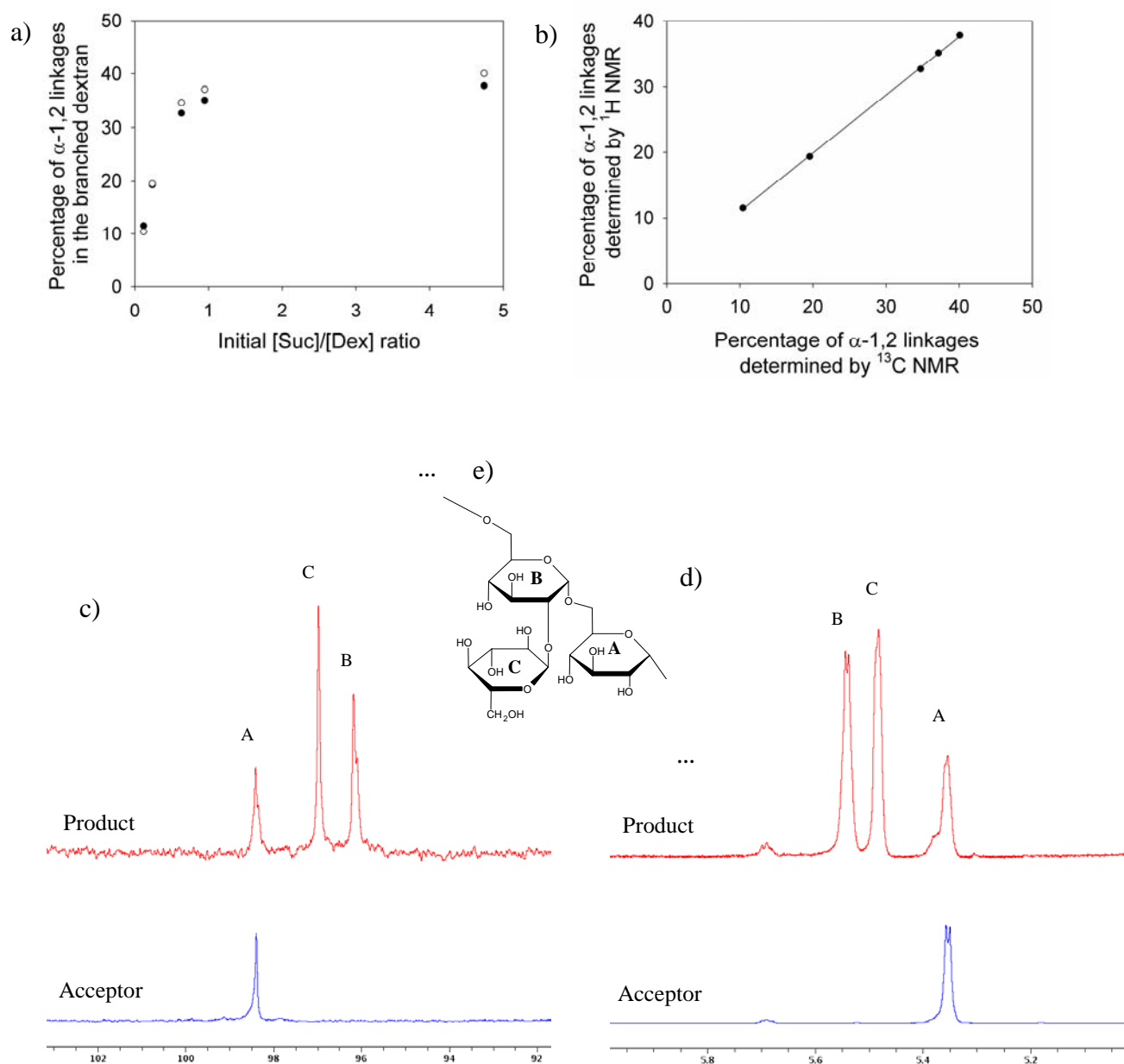


Figure 20: NMR analysis of the purified α -1,2 dextrans obtained in the presence of different initial [Suc]/[Dex] ratios (0.12, 0.24, 0.63, 0.95, 4.74; in glucosyl unit equivalents)

a) Percentage of α -1,2 linkages in function of the initial molar [Suc]/[Dex] ratio, black dots ^1H NMR, circles ^{13}C NMR

b) Correlation between the percentages of α -1,2 linkages determined by ^{13}C NMR and ^1H NMR

c) ^{13}C NMR spectra of the anomeric regions of the α -1,2 branched dextran for initial [Suc]/[Dex] = 4.74, and of the corresponding 70 kDa dextran acceptor

d) ^1H NMR spectra of the anomeric regions of the α -1,2 branched dextran for the initial [Suc]/[Dex] = 4.74 and of the corresponding 70 kDa dextran acceptor

e) Schematic structure of a branched zone of the α -1,2 dextran

The α -(1 \rightarrow 2) linkage degree was then determined from the intensities of the anomeric carbons in the ^{13}C -NMR and also from that of the anomeric protons of ^1H spectra (Table 6). The two methods gave very similar results, although ^1H -NMR measurements resulted in slightly lower values of α -(1 \rightarrow 2) linkages (Table 6). The highest value of α -(1 \rightarrow 2) linkages (40%) was observed for branched dextrans produced at initial molar [Suc]/[Dex] ratio of 4.74. This value is only 3% higher than that calculated for dextrans synthesized with an initial molar [Suc]/[Dex] ratio of 0.95. It indicates that 40% of branching linkages is likely to be the maximal value that can be reached with GBD-CD2. This is the highest percentage of α -(1 \rightarrow 2) linkages in dextrans that has been reported so far. The best compromise between a high percentage of α -(1 \rightarrow 2) linkages and a low co-product yield is obtained for initial molar [Suc]/[Dex] ratio of 0.63. Using this ratio, 69% of the glucosyl moieties of sucrose are transferred onto dextran leading to an α -(1 \rightarrow 2) linkage degree of 35% (Table 6). To determine whether the molecular weight of the α -(1 \rightarrow 6) dextran as acceptor could affect the α -(1 \rightarrow 2) linkage content, acceptor reaction in the presence of 10, 40 or 2,000 kDa dextrans was performed at an initial molar [Suc]/[Dex] ratio of 0.95. All the products showed similar α -(1 \rightarrow 2) linkage content comprised between 37 and 39% (^{13}C NMR; see Table 6), which correlates with the transglucosylation rates calculated from HPLC analysis (data not shown).

Table 6: Percentages of α -1,2 linkages determined by ^1H NMR and ^{13}C NMR for α -1,2 branched dextrans synthesized in the presence of 292 mM of sucrose and dextran of different molecular weights at concentrations ranging from 62 to 2,470 mM (dextran concentrations expressed as glucosyl unit equivalents).

Dextran molecular weight (kDa)	Polymerization degree (number of glucosyl units)	Initial molar [Suc]/[Dex]ratio	% of α -1,2 linkage (^1H NMR)	% of α -1,2 linkage (^{13}C NMR)
10	62	0.95	38	38
40	250	0.95	37	39
70	437	4.74	38	40
70	437	0.95	35	37
70	437	0.63	33	35
70	437	0.24	19	20
70	437	0.12	12	10
2,000	12,500	0.95	36	37

III. Discussion

We showed that GBD-CD2 catalysed both sucrose hydrolysis and α -(1→2) transglucosylation onto dextran at the early stage of the reaction when incubated with sucrose and dextran as acceptor. Considering that GBD-CD2 follows an α -retaining mechanism like the other glucansucrases from GH families 70 and 13, and that the reaction proceeds through the formation of a glucosyl-enzyme covalent complex (Jensen *et al.*, 2004; Mooser *et al.*, 1991), this result indicates that the glucosyl moiety is transferred onto dextran through the formation of an α -(1→2) linkage or released in the reaction medium (hydrolysis). The α -(1→2) transglucosidase activity was well modelled by a Ping Pong Bi Bi mechanism for sucrose concentrations ranging from 10 to 300 mM. At higher sucrose concentrations, initial velocities decreased. When terms introduced to allow for a possible inhibition by sucrose, the model did not fit well the experimental data. This may indicate that above 300 mM, mass transfer limitations may appear and may also be responsible for the velocity decrease. Notably, the transglucosylation reaction velocity is much higher than hydrolysis velocity. The k_{cat} of transglucosylation is one of the highest catalytic constants (970 s^{-1}) reported for glucansucrases. For comparison, Kitaoka *et al.* reported a k_{cat} of 641 s^{-1} for polymerization reaction catalysed by *Ln. mesenteroides* B-512FMC's enzymatic activity, and a k_{cat} of 1070 s^{-1} for the transfer of D-glucose from sucrose to maltose (Kitaoka *et al.*, 1999). For ASR C-del, a truncated variant of the alternansucrase from *Ln. mesenteroides* NRRL 1355, and for DSR-S vardel Δ 4N, a truncated variant from *Ln. mesenteroides*. NRRL B-512F, the respective k_{cat} values are 404 s^{-1} (Joucla *et al.*, 2006) and 584 s^{-1} (Moulis *et al.*, 2006a). In addition, the comparison for GBD-CD2 between Km_T values for sucrose ($42 \pm 2 \text{ mM}$) and 70 KDa dextran ($0.174 \pm 0.008 \text{ mM}$) indicates a much higher affinity for dextran which might accelerate the deglycosylation of the glucosyl-enzyme intermediate.

Our results also demonstrate that the degree of α -(1→2) linkages can be controlled by choosing the initial molar [Suc]/[Dex] ratio used for the acceptor reaction. This is fully in agreement with a Ping-Pong Bi-Bi mechanism. By varying this ratio from 0.92 to 4.74, dextrans with degree of α -(1→2)-branching ranging from 10% to 40% were obtained. However, it was not possible to reach a percentage of α -(1→2) linkages higher than 40%. The conformation change of α -(1→2) dextrans compared to that of the initial dextran may

probably induce affinity changes towards the enzyme active site which may impact the rate and velocity during reaction in a different way, depending on the initial molar [Suc]/[Dex] ratio. This value corresponds to the highest degree of α -(1→2) linkages reported so far for dextrans, more than one third of the α -D-Glcp units being 1→2,6- α -D-Glcp-1→6 units. To attain this value, dextran concentration had to be reduced. In these conditions, dextran molecules did not efficiently compete with water and acceptor molecules like fructose. One solution that can be envisaged to further improve transglucosylation onto dextran would consist in reducing the competing reactions (hydrolysis and transglucosylation onto fructose) by enzyme engineering. The 3D-structure of GBD-CD2 would help in understanding the mode of α -(1→2) linkage formation at the molecular level and guiding enzyme design.

Classically, the branching degree is determined from ^{13}C -NMR analyses, for which the high spectral resolution provides an advantage to separate the signals of all anomeric carbons (Dols *et al.*, 1998; Fabre *et al.*, 2005; Seymour *et al.*, 1980). Here, we have shown that the ^1H -NMR signals from anomeric protons of the pure α -(1→2) branched dextrans were well separated with much higher signal/noise ratios than those obtained with ^{13}C signals. ^1H -NMR proved to be accurate within a 2-3% error margin (Figure 20). This is important in view of screening new α -(1→2) synthesizing activities, since only a couple of minutes are needed to record ^1H -NMR spectra, whereas 26 hours are necessary to obtain ^{13}C -NMR spectra with signal-to-noise ratios compatible with quantification.

Finally, the molecular weight of the dextran used as acceptor has no effect on the amount of α -(1→2) linkages formed. The α -(1→2) transglucosidase activity of GBD-CD2 is thus independent of the dextran polymerization degree (DP), at least for dextrans with DP ranging from 62 to 12,346 glucosyl units.

Taken together, these results demonstrate that both the content in α -(1→2) linkage and the molecular mass of branched dextrans produced by GBD-CD2 can be controlled by varying the initial molar [Suc]/[Dex] ratio. This represents important progress for tailor-made α -(1→2) branched dextran production. A much larger panel of products can now be synthesized with this enzyme, thus opening the way to novel applications.

IV. Materials and methods

IV.A. Cloning and production of the transglucosidase GBD-CD2

gbd-cd2 gene used for the present study corresponds to a truncated form (gene deleted from 1 to 3994 bp) of *dsr-E* (accession no. AJ430204) from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 (National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, Ill.). *gbd-cd2* gene was cloned into pBAD/Thio TOPO[®], TA Cloning[®] vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in fusion with the sequence encoding a V5 epitope-6xHistidine tag at the 3' terminal end and an HP-Thioredoxin tag at the 5' terminal extremity. As previously reported (Fabre et al. 2005), a gain in expression and activity was obtained after the deletion of the HP-Thioredoxin tag. Thus, the sequence coding for the HP-Thioredoxin tag was removed using the restriction enzyme NcoI. The linear vector was purified by electrophoresis in an 0.8% agarose gel, extracted from the gel using the QIAquick[®] GelExtraction Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), and then self-ligated using T4 DNA ligase (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). The gene is downstream a P_{BAD} promoter inducible by *L*-arabinose. The gene cloned in the plasmid pBAD-*gbd-cd2* was expressed in *E. coli* TOP10 cells. The cells were grown at 30 °C in Luria Bertani medium with ampicillin at a final concentration of 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ to an absorbance at 600 nm ($A_{600\text{nm}}$) of 0.5. Then, the inducer *L*-arabinose was added to a final concentration of 0.002% (wt/v). The cells were grown for 9 additional hours and harvested by centrifugation. The pellets were resuspended to a final $A_{600\text{nm}}$ of 20, in 20 mM sodium acetate buffer pH 5.4, supplemented with guanidine-HCl 6M. The denaturing agent was used to solubilize inclusion bodies after cell disruption by sonication. The full cell extract was dialysed overnight to ensure enzyme renaturation, using 6 kDa-cut-off cellulose dialysis tubing (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) at 4°C in 20 mM sodium acetate buffer pH 5.4. This dialysed extract was then centrifuged at 20,000g, 4°C, for 20 min in order to eliminate cell debris. The supernatant was used as a source of enzyme for purification.

IV.B. Purification of GBD-CD2

The GBD-CD2-6xHis fusion protein was purified by affinity chromatography on Ni-NTA Superflow resin (Qiagen) at 4°C. Phosphate-Buffered Saline (PBS) buffer (Na₂HPO₄·12H₂O 20 mM, KH₂PO₄ 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7.3) was used with various concentrations of imidazole. For 1 volume of resin, binding was performed for 2 h with 4 volumes of enzyme extract supplemented with imidazole at 20 mM (pH adjusted to 7.5). The resin was washed with 3 volumes of PBS buffer containing 20 mM of imidazole. The GBD-CD2-6xHis proteins were eluted by increasing the imidazole concentration in the elution buffer from 50, 100, 150, 200 to 250 mM. One volume was used for each step of elution. GBD-CD2 enzyme was eluted with both 100 and 150 mM imidazole buffers, collected and dialysed using 6 kDa-cut-off cellulose dialysis tubing (Sigma-Aldrich) overnight at 4°C in 20 mM sodium acetate buffer pH 5.4. The purification to homogeneity was controlled by SDS-PAGE (NuPAGE[®] 3-8% Tris-Acetate gel 1.5mm; Invitrogen) and Western blotted using anti-6xHis (C-terminal) antibody (Invitrogen). The optimal temperature and pH of GBD-CD2 activity were 40°C and 5.4 respectively (data not shown). The half-life times were measured at 22°C, 30°C and 40°C and reached 50 h, 10 h and 15 min, respectively (data not shown). Due to the weak stability at 40°C, initial velocities were all assayed at 30°C and pH 5.4. The specific activity of the purified enzyme preparation was of 61 U/mg of proteins under the standard conditions for enzymatic activity assay (see next paragraph). The protein assays were carried out using micro-Bradford protocol with bovine serum albumin as standard.

IV.C. Enzymatic activity assay

One enzymatic unit is defined as the amount of enzyme that catalyses the cleavage of 1 μ mole of sucrose per minute at 30°C in 20 mM sodium acetate buffer, pH 5.4, with sucrose and calcium chloride at the final concentrations of 292 mM and 3.4 mM respectively. In the presence of sucrose as sole substrate, GBD-CD2 displays only the sucrose hydrolytic activity, producing glucose and fructose (Fabre et al. 2005). Sucrose

consumption rate was thus determined by monitoring the release of reducing sugars from sucrose using the dinitrosalicylic acid method (Sumner et al. 1935).

IV.D. Data acquisition for steady-state kinetics

The GBD-CD2 mechanism was investigated by steady-state kinetics. All the initial velocities were measured at 30°C, in 20 mM sodium acetate buffer pH 5.4 supplemented with calcium chloride 3.4 mM. They were determined from experiments in which initial sucrose concentrations ([Suc]) in the reaction medium ranged from 10 and 600 mM and the initial concentrations of dextran ([Dex]) from *Ln. mesenteroides* NRRL B-512F (M_w 70 kDa; molecular weight ranges from 65 to 85 kDa; Sigma-Aldrich) ranged between 31 and 617 mM. For the sake of clarity, dextran concentrations will be expressed as molar concentrations of anhydroglucosyl units within the dextran, by dividing dextran mass concentrations by 162 g.mol⁻¹. The reactions were initiated by enzyme addition at a final concentration of 0.25 U/mL. At regular time intervals, samples were withdrawn and immediately heated at 95°C for 5 min to stop the reaction. The concentrations of released glucose and fructose were determined by HPLC, on a Dionex system equipped with an Aminex HPX-87C Carbohydrate column (300 x 7.7 mm; Bio-rad, Hercules, CA, USA), using ultrapure water as eluent at 0.6 mL.min⁻¹. The temperature of the column oven was set at 80°C. The initial velocities of sucrose hydrolysis were directly calculated from glucose production rates. The initial velocities of glucosyl transfer onto dextran were calculated from the difference between fructose and glucose production rates. Glucose production rates reflect hydrolysis activity whereas fructose production rates reflect α -(1→2) transglucosidase activity plus hydrolysis activity. Kinetic parameter determination and data fitting were performed with the statistical software R (R Development Core Team 2005).

IV.E. α -(1→2) branching of dextrans, and purification

Various amounts of α -(1→6) dextrans, from *Ln. mesenteroides* NRRL B-512F, at concentrations of 62, 309, 463, 1235, 2470 mM (M_w 70 kDa; molecular weight ranges from 65 to 85 kDa; Sigma-Aldrich) were incubated for 12 h with sucrose (292 mM) and GBD-

CD2 (1 U/mL) for dextran branching, at 30°C in sodium acetate buffer 20 mM (pH 5.4) supplemented with calcium chloride 3.4 mM.

Dextrans 10, 40 and 2,000 kDa (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) were all used at 300 mM concentration as previously described for dextran 70 kDa. Sucrose depletion and glucose/ fructose production were measured by HPLC as previously described (see previous section). Then, excepted for the reactions using dextran 10 kDa as acceptor, ethanol was added to the reaction media to a final concentration of 50% (v/v). Regarding the reactions containing dextran 10 kDa as initial acceptor, dextran precipitation was carried out using a final ethanol concentration of 70% (v/v). After precipitation, dextrans were recovered by centrifugation. Pellets were washed with one volume of ultrapure water, equivalent to the initial volume of reaction media, and precipitated again with an additional volume of ethanol. This procedure was repeated five times before freeze-drying.

IV.F. NMR analysis of polymers

Freeze-dried dextrans were solubilised at the concentration of 0.5 g/L in D₂O. All NMR spectra were recorded on an Avance 500 MHz spectrometer (Bruker) using a 5mm z-gradient TBI probe. The data were acquired and processed using XWINNMR 3.5 software. The temperature was 343K. Quantitative ¹³C-NMR spectra were recorded as previously described (Dols et al. 1998; Fabre et al. 2005) using an inverse gated sequence taken from the Bruker pulse sequence library, and using a 90° pulse, 25,000 Hz sweep width, 2.5 s relaxation delay and 0.63 s acquisition time. A total of 30,000 scans were recorded. Proton spectra were acquired by using a 30° pulse, 12,500 Hz sweep width, 2.5 s relaxation delay and 2.0 s acquisition time. A total of 4 or 16 scans were recorded.

Signal assignments were made from Seymour and Maina (Maina et al. 2008; Seymour et al. 1979; Seymour et al. 1980) and from the comparison of spectra of products and acceptor of the branching reaction. The anomeric region of the spectrum from reaction products contained three main resonances named A, B, and C and corresponding respectively, to:

A, anomeric resonance from free carbon 2, α -(1→6) linked D-Glcp residues of the main linear chain,

B, anomeric resonance from α -(1→6) linked D-Glcp residues of the main linear chain, with the carbon 2 involved in an α -(1→2) linkage with a branched glucosyl unit,

C, anomeric resonance from α -(1→2) linked D-Glcp (i.e. branching points) (Fig 3c, 3d and 3e).

A, B and C could be alternatively the ^{13}C or ^1H resonances. The percentage of α -(1→2) branching of the different dextrans, equivalent to the percentage of α -(1→2) linked D-Glcp residues, was calculated from the relative intensities of the corresponding anomeric carbon or proton signals by integration of peak areas, as follows:

$$\% \text{ of } \alpha\text{-1,2 branching} = \frac{100 \times (I_B + I_C) / 2}{I_A + I_B + I_C}$$

(I_B , I_C and I_A : intensities of anomeric resonances) In the calculations made from ^1H spectra, resonances B and C could be interchanged without affecting the discussion.

V. Acknowledgements

Part of this work was carried out at MetaSys - the Metabolomics & Fluxomics Center at the Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP, Toulouse, France) - which is supported by the Région Midi-Pyrénées (France) and the European Regional Development Fund (ERDF). We also gratefully acknowledge Pr. Philippe Besse, Sandrine Laguerre, Gabrielle Potocki-Véronèse and Pierre Escalier for their assistance. Yoann Brison is supported by a grant from the Région Midi-Pyrénées, France.

References

B

Böker, M., Jördening, H.J., Buchholz, K., 1994. Kinetics of leucrose formation from sucrose by dextransucrase. *Biotechnol and Bioeng* 43, 856-864.

Boucher, J., Daviaud, D., Simeon-Remaud, M., Carpene, C., Saulnier-Blache, J.S., Monsan, P., Valet, P., 2003. Effect of non-digestible gluco-oligosaccharides on glucose sensitivity in high fat diet fed mice. *J Physiol Biochem* 59, 169-173.

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.

C

Côté, G.L., Robyt, J.F., 1983. The formation of α -D-(1→3) branch linkages by an exocellular glucansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-742. *Carbohydr Res* 119, 141-156.

Côté, G.L., 2009. Acceptor products of alternansucrase with gentiobiose. Production of novel oligosaccharides for food and feed and elimination of bitterness. *Carbohydr Res* 344, 187-190.

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

D

Demuth, K., Jördening, H.J., Buchholz, K. 2002. Oligosaccharide synthesis by dextransucrase: new unconventional acceptors. *Carbohydr Res* 337, 1811-1820.

Djouzi, Z., Andrieux, C., Pelenc, V., Somarriba, S., Popot, F., Paul, F., Monsan, P., Szylit, O., 1995. Degradation and fermentation of alpha-gluco-oligosaccharides by bacterial strains from human colon: *in vitro* and *in vivo* studies in gnotobiotic rats. *J Appl Microbiol* 79, 117-127.

Dols, M., Remaud-Simeon, M., Willemot, R.M., Demuth, B., Jördening, H.J., Buchholz, K., Monsan, P., 1999. Kinetic modeling of oligosaccharide synthesis catalyzed by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 dextransucrase. *Biotechnol Bioeng* 63, 308-315.

Dols, M., Remaud-Simeon, M., Willemot, R.M., Vignon, M., Monsan, P., 1998. Characterization of the Different Dextransucrase Activities Excreted in Glucose, Fructose, or Sucrose Medium by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. *Appl Environ Microbiol* 64, 1298-1302.

F

Fabre, E., Bozonnet, S., Arcache, A., Willemot, R.M., Vignon, M., Monsan, P., Remaud-Simeon M., 2005. Role of the two catalytic domains of DSR-E dextransucrase and their involvement in the formation of highly alpha-(1→2) branched dextran. *J Bacteriol* 187, 296-303.

Funane, K., Ishii, T., Ono, H., Kobayashi, M., 2005. Changes in linkage pattern of glucan products induced by substitution of Lys residues in the dextransucrase. *FEBS Lett* 579, 4739-4745.

H

Hellmuth, H., Hillringhaus, L., Hobbel, S., Kralj, S., Dijkhuizen, L., Seibel, J., 2007. Highly efficient chemoenzymatic synthesis of novel branched thiooligosaccharides by substrate direction with glucansucrases. *Chembiochem* 8, 273-276.

Hellmuth, H., Wittrock, S., Kralj, S., Dijkhuizen, L., Hofer, B., Seibel, J., 2008. Engineering the Glucansucrase GTFR Enzyme Reaction and Glycosidic Bond Specificity: Toward Tailor-Made Polymer and Oligosaccharide Products. *Biochemistry* 47, 6678-6684.

J

Jensen, M.H., Mirza, O., Albenne, C., Remaud-Simeon, M., Monsan, P., Gajhede, M., Skov, L.K., 2004. Crystal structure of the covalent intermediate of amylsucrase from *Neisseria polysaccharea*. *Biochemistry* 43, 3104-3110.

Joucla, G., Pizzut, S., Monsan, P., Remaud-Simeon, M., 2006. Construction of a fully active truncated alternansucrase partially deleted of its carboxy-terminal domain. *FEBS Lett* 580, 763-768.

K

Kitaoka, M., Robyt, J.F., 1999. Mechanism of the action of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC dextranucrase: kinetics of the transfer of D-glucose to maltose and the effects of enzyme and substrate concentrations. *Carbohydr Res* 320, 183-191.

Koepsell, H.J., Tsuchiya, H.M., Hellman, N.N., Kazenko, A., Hoffman, C.A., Sharpe, E.S., Jackson, R.W., 1953. Enzymatic synthesis of dextran; acceptor specificity and chain initiation. *J Biol Chem* 200:793-801.

Kralj, S., van Geel-Schutten, I.G., Faber, E.J., van der Maarel, M.J., Dijkhuizen, L., 2005. Rational transformation of *Lactobacillus reuteri* 121 reuteransucrase into a dextranucrase. *Biochemistry* 44, 9206-9216.

M

Maina, N.H., Tenkanen, M., Maaheimo, H., Juvonen, R., Virkki, L., 2008. NMR spectroscopic analysis of exopolysaccharides produced by *Leuconostoc citreum* and *Weissella confusa*. *Carbohydr Res* 343, 1446-1455.

Monchois, V., Willemot, R.M., Monsan, P., 1999. Glucansucrases: mechanism of action and structure-function relationships. *FEMS Microbiol Rev* 23, 131-151.

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 sobrinus* alpha-glucosyltransferases. *J Biol Chem* 266, 8916-8922.

Moulis, C., Arcache, A., Escalier, P.C., Rinaudo, M., Monsan, P., Remaud-Simeon, M., Potocki-Veronese, G., 2006a. High-level production and purification of a fully active recombinant dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *FEMS Microbiol Lett* 261, 203-210.

Moulis, C., Joucla G., Harrison, D., Fabre, E., Potocki-Véronèse, G., Monsan, P., Remaud-Simeon, M., 2006b. Understanding the polymerization mechanism of glycoside-hydrolase family 70 glucansucrases. *J Biol Chem* 281, 31254-31267.

R

R Development Core Team, 2005. R: A language and environment for statistical computing, reference index version 2.4.0. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.

Remaud-Simeon, M., Willemot, R.M., Sarçabal, P., Potocki de Montalk, G., Monsan, P., 2000. Glucansucrases: molecular engineering and oligosaccharide synthesis. *J Mol Catal B: Enzymatic* 10, 117-128.

Remaud-Simeon, M., Lopez-Munguia, A., Pelenc, V., Paul, V., Monsan, P., 1994. Production and use of glucosyltransferases from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 for the synthesis of oligosaccharides containing α -(1→2) linkages. *Appl Biochem Biotechnol* 44, 101-117.

Robyt, J.F., Walseth, T.F., 1978. The mechanism of acceptor reactions of *Leuconostoc mesenteroides* B-512F dextranucrase. *Carbohydr Res* 61, 433-435.

S

Sanz, M.L., Côté, G.L., Gibson, G.R., Rastall, R.A., 2006. Influence of glycosidic linkages and molecular weight on the fermentation of maltose-based oligosaccharides by human gut bacteria. *J Agric Food Chem* 54, 9779-9784.

Seeberger, P.H., 2008. Automated carbohydrate synthesis as platform to address fundamental aspects of glycobiology--current status and future challenges. *Carbohydr Res* 343, 1889-1896.

Segel, I.H., 1993. *Enzyme Kinetics - Behaviour and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*. Wiley, Hoboken.

Seymour, F.R., Slodki, M.R., Plattner, R.D., Jeanes, A., 1977. Six unusual dextrans: methylation structural analysis by combined G.L.C.-M.S. of per-*O*-acetyl-aldonitriles. *Carbohydr Res* 53, 153-166.

Seymour, F.R., Knapp, R.D., Bishop, S.H., 1979. Correlation of the structure of dextrans to their ¹H-NMR spectra. *Carbohydr Res* 74, 77-92.

Seymour, F.R., Knapp, R.D., 1980. Structural analysis of α -D-glucans by ¹³C-NMR, spin-lattice relaxation studies. *Carbohydr Res* 81, 67-103.

Shaikh, F.A., Withers, S.G., 2008. Teaching old enzymes new tricks: engineering and evolution of glycosidases and glycosyl transferases for improved glycoside synthesis. *Biochem Cell Biol* 86, 169-177.

Sumner, J., Howells, S., 1935. A method for determination of invertase activity. *J. Biol. Chem.* 108, 51-54.

**Chapitre III : Mode d' α -(1→2) glucosylation des dextrans et des
gluco-oligosaccharides par GBD-CD2**

La caractérisation cinétique de GBD-CD2 nous a montré que la réaction de transglucosylation suit un mécanisme Ping Pong Bi Bi. Par ailleurs, l'enzyme reconnaît très bien les accepteurs de type dextrane et oligosaccharides et les glucosyle efficacement en introduisant des liaisons α -(1→2). Si la régiospécificité de l'enzyme est attestée, la structure des produits obtenus et particulièrement l'organisation et le positionnement de la (ou des) liaison(s) α -(1→2) le long des chaînes n'ont jamais été étudié en détail. Ces données sont essentielles pour l'étude des relations structure-activité de la protéine, c'est pourquoi nous avons consacré ce chapitre à la caractérisation structurale des produits de la réaction d'accepteur catalysée par GBD-CD2.

Dans la première partie de l'étude, deux molécules acceptrices ont été sélectionnées, il s'agit de deux gluco-oligosaccharides (GOS) de degré de polymérisation 4 et 5 (composés **1** et **4** ([6)- α -D-Glcp-(1→)_n- α -D-Glcp-(1→4)-D-Glcp, avec n = 2 ou 3). Les produits de glucosylation formés au cours du temps ont été isolés et caractérisés en combinant différentes techniques d'analyse (LC/MS, RMN et dégradation enzymatique). Les résultats obtenus indiquent que différents produits résultant d'une mono-glucosylation sont initialement formés, puis réutilisés comme accepteur pour subir des glucosylations successives. Après 24h, on note la présence de GOS pour lesquels toutes les unités liées en α -(1→6) sont branchées par une unité glucosyle en α -(1→2). C'est la première fois que de telles structures sont décrites dans la littérature. Elles montrent que GBD-CD2 est capable de brancher les résidus glucosyles adjacents liés en α -(1→6) et surtout que l'enzyme peut utiliser comme accepteur des oligosaccharides déjà porteurs de liaisons α -(1→2).

La seconde partie de cette étude a été focalisée sur la caractérisation des dextrans glucosylés par GBD-CD2. Des dextrans de tailles variables ont dans un premier temps été traités par GBD-CD2 pour introduire des taux différents de liaisons α -(1→2) puis soumis à des dégradations enzymatiques par une amyloglucosidase et une endodextranase. Les profils d'hydrolyse obtenus ont ensuite été analysés afin d'étudier l'arrangement des unités glucosyle liées en α -(1→2) le long des chaînes de dextrane.

Structural characterization of gluco-oligosaccharides and dextrans produced by the α -(1→2) branching enzyme GBD-CD2

Yoann Brison, François Lefoulon, Sandrine Morel, Nelly Monties, Gabrielle Potocki-Véronèse, Pierre Monsan & Magali Remaud-Siméon

I. Summary

The transglucosidase GBD-CD2 is an engineered enzyme which belongs to the glycoside hydrolase family 70 (GH70). It catalyzes the transfer of glucosyl units from sucrose onto the α -(1→6) linked chains of dextrans (or oligosaccharides) via the formation of α -(1→2) linkages. To better understand the mode of branching of this very specific enzyme, which is unable to act as a polymerase like the vast majority of all other GH-70 enzymes, we have determined the structure of the products obtained by glucosylation from sucrose onto two pure oligosaccharides : α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→4)-D-Glcp or α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→4)-D-Glcp. First, we showed that the acceptor branching is kinetically controlled. The LC-MS and NMR analyses of the reaction products further demonstrate that the enzyme is able to transfer glucosyl units via α -(1→2) linkage formation on adjacent α -(1→6) glucosyl residues to produce novel oligosaccharide structures that were never described before. Moreover, we showed that in the presence of dextran acceptors of average molecular weights of 1.5 kDa or 10 kDa, α -(1→2) branching can occur on multiple positions onto dextran chains. The resistance of the resulting branched products to the amyloglucosidase and endodextranase action both depends on the α -(1→2) linkage content and the acceptor size. A wide range of products showing various structural patterns of resistance to hydrolytic enzymes can thus be synthesized by using this enzyme, opening the way to novel applications in the field of functional foods.

II. Introduction

Glucansucrases produced by lactic acid bacteria of the genera *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* and *Weissella* (EC 2.4.1.5) are transglucosidases that use sucrose to synthesize different glucans varying by the type and the percentage of their glucosidic linkages, depending on the enzyme specificity (Amarila *et al.*, 2009; Bounaix *et al.*, 2009; Monchois *et al.*, 1999; van Hijum *et al.*, 2006). Classified in family 70 of glycoside-hydrolases in the CAZY classification (<http://www.cazy.org/>), these enzymes share the same α -retaining mechanism involving the formation of a β -D-glucosyl covalent intermediate from sucrose (Cantarel *et al.*, 2009; Henrissat and Davies, 1997; Mooser *et al.*, 1991). These enzymes also catalyze the transfer of glucosyl moieties from the sucrose donor onto a wide variety of acceptor molecules in what is so called acceptor reactions (Bertrand *et al.*, 2006; Côté *et al.*, 2009; Moon *et al.*, 2007). Depending on the acceptor, gluco-oligosaccharides (GOS) or gluconjugates can be produced (André *et al.*, 2010; Iliev *et al.*, 2008). Among the glucansucrase activities expanded by lactic acid bacteria, that produced by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 is particularly original. Indeed, this strain produces from sucrose a dextran with 61% of α -(1→6) linkages, 13% of α -(1→3) linkages and 28% of α -(1→2) linkages, a type of osidic linkage rarely found in nature (Fabre *et al.*, 2005; Kobayashi and Matsuda, 1977; Seymour *et al.*, 1979). From sucrose as donor and maltose as acceptor, this enzyme was also shown to produce a mixture of oligosaccharides composed of linear α -(1→6) oligosaccharides and branched oligosaccharides with α -(1→6) and α -(1→2) glucosidic linkages, all of them presenting a maltose residue located at their reducing end (Dols *et al.*, 1997). The GOS containing α -(1→2) glucosidic bonds are of particular interest. Indeed, the α -(1→2) linkage is resistant to human and animal enzymes and confers prebiotic properties to these compounds which are marketed as food, feed and dermo-cosmetic ingredients (Boucher *et al.*, 2003; Djouzi and Andlueux, 1997; Flickinger *et al.*, 2000; Sanz *et al.*, 2006; Valette *et al.*, 1993).

The gene coding for the dextransucrase responsible for the synthesis of α -(1→2) branched dextrans, named *dsr-E*, was isolated from *Ln. mesenteroides* NRRL B-1299 and expressed in *E. coli* (Bozonnet *et al.*, 2002). Sequence analysis revealed the presence of two catalytic domains (CD1 and CD2) separated by a glucan binding domain (GBD) in the protein (Fabre *et al.*, 2005). Both CD1 and CD2 domains showed similarity to catalytic domains of GH-70

enzymes. Two truncated mutants (CD1-GBD and GBD-CD2) were constructed from DSR-E. GBD-CD1 was proved to be specific for the synthesis of the α -(1→6) linkage whereas GBD-CD2 is only involved in the formation of the α -(1→2) linkage (Fabre *et al.*, 2005). The truncated mutant GBD-CD2 was further characterized. From sucrose only, this engineered enzyme is unable to synthesize glucan and only acts as a sucrose hydrolase. However, when GOS containing α -(1→6) linkages and a maltose residue at the reducing end were added to sucrose, GBD-CD2 catalyses the transfer of the glucosyl units from sucrose onto the acceptor via the formation of α -(1→2) linkages (Fabre *et al.*, 2005). Recently, we showed that GBD-CD2 proceeds by a Ping-Pong Bi Bi kinetic mechanism during α -(1→2) glucosylation from sucrose onto dextrans and that the α -(1→2) linkage content in dextrans can be controlled by modulating the sucrose versus dextran molar ratio (Brison *et al.*, 2010). The high specificity of GBD-CD2 suggests promising results for the synthesis of gluco-oligosaccharides with controlled amounts of α -(1→2) linkages. To get new insights in the mode of action of GBD-CD2 and allow future structure-function relationship studies, it is important to characterize in more details the structure of the α -(1→2) branched products that can be synthesized by this new engineered enzyme.

With this objective, we describe herein the structures of the acceptor reaction products synthesized by GBD-CD2 in the presence of either a pure α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→4)-D-Glcp or α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→4)-D-Glcp and investigate the pattern of branching of 1.5 kDa or 10 kDa dextrans.

III. Results

III.A. Analysis of the glucosylation pattern of pure compound 1 and compound 4

To deepen the understanding of the transglucosidase GBD-CD2's branching mode, we first analyzed the reaction products issued from acceptor reactions in the presence of sucrose (the glucosyl donor) and the purified compound **1** (α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→4)-D-Glcp) or compound **4** (α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→6)- α -D-

Glc p -(1 \rightarrow 4)-D-Glc p). These compounds show a degree of polymerization of four or five, respectively (Figure 27 structure **1** and Figure 31 structure **4**).

III.A.1. Analysis of acceptor reaction products onto compound **1**

LC-MS analysis of the glucosylated products revealed the presence of two compounds, numbered **2** and **3**, corresponding to a pentasaccharide **2** and hexasaccharide **3**, respectively. Pentasaccharide **2** was produced during the early stages of the reaction (Fig. 2). Its production was correlated with compound **1** and sucrose consumption at an initial velocity of $106 \pm 24 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ of purified enzyme. For comparison, the initial velocity of concomitant sucrose hydrolysis is $18 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ of purified enzyme. Compound **3** was observable only when 53% of compound **1** was consumed.

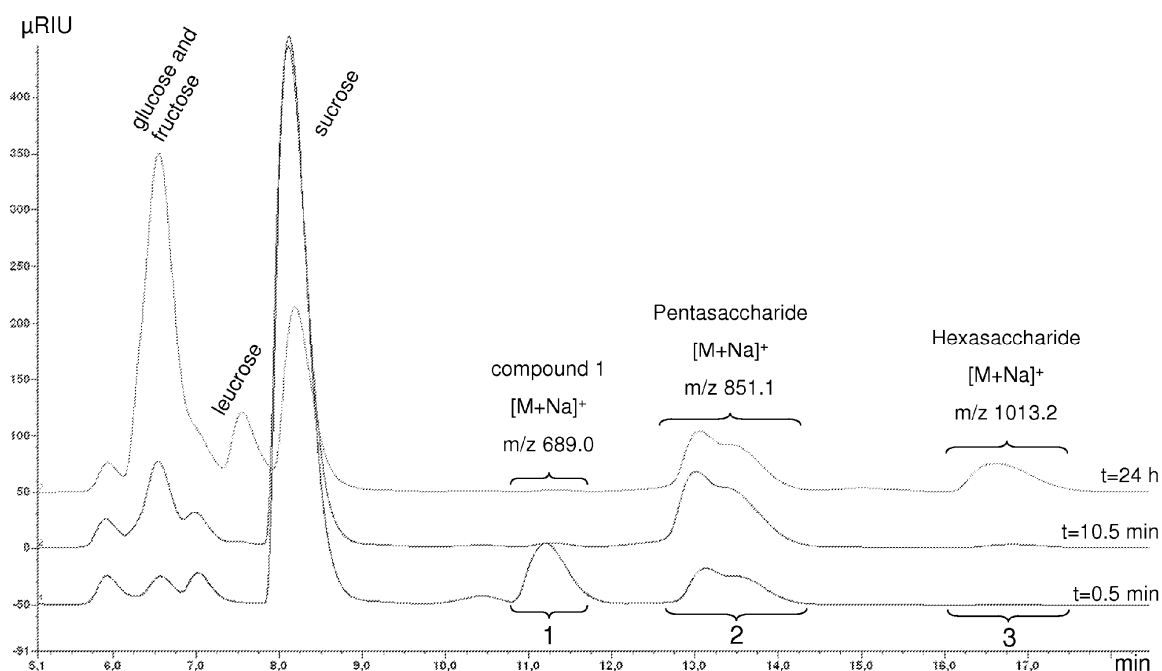


Figure 21: LC-MS analyses of the products obtained by glucosylation of compound **1** (α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-glucopyranose). Numbers refer to the compounds described in this chapter and to the structures drawn in Figure 27. Time indications next to chromatograms are the reaction durations.

III.A.1.a. Structure of compound 1

High-resolution mass spectrometry data indicate a tetrasaccharide structure. The positive-ion ESI mass spectrum of compound **1** shows an intense sodium adduct $[M+Na]^+$ at m/z 689.2 which is in agreement with a molecule containing four glucosyl units.

In the proton spectrum of tetrasaccharide **1**, the anomeric region shows the presence of four signals integrating for four protons (Figure 22). The signals at 4.57 (H-1 A β , 8 Hz) and 5.15 ppm (H-1 A α , 3.5 Hz) correspond to the glucosyl unit at the reducing extremity. The signals at $\delta = 4.89$ ppm integrating for two protons reflect the presence of α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6) (residue D) and α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6) (residue C) and the signal at 5.33 ppm corresponds to the H-1 of residue B α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4).

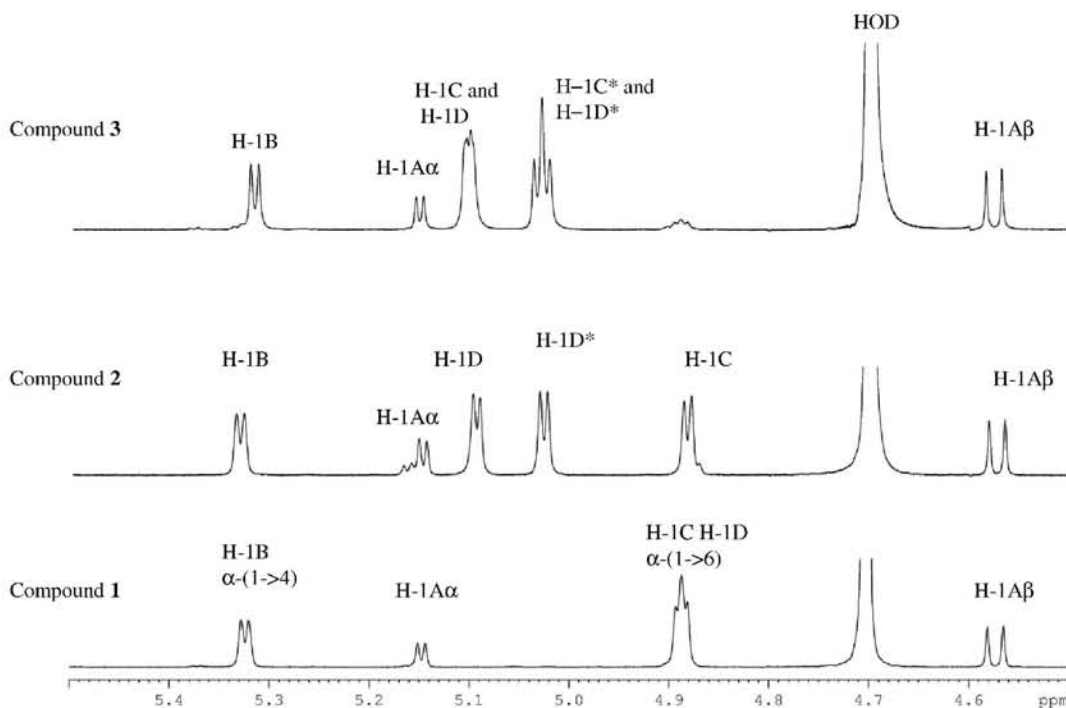


Figure 22: ^1H NMR spectra of anomeric regions of compounds **1**, **2** and **3**. The signals are designated by the proton position on the residue and followed by the letter of the glucosyl residue. For example, H-1B α -(1 \rightarrow 4) indicates that the anomeric proton of glucosyl unit B has the α -configuration and is linked to the C-4 of glucosyl residue A.

In the Heteronuclear Multiple Bond Coherence (HMBC) experiment, inter residual three-bond connectivities over glucosidic linkages are observed (Figure 23). Strong cross-peaks between H-1 D and H-1 C (4.89 ppm) and C-6 C and C-6 B (65.5 ppm) are observed and confirm the presence of α -(1 \rightarrow 6) linkages between residues B, C and D (Figure 23). Thus,

the structure of compound **1** is α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)-D-Glcp (Figure 27).

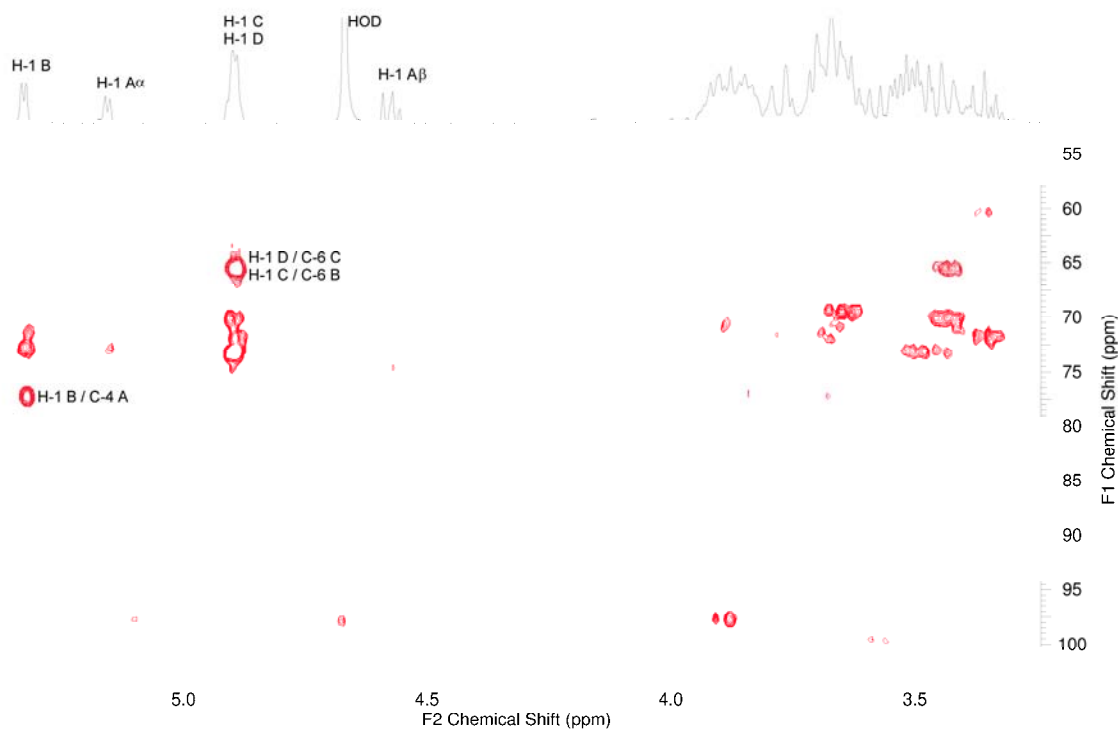


Figure 23: HMBC spectrum of compound **1** recorded in deuterium oxide at 298 K. The code H-1/ C-6 indicates a long-range coupling between C-6 of glucosyl units and H-1 of glucosyl units.

III.A.1.b. Structure of compound **2**

Both compounds **2** and **3** were purified by preparative chromatography, analyzed by high resolution mass spectrometry and ^1H , ^{13}C , HMBC NMR spectroscopy.

The positive-ion ESI mass spectrum of compound **2** shows an intense sodium adduct $[\text{M}+\text{Na}]^+$ at m/z 851.3 which is in agreement with a pentasaccharide structure. The Collision Induced Dissociation (CID) spectrum of the precursor ion at m/z 851.3 shows two series of fragments consistent with four successive losses of one glucose unit (*Y fragments*: m/z 689, m/z 527, m/z 365, m/z 203 and *B fragments*: m/z 671, m/z 509, m/z 347, m/z 185).

In the proton spectrum of pentasaccharide **2**, the anomeric region shows the presence of six signals integrating for five protons. This indicates a pentasaccharide structure in agreement

with the mass spectrometry data. Based on the complete proton attribution of compound **2** demonstrated by Dols *et al.*, the signals at 4.57 (H-1 A β , 8 Hz) and 5.15 ppm (H-1 A α , 3.5 Hz) correspond to the protons of the glucosyl unit at the reducing end (Dols *et al.*, 1998). The signal at 4.89 ppm integrating for one proton reflects the presence of α -D-Glcp-(1→6) (residue C); the signal at 5.03 ppm integrating for one proton corresponds to the H-1 of residue D* α -D-Glcp-(1→2); the signal at 5.1 ppm integrating for one proton corresponds to the H-1 of residue D α -D-Glcp-(1→6)(2→1); the signal at 5.32 ppm integrating for one proton corresponds to the H-1 of residue B α -D-Glcp-(1→4).

Considering the Heteronuclear Multiple Quantum Coherence (HMQC) spectrum, cross-peaks between H-1 and C-1 were attributed (Figure 24). Chemical shifts of anomeric carbons are those of compound **2** observed by Dols *et al.* (Dols *et al.*, 1998).

As previously demonstrated by Dols *et al.*, strong cross-peaks in HMBC spectrum of compound **2** confirm the presence of an α -(1→4) linkage between glucosyl units A and B, the presence of α -(1→6) linkages between B, C and D and the presence of an α -(1→2) linkage between H-1 D* and C-2 D (Figure 25) (Dols *et al.*, 1998).

The structure of pentasaccharide **2**, which was detected as a double peak on LC-MS chromatogram (Figure 21), is thus α -D-Glcp-(1→2)- α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→4)-D-Glcp. The double peak is attributed to the presence of the α/β anomers during elution (Dols *et al.*, 1998). This pentasaccharide contains an α -(1→2) linkage at the non-reducing end (Figure 27).

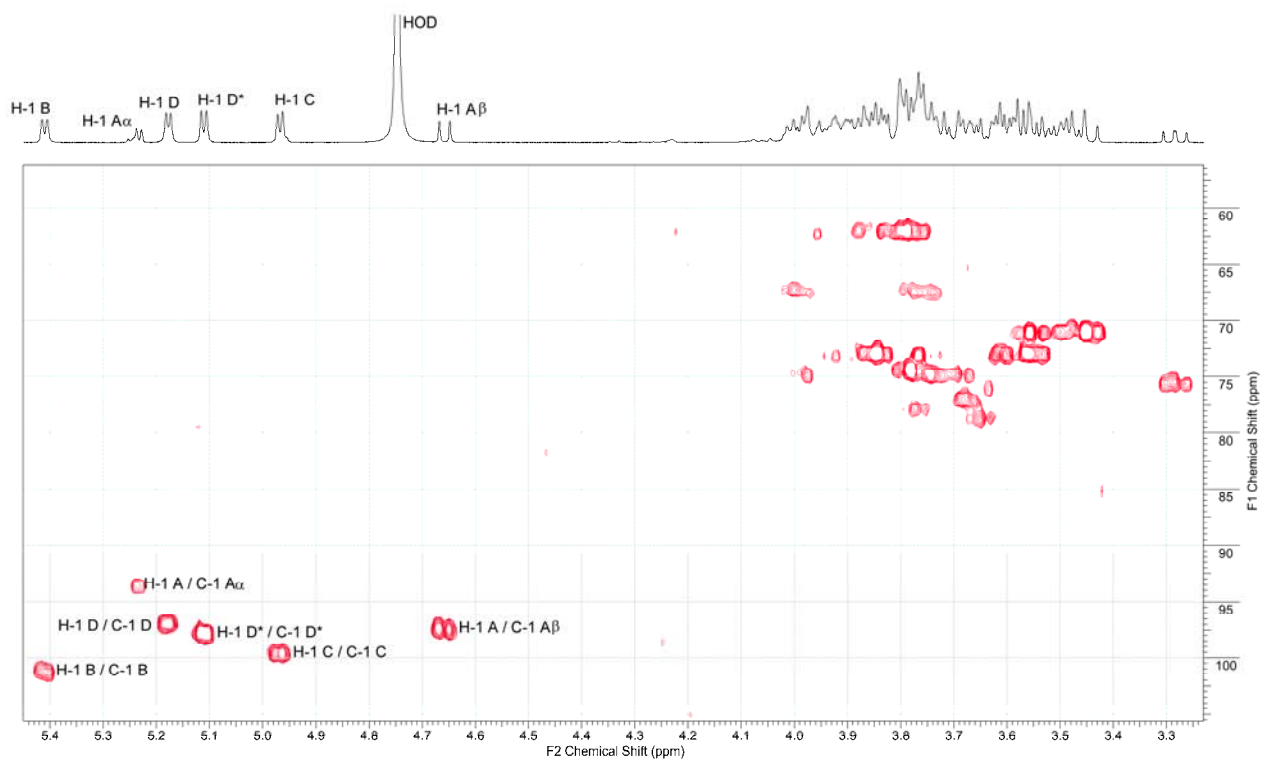


Figure 24 : HMQC spectrum of compound 2 recorded in deuterium oxide at 300.3 K. The code H-1 / C-1 indicates couplings between C-1 of a glucosyl unit and H-1 of the same glucosyl unit.

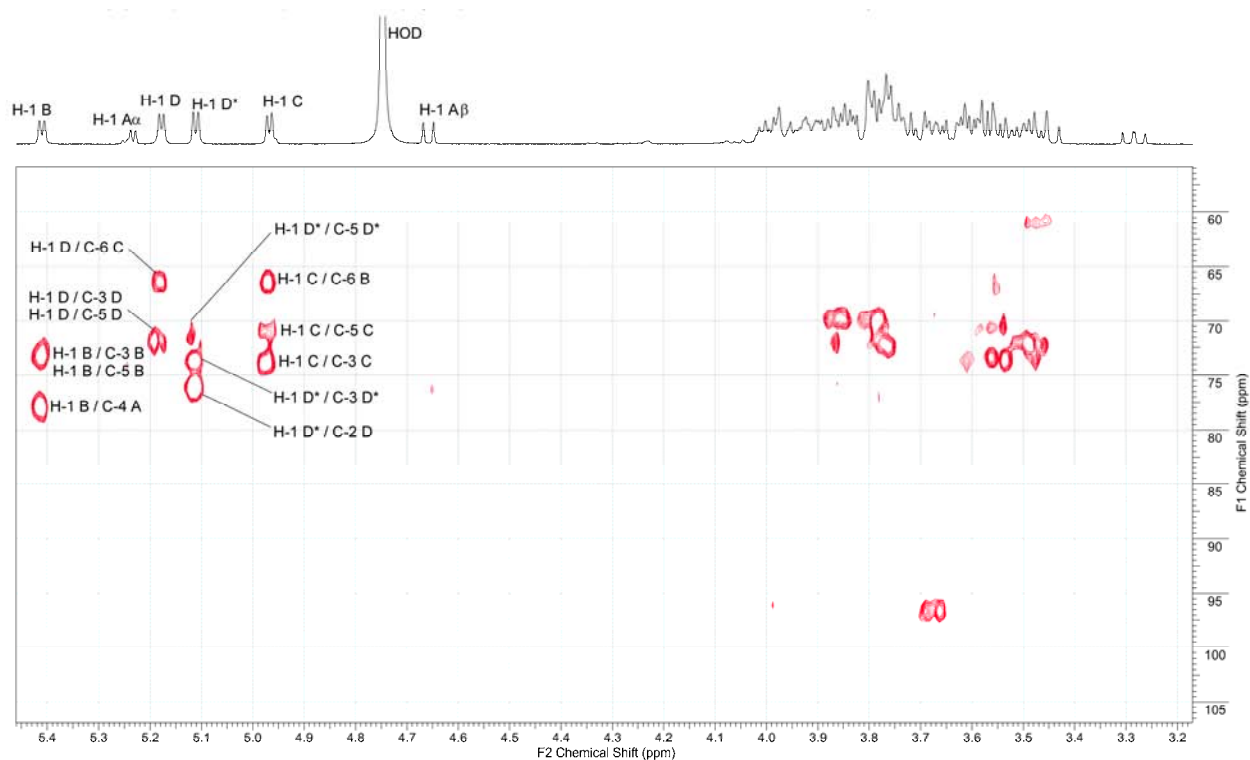


Figure 25: HMBC spectrum of compound 2 recorded in deuterium oxide at 300.3 K. The code H-1 / C-2, C-4, C-6 indicates long-range couplings between C-2 or C-4 or C-6 of glucosyl units and H-1 of glucosyl units.

III.A.1.c. Structure of compound 3

The positive-ion ESI mass spectrum of compound **3** shows an intense sodium adduct $[M+Na]^+$ at m/z 1013.3 and a doubly charged ion $[M+2Na]^{2+}$ at m/z 518.1 which is in agreement with a molecule containing six glucosyl units. The CID spectrum of the precursor ion at m/z 1013.3 shows two series of fragments consistent with five successive losses of one glucosyl unit (*Y fragments*: m/z 851, m/z 689, m/z 527, m/z 365, m/z 203 and *B fragments*: m/z 833, m/z 671, m/z 509, m/z 347, m/z 185).

In the proton spectrum of hexasaccharide **3**, the anomeric region shows the presence of five signals integrating for six protons, what is in agreement with mass spectrometry data. The signals at 4.57 (H-1 A β , 8 Hz) and 5.15 ppm (H-1 A α , 3.5 Hz) correspond to the protons of the glucosyl unit at the reducing end. The signal at 5.03 ppm integrating for two protons corresponds to the H-1 of residue C* and D* α -D-Glcp-(1 \rightarrow 2); the signal at 5.10 ppm integrating for two protons corresponds to the H-1 of residues C and D α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)(2 \rightarrow 1); the signal at 5.32 ppm integrating for one proton corresponds to the H-1 of residue B α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4).

In the HMBC spectrum, strong cross-peaks between H-1 B (5.32 ppm) and C-4 A (77.3 ppm), H-1 D (5.1 ppm) and C-6 C (65.6 ppm), H-1 C (5.1 ppm) and C-6 B (65.6 ppm), H-1 D* (5.03 ppm) and C-2 D (75.5 ppm) and H-1 C* (5.03 ppm) and C-2 C (75.5 ppm) were observed. They confirmed the presence of an α -(1 \rightarrow 4) linkage between residues A and B, the presence of α -(1 \rightarrow 6) linkages between B, C and D and the presence of α -(1 \rightarrow 2) linkages between H-1 D* and C-2 D, and H-1 C* and C-2 C (Figure 26).

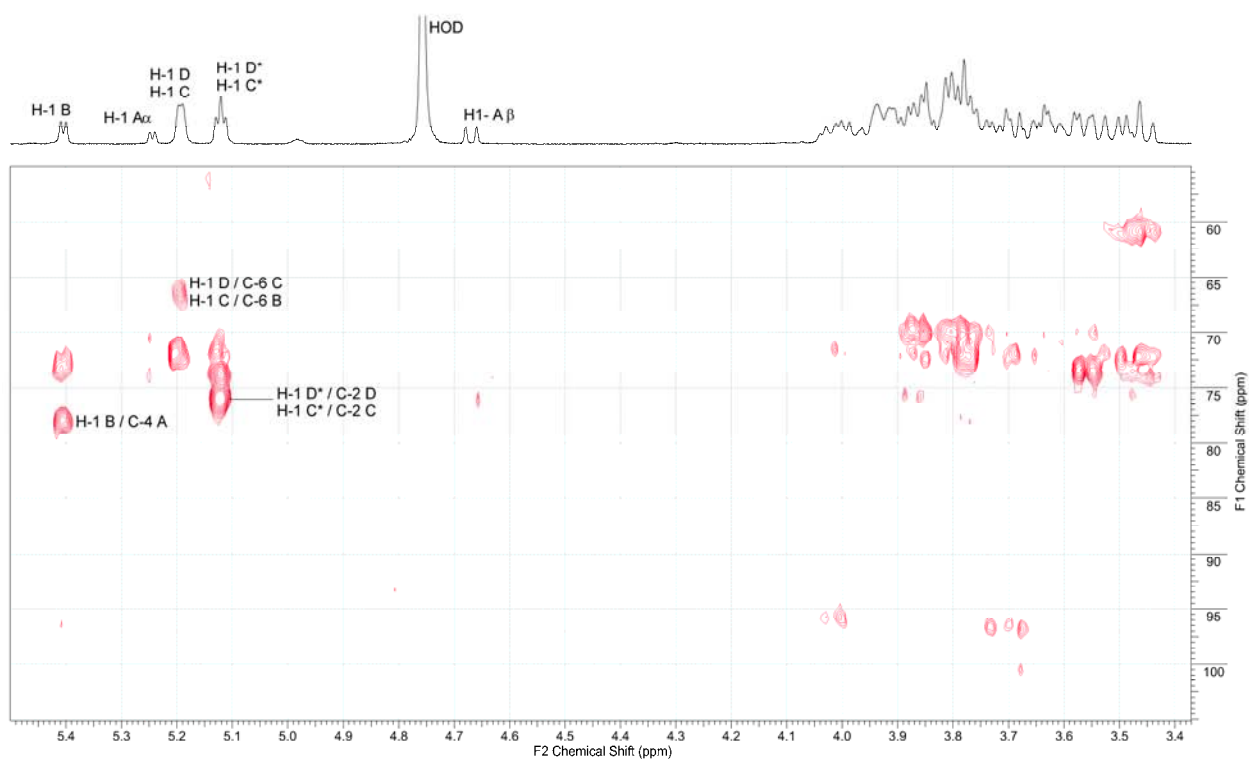


Figure 26: HMBC spectrum of compound **3** recorded in deuterium oxide at 300.3 K. The code H-1 / C-2, C-4, C-6 indicates long-range couplings between C-2, C-4 or C-6 of glucosyl units and H-1 of glucosyl units.

These analyses enabled us to define unequivocally its structure. Unexpectedly, the structure of the hexasaccharide **3** is α -D-Glcp-(1 \rightarrow 2)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)-[α -D-Glcp-(1 \rightarrow 2)]- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)-D-Glcp. Indeed, the structure of this hexasaccharide, never described before, shows that GBD-CD2 can catalyze the glucosylation through α -(1 \rightarrow 2) linkage formation on two vicinal α -(1 \rightarrow 6) linked glucosyl residues (Figure 27).

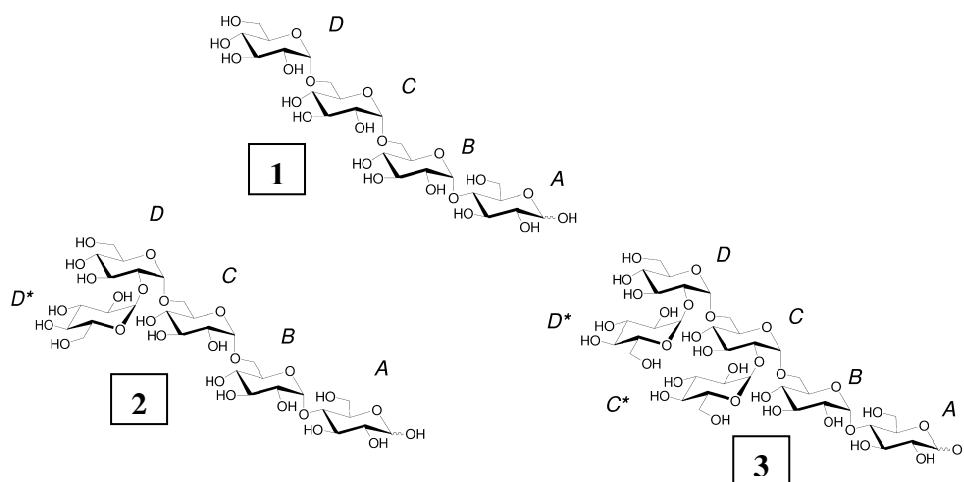


Figure 27: Structures of GOS produced by the α -(1 \rightarrow 2) glucosylation of compound **1**.

Numbers refer to the compounds described in the text and to peak attributions in Figure 21. Uppercase letters refer to glucosyl unit annotations.

1, α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-glucopyranose (acceptor molecule); **2**, α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-glucopyranose; **3**, α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-[α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-glucopyranose

III.A.2. Analysis of acceptor reaction products onto compound **4**

The LC-MS chromatograms of the reaction mixture after 0.5 min incubation revealed the presence of three peaks named **5a**, **5b** and **5c** (Figure 28). The corresponding $[M+Na]^+$ adducts were detected at a molecular mass of 1013.2, which correspond to hexasaccharides. The initial velocity of sucrose consumption reached $163 \pm 22 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ of purified enzyme, and was thus higher than that determined in the presence of compound **1** whereas the kinetic of concomitant sucrose hydrolysis was similar ($19 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ of purified enzyme). After 7 min of reaction, when compound **4** was totally consumed, additional peaks corresponding to heptasaccharides were observed, which were named **6a** and **6b**. Finally a peak corresponding to the octasaccharide **7** was also detected after 24h of reaction.

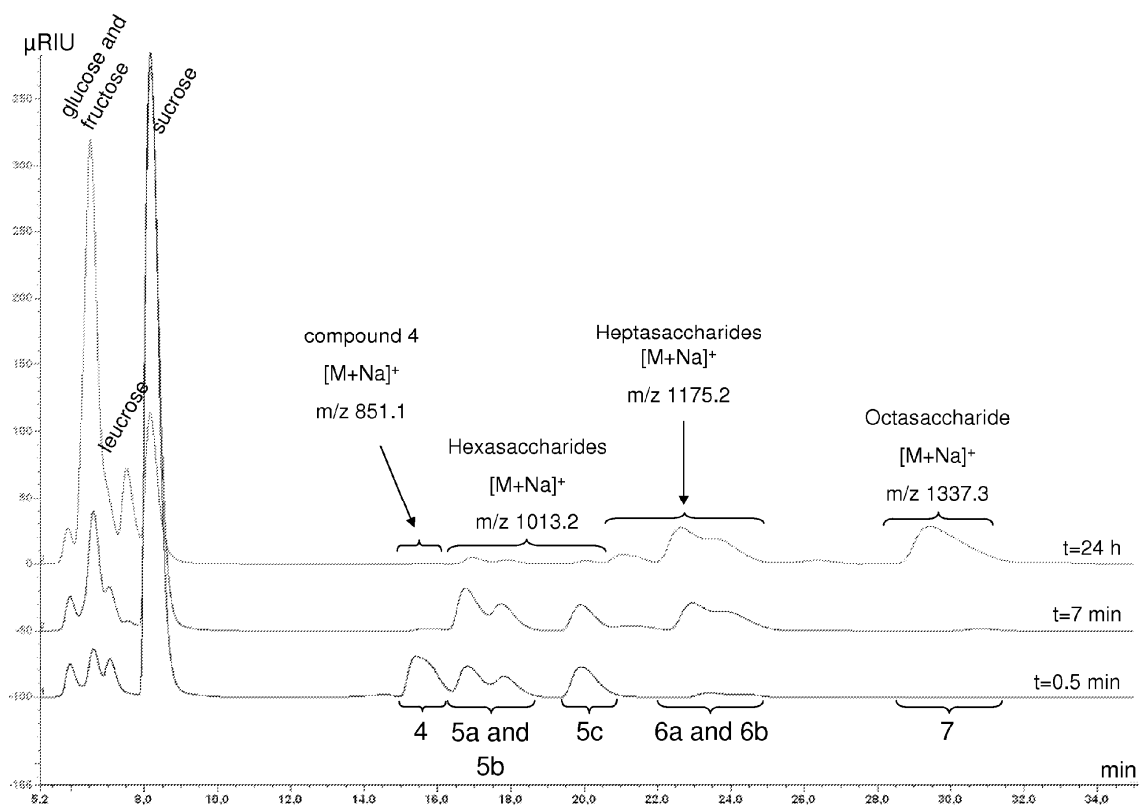


Figure 28: LC-MS analyses of the products obtained by glucosylation of compound **4** (α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-glucopyranose). Numbers refer to compounds described in this chapter and to the structures drawn in Figure 31. Time indications next to chromatograms are the reaction durations.

III.A.2.a. Structure of compound **4**

Acceptor compound **4** was analyzed by high resolution mass spectrometry and ^1H NMR. The positive-ion ESI mass spectrum of compound **4** shows an intense sodium adduct $[\text{M}+\text{Na}]^+$ at m/z 851.2 which is in agreement with a pentasaccharide structure. The CID spectrum of the precursor ion at m/z 851.2 shows two series of fragments consistent with four successive losses of one glucose unit (*Y* fragments: m/z 689, m/z 527, m/z 365, m/z 203 and *B* fragments: m/z 671, m/z 509, m/z 347, m/z 185).

Anomeric region of ^1H NMR spectrum indicates three triplets and one doublet integrating for five protons (Figure 30). This indicates a pentasaccharide structure in agreement with the mass spectrometry data. The signals at 4.57 (H-1 A β , 8 Hz) and 5.15 ppm (H-1 A α , 3.5 Hz) correspond to the proton of the glucosyl unit at the reducing end. The signal at 4.89 ppm

integrating for three protons reflects the presence of α -(1→6) linkages of residues C, D and E; the signal at 5.32 ppm integrating for one proton corresponds to the H-1 of residue B α -D-Glcp-(1→4).

III.A.2.b. Structures of compounds **5a**, **5b** and **5c**

The transitory production of the hexasaccharides corresponding to peaks **5a**, **5b** and **5c** hampered their isolations and purifications. To elucidate their structures, the products formed by GBD-CD2 after 0.5 min reaction were digested by the amyloglucosidase of *Aspergillus niger* (Figure 29). First, we checked that the amyloglucosidase did not hydrolyze the α -(1→2) linkage located at the non reducing end of the molecules. As expected, compound **4** was totally degraded. In contrast, compound **5c** was resistant. This indicates that hexasaccharide **5c** possesses an α -(1→2) linkage at its non reducing extremity. This hexasaccharide corresponds to α -D-Glcp-(1→2)- α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→4)-D-Glcp. Besides, the peaks identified as **5a** and **5b** disappeared during the hydrolysis, with the concomitant appearances of two new double peaks on LC-MS chromatograms, which were attributed to the α / β anomers of tetrasaccharide **0** (α -D-Glcp-(1→2)- α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→4)-D-Glcp) (previously described by Remaud-Siméon *et al.*, 1994) and pentasaccharide **2** (Figure 29). From the hydrolysis product structures, we concluded that products **5a** and **5b** correspond to α -D-Glcp-(1→6)-[α -D-Glcp-(1→2)]- α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→4)-D-Glcp and α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→6)-[α -D-Glcp-(1→2)]- α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→4)-D-Glcp, respectively (Figure 31).

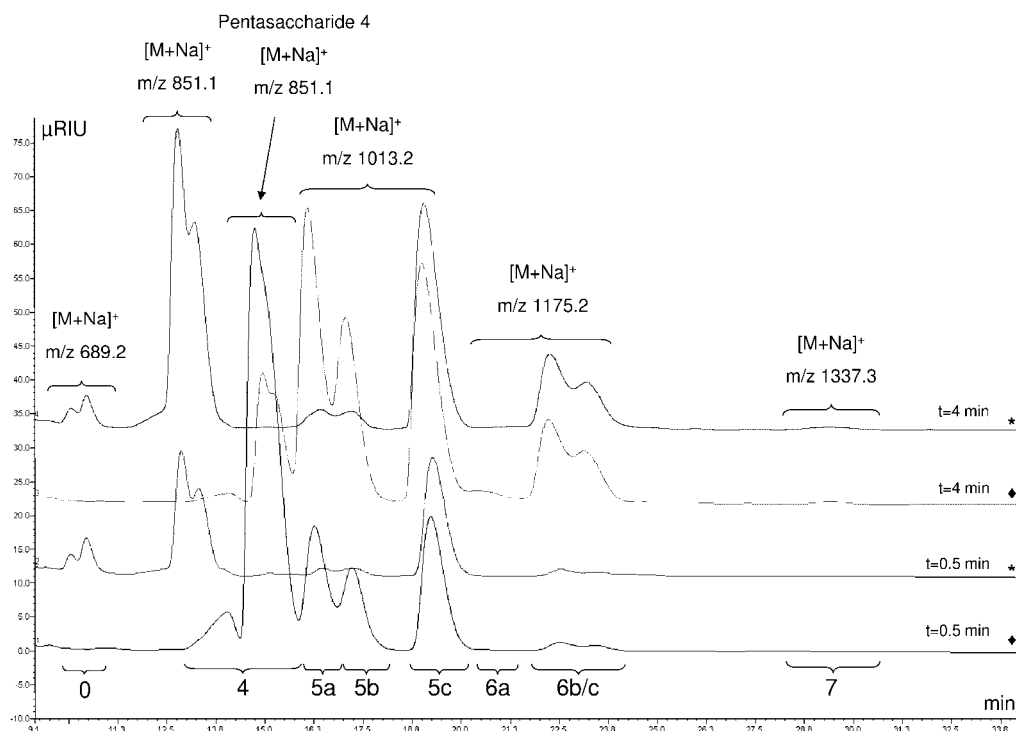


Figure 29: LC-MS analyses of the products obtained after hydrolysis by *Aspergillus niger* amyloglucosidase of α -(1 \rightarrow 2) glucosylated compound **4** (α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-glucopyranose). Numbers refer to the structures drawn in Figure 31. Time indications next to chromatograms are the durations of reaction. (\blacklozenge), (\star) before and after the *Aspergillus niger* amyloglucosidase hydrolysis, respectively.

III.A.2.c. Structures of compounds **6a** and **6b**

As shown on the chromatogram obtained after 24 h of reaction, the peaks corresponding to the hexasaccharides (**5a**, **5b** and **5c**) disappeared to give rise to products **6a**, **6b** and **7**. The corresponding $[M+Na]^+$ adducts enabled us to propose that products **6a** and **6b** correspond to heptasaccharides and product **7** to an octasaccharide. Products **6a** and **6b** are not hydrolysed by the amyloglucosidase, indicating that the corresponding compounds possess an α -(1 \rightarrow 2) linkage at their non reducing end. In addition, these products contain a second α -(1 \rightarrow 2) linked glucosyl unit. Additionally, hexasaccharides **6a** and **6b** were isolated and characterized by NMR.

The positive-ion ESI mass spectrum of compound **6a** or **6b** shows an intense sodium adduct $[M+Na]^+$ at m/z 1175.3 and a doubly charged ion $[M+2Na]^{2+}$ at m/z 599.1. This is in agreement with a heptasaccharide structure. The CID spectrum of the precursor ion at m/z 1175.3 shows two series of fragments consistent with six successive losses of one glucose unit (*Y fragments*: m/z 1013, m/z 851, m/z 689, m/z 527, m/z 365, m/z 203 and *B fragments*: m/z 995, m/z 833, m/z 671, m/z 509, m/z 347, m/z 185).

In the proton spectrum of heptasaccharide **6a** or **6b**, the anomeric region shows the presence of six signals generated by seven protons (Figure 30). The signals at 4.57 (H-1 A β , 8 Hz) and 5.15 ppm (H-1 A α , 3.5 Hz) correspond to the proton of the glucosyl unit at the reducing end. The signal at 4.89 ppm integrating for one proton reflects the presence of α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6) (residues C, D and E); the signal at 5.03 ppm integrating for two protons corresponds to the H-1 of residues (E*, C* or E*, D*); the signal at 5.10 ppm integrating for two protons corresponds to the H-1 of residues (E, C or E, D) α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)(2 \rightarrow 1); the signal at 5.32 ppm integrating for one proton corresponds to the H-1 of residue B α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4). Two possible structures for compounds **6a** and **6b** can thus be proposed for these products: α -D-Glcp-(1 \rightarrow 2)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)-[α -D-Glcp-(1 \rightarrow 2)]- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)-D-Glcp or α -D-Glcp-(1 \rightarrow 2)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)-[α -D-Glcp-(1 \rightarrow 2)]- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)-D-Glcp, respectively (Figure 31).

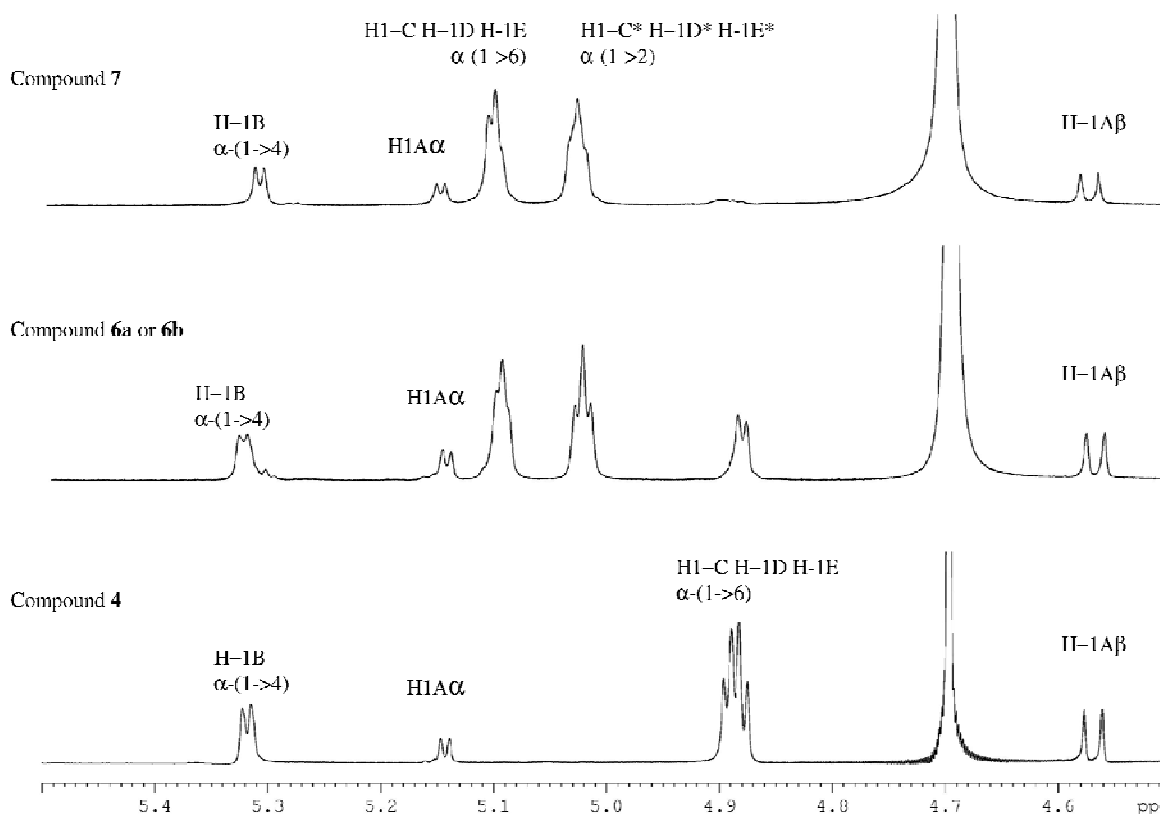


Figure 30: ^1H NMR spectra of anomeric regions of compounds 4, 6a or 6b and 7. The signals are designated by the proton position on the residue and followed by the letter of the residue. For example, H-1B α -(1 \rightarrow 4) indicates that the anomeric proton of glucosyl unit B has the α -configuration and is linked to the C-4 of glucosyl unit A.

III.A.2.d. Structure of compound 7

Octasaccharide 7 (Figure 28) was also purified by preparative chromatography. The positive-ion ESI mass spectrum of compound 7 shows an intense sodium adduct $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 1337.4 and a doubly charged ion $[\text{M}+2\text{Na}]^{2+}$ at m/z 680.2 in agreement with an oligosaccharide having eight glucosyl units. The CID spectrum of the precursor ion at m/z 1337.4 shows two series of fragments consistent with seven successive losses of one glucose unit (*Y* fragments: m/z 1175, m/z 1013, m/z 851, m/z 689, m/z 527, m/z 365, m/z 203 and *B* fragments: m/z 1157, m/z 995, m/z 833, m/z 671, m/z 509, m/z 347, m/z 185).

It was unambiguously identified by NMR as having three α -(1 \rightarrow 2) glucosyl units (Figure 31) which has never been described up to now, all the α -(1 \rightarrow 6) linked glucosyl units of compound 4 being substituted by an α -(1 \rightarrow 2) linked glucosyl unit. Indeed, in the proton

spectrum of octosaccharide **7**, the anomeric region shows the presence of five signals generated by eight protons. This indicates an octosaccharide structure in agreement with the high resolution mass spectrometry data. The signals at 4.57 (H-1 A β , 8 Hz) and 5.15 ppm (H-1 A α , 3.5 Hz) correspond to the proton of the glucosyl unit at the reducing end. The signal at 5.03 ppm integrating for three protons corresponds to the H-1 of residues (C*, D* and E*); the signal at 5.10 ppm integrating for three protons corresponds to the H-1 of residues (C, D and E) α -D-Glcp-(1→6)(2→1); the signal at 5.32 ppm integrating for one proton corresponds to the H-1 of residue B α -D-Glcp-(1→4). The structure of octosaccharide **7** is α -D-Glcp-(1→2)- α -D-Glcp-(1→6)-[α -D-Glcp-(1→2)]- α -D-Glcp-(1→6)-[α -D-Glcp-(1→2)]- α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→4)-D-Glcp (Figure 31).

III.A.3. Acceptor reaction with heptasaccharides **6a** and **6b**

An acceptor reaction in the presence of 10 mM of purified heptasaccharides **6a** and **6b** was carried out. The initial velocity of octosaccharide **7** formation was determined to be 8 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ of purified enzyme while concomitant sucrose hydrolysis rate corresponded to 22 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ of purified enzyme.

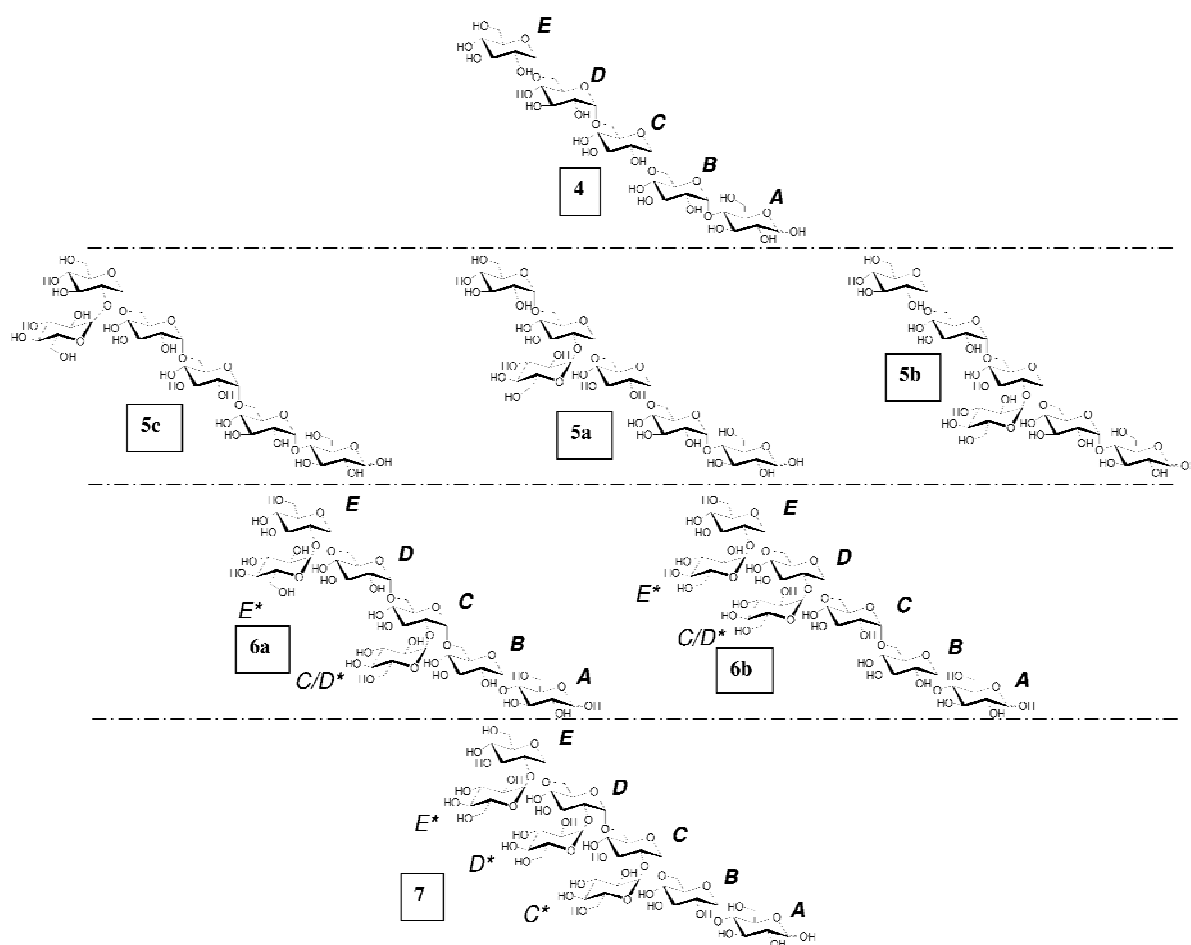


Figure 31: Structures of GOS produced by $\alpha(1\rightarrow2)$ glucosylation of compound 4. Numbers refer to the compounds described in the text and to peak attributions in Figure 28. Uppercase letters refer to glucosyl unit annotations.

4, α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-glucopyranose (acceptor molecule);

6a, α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-[α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-glucopyranose;

6b, α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-[α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-glucopyranose

7, α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-[α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-[α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-glucopyranose.

Other structures displayed on this figure have been deduced from LC-MS data and chromatogram profiles of the amyloglucosidase hydrolysis reaction of pentasaccharides **5a**, **5b** and **5c** glucosylated with GBD-CD2.

III.B. Analysis of acceptor reaction products onto 1.5 kDa and 10 kDa dextrans

Two linear dextrans of average molecular weight 1.5 kDa or 10 kDa, respectively, were first branched by acceptor reactions catalyzed by the transglucosidase GBD-CD2. To modulate the α -(1 \rightarrow 2) linkage content in the products, various sucrose donor/dextran acceptor molar ratios were used, as previously described in the literature (Brison *et al.*, 2010). Branched dextrans with percentage of α -(1 \rightarrow 2) linkages from 0% to 25% were then submitted to the action of the exo-acting amyloglucosidase from *Aspergillus Niger*; this enzyme is unable to hydrolyze the α -(1 \rightarrow 2) bonds. During the amyloglucosidase action, the hydrolysis ratio was expressed as the molar ratio between the released glucose and the amount of glucosyl units contained in the initial α -(1 \rightarrow 2) branched dextrans. As shown in Figure 32, the hydrolysis ratio decreases almost linearly from 97% to 21% when the α -(1 \rightarrow 2) linkage contents of 1.5 kDa branched dextran increases from 0 to 25%. At equivalent degree of branching, the 10 kDa branched dextran is more resistant to amyloglucosidase degradation than the 1.5 kDa branched dextran. The difference of resistance to amyloglucosidase between both branched dextrans is really marked at low degree of branching. It diminishes as the percentage of the α -(1 \rightarrow 2) bonds increases, equivalent hydrolysis ratios of about 20% being obtained when the degree of branching reaches 25 %.

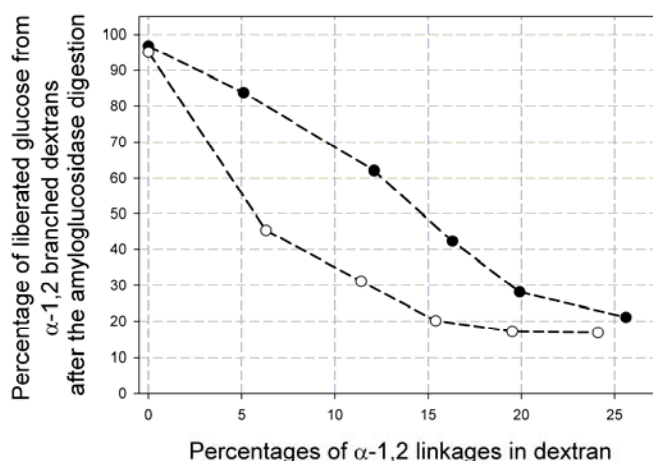


Figure 32: Evolution of the molar ratio between the glucose released from the hydrolysis of α -(1 \rightarrow 2) branched dextrans by *Aspergillus niger* amyloglucosidase, and the anhydroglucosyl units contained in branched dextrans. (●) reaction with dextran 1.5 kDa; (○) reaction with dextran 10 kDa.

III.B.1. Analysis of branched dextrans before and after *Aspergillus niger* amyloglucosidase hydrolysis

III.B.1.a. Branched dextrans produced from 1.5 kDa linear dextran

HPAEC-PAD analyses of the branched dextran reflect the decrease of isomalto-oligosaccharide content when the α -(1 \rightarrow 2) bond ratio increases. Various series of novel products are clearly distinguishable on the chromatograms for oligosaccharides showing a degree of polymerization lower than 9 (Figure 33). For dextran chains longer than DP9, the resolution is insufficient to separate the α -(1 \rightarrow 2) branched products from the linear isomalto-oligosaccharides. Interestingly, almost no glucosylation of isomaltose is observed after GBD-CD2 action, showing that this product is a poor acceptor compared to longer isomalto-oligosaccharides. As expected, more and more products are resistant to the amyloglucosidase action as the degree of α -(1 \rightarrow 2) linkages increases, which is in agreement with the values of the hydrolysis ratios (Figure 32).

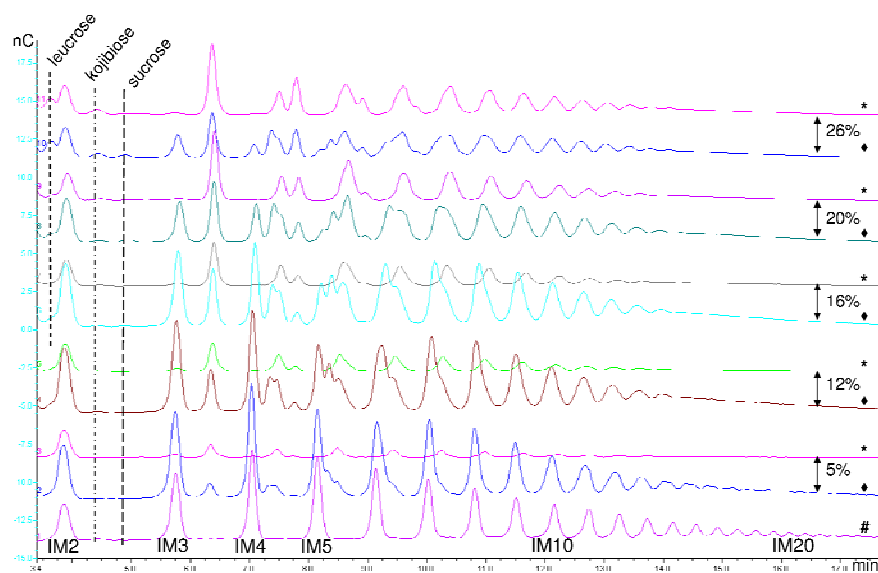


Figure 33: HPAEC-PAD chromatograms of α -(1 \rightarrow 2) branched dextrans synthesized in the presence of dextran 1.5 kDa and sucrose, and of their hydrolysis products obtained with *Aspergillus niger* amyloglucosidase. (#) dextran 1.5 kDa standard; (♦), (*) α -(1 \rightarrow 2) branched dextrans before and after amyloglucosidase hydrolysis, respectively. Percentages indicated on the figure correspond to the ratios of α -(1 \rightarrow 2) linkage in branched dextrans. IM2 to IM20 correspond to the polymerization degree of isomalto-oligosaccharides.

III.B.1.b. Branched dextrans produced from 10 kDa linear dextran

The 10 kDa dextran contains very few amounts of short dextran chains. The chromatogram profiles of the branched products hydrolysed or non-digested with the amyloglucosidase are similar. Hydrolysis with the amyloglucosidase did not yield high amounts of resistant short dextran chains whatever was the α -(1 \rightarrow 2) linkage content in these dextrans (Figure 34). This result suggests that an α -(1 \rightarrow 2) glucosyl unit rapidly stops the action of the amyloglucosidase. However, as for 1.5 kDa dextran, an α -(1 \rightarrow 2) linked glucosyl unit is not always located at the reducing end otherwise the chains would be totally resistant to amyloglucosidase action.

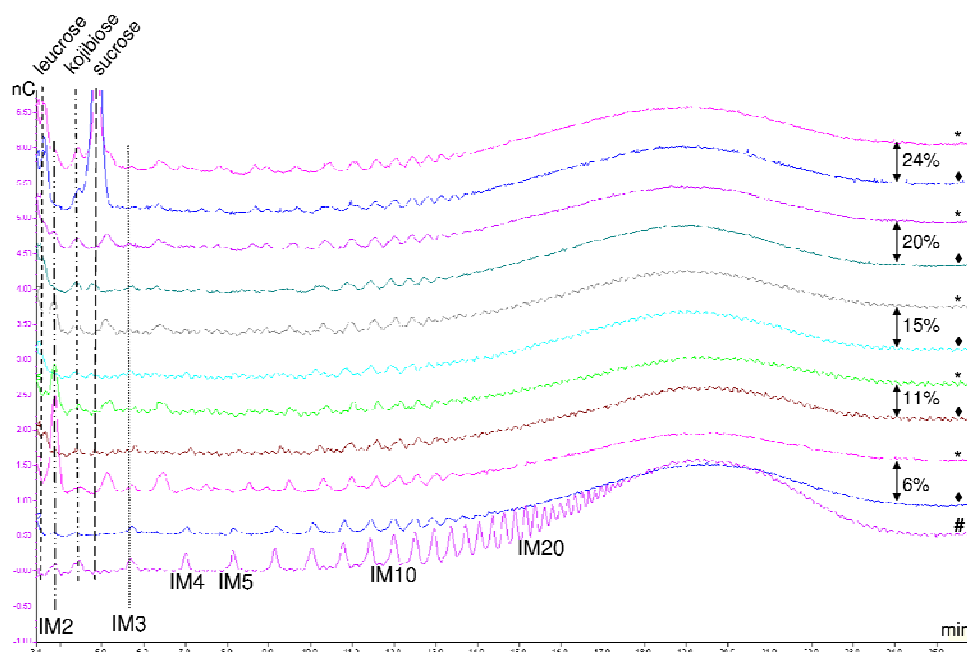


Figure 34: HPAEC-PAD chromatograms of α -(1 \rightarrow 2) branched dextrans synthesized in the presence of dextran 10 kDa and sucrose, and of their hydrolysis products obtained with *Aspergillus niger* amyloglucosidase. (#) dextran 10 kDa standard; (\blacklozenge), ($*$) α -(1 \rightarrow 2) branched dextrans before and after the amyloglucosidase hydrolysis. Percentages indicated on the figure correspond to the ratios of α -(1 \rightarrow 2) linkages in branched dextrans. IM2 to IM20 correspond to the polymerization degree of isomalto-oligosaccharides.

III.B.2. Analysis of α -(1→2) branched dextrans digested by *Chaetomium gracile* endodextranase

The chromatograms of the 1.5 kDa dextrans with more than 5% α -(1→2) branchings are rather comparable before and after endodextranase hydrolysis. The hydrolysis by endodextranase is thus limited by the presence of α -(1→2) linkages. For 1.5 kDa branched dextran with 26% of branchings, the chromatographic profile remains very similar even after the endodextranase hydrolysis. Only isomaltotetraose and isomaltopentaose disappear indicating that the hydrolysis is complete (Figure 35).

As seen on Figure 36, endodextranase hydrolysis of branched 10 kDa dextrans releases isomalto-oligosaccharides and α -(1→2) branched isomalto-oligosaccharides. The presence of isomaltotriose and isomaltotetraose is detected on the 10 kDa dextran chromatograms but isomaltopentaose is not anymore detected when the branching ratio of the dextrans is higher than 15 %. As the branching ratio of dextran increases, there are less and less sites without α -(1→2) branches, which can be hydrolysed by the endodextranase. The product profiles on chromatograms obtained after hydrolysis are similar to those obtained for dextran 1.5 kDa (Figure 35). Notably, the endodextranase can still hydrolyse branched dextrans 10 kDa even for high branching ratios (*ie* 24%) and that was not observed for dextran 1.5 kDa (Figure 35).

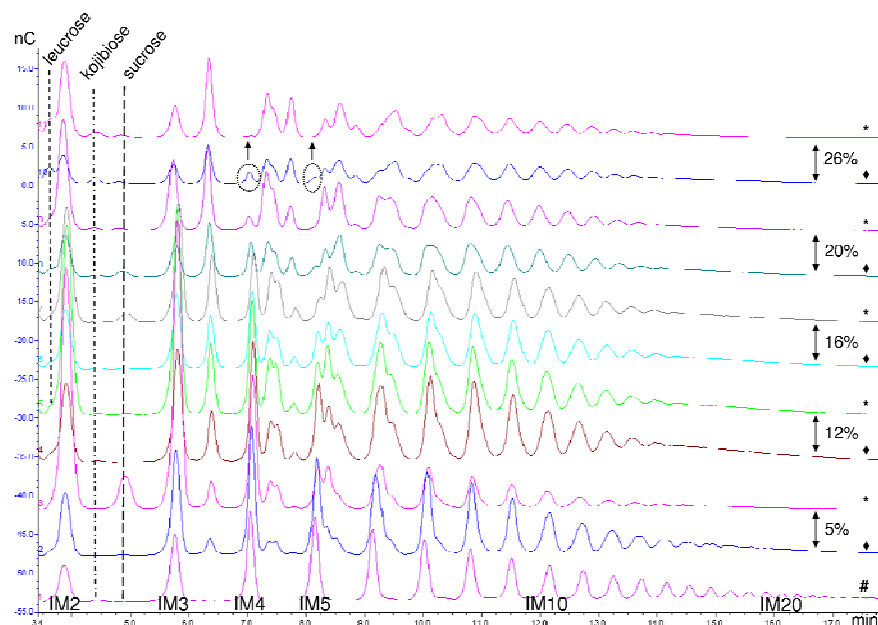


Figure 35: HPAEC-PAD chromatograms of $\alpha(1\rightarrow2)$ branched dextrans synthesized in the presence of dextran 1.5 kDa and sucrose, and of their hydrolysis products obtained with *Chaetomium gracile* endodextranase. (#) dextran 1.5 kDa standard; (♦), (*) $\alpha(1\rightarrow2)$ branched dextrans before and after the endodextranase hydrolysis, respectively. Percentages indicated on the figure correspond to the ratios of $\alpha(1\rightarrow2)$ linkage in branched dextrans. Circles indicate the presence of isomaltotetraose and isomaltopentaose. IM2 to IM20 correspond to the polymerization degree of isomalto-oligosaccharides.

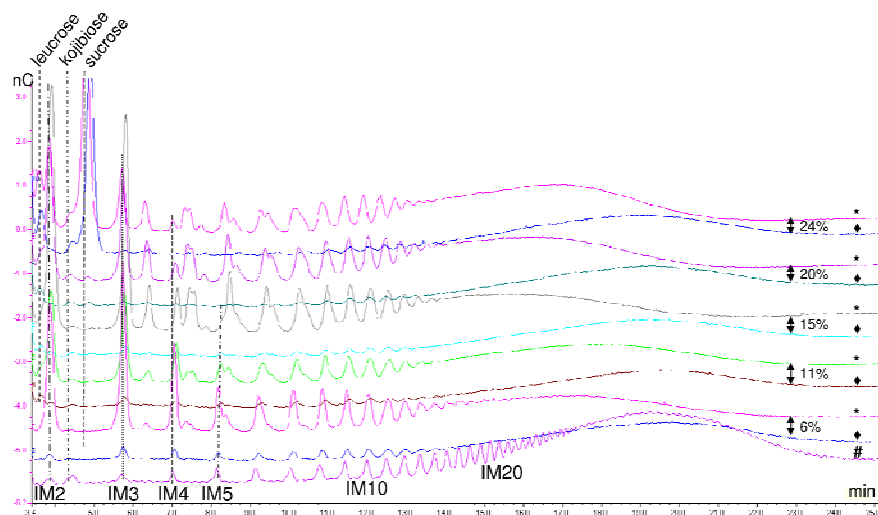


Figure 36: HPAEC-PAD chromatograms of $\alpha(1\rightarrow2)$ branched dextrans synthesized in the presence of dextran 10 kDa and sucrose, and of their hydrolysis products obtained with *Chaetomium gracile* endodextranase. (#) dextran 10 kDa standard; (♦), (*) $\alpha(1\rightarrow2)$ branched dextrans before and after the endodextranase hydrolysis, respectively. Percentages indicated on the figure correspond to the ratios of $\alpha(1\rightarrow2)$ linkage in branched dextrans. IM2 to IM20 correspond to the polymerization degree of isomalto-oligosaccharides.

III.C. Discussion

We previously showed that the α -(1→2) branching enzyme GBD-CD2 catalyzes α -(1→2) branching formation onto dextrans via a Ping-Pong Bi Bi mechanism (Brison *et al.*, 2010). Herein, we analyzed in more details the acceptor reaction products obtained after reaction in the presence of pure compounds **1** and **4** and linear dextrans of average molecular weight 1.5 kDa and 10 kDa, in order to better understand the mode of glucosylation of this engineered enzyme.

To date, only three structures of α -(1→2) branched GOS produced using the *Ln. mesenteroides* NRRL B-1299 glucansucrase activity, were determined by ^{13}C and ^1H NMR (Dols *et al.*, 1997; Remaud-Simeon *et al.*, 1994). A tetrasaccharide and a pentasaccharide were described as having a terminal α -(1→2) linked glucosyl unit at the non-reducing extremity. A hexasaccharide was described as having an α -(1→2) glucosyl unit on the penultimate position at the non-reducing extremity. The structure achievements of α -(1→2) branched GOS were limited by the large variety of α -(1→2) branched GOS obtained with the *Ln. mesenteroides* NRRL B-1299 polyspecific glucansucrase activities in the presence of sucrose and maltose, and by the difficulty to purify them. Thus, here we used the monospecific α -(1→2) branching enzyme GBD-CD2, and purified unbranched compound **1** and compound **4** as acceptors. We characterized α -(1→2) branched GOS successively obtained during the reactions by using LC-MS, ^1H -NMR and ^{13}C -NMR. Structural analysis of the acceptor reaction products obtained from pure compound **1** and compound **4** and sucrose used as glucosyl donor demonstrates that the glucosylation of these molecules is sequential and kinetically controlled. In the presence of the compound **1**, we observed that the glucosyl units coming from sucrose are first transferred onto the non reducing ends of the acceptors through the formation of an α -(1→2) linkage. The resulting pentasaccharide **2** was previously obtained by using the native dextransucrase from *Ln. mesenteroides* NRRL B-1299 in the presence of sucrose and maltose acceptor (Dols *et al.*, 1997). However, using GBD-CD2, we showed that the pentasaccharide **2** product could in turn be glucosylated, and that two vicinal α -(1→6) glucosyl residues can be branched through α -(1→2) linkages.

In the presence of compound **4** acceptor, we also observed the transitory formation of monoglucosylated products which were further glucosylated to produce polybranched compounds containing several contiguous or non-contiguous α -(1→2) branchings. The

diversity revealed in the product profiles shows that the position of the mono-glucosylation is not fixed and can occur on different α -(1→6) linked glucosyl units. This observation is in agreement with the Ping-Pong Bi Bi mechanism previously described for the transglucosidase GBD-CD2 (Brison *et al.*, 2010). In addition, they show that branching occurring on the α -(1→6) linked backbone does not prevent further glucosylation and that the enzyme can accommodate both linear and branched oligosaccharide substrates in its active site. The initial velocity determinations for the glucosylation of compound **1** and compound **4** glucosylation, which are respectively of $106 \pm 24 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ and $163 \pm 22 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$, indicate that the transfer onto long linear products is kinetically favoured. Notably, the initial velocity for the α -(1→2) glucosylation of branched structures **6a** and **6b** is much lower than that observed for unbranched gluco-oligosaccharides. It can be concluded that in the presence of gluco-oligosaccharide mixtures, GBD-CD2 preferentially branches linear products and that poly-branching can only occur in the presence of an excess of sucrose.

Regarding the α -(1→2) glucosylation from sucrose onto dextrans, we had previously shown that the percentage of α -(1→2) linkages can be controlled by the sucrose donor/dextran acceptor molar ratio used during the branching reaction (Brison *et al.*, 2010). We showed herein that by increasing the α -(1→2) branching yield of the 1.5 kDa and 10 kDa dextrans, their hydrolysis rates by amyloglucosidase hydrolysis are reduced. Analysis of the amyloglucosidase hydrolysis products also proves that the isomalto-oligosaccharide branchings do not systematically occur at the non reducing end and are distributed along the chains. Indeed, the 1.5 kDa dextran with 26% of branching was almost totally resistant to the action of the endodextranase. Only a uniform distribution of branching along could explain this phenomenon. We did not observe the same resistance for 10 kDa dextran with 24% of branching. This result indicates that there are probably some regions in these molecules that are not branched and that α -(1→2) branching on vicinal α -(1→6) linked glucosyl residues may be a more frequent event in long dextran chains than in shorter ones. We can suggest that the glucan binding domain of GBD-CD2 may play a role in this phenomenon. The three dimensional conformation of 10 kDa dextran chains in solution compared to 1.5 kDa dextran chains probably plays a role in the branching reaction (Nordmeier, 1993). We can also suggest that the GBD interacts more strongly with long linear α -(1→6) dextran chains.

Indeed, the GBDs of glucansucrases are known to strongly bind dextrans (Komatsu *et al.*, 2007; Suwannarangsee *et al.*, 2007). Interestingly, these results demonstrate that depending on the acceptor chain length, the susceptibility to hydrolytic enzymes is different. This is of importance with regard to the potential prebiotic properties of such molecules. Indeed, it can be expected that by varying the size and the percentage of branching of dextrans, it will be possible to synthesize products with different prebiotic properties due to the different resistance to hydrolytic enzymes.

In conclusion, the α -(1→2) branching reaction catalyzed by the GBD-CD2 enzyme was shown to be kinetically controlled. For the first time, GOS with contiguous α -(1→2) branchings were identified. In addition, the distribution of branched residues along the chains was shown to be dependant on the size of the linear α -(1→6) linked glucosidic chains. A wide range of products showing different resistance patterns to hydrolytic enzymes can thus be synthesized with this enzyme, which can open the way to novel applications in the field of functional foods. Moreover, we showed that the active site of GBD-CD2 can accommodate both linear and branched products glucosylated at vicinal positions. However, to elucidate the mode of branching of GBD-CD2, the 3D structure of the enzyme must be solved to identify the molecular determinants of the branching mode.

III.D. Materials and methods

III.D.1. Production and purification of the GBD-CD2 α -(1→2) transglucosidase and of DSR-S dextransucrase

The methods for the expression and the purification of the transglucosidase GBD-CD2 have been previously described (Brison *et al.*, 2010). DSR-S dextransucrase (EC 2.4.1.5) from *Ln. mesenteroides* was produced and purified according to Lopez *et al.* and Paul F *et al.* (Lopez and Monsan, 1980; Paul *et al.*, 1986).

III.D.2. Enzymatic activity assay of the GBD-CD2 α -(1→2) transglucosidase

One enzymatic unit is defined as the amount of enzyme which catalyses the hydrolysis of 1 μ mol of sucrose per minute at 30°C in 20 mM sodium acetate buffer, pH 5.75, with sucrose at the initial concentration of 292 mM. In the presence of sucrose alone, GBD-CD2 releases fructose and glucose which are monitored by using the dinitrosalicylic acid method (Sumner and Howells, 1935).

III.D.3. Large scale production and purification of compound 1 and compound 4

The GOS are produced at 30°C using native DSR-S at 2000 U.kg⁻¹ from 200 g.kg⁻¹ sucrose and 66 g.kg⁻¹ maltose in 20 mM sodium acetate buffer, pH 5.4. When all the sucrose is depleted, the reaction is stopped by thermal inactivation of the enzyme at 95 °C. During the reaction, dextran is concomitantly produced. Then, one volume of the final reaction medium is mixed overnight with one volume of ethanol 95% to precipitate dextran at 4°C. The supernatant containing GOS is recovered by centrifugation at 9000 rpm during 10 min at 4°C. Ethanol is removed by evaporation and the resulting GOS solution, containing the compound 1 and the compound 4, is used for purification.

The purification of compound 1 and the compound 4 is a multi-step process. First, the resulting GOS solution is cleared out of glucose, fructose, disaccharides and panose by preparative ion exchange chromatography using an Amberlite[®] CR1320K resin (Rohm and Haas, Philadelphia, USA) packed in a double-walled column 11 x 100 cm. The mobile phase is distilled water at a flow rate of 80 mL.min⁻¹. The column temperature was set at 60°C. The injection volume is 250 mL at a total sugar concentration of 400 g.L⁻¹. The eluted saccharides were detected by refractometry. Only the fractions containing GOS of degrees of polymerization (DP) superior to 3 were pooled and freeze-dried. Secondly, GOS of different DP were separated by preparative chromatography using Synergi Fusion RP (10 μ m; 80 Å; Phenomenex) as stationary phase packed in a 40 x 500 mm column. The separation was carried out at room temperature using distilled water at a flow rate of 50 mL.min⁻¹. The GOS

were detected by refractometry. The injection volume was 5 mL at a sugar concentration of 300 g.L⁻¹. The compound **1** and the compound **4** were purified at 99%.

III.D.4. Large-scale production and purification of α -(1→2) branched compound 1 and compound 4

Purified compound **1** and compound **4** were branched using the transglucosidase GBD-CD2 in the following conditions: 100 g.kg⁻¹ sucrose, 25 g.kg⁻¹ purified compound **1** or 30 g.kg⁻¹ compound **4**, 2000 U.kg⁻¹ GBD-CD2, 20 mM sodium acetate buffer, pH 5.4, temperature 30°C. Purifications of α -(1→2) branched compound **1** and compound **4** were carried out in the same conditions than for compound **1** and **4**.

III.D.5. Small-scale acceptor reactions onto compound 1 and compound 4

From pure compound **1** and compound **4**, α -(1→2) glucosylation reactions from sucrose for analytical purposes were carried out in the following conditions: 292 mM sucrose, acceptor compound **1** or compound **4** at a concentration of 40 mM, 1 U.mL⁻¹ GBD-CD2, 30°C, in 20 mM sodium acetate buffer at pH 5.75 during 24 h. For initial velocity determinations, the enzyme concentration was lowered to 0.1 U.mL⁻¹.

III.D.6. Enzymatic synthesis of dextrans with controlled amounts of α -(1→2) linkages

Dextrans with controlled amounts of α -(1→2) branches were synthesized, as previously described, with dextran 1.5 kDa, (M_p 1,586 g.mol⁻¹, M_w 2,111 g.mol⁻¹, M_n 755 g.mol⁻¹, M_z 4,533 g.mol⁻¹, $M_w/M_n = 2.80$, Fluka, Biochemika) and dextran 10 kDa (\overline{M}_w 10,100 g.mol⁻¹, $M_w/M_n = 1.6$, Amersham Biosciences) as substrates (Brison *et al.*, 2010). The α -(1→2) branching ratios for both dextran substrates that were aimed at, were 5, 10, 15, 20, 25%. Effective percentages of α -(1→2) linkages were calculated, based on molar balances

obtained through HPAEC-PAD analyses, as the molar ratio between the glucosyl moieties from sucrose effectively transferred onto dextrans and the total amount of anhydroglucosyl units in branched dextrans. Molarity of glucosyl moieties transferred onto dextran is calculated as the initial sucrose molarity minus the glucosyl units transferred onto water (hydrolysis), fructose (leucrose) or contained in residual sucrose. Aliquots of these α -(1→2) branching reactions at the initial and final times of the reaction were withdrawn for subsequent enzymatic degradations.

III.D.7. Enzymatic degradations of α -(1→2) branched compound 4 and dextrans

Aliquots of α -(1→2) branched dextrans at initial and final times of the branching reactions were submitted to the action of *Chaetomium gracile* endodextranase (6- α -D-glucan 6-glucanohydrolase; EC 3.2.1.11) (Sankyo Co) at 3 U.mL⁻¹ of reaction media at 37°C, or by the amyloglucosidase (glucan 1,4- α -glucosidase ; EC 3.2.1.3) of *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich) at final concentrations ranging from 25 to 9 U.mL⁻¹ depending on the amount of dextran to be hydrolyzed, at 60°C (Hattori *et al.*, 1981; Pazur and Ando, 1960). Aliquots of the reaction media were heat inactivated at 95°C for 15 min. α -(1→2) branched products obtained from the branching reaction with the compound 4 were degraded in same manner by the amyloglucosidase.

III.D.8. Analytic chromatography

III.D.8.a. GOS analysis by HPLC and LC-MS

The different GOS were separated by HPLC on a Dionex System equipped with a Synergi Fusion RP column (4 μ m; 80 Å; 250 x 4.6 mm Phenomenex) using ultrapure water as eluent at 0.5 mL.min⁻¹. The temperature oven was set at 30°C. The detection system is a refractometer.

The polymerization degree of gluco-oligosaccharides was determined by LC-MS with the above HPLC conditions. Using a MSQ[®] Plus Mass Spectrometer (Dionex - Thermoscientific equipment), molecules were ionised by electrospray ionisation technique with a source at 450°C. Separation was achieved with a quadrupole and detected using the positive mode.

III.D.8.b. HPLC assays of glucose and fructose for initial velocity determinations

The initial velocities of sucrose consumption and glucose or fructose productions were determined with the HPLC system described above using an Aminex HPX-87C Carbohydrate column (300x7.7 mm; Bio-rad, Hercules, CA, USA). The glucose production rate reflects the sucrose hydrolysis reaction whereas fructose minus glucose and leucrose production rates is representative of the α -(1→2) glucosylation activity.

III.D.8.c. HPAEC-PAD analysis

HPAEC-PAD analysis were carried out as described by Fabre *et al.* using a CarboPac[™] PA100 (4x250 mm) analytical column with a CarboPac[™] PA-100 Guard (4x50 mm) (Fabre *et al.*, 2005). The detection system is a Dionex ED40 module with a gold working electrode and an Ag/AgCl pH reference. For α -(1→2) branched dextrans 10 kDa and their degradation products, a total 48 min sodium acetate gradient in 150 mM NaOH was applied as follows: from 6 mM to 63 mM in 6 min, from 63 mM to 450 mM in 34 min, a step at 450 mM during 2 min, from 450 mM to 6 mM in 1 min and 5 min at 6 mM. For α -(1→2) branched dextrans 1.5 kDa, the gradient was applied as follows from 6 mM to 300 mM in 30 min and from 300 mM to 6 mM in 5 min. The dextrans were diluted with ultrapure water to reach a total dextran concentration of 40 mg.L⁻¹. Glucose, fructose, sucrose, leucrose, isomaltose and isomaltotriose were used as standards for quantification.

However, quantification of all isomalto-oligosaccharides was hampered by the absence of individual isomalto-oligosaccharide standards. It is not possible to extrapolate factor responses for isomalto-oligosaccharides since the relationship between chain-length and

detector response factor is governed by a complex declining multi-exponential function (Goulas *et al.*, 2004).

III.D.9. 1D and 2D NMR analyses

Samples were exchanged twice with 99,9 atom% D₂O, lyophilized and dissolved in 600 μ L D₂O.

All 1D NMR spectra were recorded on an Avance II (Bruker) 500 MHz spectrometer (500 MHz for ¹H NMR and 125 MHz for ¹³C NMR) using a 5 mm z-gradient TBI probe. The data were acquired and processed using topspin 2.1 software. The temperature was 298 K. 1D ¹H NMR spectra were acquired by using a 30° pulse, 8000 Hz sweep width and 5 s total relaxation delay. A total of 16 scans were recorded. 1D ¹³C NMR spectra were recorded using an inverse gated sequence taken from the Bruker pulse sequence library, and using a 90° pulse, 25,000 Hz sweep width, 2.5 s relaxation delay and 0.63 s. acquisition time.

Heteronuclear multiple bond correlation spectroscopy (HMBC) experiments were recorded on a BRUKER Avance 400 spectrometer (proton frequency of 400.13 MHz and ¹³C frequency of 100.62 MHz) using the BRUKER standard pulses program. The delay time for evolution of long-range ¹³C-¹H couplings was set to 120 ms. Typical used parameters were 1200 Hz spectral width for ¹H and 22,130 Hz for ¹³C, 16 scans and 196 experiments were accumulated. Samples were analyzed at 300.3 K in 5 mm o.d. tubes. Chemical shifts are given using an external reference (d6-trimethylsilylpropionic acid, sodium salt).

III.D.10. High-resolution mass spectrometry

(i) Sample preparation

The samples were dissolved (0.01 mg.mL⁻¹) in a methanol/water 50:50 (v/v) mixture and the solutions obtained were injected (5 μ l.min⁻¹) with a syringe pump (Harvard Apparatus) into the electrospray source.

(ii) Mass spectrometry

Infusion electrospray mass spectra in the positive mode were obtained on a Waters-Micromass Q-TOF2 and a Waters-Micromass LC-TOF equipped with a pneumatically

assisted electrospray (Z-spray) ion source. The source and desolvation temperatures were kept at 80 and 120°C respectively. Nitrogen was used as drying and nebulizing gas at flow rates of 500 and 20 L.h⁻¹, respectively. The capillary voltage was 3.0 kV and cone voltage 35 V. For collision-induced dissociation experiments (CID), argon was used as collision gas at an indicated analyzer pressure of 5×10^{-5} Torr and the collision energy was set to 85 V.

IV. Acknowledgements

Yoann Brison is supported by a grant from the region Midi-Pyrénées, France. We acknowledge insightful discussions with Sandrine Laguerre.

References

A

Amarila, M., Maksum, R., Slavko, K., Lubbert, D., 2009. Screening of lactic acid bacteria from Indonesia reveals glucansucrase and fructansucrase genes in two different *Weissella confusa* strains from soya. FEMS Microbiol Lett 300, 131-138.

André, I., Potocki-Véronèse, G., Morel, S., Monsan, P., Remaud-Siméon, M., 2010. Sucrose-Utilizing Transglucosidases for Biocatalysis, in: Springer (Ed.), [Without title], Top Curr Chem. Berlin - Heidelberg, pp. 1-24.

B

Bertrand, A., Morel, S., Lefoulon, F., Rolland, Y., Monsan, P., Remaud-Simeon, M., 2006. *Leuconostoc mesenteroides* glucansucrase synthesis of flavonoid glucosides by acceptor reactions in aqueous-organic solvents. Carbohydr Res 341, 855-863.

Boucher, J., Daviaud, D., Simeon-Remaud, M., Carpene, C., Saulnier-Blache, J.S., Monsan, P., Valet, P., 2003. Effect of non-digestible gluco-oligosaccharides on glucose sensitivity in high fat diet fed mice. J Physiol Biochem 59, 169-173.

Bounaix, M.S., Gabriel, V., Morel, S., Robert, H., Rabier, P., Remaud-Siméon, M., Gabriel, B., Fontagné-Faucher, C., 2009. Biodiversity of Exopolysaccharides Produced from Sucrose by Sourdough Lactic Acid Bacteria. J Agric Food Chem 57, 10889-10897.

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.

Brisson, Y., Fabre, E., Moulis, C., Portais, J.-C., Monsan, P., Remaud-Siméon, M., 2010. Synthesis of dextrans with controlled amounts of α -1,2 linkages using the transglucosidase GBD-CD2. Appl Microbiol Biotechnol 86, 545-554.

C

Cantarel, B.L., Coutinho, P.M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., Henrissat, B., 2009. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. Nucl Acids Res 37, D233-238.

Côté, G.L., Dunlap, C.A., Vermillion, K.E., 2009. Glucosylation of raffinose via alternansucrase acceptor reactions. Carbohydr Res 344, 1951.

D

Djouzi, Z., Andlueux, C., 1997. Compared effects of three oligosaccharides on metabolism of intestinal microflora in rats inoculated with a human faecal flora. Br J Nutr 78, 313-324.

Dols, M., Simeon, M.R., Willemot, R.M., Vignon, M.R., Monsan, P.F., 1997. Structural characterization of the maltose acceptor-products synthesized by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 dextransucrase. Carbohydr Res 305, 549-559.

F

Fabre, E., Bozonnet, S., Arcache, A., Willemot, R.M., Vignon, M., Monsan, P., Remaud-Simeon, M., 2005. Role of the two catalytic domains of DSR-E dextransucrase and their involvement in the formation of highly alpha-1,2 branched dextran. *J Bacteriol* 187, 296-303.

Flickinger, E.A., Wolf, B.W., Garleb, K.A., Chow, J., Leyer, G.J., Johns, P.W., Fahey, G.C., Jr., 2000. Glucose-based oligosaccharides exhibit different in vitro fermentation patterns and affect in vivo apparent nutrient digestibility and microbial populations in dogs. *J Nutr* 130, 1267-1273.

G

Goulas, A.K., Fisher, D.A., Grimble, G.K., Grandison, A.S., Rastall, R.A., 2004. Synthesis of isomaltooligosaccharides and oligodextrans by the combined use of dextransucrase and dextranase. *Enzyme Microb Technol* 35, 327 - 338.

H

Hattori, A., Ishibashi, K., Minato, S., 1981. The purification and characterization of the dextranase of *Chaetomium gracile*. *Agric Biol Chem* 45, 2409-2416.

Henrissat, B., Davies, G., 1997. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr Opin Struct Biol* 7, 637 - 644.

I

Iliev, I., Vassileva, T., Ignatova, C., Ivanova, I., Haertlé, T., Monsan, P., Chobert, J.M., 2008. Gluco-oligosaccharides synthesized by glucosyltransferases from constitutive mutants of *Leuconostoc mesenteroides* strain Lm 28. *J Appl Microbiol* 104, 243-250.

K

Kobayashi, I., Matsuda, K., 1977. Structural characteristics of dextran synthesized by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. *Agric Biol Chem* 41, 1931-1937.

Komatsu, H., Katayama, M., Sawada, M., Hirata, Y., Mori, M., Inoue, T., Fukui, K., Fukada, H., Kodama, T., 2007. Thermodynamics of the Binding of the C-Terminal Repeat Domain of *Streptococcus sobrinus* Glucosyltransferase-I to Dextran. *Biochemistry* 46, 8436-8444.

L

Lopez, A., Monsan, P., 1980. Dextran synthesis by immobilized dextran sucrose. *Biochimie* 62, 323-329.

M

Monchois, V., Willemot, R.M., Monsan, P., 1999. Glucansucrases: mechanism of action and structure-function relationships. *FEMS Microbiol Rev* 23, 131-151.

Moon, Y.H., Nam, S.H., Kang, J., Kim, Y.M., Lee, J.H., Kang, H.K., Breton, V., Jun, W.J., Park, K.D., Kimura, A., Kim, D., 2007. Enzymatic synthesis and characterization of arbutin glucosides using glucansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* B-1299CB. *Appl Microbiol Biotechnol* 77, 559-567.

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 sobrinus* alpha-glucosyltransferases. *J Biol Chem* 266, 8916-8922.

N

Nordmeier, E., 1993. Static and dynamic light-scattering solution behavior of pullulan and dextran in comparison. *J Phys Chem* 97, 5770-5785.

P

Paul, F., Oriol, E., Auriol, D., Monsan, P., 1986. Acceptor reaction of a highly purified dextransucrase with maltose and oligosaccharides. Application to the synthesis of controlled-molecular-weight dextrans. *Carbohydr Res* 149, 433-441.

Pazur, J.H., Ando, T., 1960. The Hydrolysis of Glucosyl Oligosaccharides with alpha-(1→4) and alpha-(1→6) Bonds by Fungal Amyloglucosidase. *J Biol Chem* 235, 297-302.

R

Remaud-Simeon, M., Lopez-Munguia, A., Pelenc, V., Paul, F., Monsan, P., 1994. Production and use of glucosyltransferases from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 for the synthesis of oligosaccharides containing α -(1→2) linkages. *Appl Biochem Biotechnol* 44, 101-117.

S

Sanz, M.L., Cote, G.L., Gibson, G.R., Rastall, R.A., 2006. Influence of glycosidic linkages and molecular weight on the fermentation of maltose-based oligosaccharides by human gut bacteria. *J Agric Food Chem* 54, 9779-9784.

Seymour, F.R., Knapp, R.D., Bishop, S.H., 1979. Correlation of the structure of dextrans to their ¹H-n.m.r. Spectra. *Carbohydr Res* 74, 77.

Sumner, J., Howells, S., 1935. A method for determination of invertase activity. *J Biol Chem* 108, 51-54.

Suwannarangsee, S., Moulis, C., Potocki-Veronese, G., Monsan, P., Remaud-Simeon, M., Chulalaksananukul, W., 2007. Search for a dextransucrase minimal motif involved in dextran binding. *FEBS Lett* 581, 4675-4680.

V

Valette, P., Pelenc, V., Djouzi, Z., Andrieux, C., Paul, F., Monsan, P., Szylit, O., 1993. Bioavailability of new synthesised glucooligosaccharides in the intestinal tract of gnotobiotic rats. *J Sci Food Agric* 62, 121-127.

van Hijum, S.A., Kralj, S., Ozimek, L.K., Dijkhuizen, L., van Geel-Schutten, I.G., 2006. Structure-function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 157-176.

**Chapitre IV : Caractérisations structurale et fonctionnelle de la
transglucosidase ΔN_{123} -GBD-CD2 spécifique de la formation de
liaisons α -(1→2) glucosidiques**

Dans les deux chapitres précédents nous avons caractérisé les produits synthétisés par GBD-CD2 en présence de dextranses ou de gluco-oligosaccharides (GOS). Afin de pouvoir initier l'étude des relations structure - activité de cette protéine et identifier les facteurs structuraux déterminant la régiospécificité de GBD-CD2, nous avons entrepris de résoudre la structure tridimensionnelle de cette enzyme.

Des essais de cristallisation ont été menés avec l'enzyme GBD-CD2 purifiée. Toutefois, aucune des conditions testées n'a abouti à la formation de cristaux. Nous avons postulé que le GBD, un domaine riche en résidus aromatiques et hydrophobes, pouvait gêner la cristallisation de cette enzyme. Nous avons entrepris la construction de douze variants tronqués à l'extrémité N-terminale. La forme active la plus courte que nous avons isolée est le variant ΔN_{123} -GBD-CD2. Ayant une masse molaire de 123 kDa, cette protéine présente un GBD tronqué de 76%. La caractérisation biochimique de ΔN_{123} -GBD-CD2 a prouvé que ce variant présente une activité catalytique tout à fait comparable à celle de l'enzyme parente GBD-CD2.

ΔN_{123} -GBD-CD2 a donc été retenue et sa structure a été déterminée à une résolution de 3,2 Å. Cette structure est très originale. En effet, la chaîne polypeptidique se replie sur elle-même en formant un U dans lequel quatre domaines distincts ont été identifiés. Cette structure présente des caractéristiques communes avec celle de GTF180- ΔN . Notamment, elle révèle la présence d'un domaine catalytique comprenant un tonneau (β/α)₈ présentant des liens de parenté avec celui des amylases. Le site actif de ΔN_{123} -GBD-CD2 est situé à l'interface de ce domaine et du domaine B présent lui aussi chez les α -amylases. Le site actif a la forme d'une gorge au fond de laquelle se trouve une poche fixant le saccharose. Le sous-site -1 est très similaire à celui de GTF-180- ΔN . Cependant, des différences majeures sont observées entre les deux enzymes au niveau du sous-site +1, des résidus tapissant la gorge catalytique et des boucles présentes dans la partie supérieure de la gorge.

Structural and functional characterizations of an α -(1 \rightarrow 2) branching enzyme derived from DSR-E dextransucrase

Yoann Brison, Tjaard Pijning, Samuel Tranier, Émeline Fabre, Lionel Mourey, Sandrine Morel, Gabrielle Potocki - Véronèse, Pierre Monsan, Magali Remaud-Siméon, Bauke W. Dijkstra

I. Summary

GBD-CD2 is a truncated enzyme that was constructed from DSR-E dextransucrase. From sequence alignment, this recombinant enzyme is classified in the family 70 of glycoside-hydrolases. However, the activity of GBD-CD2 is unique and diverges from that of all the other members of GH70 family. Unlike all the other glucansucrases, GBD-CD2 is unable to catalyze glucan synthesis from sucrose. Indeed, from sucrose donor, GBD-CD2 catalyzes the synthesis of α -(1 \rightarrow 2) branches onto linear gluco-oligosaccharides ([6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow)_n- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)-D-Glcp, with 1<n<7) or dextrans and was thus named α -(1 \rightarrow 2) branching enzyme. In order to investigate the structure function relationship studies of this original enzyme, we have constructed a truncated form of GBD-CD2, namely ΔN_{123} -GBD-CD2. The variant reduced in size by 76% showed the same regiospecificity as GBD-CD2 and a remarkable ability to catalyze the synthesis of dextran with controlled amounts of α -(1 \rightarrow 2) linkages. This truncated form crystallized and its structure was solved at 3.2 Å resolution by molecular replacement using a mix model based on the structure of domains A, B and C of GTF180- ΔN . Like GTF180- ΔN , ΔN_{123} -GBD-CD2 adopts the unusual U-shape structure organized in five distinct domains named C, A, B, IV and V, showing that this fold is probably common to all the other glucansucrases from family 70 and has evolved from GH13 family enzyme fold. While the residues at subsite -1 involved in the glucosyl binding

of sucrose are strictly conserved in both GTF180- ΔN and ΔN_{123} -GBD-CD2, the analysis of subsite +1 enabled to pinpoint non conserved residues probably involved in the enzyme regiospecificity. In addition, at the upper part of the catalytic gorge, three loops are shown to be very specific to ΔN_{123} -GBD-CD2. In addition, except for -1 and +1 subsites, most of the side-chains residues that define the catalytic gorge are not conserved. Sequence alignment with glucansucrases differing in regiospecificity indicates that many of these molecular features are specific to ΔN_{123} -GBD-CD2. They probably govern the recognition of GOS and dextran acceptors together with their correct positioning allowing the formation of the α -(1 \rightarrow 2) branches.

II. Introduction

Glucansucrases (EC 2.4.1.5) are transglucosidases that naturally catalyze the polymerization of glucosyl residues with a concomitant fructose release when using sucrose as sole substrate. In addition to the polymerization reaction, they are also capable of transferring the glucosyl moiety onto a wide variety of acceptors such as saccharides, alcohols and flavonoids (André *et al.*, 2010). As both polymerization and acceptor reactions do not require the use of nucleotide activated sugars, these enzymes stand as very attractive biocatalysts for the production of novel biopolymers or new glucoderivatives (Monsan *et al.*, 2010). They were discovered in the 1950's thanks to the pioneer work of Koepsell *et al.* and Hehre *et al.* (Hehre and Hamilton, 1946; Koepsell and Tsuchiya, 1952). Later on, sequence analysis enabled to distinguish two classes of glucansucrases, those produced by Gram negative bacteria from *Neisseria*, *Deinococcus* or *Alteromonas* genera (De Montalk *et al.*, 1999; Emond *et al.*, 2008; Ha *et al.*, 2009; Pizzut-Serin *et al.*, 2005) and those produced by Gram positive lactic acid bacteria from the *Weissella*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* and *Streptococcus* genera (André *et al.*, 2010). The first category corresponds to amylosucrases. They synthesize an amylose-like polymer from sucrose and, up to now, have been shown to synthesize only α -(1 \rightarrow 4) glucosidic linkages. These α -retaining enzymes all belong to the family 13 of glycoside-hydrolases. The structure of the amylosucrase from *Neisseria polysaccharea* was solved in 2001 and was, until recently, the only available structure of glucansucrase. Structural analyses of amylosucrases, alone or in complex with both sucrose

substrate and malto-oligosaccharide products, enabled to propose a reaction mechanism of polymer formation (Albenne *et al.*, 2007).

Contrary to the glucansucrases produced by Gram negative bacteria, the enzymes produced by lactic acid bacteria catalyze a much larger variety of glucans containing all types of osidic bonds, namely α -(1 \rightarrow 2), α -(1 \rightarrow 3), α -(1 \rightarrow 4), or α -(1 \rightarrow 6), and varying in terms of size, structure, degree of branches and spatial arrangements (Monsan *et al.*, 2010). More than one-hundred and eight primary structures of glucansucrases from lactic acid bacteria are available. With a predicted molecular size of more than 160 kDa, these enzymes are rather large proteins. From sequence analysis, most of the enzymes from GH70 family were predicted to be organized in three domains consisting of a variable region at the N-terminus, a conserved catalytic domain, and a C-terminal domain. Specific repeats, showing homology with cell wall binding repeats (CW), are often flanking the catalytic domain. They are of about twenty amino acids long and contain conserved glycine and aromatic residues. They have been shown to promote glucan binding in several glucansucrases. For this reason, the domain enriched in these repeats is often called Glucan Binding Domain (GBD) (Shah *et al.*, 2004). Sequence comparisons of glucansucrase catalytic domains coupled to mutagenesis experiments further revealed that these enzymes are structurally and mechanistically related to family GH13. They are also α -retaining enzymes and sucrose cleavage was predicted to occur through the formation of a β -D-glucosyl covalent intermediate involving the concerted action of an aspartic acid and a glutamic acid, which act as the nucleophile and the acid-base catalyst, respectively. Biochemical characterizations and protein engineering of DSR-S and alternansucrase, two glucansucrases produced by *Ln. mesenteroides* NRRL B-512F and NRRL-B-1355, respectively, showed that the polymer formation involves one catalytic site and that the polymer is elongated by its non-reducing end (Moulis *et al.*, 2006). Secondary structure predictions also suggested that the catalytic domain of glucansucrases consists of a $(\beta/\alpha)_8$ barrel circularly permuted compared with that of family GH13 enzymes. On this basis, glucansucrases from lactic acid bacteria were classified in the GH70 family (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>), which forms with GH13 and GH77 families the clan GH-H. These predictions have been recently confirmed by the crystal structure of GTF180- ΔN , the first structure of a GH70 glucansucrase, recently reported by Vujicic-Zagar A. and Pijning T. (Pijning *et al.*, 2008; Vujicic-Zagar, 2007). The structure of GTF180- ΔN revealed

that the protein is folded into five separate domains, namely A, B, C, IV and V. The major finding, which was not anticipated but is in agreement with the predicted permutation, is the unusual folding of the polypeptide chain. Indeed, it makes a “U-turn” in which the two stems of the U participates in the formation of domains A, B, IV and V. The domain C is the only one that results from the arrangement of one polypeptide segment. Crystallization of glucansucrases has been a challenge for many years due to the large size of these proteins probably conjugated to a high flexibility. Indeed, GTF180 produced by *Lactobacillus reuteri* 180 had to be truncated at the N-terminus for the X-ray determination of its structure at high resolution. This enzyme is specific for the synthesis of a glucan polymer that mainly contains α -(1 \rightarrow 6) linkages and the analysis of its active site allowed to identify some of the determinants of its specificity.

The present study is focused on another member of family GH70, the α -(1 \rightarrow 2) branching enzyme GBD-CD2. This enzyme was obtained by truncation of DSR-E, a glucansucrase produced by *Ln. mesenteroides* NRRL B-1299 (recently reclassified as *L. citreum*; unpublished). DSR-E is a very original glucansucrase. It naturally synthesizes an α -(1 \rightarrow 6) glucan and gluco-oligosaccharides, with α -(1 \rightarrow 2) linked branches. Sequence analyses of this very large enzyme (313 kDa) revealed the presence of two catalytic domains, namely CD1 and CD2, separated by a GBD. Both domains are homologous to the other catalytic domains of GH70 glucansucrases and exhibit 45% identity and 65% similarity (Bozonnet *et al.*, 2002). They both contain the highly conserved amino acids proposed to be involved in the formation of the glucosyl enzyme intermediate. Asp527 in CD1 and Asp2210 in CD2 were proposed to play the role of the nucleophile in each independent domain. Glu565 in CD1 and Glu2248 in CD2 were assigned the role of the general acid-base catalyst. Biochemical characterization of recombinant truncated forms of DSR-E (*ie* CD1-GBD and GBD-CD2) showed that CD1-GBD was a polymerase that produces a glucan containing a majority of α -(1 \rightarrow 6) osidic bonds and a few percentages of α -(1 \rightarrow 3) glucosidic bonds (Fabre *et al.*, 2005). The second form (GBD-CD2) was found to be responsible for the exclusive synthesis of α -(1 \rightarrow 2) branches. Indeed, this enzyme acts as a very efficient transglucosidase in the presence of sucrose and either linear α -(1 \rightarrow 6) glucans (dextrans) or linear gluco-oligosaccharides, which are used as acceptors. Steady-state kinetic analysis of α -(1 \rightarrow 2) branch formation revealed that the enzyme adopts a Ping-Pong Bi-Bi mechanism and can branch adjacent

glucosyl residues linked by α -(1 \rightarrow 6) osidic bonds. In addition, experimental conditions have been established that enable the production of new polymers with controlled sizes and α -(1 \rightarrow 2) linkage contents (Brison *et al.*, 2010). The presence of α -(1 \rightarrow 2) linkages in gluco-oligosaccharides renders these products resistant to the action of animal digestive enzymes and promotes the growth of beneficial bacteria of the human gut microbiota (Djouzi and Andlueux, 1997; Djouzi *et al.*, 1995; Flickinger *et al.*, 2000; Valette *et al.*, 1993).

Due to its unique specificity, GBD-CD2 holds a great potential for the production of novel functional food. However, structure-function relationship studies and enzyme engineering are limited by the absence of three-dimensional structure. In particular, the molecular features responsible for its specificity are still unknown. This work presents the X-ray structure of a truncated form of GBD-CD2 obtained at 3.2 Å resolution. This is the first 3D-structure of an α -(1 \rightarrow 2) branching enzyme belonging to GH70 family. When compared to the structural data of GTF180- Δ N, these data revealed common but also very distinctive features which will be discussed with regard to GBD-CD2 specificity.

III. Results and discussion

III.A. Construction and expression of truncated GBD-CD2 enzymes

All attempts to crystallize the full length GBD-CD2 failed. We assumed that the long and quite hydrophobic GBD (849 amino acids) located at the N-terminal end of the protein may favour protein aggregation and interfere with the crystal packing. Indeed, this GBD contains forty one consecutive repeated units, which are rich in aromatic residues and could promote hydrophobic interactions. These repeats were shown to be homologous to the Cell Wall binding units (CW, Pfam family PF01473) of the C-terminal choline binding domain of *Streptococcus pneumoniae* autolysin (C-LytA) (Fernandez-Tornero *et al.*, 2001). The three dimensional structure of C-LytA was thus used to target twelve sites of truncation in the GBD which enabled us to increment the number of CW like repeats at the N-terminal end of the protein (Figure 37).

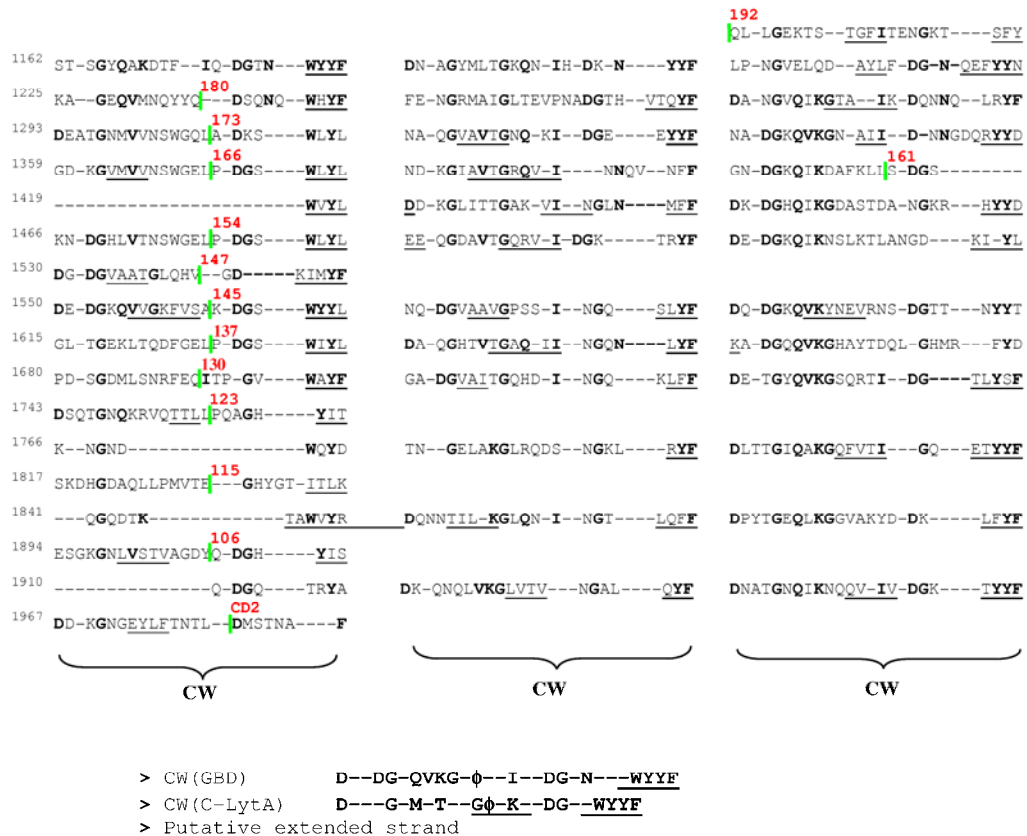
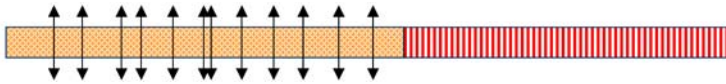




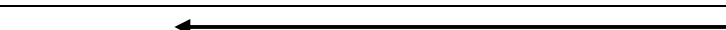
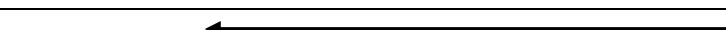


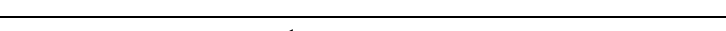
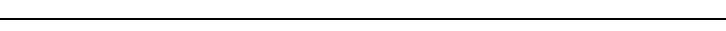
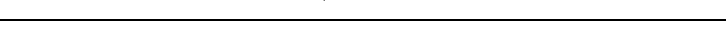
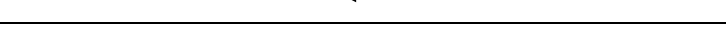


Figure 37: Truncation sites (green marks) on the aligned glucan binding domain of GBD-CD2. In red, molecular masses. On the left, numbering refers to DSR-E enzyme sequence available in GenBank. Strongly conserved residues are printed in boldface type. D'après (Bozonnet *et al.*, 2002).

The truncated genes were expressed in *E. coli*. Of the twelve constructs, only three yielded active proteins *ie* ΔN_{180} -GBD-CD2, ΔN_{147} -GBD-CD2 and ΔN_{123} -GBD-CD2 (Table 7).

The shortest active truncated form, ΔN_{123} -GBD-CD2 exhibits a glucan binding domain reduced by 76% and was retained for further characterization. The cultivation conditions of the recombinant *E. coli* strain were optimized and the best enzyme production level was obtained by adjusting the inducer concentration (L-arabinose) to 0.02% (wt/v). We could not avoid the formation of inclusion bodies but made profit of their formation to isolate and purify them. Using these conditions of expression, after the denaturation of inclusion bodies and refolding of the recombinant enzyme, the enzyme production level reached 2,300 U.L⁻¹ of culture.

Table 7: Truncated enzymes constructed from GBD-CD2-V5-His₆. When expressed and active, enzymes are marked by +.

Forward primer name	Size of recombinant enzymes (kDa)	Schematic representation of truncated enzymes	
			Expressed and active enzymes
For_pBadD_ΔN ₁₈₀	180		+
For_pBadD_ΔN ₁₇₃	173		-
For_pBadD_ΔN ₁₆₆	166		-
For_pBadD_ΔN ₁₆₁	161		-
For_pBadD_ΔN ₁₅₄	154		-
For_pBadD_ΔN ₁₄₇	147		+
For_pBadD_ΔN ₁₄₅	145		-
For_pBadD_ΔN ₁₃₇	137		-
For_pBadD_ΔN ₁₃₀	130		-
For_pBadD_ΔN ₁₂₃	123		+
For_pBadD_ΔN ₁₁₅	115		-
For_pBadD_ΔN ₁₀₆	106		-

III.B. Purifications of GBD-CD2 and ΔN_{123} -GBD-CD2

The purification procedure which included inclusion bodies isolation, IMAC and IEC yielded 14 mg of purified enzyme per liter of culture. As seen on SDS-PAGE (Figure 38), the predicted Mr of the purified enzymes are in agreement with the estimated Mr of the main protein revealed on the gel. Two minor degradation forms of 92 and 59 kDa can be observed. The specific activities of ΔN_{123} -GBD-CD2 and GBD-CD2 preparations are of 44.6 ± 9.6 U.mg⁻¹ and 28.3 ± 8.9 U.mg⁻¹, respectively.

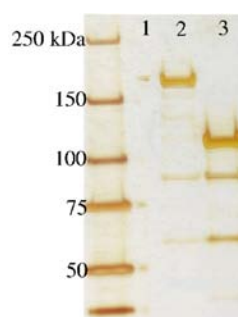


Figure 38: Silver-stained SDS-PAGE of purified GBD-CD2 and ΔN_{123} -GBD-CD2 (3 - 8 % Tris-Acetate precasted gel; Invitrogen). 1, no loaded protein; 2, purified GBD-CD2 enzyme; 3, purified ΔN_{123} -GBD-CD2 enzyme.

III.C. Comparison of ΔN_{123} -GBD-CD2 with the full length GBD-CD2

We first compared the profiles of the products synthesized from sucrose alone. ΔN_{123} -GBD-CD2 and GBD-CD2 mainly catalyze sucrose hydrolysis (Figure 39). Around 73% of the glucosyl residues are transferred from sucrose onto water. Several by-products such as leucrose (α -D-Glcp-(1 \rightarrow 5)-D-Frup) and kojibiose (α -D-Glcp-(1 \rightarrow 2)-D-Glcp) and traces of maltulose are also produced in equivalent yields by both enzymes. They correspond to glucosyl transfer onto fructose and glucose moieties released by hydrolysis. The product profiles and yields obtained with ΔN_{123} -GBD-CD2 and the full length enzyme are thus comparable.

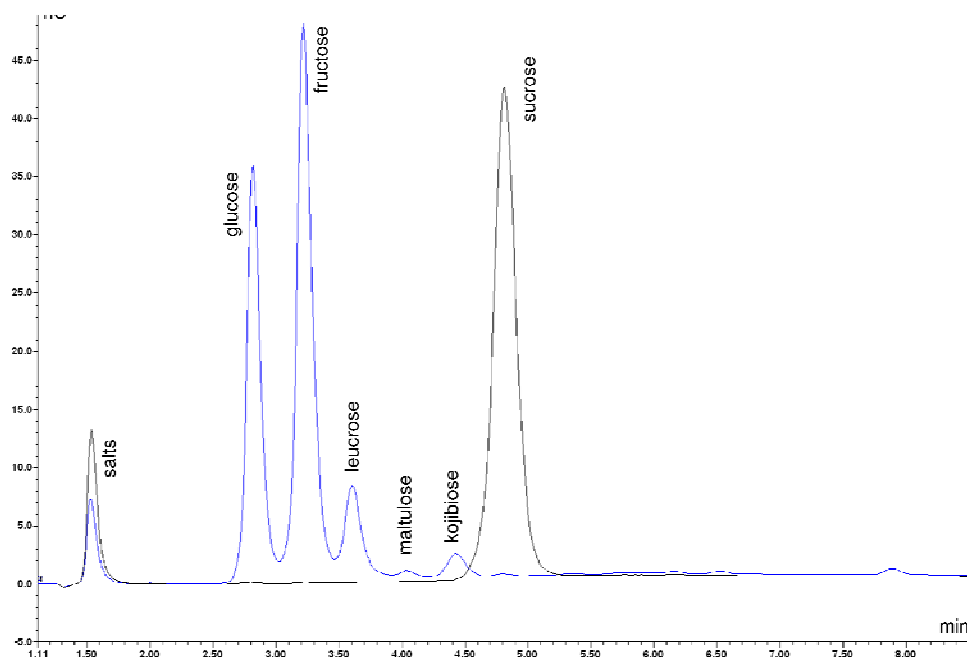


Figure 39: HPAEC-PAD chromatograms for the reaction in the presence of sucrose and catalyzed by ΔN_{123} -GBD-CD2. Initial time of the reaction (black) and final (blue).

Table 8: Comparison of the glucosyl unit destination from sucrose at the end of enzymatic reactions in the presence or absence of acceptors. Reactions carried out either with GBD-CD2 or ΔN_{123} -GBD-CD2 branching enzymes. Products were quantified by HPAEC-PAD using appropriate standards.

		Sucrose consumption (%)	% of α -D-glucosyl units from sucrose donor transferred onto				
			Water ^a	Glucose (Kojibiose formation)	Fructose (Leucrose formation)	Glucose or fructose (other disaccharides)	Exogenous acceptors
GBD-CD2	No exogenous acceptor	89	74	6	22	0	-
	Maltose	88	71	5	21	0	0
	GOS	96	20	5	29	0	47
ΔN_{123}-GBD-CD2	No exogenous acceptor	100	73	5	21	2	-
	Maltose	100	72	5	23	1	0
	GOS	99	24	5	29	0	42

(i) Acceptor reaction with sucrose and maltose as acceptor

In the presence of sucrose donor and maltose acceptor, the product profile was similar to that obtained with sucrose alone (Figure 40). ΔN_{123} -GBD-CD2 behaves like GBD-CD2 and does not recognize maltose as acceptor.

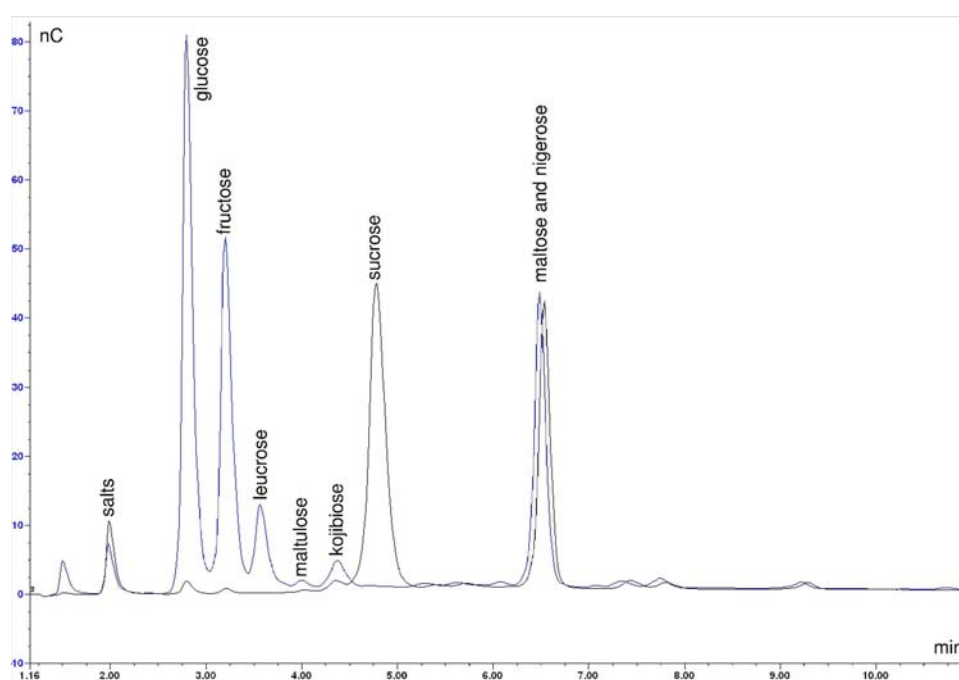


Figure 40: HPAEC-PAD chromatograms for the acceptor reaction in the presence of maltose and catalyzed by ΔN_{123} -GBD-CD2. Initial time of the reaction (black) and final (blue).

(ii) Acceptor reaction with sucrose and GOS as acceptor

In the presence of linear GOS acceptors, 52% and 54% of the glucosyl residues were transferred from sucrose onto the acceptors by GBD-CD2 and ΔN_{123} -GBD-CD2, respectively (Table 8). This reaction occurs at the expense of sucrose hydrolysis and kojibiose formation. Leucrose synthesis remains comparable to that observed in the absence of acceptors. As shown in Figure 41, the newly formed products display the retention times of α -(1 \rightarrow 2) branched GOS (Fabre *et al.*, 2005). This shows that the GBD-CD2 truncation does not affect its specificity.

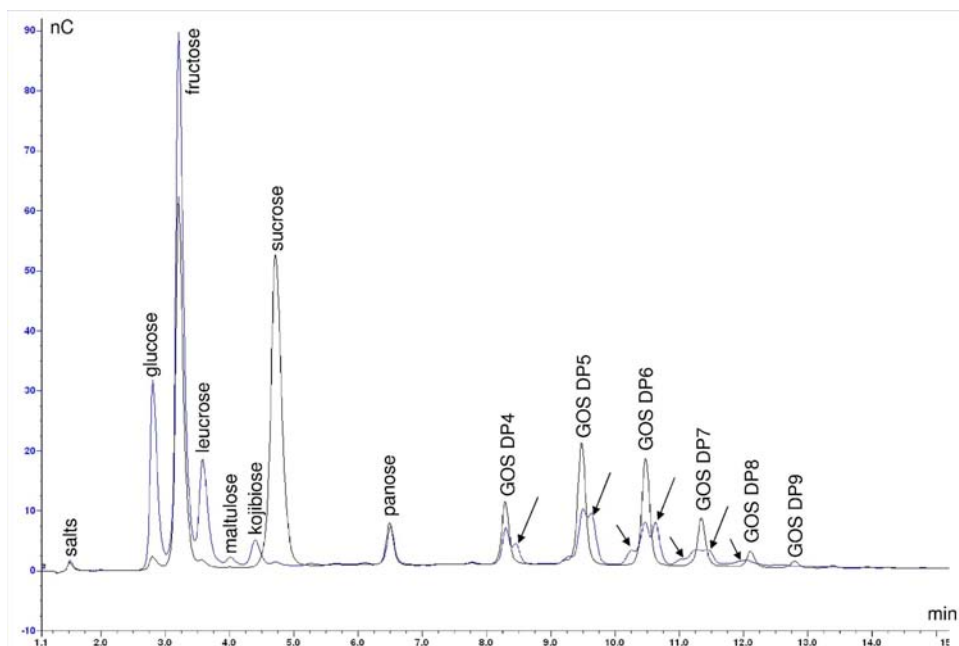


Figure 41: HPAEC-PAD chromatograms of the acceptor reaction in the presence of linear GOS and catalyzed by ΔN_{123} -GBD-CD2. Initial time of the reaction (black) and final (blue).

GOS DP n stands for gluco-oligosaccharides of the following structures $([6)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow)_n\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow4)\text{-D-Glcp}$; with $1 < n < 7$). Arrows indicate the presence of $\alpha(1\rightarrow2)$ branched GOS on the chromatogram corresponding to the end-point of the enzymatic reaction.

A more precise comparison of the acceptor reaction products synthesized by GBD-CD2 and the truncated form was performed using pure GOS of DP4 and DP5 as acceptors. Similar products are synthesized by both enzymes as revealed by the HPLC profiles shown in Figure 42. These results confirm that the GBD truncation does not affect the ability to branch GOS.

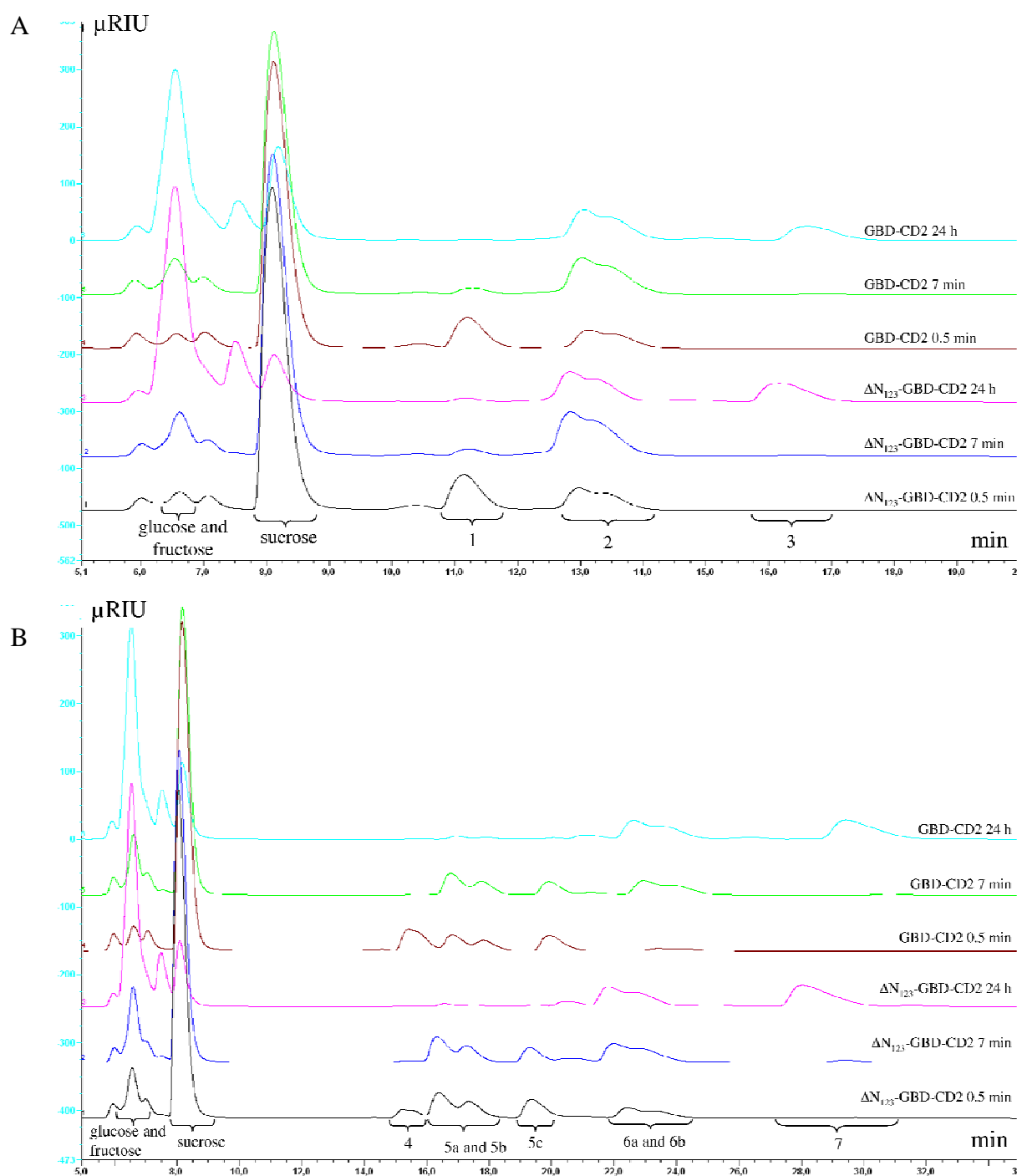


Figure 42 : Comparison of product profiles for acceptor reactions in the presence of GOS DP4 (A) or GOS DP5 (B). (HPLC – Synergi RP Fusion column – Ultrapure water). Durations of reaction are indicated on the chromatograms. 1, α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)-D-Glcp. 2, α -D-Glcp-(1 \rightarrow 2)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)-D-Glcp. 3, α -D-Glcp-(1 \rightarrow 2)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)-[α -D-Glcp-(1 \rightarrow 2)]- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)-D-Glcp. 4, α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)-D-Glcp. 5a, α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)-[α -D-Glcp-(1 \rightarrow 2)]- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)-[α -D-Glcp-(1 \rightarrow 2)]- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)-D-Glcp. 5b, α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)-[α -D-Glcp-(1 \rightarrow 2)]- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)-D-Glcp. 5c, α -D-Glcp-(1 \rightarrow 2)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)-D-Glcp. 6a, α -D-Glcp-(1 \rightarrow 2)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)-[α -D-Glcp-(1 \rightarrow 2)]- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)-D-Glcp. 6b, α -D-Glcp-(1 \rightarrow 2)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)-[α -D-Glcp-(1 \rightarrow 2)]- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)-D-Glcp. 7, α -D-Glcp-(1 \rightarrow 2)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)-[α -D-Glcp-(1 \rightarrow 2)]- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)-[α -D-Glcp-(1 \rightarrow 2)]- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)-D-Glcp.

(iii) Acceptor reactions with sucrose and dextran as acceptor

We previously showed that the α -(1 \rightarrow 2) linkage content of dextrans branched with GBD-CD2 can be easily controlled by simply modifying the [sucrose]/[dextran] molar ratio. In order to further compare GBD-CD2 and ΔN_{123} -GBD-CD2 mutants, we carried out similar dextran branching reactions with the truncated mutant ΔN_{123} -GBD-CD2 using various concentrations of 70 kDa dextran acceptor.

The reaction products were analyzed and quantified by HPLC. The destination of the glucosyl units from sucrose is shown in Figure 43 A. Glucose, leucrose and kojibiose formation are reduced when the dextran concentration increases. For low molar [sucrose]/[dextran] ratios (*ie* 0.12 and 0.24), the glucosyl units from sucrose are almost exclusively transferred onto dextran. ^1H NMR spectra in Figure 43 B confirm that ΔN_{123} -GBD-CD2 action resulted in the formation of branched dextrans containing α -(1 \rightarrow 2) osidic bonds. According to the percentages of α -(1 \rightarrow 2) linkages, the branching ratios obtained with ΔN_{123} -GBD-CD2 and the full length enzyme are equivalent (Figure 42 C).

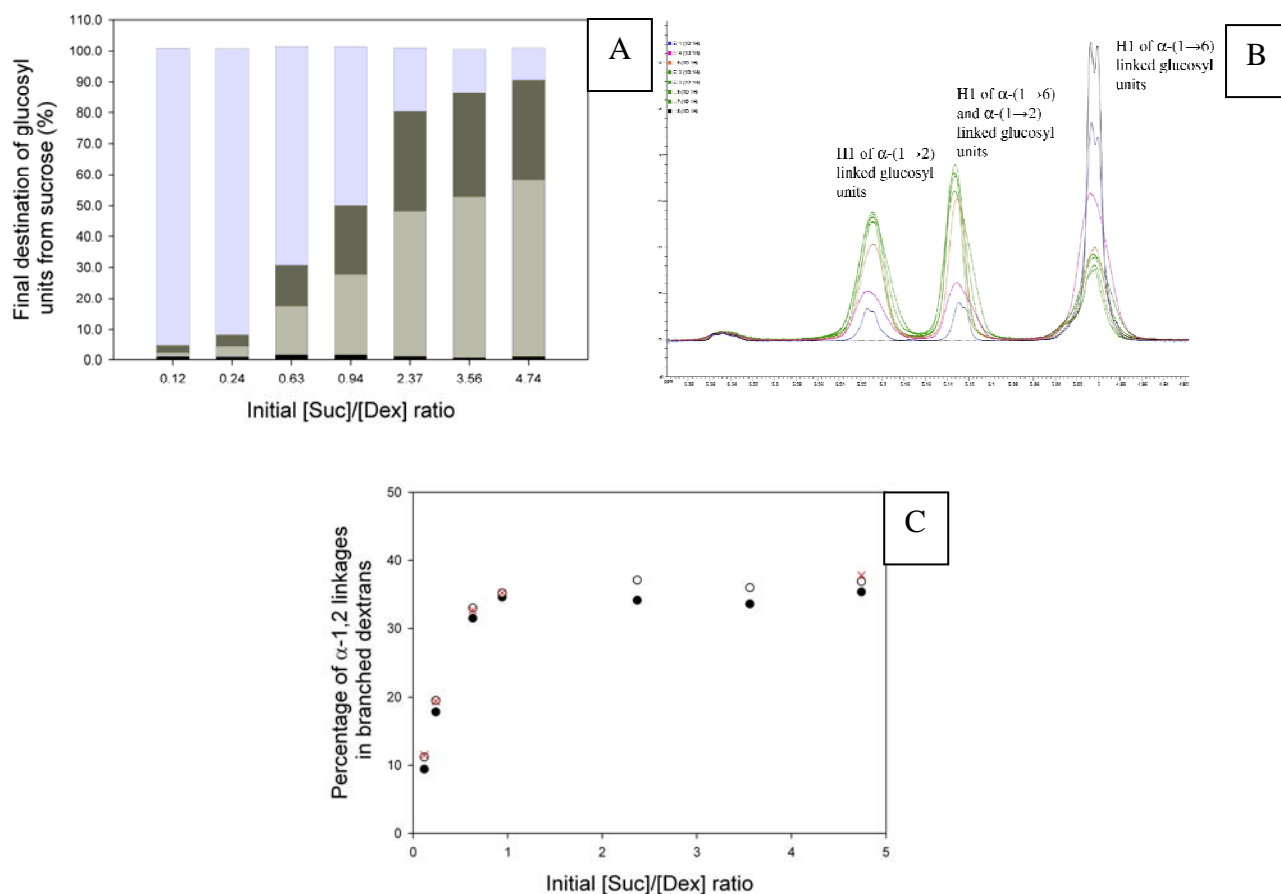


Figure 43: **A** : Effects of [sucrose]/[acceptor] ratio on product yield and $\alpha(1\rightarrow2)$ linkage content. Reactions were carried out at different [sucrose]/[dextran] molar ratios, ranging from 0.12 to 4.74. From bottom to top, black, residual sucrose; grey, glucose (from sucrose hydrolysis); dark grey, leucrose (from fructose glucosylation); light blue, glucosyl units transferred onto dextran chains. **B** : Anomeric region of ^1H NMR spectra obtained at 298 K for the purified $\alpha(1\rightarrow2)$ branched dextrans. Black, dextran 68.6 kDa standard; blue, dextran branched at 11%; pink, dextran branched at 19%; orange, dextran branched at 33%; green, dextrans branched between 35 and 37%. Peak intensities were standardised with peaks corresponding to H-1 of $\alpha(1\rightarrow3)$ linked glucosyl units. **C** : Percentages of $\alpha(1\rightarrow2)$ linkage as a function of [sucrose]/[dextran] ratios used for the acceptor reaction. Empty circles, filled circles, ^1H NMR or HPLC determinations of $\alpha(1\rightarrow2)$ linkage content in dextrans synthesized by ΔN_{123} -GBD-CD2, respectively. Red crosses, ^1H NMR results for dextrans branched by GBD-CD2 (Brison et al., 2010).

III.D. Kinetic studies of ΔN_{123} -GBD-CD2

The initial velocities were determined in the presence or absence of dextran. ΔN_{123} -GBD-CD2 displays a Michaelis-Menten type of kinetics for sucrose hydrolysis. The kinetic parameters calculated from this model are not significantly different from those computed for GBD-CD2 (Table 9). The initial velocities of the α -(1 \rightarrow 2) glucosylation catalyzed by ΔN_{123} -GBD-CD2 can be modelled by a Ping Pong Bi Bi mechanism like GBD-CD2. The kinetic parameters calculated from this model revealed that the catalytic constants k_{cat} are not significantly different. In contrast, the apparent $K_{m_{DexT}}$ and $K_{m_{SucT}}$ of ΔN_{123} -GBD-CD2 are higher than those observed for GBD-CD2.

Table 9: Comparison of the apparent kinetic parameters determined for the hydrolytic activity (subscript H) and the transglucosylation activity (subscript T) for GBD-CD2 and ΔN_{123} -GBD-CD2. ^a, from (Brison et al., 2010). Standard errors are given for apparent kinetic parameters.

Apparent kinetic parameter	GBD-CD2 ^a	ΔN_{123} -GBD-CD2
<i>In the presence of sucrose</i>		
V_{maxH} ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ of purified enzyme)	34.6 ± 0.5	36.3 ± 0.6
$K_{m_{SucH}}$ (mM)	10.8 ± 0.8	7.5 ± 1.0
$k_{cat H}$ (s^{-1})	109	76
<i>In the presence of sucrose and dextran 70 kDa</i>		
V_{maxT} ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ of purified enzyme)	303 ± 5	462 ± 45
$K_{m_{SucT}}$ (mM)	42 ± 2	206 ± 34
$K_{m_{DexT}}$ (mM of anhydroglucosyl units)	75 ± 3	125 ± 21
$K_{m_{DexT}}$ (mM)	0.174 ± 0.008	0.30 ± 0.05
$k_{cat T}$ (s^{-1})	970	947
$k_{cat T}/K_{m_{SucT}}$ ($\text{s}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$)	23	4.6
$k_{cat T}/K_{m_{DexT}}$ ($\text{s}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$)	13	7.6

A fully active truncated form of the α -(1 \rightarrow 2) branching enzyme GBD-CD2 was successfully produced and purified. Like GBD-CD2, the enzyme mainly acts as a sucrose hydrolase when acting on sucrose as sole substrate and is unable to recognize maltose acceptor. Although the GBD is reduced by 76%, this GBD-CD2 variant has kept its ability to branch very efficiently

GOS and dextran through the formation α -(1 \rightarrow 2) glucosidic linkages. Notably, when branching 70 kDa dextran ΔN_{123} -GBD-CD2 hydrolyses a little bit more sucrose and produces more leucrose than GBD-CD2.

In addition, the kinetic parameters for sucrose hydrolysis remained unchanged between GBD-CD2 and ΔN_{123} -GBD-CD2 but differ for the α -(1 \rightarrow 2) glycosylation from sucrose onto dextran. Although the k_{cat} is equivalent for the two mutants, apparent K_{mG} for sucrose and dextran are both higher than those computed for GBD-CD2. Thus, the truncation resulted in an apparent lower affinity for both sucrose and dextran. From these results we can conclude that the deleted part of the GBD is not essential for the enzyme but may favor high molecular dextran binding. It should be noted that the complete deletion of the GBD (from residue Gln1141 to Asp1981) previously carried out by Fabre *et al.* resulted in an almost inactive variant, namely CD2, only capable of consuming 7% sucrose after 24h reaction (Fabre *et al.*, 2005). Knowing that the residue Asp1981 is located at the junction between domain V (GBD) and IV, we may assume that domain V is important for maintaining enzymatic activity.

III.E. Description of ΔN_{123} -GBD-CD2 structure

III.E.1. Overall fold

The structure of ΔN_{123} -GBD-CD2 co-crystallized with GOS DP6 was solved at 3.2 Å resolution by molecular replacement using a mix model based on the structure of domains A, B and C of GTF180- ΔN . Although ΔN_{123} -GBD-CD2 was co-crystallized with this acceptor molecule, we did not observe electron density corresponding to the GOS DP6 molecule. Four loosely packed molecules were found in the asymmetric unit (Figure 44 A). The single polypeptide chain (1108 residues) is folded into a tertiary structure organized in five distinct domains named C, A, B, IV and V (Figure 44 B and C). As previously described for GTF180- ΔN , domains C, A, B and IV of ΔN_{123} -GBD-CD2 are not arranged consecutively along the peptide chain (Figure 44 C). Domain IV is made up of two polypeptide segments from residues Phe1987 to Asn2123 and from residues Met2812 to Thr2831. Domain B is also an assembly of three polypeptide segments from residues Lys2124 to Leu2172, Tyr2696 to Val2711 and from Trp2795 to Gly2811. Domain A is constituted of three polypeptide segments, from residues Leu2173 to Ser2424, Ser2561 to Val2695 and Gly2731 to Ser2796. Finally, domain C consists of one polypeptide segment (from Gly2425 to Asp2560) forming the bottom of the U-shape folding. The stems of the U-shape fold are constituted by domains A, B and IV (Figure 44 B and C). The overall domain organization shows high similarities to the previously described U-shape folding of GTF180- ΔN glucansucrase. Domain V which is a part of the GBD could not be built. This domain corresponds to the N-terminal part of the enzyme (residues Pro1758 to residues ~1990). In GTF180- ΔN , domain V is made up of two different segments from residues 742 to 792 and 1637 to 1751 which are located at the C and N terminal extremities, respectively.

The ΔN_{123} -GBD-CD2 domains C, A, B and IV superimpose well with the equivalent domains of GTF180- ΔN . A structural alignment was performed against the proteins available in PDB with the DALI server. Out of 844 C α , a total of 558 C α atoms superimposed with a rmsd of 1.2 Å. Additionally, it also shows that 264 C α of the domains

A, B, C of ΔN_{123} -GBD-CD2 superimposed with the α -amylase of *Bacillus licheniformis* (469 C α ; rmsd 2.8 Å, PDB accession number, 1bpl). The same best hit was obtained from the structural alignment of GTF180- ΔN using DALI (Holm *et al.*, 2008).

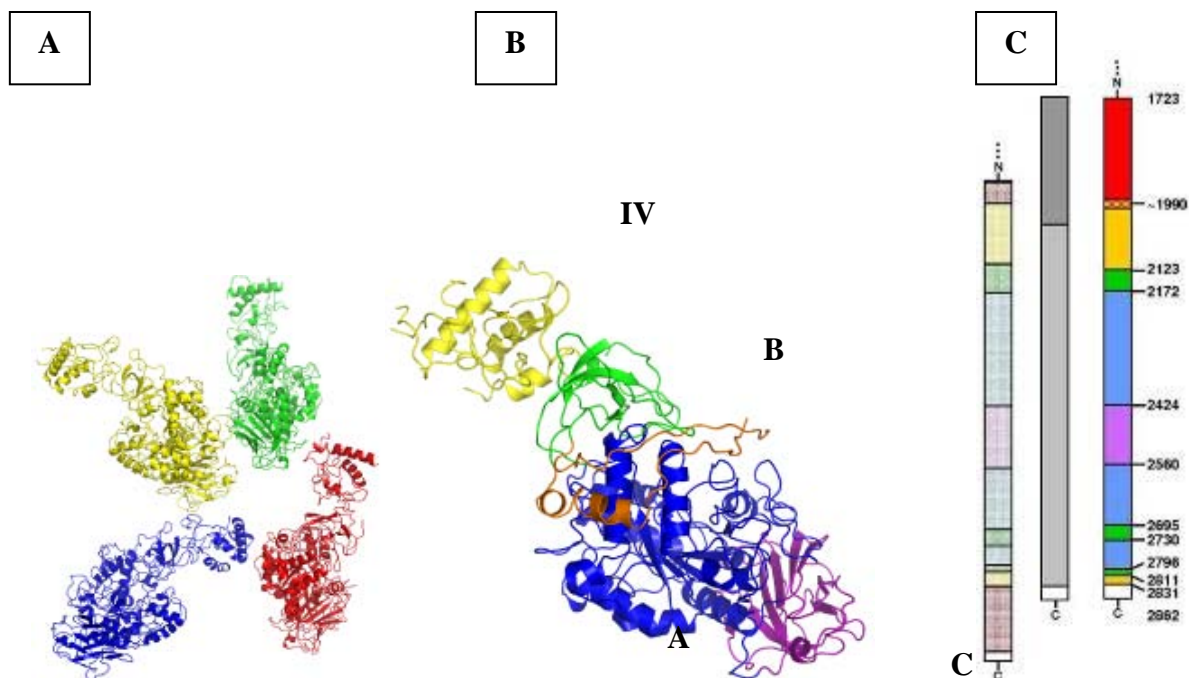


Figure 44: **A** : Arrangement of chains A, B, C and D of ΔN_{123} -GBD-CD2 in the asymmetric unit. **B** : Domain organization of ΔN_{123} -GBD-CD2. Domain C (purple), domain A which includes the $(\beta/\alpha)_8$ barrel (blue), domain B (green) and domain IV (yellow). Brown loop is part of domain A but protrudes from domain B. **C** : Schematic representation of the domain arrangement for crystallized GH70 glucansucrases; from the left to the right, GTF180- ΔN , Pfam prediction of the domain organization of ΔN_{123} -GBD-CD2 (light grey, catalytic domain (Pfam family PF02324.9), grey, putative Glucan Binding Domain)) and on the right domain organization deduced from the crystal structure of ΔN_{123} -GBD-CD2.

III.E.2. Individual domain descriptions

Domain C consists of eight anti-parallel β strands and includes a modified Greek-key motif (Figure 45). The primary structure of this domain shares 60% of identical residues with domain C of GTF180- ΔN , respectively. A DALI analysis of the domain C shows that the closest structurally related domain is domain C (83 C α out of 135, rmsd 2.5 Å) of chimerical α -amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus licheniformis* (PDB accession number 1e3x). The function of this domain remains unknown.

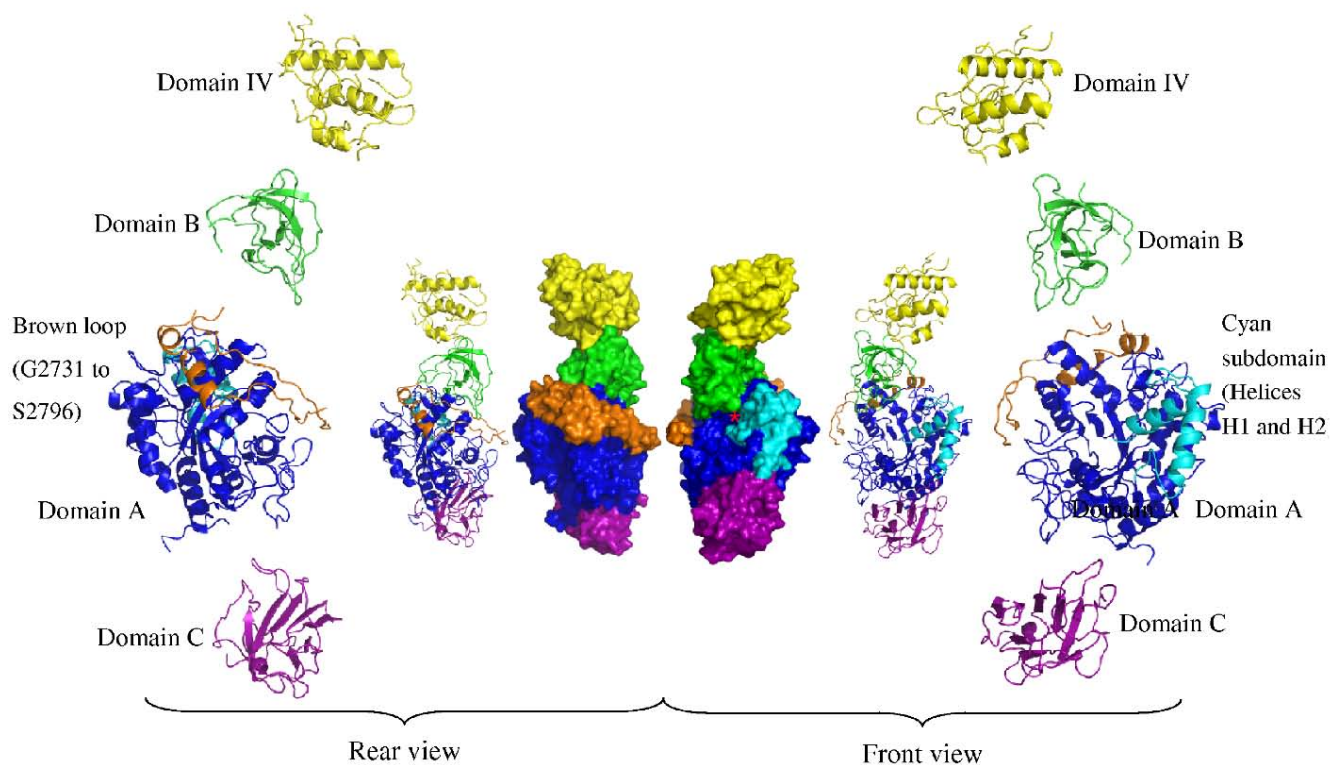


Figure 45: Domain organization of ΔN_{123} -GBD-CD2. Domains IV, B, A and C are yellow, green, blue and magenta, respectively. Brown loop figures the loop protruding from domain B but participating in domain A formation. Cyan subdomain is inserted between β_6 and α_7 of the $(\beta/\alpha)_8$ barrel. Red star in the front view figures the catalytic pocket.

Domain A is the largest domain, which forms with domain B the catalytic core. In contrast to GH13 $(\beta/\alpha)_8$ barrel, it comprises a “circularly permuted” $(\beta/\alpha)_8$ barrel as described for GTF180- ΔN . At the N-terminal part of domain A, the first secondary structure element of the $(\beta/\alpha)_8$ barrel is equivalent to helix α_3 of the GH13 family enzymes. Then, the secondary structures adopt the following arrangement: α_3 , $\beta_4\alpha_4$, $\beta_5\alpha_5$, $\beta_6\alpha_6$, $\beta_7\alpha_7$, $\beta_8\alpha_8$, $\beta_1\alpha_1$, $\beta_2\alpha_2$, β_3 . Domain C is inserted between the helix α_8 and strand β_1 and domain B connects strand β_3 to helix α_3 . Thus, the circularly permuted $(\beta/\alpha)_8$ barrel is made up of two polypeptide segments separated by domain C. Interestingly, it should be noted that the helix α_5 is less structured and three residues shorter than the equivalent helix of GTF180- ΔN . It even does not fold anymore as an helix but more as a loop for which the electron density map was not always defined for side-chains. In addition, helix α_5 is partly covered by a loop (from Gly2731 to Ser2796, in brown on Figure 46 B) which protrudes from domain B and contributes to domain A and is 25 residues longer than its equivalent in GTF180- ΔN . It starts

with two contiguous α -helices (residues Gln2734 to Tyr2739 and residues Gln2741 to Lys2750) followed by a loop covering helices α_3 , α_4 and α_5 . In the electron density map, only the backbone atoms of this loop are well defined. Moreover, nine residues at the tip of this loop could not be built since no electron density is defined in the map (Figure 44 B). In addition, the loop (Asp2292 to Ile2299) that connects helix α_6 to strand β_7 of the $(\beta/\alpha)_8$ barrel is four residues longer than its equivalent in GTF180- ΔN (Gln1111 – Leu1113). The loops described above comprising residues 2731 to 2796, and residues 2292 and 2299 are both located at the upper part of the catalytic gorge which is also delineate by a small sub-domain inserted between strand β_6 and helix α_7 (residue Gly2324 to Asn2368) like GTF180- ΔN . This sub-domain comprises two helices, named H1 and H2 by analogy with the nomenclature proposed for GTF180- ΔN (Vujicic-Zagar, 2007). Such a long loop was also described in amylosucrase of *Neisseria polysaccharea* (the sole known structure of a glucansucrase from family 13) in which it constitutes domain B'. However, this subdomain of ΔN_{123} -GBD-CD2 shares no structural homology with domain B' (Skov *et al.*, 2001).

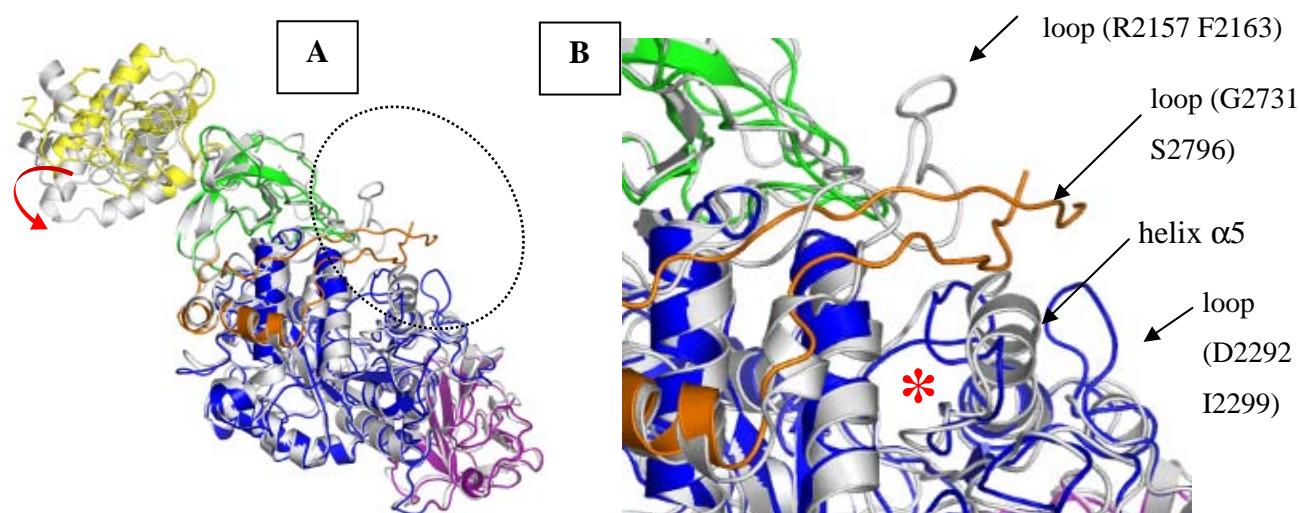


Figure 46: **A** : Superimposition of domains C, A, B and IV from GTF180- ΔN (grey) and ΔN_{123} -GBD-CD2 (colored). Dashed ellipsis outlines the major differences of loop conformations and secondary structure elements between upper parts of the two glucansucrase catalytic gorges. **B** : Zoom over the upper parts of catalytic gorges; position of the catalytic glutamic acid is figured by a red star; the catalytic site is backwards the current view.

Domain B, also found in α -amylases, is folded into a five-stranded β -sheet like in GTF180 ΔN (94 C α out of 99 C α , rmsd 1.2 Å) showing that the domains are well aligned (Figure 45). In ΔN_{123} -GBD-CD2 structure, three loops connecting the strands point toward the catalytic gorge. Two of them (residues Glu2127 to Tyr2140 and residues Ala2709 to Thr2722) take a position similar to that observed in GTF180- ΔN . However, the third loop inserted between Arg2157 and Phe2163 is much shorter than the equivalent in GTF180- ΔN (Arg961 to Ala978 for GTF180- ΔN). This loop is also situated in the upper part of the catalytic gorge.

A calcium ion was found at the interface of domains A and B of GTF180- ΔN (Figure 47). This calcium binding site involves residues Asp1508, Glu979, Asp985 and Asn1029. Of these four residues none of them is structurally conserved in ΔN_{123} -GBD-CD2. A positive blob of electron density is observed in the F_0 - F_c map at 3σ level, that may indicate the presence of an ion, but from which we cannot conclude to the presence of calcium ion. The role of calcium in GBD-CD2 was thus investigated. As shown in Table 10, ΔN_{123} -GBD-CD2 is weakly activated by calcium chloride (3.4 mM) but the addition of EDTA in the reaction medium does not lead to a drastic decrease of initial velocities as for DSR-S produced by *Ln. mesenteroides* NRRL B-512F or GTF180- ΔN (Kralj *et al.*, 2004; Robyt and Walseth, 1979). ΔN_{123} -GBD-CD2 is not calcium dependant.

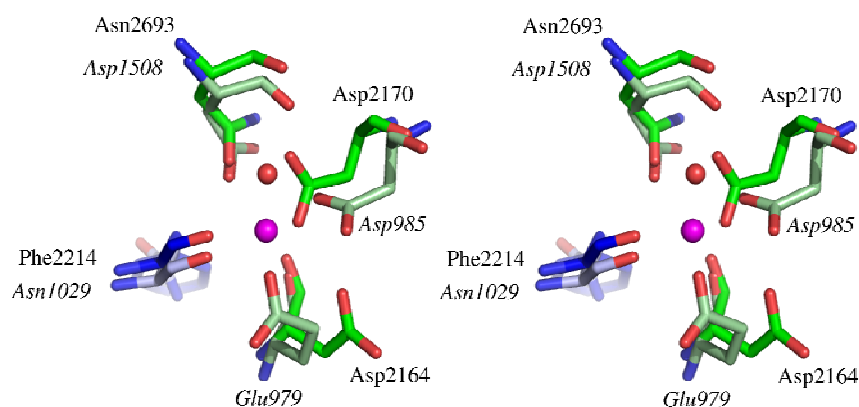


Figure 47: Stereo-view of calcium binding site of GTF180- ΔN superimposed with structurally equivalent residues of ΔN_{123} -GBD-CD2. Magenta sphere, calcium ion. Red sphere, water molecule. Pale green and pale blue colored residues from domains B and A of GTF180- ΔN , respectively. Bright colours, structurally equivalent residues of ΔN_{123} -GBD-CD2. Italic or regular residue numbers correspond to GTF180- ΔN and ΔN_{123} -GBD-CD2, respectively.

Table 10: Effect of calcium chloride and EDTA on ΔN_{123} -GBD-CD2 activities. (Activity measurements were carried out at 30°C in 20 mM sodium acetate buffer (pH 5.75) with 292 mM sucrose or 292 mM sucrose and 62 mM dextran. Results are given as means \pm standard deviations; $n=3$. Activities without any compound were taken as references (100%).)

Compound	Sucrose hydrolysis (%)	Transferase activity (%)
None	100 \pm 8	100 \pm 0.02
CaCl ₂ (3.4 mM)	107 \pm 15	113 \pm 0.03
EDTA (1 mM)	88 \pm 10	98 \pm 0.04
EDTA (5 mM)	86 \pm 9	101 \pm 0.02

Domain IV does not show significant structural similarities with any other protein in the PBD as revealed by a DALI analysis. The superimposition on the secondary structures of GTF180- ΔN domain IV shows that the secondary structure elements are well conserved but slightly shifted (Figure 46).

The attempts in building the N-terminal domain of GBD-CD2 by molecular replacement with the domain V of GTF180- ΔN or with the closest structurally related domain retrieved by the FFAS03 server (<http://ffas.ljcrf.edu/ffas-cgi/cgi/ffas.pl>) were not successful. Only several β -sheets were distinguishable in the electron density map. This suggests that the CW like repeated sequences found at the N-terminal end of GBD-CD2 may be arranged in β -hairpin type of motifs comparable to the domain V of GTF180- ΔN and C-Lyt A (Vujicic-Zagar, 2007; Fernandez-Tornero *et al.*, 2001). In GTF180- ΔN , the domain V can adopt various positions between an extended conformation and a compact one. The envelope defined by the β -sheets of ΔN_{123} -GBD-CD2 domain V is located at a different position from that occupied by domain V of GTF-180 in its two extreme states (see Chapter I). The conformation of ΔN_{123} -GBD-CD2 could thus be different from that of GTF180- ΔN and the mobility of this domain could explain the difficulties encountered for acquiring well defined electron density map in this region.

III.E.3. Catalytic core architecture

The active site of the enzyme forms a pocket, itself included into a large gorge (Figure 48 A). We superimposed the structure of the inactive mutant GTF180- ΔN :sucrose complex with that of ΔN_{123} -GBD-CD2. As seen in Figure 48 B, the structural alignments of the residues defining the subsites -1 and +1 in GTF180- ΔN show that the structural similarity to subsites -1 and +1 of GTF180- ΔN is high and can be used to investigate the interactions between sucrose and ΔN_{123} -GBD-CD2 (rmsd 0.53 Å, 13 superimposed C α).

III.E.3.a. Sucrose specificity: structural analysis of subsites -1 and +1

In subsite -1, nine residues of GTF180- ΔN were reported to interact with the glucosyl ring of sucrose (Arg2208, Asp2210, His2321, Asp2322, Glu2248, Asn2596, Asp2643, Tyr2650, Gln2694). All these residues are conserved in ΔN_{123} -GBD-CD2 (Figure 48). Among them, residues Arg2208, Asp2210, His2321, Asp2322, Glu2248 are also strictly conserved in α -amylase family subsite -1. In particular, residues Glu2248 and Asp2210 coincide with the general acid base catalyst and nucleophile residues of GH13 enzymes (Jensen *et al.*, 2004; Uitdehaag *et al.*, 1999). We can assume that they play a similar role in ΔN_{123} -GBD-CD2. The residues Gln2694, Tyr 2650, Asp2643 are all strictly conserved in GH70 family but not in family 13. Gln2694 is the equivalent of the His187 (amylosucrase of *N. polysaccharea* numbering) proposed to be involved in the stabilization of the transition state (Svensson *et al.*, 1994; Nakamura *et al.*, 1993). In GTF180- ΔN , it is H-bonded to the C-6 hydroxyl of glucose and its mutation strongly decreases glucansucrase activity (Monchois *et al.*, 2000a). By analogy to GTF180- ΔN :sucrose complex structure, Asp2643 (Asp1458 GTF180- ΔN numbering) and Asn2596 (Asn1411) could interact with C-4 and C-3 hydroxyl groups of the glucosyl residue and be responsible for the pocket shape of the active site ensuring a strong binding of the glucosyl ring and the absence of -2 or -3 subsites. In the ASNp glucansucrase, the subsite -1 is also blocked by the presence of a salt bridge (Asp144, Arg509, amylosucrase of *N. polysaccharea* numbering). Finally, Tyr2650 is conserved in all

glucansucrases from GH13 and GH70 families and provides a stacking platform for the glucosyl residue of sucrose.

At subsite +1, seven residues interacting with the fructosyl ring have been described by Vujicic-Zagar. Five of them are conserved; they correspond to Leu2166, Leu2167, Glu2248, Asp2322, Gln2326 in ΔN_{123} -GBD-CD2. The leucine residues are located in the B domain and could interact through van der Waals interactions. Glu2248 and Asp2322 correspond to the catalytic residues and Gln2326 is H-bonded with the C-6 hydroxyl of the fructosyl. Indeed, the fructosyl residue of sucrose establishes hydrogen bonds with Asn1029 and Trp1065 in GTF180- ΔN . While these two residues are strictly conserved among characterized GH70 glucansucrases, they are substituted by a phenylalanine and an alanine in ΔN_{123} -GBD-CD2 structure, respectively, two amino acids that cannot make hydrogen bonds with the fructosyl residue. This suggests that the fructosyl binding at subsite +1 may be weaker in ΔN_{123} -GBD-CD2. This is also corroborated by the apparent $K_{m_{\text{SucT}}}$ value of ΔN_{123} -GBD-CD2 which is 32 times higher than that of GTF180- ΔN (Vujicic-Zagar, 2007). It shows that the +1 subsite tolerates mutations concerning sucrose binding and consecutive cleavage. Residues located at subsite +1 are less conserved than those of subsite -1. A weaker binding at subsite +1 is also in agreement with the reaction mechanism in which the fructosyl residue has to leave the subsite +1 before the acceptor glucosylation.

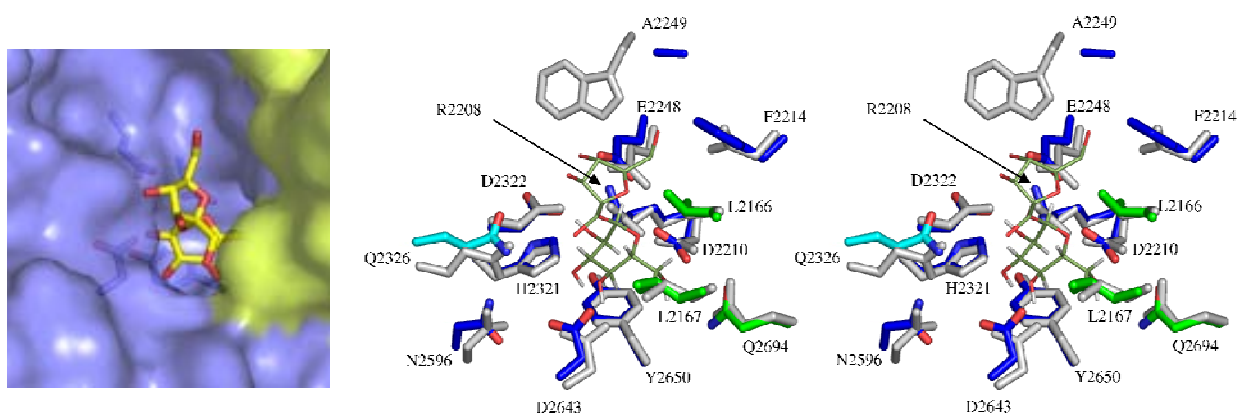


Figure 48: **A** : Active site of ΔN_{123} -GBD-CD2 superimposed with sucrose from GTF180- ΔN :sucrose complex structure. The catalytic diad, the putative transition state stabilizer and stacking tyrosine at subsite -1 are represented. **B** : Stereo-view of side-chain residues involved in sucrose binding at subsites -1 and +1. Sucrose is figured as olive line. Are represented in grey the residues identified in GTF180- ΔN inactive mutant (Asp1025Asn) in complex with sucrose (Vujicic-Zagar, 2007). Their structural equivalents are figured in blue (domain A), cyan (helices H1 and H2), green (domain B) for ΔN_{123} -GBD-CD2.

III.E.3.b. Product specificity of ΔN_{123} -GBD-CD2

In GH70 and GH13 glucansucrases, the subsite +1 not only has to accommodate fructose, it must be adapted to the recognition of acceptors. We have shown that ΔN_{123} -GBD-CD2 does not glucosylate maltose (Figure 40). This disaccharide is known as being the most efficient acceptor for glucansucrases (Remaud-Siméon *et al.*, 2000). From the analysis of the GTF180- ΔN :maltose complex structure, it has been shown that the interaction between the maltose and Trp1065 was essential for maltose glucosylation, producing panose (α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)-D-Glcp). This residue is conserved in all glucansucrases except for ΔN_{123} -GBD-CD2 in which it is substituted by an alanine. This mutation could explain the non-recognition of maltose.

Furthermore, we have shown that ΔN_{123} -GBD-CD2 cannot synthesize a glucan polymer. The structural equivalent of the conserved Trp1065 (GTF180- ΔN numbering) is Ala2249 which may play an important role in the inability of ΔN_{123} -GBD-CD2 to synthesize a glucan. Indeed, we may assume that Trp1065 in GTF108- ΔN can also act as a stacking platform for glucosyl residues of glucans. The role of Ala2249 in ΔN_{123} -GBD-CD2 and substrate specificity of Ala2249Trp mutant will have to be investigated in details.

To catalyze glucosyl transfer onto linear α -(1 \rightarrow 6) linked oligosaccharides or dextrans, ΔN_{123} -GBD-CD2 must first bind sucrose, and then catalyze the formation of the β -D-glucosyl enzyme. Fructose must be released from subsite +1 to allow the accommodation of the acceptor. The dextran or GOS glucosyl residues that will be branched, must bind in subsite +1 with the C2 hydroxyl group correctly oriented toward the C1 of the β -D-glucosyl-enzyme intermediate. Furthermore, the structural characterization of GOS DP6 (α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)-D-Glcp) revealed that the enzyme can branch the various α -(1 \rightarrow 6) linked glucosyl units of the molecule and can also catalyze α -(1 \rightarrow 2) branching onto vicinal α -(1 \rightarrow 6) linked glucosyl units (Figure 49). In addition, ΔN_{123} -GBD-CD2 enzyme can also branch dextran polymer indicating that the acceptor binding site can also accommodate long dextran chains. The Ping-Pong Bi Bi mechanism of ΔN_{123} -GBD-CD2 also shows that following its branching,

the product has to quit the active site to allow the binding of a new molecule of sucrose substrate. How the dextran chain accommodates in the catalytic gorge remain a very interesting point to elucidate. Unfortunately, it was not possible to obtain a ΔN_{123} -GBD-CD2:GOS complex structure to map the acceptor binding subsites. However, in the absence of complex structure, to possibly identify structural factors, we have compared the residues which delineate the catalytic gorge of GTF180- ΔN and ΔN_{123} -GBD-CD2 (Figure 50). As seen on this figure, many residues lining the catalytic groove are different or adopt a different conformation. Thus, these residues which are also not conserved in other glucansucrases may participate to the regiospecificity of ΔN_{123} -GBD-CD2. The mutations of these residues may further help to investigate their roles in catalysis, enzyme's regiospecificity and dextran binding.

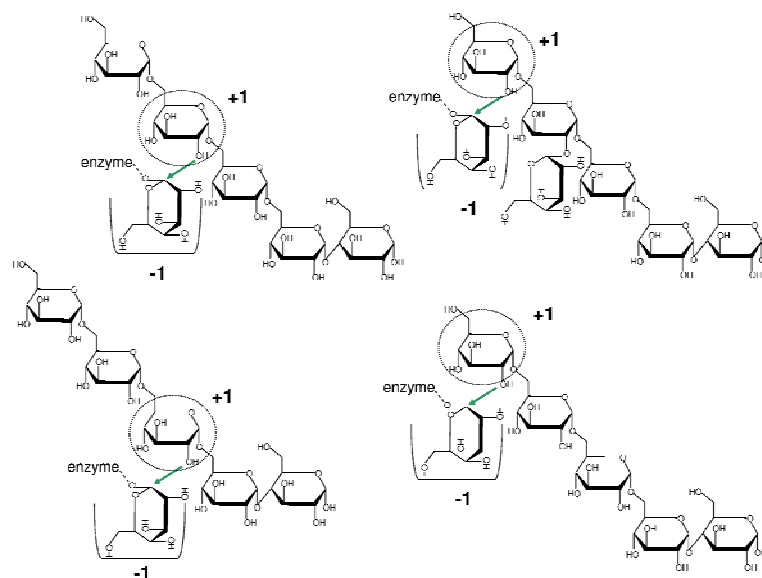


Figure 49: Schematic representation of ΔN_{123} -GBD-CD2 active site with the putative β -D-glucosyl-enzyme intermediate at subsite -1 and GOS DP6 acceptor (α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)-D-Glcp) of which one of the glucosyl unit is located at subsite +1. Figured situations represent products that were previously described (Chapter III).

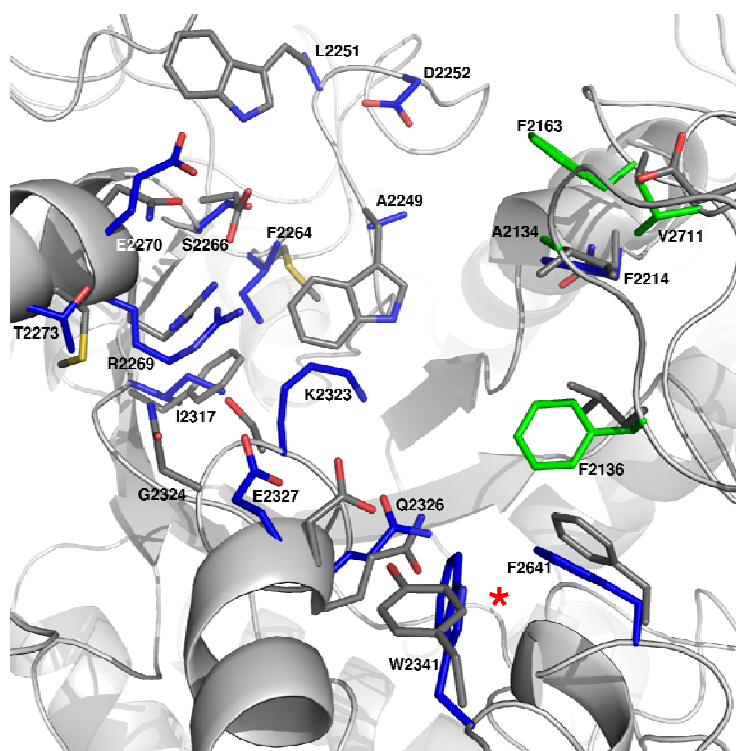


Figure 50: Comparison of the catalytic gorges of GTF180- ΔN and ΔN_{123} -GBD-CD2. For the sake of clarity, only different residues or residues adopting a different conformation are figured. Grey backbone corresponds to ΔN_{123} -GBD-CD2. Grey residues correspond to GTF180- ΔN residues. Blue, green colored residues, from domains A and B of ΔN_{123} -GBD-CD2 respectively. Residues from subsites -1 and +1 are not figured. Red star represents stacking Tyr2650 position at subsite -1.

We compared by sequence alignment the amino acid residues involved in catalytic gorges of six glucansucrases with different regiospecificities (α -(1 \rightarrow 2) branching enzyme from DSR-E, mutansucrase GTF-I, dextransucrase DSR-S, alternansucrase ASR, dextransucrase GTF180 and reuteransucrase GTF-A) (Figure 51). As previously described for GTF180- ΔN and ΔN_{123} -GBD-CD2, the residues involved in subsite -1 and +1 are almost all conserved in the four other glucansucrases. The more striking result is coming from the residues (Phe2214 and Ala2249) which are located at subsite +1 and which are specific for ΔN_{123} -GBD-CD2. We may propose that these residues play a critical role in α -(1 \rightarrow 2) specificity. Residues from loop 2, β 3 region, loop 1 and β 7 region exposed in the catalytic gorges are very well conserved among these glucansucrases.

Around the catalytic diad and the putative transition state stabilizer, amino acid variability is more important. The mutations around the putative transition state stabilizer Asp2322 (SEV, NNS, YDA, SNA or KGV motifs) were studied and resulted in some cases in specificity modifications (Fabre, 2004; Joucla, 2003; Kralj *et al.*, 2005b; Moulis, 2006; van Leeuwen *et*

al., 2008; van Leeuwen *et al.*, 2009). The alignment shows that mutagenesis on the residues around Glu2248 should also be investigated.

Interestingly, amino acid residues from domain B and H1-H2 region which confer to the catalytic region a gorge shape are not conserved. In GH13 enzymes, domain B is crucial for regiospecificity (Janecek S *et al.*, 1997; Svensson, 1994). It would be very interesting to determine the involvement of these residues in regiospecificity. Finally, helix α_5 might also be crucial for regiospecificity. On one hand, its length is not conserved for CD2 of DSR-E and ASR and on the other hand the residues exposed to the catalytic gorge can greatly differ. All these potential hotspots for regiospecificity will have to be studied by site-directed mutagenesis.

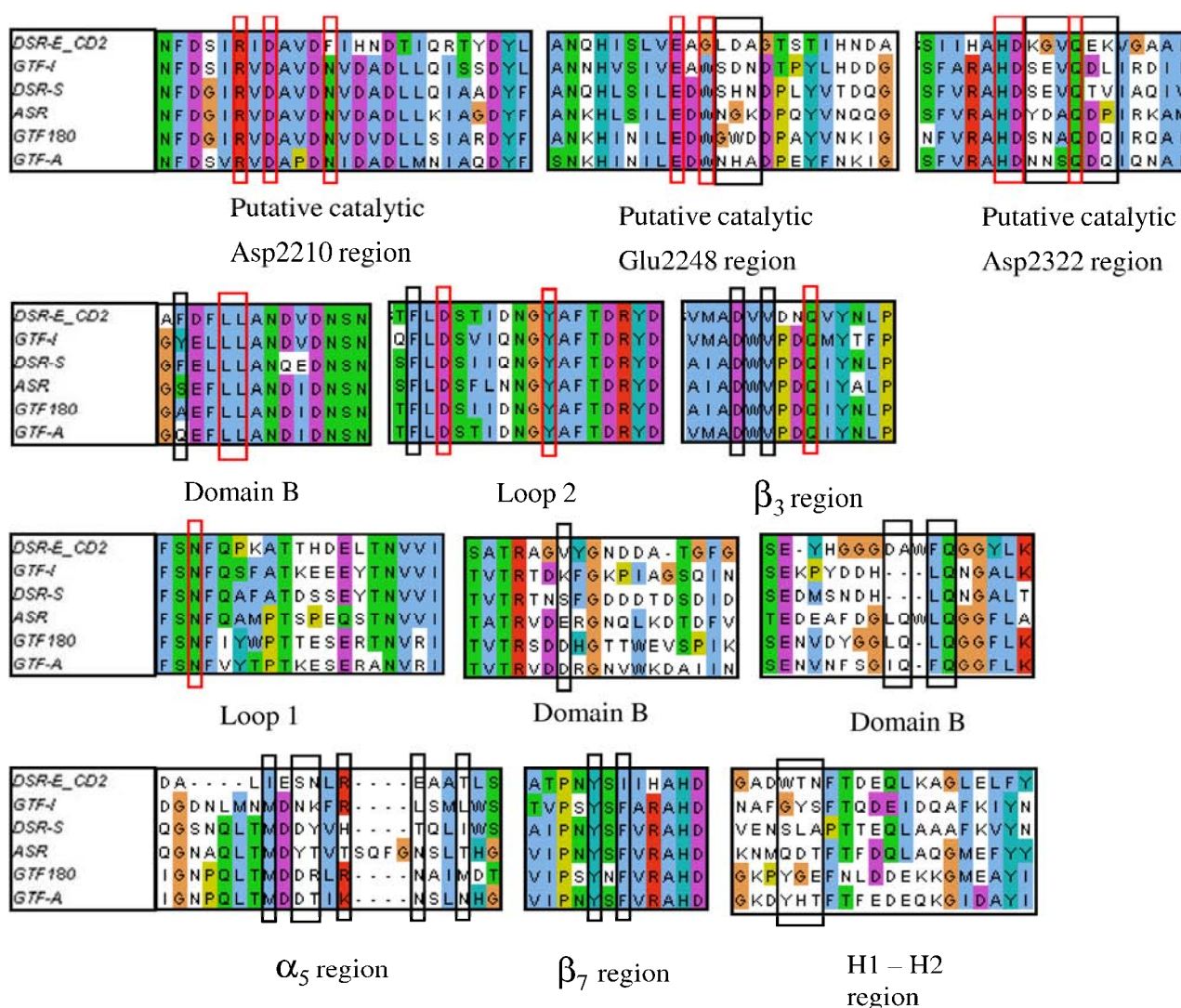


Figure 51: Sequence alignment of DSR-E, GTF-I, DSR-S, ASR, GTF180 and GTF-A glucansucrases for the residues involved in catalytic pockets. Red or black framed residues correspond to those involved in subsites -1 and +1 (according to GTF180- ΔN :sucrose structure) or exposed in the catalytic gorges of GTF180- ΔN or ΔN_{123} -GBD-CD2.

III.E.3.c. Loops at the upper part of the catalytic gorge

Moreover, another major topological difference between GTF180- ΔN and ΔN_{123} -GBD-CD2 is due to the presence of three loops (residues Gly2731 to Ser2796, Asp2292 to Ile2299 and Arg2157 to Phe2163; see domains A and B descriptions and Figure 52). Indeed they confer to ΔN_{123} -GBD-CD2 a totally different topology at the upper part of the catalytic gorge. In addition, as shown on Figure 53, these loops are characteristic of the three primary structures of the glucansurases DSR-E from *Ln. mesenteroides* NRRL B-1299, *Ln. mesenteroides* subsp *mesenteroides* ATCC 8293 and *Ln. mesenteroides* KM20. The loop (Gly2731 to Ser2796) from the domain B which covers α_3 , α_4 and α_5 of the $(\beta/\alpha)_8$ barrel points toward the upper part of the catalytic gorge has especially retained our attention. It might have an important role for the α -(1 \rightarrow 2) dextran branching reaction since it is found in CD2's primary structure. When studying the primary sequence of these twenty residues, an intriguing similarity to the CW motif of the GBD was found. These two resembling CW motifs are YWYKKNYANDG and NPYYTLSHGD, from residues Tyr2762 to Gly2771 and Pro2774 to Asp2782, respectively. A Pfam search of DYWYKKNYANDGSPYYTLSH residues did not retrieve any significant matches. A Blastp search return similar sequences found in the putative glucansucrases from *Ln. mesenteroides* subsp *mesenteroides* ATCC 8293 and *Ln. mesenteroides* KM20. In other GH70 glucansucrases, the length variability for these three loops (residues Gly2731 to Ser2796, Asp2292 to Ile2299 and Arg2157 to Phe2163) participating in the upper part of catalytic gorges can be important (Figure 53).

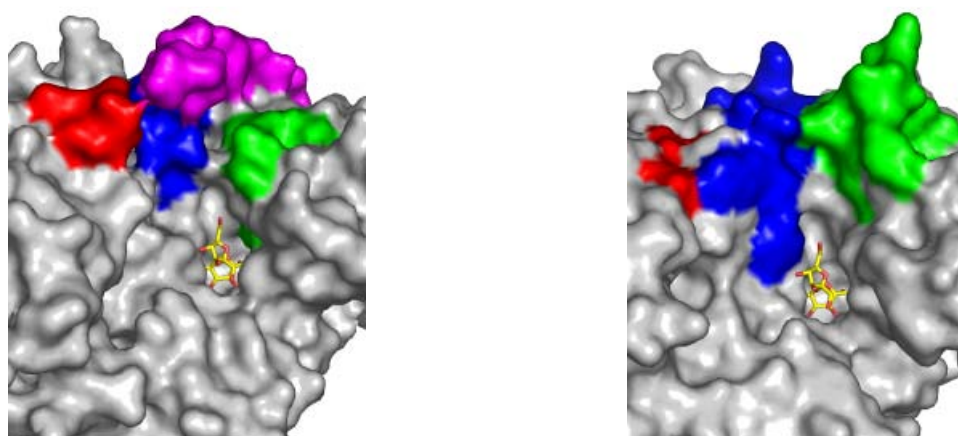


Figure 52: Comparison of catalytic gorges of ΔN_{123} -GBD-CD2 (left) and GTF180- ΔN (right). Sucrose displayed in subsites -1 and +1 is that of GTF180- ΔN :sucrose complex structure. For ΔN_{123} -GBD-CD, loop from residues Gly2731 to Ser2796 in magenta (incomplete loop), Asp2292 to Ile2299 in red, Arg2157 to Phe2163 in green and helix α_5 from $(\beta/\alpha)_8$ barrel in blue.

The determination of the glucansucrase ΔN_{123} -GBD-CD2 structure outlines key structural elements which may be involved in its regiospecificity. Mutations of key amino acids in the catalytic gorge are currently in progress. Moreover, the role of the loop containing two relative CW motifs will be investigated. We continue to test crystallization conditions in an attempt to get a structure of ΔN_{123} -GBD-CD2 at higher resolution as well as a structure of ΔN_{123} -GBD-CD2 in complex with an acceptor molecule. The resolution of the two glucansucrases GTF180- ΔN and ΔN_{123} -GBD-CD2 structures also paves the way to the design of combinatorial engineering to uncover the structural factors responsible of their product specificities.

IV. Experimental procedures

IV.A. Rational truncations of the glucan binding domain of GBD-CD2

Several truncated forms were generated from gene deletion experiments. The *gbd-cd2* gene inserted into pBAD TOPO TA vector (Invitrogen) was amplified by PCR using the forward and reverse primers listed in Table 11.

*Table 11: Forward and reverse primers used to generate GBD-CD2 truncated mutants. Twelve sites of truncature were chosen. Green colored bases were necessary for the directional insertion of the purified PCR products in pBAD TOPO Directional 102 vector. Base numbering corresponds to base annotation of the *dsr-E* gene sequence as deposited in the GenBank (accession number AJ430204.1). Underlined bases correspond to the *NcoI* restriction site; red colored bases have been mutated to create the *NcoI* restriction site.*

Primer name	Sequence (5' to 3')
For_pBadD_ΔN ₁₈₀	<u>CACC</u> ATGG ₄₂₇₄ ATAGTCAAATCAATGGCATTATTTCT
For_pBadD_ΔN ₁₇₃	<u>CACC</u> ATGG ₄₄₈₇ CAGATAAGTCTTGGCTTTACCC TAATG
For_pBadD_ΔN ₁₆₆	<u>CACC</u> ATGG C ₄₆₈₂ AGATGGCTCATGGTTATATTTGAATG
For_pBadD_ΔN ₁₆₁	<u>CACC</u> ATGG T ₄₈₀₆ ATCCGATGGTTCATGGGTGATTTGG
For_pBadD_ΔN ₁₅₄	<u>CACC</u> ATGG C ₅₀₀₃ AGATGGTTCATGGTTATATCTAGAAG
For_pBadD_ΔN ₁₄₇	<u>CACC</u> ATGG ₅₁₉₅ GCGATAAAATCATGTATTTTGATGAAG
For_pBadD_ΔN ₁₄₅	<u>CACC</u> ATGG ₅₂₅₈ ATGGTTCATGGTATTACTTAAATCAGG
For_pBadD_ΔN ₁₃₇	<u>CACC</u> ATGG C ₅₄₅₁ AGATGGTTCATGGATTTATCTTGATG
For_pBadD_ΔN ₁₃₀	<u>CACC</u> ATGG C ₅₆₄₆ ACCTGGTGTATGGGCTTACTTTGGTG
For_pBadD_ΔN ₁₂₃	<u>CACC</u> ATGG C ₅₈₃₈ ACAAGCAGGTCACTATATCACGAAAA
For_pBadD_ΔN ₁₁₅	<u>CACC</u> ATGG A ₆₀₆₃ TTACGGTACAATAACACTCAAGCAAG
For_pBadD_ΔN ₁₀₆	<u>CACC</u> ATGG ₆₂₉₆ ATGGTCATTATATTTCCCAAGATGGCC
Rev_pBadD	AGCTTGAGGTAATGTTGATTTATC

PCR reactions were set up with the Pfu Turbo polymerase (Stratagene). The PCR fragments were purified using 0.8% agarose gel and Qiagen purification columns (QIAquick® gel Extraction Kit). Purified PCR products were cloned into pBAD TOPO Directional 102 vector according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). The *NcoI* restriction sites upstream of the N-terminal thioredoxin tag and that introduced during the PCR (which

includes the ATG start codon) allowed us to easily remove the thioredoxin tag from plasmids. Then, the linear plasmids were purified and ligated using the T4 ligase according to the manufacturer's instructions (New England Biolabs).

The final truncated forms did not have thioredoxin tags at the N-terminal extremity as these tags were previously shown to have no effect on either expression or solubilisation. All constructions have a C-terminal V5 epitope – His₆ tag. Restriction enzymes were purchased from New England Biolabs and used according to the manufacturer's instructions. DNA sequencing of the truncated genes ΔN_{123} -gbd-cd2 and ΔN_{130} -gbd-cd2 did not reveal any DNA mutation (MilleGen, Labège, France).

IV.B. Production of recombinant GBD-CD2 and of its truncated variants

TOP10 One shot chemically competent cells (Invitrogen) were transformed by the constructed plasmids, and used to express the set of genes deleted from their 5' ends. Bacterial cells were grown in Luria-Bertani medium supplemented with 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ampicillin. Induction with 0.002% (w/v) L-arabinose was performed at OD 600nm of 0.5. The cells were grown for 8 additional hours, harvested by centrifugation (6000 g, 10 min, 4°C), and resuspended at OD 600 nm of 80 in PBS buffer (pH 7.0) supplemented with anti-protease tablets. Cells were disrupted by sonication using five cycles of 20 s at 30% of maximal intensity and low tuner. Each sonication cycle was separated by a 4 min delay in which samples were kept in melting ice. The crude cell extracts were used as a source of enzyme for purification.

IV.C. Purification of GBD-CD2 and ΔN_{123} -GBD-CD2 mutants

For both constructs, the enzyme was recovered as inclusion bodies. The first step of purification consists in the isolation of the inclusion bodies from cell debris. Three cycles of washing, with PBS buffer supplemented with 1 mM EDTA and 1% (v/v) of Triton X-100, followed by centrifugation at 20,000 g during 20 min at 4°C were applied. Then, the

inclusion bodies were denaturated, overnight at 4°C, with a 8 M urea buffer (pH 8.0) at OD 600 nm of 20. An aliquot of the recombinant protein was then dialyzed in sodium acetate buffer (20 mM, pH 5.4) and used to control the enzymatic activity prior to recombinant protein purifications.

A second step of purification was carried out by Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography (IMAC). A volume of 120 mL of denatured protein preparation was supplemented with NaCl (500 mM), glycerol (0.5% (v/v)) and imidazole (25 mM). The pH was adjusted to 7.4. It was then centrifuged at 20,000g during 20 min. The centrifuged extract was injected, at a flow rate of 3 mL.min⁻¹ onto a 20 mL Ni-NTA sepharose column, (HisPrep FF 16/10, GE Healthcare Life Sciences) which was previously equilibrated with the 8 M urea buffer (pH 8.0). The column was then washed with five column volumes of 8 M urea buffer. Protein refolding was carried out in the column, with five column volumes of buffer A1 (sodium phosphate buffer (20 mM) supplemented with NaCl (500 mM) and glycerol (1% (v/v)), pH 7.4). Then, the column was equilibrated at 3 mL.min⁻¹ with five column volumes using 95% (v/v) of buffer A1 and 5% of buffer B1 (buffer A1 supplemented with imidazole (500 mM), pH 7.4). Finally, to elute the recombinant protein, a 40 min imidazole gradient was applied, at 5 mL.min⁻¹, starting from 5% of buffer B1 to 100% (v/v). Purified protein extracts were dialyzed overnight at 4°C in a sodium phosphate buffer (20 mM), NaCl (25 mM) and glycerol (1% (v/v)), pH 7.4.

Thirdly, anion exchange chromatography (IEX) was realized using a column packed with 20 mL of Q Sepharose resin (Q Sepharose Fast Flow, GE Healthcare Life Sciences). The column was first equilibrated, at 5 mL.min⁻¹, with 95% of buffer A2 (sodium phosphate buffer (20 mM), glycerol (1% (v/v)), pH 7.4) and 5% of buffer B2 (buffer A2 with NaCl (1 M), pH 7.4). Dialyzed recombinant protein was centrifuged during 20 min, at 20,000 g, at 4°C, prior to injection on the column. Recombinant protein was injected on the column, at 5 mL.min⁻¹, and the column was equilibrated with 95% buffer A2 and 5% buffer B2, for five column volumes. Then, a 40 min sodium chloride gradient was applied, at 5 mL.min⁻¹, to elute the recombinant protein.

Fourthly, the purified protein was finally dialyzed overnight at 4°C in the activity buffer (sodium acetate buffer (20 mM), NaCl (150 mM), glycerol (2.5% (v/v)) and CaCl₂ (1 mM), pH 5.75). The protein purity was checked by silver stained SDS-PAGE. The final purified protein can be preserved for several months at 4°C by addition of sodium azide.

IV.D. Standard activity assay in standard conditions

In the presence of sucrose alone, standard activities were determined by measuring the reducing power produced from sucrose cleavage using the dinitrosalicylic (DNS) acid assay (Sumner and Howells, 1935). One unit (U) of enzyme is defined as the amount of enzyme that catalyzes at 30°C the production of one μ mole of fructose (or glucose) per min in the standard conditions (292 mM sucrose, 20 mM sodium acetate buffer (pH 5.4), and 3.4 mM calcium chloride).

IV.E. Product analyses

IV.E.1. Reaction conditions

(i) Product spectrum from sucrose

The reaction from sucrose was carried out in standard conditions with 1.0 U.mL⁻¹ of enzyme during 24 h (Fabre *et al.*, 2005). The products were analyzed and quantified by HPAEC-PAD.

(ii) Product spectrum from acceptor reaction in the presence of maltose

The reaction was performed in standard conditions during 24 h using 146 mM of maltose and 1.0 U.mL⁻¹ of enzymatic activity. The reaction products were quantified by HPAEC-PAD.

(iii) α -(1→2) branched gluco-oligosaccharide synthesis

In standard conditions, α -(1→2) branching reactions of gluco-oligosaccharides (GOS) were carried out until sucrose depletion with 50 g.L⁻¹ of acceptor and using 0.25 U.mL⁻¹ of enzymatic activity. The final reaction medium was analyzed by HPAEC-PAD.

α -(1→2) GOS branching reactions with purified GOS DP4 (α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→4)-D-Glcp) and purified GOS DP5 (α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→4)-D-Glcp) were performed and analyzed by HPLC as described in chapter III.

(iv) Control of α -(1→2) linkage content in dextrans

Seven reactions were carried out with 292 mM sucrose and 2470, 1237, 463, 311, 123, 92 or 62 mM of 70 kDa dextran (dextran concentrations expressed as anhydroglucosyl unit concentrations). Enzyme concentration was 1.5 U.mL⁻¹. The final reaction media were analyzed using HPLC to check sucrose depletion and calculate α -(1→2) linkage content. Then, modified dextrans were precipitated by adding absolute ethanol (4°C) to a final concentration of 70% (v/v). Precipitated dextrans were recovered by centrifugation and solubilized in ultrapure water before undergoing another cycle of purification. Prior to freeze drying, dextran purity was checked by HPLC. Approximately 10 mg of each dextran were analyzed by ¹H NMR to determine the α -(1→2) linkage content.

IV.E.1.a. Analytical techniques

(i) HPAEC-PAD

Glucose, fructose, sucrose, leucrose, nigerose, turanose, maltose and kojibiose concentrations were assayed by HPAEC-PAD. Tréhalulose was only used as standard for product identification. Products were separated with a CarboPAC PA100 column combined with PA100 guard column. The oven temperature is 30°C. The mobile phase is sodium hydroxide solution (150 mM) at a flow rate of 1 mL.min⁻¹. A sodium acetate gradient from 6 to 300 mM in 30 min was performed.

To calculate reaction yields, free glucose, kojibiose, turanose and nigerose concentrations are subtracted from the free fructose concentration, allowing yield calculations of α -(1→2) branched GOS or α -(1→2) branched dextran synthesis.

(ii) HPLC

Glucose, fructose, leucrose productions and sucrose depletion were assayed by high performance liquid chromatography (HPLC) on a Dionex system equipped with a refractometer (RI-101 - Shodex). The column was an Aminex HPX-87K (300x7.7 mm; Biorad, Hercules, CA, USA). The column oven temperature was set at 65°C. Ultrapure water was used as eluent at a flow rate of 0.6 mL.min⁻¹. Glucose production rates reflect hydrolysis activity whereas fructose production rates reflect α -(1→2) glucosylation activity plus hydrolysis activity.

(iii) NMR

Samples of α -(1 \rightarrow 2) branched dextrans (10 mg) were exchanged twice with 99,9 atom% D₂O, lyophilized and dissolved in 600 μ L D₂O. All 1D NMR spectra were recorded on an Avance II (Bruker) 500 MHz spectrometer (500 MHz for ¹H NMR and 125 MHz for ¹³C NMR) using a 5 mm z-gradient TBI probe. The data were acquired and processed using topspin 2.1 software. The temperature was 298 K. 1D ¹H NMR spectra were acquired by using a 30° pulse, 8,000 Hz sweep width and 5 s total relaxation delay. A total of 16 scans were recorded.

IV.F. Kinetic parameter determination for ΔN_{123} -GBD-CD2

ΔN_{123} -GBD-CD2 kinetic mechanism was investigated by steady-state kinetics following the methodology described in (Brison *et al.*, 2010). Initial velocities were all determined in standard conditions using varying sucrose concentrations of 10, 20, 30, 50, 100, 200, 300, 400, 500 or 600 mM, and 70 kDa dextran concentrations of 31, 62, 309 or 617 mM (concentrations expressed in anhydroglucosyl units). The enzyme concentration used was of 0.25 U.mL⁻¹.

Glucose, fructose productions and sucrose depletion were assayed by high performance liquid chromatography (HPLC) using an Aminex HPX-87K column (300x7.7 mm; Biorad, Hercules, CA, USA).

The protein content of the purified enzyme preparation was assayed using the microBradford technique using BSA as standard, in order to compare the initial velocities of sucrose hydrolysis and glucosylation of acceptors determined for ΔN_{123} -GBD-CD2 with that of GBD-CD2 (Brison *et al.*, 2010).

IV.G. Effect of calcium on ΔN_{123} -GBD-CD2

Hydrolytic and transferase activities of ΔN_{123} -GBD-CD2 were determined in the presence of either calcium chloride (0.34 mM), or EDTA (1 mM and 5 mM) or without any additive by measuring the reducing sugars produced from sucrose consumption. In standard conditions,

at enzyme concentration of 0.32 U.mL^{-1} (87 nM), triplicates of initial velocity determinations were carried out. Analog experiences were repeated in standard conditions in the presence of 62 mM (concentration expressed in anhydroglucosyl units) of 70 kDa dextran (Sigma-Aldrich) with 0.10 U.mL^{-1} (27 nM) of enzyme.

IV.H. Crystallization and data collection

Freshly purified enzymes were concentrated using centrifugal filter device (Amicon Ultra – 4 Ultracel – 50 kDa, Millipore) to concentrations ranging from 3 to 4 mg.mL^{-1} . Purified proteins were assayed during enzyme concentrations by spectroscopy at 280 nm using a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer with theoretical molar extinction coefficients and molecular masses supplied by ProtParam software (GBD-CD2-V5-His₆, 191,937 Da, $315,950 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$; ΔN_{123} -GBD-CD2-V5-His₆, 123,374 Da, $188,860 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).

Protein crystallization conditions were screened according to the sparse-matrix method using the commercially available buffers, for GBD-CD2 and ΔN_{123} -GBD-CD2. All attempts to crystallise the full-length GBD-CD2 were unsuccessful.

Using the hanging-drop vapour diffusion technique, ΔN_{123} -GBD-CD2 enzyme crystallized over several weeks at 285 K in three related conditions of JCSG Core suite, containing low molecular weight PEG and ammonium salts. After optimization, crystals were obtained in 17% (w/v) PEG 3350, 0.2 M NH_4I , 80 mM ammonium citrate, 2% (v/v) glycerol, pH 5.0. Drops were prepared by mixing 0.75 μL of the protein solution at concentrations ranging from 3 to 4 mg.mL^{-1} , with 0.75 μL of the reservoir solution. In this condition, crystals are either needles or plate clusters. Streak seeding with a cat's whisker enabled us to obtain single or clustered plate crystals with a thickness of 10-20 μm . Attempts to enhance the third dimension were unsuccessful. Crystals were cryo-protected with the reservoir solution supplemented with 15% glycerol (w/v) and then flash-cooled. The majority of crystals diffracted to 5 – 8 Å resolution; only one crystal (100 x 100 x ~10 μm) co-crystallized with $([\alpha\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow)_n\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow4)\text{-D-Glcp}]; n=4)$ diffracted to 3 - 4 Å resolution and was used for data collection and structure determination.

Data were collected at the European Synchrotron Radiation Facility (Grenoble, France) at 100 K on beamline ID14-eh2. The dataset was processed using IMOSFLM and SCALA

(Bailey, 1994; Leslie, 1992). According to the methodology for structure determination at low resolution described by Brunger *et al.*, we fixed the resolution limit at a $I/\sigma(I)$ cutoff of 1.2 (Brunger *et al.*, 2009). Including weak diffraction reflections resulted in a less noisy electron density map.

IV.I. Primary sequence alignment of glucansucrases from GH70

The amino acid sequences of the forty-four characterized GH-70 glucansucrases, including the CD2 of DSR-E and GTF180, indexed in CAZy classification were retrieved from the GenBank. They are listed with their product specificities in Appendix I. The amino acid sequences of catalytic domains (domains A, B and C) were aligned using MUSCLE web server and visualized with the Jalview applet (Edgar, 2004).

IV.J. Structure determination and refinement

First, CHAINSAW was used to obtain a mixed model between domains A, B and C of GTF180- ΔN and ΔN_{123} -GBD-CD2 in which only conserved residues were retained (Stein, 2008). This model was used as a template for molecular replacement. With PHASER, four loosely packed molecules were found in the asymmetric unit with a solvent content of 58% (McCoy *et al.*, 2007). The unit cell parameters are defined in Table 2. Then, the model was cautiously manually built using COOT software (Emsley *et al.*, 2010). The structure of GTF180- ΔN at 1.7 Å resolution was used as a model during building.

Refinement was achieved using REFMAC5 applying NCS as well as TLS (Murshudov *et al.*, 1997; Painter and Merritt, 2006). Respective values for R_{work} and R_{free} are 0.34 and 0.39. Data collection and processing statistics are presented in Table 12. Residue numbering refers to the protein sequence of the whole DSR-E dextransucrase sequence available in the GenBank (accession number CAD22883.1). The coordinates and structure factor amplitudes will be deposited in the PDB.

Table 12: Data collection and refinement statistics. Numbers in parentheses refer to statistics for the outer resolution shell.

Data collection	
Wavelength (Å)	0.933
Cell dimensions, a b c (Å), α β γ (°)	66.85 140.90 155.35 84.9 89.1 75.7
Space group	<i>P1</i>
Molecules per asymmetric unit	4
Resolution limit (Å)	43 - 3.2 (3.37 – 3.20)
Reflections (total/unique)	165,730 / 87,356
Completeness (%)	96.8 (96.3)
R_{sym} (%)	22.4 (69.1)
Mean $I/\sigma(I)$	3.1 (1.2)
Refinement statistics	
<i>Asymmetric unit content</i>	
Number of protein atoms	23,056
Reflections (working/test)	82,988 / 4,368
$R_{\text{free}}/R_{\text{cryst}}$	0.39/0.34
<i>Stereochemical quality of the model</i>	
Rmsd from bond lengths (Å)	0.01
Rmsd from angles (°)	1.34
Ramachandran favoured (%)	88.1
Ramachandran allowed (%)	9.6
Ramachandran disallowed (%)	2.3

V. Acknowledgments

Yoann Brison was supported by a grant from the region Midi-Pyrénées (France). Yoann Brison has been financially supported by a short-term fellowship from the European Molecular Biology Organization (EMBO). We gratefully acknowledge the staff of beamline ID14-eh2 at ESRF for data collection facilities and assistance (Grenoble, France).

We thank Nelly Monties for contributing to the characterization and the purification ΔN_{123} -GBD-CD2. We also thank Pierre Escalier and Sandra Pizzut-Serin for technical assistance.

References

A

Albenne, C., Skov, L.K., Tran, V., Gajhede, M., Monsan, P., Remaud-Siméon, M., André-Leroux, G., 2007. Towards the molecular understanding of glycogen elongation by amylosucrase. *Proteins Struct Funct Bioinf* 66, 118-126.

André, I., Potocki-Véronèse, G., Morel, S., Monsan, P., Remaud-Siméon, M., 2010. Sucrose-Utilizing Transglucosidases for Biocatalysis, in: Springer (Ed.), [Without title], Berlin - Heidelberg, pp. 1-24.

B

Bailey, S., 1994. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D* 50, 760-763.

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.

Brisson, Y., Fabre, E., Moulis, C., Portais, J.-C., Monsan, P., Remaud-Siméon, M., 2010. Synthesis of dextrans with controlled amounts of α -1,2 linkages using the transglucosidase GBD-CD2. *Appl Microbiol Biotechnol* 86, 545-554.

Brunger, A. T., DeLaBarre, B., Davies, J. M., Weis, W. I., 2009. X-ray structure determination at low resolution. *Acta Crystallogr D* 65, 128-133.

D

De Montalk, G.P., Remaud-Simeon, M., Willemot, R.M., Planchot, V., Monsan, P., 1999. Sequence analysis of the gene encoding amylosucrase from *Neisseria polysaccharea* and characterization of the recombinant enzyme. *J Bacteriol* 181, 375-381.

Djouzi, Z., Andlueux, C., 1997. Compared effects of three oligosaccharides on metabolism of intestinal microflora in rats inoculated with a human faecal flora. *Br J Nutr* 78, 313-324.

Djouzi, Z., Andrieux, C., Pelenc, V., Somarriba, S., Popot, F., Paul, F., Monsan, P., Szylit, O., 1995. Degradation and fermentation of alpha-gluco-oligosaccharides by bacterial strains from human colon: in vitro and in vivo studies in gnotobiotic rats. *J Appl Microbiol* 79, 117-127.

E

Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucl Acids Res* 32, 1792-1797.

Emond, S., Mondeil, S., Jaziri, K., Andre, I., Monsan, P., Remaud-Simeon, M., Potocki-Veronese, G., 2008. Cloning, purification and characterization of a thermostable amylosucrase from *Deinococcus geothermalis*. *FEMS Microbiol Lett* 285, 25-32.

Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G., Cowtan, K., 2010. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D* 66, 486-501.

F

Fabre, E., 2004. Caractérisation de la dextrane saccharase DSR-E de *Leuconostoc mesenteroides*, et application à la synthèse de composés prébiotiques. PhD Thesis, INSA, Toulouse, France.

Fabre, E., Bozonnet, S., Arcache, A., Willemot, R.M., Vignon, M., Monsan, P., Remaud-Simeon, M., 2005. Role of the two catalytic domains of DSR-E dextranucrase and their involvement in the formation of highly alpha-1,2 branched dextran. *J Bacteriol* 187, 296-303.

Fernandez-Tornero, C., Lopez, R., Garcia, E., Gimenez-Gallego, G., Romero, A., 2001. A novel solenoid fold in the cell wall anchoring domain of the pneumococcal virulence factor LytA. *Nat Struct Biol* 8, 1020-1024.

Flickinger, E.A., Wolf, B.W., Garleb, K.A., Chow, J., Leyer, G.J., Johns, P.W., Fahey, G.C., Jr., 2000. Glucose-based oligosaccharides exhibit different in vitro fermentation patterns and affect in vivo apparent nutrient digestibility and microbial populations in dogs. *J Nutr* 130, 1267-1273.

H

Ha, S.J., Seo, D.H., Jung, J.H., Cha, J., Kim, T.J., Kim, Y.W., Park, C.S., 2009. Molecular cloning and functional expression of a new amylosucrase from *Alteromonas macleodii*. *Biosci Biotechnol Biochem* 73, 1505-1512.

Hehre, E.J., Hamilton, D.M., 1946. Bacterial synthesis of an amylopectin-like polysaccharide from sucrose. *J Biol Chem* 166, 777-778.

Holm, L., Kaariainen, S., Rosenstrom, P., Schenkel, A., 2008. Searching protein structure databases with DaliLite v.3. *Bioinformatics* 24, 2780-2781.

J

Janecek, S., Svensson, B., Henrissat, B., 1997. Domain Evolution in the α -Amylase Family. *J Mol Evol* 45, 322-331.

Jensen, M.H., Mirza, O., Albenne, C., Remaud-Simeon, M., Monsan, P., Gajhede, M., Skov, L.K., 2004. Crystal structure of the covalent intermediate of amylosucrase from *Neisseria polysaccharea*. *Biochemistry* 43, 3104-3110.

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.

K

Koepsell, H.J., Tsuchiya, H.M., 1952. Enzymatic synthesis of dextran. *J Bacteriol* 63, 293-295.

Kralj, S., van Geel-Schutten, G.H., Dondorff, M.M., Kirsanovs, S., van der Maarel, M.J.E.C., 2004. Glucan synthesis in the genus *Lactobacillus*: isolation and characterization of glucansucrase genes, enzymes and glucan products from six different strains. *Microbiology* 150, 3681-3690.

Kralj, S., Stripling, E., Sanders, P., van Geel-Schutten, G.H., Dijkhuizen, L., 2005. Highly hydrolytic reuteransucrase from probiotic *Lactobacillus reuteri* strain ATCC 55730. *Appl Environ Microbiol* 71, 3942-3950.

L

Leslie, A.G.W., 1992. Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data. *Joint CCP4 + ESF-EAMCB Newsletter on Protein Crystallography* No 26.

M

McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C., Read, R.J., 2007. Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr* 40, 658-674.

Monchois, V., Vignon, M., Escalier, P.C., Svensson, B., Russel, R.R., 2000a. Involvement of Gln 937 of *Streptococcus downei* GTF-I glucansucrase in transition-state stabilisation. *Eur J Biochem* 2000, 4127-4136.

Monchois, V., Vignon, M., Russell, R.R., 2000b. Mutagenesis of Asp569 of glucosyltransferase I glucansucrase modulates glucan and oligosaccharide synthesis. *Appl Environ Microbiol* 66, 1923-1927.

Monsan, P., Remaud-Siméon, M., André, I., 2010. Transglucosidases as efficient tools for oligosaccharide and glucoconjugate synthesis. *Curr Opin Microbiol* 13, 293-300.

Moulis, C., Joucla, G., Harrison, D., Fabre, E., Potocki-Veronese, G., Monsan, P., Remaud-Simeon, M., 2006. Understanding the polymerization mechanism of glycoside-hydrolase family 70 glucansucrases. *J Biol Chem* 281, 31254-31267.

Moulis, C., 2006. Ingénierie rationnelle de la dextrane-saccharase DRS-S: Compréhension du mécanisme de polymérisation pour la synthèse de dextranses de taille contrôlée. PhD Thesis, INSA, Toulouse.

Murshudov, G.N., Vagin, A.A., Dodson, E.J., 1997. Refinement of Macromolecular Structures by the Maximum-Likelihood Method. *Acta Crystallogr D* 53, 240-255.

N

Nakamura, A., Haga, K., Yamane, K., 1993. Three histidine residues in the active center of cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus* sp. 1011: effects of the replacement on pH dependence and transition-state stabilization. *Biochemistry* 32, 6624-6631.

P

Painter, J., Merritt, E.A., 2006. TLSMD web server for the generation of multi-group TLS models. *J Appl Crystallogr* 39, 109-111.

Pijning, T., Vujicic-Zagar, A., Kralj, S., Eeuwema, W., Dijkhuizen, L., Dijkstra, B.W., 2008. Biochemical and crystallographic characterization of a glucansucrase from *Lactobacillus reuteri* 180. *Biocatal Biotransfor* 26, 12-17.

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

R

Remaud-Simeon, M., Willemot, R.-M., Sarçabal, P., Potocki de Montalk, G., Monsan, P., 2000. Glucansucrases: molecular engineering and oligosaccharide synthesis. *J Mol Catal B: Enzym* 10, 117-128.

Robyt, J.F., Walseth, T.F., 1979. Production, purification, and properties of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Carbohydr Res* 68, 95-111.

S

Shah, D.S.H., Joucla, G., Remaud-Simeon, M., Russell, R.R., 2004. Conserved repeat motifs and glucan binding by glucansucrases of oral *streptococci* and *Leuconostoc mesenteroides*. J Bacteriol 186, 8301-8308.

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

Stein, N., 2008. CHAINSAW: a program for mutating pdb files used as templates in molecular replacement. J Appl Crystallogr 41, 641-643.

Sumner, J., Howells, S., 1935. A method for determination of invertase activity. J Biol Chem 108, 51-54.

Svensson, B., 1994. Protein engineering in the alpha-amylase family: catalytic mechanism, substrate specificity, and stability. Plant.Mol.Biol. 25, 141.

U

Uitdehaag, J.C.M., 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.

V

Valette, P., Pelenc, V., Djouzi, Z., Andrieux, C., Paul, F., Monsan, P., Szylit, O., 1993. Bioavailability of new synthesised glucooligosaccharides in the intestinal tract of gnotobiotic rats. J Sci Food Agric 62, 121-127.

van Leeuwen, S.S., Kralj, S., Eeuwema, W., Gerwig, G.J., Dijkhuizen, L., Kamerling, J.P., 2009. Structural Characterization of Bioengineered α -D-Glucans Produced by Mutant Glucansucrase GTF180 Enzymes of *Lactobacillus reuteri* Strain 180. Biomacromolecules 10(3), 580-588.

Vujcic-Zagar, A., 2007. Structural and functional investigations of *Lactobacillus reuteri* glucansucrase with crystallographic studies on an α -amylase and a prolyl endoprotease from *Aspergillus niger*. PhD Thesis, Rijkuniversiteit Groningen, Groningen.

Conclusion

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse ont visé à mieux comprendre le mécanisme de synthèse de gluco-oligosaccharides (GOS) et dextrans branchés en α -(1→2) par la transglucosidase GBD-CD2 et d'avancer dans la compréhension des facteurs liant la structure de cette enzyme à son activité.

Depuis 1992, l'activité dextrane-saccharase de *Ln. mesenteroides* NRRL B-1299 est utilisée par la société Solabia pour synthétiser un mélange de GOS branchés en α -(1→2) constitué de trois séries de GOS, appelées OD, R et R', qui présentent des propriétés prébiotiques. Le procédé industriel est basé sur l'utilisation en réacteur à lit fixe de l'activité enzymatique immobilisée dans des billes d'alginate. À partir de saccharose et de maltose, le procédé permet de produire les GOS branchés en α -(1→2) avec un rendement de seulement 40% malgré un taux de conversion du saccharose proche de 100%. En effet, la majorité des GOS synthétisés par ce procédé ne présente pas de liaisons α -(1→2). Le gène *dsr-E* codant pour la dextrane-saccharase de *Ln. mesenteroides* NRRL B-1299 responsable de la synthèse de GOS branchés en α -(1→2) a été isolé en 2002. Le produit de ce gène est une enzyme de haute masse moléculaire (313 kDa) appelée DSR-E appartenant à la famille 70 des glycoside-hydrolases. Au sein de ce groupe, DSR-E présente la particularité de posséder deux domaines catalytiques (CD1 et CD2), appartenant tous deux à la famille 70 des glycoside-hydrolases (GH70) et séparés par un domaine putatif de liaison au glucane (GBD). La DSR-E recombinante, produite chez *E. coli*, synthétise à partir de saccharose un dextrane ne contenant que 5% de liaisons glucosidiques α -(1→2).

Lorsque nous avons débuté nos travaux, la caractérisation de variants tronqués de DSR-E avait permis d'attribuer un rôle spécifique à chacun des domaines catalytiques. Il avait en effet été démontré que la forme CD1-GBD est responsable de la synthèse d'un dextrane contenant 5% de liaisons α -(1→3) et 11% de liaisons α -(1→4) alors que la forme GBD-CD2 ne produit pas de glucane à partir de saccharose. C'est à partir de l'analyse préliminaire des produits de réactions obtenus en présence de saccharose et de dextrane (ou GOS) accepteur, que l'activité transglucosidase de GBD-CD2 avait été mise en évidence et que sa spécificité pour la synthèse de liaisons glucosidiques de type α -(1→2) avait été révélée.

Les données disponibles tant sur le plan biochimique que structural étant réduites, l'étude plus approfondie des relations structure-activité de GBD-CD2 a été conduite en menant de front différentes approches combinant des techniques de biologie moléculaire à des techniques de biochimie analytique et de biologie structurale. Ces approches incluent :

- la construction rationnelle de nouvelles formes tronquées de GBD-CD2 possédant un domaine de liaison au glucane raccourci afin d'améliorer la solubilité et la purification de l'enzyme recombinante ;
- l'analyse cinétique à l'état stationnaire des réactions d'hydrolyse et de transglucosylation catalysées par GBD-CD2 et par les formes tronquées retenues
- la caractérisation structurale des produits synthétisés (GOS et dextrans branchés en α -(1→2)) ;
- la cristallisation de GBD-CD2 (ou d'un de ses mutants tronqués) et la résolution de sa structure tridimensionnelle afin d'approfondir l'étude de ses relations structure-fonction au niveau moléculaire.

Les principales conclusions que nous pouvons tirer de notre étude ainsi que les perspectives envisagées sont présentées ci-après.

Construction des mutants tronqués de GBD-CD2

GBD-CD2 possède un domaine putatif de liaison au glucane d'environ 850 acides aminés. Ce domaine est constitué d'unités répétées Cell-Wall d'environ 20 résidus qui ont été identifiées par alignement de séquence. Chaque unité possédant un motif comprenant des résidus aromatiques, il est fort probable que la taille du GBD ainsi que son caractère hydrophobe ne favorisent pas la solubilisation et la purification de la protéine. Partant de cette hypothèse, nous avons ciblé douze sites de troncature. La construction des variants a permis d'obtenir trois mutants actifs de masses moléculaires égales à 180, 147 et 123 kDa. Nous nous sommes concentrés sur l'optimisation de l'expression du gène codant pour la forme la plus courte, ΔN_{123} -GBD-CD2, pour laquelle 76% du GBD a été tronqué. Après optimisation, le variant a été produit à hauteur de 2 300 U.L⁻¹ de culture, soit à un niveau 13 fois supérieur à celui enregistré au démarrage de l'étude. Les deux autres formes tronquées

actives ont été exprimées à des niveaux d'activité comparables à ceux de l'enzyme parentale (1 000 U.L⁻¹ de culture). Toutefois, comme pour GBD-CD2, ces formes tronquées sont principalement produites sous la forme de corps d'inclusion.

Purification de GBD-CD2 et de ΔN_{123} -GBD-CD2

Nous avons tiré profit de la production de GBD-CD2 et de ΔN_{123} -GBD-CD2 sous forme de corps d'inclusion pour en faciliter la purification. En effet, les corps d'inclusion sont en grande majorité composés de l'enzyme recombinante inactive. Ils sont par ailleurs plus denses que les autres débris cellulaires, ce qui permet de les isoler par centrifugation après cassage cellulaire. Après cette première étape, l'enzyme recombinante contenue dans les corps d'inclusion isolés a été dénaturée. Les étapes suivantes ont consisté à la purifier par chromatographie d'affinité (IMAC) en la renaturant directement sur la colonne Ni²⁺-NTA puis par une chromatographie échangeuse d'anions (IEC). Ces trois étapes ont permis d'isoler les deux formes, GBD-CD2 et ΔN_{123} -GBD-CD2, avec un degré de pureté supérieur à 95 %, l'activité spécifique de chacune des préparations étant respectivement de 28 ± 9 et de 45 ± 10 U.mg⁻¹. Il faut toutefois noter que le procédé de purification employé n'a pas permis de se débarrasser des deux formes dégradées. Ces formes dégradées et co-purifiées avec les enzymes d'intérêt peuvent être préjudiciables à la cristallisation de ces protéines. Pour éviter ces phénomènes et améliorer la qualité des cristaux que nous avons obtenus, il serait intéressant de modifier les constructions plasmidiques afin d'introduire en position N-terminale une étiquette de purification par affinité, différente de l'étiquette histidine, de type glutathione-S-transférase (GST) par exemple. Elle permettrait de mener une seconde étape de purification par affinité afin de ne purifier que les formes enzymatiques non dégradées.

Détermination des paramètres cinétiques de GBD-CD2 et ΔN_{123} -GBD-CD2

En présence de saccharose seul, la cinétique de la réaction d'hydrolyse catalysée par ces deux formes suit le modèle de Michaelis-Menten. Les V_{max_H} respectifs calculés pour GBD-CD2 et ΔN_{123} -GBD-CD2 sont respectivement de $34,1 \pm 0,5$ et de $36,3 \pm 0,6$ $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de protéine purifiée. Par ailleurs, les $K_{m_{\text{SucH}}}$ valent $9,7 \pm 0,8$ et $7,5 \pm 1,0$ mM. Les

deux mutants présentant constantes catalytiques très proches, la troncature du GBD n'affecte pas la capacité d'hydrolyse du saccharose en l'absence d'accepteur.

En présence de dextrane et de saccharose, les enzymes GBD-CD2 et ΔN_{123} -GBD-CD2 sont toutes les deux activées. Leurs V_{maxT} respectifs augmentent jusqu'à 303 ± 5 et 462 ± 45 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de protéine. Ces valeurs correspondent à des turnovers du même ordre de grandeur, respectivement de 970 et de 947 s^{-1} . Toutefois, les constantes de Michaelis apparentes, K_{mDexT} et K_{mSucT} , déterminées à partir du modèle Ping Pong Bi Bi valent respectivement 125 ± 21 et 206 ± 34 mM pour ΔN_{123} -GBD-CD2 alors que ces mêmes grandeurs atteignent 75 ± 3 et 42 ± 2 mM pour GBD-CD2. La troncature a donc un effet sur les constantes apparentes de Michaelis. Si nous considérons que ces paramètres sont le reflet de l'affinité de l'enzyme pour ses substrats, la troncature entrainerait donc une diminution de l'affinité à la fois pour le dextrane et le saccharose. Alors que cette troncature du GBD peut diminuer le nombre de sites putatifs de fixation au dextrane au sein du GBD, on peut se demander quelle pourrait être la raison pour laquelle l'affinité envers le saccharose se trouve diminuée. Zujicic-Zagar *et al.* ont décrit une forme cristallographique de l'apo-enzyme GTF180- ΔN , seule glucane-saccharase de la famille 70 de structure connue, pour laquelle le GBD tronqué est rabattu sur la gorge catalytique en formant deux petits tunnels, orientés vers les sous-sites -1 et +1, et de diamètre probablement suffisant (8,5 Å) pour laisser rentrer le saccharose. Par analogie, si des mouvements équivalents devaient se produire dans GBD-CD2, ils pourraient affecter la structure du site actif et par voie de conséquence l'affinité de l'enzyme pour le saccharose. L'importance du GBD pour l'activité de l'enzyme pourrait aussi expliquer la très forte perte d'activité enregistrée pour le variant totalement délété du domaine de liaison au glucane (Fabre, 2004).

Caractérisation des produits des réactions d'accepteur

Le maltose est un accepteur fort pour la plupart des glucane-saccharases de la famille GH70. Pourtant, GBD-CD2 et ΔN_{123} -GBD-CD2 ne le reconnaissent pas du tout comme accepteur. Par contre, en présence d'un mélange de GOS accepteurs, riches en liaison α -(1 \rightarrow 6) du type $[(6)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow)_n\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{4)-D-Glcp}$, avec $1 < n < 9$), les deux mutants catalysent efficacement le transfert des unités glucosyle du saccharose sur les accepteurs avec formation de liaisons α -(1 \rightarrow 2). Le suivi de la production des GOS branchés

a permis de démontrer que la glucosylation des GOS est séquentielle. Cette observation a été confortée par l'analyse des réactions d'accepteur effectuées en présence de GOS isolés et purs de DP4 et 5 ($[(6)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{)}_2\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{4)}\text{-D-Glcp}$ et $[(6)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{)}_3\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{4)}\text{-D-Glcp}$, respectivement). Au cours de la réaction enzymatique, les GOS sont d'abord mono-glucosylés avant d'être di et tri-glucosylés (pour le GOS de DP5). Ces résultats sont en accord avec le mécanisme Ping Pong Bi Bi proposé. La caractérisation structurale des produits nous a permis de localiser la (ou les) position(s) de la liaison α -(1 \rightarrow 2) introduite. Dans le cas du DP4 accepteur, la glucosylation conduit à la formation d'un seul produit mono-glucosylé à l'extrémité non réductrice et d'un produit di-glucosylé. Pour ce qui concerne l'accepteur de DP5, il peut être mono-glucosylé sur l'une des trois unités glucosyle liées en α -(1 \rightarrow 6) de la molécule. Cela indique que l'accepteur peut s'arrimer dans trois positions différentes dans le site actif de l'enzyme. Notons que la formation du produit portant le branchement le plus proche de l'extrémité réductrice est la moins favorable au vu des niveaux de production. L'apparition graduelle des produits di-glucosylés et du produit tri-glucosylé indique de surcroît que le site actif peut accueillir ces accepteurs branchés et que l'enzyme peut glucosyler deux unités « glucosyle » adjacentes (Figure 54 et Figure 55). Si l'on se réfère à la nomenclature généralement utilisée pour décrire les sous-sites des amylases, cette analyse structurale nous permet de suggérer que le site actif a probablement la forme d'une gorge ne présentant qu'un seul sous-site -1 et différents sous-sites accepteurs (série +n et +n').

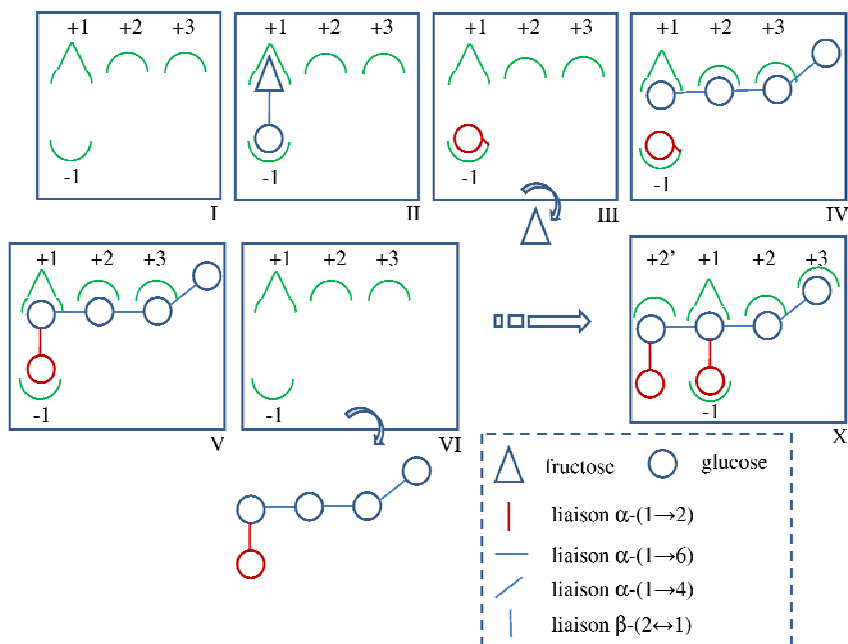


Figure 54 : Schéma récapitulatif du mode de branchement du GOS DP4 (α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)-D-Glcp) prenant en considération un mécanisme Ping Pong Bi Bi et les structures de GOS branchés en α -(1 \rightarrow 2). Sous-sites de ΔN_{123} -GBD-CD2 notés -1 et de +n' à +n.

I, site actif de l'enzyme ΔN_{123} -GBD-CD2 ; **II**, arrimage du saccharose ; **III**, formation de l'intermédiaire β -D-glucosyl-enzyme ; **IV**, arrimage du GOS DP4 ; **V**, mono-glucosylation en α -(1 \rightarrow 2) du GOS DP4 ; **VI**, relargage du GOS branché en α -(1 \rightarrow 2) ; **X**, formation du GOS di-glucosylé au terme de la réaction enzymatique.

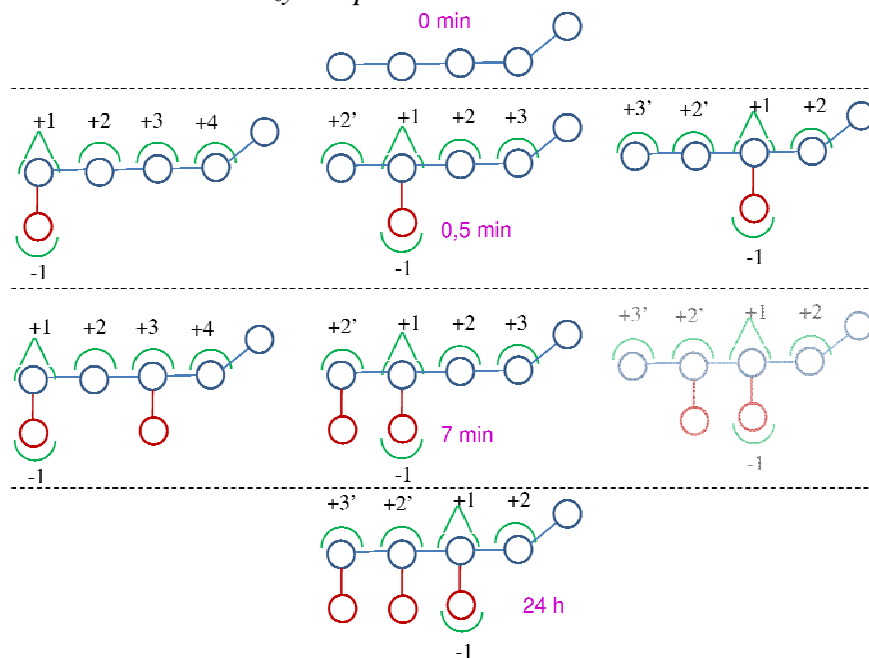


Figure 55 : Schéma récapitulatif des produits de la glucosylation séquentielle du GOS DP5. Après 30 s de réaction les formes mono-glucosylées sont synthétisées, les formes di-glucosylées le sont après 7 min et la forme tri-glucosylée l'est à 24h. Notons que la forme di-glucosylée mise en transparence n'a pas été isolée et caractérisée.

Le dextrane est également un bon accepteur pour GBD-CD2 et ΔN_{123} -GBD-CD2. Nous avons montré pour les deux enzymes qu'il est possible de contrôler le taux de liaisons α -(1 \rightarrow 2) contenu dans le produit final. Pour ce faire, le rapport molaire entre le donneur d'unités glucosyle (saccharose) et l'accepteur de ces unités (dextrane) a été modulé de 0,12 à 4,74. À faible concentration en saccharose (rapport de 0,12), toutes les unités glucosyle sont transférées sur l'accepteur. Le dextrane final contient alors environ 11% de liaisons α -(1 \rightarrow 2) que cela soit pour GBD-CD2 ou ΔN_{123} -GBD-CD2. Lorsque le rapport molaire [saccharose]/[dextrane] augmente, la disponibilité des chaînes de dextrans diminue. Les unités glucosyle sont transférées sur l'eau (hydrolyse) ou sur le fructose libre pour former du leucrose. Pour un rapport de 4,74, le dextrane contient près de 40 % de liaisons α -(1 \rightarrow 2). Cela implique que plus d'une unité glucosyle sur deux des chaînes linéaires de dextrane est branchée en α -(1 \rightarrow 2). Il s'agit du plus fort taux de liaisons α -(1 \rightarrow 2) rapporté pour un dextrane. De plus, la dégradation enzymatique par l'amyloglucosidase et l'endodextranase a permis de mettre en évidence que les très longues chaînes de dextrane sont probablement plus ramifiées au niveau de leur extrémité non réductrice. Au contraire, les dextrans plus courts présentent une répartition plus uniforme des branchements.

Intérêt applicatif

Nos travaux ont permis d'élargir la gamme des produits synthétisés par GBD-CD2. Un procédé permettant de contrôler le taux de branchement des GOS branchés en α -(1 \rightarrow 2) a pu être proposé et de nouvelles structures encore jamais identifiées ont été également générées. Sur un plan plus appliqué, il sera intéressant d'évaluer les propriétés (notamment prébiotiques) de ces différents produits afin d'établir un éventuel lien entre la structure des GOS branchés en α -(1 \rightarrow 2) et leurs propriétés. De plus la mise en œuvre de GBD-CD2 ou ΔN_{123} -GBD-CD2 dans un procédé industriel présenterait l'avantage par rapport au procédé actuel de limiter la production de dextrane et d'oligosaccharides ne contenant pas de liaisons α -(1 \rightarrow 2).

Analyse de la structure tri-dimensionnelle de ΔN_{123} -GBD-CD2

Alors que nous n'avons jamais obtenu de cristaux pour GBD-CD2, la forme ΔN_{123} -GBD-CD2 a cristallisé en présence de [6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow)]₄- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)-D-Glcp. Le cristal a diffracté à une résolution de 3,2 Å et la structure de ΔN_{123} -GBD-CD2 a ensuite été déterminée par remplacement moléculaire. Il s'agit de la première structure d'une transglucosidase utilisatrice de saccharose et spécifique de la formation de liaisons α -(1 \rightarrow 2) glucosidiques. Ajoutons que dans cette famille d'enzymes, seule la structure de GTF180- ΔN avait été déterminée au préalable.

La structure de ΔN_{123} -GBD-CD2 révèle que le polypeptide se replie de manière très originale pour adopter une structure formant un U dont les deux extrémités correspondent aux extrémités N et C-terminales de la chaîne. Ce repliement permet de définir quatre domaines A, B, C et IV, comparables à ceux de GTF180- ΔN décrits par Zujicic-Zagar (Figure 56) (Vujicic-Zagar, 2007). Le domaine C forme la base du repliement en U, les trois autres domaines (A, B et IV) sont formés par l'imbrication des deux branches du U.

Le GBD est uniquement situé à l'extrémité N-terminale et constituerait un cinquième domaine. Toutefois, nous n'avons pas pu reconstruire ce domaine car il semblerait qu'il soit faiblement ordonné. Il serait intéressant de construire, produire et purifier le GBD seul pour vérifier qu'il fixe les chaînes de dextrans et/ou les isomalto-oligosaccharides et entreprendre des essais de cristallisation qui pourraient permettre de résoudre sa structure.

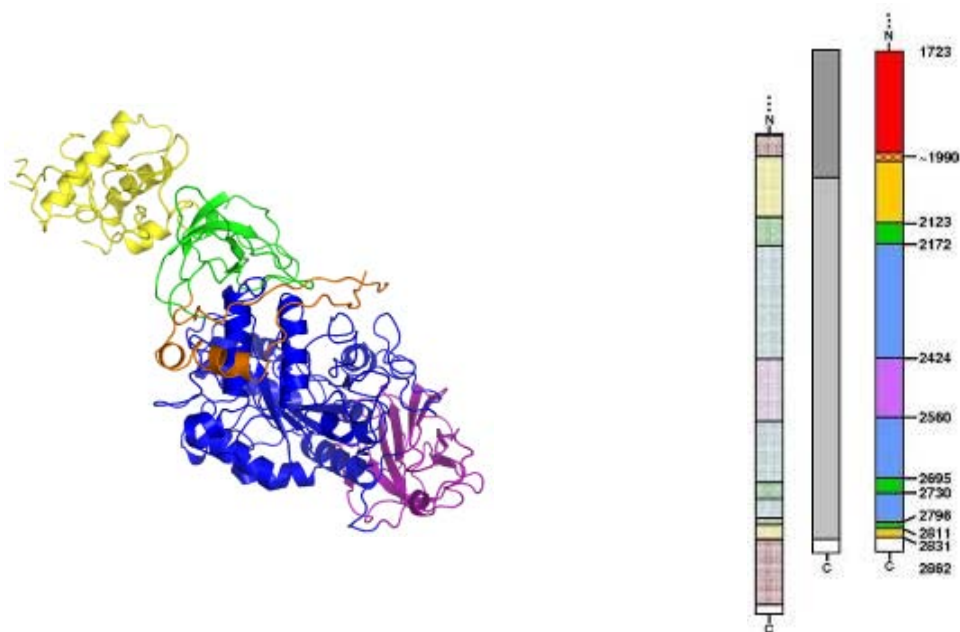


Figure 56 : Représentation cartoon de la structure de ΔN_{123} -GBD-CD2 et organisation en domaines le long de la chaîne polypeptidique.

En magenta, domaine C, en bleu et marron, domaine A, en vert, domaine B et en jaune domaine IV. La représentation en couleurs translucides correspond à GTF180- ΔN , celle en gris et gris foncé correspond à prédiction de structure de la Pfam.

Les trois domaines A, B et C présentent des homologies avec les domaines équivalents décrits pour la famille 13 des glycoside-hydrolases. Le site catalytique de la protéine est formé des domaines A et B. Comme pour les α -amylases, le domaine A adopte une structure en tonneau (β/α)₈. Conformément à ce qui est observé par Zujicic-Zagar dans la structure de GTF180- ΔN , l'enchaînement des hélices et feuilletts révèle que le tonneau de ΔN_{123} -GBD-CD2 est apparenté à celui des α -amylases (Vujicic-Zagar, 2007). Dans les deux cas, les éléments correspondant aux éléments $\beta_1\alpha_1 \beta_2\alpha_2 \beta_3$ de la famille des α -amylases sont situés après les éléments $\alpha_3 \beta_4\alpha_4 \beta_5\alpha_5 \beta_6\alpha_6 \beta_7\alpha_7 \beta_8\alpha_8 \beta_3$ (le long de la séquence). Ces résultats sont en accord avec les prédictions de structure secondaire proposées par Mac Gregor *et al.* et soutiennent donc l'hypothèse de la permutation circulaire qui serait intervenue au cours de l'évolution et aurait conduit à la structure des glucane-saccharases (MacGregor *et al.*, 1996).

L'examen du site actif de ΔN_{123} -GBD-CD2 révèle une topologie en forme de gorge au fond de laquelle se trouve une poche qui fixe le saccharose. C'est en effet au fond de cette poche que se trouvent la diade catalytique putative (Asp2210 et Glu2248) et l'acide

aspartique putativement stabilisateur de l'intermédiaire covalent (Asp2322). La comparaison de la structure de ΔN_{123} -GBD-CD2 avec celle du complexe GTF180- ΔN : saccharose nous a permis de montrer que le sous-site -1, responsable de l'arrimage de l'unité glucosyle du saccharose est strictement conservé entre ΔN_{123} -GBD-CD2 et GTF180- ΔN . Ce n'est pas le cas du sous-site +1 qui diffère beaucoup plus, notamment au niveau des résidus Phe2214 et Ala2249. Dans GTF180- ΔN ces deux résidus sont respectivement remplacés par une asparagine et un tryptophane, résidus impliqués dans des liaisons hydrogène avec les fonctions hydroxyle en C1 et C6 de l'unité fructosyle du saccharose. Ces variations indiquent que la spécificité pour le saccharose est principalement conférée par le sous-site -1. Ces résultats mériteraient bien sûr d'être confortés par l'analyse d'un complexe de ΔN_{123} -GBD-CD2 : saccharose. Dans cette optique, des mutants inactifs sont en cours de préparation.

ΔN_{123} -GBD-CD2 a été cristallisée en présence d'un oligosaccharide. Pourtant, aucune densité électronique susceptible de correspondre à cette molécule n'a été observée sur les cartes. Pour pouvoir cartographier avec précision les sous-sites accepteurs dans la gorge catalytique, des essais de co-cristallisation en présence d'oligosaccharides de différentes tailles et structures (GOS et GOS branchés en α -(1 \rightarrow 2)) devront être à nouveau entrepris. Des essais réalisés avec un mutant inactif pourront peut-être faciliter l'obtention de ces complexes.

ΔN_{123} -GBD-CD2 n'est pas, au sens strict, une glucane-saccharase. En effet, elle est incapable de synthétiser du polymère. De plus, alors que la plupart des glucane-saccharases glucosylent avec une très grande efficacité l'accepteur maltose, ΔN_{123} -GBD-CD2 ne reconnaît pas cette molécule. L'analyse de la structure de GTF180- ΔN en complexe avec du maltose nous a révélé que le résidu Trp1065 qui est conservé chez toutes les glucane-saccharases, à l'exception de GBD-CD2, joue un rôle très important dans la reconnaissance du maltose. En effet, ce résidu établit des interactions de « stacking » avec le maltose dont la fonction hydroxyle du C-6, côté non-réducteur, se trouve favorablement orientée vers le C-1 de l'intermédiaire covalent β -D-glucosyl-enzyme. L'équivalent structural de ce résidu est l'alanine 2249, ce qui expliquerait pourquoi le maltose n'est pas un accepteur pour ΔN_{123} -GBD-CD2. L'absence du Trp1065 pourrait aussi être responsable de l'absence d'activité

polymérase. Cette hypothèse pourra être facilement vérifiée par la construction de mutants sur la position 2249.

De plus, bien que la topologie des gorges catalytiques de ΔN_{123} -GBD-CD2 et GTF180- ΔN soit assez proche, de nombreux résidus tapissant la gorge ne sont pas conservés. Enfin, la partie supérieure des deux gorges catalytiques diffère très nettement. Trois boucles de taille variables en modifient la topologie. L'une d'entre elle a retenu notre attention (résidus Gly2731 à Ser2796). Sa structure n'a pas pu être totalement construite dans le modèle, probablement en raison d'une grande flexibilité. Cependant, elle contient deux motifs CW évolués qui pourraient participer à la fixation des chaînes de dextrane au cours de la catalyse. Il serait intéressant d'éliminer ces motifs par ingénierie de la boucle pour étudier l'impact que cela pourrait avoir sur le branchement des GOS et des dextrans.

L'ensemble de ces observations indique que de nombreux facteurs sont susceptibles d'intervenir dans la spécificité de GBD-CD2. Il souligne la nécessité de poursuivre les études structurales et les essais de cristallisation pour obtenir des complexes indispensables pour l'identification des facteurs déterminant la spécificité de cette protéine. Enfin, connaissant la spécificité d'environ une quarantaine de glucane-saccharases de séquences connues et les structures tri-dimensionnelles de deux représentants de la famille, il devrait être possible d'identifier des résidus déterminant la spécificité (SDPs) des autres glucane-saccharases, par des méthodes bioinformatiques, de type « Surface Patch Ranking » ou « Substrate Determining Position method » (Capra and Singh, 2008; Georgi *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2005).

En conclusion, ce travail illustre l'intérêt d'étudier les relations structure-activité des glucane-saccharases pour d'une part approfondir l'étude des déterminants responsables de la régiospécificité de ces enzymes, et d'autre part contrôler et diversifier les produits synthétisés par ces enzymes (dextrans, gluco-oligosaccharides et gluco-conjugués). Enfin, la résolution de la structure de ΔN_{123} -GBD-CD2, seule enzyme caractérisée de la famille 70 spécifique de la synthèse de liaisons α -(1→2) glucosidiques, a apporté des informations précieuses et indispensables à la compréhension des relations structure-activité de cette enzyme. Ces données seront aussi utiles aussi bien pour analyser la spécificité des autres

enzymes de la famille GH70 que pour identifier des cibles de mutagénèse dirigée visant à élargir le spectre des accepteurs reconnus par ces enzymes et contrôler leurs spécificités.

Références bibliographiques

Capra, J.A., Singh, M., 2008. Characterization and prediction of residues determining protein functional specificity. *Bioinformatics* 24, 1473-1480.

Georgi, B., Schultz, J., Schliep, A., 2009. Partially-supervised protein subclass discovery with simultaneous annotation of functional residues. *BMC Struct Biol* 9, 68-82.

MacGregor, E.A., Jespersen, H.M., Svensson, B., 1996. A circularly permuted α -amylase-type (α/β)-barrel structure in glucan-synthesizing glucosyltransferases. *FEBS Lett* 378, 263-266.

Vujicic-Zagar, A., 2007. Structural and functional investigations of *Lactobacillus reuteri* glucansucrase with crystallographic studies on an α -amylase and a prolyl endoprotease from *Aspergillus niger*. PhD Thesis, Rijkuniversiteit Groningen, Groningen.

Yu, G.X., Park, B.H., Chandramohan, P., Munavalli, R., Geist, A., Samatova, N.F., 2005. In silico discovery of enzyme-substrate specificity-determining residue clusters. *J Mol Biol* 352, 1105-1117.

Annexes

Annexe I (partie 1/3)

Principales glucane-saccharases de la famille GH70 clonées (et caractérisées) classées par type de glucane synthétisé. Légende : pol - et pol + signifient que l'enzyme possède ou non une activité polymérase ; nd : non déterminé ; maj. : majoritaire. ^a d'autres souches de bactéries lactiques produisent des dextrans branchés en α -(1→2) : *Ln. mesenteroides* B-1298, B-1396, B-1399 (Slodki et al., 1986), *Ln. citreum* E497 (Maina et al., 2008), *Lb. spp* G77 (Dueñas-Chasco et al., 1998). Les gènes codant ces GS n'ont pas été clonés. ^b valable pour la souche *Ln. mesenteroides* B-1501.

^c dextrane de poids moléculaire supérieur à 68 kDa.

	Souche	Enzyme	Taille (aa)	α -(1→6)	α -(1→4)	α -(1→3)	α -(1→2)	Référence
Dextrane-saccharases	<i>Ln. mesenteroides</i> B-512F	DSR-S	1 527	95		5		(Monchois et al., 1997)
	<i>Ln. mesenteroides</i> B-512F	DSR-T	1 015	pol -				(Funane et al., 2000)
	<i>Ln. mesenteroides</i> B-512F	DSR-T5	1 499	pol +				(Funane et al., 2000)
	<i>Ln. mesenteroides</i> B-1299 ^a	DSR-E	2 835	81	3	10	5	(Fabre et al., 2005)
	<i>Ln. mesenteroides</i> B-1299	DSR-A	1 290	85		15		(Monchois et al., 1996a)
	<i>Ln. mesenteroides</i> B-1299	DSR-B	1 508	95				(Monchois et al., 1996b)
	<i>Ln. mesenteroides</i> B-1299CB4	DSR-BCB4	1 465	100				(Hee-Kyoung et al., 2008)
	<i>Ln. mesenteroides</i> B-1299	DSR-E- Δ (CD2)	1 980	86	3	11		(Fabre et al., 2005)
	<i>Ln. mesenteroides</i> B-1355	DSR-C	1 477	96				(Arguello-Morales et al., 2000)
	<i>Ln. mesenteroides</i> Lcc4	DSR-D	1 527	maj.				(Neubauer et al., 2003)
	<i>Ln. mesenteroides</i> ATCC 8293	DSR-P- Δ (VZ)	2 800	75		25		(Kralj et al., 2009)
	<i>Ln. mesenteroides</i> B-1501	DSR-R	1 330	93 ^b		7 ^b		unpub.
	<i>Ln. mesenteroides</i> B-742CB	DSRB-742	1 508	95 - 97		3 - 5		(Kang et al., 2003)
	<i>Ln. citreum</i> HJ-P4	LcDS	1 477	nd				(Yi et al., 2009)
	<i>Ln. mesenteroides</i> L0309	DSR-X	1 485	nd				(Yalin et al., 2008)

Annexe I (partie 2/3)

Principales glucane-saccharases de la famille GH70 clonées (et caractérisées) classées par type de glucane synthétisé. ^d d'autres dextranes ont été isolés à partir de souches de *Weissella confusa* (Kang et al., 2006; Maina et al., 2008)

	Souche	Enzyme	Taille (aa)	α -(1→6)	α -(1→4)	α -(1→3)	α -(1→2)	Référence
Dextrane-saccharases	<i>Ln. mesenteroides</i> 0326	Dex-YG	1 527	pol + ^c				(Zhang et al., 2008)
	<i>Ln. mesenteroides</i> IBT-QP	DSR-P	1 454	nd				(Olvera et al., 2007)
	<i>S. mutans</i> GS5	GTF-D/GTF-S	1 430	70		30		(Shimamura et al., 1994)
	<i>S. downei</i> Mfe 28	GTF-S	1 365	90				(Gilmore et al., 1990)
	<i>S. oralis</i>	GTF-R	1 575	86				(Fujiwara et al., 2000; Seibel et al., 2006)
	<i>S. sobrinus</i> OMZ176	GTF-T	1 468	79		21		(Hanada et al., 1993)
	<i>S. sobrinus</i> B13N	GTF-U	1 554	69		31		(Hanada et al., 2002)
	<i>S. salivarius</i> ATCC 25975	GTF-K	1 599	100				(Simpson et al., 1995)
	<i>S. salivarius</i> ATCC 25975	GTF-M	1 577	95				(Simpson et al., 1995)
	<i>S. gordonii</i> CH1	GTF-G	1 577	75		23		(Vickerman et al., 1997)
	<i>Lb. reuteri</i> 180	GTF-180	1 772	91		39		(Kralj et al., 2004)
	<i>Lb. sakei</i> Kg15	GTF-Kg15	1 561	90		10		
	<i>Lb. fermentum</i> Kg3	GTF-Kg3	1 595	92		8		
	<i>Lb. parabuchneri</i> 33	GTF-33	1 463	81		19		
<i>W. cibaria</i> ^d	DSR-WC	1 472	100				(Hee-Kyoung et al., 2009)	
Mutane-saccharases	<i>S. salivarius</i> ATCC 25975	GTF-L	1 449	50		50		(Simpson et al., 1995)
	<i>S. salivarius</i> ATCC 25975	GTF-J	1 517			90		
	<i>S. sobrinus</i> OMZ176/ ATCC 33478	GTF-I	1 590	glucane insoluble dans l'eau				publié en japonais
	<i>S. mutans</i> GS5	GTF-D/GTF-I	1 431	24		76		(Shimamura et al., 1994)

Annexe I (partie 3/3)

Principales glucane-saccharases de la famille GH70 clonées (et caractérisées) classées par type de glucane synthétisé.

	Souche	Enzyme	Taille (aa)	α -(1→6)	α -(1→4)	α -(1→3)	α -(1→2)	Référence
Mutane-saccharases	<i>S. mutans</i> GS5	GTF-B	1 475	12		88		(Shiroza <i>et al.</i> , 1987)
	<i>S. mutans</i> GS5	GTF-C	1 375	15		86		(Ueda <i>et al.</i> , 1988)
	<i>S. downei</i> Mfe 28	GTF-I	1 597	12		88		(Konishi <i>et al.</i> , 1999; Russell <i>et al.</i> , 1987)
	<i>S. sobrinus</i> 6715	GTF-Ia	1 592			maj.		(Konishi <i>et al.</i> , 1999)
	<i>Lb. reuteri</i> ML1	GTF-ML1	1 772	27		73		(Kralj <i>et al.</i> , 2004)
	<i>S. mutans</i> GS5	GTF-D	1 462	30		70		(Honda <i>et al.</i> , 1990)
Reuterane-saccharases	<i>Lb. reuteri</i> 121	GTF-A	1 781	43	57			(Kralj <i>et al.</i> , 2002)
	<i>Lb. reuteri</i> BioGaia /ATCC 55730	GTF-Bio/ GTF-O	1 781	22	78			(Kralj <i>et al.</i> , 2005)
Alternane-saccharase	<i>Ln. mesenteroides</i> B-1355	ASR	2 057	45		55		(Arguello-Morales <i>et al.</i> , 2000)
Enzyme de branchement en α -(1→2)	<i>Ln. mesenteroides</i> B-1299	GBD-CD2	1 745				100	(Fabre <i>et al.</i> , 2005)

Références bibliographiques – Annexe I**A**

Arguello-Morales, M.A., Remaud-Simeon, M., Pizzut, S., Sarcabal, P., Willemot, R., Monsan, P., 2000. Sequence analysis of the gene encoding alternansucrase, a sucrose glucosyltransferase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355. FEMS Microbiol Lett 182, 81-85.

D

Dueñas-Chasco, M.T., Rodríguez-Carvajal, M.A., Tejero-Mateo, P., Espartero, J.L., Irastorza-Iribas, A., Gil-Serrano, A.M., 1998. Structural analysis of the exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* spp. G-77. Carbohydr Res 307, 125-133.

F

Fabre, E., Bozonnet, S., Arcache, A., Willemot, R.M., Vignon, M., Monsan, P., Remaud-Simeon, M., 2005. Role of the two catalytic domains of DSR-E dextranucrase and their involvement in the formation of highly alpha-1,2 branched dextran. J Bacteriol 187, 296-303.

Fujiwara, T., Hoshino, T., Ooshima, T., Sobue, S., Hamada, S., 2000. Purification, characterization, and molecular analysis of the gene encoding glucosyltransferase from *Streptococcus oralis*. Infect Immun 68, 2475-2483.

Funane, K., Mizuno, K., Takahara, H., Kobayashi, M., 2000. Gene encoding a dextranucrase-like protein in *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. Biosci Biotechnol Biochem 64, 29-38.

G

Gilmore, K.S., Russell, R.R., Ferretti, J.J., 1990. Analysis of the *Streptococcus downei* *gtfS* gene, which specifies a glucosyltransferase that synthesizes soluble glucans. Infect Immun 58, 2452-2458.

H

Hanada, N., Fukushima, K., Nomura, Y., Senpuku, H., Hayakawa, M., Mukasa, H., Shiroza, T., Abiko, Y., 2002. Cloning and nucleotide sequence analysis of the *Streptococcus sobrinus* *gtfU* gene that produces a highly branched water-soluble glucan. Biochim Biophys Acta 1570, 75-79.

Hanada, N., Isobe, Y., Aizawa, Y., Katayama, T., Sato, S., Inoue, M., 1993. Nucleotide sequence analysis of the *gtfT* gene from *Streptococcus sobrinus* OMZ176. Infect Immun 61, 2096-2103.

Hee-Kyoung, K., Jong-Suk, O., Doman, K., 2009. Molecular characterization and expression analysis of the glucanucrase DSRWC from *Weissella cibaria* synthesizing a α -1,6 glucan. FEMS Microbiol Lett 292, 33-41.

Hee-Kyoung, K., Kim, Y.M., Kim, D., 2008. Functional, Genetic, and Bioinformatic Characterization of Dextranucrase (DSRBCB4) Gene in *Leuconostoc mesenteroides* B-1299CB4. J Microbiol Biotechnol 18, 1050-1058.

Honda, O., Kato, C., Kuramitsu, H.K., 1990. Nucleotide sequence of the *Streptococcus mutans* *gtfD* gene encoding the glucosyltransferase-S enzyme. J Gen Microbiol 136, 2099-2105.

K

Kang, H.-K., Seo, E.-S., Robyt, J.F., Kim, D., 2003. Directed evolution of a dextransucrase for increased constitutive activity and the synthesis of a highly branched dextran. *J Mol Catal B-Enzym* 26, 167.

Kang, M.S., Chung, J., Kim, S.M., Yang, K.H., Oh, J.S., 2006. Effect of *Weissella cibaria* isolates on the formation of *Streptococcus mutans* biofilm. *Caries Res* 40, 418-425.

Konishi, N., Torii, Y., Yamamoto, T., Miyagi, A., Ohta, H., Fukui, K., Hanamoto, S., Matsuno, H., Komatsu, H., Kodama, T., Katayama, E., 1999. Structure and enzymatic properties of genetically truncated forms of the water-insoluble glucan-synthesizing glucosyltransferase from *Streptococcus sobrinus*. *J Biochem* 126, 287-295.

Kralj, S., Grijpstra, P., van Leeuwen, S., Kamerling, J.P., Dijkhuizen, L., 2009. Characterisation of a dextransucrase (DSRP) with two catalytic domains from *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293, 8th Carbohydrate Bioengineering Meeting, Ischia, Naples, Italy.

Kralj, S., Stripling, E., Sanders, P., van Geel-Schutten, G.H., Dijkhuizen, L., 2005. Highly hydrolytic reuteransucrase from probiotic *Lactobacillus reuteri* strain ATCC 55730. *Appl Environ Microbiol* 71, 3942-3950.

Kralj, S., van Geel-Schutten, G.H., Dondorff, M.M., Kirsanovs, S., van der Maarel, M.J., Dijkhuizen, L., 2004. Glucan synthesis in the genus *Lactobacillus*: isolation and characterization of glucansucrase genes, enzymes and glucan products from six different strains. *Microbiology* 150, 3681-3690.

Kralj, S., van Geel-Schutten, G.H., Rahaoui, H., Leer, R.J., Faber, E.J., van der Maarel, M.J., Dijkhuizen, L., 2002. Molecular characterization of a novel glucosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* strain 121 synthesizing a unique, highly branched glucan with α -1,4 and α -1,6 glucosidic bonds. *Appl Environ Microbiol* 68, 4283-4291.

M

Maina, N.H., Tenkanen, M., Maaheimo, H., Juvonen, R., Virkki, L., 2008. NMR spectroscopic analysis of exopolysaccharides produced by *Leuconostoc citreum* and *Weissella confusa*. *Carbohydr Res* 343, 1446-1455.

Monchois, V., Remaud-Simeon, M., Russell, R.R., Monsan, P., Willemot, R.M., 1997. Characterization of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextransucrase (DSRS) and identification of amino-acid residues playing a key role in enzyme activity. *Appl Microbiol Biotechnol* 48, 465-472.

Monchois, V., Willemot, R.-M., Remaud-Simeon, M., Croux, C., Monsan, P., 1996a. Cloning and sequencing of a gene coding for a novel dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 synthesizing only α -(1-6) and α -(1-3) linkages. *Gene* 182, 23-32.

Monchois, V., Willemot, R.M., Remaud-Simeon, M., Croux, C., Soucaille, P., Monsan, P., 1996b. Primary structure of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. Comparison with dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 799, 151-156.

N

Neubauer, H., Bauche, A., Mollet, B., 2003. Molecular characterization and expression analysis of the dextransucrase DsrD of *Leuconostoc mesenteroides* Lcc4 in homologous and heterologous *Lactococcus lactis* cultures. *Microbiology* 149, 973-982.

O

Olvera, C., Fernandez-Vazquez, J.L., Ledezma-Candanoza, L., Lopez-Munguia, A., 2007. Role of the C-terminal region of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ in cell anchoring. *Microbiology* 153, 3994-4002.

R

Russell, R.R.B., Gilpin, M.L., Mukasa, H., Dougan, G., 1987. Characterization of glucosyltransferase expressed from a *Streptococcus sobrinus* gene cloned in *Escherichia coli*. J Gen Microbiol 133, 935-944.

S

Seibel, J., Hellmuth, H., Hofer, B., Kicinska, A.M., Schmalbruch, B., 2006. Identification of new acceptor specificities of glucosyltransferase R with the aid of substrate microarrays. ChemBiochem 7, 310-320.

Shimamura, A., Nakano, Y.J., Mukasa, H., Kuramitsu, H.K., 1994. Identification of amino acid residues in *Streptococcus mutans* glucosyltransferases influencing the structure of the glucan product. J Bacteriol 176, 4845-4850.

Shiroza, T., Ueda, S., Kuramitsu, H.K., 1987. Sequence analysis of the *gtfB* gene from *Streptococcus mutans*. J Bacteriol 169, 4263-4270.

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

Slodki, M.E., England, R.E., Plattner, R.D., Dick Jr, W.E., 1986. Methylation analyses of NRRL dextrans by capillary gas-liquid chromatography. Carbohydr Res 156, 199-206.

U

Ueda, S., Shiroza, T., Kuramitsu, H.K., 1988. Sequence analysis of the *gtfC* gene from *Streptococcus mutans* GS-5. Gene 69, 101-109.

V

Vickerman, M.M., Sulavik, M.C., Nowak, J.D., Gardner, N.M., Jones, G.W., Clewell, D.B., 1997. Nucleotide sequence analysis of the *Streptococcus gordonii* glucosyltransferase gene, *gtfG*. DNA Seq 7, 83-95.

Y

Yalin, Y., Jin, L., Jianhua, W., Da, T., Zigang, T., 2008. Expression and characterization of dextransucrase gene *dsrX* from *Leuconostoc mesenteroides* in *Escherichia coli*. J Biotechnol 133, 505.

Yi, A.-R., Lee, S.-R., Jang, M.-U., Park, J.-M., Eom, H.-J., Han, N.S., Kim, T.-J., 2009. Cloning of Dextransucrase Gene from *Leuconostoc citreum* HJ-P4 and Its High-Level Expression in *E. coli* by Low Temperature Induction. J Microbiol Biotechnol 19, 829-835.

Z

Zhang, H., Hu, Y., Zhu, C., Zhu, B., Wang, Y., 2008. Cloning, sequencing and expression of a dextransucrase gene (dex YG) from *Leuconostoc mesenteroides*. Biotechnol Lett 30, 1441-1446.

Annexe II : séquence nucléotidique et protéique de DSR-E

```

1      ATCATGCTTA TTGTTTAAAG TTAATGTCTT TCTCAGTTTT AGTTCATTAT ACATTGCATA
61     TAAGCCGTC A ATGTCATTAT GAAGGTACTT ATAATTTAAT TTATTTTCGAA AGTTAACGAT
121    ATTAAATCG  A ATTTCAAAT  TGTTAGAAAA ATATTCATCG ATGGTGATGT CTAGCTCTTT
181    GCAAATAAAA TAAATCGATT GNGCATTAGG TAGAATTTGG CCACTTTCAA TTCTAGAAAC
241    CATAGCTTGT GAACCGATAA AGGCACCTAA CTGTTTTTGA GATAAGTTT TTAATTTTCG
301    ACGTTCCTTG ATAATGTTTG TTTCTTTCCG CATAATAATC TGTCTCCATT GCTTTCAAAA
361    TAATAATAGT TAATTATTAT CATGGAACAA TCAATATTTT ATTATATATC ACTATTGAAT
421    ATCCTTTTTT GCATAAATCT CTAGAGCCGA TTTTTTGGGT TATACAATGA ATTGGTAAAG
481    GTTAATCATT TTTACAAAAC CATGGTGGTT TTTTATTTTT TCTAAAAATA CCGAACTAGA
      M R D M R V I C D R K K .
      ~~~~~
541    GGAAGAGAAA AGGAGCAATA GTTGATGAG AGACATGAGG GTAATTTGTG ACCGTAAAAA
      . L Y K S G K V L V T A G I F A L M M F G .
      ~~~~~
601    ATTGTACAAA TCGGCAAAAG TACTAGTAAC AGCCGGTATT TTTGCTTTGA TGATGTTTGG
      . V T T A S V S A N T I A V D T N H S R T .
      ~~~~~
661    CGTCACAAC TCTAGTGTTA GTGCAAATAC GATTGCAGTT GACACGAATC ATAGCCGTAC
      . S A Q I N K S A V D K V N D D K T T L G .
      ~~~~~
721    TTCAGCACAG ATTAATAAGA GTGCCGTTGA TAAGGTAAAT GATGACAAGA CTACTTTAGG
      . A A K V V A V A T T P A T P V A D K T V .
      ~~~~~
781    AGCGGCAAAA GTAGTGGCAG TAGCCACAAC GCCAGCGACA CCGGTAGCAG ATAAAACAGT
      . S A P A A D K A V D T T S S T T P A T D .
      ~~~~~
841    AAGTGACCCC GCAGCAGATA AGGCAGTAGA TACAACGTCA TCAACGACAC CTGCAACGGA
      . K A V D T T P T T P A A D K A V D T T P .
      ~~~~~
901    TAAGGCAGTA GATACAACGC CAACGACACC TGCAGCAGAT AAGGCAGTAG ATACAACGCC
      . T T P A A D K A V D T T P T T P A A N K .
      ~~~~~
961    AACGACACCT GCAGCAGATA AGGCAGTAGA TACAACGCCA ACGACACCTG CAGCAAATAA
      . A V D T T P A T A A T D K A V A T P A T .
      ~~~~~
1021   AGCAGTAGAT ACAACGCCAG CGACCGCTGC AACAGATAAG GCGGTAGCCA CGCCAGCCAC
      . P A A D K L A N T T P A T D K A V A T T .
      ~~~~~
1081   ACCTGCAGCA GATAAGCTAG CAAATACGAC GCCTGCAACG GACAAGGCAG TAGCCACAAC
      . P A T P V A N K A A D T S S I H D Q P L .
      ~~~~~
1141   GCCAGCGACG CCGGTAGCAA ATAAAGCAGC AGACACGAGT AGTATTCATG ATCAACCATT
      . D T N V P T D K S A N L V S T T Q K S T .
      ~~~~~
1201   AGATACAAAT GTGCCAACTG ATAAATCAGC AAACCTCGTC TCGACAACAC AAAAAAGTAC
      . D N Q Q V K S T E T S H L Q E I N G K T .
      ~~~~~
1261   GGATAATCAA CAAGTTAAGT CTACAGAAAC ATCTCATCTT CAAGAAATCA ACGGTA AAAAC
      . Y F L D D N G Q V K K N F T A I I D G K .
      ~~~~~
1321   CTATTTTCTT GACGACAATG GTCAAGTTAA AAAGAACTTC ACGCTATTA TTGACGGTAA
      . V L Y F D K T S G E L T A N A P Q V T K .
      ~~~~~
1381   AGTTCTATAC TTTGATAAAA CATCCGGCGA ATTGACCGCA AATGCACCGC AAGTTACTAA
      . G L V N I D N A H N A A H D L T A D N F .
      ~~~~~
1441   GGGATTAGTA AATATTGATA ATGCACATAA CGCGGCTCAT GATCTCACAG CTGATAACTT
      . T N V D G Y L T A N S W Y R P K D I L K .
      ~~~~~
1501   CACAAATGTC GATGGTACT TAACAGCTAA CAGTTGGTAT CGTCCTAAGG ACATCTTAAA
      . N G T T W T P T T A E D F R P L L M S W .
      ~~~~~
1561   AAACGGAACG ACCTGGACAC CAACAACAGC AGAAGATTTT CGACCATTGC TCATGTCTTG
      . W P D K N T Q V A Y L Q Y M Q S V G M L .
      ~~~~~
1621   GTGGCCGGAT AAGAATACGC AGGTAGCTTA TCTACAATAT ATGCAATCAG TTGGTATGCT
      . P D D V K V S N D D N M S T L T D A A M .
      ~~~~~
1681   ACCTGACGAT GTTAAAGTAT CAAATGATGA TAATATGAGC ACATTGACTG ATGCTGCTAT
      . T V Q K N I E S R I G V S G K T D W L K .
      ~~~~~
1741   GACTGTTCAA AAGAATATCG AATCGCGAAT TGGTGTATCT GGAAAACTG ATGGCTCAA

```

```

· Q D M N K L I D S Q A N W N I D S E S K ·
~~~~~
1801 GCAAGATATG AACAACTGA TTGATTCACA GGCAAATTGG AATATTGATA GTGAATCAAA
· G N D H L Q G G A L L Y V N D D K T P N ·
~~~~~
1861 GGGTAATGAT CATTACAGG GTGGGGCATT GTTATATGTG AATGATGACA AAACACCTAA
· A N S D Y R L L N R T P T N Q T G Q I T ·
~~~~~
1921 CGCGAACTCA GATTACCGTC TGTTAAACCG TACACCAACC AACCAAACCG GCCAAATAC
· D P S K Q G G Y E M L L A N D V D N S N ·
~~~~~
1981 TGATCCAAGT AAACAAGGTG GATATGAGAT GTTATTAGCT AATGATGTTG ATAATTCTAA
· P V V Q A E Q L N W L H Y M M N I G T I ·
~~~~~
2041 CCCTGTTGTA CAAGCTGAGC AATTGAACTG GCTTCACTAC ATGATGAACA TTGGTACTAT
· A Q N D P T A N F D G Y R V D A V D N V ·
~~~~~
2101 AGCTCAGAAC GACCCAACAG CTAATTTTGA CGGTTATCGT GTTGATGCGG TTGATAACGT
· D A D L L Q I A G D Y F K A A Y G T G K ·
~~~~~
2161 TGATGCCGAT CTCTTACAAA TTGCTGGTGA TTACTTTAAA GCTGCATACG GTACTGGTAA
· T E A N A N N H I S I L E D W D N N D S ·
~~~~~
2221 AACTGAGGCA AACGCAAACA ATCATATTTT GATCTTGGAA GATTGGGATA ATAATGATTC
· A Y I K A H G N N Q L T M D F P A H L A ·
~~~~~
2281 TGCGTACATT AAAGCCACG GGAATAACCA ATTGACAATG GATTTTCCAG CACACTTGGC
· L K Y A L N M P L A A Q S G L E P L I N ·
~~~~~
2341 TTTGAAATAC GCCTTGAACA TGCCTTTGCG CGCACAAAGT GGCCTAGAAC CGCTAATTA
· T S L V K R G K D A T E N E A Q P N Y A ·
~~~~~
2401 TACAAGTCTT GTTAAGCGTG GGAAAGATGC CACAGAAAAT GAAGCACAC CAAACTATGC
· F I R A H D S E V Q T V I A Q I I K D K ·
~~~~~
2461 CTTTATCCGT GCCCATGATA GTGAAGTGCA GACCGTTATT GCACAAATTA TTAAGGATAA
· I N T K S D G L T V T P D E I K Q A F T ·
~~~~~
2521 AATTAACACA AAATCAGACG GCTTAACTGT AACACCAGAT GAGATTAAGC AAGCTTTCAC
· I Y N A D E L K A D K E Y T A Y N I P A ·
~~~~~
2581 TATTTACAAC GCCGATGAAT TAAAAGCAGA TAAGGAATAT ACAGCATACA ATATTCCTGC
· S Y A V L L T N K D T V P R V Y Y G D L ·
~~~~~
2641 TTCTTACGCT GTATTGTTGA CAAACAAGGA TACTGTGCCA CGTGTTTATT ATGGTGATCT
· F S D D G Q Y M S Q K S P Y Y D A I T S ·
~~~~~
2701 ATTTTCTGAT GATGGACAGT ATATGTCACA GAAGTCACCA TACTATGACG CCATTACGTC
· L L K S R I K Y V A G G Q S M N M T Y L ·
~~~~~
2761 ACTTTTGGAA AGCCGTATCA AATATGTTGC TGGTGGTCAA AGTATGAATA TGACGTACTT
· H E C F D P A K N E T K P Q G V L T S V ·
~~~~~
2821 GCATGAGTGC TTTGATCCAG CAAAAAATGA GACAAAGCCA CAAGGTGTCT TAACATCAGT
· R Y G K G A M T A D D L G N S D T R Q Q ·
~~~~~
2881 ACGTTACGGT AAAGTGCGA TGACGGCTGA CGATTGGGT AATAGTGACA CACGTCAACA
· G I G L V I N N K P F L N L N D D E Q I ·
~~~~~
2941 AGGTATTGGT TTGGTGATTA ATAATAAGCC ATTCTTGAAT TTAATGATG ATGAACAAAT
· V L N M G A A H K N Q A Y R P L M L T T ·
~~~~~
3001 TGTGCTCAAT ATGGGTGCTG CTCACAAAAA TCAAGCTTAC CGACCACTTA TGTGACAAC
· K S G L Q I Y D K D A G A P V V Y T N D ·
~~~~~
3061 AAAATCTGGT CTTCAAATTT ACGATAAGGA TGCCGGAGCG CCAGTTGTTT ATACTAACGA
· A G Q L I F K S D M V Y G V S N P Q V S ·
~~~~~
3121 TGCTGGTCAA CTTATTTTAA AGTCAGATAT GGTCTATGGT GTCAGCAATC CACAGGTATC
· G Y F A A W V P V G A S D S Q D A R T Q ·
~~~~~
3181 TGGTTATTTT GCTGCATGGG TACCAGTCGG TGCGAGTGAT AGTCAAGATG CTAGAACACA
· S S Q S E T K D G D V Y H S N A A L D S ·
~~~~~
3241 AAGCAGCCAG TCAGAAACTA AGGATGGCGA TGTCTATCAT TCAAATGCTG CGCTTGATTC
· N V I Y E G F S N F Q A M P E K N D D F ·
~~~~~

```

3301 TAATGTGATT TATGAAGGCT TCTCGAATTT CCAAGCAATG CCTGAAAAGA ATGATGACTT
 · T N V K I A Q N A K L F K D L G I T S F ·
 ~~~~~  
 3361 CACCAACGTA AAAATGCTC AAAATGCTAA ATTGTTTAAA GATTTAGGGA TTACAAGCTT  
 · E L A P Q Y R S S T D N S F L D S V I Q ·  
 ~~~~~  
 3421 TGAATTAGCA CCGCAATATC GTTCAAGTAC AGATAATAGT TTTTGGATT CGGTTATCCA
 · N G Y A F T D R Y D V G Y N T P T K Y G ·
 ~~~~~  
 3481 AAACGGCTAT GCCTTTACTG ATCGATATGA TGTTGGCTAT AATACGCCAA CAAAATATGG  
 · T V D Q L L D S L R A L H A Q G I Q A I ·  
 ~~~~~  
 3541 TACAGTTGAT CAACTTCTAG ATAGTCTAAG AGCATTACAC GCACAAGGTA TTCAGGCTAT
 · N D W V P D Q I Y N L P G E Q I V T A V ·
 ~~~~~  
 3601 TAATGACTGG GTACCTGATC AAATTTATAA TTTACCTGGC GAACAAATCG TCACCGCAGT  
 · R T N G S G K Y D Y D S V I N N T L Y D ·  
 ~~~~~  
 3661 TCGTACAAAT GGTTCAGGTA AGTACGATTA TGATTCAGTG ATTAATAACA CGCTCTATGA
 · S R T V G G G E Y Q E K F G G L F L D Q ·
 ~~~~~  
 3721 TTCACGAACA GTTGGGGGCG GCGAATACCA AGAAAAGTTT GGTGGCCTGT TCTTAGACCA  
 · L K K D Y P S L F E T K Q I S T N Q P M ·  
 ~~~~~  
 3781 GTTGAAAAA GATTATCCTA GCTTGTTTGA AACTAAGCAG ATATCAACGA ATCAGCCGAT
 · N P D V K I K E W S A K Y F N G S N I Q ·
 ~~~~~  
 3841 GAATCCGGAT GTTAAAATTA AAGAATGGTC TGCAAAGTAC TTTAATGGTT CAAACATTCA  
 · G R G A W Y V L K D W A T N Q Y F N V S ·  
 ~~~~~  
 3901 AGGTCGTGGC GCTTGGTATG TACTTAAAGA CTGGGCAACA AATCAATATT TCAATGTGTC
 · S D N G F L P K Q L L G E K T S T G F I ·
 ~~~~~  
 3961 TAGTGATAAT GGATTCTTGC CTAACAGTT ACTGGGTGAA AAAACAAGCA CCGGCTTTAT  
 · T E N G K T S F Y S T S G Y Q A K D T F ·  
 ~~~~~  
 4021 AACAGAAAAT GGTAAGACTT CTTTCTACTC AACAAGTGGT TATCAAGCTA AAGATACCTT
 · I Q D G T N W Y Y F D N A G Y M L T G K ·
 ~~~~~  
 4081 TATTCAAGAT GGAACAAATT GGTATTACTT TGATAATGCA GGCTATATGT TGACAGGTAA  
 · Q N I H D K N Y Y F L P N G V E L Q D A ·  
 ~~~~~  
 4141 ACAAATATC CACGATAAAA ATTATTATTT CTTACCTAAT GGTGTGGAAC TTCAAGATGC
 · Y L F D G N Q E F Y Y N K A G E Q V M N ·
 ~~~~~  
 4201 TTACCTTTTT GATGTAATC AAGAATTTTA CTATAATAAA GCTGGGGAAC AAGTTATGAA  
 · Q Y Y Q D S Q N Q W H Y F F E N G R M A ·  
 ~~~~~  
 4261 CCAGTATTAT CAAGATAGTC AAAATCAATG GCATTATTTT TTTGAAAATG GTCGCATGGC
 · I G L T E V P N A D G T H V T Q Y F D A ·
 ~~~~~  
 4321 AATTGGCCTG ACAGAAGTTC CGAACGCTGA TGGCACCCAT GTTACACAAT ATTTTGATGC  
 · N G V Q I K G T A I K D Q N N Q L R Y F ·  
 ~~~~~  
 4381 TAATGGTGTC CAAATTAAG GCACAGCTAT AAAAGATCAG AATAATCAAT TACGCTATTT
 · D E A T G N M V V N S W G Q L A D K S W ·
 ~~~~~  
 4441 TGATGAGGCC ACAGGTAATA TGGTGGTTAA TTCATGGGGA CAGTTAGCAG ATAAGTCTTG  
 · L Y L N A Q G V A V T G N Q K I D G E E ·  
 ~~~~~  
 4501 GCTTTACCTT AATGCACAAG GCGTTGCTGT GACTGGTAAC CAAAAAATG ATGGTGAAGA
 · Y Y F N A D G K Q V K G N A I I D N N G ·
 ~~~~~  
 4561 GTACTACTTC AATGCTGATG GTAAGCAAGT TAAAGGCAAT GCAATCATCG ATAATAATGG  
 · D Q R Y Y D G D K G V M V V N S W G E L ·  
 ~~~~~  
 4621 TGATCAACGT TATTATGATG GTGATAAGGG TGTCATGGTA GTTAATTCAT GGGGTGAGTT
 · P D G S W L Y L N D K G I A V T G R Q V ·
 ~~~~~  
 4681 GCCAGATGGC TCATGGTTAT ATTTGAATGA CAAAGGTATT GCTGTAACAG GCCGTCAAGT  
 · I N N Q V N F F G N D G K Q I K D A F K ·  
 ~~~~~  
 4741 CATTAAATAAT CAAGTTAATT TCTTTGGTAA TGATGGTAAG CAAATCAAAG ATGCCTTTAA
 · L L S D G S W V Y L D D K G L I T T G A ·
 ~~~~~  
 4801 ATTATTATCC GATGGTTCAT GGGTGTATTT GGATGATAAG GGCTGATAA CAACTGGAGC  
 · K V I N G L N M F F D K D G H Q I K G D ·

```

4861 CAAAGTTATC AATGGTCTAA ATATGTTTTT TGATAAAGAC GGTCATCAAA TCAAAGGTGA
· A S T D A N G K R H Y Y D K N D G H L V ·
4921 TGCCAGCACG GATGCCAATG GTAAGCGCCA TTATTATGAC AAAAATGATG GTCATCTTGT
· T N S W G E L P D G S W L Y L E E Q G D ·
4981 CACAAATTCA TGGGGTGAGT TGCCAGATGG TTCATGGTTA TATCTAGAAG AACAAAGGTGA
· A V T G Q R V I D G K T R Y F D E D G K ·
5041 TGCTGTTACT GGTCAACGTG TGATGATGG CAAGACACGC TATTTTGATG AAGATGGCAA
· Q I K N S L K T L A N G D K I Y L D G D ·
5101 ACAAATTAAT AATAGCCTAA AAACGCTGGC CAATGGCGAT AAGATTTATC TTGATGGTGA
· G V A A T G L Q H V G D K I M Y F D E D ·
5161 TGGGGTTGCT GCAACAGGCT TACAACATGT GGGCGATAAA ATCATGTATT TTGATGAAGA
· G K Q V V G K F V S A K D G S W Y Y L N ·
5221 TGGCAAACAA GTTGTGGCA AGTTTGTATC AGCAAAAGAT GGTTCATGGT ATTACTTAAA
· Q D G V A A V G P S S I N G Q S L Y F D ·
5281 TCAGGATGGT GTTGCCGCGG TTGGTCCAAG CAGCATTAAAT GGACAATCAC TTTACTTTGA
· Q D G K Q V K Y N E V R N S D G T T N Y ·
5341 TCAAGATGGT AAACAAGTTA AATATAATGA AGTTCGTAAT AGTGATGGAA CAACCAACTA
· Y T G L T G E K L T Q D F G E L P D G S ·
5401 TTACACAGGA TTAACGGGTG AAAAGTTAAC GCAAGACTTC GGTGAACTAC CAGATGGTTC
· W I Y L D A Q G H T V T G A Q I I N G Q ·
5461 ATGGATTTAT CTTGATGCGC AAGGTCATAC AGTAACTGGT GCACAAATCA TTAACGGTCA
· N L Y F K A D G Q Q V K G H A Y T D Q L ·
5521 AAATCTTTAC TTTAAGGCTG ACGGCCAGCA AGTTAAAGGT CATGCTTATA CTGACCAATT
· G H M R F Y D P D S G D M L S N R F E Q ·
5581 AGGTCATATG CGTTTTTATG ATCCTGATTC AGGTGATATG TTGAGTAATC GCTTTGAACA
· I T P G V W A Y F G A D G V A I T G Q H ·
5641 AATCACACCT GGTGTATGGG CTTACTTTGG TGCTGATGGT GTGGCCATAA CTGGACAACA
· D I N G Q K L F F D E T G Y Q V K G S Q ·
5701 TGACATAAAT GGTCAGAAGC TATTCTTTGA TGAGACAGGA TATCAAGTTA AAGGTTGCGA
· R T I D G T L Y S F D S Q T G N Q K R V ·
5761 ACGTACAATA GATGGTACGT TATACAGCTT CGATTCTCAA ACTGGTAACC AAAACGCGT
· Q T T L L P Q A G H Y I T K N G N D W Q ·
5821 ACAGACAACA TTGTTGCCAC AAGCAGGTCA CTATATCAGC AAAAATGGTA ACGATTGGCA
· Y D T N G E L A K G L R Q D S N G K L R ·
5881 GTATGATACC AATGGTGAAC TAGCGAAGGG TCTGCGTCAA GATAGCAATG GTAAGTTGCG
· Y F D L T T G I Q A K G Q F V T I G Q E ·
5941 TTACTTTGAT TTGACAACCG GCATACAAGC GAAAGGCCAA TTTGTTACAA TTGGCCAAGA
· T Y Y F S K D H G D A Q L L P M V T E G ·
6001 AACTTATTAC TTTAGTAAAG ATCACGGGGA TGCGCAGTTA TTGCCAATGG TCACTGAAGG
· H Y G T I T L K Q G Q D T K T A W V Y R ·
6061 GCATTACGGT ACAATAACAC TCAAGCAAGG TCAAGACACC AAAACAGCCT GGGTTTACCG
· D Q N N T I L K G L Q N I N G T L Q F F ·
6121 TGATCAAAAT AATACTATTT TGAAGGGATT GCAAAATATC AATGGCACGT TGCAATTCCT
· D P Y T G E Q L K G G V A K Y D D K L F ·
6181 TGATCCATAT ACAGGTGAAC AACTTAAGGG TGGCGTAGCA AAGTATGACG ACAAGCTCTT
· Y F E S G K G N L V S T V A G D Y Q D G ·
6241 TTACTTTGAA TCAGGTAAGG GTAATCTTGT TAGCACCGTA GCAGGTGACT ATCAGGATGG
· H Y I S Q D G Q T R Y A D K Q N Q L V K ·
6301 TCATTATATT TCCCAAGATG GCCAAACACG TTACGCAGAT AAGCAAAATC AGCTTGTAAT
· G L V T V N G A L Q Y F D N A T G N Q I ·
6361 GGGACTTGTT ACTGTTAATG GGGCATTACA ATACTTTGAT AACGCTACTG GTAACCAAT

```



```

· K N Q Q V I V D G K T Y Y F D D K G N G ·
~~~~~
6421 AAAAAATCAA CAAGTATTG TTGATGGCAA GACGTACTAT TTTGACGATA AAGGCAATGG
· E Y L F T N T L D M S T N A F S T K N V ·
~~~~~
6481 TGAATACTTA TTCACTAATA CATTAGATAT GTCTACTAAT GCTTTTTCTA CCAAAAAATGT
· A F N H D S S S F D H T V D G F L T A D ·
~~~~~
6541 TGCATTCAAT CATGACAGTA GCAGTTTCGA CCATACTGTT GATGGCTTCT TGACGGCAGA
· T W Y R P K S I L A N G T T W R D S T D ·
~~~~~
6601 TACTTGGTAT CGACCAAAGT CAATTTTGGC TAACGGGACA ACTTGGCGTG ATTCGACTGA
· K D M R P L I T V W W P N K N V Q V N Y ·
~~~~~
6661 TAAGGATATG CGACCATTAA TCACGTGTTG GTGGCCAAAT AAGAATGTTT AAGTCAACTA
· L N F M K A N G L L T T A A Q Y T L H S ·
~~~~~
6721 CCTCAACTTC ATGAAAGCAA ATGGCTTGTT GACAACAGCA GCACAATACA CACTACATTC
· D Q Y D L N Q A A Q D V Q V A I E R R I ·
~~~~~
6781 AGATCAATAT GATTTGAACC AAGCTGCACA AGATGTTCAA GTGGCCATG AAGGGCGCAT
· A S E H G T D W L Q K L L F E S Q N N N ·
~~~~~
6841 TGGCTCAGAG CATGGCACAG ACTGGTTACA GAAATTGTTG TTTGAATCAC AAAATAATAA
· P S F V K Q Q F I W N K D S E Y H G G G ·
~~~~~
6901 CCCATCATTT GTGAAGCAAC AATTCATTTG GAACAAGGAT TCTGAATATC ATGGTGGTGG
· D A W F Q G G Y L K Y G N N P L T P T T ·
~~~~~
6961 TGATGCTTGG TTCCAAGGTG GTTATCTGAA GTATGGCAAT AACCCACTCA CACCAACAAC
· N S D Y R Q P G N A F D F L L A N D V D ·
~~~~~
7021 TAATTCGTAT TATCGTCAAC CTGGTAATGC ATTTGATTTT TTGCTAGCCA ACGACGTGGA
· N S N P V V Q A E N L N W L H Y L M N F ·
~~~~~
7081 TAATTCATAT CCTGTTGTGC AAGCTGAAAA CTTAAACTGG TTACATTACT TAATGAACCT
· G T I T A G Q D D A N F D S I R I D A V ·
~~~~~
7141 TGGCACCATC ACTGCGGGTC AAGATGACGC TAATTTTGTG AGTATTCGTA TTGACGCTGT
· D F I H N D T I Q R T Y D Y L R D A Y Q ·
~~~~~
7201 CGACTTTATT CATAATGATA CAATCCAACG TACTTATGAT TATCTTCGTG ATGCTTATCA
· V Q Q S E A K A N Q H I S L V E A G L D ·
~~~~~
7261 AGTGCAACAA AGTGAAGCCA AAGCAAACCA GCACATTTC A TTGTTGAAG CTGGCTTAGA
· A G T S T I H N D A L I E S N L R E A A ·
~~~~~
7321 CGCAGGTACA TCAACGATTC ATAATGATGC GTTAATTGAG TCAAACCTCC GTGAAGCAGC
· T L S L T N E P G K N K P L T N M L Q D ·
~~~~~
7381 GACATTGTGC TTAACAAATG AACCTGGTAA AAATAAACCA TTGACGAATA TGCTACAAGA
· V D G G T L I T D H T Q N S T E N Q A T ·
~~~~~
7441 CGTTGACGGC GGTACGCTTA TCACCGACCA TACGAGAAT AGTACAGAAA ATCAGGCGAC
· P N Y S I I H A H D K G V Q E K V G A A ·
~~~~~
7501 ACCAAACTAT TCAATTATTC ACGCGCACGA TAAAGGTGTG CAAGAAAAAG TAGGTGCAGC
· I T D A T G A D W T N F T D E Q L K A G ·
~~~~~
7561 CATTACTGAT GCTACTGGTG CTGATTGGAC GAACTTTACA GATGAACAGT TAAAAGCCGG
· L E L F Y K D Q R A T N K K Y N S Y N I ·
~~~~~
7621 ATTAGAGCTA TTCTATAAGG ATCAGCGCGC AACAAACAAA AAGTATAATA GTTATAACAT
· P S I Y A L M L T N K D T V P R M Y Y G ·
~~~~~
7681 ACCAAGTATT TATGCCTGA TGTTGACAAA CAAAGATACT GTTCCTCGTA TGTATTATGG
· D M Y Q D D G Q Y M A N K S I Y Y D A L ·
~~~~~
7741 GGATATGTAT CAAGATGACG GACAGTATAT GGCAAACAAG AGTATCTACT ATGATGCCTT
· V S L M T A R K S Y V S G G Q T M S V D ·
~~~~~
7801 AGTGTCAATTA ATGACGGCTC GTAAAAGCTA TGTACGCGGT GGTCAAACCTA TGAGTGTGA
· N H G L L K S V R F G K D A M T A N D L ·
~~~~~
7861 CAATCATGGT TTGTTGAAGA GTGTCCGTTT TGGAAAAGAT GCGATGACAG CTAATGATTT
· G T S A T R T E G L G V I I G N D P K L ·
~~~~~

```

7921 AGGTACATCA GCTACGCGTA CTGAGGGTCT TGGTGTCAAT ATTGGTAATG ATCCAAAGTT  
 · Q L N D S D K V T L D M G A A H K N Q K ·  
 ~~~~~  
 7981 GCAACTTAAT GATTCGGATA AAGTGACACT GGATATGGGT GCAGCACATA AAAATCAAAA
 · Y R A V I L T T R D G L A T F N S D Q A ·
 ~~~~~  
 8041 GTATCGCGCA GTTATCTTAA CAACACGTGA TGGTTGGCA ACCTTTAATT CAGATCAAGC  
 · P T A W T N D Q G T L T F S N Q E I N G ·  
 ~~~~~  
 8101 ACCAACAGCT TGGACAAACG ATCAAGGAAC GTTAACATTC TCAAATCAAG AGATTAACGG
 · Q D N T Q I R G V A N P Q V S G Y L A V ·
 ~~~~~  
 8161 GCAAGACAAT ACACAAATTC GTGGTGTTC TAATCCGCAA GTTCTGGTT ATCTAGCTGT  
 · W V P V G A S D N Q D A R T A A T T T E ·  
 ~~~~~  
 8221 TTGGGTGCCT GTGGGTGCAT CAGACAATCA AGATGCCCGT ACAGCAGCAA CGACAACAGA
 · N H D G K V L H S N A A L D S N L I Y E ·
 ~~~~~  
 8281 AAATCATGAT GGTAAAGTAT TACACTCGAA TGCGCATTA GATCTAACCT TTATTTATGA  
 · G F S N F Q P K A T T H D E L T N V V I ·  
 ~~~~~  
 8341 AGGTTTCTCT AACTTCCAAC CTAAGGCAAC AACGCATGAT GAACTTACGA ACGTTGTAAT
 · A K N A D V F N N W G I T S F E M A P Q ·
 ~~~~~  
 8401 TGCTAAAAAT GCCGATGTCT TCAATAATTG GGGTATTACG AGTTTTGAAA TGGCACCACA  
 · Y R S S G D H T F L D S T I D N G Y A F ·  
 ~~~~~  
 8461 GTACCGTTCA AGTGGGGACC ATACATTCTT GGATTCAACG ATTGATAATG GTTATGCCTT
 · T D R Y D L G F N T P T K Y G T D G D L ·
 ~~~~~  
 8521 CACTGATCGC TATGACTTAG GTTTC AATAC ACCAACAAAG TATGGCACTG ATGGTGATT  
 · R A T I Q A L H H A N M Q V M A D V V D ·  
 ~~~~~  
 8581 GCGTGCAACG ATTCAAGCGC TACATCATGC TAATATGCAA GTTATGGCTG ACGTTGTGTA
 · N Q V Y N L P G K E V V S A T R A G V Y ·
 ~~~~~  
 8641 TAACCAAGTC TATAACTTAC CTGGTAAAGA AGTTGTTTCA GCAACACGAG CAGGTGTTTA  
 · G N D D A T G F G T Q L Y V T N S V G G ·  
 ~~~~~  
 8701 TGGTAATGAC GACGCCACGG GCTTTGGAAC GCAACTCTAT GTGACTAACT CCGTTGGTGG
 · G Q Y Q E K Y A G Q Y L E A L K A K Y P ·
 ~~~~~  
 8761 TGGTCAATAC CAAGAGAAAT ATGCTGGACA ATACTTAGAA GCTCTGAAAG CAAAGTATCC  
 · D L F E G K A Y D Y W Y K N Y A N D G S ·  
 ~~~~~  
 8821 AGACCTCTTT GAGGGTAAGG CCTATGATTA TTGGTATAAG AACTATGCAA ATGATGGGTC
 · N P Y Y T L S H G D R E S I P A D V A I ·
 ~~~~~  
 8881 AAATCCTTAC TATACATTGT CACACGGTGA CCGTGAATCT ATCCAGCAG ATGTTGCTAT  
 · K Q W S A K Y M N G T N V L G N G M G Y ·  
 ~~~~~  
 8941 TAAGCAATGG TCAGCTAAGT ATATGAACGG CACGAACGTT TTGGCAATG GTATGGGTTA
 · V L K D W H N G Q Y F K L D G D K S T L ·
 ~~~~~  
 9001 TGTATTGAAG GATTGGCATA ATGGTCAATA TTTCAAGCTT GATGGTGATA AATCAACATT  
 · P Q I  
 ~~~~~  
 9061 ACCTCAAATT TAATTTATTT TGATAGGGAA CGATTATCTT ATCAAATTGT AGTGACAAAA
 9121 GTCGCAGATA TTGAATCCAA TATCTGCGAC TTTTCGTCTG TAAAGCTATG CTATAATAAC
 9181 GTTATGACAA AAGAAAATTA TTTTAAAGTT GGCACAATTG TCAACACCCA CGGTATTCTG
 9241 GGCGAAGTGA AGATTATGGA TATC

Tables des illustrations

Figures

- Figure 1 : Exemples de structures des GOS produits à partir de saccharose et de maltose par l'activité dextrane-saccharase de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 (Dols et al., 1997c; Remaud-Siméon et al., 1994)...37
- Figure 2 : Réactions catalysées par les glucane-saccharases. +1 : formation du complexe β -D-glucosyl-enzyme ; -1 : échange isotopique ; 2 : réaction de polymérisation ; 3 : hydrolyse ; 4 : réaction d'accepteur ; 5 : isomérisation du saccharose.42
- Figure 3 : Représentation schématique de la prédiction de l'organisation du tonneau (β/α)₈ entre les glucane-saccharases des familles GH13 et GH70. Les domaines notés N, B, B' et C sont ceux de l'exemple de l'amylosaccharase de *Neisseria polysaccharea*. ZV : zone variable ; GBD : « glucan binding domain ». (Moulis, 2006).....46
- Figure 4 : Structure tridimensionnelle de l'amylosaccharase de *N. polysaccharea* (Code PDB : 1G5A). Légende des domaines : N (orange), A (bleu), B' (cyan), B (vert) et C (magenta). Le cercle rouge figure la zone du site catalytique.47
- Figure 5 : Représentation des sous-sites de liaison aux oligosaccharides de l'ASNp. A : Représentation schématique d'après la nomenclature proposée par Davies et al. (Davies et al., 1997). (Champion, 2008). B : Représentation du site actif de l'amylosaccharase de *N. polysaccharea* en présence de maltoheptaose (Codes PDB : 1MW0 et 1MVY). Légende : Domaine A (bleu) ; Domaine B' (cyan) ; résidus de la diade catalytique et l'acide aspartique stabilisateur (vert) ; résidus du pont salin (en bleu) ; les sous-sites de fixation sont notés de -1 à +5.....48
- Figure 6 : Représentation schématique des interactions entre le mutant inactif Glu328Gln et le saccharose. (Mirza et al., 2001).49
- Figure 7 : Schéma du mécanisme catalytique des amylosaccharases, d'après le mécanisme d'a-rétention de configuration décrit par Skov et al. (Skov et al., 2001).51
- Figure 8A: Séquence logo des glucane-saccharases de la famille GH70, obtenue par comparaison des séquences protéiques des domaines A, B et C des 44 glucane-saccharases caractérisées et répertoriées dans CAZy. Les motifs I à VII caractéristiques de la famille GH70 sont surlignées en jaune, ceux conservés entre les enzymes GH13 et GH70 sont surlignés en bleu. Les résidus de la diade catalytique et l'acide aspartique stabilisateur de l'intermédiaire covalent sont surmontés d'une étoile. Ceux conservés entre les familles GH13 et GH70 sont surmontés d'un triangle. Les prédictions des hélices α et feuilletts β du tonneau (β/α)₈ sont respectivement représentés par des cylindres et des flèches. Adapté de (MacGregor et al., 1996; Monchois et al., 1999c).....53

- Figure 9 : Comparaison des trois structures apo de GTF180-ΔN (Codes PDB : 3KLL et 3HQ3). **A** : Superposition des deux formes cristallines obtenues pour les cristaux tricliniques (P1). Les deux structures se superposent jusqu'au résidu Ser1633 du domaine IV. * indique la position approximative de l'axe de rotation perpendiculaire au plan xy autour duquel pivote le domaine V. La sphère jaune représente l'ion calcium. **B** : Superposition des structures obtenues pour les cristaux triclinique (P1) et orthorhombique (P2₁2₁2₁) de GTF180-ΔN. Le cercle en pointillé jaune indique l'emplacement du site catalytique. Les extrémités N- et C-terminale sont indiquées. D'après (Vujicic-Zagar, 2007).....59
- Figure 10 : Repliement global de la forme triclinique de GTF180-ΔN (Code PDB : 3KLL). **A** : Structure de GTF180-ΔN, les extrémités N- et C-terminales sont indiquées. La sphère jaune représente l'ion calcium. **B** : Représentation schématique du repliement en « U », le code couleur correspond également à celui employé pour la Figure 4. **C** : En gris, prédiction de l'organisation en domaine, et motifs caractéristiques de la superfamille des α-amylases indiqués par des rectangles noirs. Ces motifs (de I à IV) sont aussi repérés sur la Figure 8 (weblogo). (Vujicic-Zagar, 2007).60
- Figure 11 : Organisation en domaines de GTF180-ΔN (Code PDB : 3KLL). Légende : Domaine A (bleu), domaine C (magenta), domaine B (vert), domaine IV (jaune), domaine V (rouge). Boucle 7 (hélices H1 et H2) en cyan. Boucle en gris incluant trois hélices participant au domaine A mais provenant du domaine B.61
- Figure 12 : **A** : Topologie du site actif de la glucane-saccharase GTF180-ΔN en présence de saccharose représenté en jaune (Code PDB : 3HZ3). Légende : Domaine A (bleu), domaine C (magenta), domaine B (vert), domaine IV (jaune), boucle 7 (hélices H1 et H2) en cyan. L'ellipse figure la position de la gorge catalytique. **B** : Résidus conservés des sous-sites -1 et +1, entre l'ASNp (gris) et GTF180-ΔN. Seul Q1509 n'est pas conservé. Les résidus en bleu, en cyan et en vert appartiennent respectivement aux domaines A, à la boucle 7 et au domaine B. La numérotation des résidus correspond à celle de GTF180-ΔN ; ceux de la diade catalytique et l'acide aspartique stabilisateur sont indiqués en gras. Le saccharose du complexe GTF180-ΔN : saccharose est représenté couleur olive.62
- Figure 13 : Vue des sous-sites -1 et +1 du site actif de GTF180-ΔN en complexe avec du saccharose (Code PDB : 3HZ3). Légende : domaine B (vert), domaine A (bleu) ; Sphère violette, ion calcium. Petites sphères rouges, molécules d'eau ; Par souci de clarté, la boucle (résidus 980 – 984) est représenté en cartoon transparent. D'après (Vujicic-Zagar, 2007).....63
- Figure 14 : Sites de fixation du maltose (Code PDB : 3KLL). **A** : Représentation de surface de GTF180-ΔN avec les quatre sites de fixation de maltose notés de M1 à M4. Deux molécules de glycérol sont présentes dans le sous-site -1. **B** : Représentation des molécules de maltose M1 et M2 présentes respectivement dans les sous-sites [+1 ; +2] et [+2' ; +3]. Le glucose en -1 provient du complexe saccharose – GTF180-ΔN. Légende : domaine B (vert), domaine A (bleu) ; Sphère violette, ion calcium. Petites sphères rouges, molécules d'eau. D'après (Vujicic-Zagar, 2007).....65

- Figure 15 : Représentation schématique de l'organisation putative en domaines de DSR-E et des mutants tronqués par domaine. ZV, zone variable ; CD1, domaine catalytique 1 ; GBD, domaine de liaison au glucane ; CD2, domaine catalytique 2. D'après (Fabre, 2004).68
- Figure 16 : Chromatogrammes obtenus par HPLC C18 des oligosaccharides synthétisés en présence de maltose et de saccharose par les différents mutants tronqués de DSR-E. (saccharose 200 g.L⁻¹ ; maltose 100 g.L⁻¹). D'après (Fabre, 2004).72
- Figure 17 : Initial velocities for a) α -1,2 transglucosylation and for b) sucrose hydrolysis in the presence of sucrose (from 10 mM to 600 mM) and for several dextran concentrations: (●) 31 mM; (○) 62 mM; (▼) 309 mM and (Δ) 617 mM (dextran concentrations expressed as glucosyl unit equivalents). 101
- Figure 18: Double reciprocal plots obtained for the α -1,2 transglucosylation considered a) for sucrose concentrations ranging from 10 to 300 mM and dextran concentrations of (●) 31 mM; (○) 62 mM; (▼) 309 mM and (Δ) 617 mM b) for dextran concentrations equal to 31, 62, 309 and 617 mM and sucrose concentrations (○) 10 mM; (▼) 20 mM; (Δ) 30 mM; (■) 50 mM, (□) 100 mM and (◆) 300 mM. Straight lines correspond to the Ping Pong Bi Bi model c) King-Altman diagram for the α -1,2 transglucosylation catalysed by GBD-CD2. 102
- Figure 19: Main destination of the glucosyl units from sucrose, at the end of the dextran α -1,2 branching reaction obtained for different initial [Suc]/[Dex] ratios (0.12, 0.24, 0.63, 0.95, 4.74; glucosyl unit equivalents) (HPLC analysis). Black, glucosyl units in residual sucrose; Grey, glucose (from sucrose hydrolysis); Dark grey, glucosyl units transferred onto fructose (leucrose); Light grey, glucosyl units transferred by α -1,2 transglucosylation onto α -1,6 dextran 103
- Figure 20: NMR analysis of the purified α -1,2 dextrans obtained in the presence of different initial [Suc]/[Dex] ratios (0.12, 0.24, 0.63, 0.95, 4.74; in glucosyl unit equivalents) 105
- Figure 21: LC-MS analyses of the products obtained by glucosylation of compound **1** (α -D-glucopyranosyl-(1→6)- α -D-glucopyranosyl-(1→6)- α -D-glucopyranosyl-(1→4)-D-glucopyranose). Numbers refer to the compounds described in this chapter and to the structures drawn in Figure 27. Time indications next to chromatograms are the reaction durations. 128
- Figure 22: ¹H NMR spectra of anomeric regions of compounds **1**, **2** and **3**. The signals are designated by the proton position on the residue and followed by the letter of the glucosyl residue. For example, H-1B α -(1→4) indicates that the anomeric proton of glucosyl unit B has the α -configuration and is linked to the C-4 of glucosyl residue A. 129
- Figure 23: HMBC spectrum of compound **1** recorded in deuterium oxide at 298 K. The code H-1/ C-6 indicates a long-range coupling between C-6 of glucosyl units and H-1 of glucosyl units. 130

- Figure 24 : HMQC spectrum of compound **2** recorded in deuterium oxide at 300.3 K. The code H-1 / C-1 indicates couplings between C-1 of a glucosyl unit and H-1 of the same glucosyl unit..... 132
- Figure 25: HMBC spectrum of compound **2** recorded in deuterium oxide at 300.3 K. The code H-1 / C-2, C-4, C-6 indicates long-range couplings between C-2 or C-4 or C-6 of glucosyl units and H-1 of glucosyl units... 132
- Figure 26: HMBC spectrum of compound **3** recorded in deuterium oxide at 300.3 K. The code H-1 / C-2, C-4, C-6 indicates long-range couplings between C-2, C-4 or C-6 of glucosyl units and H-1 of glucosyl units. 134
- Figure 27: Structures of GOS produced by the α -(1→2) glucosylation of compound **1**..... 135
- Figure 28: LC-MS analyses of the products obtained by glucosylation of compound **4** (α -D-glucopyranosyl-(1→6)- α -D-glucopyranosyl-(1→6)- α -D-glucopyranosyl-(1→4)-D-glucopyranose). Numbers refer to compounds described in this chapter and to the structures drawn in Figure 31. Time indications next to chromatograms are the reaction durations. 136
- Figure 29: LC-MS analyses of the products obtained after hydrolysis by *Aspergillus niger* amyloglucosidase of α -(1→2) glucosylated compound **4** (α -D-glucopyranosyl-(1→6)- α -D-glucopyranosyl-(1→6)- α -D-glucopyranosyl-(1→6)- α -D-glucopyranosyl-(1→4)-D-glucopyranose). Numbers refer to the structures drawn in Figure 31. Time indications next to chromatograms are the durations of reaction. (♦), (*) before and after the *Aspergillus niger* amyloglucosidase hydrolysis, respectively. 138
- Figure 30: ^1H NMR spectra of anomeric regions of compounds **4**, **6a** or **6b** and **7**. The signals are designated by the proton position on the residue and followed by the letter of the residue. For example, H-1B α -(1→4) indicates that the anomeric proton of glucosyl unit B has the α -configuration and is linked to the C-4 of glucosyl unit A. 140
- Figure 31: Structures of GOS produced by α -(1→2) glucosylation of compound **4**. Numbers refer to the compounds described in the text and to peak attributions in Figure 28. Uppercase letters refer to glucosyl unit annotations. 142
- Figure 32: Evolution of the molar ratio between the glucose released from the hydrolysis of α -(1→2) branched dextrans by *Aspergillus niger* amyloglucosidase, and the anhydroglucosyl units contained in branched dextrans. (●) reaction with dextran 1.5 kDa; (○) reaction with dextran 10 kDa. 143
- Figure 33: HPAEC-PAD chromatograms of α -(1→2) branched dextrans synthesized in the presence of dextran 1.5 kDa and sucrose, and of their hydrolysis products obtained with *Aspergillus niger* amyloglucosidase. (#) dextran 1.5 kDa standard; (♦), (*) α -(1→2) branched dextrans before and after amyloglucosidase hydrolysis, respectively. Percentages indicated on the figure correspond to the ratios of α -(1→2) linkage in branched dextrans. IM2 to IM20 correspond to the polymerization degree of isomalto-oligosaccharides..... 144

Figure 34: HPAEC-PAD chromatograms of α -(1 \rightarrow 2) branched dextrans synthesized in the presence of dextran 10 kDa and sucrose, and of their hydrolysis products obtained with *Aspergillus niger* amyloglucosidase. (#) dextran 10 kDa standard; (♦), (*) α -(1 \rightarrow 2) branched dextrans before and after the amyloglucosidase hydrolysis. Percentages indicated on the figure correspond to the ratios of α -(1 \rightarrow 2) linkages in branched dextrans. IM2 to IM20 correspond to the polymerization degree of isomalto-oligosaccharides. 145

Figure 35: HPAEC-PAD chromatograms of α -(1 \rightarrow 2) branched dextrans synthesized in the presence of dextran 1.5 kDa and sucrose, and of their hydrolysis products obtained with *Chaetomium gracile* endodextranase. (#) dextran 1.5 kDa standard; (♦), (*) α -(1 \rightarrow 2) branched dextrans before and after the endodextranase hydrolysis, respectively. Percentages indicated on the figure correspond to the ratios of α -(1 \rightarrow 2) linkage in branched dextrans. Circles indicate the presence of isomaltotetraose and isomaltopentaose. IM2 to IM20 correspond to the polymerization degree of isomalto-oligosaccharides. 147

Figure 36: HPAEC-PAD chromatograms of α -(1 \rightarrow 2) branched dextrans synthesized in the presence of dextran 10 kDa and sucrose, and of their hydrolysis products obtained with *Chaetomium gracile* endodextranase. (#) dextran 10 kDa standard; (♦), (*) α -(1 \rightarrow 2) branched dextrans before and after the endodextranase hydrolysis, respectively. Percentages indicated on the figure correspond to the ratios of α -(1 \rightarrow 2) linkage in branched dextrans. IM2 to IM20 correspond to the polymerization degree of isomalto-oligosaccharides. 147

Figure 37: Truncation sites (green marks) on the aligned glucan binding domain of GBD-CD2. In red, molecular masses. On the left, numbering refers to DSR-E enzyme sequence available in GenBank. Strongly conserved residues are printed in boldface type. D'après (Bozonnet et al., 2002). 172

Figure 38: Silver-stained SDS-PAGE of purified GBD-CD2 and Δ N123-GBD-CD2 (3 - 8 % Tris-Acetate precasted gel; Invitrogen). 1, no loaded protein; 2, purified GBD-CD2 enzyme; 3, purified Δ N123-GBD-CD2 enzyme. 174

Figure 39: HPAEC-PAD chromatograms for the reaction in the presence of sucrose and catalyzed by Δ N₁₂₃-GBD-CD2. Initial time of the reaction (black) and final (blue). 175

Figure 40: HPAEC-PAD chromatograms for the acceptor reaction in the presence of maltose and catalyzed by Δ N₁₂₃-GBD-CD2. Initial time of the reaction (black) and final (blue). 176

Figure 41: HPAEC-PAD chromatograms of the acceptor reaction in the presence of linear GOS and catalyzed by Δ N₁₂₃-GBD-CD2. Initial time of the reaction (black) and final (blue). 177

Figure 42 : Comparison of product profiles for acceptor reactions in the presence of GOS DP4 (A) or GOS DP5 (B). (HPLC – Synergi RP Fusion column – Ultrapure water). Durations of reaction are indicated on the chromatograms. **1**, α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)-D-Glcp. **2**, α -D-Glcp-(1 \rightarrow 2)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)-D-Glcp. **3**, α -D-Glcp-(1 \rightarrow 2)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)-[α -D-Glcp-

(1→2)]- α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→4)-D-Glcp. **4**, α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→4)-D-Glcp. **5a**, α -D-Glcp-(1→6)-[α -D-Glcp-(1→2)]- α -D-Glcp-(1→6)-[α -D-Glcp-(1→2)]- α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→4)-D-Glcp. **5b**, α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→6)-[α -D-Glcp-(1→2)]- α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→4)-D-Glcp. **5c**, α -D-Glcp-(1→2)- α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→4)-D-Glcp. **6a**, α -D-Glcp-(1→2)- α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→6)-[α -D-Glcp-(1→2)]- α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→4)-D-Glcp. **6b**, α -D-Glcp-(1→2)- α -D-Glcp-(1→6)-[α -D-Glcp-(1→2)]- α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→4)-D-Glcp. **7**, α -D-Glcp-(1→2)- α -D-Glcp-(1→6)-[α -D-Glcp-(1→2)]- α -D-Glcp-(1→6)-[α -D-Glcp-(1→2)]- α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→4)-D-Glcp. 178

Figure 43: **A** : Effects of [sucrose]/[acceptor] ratio on product yield and α -(1→2) linkage content. Reactions were carried out at different [sucrose]/[dextran] molar ratios, ranging from 0.12 to 4.74. From bottom to top, black, residual sucrose; grey, glucose (from sucrose hydrolysis); dark grey, leucrose (from fructose glucosylation); light blue, glucosyl units transferred onto dextran chains. **B** : Anomeric region of ^1H NMR spectra obtained at 298 K for the purified α -(1→2) branched dextrans. Black, dextran 68.6 kDa standard; blue, dextran branched at 11%; pink, dextran branched at 19%; orange, dextran branched at 33%; green, dextrans branched between 35 and 37%. Peak intensities were standardised with peaks corresponding to H-1 of α -(1→3) linked glucosyl units. **C** : Percentages of α -(1→2) linkage as a function of [sucrose]/[dextran] ratios used for the acceptor reaction. Empty circles, filled circles, ^1H NMR or HPLC determinations of α -(1→2) linkage content in dextrans synthesized by ΔN_{123} -GBD-CD2, respectively. Red crosses, ^1H NMR results for dextrans branched by GBD-CD2 (Brison et al., 2010). 180

Figure 44: **A** : Arrangement of chains A, B, C and D of ΔN_{123} -GBD-CD2 in the asymmetric unit. **B** : Domain organization of ΔN_{123} -GBD-CD2. Domain C (purple), domain A which includes the $(\beta/\alpha)_8$ barrel (blue), domain B (green) and domain IV (yellow). Brown loop is part of domain A but protrudes from domain B. **C** : Schematic representation of the domain arrangement for crystallized GH70 glucansucrases; from the left to the right, GTF180- ΔN , Pfam prediction of the domain organization of ΔN_{123} -GBD-CD2 (light grey, catalytic domain (Pfam family PF02324.9), grey, putative Glucan Binding Domain)) and on the right domain organization deduced from the crystal structure of ΔN_{123} -GBD-CD2. 184

Figure 45: Domain organization of ΔN_{123} -GBD-CD2. Domains IV, B, A and C are yellow, green, blue and magenta, respectively. Brown loop figures the loop protruding from domain B but participating in domain A formation. Cyan subdomain is inserted between β_6 and α_7 of the $(\beta/\alpha)_8$ barrel. Red star in the front view figures the catalytic pocket. 185

Figure 46: **A** : Superimposition of domains C, A, B and IV from GTF180- ΔN (grey) and ΔN_{123} -GBD-CD2 (colored). Dashed ellipsis outlines the major differences of loop conformations and secondary structure elements between upper parts of the two glucansucrase catalytic gorges. **B** : Zoom over the upper parts of catalytic gorges; position of the catalytic glutamic acid is figured by a red star; the catalytic site is backwards the current view. 186

- Figure 47: Stereo-view of calcium binding site of GTF180- Δ N superimposed with structurally equivalent residues of Δ N₁₂₃-GBD-CD2. Magenta sphere, calcium ion. Red sphere, water molecule. Pale green and pale blue colored residues from domains B and A of GTF180- Δ N, respectively. Bright colours, structurally equivalent residues of Δ N₁₂₃-GBD-CD2. Italic or regular residue numbers correspond to GTF180- Δ N and Δ N₁₂₃-GBD-CD2, respectively. 187
- Figure 48: **A** : Active site of Δ N₁₂₃-GBD-CD2 superimposed with sucrose from GTF180- Δ N:sucrose complex structure. The catalytic diad, the putative transition state stabilizer and stacking tyrosine at subsite -1 are represented. **B** : Stereo-view of side-chain residues involved in sucrose binding at subsites -1 and +1. Sucrose is figured as olive line. Are represented in grey the residues indentified in GTF180- Δ N inactive mutant (Asp1025Asn) in complex with sucrose (Vujicic-Zagar, 2007). Their structural equivalents are figured in blue (domain A), cyan (helices H1 and H2), green (domain B) for Δ N₁₂₃-GBD-CD2..... 190
- Figure 49: Schematic representation of Δ N₁₂₃-GBD-CD2 active site with the putative β -D-glucosyl-enzyme intermediate at subsite -1 and GOS DP6 acceptor (α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)-D-Glcp) of which one of the glucosyl unit is located at subsite +1. Figured situations represent products that were previously described (Chapter III)..... 192
- Figure 50: Comparison of the catalytic gorges of GTF180- Δ N and Δ N₁₂₃-GBD-CD2. For the sake of clarity, only different residues or residues adopting a different conformation are figured. Grey backbone corresponds to Δ N₁₂₃-GBD-CD2. Grey residues correspond to GTF180- Δ N residues. Blue, green colored residues, from domains A and B of Δ N₁₂₃-GBD-CD2 respectively. Residues from subsites -1 and +1 are not figured. Red star represents stacking Tyr2650 position at subsite -1..... 193
- Figure 51: Sequence alignment of DSR-E, GTF-I, DSR-S, ASR, GTF180 and GTF-A glucansucrases for the residues involved in catalytic pockets. Red or black framed residues correspond to those involved in subsites -1 and +1 (according to GTF180- Δ N:sucrose structure) or exposed in the catalytic gorges of GTF180- Δ N or Δ N₁₂₃-GBD-CD2. 194
- Figure 52: Comparison of catalytic gorges of Δ N₁₂₃-GBD-CD2 (left) and GTF180- Δ N (right). Sucrose displayed in subsites -1 and +1 is that of GTF180- Δ N:sucrose complex structure. For Δ N₁₂₃-GBD-CD, loop from residues Gly2731 to Ser2796 in magenta (incomplete loop), Asp2292 to Ile2299 in red, Arg2157 to Phe2163 in green and helix α_5 from (β/α)₈ barrel in blue. 195
- Figure 53A: Representation of sequence alignment of GH70 glucansucrase loop region. Loops considered are those participating in the catalytic gorge. Blue, loops of DSR-E from *Ln. mesenteroides* NRRL B-1299 or putative glucansucrases from *Ln. mesenteroides* KM20 and ATCC8293 strains. Green, loop regions of ASR from *Ln. mesenteroides* NRRL B-1355 or GTFJ from *S. salivarius* ATCC 25975..... 197

Figure 54 : Schéma récapitulatif du mode de branchement du GOS DP4 (α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→6)- α -D-Glcp-(1→4)-D-Glcp) prenant en considération un mécanisme Ping Pong Bi Bi et les structures de GOS branchés en α -(1→2). Sous-sites de ΔN_{123} -GBD-CD2 notés -1 et de +n' à +n.222

Figure 55 : Schéma récapitulatif des produits de la glucosylation séquentielle du GOS DP5. Après 30 s de réaction les formes mono-glucosylées sont synthétisées, les formes di-glucosylées le sont après 7 min et la forme tri-glucosylée l'est à 24h. Notons que la forme di-glucosylée mise en transparence n'a pas été isolée et caractérisée.222

Figure 56 : Représentation cartoon de la structure de ΔN_{123} -GBD-CD2 et organisation en domaines le long de la chaîne polypeptidique.225

Tableaux

Table 1: Exemples de composés prébiotiques commercialisés. Adapté de (Rousseau, 2004).	34
Table 2 : Composition en type de liaisons osidiques des dextrans synthétisés par les différents mutants de DSR-E déterminée par RMN du ^{13}C . Les réactions ont été menées en présence de 100 g.L^{-1} de saccharose, avec $0,5 \text{ U.mL}^{-1}$ d'enzyme recombinante non purifiée, en présence de tampon acétate de sodium 20 mM à $\text{pH} = 5,4$ supplémenté avec $0,34 \text{ mM}$ de CaCl_2 . (Fabre, 2004).	70
Table 3 : Rendements de synthèse en α -(1 \rightarrow 6) GOS, en GOS α -(1 \rightarrow 2) branchés et en GOS totaux pour les différents mutants tronqués de DSR-E. Les réactions ont été menées en présence de 200 g.L^{-1} de saccharose, 100 g.L^{-1} de maltose, avec $0,5 \text{ U.mL}^{-1}$ d'enzyme recombinante non purifiée, dans du tampon acétate de sodium 20 mM à $\text{pH} = 5,4$, à 30°C . (Fabre, 2004).	71
Table 4 : Produits formés par le mutant tronqué GBD-CD2. Les différentes réactions ont été menées en présence d'extrait brut à $0,5 \text{ U.mL}^{-1}$ excepté pour la réaction utilisant du dextrane (1 U.mL^{-1}). Les produits ont été identifiés et quantifiés par HPAEC-PAD et HPLC. Lorsque le total des pourcentages d'unités glucosyle diffère de 100%, de faibles quantités d'isomère du saccharose et/ou de maltose ont été identifiées mais non quantifiées. D'après (Fabre, 2004).	74
Table 5: Kinetic parameters computed for the α -(1 \rightarrow 2) transglucosylation of dextran catalysed by GBD-CD2	103
Table 6: Percentages of α -1,2 linkages determined by ^1H NMR and ^{13}C NMR for α -1,2 branched dextrans synthesized in the presence of 292 mM of sucrose and dextran of different molecular weights at concentrations ranging from 62 to $2,470 \text{ mM}$ (dextran concentrations expressed as glucosyl unit equivalents).	106
Table 7: Truncated enzymes constructed from GBD-CD2-V5-His ₆ . When expressed and active, enzymes are marked by +.	173
Table 8: Comparison of the glucosyl unit destination from sucrose at the end of enzymatic reactions in the presence or absence of acceptors. Reactions carried out either with GBD-CD2 or ΔN_{123} -GBD-CD2 branching enzymes. Products were quantified by HPAEC-PAD using appropriate standards.	175
Table 9: Comparison of the apparent kinetic parameters determined for the hydrolytic activity (subscript H) and the transglucosylation activity (subscript T) for GBD-CD2 and ΔN_{123} -GBD-CD2. ^a , from (Brison et al., 2010). Standard errors are given for apparent kinetic parameters.	181
Table 10: Effect of calcium chloride and EDTA on ΔN_{123} -GBD-CD2 activities. (Activity measurements were carried out at 30°C in 20 mM sodium acetate buffer ($\text{pH} 5.75$) with 292 mM sucrose or 292 mM sucrose and 62	

mM dextran. Results are given as means \pm standard deviations; n=3. Activities without any compound were taken as references (100%). 188

Table 11: Forward and reverse primers used to generate GBD-CD2 truncated mutants. Twelve sites of truncature were chosen. Green colored bases were necessary for the directional insertion of the purified PCR products in pBAD TOPO Directional 102 vector. Base numbering corresponds to base annotation of the *dsr-E* gene sequence as deposited in the GenBank (accession number AJ430204.1). Underlined bases correspond to the NcoI restriction site; red colored bases have been mutated to create the NcoI restriction site. 199

Table 12: Data collection and refinement statistics. Numbers in parentheses refer to statistics for the outer resolution shell. 207

Abbreviations

ASNp	Amylosaccharase of <i>Neisseria polysaccharea</i>
CD	Catalytic Domain
CID	Collision Induced Dissociation
CW	Cell Wall
DNS	Dinitrosalicylic
GBD	Glucan Binding Domain
GH	Glycoside-hydrolase
GOS	Gluco-oligosaccharides
HPAEC-PAD	High Performance Anion Exchange Chromatography – Pulsed Amperometry Detector
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IEC	Ion Exchange Chromatography
IMAC	Immobilized Metal Affinity Chromatography
LC-MS	Liquid Chromatography – Mass Spectroscopy
<i>Ln.</i>	<i>Leuconostoc</i>
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
TLC	Thin Layer Chromatography
U	(enzymatic) Unit
v	volume
v_i	initial velocity
wt	weight
ZV	Zone Variable