

N° d'ordre : 631

50376
1990
291

50376
1990
291

T H E S E

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE
en SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
Spécialité : BIOCHIMIE

par

Vincent DUMORTIER



LA REACTION DE TRANSGALACTOSYLATION CHEZ
***BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM* SOUCHE AA 2/2**

- 1- OPTIMISATION DE LA PRODUCTION ET DETERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE
DES PRODUITS DE TRANSGALACTOSYLATION
- 2- PURIFICATION ET ETUDE DU SYSTEME ENZYMATIQUE



Présentée le 14 Décembre 1990 devant la commission d'Examen

Président :
Rapporteur :
Rapporteur :
Examinateur :
Examinateur :
Examinateur :

J. MONTREUIL
M. D. LEGOY
G. STRECKER
H. LECLERC
A. VERBERT
S. BOUQUELET

Ce travail a été réalisé sous la direction de Monsieur le Professeur Stéphane BOUQUELET dans le laboratoire de Chimie Biologique (Directeur : Jean MONTREUIL) de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres Artois (Unité Mixte du CNRS n° 111 : Relations structure-fonction des constituants membranaires)

ABREVIATIONS

oNP- α -Gal : ortho-nitrophényl- α -D-galactoside
pNP- α -Gal : para-nitrophényl- α -D-galactoside
oNP- β -Gal : ortho-nitrophényl- β -D-galactoside
pNP- β -Gal : para-nitrophényl- β -D-galactoside
pNP- α -Man : para-nitrophényl- α -D-mannoside
pNP- α -Glc : para-nitrophényl- α -D-glucoside
Phen- β -Gal : phényl- β -D-galactoside
UDP-Gal : uridine diphospho galactoside
CMP-NeuAc : cytidyl monophosphate acide N-acétyl neuraminique
MU-Gal : Acide 4-Méthyl-ombélliféryl- β -D-galactoside
GlcNAc- β -Et : éthyl-N acétyl- β -D-glucosaminide
Gal-O-Me : méthyl-O-galactoside
Gal-O-Et : éthyl-O-galactoside
Gal : galactose
Glc : glucose
Man : mannose
Fru : fructose
GlcNAc : N-acétylglucosamine
GalNAc : N-acétylgalactosamine
GlcNH₂ : glucosamine
GalNH₂ : galactosamine
Xyl : xylose
Fuc : fucose
Bis Tris : bis (2-hydroxyéthyl)imino Tris-hydroxyméthyl-aminométhane
EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique (sel disodique)
SDS : Dodécyl sulfate de sodium
FPLC : Fast Protein Liquid Chromatography
HPLC : High Performance Liquid chromatography
TLC : Thin Layer Chromatography
g.l.c. : Gas Liquid Chromatography
g.l.c.-m.s. : Gas Liquid Chromatography -Mass Spectrometry
f.a.b.-m.s. : Fast Atom Bombardment -Mass Spectrometry
di; tri; tetra; penta... : disaccharide ; trisaccharide etc..
rpm : Tours par minute
S A B : sérum albumine bovine
K_m : constante de Michaelis-Menten
V_m : vitesse maximale

TABLE DES MATIERES

<u>INTRODUCTION</u>	p.1
----------------------------	-----

<u>GENERALITES</u>	p.3
---------------------------	-----

LES GLYCOSIDASES ET LES REACTIONS DE TRANSGLYCOSYLATION

- a- Synthèse chimique
- b- Glycosyltransférases

<u>I- MECANISME REACTIONNEL</u>	p.4
--	-----

A- DEFINITIONS

1-LES REACTIONS DE SYNTHESE D'OLIGOSACCHARIDES

2-LES GLYCOSIDASES

- a-Les endoglycosidases
- b-Les exoglycosidases

3-LE SUBSTRAT

- a-Le donneur
- b-L'accepteur

p.5

B- HYDROLYSE

1- RUPTURE DE LA LIAISON GLYCOSIDIQUE

2- HYDROLYSE

C- LES REACTIONS DE SYNTHESE

p.6

1- LA REACTION DE TRANSGLYCOSYLATION

- a-Le substrat donneur
- b-L'accepteur

p.9

c-L'enzyme

2- LA REACTION DE REVERSION

3- RENDEMENT ET SELECTIVITE

p.10

a-Rendement

b-sélectivité

p.11

II- FORMATION DE SACCHARIDES PAR LES GLYCOSIDASES

p.14

A- LES POLYSACCHARIDES

p.16

B- LES OLIGOSACCHARIDES	p.17
C- CAS PARTICULIERS	p.18
1-LES ENDOGLYCOSIDASES	
2-LA CYCLODEXTRINE GLUCOSYL TRANSFERASE	

LES REACTIONS DE β -TRANSGALACTOSYLATION

I-HISTORIQUE p.19

A- PREMIERE PERIODE (1915, 1950-1970)

-DECOUVERTE DES REACTIONS DE TRANSGALACTOSYLATION-

B-DEUXIEME PERIODE (1980-1990)

- HYDROLYSE DU LACTOSE-

p.21

II- LE MECANISME DE TRANSGALACTOSYLATION

p.23

A-REACTION DE TRANSGALACTOSYLATION INTERMOLECULAIRE

B-REACTION DE TRANSGALACTOSYLATION INTRAMOLECULAIRE p.24

C-REACTION DE REVERSION

III- FACTEURS INFLUENCANT LA REACTION DE TRANSFERT p.26

A- LE DONNEUR

1- NATURE DU DONNEUR

2-CONCENTRATION EN DONNEUR

p.28

B- L'ACCEPTEUR

p.30

C- L'ENZYME

1- ROLE QUALITATIF

2- ROLE QUANTITATIF

p.32

3- ENZYME LIBRE OU IMMOBILISEE ?

a- Modifications qualitatives

p.34

b- Modifications quantitatives

D- LES CONDITIONS OPERATOIRES

- 1- LE pH
- 2- LA TEMPERATURE p.36
- 3- LES IONS
- 4- L'EQUILIBRE REACTIONNEL

IV- ROLES BIOLOGIQUES DES PRODUITS DE TRANSFERT p.37

- 1- INDUCTEUR DE L'OPERON LACTOSE
- 2- FACTEURS BIFIDIQUES p.39
 - a-La N-acétyllactosamine
 - b-Le lactulose
 - c- β Gal(1-6) β Gal(1-4)Glc
- 3- ACTIVITE DE GROUPE SANGUIN
- 4- DETERMINANT ANTIGENIQUE p.40
- 5- SYNTHÈSE DE GLYCOSIDES CARDIAQUES
- 6- RECONNAISSANCE CELLULAIRE

CONCLUSION

MATERIEL ET METHODES

I-TECHNIQUE DE CULTURE p.42

A-MILIEU DE CULTURE

B-PRODUCTION DE BIOMASSE

II-PRODUCTION ET CARACTERISATION DES PRODUITS DE TRANSFERT

A- PRODUCTION D'OLIGOSACCHARIDES A PARTIR DE LACTOSE PAR DES CELLULES INTACTES

B- VISUALISATION ET DOSAGE DES OLIGOSACCHARIDES p.43

- 1- CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE ET QUANTIFICATION PAR DENSITOMETRIE

- 2- QUANTIFICATION DES OLIGOSACCHARIDES

C- DETERMINATION DE LA STRUCTURE DES OLIGOSACCHARIDES

- 1- COMPOSITION MOLAIRE EN GLUCIDES
- 2- ANALYSE DES PRODUITS METHYLES
- 3- CONFIGURATION ANOMERIQUE

p.44

III-EXTRACTION DE L'ACTIVITE TRANSGALACTOSYLASIQUE

A- EXTRACTION AUX ULTRA-SONS EN PRESENCE DE DETERGENT

B- EXTRACTION A LA PRESSE DE FRENCH

p.45

IV- MESURES DES ACTIVITES ENZYMATIQUES

A- DOSAGE DES ACTIVITES β -D-GALACTOSIDASQUES

1- SUBSTRAT DE SYNTHESE

- a- Principe
- b- Mode opératoire

2- SUBSTRAT NATUREL : LE LACTOSE

p.46

- a- Dosage du glucose
 - α - Principe
 - β - Mode opératoire
- b- Dosage du galactose
 - α - Principe
 - β - Mode opératoire

p.47

B- DOSAGE DE L'ACTIVITE TRANSFERASIQUE

- 1- PRINCIPE
- 2- MODE OPERATOIRE
- 3- EXPRESSION DES RESULTATS
 - a- Quantité de trisaccharides
 - b- Activité transférante

p.48

V- DOSAGES DES PROTEINES

VI- TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES

A- CHROMATOGRAPHIE SUR HYDROXYAPATITE-ULTROGEL®

B- CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS SUR Q FAST FLOW SEPHAROSE®

p.49

C- CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS SUR MONO P®

D- CHROMATOGRAPHIE SUR SUPEROSE 6®

VII- ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE

A- ELECTROPHORESE EN CONDITIONS DENATURANTES

B- ELECTROPHORESE EN CONDITIONS NON DENATURANTES p.50

C- TRANSFERT DES ACTIVITES ENZYMATIQUES

VIII- ETUDES IMMUNOLOGIQUES

A- METHODE D'OUCHTERLONY p.51

B- IMMUNOELECTROPHORESE

C- INHIBITION DE L'ACTIVITE HYDROLYTIQUE PAR UN IMMUNSERUM MONOSPECIFIQUE

IX-ETUDE DES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES p.52

A-DETERMINATION DES MASSES MOLECULAIRES

B-DETERMINATION DU POINT ISOELECTRIQUE

C-DETERMINATION DE LA STABILITE A LA TEMPERATURE

1- PRINCIPE

2- MODE OPERATOIRE

p.53

D- STABILITE AU pH

1- PRINCIPE

2- SOLUTION MERE DE TAMPON CITRATE PHOSPHATE BORATE

p.54

3- TAMPON CITRATE PHOSPHATE BORATE 100 mM

4- MILIEUX DE PREINCUBATION

p.54

E- STABILITE A LA CONGELATION

X-ETUDE DES PROPRIETES ENZYMATIQUES

A- DETERMINATION DES pH OPTIMAUX

B- DETERMINATION DES TEMPERATURES OPTIMALES D'ACTION

C- DETERMINATION DES Km ET Vmax

p.55

1- ACTIVITES β -D-GALACTOSIDASIQUES

a- Détermination sur le pNP- β -D-Gal

b- Détermination sur le lactose

c- Détermination sur le produit majeur de transfert

2- ACTIVITE TRANSGALACTOSYLASIQUE

D- SPECIFICITE D'HYDROLYSE

p.56

XI- ACTION DES EFFECTEURS SUR LES ACTIVITES ENZYMATIQUES

A- ACTIVITE HYDROLYTIQUE SUR LE pNP- β -Gal

B- ACTION DES EFFECTEURS EN PRESENCE DE LACTOSE

XII- CINETIQUE DE LA REACTION DE TRANSGALACTOSYLATION

p.57

XIII- ETUDE DES SPECIFICITES DE LA TRANSGALACTOSYLASE

A- SPECIFITE DU DONNEUR

B- SPECIFICITE D'ACCEPTEUR

1- GLUCIDES ET ACIDES AMINES

2- ALCOOLS

p.58

XIV- DIMINUTION DE LA TENEUR EN EAU

A- ADJONCTION DE SELS

B- INCUBATION EN PRESENCE DE SOLVANTS

p.59

XV- DETECTION D'UNE ACTIVITE LECTINIQUE PORTEE PAR

Bifidobacterium bifidum

1- DETECTION DU SEUIL D'AGGLUTINATION

RESULTS

I- PRODUCTION DES OLIGOSACCHARIDES

p.61

A- OPTIMISATION DE LA PRODUCTION

1- LE pH

2- TEMPERATURE OPTIMALE DE PRODUCTION D'OLIGOSACCHARIDES

3- DETERMINATION DE LA CONCENTRATION OPTIMALE EN LACTOSE

p.62

B- QUANTIFICATION DE LA PRODUCTION

p.65

II- STRUCTURES DES OLIGOSACCHARIDES

p.66

A- FRACTIONNEMENT DES OLIGOSACCHARIDES

B- DETERMINATION DES STRUCTURES

1- CARACTERISTIQUES GENERALES DES OLIGOSACCHARIDES

2- FRACTION F.1

p.68

3- FRACTION F.2

4- FRACTION F.3

5- FRACTION F.4

p.71

6- FRACTION F.5

7- FRACTION F.6

8- FRACTION F.7

p.72

9- FRACTION F.8

10- FRACTIONS F.9 ET F.10

CONCLUSIONS

III- PURIFICATION DE LA TRANSGALACTOSYLASE

p.75

A- EXTRACTION DU SYSTEME ENZYMATIQUE

B- CHROMATOGRAPHIE SUR HYDROXYAPATITE- ULTROGEL®

p.77

C- CHROMATOGRAPHIE SUR Q FAST FLOW SEPHAROSE®

p.81

D- CHROMATOGRAPHIE SUR Mono P®

E- CHROMATOGRAPHIE SUR SUPEROSE 6®	p.84
F- PURETE DE LA SOLUTION ENZYMATIQUE	p.89
1- IMMUNOELECTROPHORESE	
2- CHROMATOGRAPHIE SUR Mono P ®	
3- ELECTROPHORESE EN CONDITIONS NON DENATURANTES	
4- ELECTROPHORESE EN CONDITIONS DENATURANTES	
CONCLUSIONS	p.92
<u>IV- CARACTERISATION DE LA TRANSGALACTOSYLASE</u>	p.94
A- DETERMINATION DES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES	
1- MASSE MOLECULAIRE	
2- DETERMINATION DU POINT ISOELECTRIQUE	
3- STABILITE DU SYSTEME ENZYMATIQUE	
a- Stabilité au pH	
b- Stabilité à la température	p.96
c- Stabilité à la congélation	
B- DETERMINATION DES PARAMETRES ENZYMATIQUES	p.98
1- pH OPTIMAUX D'HYDROLYSE ET DE TRANSFERT	
2- TEMPERATURES OPTIMALES DE SYNTHÈSE ET D'HYDROLYSE	
3- DETERMINATION DES PARAMETRES ENZYMATIQUES K_m ET V_m	p.100
a- Détermination de K_M et V_m sur le pNP- β -D-Gal et le lactose	
b- Détermination des paramètres enzymatiques sur l'activité transférasique à partir de lactose	
4- INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN LACTOSE SUR DES CINÉTIQUES DE REACTION	p.102
5- INHIBITION PAR LE GALACTOSE ET LA GLUCOSAMINE	p.107
a- Le galactose	
b- La glucosamine	p.108
3- ACTION DES EFFECTEURS	
a- Influence du calcium et de l'EDTA sur le pH optimum d'hydrolyse	p.110
b- Effet du calcium et de l'EDTA sur l'activité hydrolytique	
c- Effet du calcium et de l'EDTA sur la réaction de transgalactosylation	p.113
CONCLUSIONS	

C- ETUDE DU MECANISME REACTIONNEL	p.115
1- SPECIFICITE DU DONNEUR	p.118
2- SPECIFICITE D'ACCEPTEUR	
a- Les accepteurs glycosidiques	
b- Les acides aminés	p.123
c- Les alcools	
3- INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN EAU	p.125
<u>V- COMPARAISON AVEC UNE AUTRE β-D-GALACTOSIDASE</u>	
<u>DE <i>Bifidobacterium bifidum</i></u>	p.127
A- REACTION DE TRANSGALACTOSYLATION PAR LA β-D-GALACTOSIDASE	
DE LA FRACTION "HA 300 / QFF"	
1- PURIFICATION DE LA FRACTION "HA 300"	
2- DETERMINATION DES OPTIMAUX DE PRODUCTION	
3- LES PRODUITS DE TRANSGALACTOSYLATION	p.130
B- SPECIFICITE D'HYDROLYSE DES GALACTOSIDASES	
C- DIFFERENCIATION IMMUNOLOGIQUE	p.132
<u>VI- ROLE DES PRODUITS DE TRANSGALACTOSYLATION</u>	p.134
<u>CONCLUSION GENERALE</u>	p.137

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

La découverte dès 1900 par TISSIER (115) d'une bactérie anaérobie prédominante dans la flore intestinale du nourrisson alimenté au lait maternel : *Bifidobacterium bifidum* et l'observation chez ces mêmes enfants d'une diminution du taux de mortalité et de morbidité ont amené de nombreux chercheurs à s'intéresser à l'implantation des bifidobactéries au niveau de l'intestin et à ses conséquences sur l'état de "bonne santé" apparente de la muqueuse intestinale.

Dans le cadre général des études entreprises au Laboratoire concernant la "maternisation" des laits industriels et plus précisément, celui des facteurs de croissance : dits facteurs bifidigènes, nous avons été amenés à nous intéresser aux potentialités enzymatiques de *Bifidobacterium bifidum* souche AA 2/2. Cette bactérie ne peut s'implanter au niveau intestinal qu'en présence d'oligosaccharides indispensables (présents dans le lait maternel) contenant de la N-acétyl glucosamine dans leur structure. La bactérie renferme un fort potentiel en exoglycosidases telles que : N acétyl β -D-glucosaminidase, α -L-fucosidase, α -D-neuraminidase et β -D-galactosidase, susceptibles de dégrader ces structures. De plus, APPOURCHAUX (7) et BOUTRY (22) ont caractérisé au sein d'une même famille de glycosidases une hétérogénéité. Ainsi deux N-acétyl- β -D-glucosaminidases et surtout quatre β -D-galactosidases ont été mises en évidence et séparées.

Lors de la mise au point d'un réacteur à enzyme immobilisée (cellules incluses dans une matrice d'alginate) pour l'hydrolyse du lactose du lactosérum (108), un déficit en galactose par rapport au glucose libéré a été observé.

Il est connu depuis de nombreuses années, que les β -D-galactosidases agissent sur le lactose par un mécanisme transgalactosidique. L'action de ces enzymes ne libère non seulement les monosaccharides mais peut aussi entraîner la formation de galacto-oligosaccharides.

La diversité des β -D-galactosidases de *bifidobacterium bifidum*, l'intérêt porté aux

oligosaccharides, possibles supports d'activités biologiques et par la même, la recherche de nouvelles voies pour leur synthèse, nous ont amenés à nous intéresser à la (aux) réaction(s) de transgalactosylation catalysée(s) par *Bifidobacterium bifidum* souche AA/22. Cette étude nous permettra de répondre plus particulièrement aux questions suivantes :

- Quelles étaient les structures des produits néoformés ?
- Quelles étaient les enzymes responsables de cette synthèse ?
- Quel était le rôle biologique possible de ces produits ?

GENERALITES



LES GLYCOSIDASES ET LES REACTIONS DE SYNTHÈSE

La réversibilité d'action des hydrolases a été mise à profit pour la synthèse de nombreuses molécules telles que des peptides (119), des lipides (110) ou des esters (78).

Actuellement, la synthèse d'oligosaccharides par l'intermédiaire de glycosylhydrolases ou glycosidases fait l'objet de recherches multiples, d'une part grâce à une bonne connaissance générale des systèmes enzymatiques utilisés et d'autre part dû au besoin croissant en certains oligosaccharides ou courts fragments glycaniques spécifiques et porteurs d'activités biologiques (89).

Avant d'entrer dans le domaine plus particulier des glycosidases, il faut cependant rappeler brièvement les deux voies de synthèse classiques des oligosaccharides.

a) Synthèse chimique

Les méthodes chimiques de synthèse (71, 94), sont délicates à mettre en oeuvre. En effet les saccharides possèdent plusieurs groupes hydroxyles ayant des réactivités identiques. Ils nécessitent donc des étapes de protection et de déprotection afin d'obtenir une synthèse spécifique. Ainsi, la synthèse d'un disaccharide requiert 5 à 6 étapes et celle d'un trisaccharide plus de 10.

De faibles rendements associés à la synthèse de différents anomères (α et β) difficilement séparables rendent ces méthodes peu attractives.

b) Glycosyltransférases

Les glycosyltransférases (17) catalysent le transfert à partir d'un donneur de type glycoside-nucléotide sur un accepteur, de manière spécifique. Leur classification repose d'une part sur le sucre transféré et d'autre part en fonction de l'accepteur et du type de liaison synthétisée. Ces enzymes, très attractives pour ce type de synthèse dirigée, sont, du fait de cette haute spécificité, présentes en faibles concentrations au niveau cellulaire et souvent intégrées au milieu intracellulaire. De plus l'utilisation comme substrat de nucléotides sucres (UDP-Gal, CMP-NeuAc...) rend ces méthodes plus onéreuses. Cependant leur utilisation pour la synthèse d'oligosaccharides supérieurs est plus intéressante car ces enzymes transfèrent mieux sur des di-, ou trisaccharides que sur des monosaccharides.

Par contre l'utilisation des glycosidases en tant qu'agent de catalyse des réactions de synthèse a été envisagée pour la formation de di- tri- ou tétrasaccharides. Avant d'énoncer la liste des enzymes capables de synthétiser des produits de transfert, un rappel du mécanisme d'action de ces enzymes permettra de mieux comprendre la formation d'oligosaccharides par les glycosidases.

I -MECANISME REACTIONNEL

A-DEFINITIONS

1- LES REACTIONS DE SYNTHÈSE D'OLIGOSACCHARIDES

Avant d'entrer dans le détail du mécanisme réactionnel, il faut souligner que les réactions de synthèse par des glycosidases sont appelées, de manière générale, réactions de transglycosylation. La distinction doit être faite cependant entre les réactions dites réverses ou de condensation qui permettent la synthèse d'oligosaccharides à partir des monosaccharides spécifiques à chacune des glycosidases et les réactions de transglycosylation "classiques" nécessitant une rupture de la liaison glycosidique pour transférer le résidu qui leur est spécifique sur un accepteur hydroxylé autre que l'eau.

Les réactions de transfert de groupements glycosidiques sur des alcools organiques se produisant par un mécanisme moins spécifique n'ont pas été détaillées.

2- LES GLYCOSIDASES

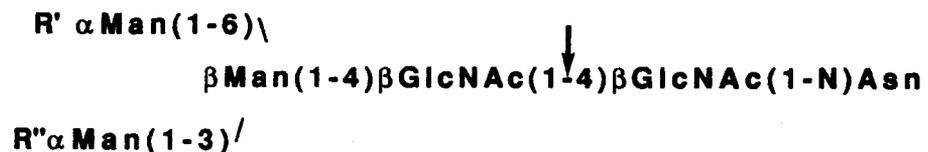
L'ensemble des enzymes catalysant l'hydrolyse de glycosides ou d'oligosaccharides peut être impliqué dans des réactions de synthèse d'oligosaccharides. Elles sont classées selon leur spécificité envers la partie glycosidique qui sera libérée du substrat ainsi que de la conformation anomérique de la liaison hydrolysée. Les O-glycosidases sont divisées en deux groupes particuliers :

a- Les endoglycosidases

Ces enzymes agissent sur des liaisons glycosidiques à l'intérieur d'un glycanne telles que : l'endo- β -galactosidase qui coupe les liaisons de type β



ou l'endo- β -N-acétylglucosaminidase qui hydrolyse la liaison glycosidique entre les deux GlcNAc du "core" des glycanes des N-glycosyl protéines.



b- Les exoglycosidases

Elles agissent par récurrence à partir de l'extrémité non réductrice de la chaîne saccharidique.

3- LE SUBSTRAT

Lors des réactions de synthèse, la notion de substrat de glycosidases est différente de celle utilisée lors des réactions d'hydrolyse.

a- Le donneur

C'est le substrat reconnu spécifiquement par l'enzyme de par son résidu glycosidique. Lors des réactions de réversion, ce substrat est un monosaccharide alors que pour des réactions de transglycosylation le substrat est soit sous forme oligosaccharidique soit de glycoside de synthèse.

b- L'accepteur

Il est reconnu plus ou moins spécifiquement selon l'enzyme. Il est obligatoirement hydroxylé. Cet accepteur peut être le donneur lui-même ou étranger au système enzyme/donneur.

B- HYDROLYSE

1-RUPTURE DE LA LIAISON GLYCOSIDIQUE

On s'est d'abord interrogé sur le devenir de l'atome d'oxygène impliqué dans la liaison glycosidique coupée par la glycosidase et notamment s'il restait au niveau de la partie glucidique reconnue. Lors de l'hydrolyse de cette liaison, BUNTON *et al.*(25), en utilisant de l'eau avec l'isotope 18 de l'oxygène ($H_2^{18}O$) ont montré que l'hydrolyse chimique de méthylglucosides ou enzymatique par des glucosidases appropriées conduisait à une rupture de la liaison glycosidique entraînant la substitution de l'atome d'oxygène de la partie glycanique.



Ces mêmes expériences reproduites avec l'ensemble des autres glycosidases ont abouti aux mêmes conclusions.

2-HYDROLYSE

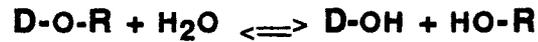
HEHRE (51) décrit les glycosidases comme étant capables de transférer la partie glycanique d'un substrat sur un accepteur autre que l'eau. Cela a été confirmé par d'autres auteurs, pour lesquels l'hydrolyse n'est que le cas particulier où l'eau sert d'accepteur.

Dans la réaction générale suivante pouvant s'appliquer aux réactions d'hydrolyse et de synthèse :



D-O-R représente le donneur glycosylé (substrat) et A-OH l'accepteur hydroxylé.

Lorsque A = H et R = groupe organique, en fait l'eau sert d'accepteur et conduit à une réaction d'hydrolyse classique du substrat avec libération du monosaccharide HO-R :



C- LES REACTIONS DE SYNTHÈSE

1- LA REACTION DE TRANSGLYCOSYLATION

La plus répandue des réactions de synthèse catalysée par les glycosidases est aussi connue sous l'appellation de "kinetically controlled reaction". Elle se déroule lorsque R est un groupement organique et A-OH est un alcool ou un saccharide. Cette réaction nécessite une coupure de la liaison glycosidique pour induire la formation de produits de transfert et dépend directement de la concentration en enzyme. Cette réaction peut être décomposée en deux étapes comme l'illustre la figure 1 page 7 :

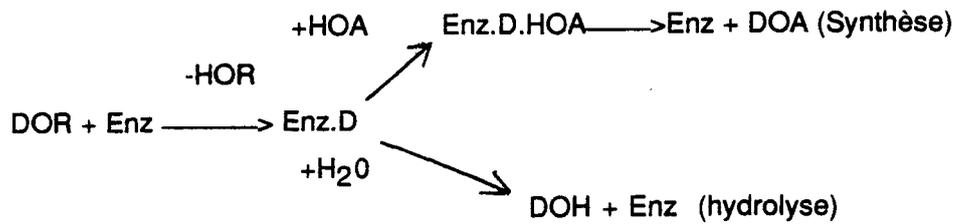
a- formation d'un complexe binaire E.D (Donneur) dont dépendra l'orientation de la réaction enzymatique (hydrolyse ou synthèse)

b- Passage vers un complexe ternaire E.D.A (Accepteur) lors de la réaction de synthèse

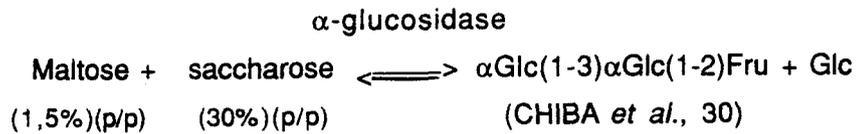
JERMYN (62) affirmait que cette réaction, passant par la formation d'un complexe ternaire (Enzyme-Substrat*-Accepteur), était due à une spécificité envers l'accepteur aussi importante que la spécificité envers le donneur. Cette hypothèse a été infirmée par de nombreux auteurs pour lesquels, la spécificité de l'enzyme envers la molécule acceptrice est très large et permet un transfert sur de multiples accepteurs. Ainsi COURTOIS *et al.*(6,35,99) ont montré que l' α -galactosidase de grain de café ne possédait pas de grande spécificité envers l'accepteur car l'enzyme était capable de regreffer le résidu galactosylé sur du saccharose, du mannose ou du cellobiose.

A notre connaissance, une caractéristique est commune à toutes les réactions de transglycosylation : il n'a jamais été relaté d'inversion de l'anométrie entre la liaison de la molécule formée et celle du donneur glycosylé. Basée sur ces observations, l'hypothèse d'un mécanisme de double inversion lors de la fixation du groupe glycosyl sur le site de l'enzyme puis lors de la formation de la liaison de covalence avec l'accepteur a été émise. WALLENFELS et MALHOTRA(120) ont proposé pour la β -D-galactosidase un mécanisme autre, sans inversion de conformation (figure 2 page 8).

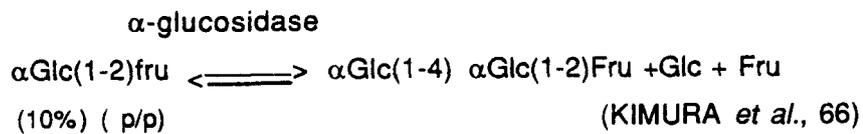
Cette réaction de synthèse par transglycosylation s'avère être très intéressante pour de multiples raisons :

1.a Réaction générale1.b Exemples

Donneur naturel + Accepteur



Donneur seul



Donneur synthétique + Accepteur

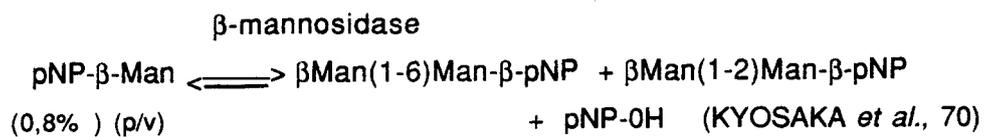


Figure 1 : La réaction de transglycosylation

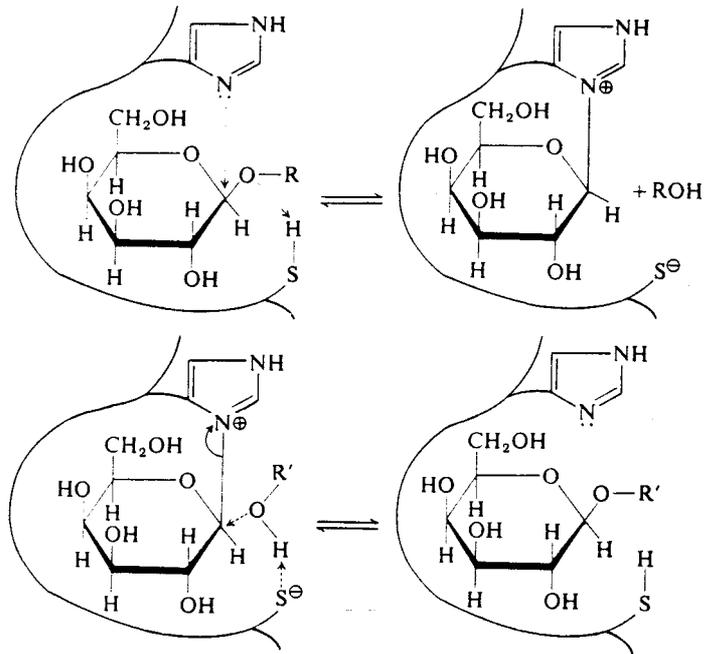
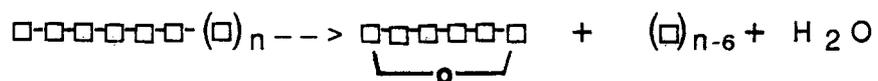


Figure 2 : Mécanisme de transfert d'un résidu galactosylé à partir d'un β -galactoside sur un accepteur

(d'après WALLENFELS et MALHOTRA, 120)

Réaction de cyclisation



Réaction de réversion



Figure 3 : Réaction de condensation

a- Le substrat donneur

Il peut être un glycoside naturel comme un oligosaccharide (lactose, saccharose, chitobiose...) ou synthétique avec une partie aglycannique aromatique ou aliphatique (Fig.1b). Généralement, ce sont des substrats peu onéreux ou faciles à préparer, ne possédant pas de liaison à haut potentiel énergétique.

Comparativement aux réactions de réversion, l'utilisation des substrats "naturels" des glycosidases favorise le déplacement de l'équilibre de la réaction vers la formation des complexes enzyme-substrat et permet d'augmenter les rendements de transfert. Cependant, pour éviter de faire basculer la réaction enzymatique vers une hydrolyse secondaire des produits de synthèse, il est nécessaire d'être toujours en concentration saturante en donneur

b- L'accepteur

Lorsque le donneur glycosylé sert d'accepteur, on observe une élongation des produits de transfert : un disaccharide donnant un trisaccharide qui lui même sert d'accepteur etc... Il existe aussi la possibilité d'orienter la réaction de synthèse en incorporant un accepteur dit "externe" au système enzyme-substrat pour créer une nouvelle famille d'oligosaccharides.

Généralement, dans ce type de réaction, la concentration en accepteur sera plus élevée que la concentration en donneur pour orienter la réaction de synthèse vers le greffage sur la molécule introduite dans le milieu (89).

La plupart des glycosidases ont montré une aptitude à transférer sur les alcools organiques. Afin de ne pas alourdir la revue générale sur les réactions de transglycosylation et devant le peu de spécificité de tels greffages, le choix d'omettre ces cas particuliers de réaction de transglycosylation a été fait.

c- L'enzyme

La quantité d'enzyme utilisée est moindre par rapport à la réaction de réversion, du fait du déplacement vers la formation d'un complexe enzyme-donneur.

2- LA REACTION DE REVERSION

Encore appelée "equilibrium controlled synthesis" lorsque R représente un atome d'hydrogène et A-OH est un monosaccharide, cette réaction peut être classée parmi les réactions de condensation schématisées sur la figure 3 page 8 car elle présente la particularité de libérer une molécule d'eau.

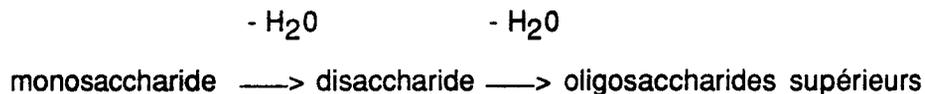
PEAT *et al.* (98) ont montré la réversibilité de la réaction d'hydrolyse en mettant en présence une concentration saturante de D-glucose, d'accepteur, et de β -D-glycosidase d'émulsine d'amande. Après incubation, ils observaient la formation de β -D-glycosides.

Cette synthèse aurait lieu grâce à un mécanisme de substitution : la β -glycosidase

peut catalyser une réaction dans laquelle l'eau servirait à la fois d'accepteur et de donneur (67). Lors d'incubation de monosaccharide et d'eau "isotopique" (oxygène 18) en présence d'enzyme, des réactions d'échanges de l'oxygène de la fonction hémiacétalique et de l'eau se produisent :



La réaction réverse peut donc se résumer ainsi:



L'équilibre de cette réaction fortement déplacé vers l'hydrolyse, nécessite la mise au point de méthodologies adaptées pour augmenter les rendements de synthèse. Comparativement à la réaction de transglycosylation, la réaction de condensation utilise des quantités importantes d'enzyme par rapport au taux de produits synthétisés.

Les réactions de réversion présentent la même particularité que celle observée pour les réactions de transglycosylation. L'anométrie de la liaison formée est identique à la spécificité de la glycosidase utilisée : par exemple, une α -galactosidase ne formera à partir de galactose que des α -galactosides.

3- RENDEMENT ET SELECTIVITE

La comparaison entre la synthèse de peptides et la synthèse d'oligosaccharides par des hydrolases montre que les réactions catalysées par les glycosidases sont moins sélectives et présentent de plus faibles rendements.

a- Rendement

Les rendements moins élevés s'expliquent par une différence de réactivité des groupements impliqués lors des réactions de condensation entre acides aminés ou entre saccharides : le groupe hydroxyle d'un accepteur de type glycosidique est beaucoup moins nucléophile que le groupe aminé impliqué dans les synthèses de peptides. La formation des liaisons glycosidiques est ainsi plus difficile à réaliser que les liaisons peptidiques. De plus, lors de la synthèse peptidique par catalyse protéasique, les réactions peuvent se effectuer en milieu biphasique pour piéger les produits néosynthétisés dans la phase organique et ainsi déplacer l'équilibre. Le caractère plus hydrophile des glucides ne permet pas d'utiliser le même stratagème.

Pour déplacer l'équilibre vers la synthèse d'oligosaccharides, la plupart des auteurs ont diminué la teneur en eau du milieu réactionnel en utilisant de fortes concentrations initiales en substrat.

Dans le cas des réactions de réversion, la concentration en monosaccharide peut

atteindre 80 % (p/v) (64).

AJISAKA *et al.*,(1) ont montré que la production d'oligosaccharides était proportionnelle à la concentration initiale en monosaccharide.

b- Sélectivité

Lors des réactions de synthèse d'oligosaccharides par des glycosidases, que ce soit par réactions de transglycosylation mais encore plus, lors des réactions de réversion, le problème majeur réside dans l'hétérogénéité des produits formés. Ce problème est essentiellement dû, d'une part à la multiplicité des groupes hydroxyles disponibles sur les accepteurs glucidiques et d'autre part à la faible spécificité des enzymes vis-à-vis des accepteurs.

Beaucoup d'oligosaccharides naturels à activité biologique contiennent des liaisons où un alcool secondaire est impliqué. Les réactions de transglycosylation génèrent des produits dont la majorité des liaisons est de type (1-6) (correspondant à l'alcool primaire du saccharide accepteur).

Pour orienter spécifiquement la synthèse vers tel type de liaison plutôt qu'un autre, deux méthodes ont été proposées :

- Au sein d'une même classe de glycosidases, répertorier et sélectionner les enzymes selon leurs aptitudes (quantitatives mais surtout qualitatives) envers les réactions de transglycosylation. TOBA *et al.*(116) ont répertorié près de dix souches bactériennes en fonction des produits de transfert obtenus après action de leurs galactosidases sur le lactose.

- NILSSON (87,88) a basé sa méthodologie sur le principe suivant : l'anométrie de l'accepteur glycosylé et la structure de la partie non spécifique du donneur peuvent influencer la formation des nouvelles liaisons des disaccharides . Le tableau I (page 12) résume une partie des résultats obtenus. Il montre que :

- la formation de liaison avec l'hydroxyle primaire n'est plus majoritaire
- l'anométrie de liaison des méthyl-galactosides accepteurs pour les α - et β -galactosidases comme pour l' α -fucosidase module la spécificité du greffage
- la position ortho ou para des nitrophényl-galactosides influence le type des liaisons formées par l' α -D-galactosidase.

CONCLUSIONS :

La comparaison des différentes méthodologies (chimique et enzymatique) envisageables pour l'obtention d'oligosaccharides est illustrée sur le tableau II (page 13)

Le problème majeur de synthèse des oligosaccharides, lié à la multiplicité des fonctions hydroxylées des glucides, réside essentiellement dans la spécificité de la synthèse. L'hétérogénéité des produits néosynthétisés provient soit de la présence des 2 anoméries de liaisons possibles (méthode chimique), soit de la mauvaise spécificité de

**TABLEAU J : FORMATION DE DISACCHARIDES BLOQUES PAR REACTION DE
TRANSGLYCOSYLATION ; INFLUENCE DU GROUPE
AGLYCANNIQUE DU DONNEUR ET DE L'ANOMERIE DE LIAISON
DE L'ACCEPTEUR SUR LA REGIOSELECTIVITE (NILSSON)(88)**

<u>Donneur glycosylé</u>	<u>Accepteur glycosylé</u>	<u>Produits majeurs formés</u>
<u>α-D-galactosidase</u>		
pNP- α -Gal	α Gal-O-Me	α Gal(1-3) α Gal-O-Me
pNP- α -Gal	β Gal-O-Me	α Gal(1-6) β Gal-O-Me
pNP- α -Gal	pNP- α -Gal	α Gal(1-3)Gal α -pNP
oNP- α -Gal	oNP- α -Gal	α Gal(1-2)Gal α -oNP
<u>α-L-fucosidase</u>		
pNP- α -Fuc	α Gal-O-Me	α Fuc(1-3) α Man-O-Me
pNP- α -Fuc	β Gal-O-Me	α Fuc(1-6) β Man-O-Me

TABLEAU II : COMPARAISON DES DIFFERENTES VOIES DE SYNTHÈSE DES OLIGOSACCHARIDES

<u>SYNTHÈSE</u>	<u>AVANTAGES</u>	<u>INCONVENIENTS</u>
<u>Chimique</u>	Bon contrôle	Fastidieuse Faible rendement de réaction Mélange d'anomères
<u>Enzymatique</u>		
Glycosyl transférases	Haute spécificité de l'enzyme Rendement élevé	Faible disponibilité de l'enzyme Substrat onéreux
Glycosidases		
Réaction de réversion	Enzyme abondante Substrat bon marché	Rendement faible Concentration élevée en substrat Moins spécifique
Réaction de transglycosylation	Enzyme abondante Haut rendement Bonne spécificité Substrat bon marché Contrôle aisé de la réaction	Hydrolyse du substrat et des produits de réaction

synthèse (méthode enzymatique faisant appel aux glycosidases).

A cette difficulté d'obtenir des produits homogènes vient se greffer des problèmes de purification.

Les glycosyl-transférases présentent une haute spécificité de synthèse mais outre les problèmes liés à l'extraction et à la purification des systèmes enzymatiques, elles nécessitent des substrats onéreux (ou devant être régénérés).

Les méthodes enzymatiques utilisant les glycosidases n'en sont qu'à leurs débuts et manquent encore de résultats probants. Cependant, leur facilité d'utilisation, alliée à leur faible coût, les rendent très attractives par rapport aux méthodes chimiques.

Les réactions de transglycosylation présentent de meilleurs rendements de synthèse et une meilleure spécificité de réaction que les réactions de réversion. Elles requièrent en outre moins de matériel enzymatique. Cependant, dans le cas des réactions de réversion, l'utilisation de monosaccharides comme substrat donneur facilite la purification des disaccharides et homologues supérieurs néosynthétisés.

II- FORMATION DE SACCHARIDES PAR LES GLYCOSIDASES

La formation d'oligosaccharides par l'intermédiaire de glycosidases nécessite dans la plupart des cas des substrats glycosidiques, naturels ou synthétiques peu onéreux. Cette synthèse s'effectue sans apport d'énergie extérieure.

Les produits formés peuvent posséder des propriétés biologiques. Les fructo-oligosaccharides synthétisés à partir de saccharose ont des effets bénéfiques sur la flore intestinale et participant à l'abaissement de la cholestérolémie chez les diabétiques (123). Les cyclomaltodextrines sont synthétisées pour leurs propriétés d'inclusion (107).

Le tableau III page 15 montre de manière non exhaustive la variété des enzymes et des produits impliqués dans des phénomènes de transglycosylation. Cette diversité se retrouve à différents niveaux :

- la classe des enzymes : Toutes les variétés enzymatiques sont capables de former des produits de transglycosylation, indépendamment de l'anométrie de liaisons (α ou β) et du résidu spécifique (glucosidase, mannosidase, fructosidase, N-acétyl- β -D- glucosaminidase, galactosidase)
- l'origine des systèmes enzymatiques (microbienne, végétale ou animale)
- les produits de réaction (fonction hydroxylée primaire ou secondaire, degré de polymérisation).

**TABLEAU III : DIVERSITE DES GLYCOSIDASES IMPLIQUEES DANS LES
REACTIONS DE SYNTHESE**

ENZYMES	ORIGINE	SUBSTRAT	PRODUITS DE TRANSFERT	Réf.
β -D-fructofuranosidase (invertase)	levure	saccharose	fru-(Sac)	10
β -D-fructofuranosidase (levane sucrase)	<i>E. herbicola</i>	saccharose	(Fru) _n +nGlc liaisons β (2-1); β (2-6)	51
α -D-glucosidase (dextrane sucrase)		saccharose	(Glc) _n +nFru liaison α (1-6)	54
α -D-glucosidase	<i>A. niger</i>	maltose	α Glc(1-6)Glc	93
β -D-glucosidase	<i>A. niger</i>	cellobiose	cellotriose	14
β -D-mannosidase	cobaye	pNP- β -Man	pNP-Man-Man	70
α -D-mannosidase	haricot	mannose	α Man(1-6)Man	64
2 acétamido-2déoxy- β -D- glucosaminidase(chitinase) <i>verrucaria</i>	<i>Myrotherium</i>	chitobiose	GlcNAc(1-6) chitobiose	15
cyclodextrine trans- glucosylase	<i>Bacillus</i> <i>macerans</i>	amidon	cyclodextrines	44
α -D-galactosidase	grain de café	Phen- α -Gal +cellobiose	α Gal-cellobiose	99
β -D-xylosidase		xylobiose xylose	trisaccharide β Xyl(1-3)Xyl	58

Sur ce dernier critère, deux catégories de produits de synthèse peuvent ainsi être différenciées : les polysaccharides dont le degré de polymérisation est supérieur à 50 et les oligosaccharides

A- LES POLYSACCHARIDES

La synthèse de polysaccharides, sans utilisation de donneur glycosylé à haute énergie comme c'est le cas pour la formation du glycogène ou de l'amidon, est connue depuis de nombreuses années.

Dans la majorité des cas, le disaccharide donneur est le saccharose, dont la liaison glucose-fructose possède un niveau d'énergie relativement faible par rapport aux autres liaisons glycosidiques. Les enzymes capables d'effectuer des réactions de transglycosylation à partir de ce substrat sont divisées en deux groupes : les D-glucosyl-transférases et les D-fructosyl transférases.

Parmi ces dernières, dès 1944, HESTRIN *et al.* (53) mettent en évidence une levane-sucrase capable d'allonger, à partir de saccharose, une chaîne de fructose par des liaisons de type β (2-6) (levane) et de libérer du glucose. Le trisaccharide précurseur de ce polysaccharide a été identifié comme un 6-kestose (β -Fru(2-6) β Fru(2-1) α Glc). De même, l'élongation sur le deuxième hydroxyle primaire de la molécule de fructose (C1) débute par la formation du 1-kestose (β -Fru(2-1) β Fru(2-1) α Glc) pour aboutir à la formation d'un polysaccharide de type β (2-1) fructofuranane ou inuline (55).

HEHRE (52) a découvert la réaction antagoniste à partir du même substrat, la synthèse d'une chaîne de glucose par des liaisons α (1-6) (dextrane) avec libération de fructose, l'enzyme en question étant la dextrane-sucrase.

Ces deux réactions montrent que les enzymes responsables de ce type de synthèse sont particulières et beaucoup plus spécifiques, que ce soit au niveau de la molécule acceptrice que du type de liaison formée (transfert sur l'hydroxyle primaire et reconnaissance du glycosyl accepteur). Néanmoins il existe des dextrane-sucrases capables de former d'autres liaisons. C'est le cas avec la glucane sucrase de *L.mesenteroides* dont les oligosaccharides néo-synthétisés renferment des liaisons α (1-6) et α (1-3) (34).

Les réactions de synthèse de polysaccharides n'ont pas seulement été mises en évidence avec le saccharose comme substrat, la synthèse de dextrane à partir de dextrines a été reportée par HASSID (48). TANAKA et OI (112) ont caractérisé une β -transglycosylase capable de synthétiser des oligosaccharides supérieurs à partir de cellopentaose. Cette enzyme présente la particularité de transférer des substrats glycosidiques à deux ou trois résidus glucosyls sur un accepteur.

Ces enzymes peuvent être classées dans le groupe des véritables

transglycosylases pour lesquelles une hydrolyse s'accompagne d'un greffage spécifique sur un accepteur et entraîne un allongement conséquent de la molécule nouvellement synthétisée.

B- LES OLIGOSACCHARIDES

La caractérisation des réactions de synthèse d'oligosaccharides par les enzymes hydrolytiques n'est pas récente. Notamment, comme pour les réactions conduisant à la formation des polysaccharides, une revue générale concernant la réaction de transglycosylation due à l'invertase et utilisant le saccharose comme substrat a été publiée dès 1956 par EDELMAN (39).

D'une manière générale, la biosynthèse des oligosaccharides est beaucoup plus aléatoire et ne permet pas d'obtenir une élongation homogène des chaînes glycosidiques. Les disaccharides sont les produits majeurs, mais il y a aussi des tri- et des tétrasaccharides qui peuvent être formés. Il n'existe pas de point de branchement privilégié parmi les produits néo-synthétisés même si la liaison avec l'alcool primaire est majoritaire (75,85).

De plus, les glycosidases peuvent transférer la partie glycanique sur divers accepteurs, leur spécificité envers ces derniers étant plus faible que celle des glycosyltransférases ou des transglycosylases mentionnées dans le paragraphe précédent.

Les β -D-galactosidases sont les plus connues des glycosidases et les études concernant leurs réactions de synthèse seront vues dans le chapitre suivant.

Les α -D-galactosidases, largement répandues dans la nature ont elles aussi fait l'objet de nombreuses études, et notamment celles concernant leur spécificité envers les accepteurs (6,35,37,99). Ces enzymes catalysent les réactions de condensation aussi bien que les réactions de transglycosylation avec un greffage majoritaire sur le groupement hydroxyle primaire.

L' α -D-mannosidase de la fève jack montre elle aussi une aptitude vis-à-vis des réactions de réversion et de transglycosylation. Comme pour l' α -D-galactosidase, le greffage s'effectue prioritairement sur l'hydroxyle primaire (64).

La chitinase de *myrotherium verrucaria* transfère une unité de N-acétyl glucosamine sur l'hydroxyle primaire du chitobiose (15).

Les N-acétyl- β -D-glucosaminidases de *Bifidobacterium bifidum* souche AA 2/2 sont capables d'effectuer des réactions de réversion à partir de solution concentrée en N-acétyl-D-glucosamine pour former un dissaccharide (74).

La xylosidase de *Penicillium wortmanni* est capable de transférer des résidus β -D-xylopyranosyles, mais également d' α -L-arabinosyles sur divers accepteurs (36). A notre connaissance, c'est la seule enzyme capable de greffer sans

discernement de l'anomérisation et de la série, mais il faut signaler cependant que ces structures possèdent des conformations semblables.

C- CAS PARTICULIERS

Dans cette classification basée sur les produits néosynthétisés, diverses enzymes n'ont pu y être intégrées.

1- Les endo-glycosidases

Peu de résultats concernent l'éventuelle activité transférasique des amylases ou des cellulases.

Cependant des réactions de transglycosylation ont pu être mises en évidence. C'est le cas de l'endo- α -N-acétyl-D-galactosaminidase. BARDALES *et al.*(13) ont caractérisé un transfert sur différents alcools et plus particulièrement le glycérol.

Des résultats identiques sont obtenus avec l'endoglucosaminidase F ou la N-glycopeptidase F isolées de *Flavobacterium meningosepticum*. Dans ce dernier cas, la teneur très élevée en glycérol (20 %) peut expliquer le transfert préférentiel.

2-la cyclodextrine transglucosylase

Ainsi la cyclodextrine transglucosylase isolée par FRENCH *et al.* (44,45) transforme l'amylose en cyclodextrines par transfert de groupes glucosylés à partir de l'extrémité non réductrice de son substrat. En plus de cette production de cyclodextrines, cette enzyme catalyse la formation de divers saccharides par l'intermédiaire de réaction soit de couplage soit d'élongation en fonction des substrats présents dans le milieu réactionnel.

LES REACTIONS DE β -TRANSGALACTOSYLATION

La réaction de β -transgalactosylation est certainement la plus étudiée des réactions de synthèse catalysées par des glycosidases. L'obtention aisée en quantité importante, d'enzyme purifiée a permis à de nombreux auteurs d'utiliser la β -D-galactosidase comme modèle non seulement pour l'élucidation du mécanisme réactionnel d'une glycosidase, mais aussi pour la compréhension et la modélisation de la régulation génique de la synthèse de l'enzyme, notamment chez *E.coli*.

Avant d'expliquer le rôle et l'importance des produits néosynthétisés, l'historique des réactions de transgalactosylation permettra de montrer la multiplicité des systèmes enzymatiques impliqués dans des réactions de transfert de résidus galactosylés, et d'apporter un début d'explication au mécanisme réactionnel

responsable de ces synthèses.

I- HISTORIQUE

La chronologie de l'étude des phénomènes de transgalactosylation peut être divisée en deux périodes majeures.

Dans un premier temps, les potentialités des β -D-galactosidases ont été étudiées d'un point de vue académique.

Une deuxième époque, plus récente, qui est le fait de l'utilisation des réacteurs à enzymes pour la fabrication de lactolysat ou de l'obtention de produits laitiers à faible teneur en lactose.

A- PREMIERE PERIODE (1915, 1950-1970)

LA DECOUVERTE DES REACTIONS DE TRANSGALACTOSYLATION

Le tableau IV (page 20) illustre chronologiquement les premières découvertes majeures concernant les réactions de transgalactosylation. On retrouve la diversité des sources enzymatiques déjà caractérisée pour l'ensemble des réactions de transglycosylation. Dans un premier temps ces réactions ont été observées uniquement en présence du substrat naturel de ces enzymes : le lactose. Dans un deuxième temps un accepteur externe a été adjoint au substrat de façon à orienter le greffage. Et enfin, les substrats naturels peuvent être remplacés par des galactosides synthétiques.

Les premières réactions de transgalactosylation ont été mises en évidence dès 1915 par BOURQUELOT et BRIDEL (20) avec le transfert enzymatique de résidus galactosylés sur des alcools organiques. Mais c'est en fait l'avènement de la chromatographie sur papier qui a permis la caractérisation des réactions de transgalactosylation à partir de lactose. Ainsi, dès 1952, ARONSON (8) a montré que l'action des lactases de *Saccharomyces fragilis* et d'*Escherichia coli* sur le lactose induisait la production d'oligosaccharides en plus de la libération des monosaccharides. En 1953, PAZUR (95) a confirmé les réactions de transfert de *S. fragilis* et a déterminé la structure des oligosaccharides néosynthétisés, laissant déjà apparaître une prédominance pour le greffage sur les hydroxyles primaires (96). Onze galacto- oligosaccharides formés par *S. fragilis* à partir de lactose ont été dénombrés (104).

L'incorporation d'un accepteur glycosylé externe, en l'occurrence de la N-acétyl-D-glucosamine, a été faite pour les premières fois par ZILLIKEN *et al.*, (124)

**TABLEAU IV : REACTIONS DE TRANSGALACTOSYLATION :
DECOUVERTES INITIALES**

origine enzymatique	substrat	produits synthétisés		Réf.
		nombre	structure	
<i>S.fragilis</i>	lactose	4		8
<i>E.coli</i>	lactose	3		
<i>S.fragilis</i>	lactose	4		95
<i>S.fragilis</i>	lactose	5	β Gal(1-6)Glc β Gal(1-6)Gal β Gal(1-3)Glc	96
<i>S.fragilis</i>	lactose	11		104
<i>L.bacillus var.penn.</i>	lactose + GlcNAc	2	β Gal(1-6)GlcNAc β Gal(1-4)GlcNAc	125
testicule bovin	lactose + GlcNAc	2	β Gal(1-3)GlcNAc β Gal(1-4)GlcNAc	
glande mammaire de rat	lactose + GlcNAc	4	β Gal(1-3)GlcNAc β Gal(1-4)GlcNAc β Gal(1-6)GlcNAc	5
<i>E.coli</i>	Phen- β -Gal + Glc +GlcNAc		β Gal(1-6)Glc β Gal(1-6)GlcNAc	69
<i>P.chrysogenum</i>	lactose	9	β Gal(1-3)Glc β Gal(1-6)Glc β Gal(1-6)Gal β Gal(1-6) β Gal(1-4)Glc	12
<i>A.niger</i>	lactose	5		122

disaccharides de type Gal-GlcNAc.

L'utilisation de donneurs synthétiques lors de réactions de transgalactosylation, en présence d'accepteur externe s'avère intéressante pour la synthèse spécifique de galactosyl-O-accepteur.

En effet, par cette technique, on se heurte beaucoup moins aux problèmes de purification des produits néosynthétisés, ce qui n'est pas le cas lors de l'utilisation du lactose.

Ainsi, KUHN *et al.* (69) ont substitué le galactoside naturel par le phényl β -D-galactoside en présence de N-acétylglucosamine et de la β -galactosidase d'*E.coli*. Par la suite, PAZUR *et al.* (97) et BOOS *et al.* (19) utilisèrent respectivement l'ortho- et le para-nitrophényl- β -D- galactoside comme donneurs du résidu galactosylé vis-à-vis de différents accepteurs.

B- DEUXIEME PERIODE

L'HYDROLYSE DU LACTOSE

Depuis ces dix dernières années, l'intérêt du lait dans l'alimentation des populations des pays en voie de développement (généralement sous et mal nutries) s'est considérablement accru. Cependant, l'intolérance au lactose, dû à un déficit primaire en lactase intestinale, est un frein à l'utilisation de cette matière première excédentaire. Pour palier à cet inconvénient et grâce à l'essor des biotechnologies, il a été envisagé l'utilisation de bioréacteur à lactase immobilisée. Ce programme a entraîné la recherche de nouvelles sources d'enzymes et la caractérisation de leurs aptitudes à l'hydrolyse et secondairement aux réactions de transgalactosylation. Le tableau V page 22 résume l'ensemble des réactions de transgalactosylation découvertes lors de l'incubation de systèmes hydrolytiques en présence de lactose.

La plupart des auteurs ont recherché des β -D-galactosidases d'origine microbienne dans une optique de production facilitée. De la même manière, lors de l'étude des paramètres enzymatiques et physico-chimiques de ces enzymes, ils ne se sont pas uniquement préoccupés de l'hydrolyse du lactose.

En effet la production d'oligosaccharides diminue les rendements de conversion du lactose. Les auteurs ont donc été amenés à étudier le mécanisme de production et la structure des produits formés lors de la réaction secondaire afin de l'éviter ou de la diminuer.

Ces études ont montré d'une part la très grande homogénéité d'action des enzymes quant au greffage préférentiel sur l'hydroxyle primaire (C6) des molécules acceptrices (9, 38, 46, 93, 117). Cependant, TOBA *et al.* (116,117) ont montré, que le greffage pouvait aussi s'effectuer sur les hydroxyles secondaires (C2) et (C3), mais en plus faibles proportions.

**TABLEAU V : REACTIONS DE TRANSGALACTOSYLATION EN
PRESENCE DE LACTOSE**

<u>ORIGINE DE L'ENZYME</u>	<u>PRODUITS SYNTHETISES</u>		<u>Réf.</u>
	<u>nombre</u>	<u>structures</u>	
<i>K.lactis</i>	4	β Gal(1-6)Glc	38
<i>S.lactis</i>	6	β Gal(1-6) β Gal(1-6) β Gal(1-4)Glc β Gal(1-6) β Gal(1-6)Glc β Gal(1-6) β Gal(1-6)Gal β Gal(1-6) β Gal(1-4)Glc β Gal(1-6)Gal; β Gal(1-6)Glc	9
<i>L.helveticus</i> (B1;LH17)	2	β Gal(1-6)Glc + Trisaccharides	116
<i>L.plantarum</i> et <i>L.acidophilus</i>	3	β Gal(1-6)Glc β Gal(1-6)Gal + Trisaccharides	
<i>K.lactis</i> et <i>L.helveticus</i> (Bf3)	3	β Gal(1-6)Glc β Gal(1-3)Glc + Trisaccharides	
<i>L.bulgaricus</i> et <i>S.thermophilus</i>	5	β Gal(1-6)Glc; β Gal(1-6)Gal β Gal(1-3)Glc β Gal(1-2)Glc +Tri- + Tetra-	
<i>S.thermophilus</i>	2	β Gal(1-6)Glc; β Gal(1-6)Gal	46
<i>B.macerans</i>		Di-,tri-,tetra- et pentasaccharides	82
<i>A.oryzae</i>	20	β Gal(1-6) β Gal(1-6) β Gal(1-4)Glc β Gal(1-6) β Gal(1-4)Glc β Gal(1-3) β Gal(1-4)Glc Tri-,tetra-, penta- et hexasaccharides	117
<i>K.fragilis</i>			103
<i>A.niger</i>			
<i>T.herzianum</i>	3	β Gal(1-6) β Gal(1-4)Glc	102

D'autre part, ces recherches ont mis en évidence une grande disparité concernant :

- le nombre de molécules synthétisées, nombre variant de 2 à 20 (46, 117).
- le degré de polymérisation des oligosaccharides. TOBA *et al.* (117) ont caractérisé des structures allant du disaccharide jusqu'à l'hexasaccharide.

CONCLUSIONS :

Ces réactions de transgalactosylation faisant suite à des recherches plus appliquées sur l'hydrolyse du lactose mettent en évidence que :

-les produits de synthèse ne doivent pas être négligés lors de la mise au point de procédés concernant l'hydrolyse du lactose car quantitativement, ils peuvent représenter plus de 30 % du lactose initiale comme nous le montrerons par la suite et, qualitativement, ils sont mal assimilés au niveau intestinal (29).

-La prédominance du greffage sur l'hydroxyle primaire est observée. La formation de l'allolactose n'est pas seulement le fait d'un artéfact enzymatique, mais provient d'un mécanisme réactionnel discuté dans le paragraphe suivant et pouvant être essentielle à la dégradation du lactose par certains microorganismes.

II- LE MECANISME DE β -TRANSGALACTOSYLATION

Sous l'influence de HUBER et WALLENFELS (59,60), le système enzymatique étudié est celui de la β -D-galactosidase d'*E.coli*.

Plusieurs raisons permettent d'expliquer le choix de ce modèle :

- La facilité de production et de purification de la β -D-galactosidase.
- La mise en évidence que le système purifié, sous forme cristalline est bien responsable de l'hydrolyse et des réactions de transfert (WALLENFELS et MALHOTRA, 120).

-L'importance des produits de transfert lors de l'action sur le lactose et surtout de son produit majeur : l'allolactose (β Gal(1-6)Glc) impliqué dans les mécanismes de régulation de l'opéron lactose (27).

HUBER, KURZ et WALLENFELS (59) ont émis l'hypothèse que deux types de mécanismes étaient responsables des réactions de transglycosylation lors de l'incubation du système enzymatique en présence de lactose.

A- LA TRANSGALACTOSYLATION INTERMOLECULAIRE

Dans ce type de mécanisme, l'enzyme a besoin de 2 molécules pour effectuer sa

réaction de synthèse : un donneur et un accepteur.

Ce mécanisme indirect a lieu lorsqu'après rupture de la liaison galactosidique, la partie non reconnue d'un β -galactoside (le glucose pour le lactose) a le temps de diffuser hors du site actif de l'enzyme. Le galactose "fixé" au site de catalyse de l'enzyme peut alors être greffé sur une molécule acceptrice "externe", renfermant un groupement hydroxylé. Le lactose, les monosaccharides libérés (Glc ou Gal), ou encore des oligosaccharides néo-synthétisés sont les molécules hydroxylées les plus communément citées. Ce mécanisme est responsable de l'allongement des galacto-oligosaccharides.

HUBER, GAUNT et HULBURT (60) ont suggéré que cette réaction intermoléculaire était dépendante de la structure de la molécule porteuse de l'hydroxyle accepteur.

B- LA TRANSGALACTOSYLATION INTRAMOLECULAIRE

Après coupure de la liaison galactosidique du lactose, le galactose est transféré directement sur l'hydroxyle en C6 du glucose pour former l'allolactose. Ce transfert sur le glucose donneur se déroule avant que la molécule n'ait eu le temps de quitter le site de catalyse.

HUBER *et al.* (60) ont montré que le glucose quittait très lentement le complexe enzyme-galactosyl du fait d'une forte affinité du glucose pour son site de fixation et expliquent ainsi la formation majeure d'allolactose pouvant atteindre 47 % des produits de la réaction. La vitesse de formation de l'allolactose est indépendante de la concentration initiale en lactose.

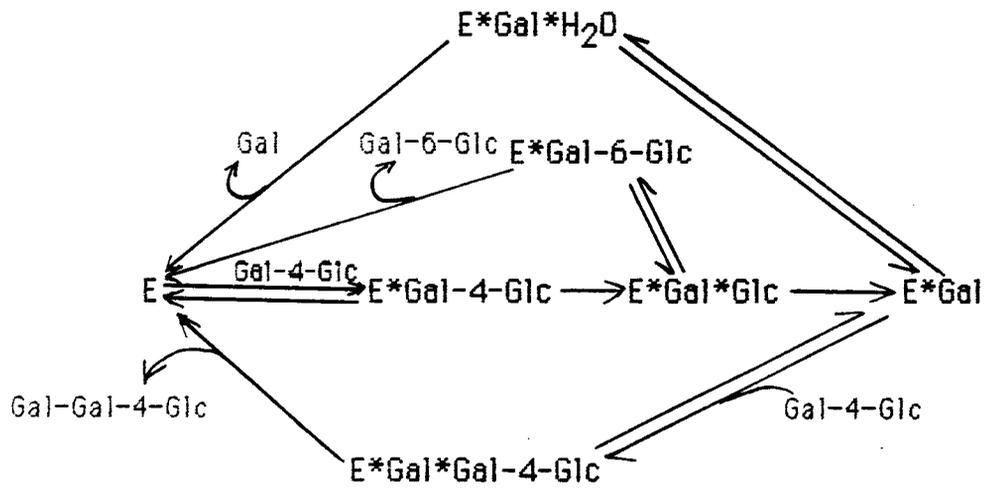
Cependant tout l'allolactose formé ne provient pas toujours d'un mécanisme intramoléculaire de transgalactosylation. Il peut être synthétisé par voie indirecte soit par hydrolyse de galactooligosaccharides de type β Gal(1-6) β Gal(1-6)Glc, soit par greffage du résidu galactosyl sur du glucose libéré lors de l'hydrolyse. Ce regreffage intermoléculaire s'explique par le fait que le glucose est l'accepteur possédant la meilleure spécificité pour l'enzyme.

Pour mémoire, la synthèse d'allolactose à partir de phényl- β -D- galactoside et de glucose rapporté par KUHN *et al.* (69) (cf page 20) s'effectue par un mécanisme intermoléculaire.

La figure 4 page 25 schématise les différentes voies que peut prendre le résidu galactosylé pour donner les produits de la réaction.

C- LA REACTION DITE REVERSE

Peu de travaux concernent l'étude des réactions de réversion des β -D-galactosidases. Le passage par un mécanisme intermoléculaire est obligatoire. HUBER



Gal-4-Glc : Lactose ; Gal-6-Glc : Allolactose ; Gal : Galactose ;
 Glc : Glucose ; Gal-Gal-4-Glc : Trisaccharide ; E: Enzyme

Figure 4 : Mécanisme hypothétique d'action de la β -D-galactosidase d' *E. coli* sur le lactose (d'après HUBER, KURZ et WALLENFELS) (59)

et HURLBURT (61) ont démontré que toutes les liaisons pouvaient être synthétisées lors de l'incubation de galactose avec du glucose, cependant l'allolactose était formé plus rapidement que le lactose.

Ces mêmes auteurs ont mis en évidence, mis à part le galactose, que seulement trois composés peuvent être utilisés par l'enzyme pour effectuer ces réactions de condensation. Parmi ceux-ci, deux présentent des modifications sur le carbone 6 indiquant le peu d'importance de cet hydroxyl du donneur sur la réactivité de l'enzyme (L-arabinose et D-fucose), le troisième étant le D-galactal.

Les facteurs influençant cette réaction ont été étudiés par AJISAKA (2,3).

CONCLUSIONS :

Après la découverte des premières réactions de transgalactosylation, les connaissances ont progressé non seulement grâce à une amélioration des techniques utilisées pour la quantification des produits réactionnels (GLC ; HPLC) et la détermination de la structure des oligosaccharides néosynthétisés (analyse des produits méthylés ; R.M.N.) mais aussi par un besoin croissant en nouvelles structures glucidiques.

Les réactions de transgalactosylation sont une approche nouvelle pour espérer obtenir des quantités importantes d'oligosaccharides de manière relativement aisée. Avant d'envisager les rôles biologiques des produits synthétisés, il faut définir quels sont les facteurs influençant cette réaction.

III-FACTEURS INFLUENCANT LA REACTION DE TRANSFERT

L'incubation de lactose en présence des systèmes enzymatiques purifiés ou non, conduit à la production simultanée des monosaccharides (Gal et Glc) et des produits de synthèse. La figure 5 page 27 est une illustration de la réaction enzymatique.

On remarque que si les produits néosynthétisés peuvent être caractérisés dans les premiers temps de la réaction, ils peuvent tout aussi bien disparaître, hydrolysés à leur tour par le système enzymatique, lorsque la concentration en substrat diminue.

A- LE DONNEUR

1- NATURE DU DONNEUR

Peu de galacto-oligosaccharides ont été synthétisés à partir de galactose seul car la réaction de réversion, outre les rendements faibles, entraîne la formation de

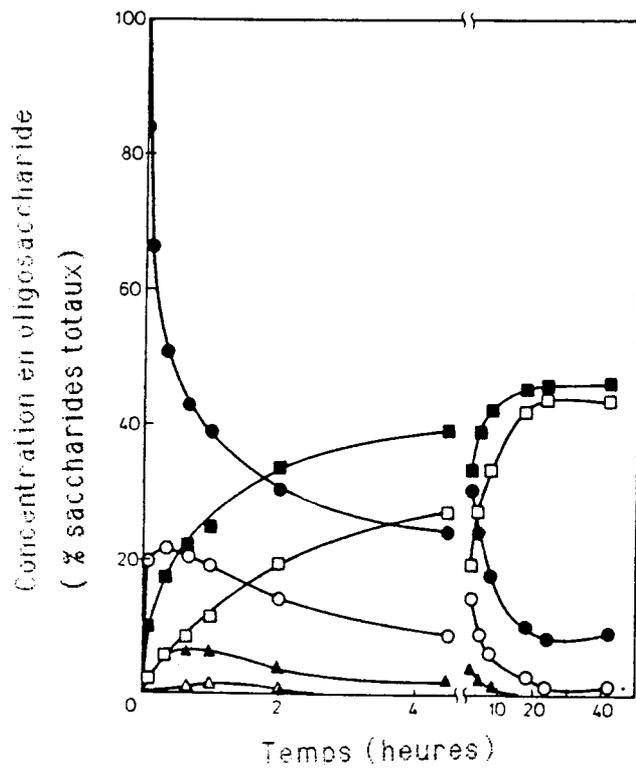


Figure 5: Cinétique d'hydrolyse du lactose par la β -D-galactosidase d'*Aspergillus oryzae* (BETSCHART et PRENOSIL,16)

La concentration initiale en lactose est de 30% ;

■,Glc ; □ Gal ; ○ ,Di- ; ●,Tri- ; ▲,Tetra- ; △,pentasaccharide.

galactosylé, certains auteurs ont malgré cela, envisagé l'utilisation de cette réaction. La plupart des auteurs utilisent le lactose comme source de galactose car c'est le substrat naturel des β -D-galactosidases.

Ainsi, HUBER *et al.*(59) sont arrivés aux conclusions suivantes :

-la configuration anomérique du lactose peut modifier le rapport d'activités transférante/hydrolytique : l' α -lactose diminue la formation d'allolactose.

-le résidu glucosyl sert d'accepteur privilégié car il possède une affinité particulière envers son site (le site "glucose" de la β -galactosidase) qu'il quitte lentement après la rupture de la liaison galactosidique (60).

Pour éviter d'orienter la réaction vers la synthèse d'allolactose ou des produits de réaction dérivant du lactose, l'utilisation de galactosides de synthèse a été envisagée.

Si KUHNS *et al.* (69) utilisent le phényl-galactoside en présence de glucose ou de N-acétyl-glucosamine pour leur réaction de synthèse, par la suite, PAZUR *et al.* (97), BOOS *et al.*(19) et plus récemment SUYAMA (109) puis NILSSON (88,90) ont utilisé les nitrophényl-galactosides comme donneur parce qu'ils étaient de bons substrats pour la majorité des galactosidases. Il faut souligner que la plupart des hydrolases sont plus affines des substrats synthétiques par rapport aux substrats naturels. Ceci n'est pas forcément en faveur des réactions de transgalactosylation.

2- CONCENTRATION EN DONNEUR

Dans le cas d'une synthèse intramoléculaire (allolactose), la formation des oligosaccharides est peu influencée par la concentration initiale en substrat.

Les études des réactions de transgalactosylation intermoléculaires ont montré dans tous les cas, que lorsque le lactose est utilisé comme donneur, plus sa concentration initiale est élevée, plus l'équilibre est déplacé vers la réaction de synthèse. Deux raisons peuvent être invoquées pour la modification du rapport des 2 activités :

- la diminution de la teneur en eau libre du milieu réactionnel
- l'augmentation en accepteur spécifique (autre que eau ou alcool)

La figure 6 page 29 résume l'influence de la concentration en lactose sur la production des oligosaccharides. Comme nous pouvons le voir, il est possible d'obtenir près de 45 % de conversion du lactose en galacto- oligosaccharide. Ce record a été atteint pour une concentration initiale en lactose de l'ordre de 35 % (p/v). Généralement les valeurs données dans la littérature n'excèdent jamais 40 % de conversion, elles sont voisines de 15 à 20 % et ceci pour des concentrations en donneur ne dépassant pas 30 % (p/v). Cette dernière valeur est due au fait que les solutions de lactose au delà de 0,7 M cristallisent à température ambiante.

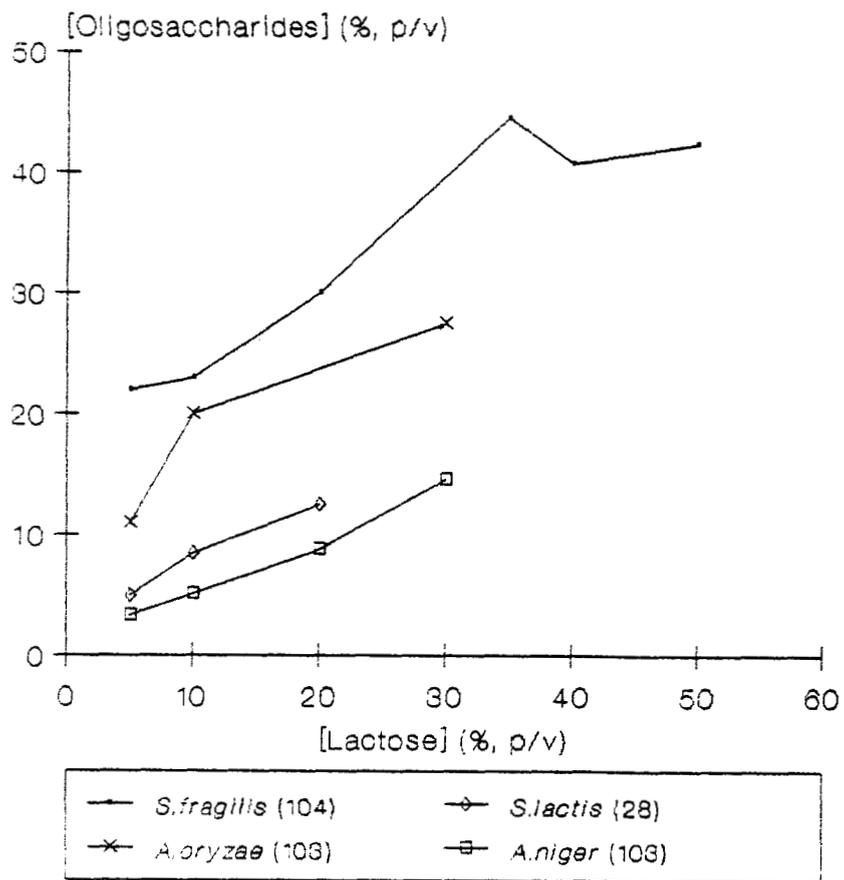


Figure 6 : Production d'oligosaccharides par différentes β -D-galactosidases en fonction de la concentration en lactose

A côté de ces valeurs élevées, WIERZBICKI et KOSIKOWSKI (122) ont obtenu une synthèse d'oligosaccharides n'excédant pas 2 % en traitant du lait écrémé (4% en lactose) avec la β -D-galactosidase d'*A.niger*.

L'utilisation d'autres donneurs tels que les nitrophényl-galactosides (moins solubles) ne permet pas toujours d'obtenir des concentrations aussi élevées et sont ainsi moins attractifs pour la synthèse de quantités importantes de galacto-oligosaccharides.

B-L'ACCEPTEUR

Pour synthétiser des oligosaccharides particuliers (N-acétyl-lactosamine, 3'N-acétyl-lactosamine...), l'adjonction d'accepteur externe est impérative. Toute molécule hydroxylée ne pourra servir d'accepteur. Il faudra qu'elle puisse réagir avec le site catalytique de l'enzyme.

On utilisera préférentiellement des accepteurs glycosylés qui vont permettre de moduler la synthèse des oligosaccharides. Il a ainsi été démontré que l'anométrie de liaisons (α ou β) de l'accepteur glycosylé avait une importance sur le greffage. Il en est de même quant à la nature de cet accepteur (tableau VI p. 31).

Dans le cas du transfert sur des alcools : méthanol, éthanol, glycérol..., l'absence de spécificité de l'enzyme vis-à-vis de ces molécules est compensée par une conformation telle qu'elles peuvent venir se localiser au niveau du site de catalyse, par simple diffusion.

Pour orienter la réaction vers le regreffage du galactose sur l'accepteur, les auteurs utilisent généralement des concentrations très élevées de ce dernier (tableau VII page 31).

Si pour certains auteurs, il est nécessaire d'utiliser des concentrations en accepteur supérieures à celle du donneur, on remarque que ceci n'est pas une règle générale puisque KUHN *et al.* (69) et HEDBYS *et al.* (49,50) démontrent qu'il est possible d'obtenir une réaction de transfert avec respectivement des concentrations équimolaires ou inférieures en accepteur par rapport au donneur.

On notera l'utilisation de concentration élevée en donneur. Dans certains cas, elle est supérieure au seuil de solubilité du lactose ou des substrats synthétiques.

C- L'ENZYME

1- ROLE QUALITATIF

Si la plupart des galactosidases regreffent majoritairement sur les hydroxyles primaires (C6 du Glc ou de Gal), la formation des liaisons de type 1-2 ; 1-3 et 1-4

**TABLEAU VI : FORMATION DE DISACCHARIDES BLOQUES PAR
UTILISATION DE β -D-GALACTOSIDASE BOVINE
NILSSON (88-90)**

<u>DONNEUR</u>	<u>ACCEPTEUR</u>	<u>PRODUIT (S) MAJEUR (S)</u>
oNP- β -Gal	α Gal-O-Me	β Gal(1-6) α Gal-O-Me
oNP- β -Gal	β Gal-O-Me	β Gal(1-3) β Gal-O-Me
pNP- β -Gal	α GalNAc-O-Et	β Gal(1-3)- α GalNAc-O-Et
pNP- β -Gal	β GlcNAc-O-EtSiMe ₃	β Gal(1-3)- β GlcNAc-O-EtSiMe ₃
pNP- β -Gal	β GlcNAc-O-Me	β Gal(1-4)- β GlcNAc-O-Me β Gal(1-3)- β GlcNAc-O-Me

**TABLEAU VII : REACTION INTERMOLECULAIRE : CONCENTRATIONS EN
DONNEUR ET EN ACCEPTEUR**

<u>DONNEUR</u>		<u>ACCEPTEUR</u>		<u>Références</u>
	<u>concentration (mM)</u>		<u>concentration (mM)</u>	
lactose	152	GlcNAc	144	ALESSANDRINI (5)
lactose	160	GlcNAc	125	ZILLIKEN (125)
phenyl- β -Gal	160	Glc	160	KUHN (69)
phenyl- β -Gal	160	GlcNAc	160	
oNP- β -Gal	41,5	Gal	350	PAZUR (97)
lactose	450	GalNAc	220	HEDBYS (49)
oNP- β -Gal	332	saccharose	585	SUYAMA (109)
lactose	730	saccharose	730	
oNP- β -Gal	250	β -Gal-O-Me	500	NILSSON (88)
oNP- β -Gal	250	α -Gal-O-Me	500	
lactose	585	GlcNAc	226	HEDBYS (50)

peut néanmoins se réaliser. La source enzymatique joue un rôle prépondérant dans la spécificité de la réaction de synthèse. Ainsi lors d'une incubation de donneur galactosylé et de N-acétyl glucosamine, la β -D-galactosidase d'*E.coli*, de glande mammaire de Rat et de *L.bifidus* favorisent respectivement la formation de liaison Gal-GlcNAc en $\beta(1-6)$, $\beta(1-3)$ et $\beta(1-4)$ (69,5,125) (tableau IV p. 20).

TOBA *et al.*(116) ont caractérisé et classé différentes souches bactériennes selon la spécificité de greffage et le nombre de produits synthétisés par leur β -D-galactosidases à partir de lactose (Tableau V p.22). Ainsi toutes les enzymes caractérisées ne possèdent pas la faculté d'allonger leurs produits de synthèse ou de former des liaisons sur des hydroxyles secondaires.

Par contre lors de réactions de réversion, AJISAKA *et al.* (3) n'ont pas pu mettre en évidence de différences marquantes entre l'action de la β -D-galactosidase d'*E.coli* et celle d'*A.oryzae*. Toutes deux catalysent la formation de produits avec des rendements et des rapports (liaisons 1-6/ liaisons 1-4) identiques.

2- ROLE QUANTITATIF

L'influence de la concentration en enzyme sur la réaction de transgalactosylation est difficile à mettre en évidence car les conditions opératoires sont très différentes et dépendent de l'origine de l'enzyme et des auteurs. Nous avons tenté de donner un aperçu de la réactivité de différentes enzymes lors de réactions de synthèse (tableau VIII page 33).

- La β -D-galactosidase d'*A.niger* est la moins active des enzymes répertoriées (122). PRENOSIL *et al.*(103) ont comparé dans les mêmes conditions réactionnelles, l'action des β -D-galactosidases d'*A.oryzae*, de *K.lactis*, d'*A.niger* et de *K.fragilis* sur le lactose pour mettre en évidence que la production d'oligosaccharides pouvait varier du simple au double selon l'origine de l'enzyme.

- Les β -D-galactosidases de *S.lactis* et d' *E.coli* sont parmi les plus actives avec respectivement, des concentrations en produits formés de l'ordre de 45 et 32 %.

L'origine des systèmes enzymatiques est prépondérante vis-à-vis des réactions de transfert tant au niveau de la spécificité de synthèse que d'un point de vue quantitatif.

3-ENZYME LIBRE OU IMMOBILISEE ?

L'immobilisation de divers systèmes enzymatiques permet :

- une réutilisation de l'enzyme lors de productions successives
- une amélioration de la stabilité du système enzymatique
- la mise au point de processus de synthèse en continu.

Cependant, une immobilisation de système enzymatique peut néanmoins modifier la

**TABLEAU VIII : RENDEMENT DES REACTIONS DE
TRANSGALACTOSYLATION EN PRESENCE DE LACTOSE**

<u>Enzyme</u>	<u>[lactose] (%)</u>	<u>[produit] (%)</u>	<u>Référence</u>
<i>S.fragilis</i>	5	22	(104)
<i>A.niger</i>	4	1 à 2	(122)
<i>A.niger</i>	5	3,3	(103)
<i>B.circulans</i>	4,7	15	(86)

<i>S.fragilis</i>	10	23	(104)
<i>S.thermophilus</i>	10	25	(46)
<i>A.niger</i>	10	5,1	(103)

<i>E.coli</i>	17,1	32	(59)
<i>S.fragilis</i>	20	30	(104)
<i>S.lactis</i>	20	13	(28)
<i>A.niger</i>	20	8,8	(103)

<i>A.niger</i>	30	14,6	(103)
<i>S.fragilis</i>	35	44,6	(104)

réactivité d'une enzyme.

a- Modifications qualitatives

Pour les réactions de transfert de résidu galactosyl, AJISAKA (4) montre que l'enzyme immobilisée en présence de galactose en tant que donneur et de saccharose comme accepteur, n'entraîne plus de greffage du galactose sur l'hydroxyle primaire du C1 de la molécule de fructose, mais que le transfert est effectué sur l'hydroxyle primaire du C6 du glucose (tableau IX page 35).

b- Modifications quantitatives

MOZAFFAR *et al.* (83) ont démontré, lors de l'immobilisation d'une β -D-galactosidase de *B.circulans*, l'influence du pontage sur la réaction de transgalactosylation. En effet, le maximum de production des oligosaccharides peut passer de 12 à 40 % lors d'une immobilisation par le glutaraldéhyde. NAKANISHI *et al.* (86) ont observé les mêmes résultats lors d'une immobilisation de cette enzyme sur Duolite ES 762.

PRENOSIL *et al.* (103) ont mis en évidence le phénomène inverse : l'immobilisation du système enzymatique (β -D-galactosidase d'*A. niger*) aurait tendance à diminuer les rendements de la réaction de transgalactosylation. Cette modification de réactivité serait due aux diminution des vitesses de diffusion au sein de la matrice plutôt qu'à une modification de la structure de l'enzyme.

L'intérêt de l'immobilisation des enzymes se fait surtout sentir dans le cas des réactions de réversion où le taux de conversion des monosaccharides est faible. L'utilisation de tel réacteur permet d'augmenter les quantités d'enzymes mises en oeuvre et de recycler les produits de la réaction en vue d'une élongation éventuelle.

D- LES CONDITIONS OPERATOIRES

La détermination des conditions optimales de transfert n'a pas fait l'objet d'études particulières, la plupart des auteurs se contente d'utiliser les conditions d'hydrolyse pour effectuer les réactions de synthèse. Bien que PRENOSIL *et al.* (103) aient montré que la formation d'oligosaccharides était peu influencée par la température, le pH et la force ionique, d'autres auteurs ont émis un avis contraire.

1- LE pH

HUBER *et al.* (59) ont démontré que le pH jouait un rôle important dans la réaction de transfert catalysée par la β -D-galactosidase d'*E.coli*. Pour des valeurs de pH supérieures à 7,8, le rapport des activités (activité transgalactosylasique / activité hydrolytique) augmente, tandis qu'il diminue pour des valeurs de pH inférieures à 6,0.

TABEAU IX : INFLUENCE DE L'IMMOBILISATION DE LA β -D-GALACTOSIDASE D'*E.coli* ET DE LA CAPTATION DES PRODUITS DE TRANSFERT LORS DE LA REACTION DE REVERSION EN PRESENCE DE GALACTOSE AJISAKA *et al.*, (3,4)

Accepteur	Enzyme*	Rendement (%)	Répartition des différents types de liaison (%)					
			(1-1)	(1-2)	(1-3)	(1-4)	(1-5)	(1-6)
Glc	libre	2,9		13	6	27		54
	immobilisée	6,0		9	9	28		54
GlcNAc	libre	7,6				20		80
	immobilisée	16				20		80
Fru	libre	55	61			19	12	8
	immobilisée	13,3	51			24	10	15
Sac	libre C6(Glc)*	ND	C1(Fru)*					
	immobilisée C6(Glc)*	ND						

Enzyme libre : réaction batch

Enzyme immobilisée : colonnes couplées d'enzyme immobilisée et de charbon activé

ND= non déterminé

C1(Fru)* = Trisaccharide β Gal(1-1)Fru β (2-1) α Glc

C6(Glc)* = Trisaccharide β Gal(1-6)Glc α (1-2) β Fru

2-LA TEMPERATURE

L'influence de la température a été peu étudiée. Pour certains auteurs la réaction de transfert peut s'effectuer à des températures plus élevées du fait de l'effet protecteur du substrat à haute concentration (1). D'autres auteurs préconisent plutôt de travailler à des températures plus basses pour favoriser le transfert.

3-LES IONS

HUBER *et al.*, (59) ont mis en évidence que les cations augmentaient la réaction de transfert, cette action est d'autant plus marquée que le milieu renferme du magnésium. Les cations monovalents (Na^+ , K^+) n'ont aucun effet sur la réaction de transgalactosylation alors que l'activité hydrolytique est sensible à l'action de ces cations (114).

4-L'EQUILIBRE REACTIONNEL

Les modifications de l'équilibre réactionnel sont surtout utilisées pour les réactions de réversion dont les rendements sont inférieurs à ceux de la réaction de transglycosylation. Le retrait des produits de la réaction du milieu réactionnel permet de déplacer l'équilibre vers la formation des oligosaccharides.

La technique la plus utilisée consiste à piéger les oligosaccharides formés par un adsorbant tel que le charbon activé. Il est nécessaire dans ce cas d'utiliser des colonnes d'enzyme immobilisée. Ce couplage en série de deux réacteurs a été mis à profit par AJISAKA *et al.*, (2-4) lors de la production d'oligosaccharides à partir de solutions de galactose et de divers accepteurs. Les résultats qu'ils ont obtenus sont rassemblés dans le tableau IX page 35. Les conclusions qu'on peut tirer concernant l'utilisation d'un système enzymatique immobilisé couplé à une colonne d'adsorbant sont :

- faible influence sur la spécificité de la réaction de synthèse (elle entraîne toujours un greffage privilégié sur les hydroxyles primaires).
- les rendements sont supérieurs à ceux obtenus dans un système batch (hormis lors de l'utilisation d'une solution de fructose accepteur).

Il faut remarquer que ces auteurs ont toujours travaillé avec des solutions d'accepteur 3 à 5 fois plus concentrées que la solution de galactose (10 %) (p/v).

Nous avons vu que les résultats de la réaction de transgalactosylation étaient très différents selon les auteurs quant à l'influence des paramètres de la réaction (substrat accepteur, conditions expérimentales...).

Dans les réactions de transgalactosylation ou de réversion, deux choses sont importantes : le rendement et la spécificité de la réaction.

S'il est possible, comme nous l'avons décrit, de modifier les rendements

réactionnels, il est beaucoup plus difficile d'obtenir une espèce unique d'oligosaccharide en fin de réaction.

A ce propos une technique a été mise au point par HEDBYS *et al.*(49,50) pour changer les proportions relatives des oligosaccharides néoformés en utilisant la spécificité d'hydrolyse des différentes β -D-galactosidases. Les résultats qu'ils ont obtenus sont rassemblés dans le tableau X page 38.

Dans un premier temps, la réaction de transgalactosylation est effectuée en présence de lactose, d'un accepteur et de la β -D-galactosidase d'origine bovine.

Dans un deuxième temps, l'élimination des structures non désirées synthétisées lors de la première étape est assurée par la β -D-galactosidase d' *E.coli* . L'hydrolyse s'effectue avec des quantités d'enzyme beaucoup plus importantes (500 à 800 fois plus élevées).

Ces auteurs sont ainsi parvenus à n'obtenir que des galacto-oligosaccharides de type β (1-3). En effet la β -D-galactosidase d'*E.coli* hydrolyse préférentiellement les liaisons β (1-6) puis les liaisons β (1-4) et enfin les liaisons β (1-3).

Il est donc possible, maintenant d'envisager une synthèse spécifique de structure oligosaccharidiques, en particulier celle possédant des activités biologiques.

IV- ROLES BIOLOGIQUES DES PRODUITS DE β -TRANSGALACTOSYLATION

Lors des réactions de transgalactosylation, le greffage s'effectue majoritairement sur l'hydroxyle primaire de l'accepteur (C6 pour la plupart des monosaccharides), la formation de liaisons galactosidiques avec les hydroxyles secondaires est faible voire artéfactuelle (117) (tableaux IV et V pages 20 et 22). Néanmoins certaines de ces structures se sont révélées porteuses d'activités biologiques.

A notre connaissance, il y a peu d'activités biologiques portées par les galacto-oligosaccharides synthétisés à partir de lactose seul, la plupart des produits de transfert actifs ont été synthétisés par adjonction d'accepteurs externes.

1-INDUCTEUR DE L'OPÉRON LACTOSE

Le premier oligosaccharide porteur d'une activité biologique provient cependant de l'incubation de lactose seul en présence de la β -D-galactosidase d'*E.coli*.

L'utilisation de souches mutées d'*E.coli* déficientes en β -D- galactosidase, incapables de transformer le lactose et de la souche sauvage a montré que l'inducteur naturel de l'opéron lactose d'*E.coli* n'est pas le lactose lui-même mais un de ses produits métaboliques résultant de l'action de la β -D-galactosidase (27).

TABLEAU X : SYNTHÈSE DE GALACTO-OLIGOSACCHARIDES PAR UTILISATION SUCCESSIVE DE β -D-GALACTOSIDASES DE TESTICULE BOVIN ET D'*E.coli* A PARTIR DE LACTOSE (HEDBYS *et al.*) (49,50)

ACCEPTTEUR	produits de synthèse par Gal ^{ase} test. bov.	produit après hydrolyse par Gal ^{ase} <i>E.coli</i>	Rend ^{t*}
GlcNAc	β Gal(1-3)GalNAc β Gal(1-6)GalNAc +Gal-Glc, Gal-Gal, Gal-Lac	β Gal(1-3)GalNAc	21 %

GlcNAc	β Gal(1-3)GlcNAc β Gal(1-4)GlcNAc β Gal(1-6)GlcNAc	β Gal(1-3)GlcNAc	12 %

GlcNAc -SEt	β Gal(1-3)GlcNAc β -SEt β Gal(1-4)GlcNAc β -SEt β Gal(1-6)GlcNAc β -SEt	β Gal(1-3)GlcNAc β -SEt	17 %

Rend^{t*} = Rendement par rapport à la concentration initiale en accepteur

Gal^{ase} test. bov. = β -D-galactosidase de testicule bovin

Gal^{ase} *E.coli* = β -D-galactosidase d' *E. coli*

L'identification de la molécule responsable a été faite par MULLER-HILL *et al.* (84) et son mécanisme de synthèse démontré par JOBE et BOURGEOIS (63). Il s'agit de l'allolactose : $\beta\text{Gal}(1\rightarrow6)\text{Glc}$ obtenu par réaction de transgalactosylation intramoléculaire et représentant près de 50 % du lactose transformé.

2- FACTEURS BIFIDIGENES

Les facteurs bifidigènes sont des facteurs de croissance nécessaires au développement des Bifidobacteries. Ces composés de nature très différente se rencontrent particulièrement dans la fraction oligosaccharidiques du lait de femme.

Plusieurs oligosaccharides synthétisés par réaction de transgalactosylation favorisent la croissance de ces bactéries "bénéfiques" du tractus intestinal du nourrisson.

a- La N-acétyllactosamine

L.bifidum synthétise deux disaccharides à partir de lactose et de N-acétyl glucosamine (cf tableau IV p.20). ZILLIKEN *et al.* (124,125) montrent qu'un seul de ces composés est porteur d'une activité bifidigène : la N-acétyllactosamine $\beta\text{Gal}(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}$. Cette molécule entre dans la catégorie des facteurs de croissance 1 de GYORGY (BF1) dont la réactivité est fonction de la présence de N-acétylglucosamine dans la structure des oligosaccharides. Le disaccharide porteur de la liaison sur l'hydroxyle primaire (C6) ne s'est pas avéré bifidigène.

b-le lactulose

Selon PETUELY (100,101), ce disaccharide est un facteur bifidigène. Le passage de solution de galactose et de fructose à des concentrations respectives de 10 et 50 % sur une colonne d'enzyme immobilisée (β -D- galactosidase d'*E.coli*) a conduit par réaction de réversion à la synthèse du lactulose $\beta\text{Gal}(1\rightarrow4)\text{Fru}$ et d'allolactulose $\beta\text{Gal}(1\rightarrow6)\text{Fru}$, ce dernier composé étant produit en quantité deux fois plus importante (2).

c- $\beta\text{Gal}(1-6)\beta\text{Gal}(1-4)\text{Glc}$

Ce trisaccharide est le deuxième produit biologiquement actif, synthétisé majoritairement par réaction de transgalactosylation à partir de lactose et en présence d'enzymes de sources diverses (9,102, 116). Il a été décrit comme pouvant promouvoir la croissance des Bifidobacteries (112).

3-ACTIVITE DE GROUPES SANGUINS

Le disaccharide $\beta\text{Gal}(1-3)\text{GlcNAc}$ dont la synthèse a été répertoriée dans le

tableau IV page 20, constituant du lacto-N-tétraose est un déterminant d'activité de groupes sanguins , (Lewis a et b).

4-DETERMINANT ANTIGENIQUE

HEDBYS *et al.* (49) (tableau X page 38) ont réussi à synthétiser spécifiquement un disaccharide : β Gal(1-3)GalNAc dont la structure est un marqueur auto-immun présent à la surface des cellules de carcinome humain. De plus cette structure est commune aux O-glycosyl-protéines et aux gangliosides.

5-SYNTHESE DE GLYCOSIDES CARDIAQUES

OOI *et al.* (91) ont décrit la production de glycosides cardiaques, en traitant un accepteur et le phényl- β -D-galactoside par la β -galactosidase d'*A.oryzae* en milieu organique .

6-RECONNAISSANCE CELLULAIRE

Les phénomènes de reconnaissance cellulaire mettent en jeu des structures protéiques affines de structures saccharidiques (105). Cette reconnaissance structurale permet l'adhérence des bactéries au niveau des muqueuses et constitue l'étape initiale à l'infection bactérienne (79).

De la même manière des structures saccharidiques présentent à la surface des cellules peuvent aussi servir de récepteur pour des toxines (41, 43, 57). Ainsi l'entérotoxine de *Clostridium difficile* serait spécifique d'une structure α et β galactosidiques (68).

La production d'oligosaccharides spécifiques peut être envisagée pour traiter les infections en inhibant l'adhésion des bactéries ou de leur toxines par un mécanisme de compétition avec les structures glycaniques des muqueuses.

Enfin il faut signaler que les galacto-oligosaccharides produits lors des réactions d'hydrolyse du lactose ne sont pas toujours désirés :

- d'une part, d'un point de vue nutritionnel ils peuvent être à l'origine d'inconvénient digestif (29)
- d'autre part, au niveau industriel, ils peuvent promouvoir une inactivation réversible des systèmes enzymatiques dans les réacteurs à enzyme immobilisée (86)

CONCLUSION

Les réactions de transglycosylation catalysées par les glycosidases sont connues depuis de nombreuses années et largement répertoriées dans la littérature.

Les premières réactions utilisaient le saccharose comme substrat. Les réactions impliquant les β -D-galactosidases dans le transfert de galactose ont été caractérisées plus récemment mais ont fait l'objet de nombreuses études. Cette revue générale a permis de tirer les points communs à la plupart des réactions de transgalactosylation.

*Toutes les β -D-galactosidases sont capables d'effectuer des réactions de transfert avec, majoritairement, un greffage sur l'hydroxyle primaire lorsque le substrat de l'enzyme est le lactose ou lors de l'incorporation d'un accepteur externe. La purification de ces produits de synthèse n'est pas facilitée car il y a formation de nombreuses autres formes moléculaires cosynthétisées.

*L'allongement des produits néoformés a été observé dans plusieurs cas. Cet allongement peut aller jusqu'à la production d'hexasaccharides (117).

*La quantité de produits néosynthétisés est dépendante de la concentration en substrat et de l'origine de l'enzyme.

* Les optimums de pH et de température des réactions de transglycosylation sont parfois différents de ceux de l'activité hydrolytique.

* La transgalactosylation intra ou intermoléculaire donne toujours des rendements réactionnels supérieurs à ceux des réactions de réversion.

* Les mécanismes de réaction ne sont pas parfaitement connus, un seul modèle a été proposé et il date de 15 ans.

* L'utilisation de stratagèmes permet d'augmenter le rendement et la spécificité de ces réactions de synthèse d'oligosaccharides

Les réactions de synthèse catalysées par les glycosidases seront dans les prochaines années une voie importante de production de structures glucidiques. L'utilisation de ces méthodologies sera d'autant plus intéressante si celles-ci sont combinées avec les méthodes chimiques classiques, ou encore avec les méthodes enzymatiques faisant appel aux glycosyl-transférases.

MATERIEL ET METHODES

I-TECHNIQUE DE CULTURE

Le microorganisme utilisé lors de ce travail est le *Bifidobacterium bifidum* var b (souche AA 2/2) selon les critères de MITSUOKA (80). Il a été isolé par C. ROMOND (UFR de Pharmacie de l'Université de Lille II) à partir de fécès d'enfants nourris au sein.

A-MILIEU DE CULTURE

Le microorganisme est cultivé sur un milieu dont la composition est la suivante :

-Oligo-éléments et vitamines	Extrait de levure	5 g/l
-Source d'azote et éléments nutritifs	Bouillon cerveau-coeur (Institut Pasteur Production)	37 g/l
-Source de carbone	Glucose	10 g/l

Le milieu est réduit par une solution de chlorhydrate de cystéine à 0,5 g/l.

B-PRODUCTION DE BIOMASSE

Les conditions de fermentation ont été optimisées par BOUTRY (22). Elles ont permis d'obtenir des quantités importantes de microorganismes.

Une première préculture de 300 ml est réalisée en flacon durant 24 heures. Après contrôle au microscope, elle est inoculée à un fermenteur de 6 litres SETRIC dont le milieu a été préalablement autoclavé. La fermentation s'effectue sous contrôle de température (37°C) et de régulation de pH à 6,0 par addition de soude et en anaérobiose (sous mélange N₂/CO₂ ; 85/15). Cette deuxième préculture est stoppée en phase de croissance (24 heures) pour ensemercer un fermenteur SETRIC de 200 litres.

La culture, arrêtée après 40 heures, soit 10 heures après la fin de la phase exponentielle de croissance, est centrifugée à 4°C à 7000 g et le culot cellulaire est congelé à - 80°C dans un tampon phosphate de sodium 20 mM pH 7, contenant du glycérol(10 %).

II-PRODUCTION ET CARACTERISATION DES PRODUITS DE TRANSFERT

A- PRODUCTION D'OLIGOSACCHARIDES A PARTIR DE LACTOSE PAR DES CELLULES INTACTES

2 ml d'une suspension cellulaire de *Bifidobacterium bifidum* (équivalent à 30,5

unités de β -D-galactosidase) sont incubés en présence de 23 ml d'une solution de lactose à 600 mM en tampon citrate-phosphate de sodium 100-200 mM pH 4,20. Le pH est ajusté à pH 4,2 par 2,5 ml d'acide citrique 100 mM, la concentration finale en lactose est de 500 mM. Après 80 heures à 40°C, la réaction est arrêtée par chauffage à 100°C durant 5 min, et le milieu réactionnel est centrifugé 1 heure à 20 000 g. Le surnageant est concentré à l'évaporateur rotatif et ensuite appliqué directement sur une double colonne (100*1,6 cm) thermostatée à 45°C de TSK HW 40 S (Fractogel, MERCK). L'élution est effectuée par de l'eau à un débit de 13,5 ml/h et les saccharides sont suivis par réfractométrie (réfractomètre R.401; WATERS ASSOCIATES).

B- VISUALISATION ET DOSAGE DES OLIGOSACCHARIDES

1- CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE ET QUANTIFICATION PAR DENSITOMETRIE

Les produits de transfert sont chromatographiés par migration sur couche mince de silice (Kieselgel 60, MERCK) dans le système de migration suivant : butanol - acide acétique - eau (2:1:1)(v/v). Deux migrations successives permettent d'améliorer la séparation des produits de réaction. La révélation des plaques se fait à 105°C pendant 10 minutes après pulvérisation par de l'orcinol à 0,2 % (p/v) dans l'acide sulfurique à 20 % (v/v).

L'intensité des taches correspondant aux oligosaccharides a pu être quantifiée par lecture des plaques au densitomètre (BIORAD modèle 620) couplé à un intégrateur (SHIMADZU modèle CR 4 A). Les résultats sont exprimés en activité relative.

2- QUANTIFICATION DES OLIGOSACCHARIDES

Les galactooligosaccharides ont été quantifiés par une méthode HPLC. Les protocoles expérimentaux sont décrits pages 47-48.

C- DETERMINATION DE LA STRUCTURE DES OLIGOSACCHARIDES

1- COMPOSITION MOLAIRE EN GLUCIDE

La composition molaire des fractions oligosaccharidiques a été déterminée par g.l.c. après méthanolyse en présence de méthanol-HCl à 80°C pendant 24 h et après N-réacétylation et pertriméthylsilylation selon le protocole décrit par KAMERLING *et al.*(65).

2-ANALYSE DES PRODUITS METHYLES

La perméthylation des oligosaccharides a été réalisée après réduction au BD_4Na selon la méthode de CIUCANU et KEREK (31).

La masse moléculaire des oligosaccharide-alditols perméthylés a été déterminée par f.a.b.-m.s. sur le spectromètre de masse Kratos MS 50 RF sous un potentiel d'accélération de 8 KeV, l'atome de bombardement étant le xénon (7,3 KV; 1,2 mA).

Après méthanolyse des oligosaccharide-alditols perméthylés, la réacétylation est effectuée avec une solution de pyridine-anhydride acétique (2:1, v/v) pendant 15 h à 20°C. Les produits sont analysés par g.l.c.-m.s. avec l'appareil de chromatographie gazeuse Girdell Model 30 équipé d'une colonne (0.3 mm x 30 m) garnie d'un support de chromatographie OV 101 avec le gradient thermique suivant : 120-180°, 2°/min ; 180-240°, 4°/min, selon la technique de FOURNET *et al.* (42). Les spectres de masse sont enregistrés avec un spectromètre de masse Riber Mag 10-10 sous un potentiel d'ionisation de 70 eV.

3-CONFIGURATION ANOMERIQUE

Les β - et α -D-galactosidases, purifiées respectivement de *Canavalia ensiformis* (Jack bean) et de grain de café (BOEHRINGER MANNHEIM) sont préalablement testées sur pNP- β -Gal ; pNP- α -Gal et mélibiose. Elles ont été utilisées pour l'hydrolyse enzymatique des liaisons galactosidiques, dans les conditions suivantes : 100 μ g d'oligosaccharide en tampon citrate phosphate de sodium 100/200 mM, pH 3,5 ou en tampon phosphate de sodium 100mM pH 6,5 sont traités par 10 mU d'enzyme. Après 15 heures, la réaction est stoppée par chauffage à 80°C et les produits d'hydrolyse sont analysés par TLC.

III-EXTRACTION DE L'ACTIVITE

TRANSGALACTOSYLASIQUE

A- EXTRACTION AUX ULTRA-SONS EN PRESENCE DE DETERGENT

Après avoir lavé les cellules par du tampon phosphate de sodium 30 mM pH 6,8 , l'extraction s'effectue sous l'action conjointe de TRITON X 100 à 0,2 % dans le tampon de lavage et des ultra-sons.

Une suspension cellulaire contenant approximativement 0,4 g de cellules lavées par ml de tampon d'extraction est mise dans un bain de glace pour que l'extraction puisse se faire à des températures inférieures à 10°C. Après mise en contact de la sonde à ultra-sons et de la suspension cellulaire, le traitement s'effectue avec les paramètres suivants :

- Type de l'appareil : BRANSON Sonifier Cell Disruptor B 30
- Amplitude : 30 microns pic à pic

-Durée du traitement : 15 minutes (fréquence de 20 secondes par minute)

Après ce premier traitement, l'extrait est centrifugé à 4°C, à 35 000 g durant 30 minutes (centrifugeuse J 2-21, rotor JA 20). Le culot est alors repris dans le tampon d'extraction, homogénéisé puis remis au contact de la sonde à ultra-sons.

Après trois traitements similaires, les surnageants sont centrifugés 2 heures à 4°C dans les mêmes conditions que précédemment de façon à obtenir une solution limpide.

B- EXTRACTION A LA PRESSE DE FRENCH

Un essai d'extraction à la presse de French a été effectué dans les conditions suivantes :

15 grammes de cellules sont repris dans du tampon phosphate de sodium 30 mM pH 6,5 (38 ml final) et placé dans la chambre de la presse de French préalablement refroidie à 4°C. Les cellules sont cassées par un double passage sous une pression de 20.000 psi. Une centrifugation à 40.000 g durant 2 heures permet la séparation de l'extrait cellulaire du culot.

IV-MESURES DES ACTIVITES ENZYMATIQUES

A-DOSAGES DES ACTIVITES β -D-GALACTOSIDASISQUES

1-SUBSTRAT DE SYNTHÈSE

a-Principe

Pour ce dosage nous utilisons comme substrat le para-Nitrophényl- β -D-galactoside (KOCH-LIGHT) qui, lorsqu'il est hydrolysé, libère le galactose et le para-nitrophénol qui se colore en jaune en milieu basique et est dosé par spectrophotométrie.

b-Mode opératoire

Il dérive de la méthode de CONCHIE (33).

100 μ l de pNP-Gal 5mM

200 μ l de tampon phosphate de sodium 100 mM pH 6,5

100 μ l de fraction enzymatique

Après une incubation de 10 minutes à 37°C, la réaction est bloquée par addition de 600 μ l de carbonate de sodium 500 mM. la lecture est effectuée à 400 nm.

Une unité galactosidasique est définie comme la quantité d'enzyme libérant une μ mole de para-nitrophénol par minute dans les conditions standard. Cette technique a

été utilisée lors des étapes de purification du système enzymatique.

2-SUBSTRAT NATUREL : LE LACTOSE

L'activité sur le lactose a été mesurée par dosage des monosaccharides libérés: le glucose et le galactose selon la technique de FINCH (40).

a-Dosage du glucose

α-Principe

Le glucose libéré par l'action de la β-D-galactosidase est dosé après action de l'hexokinase qui transforme le glucose en glucose-6-phosphate (G-6-P) et de la glucose-6-phosphodéshydrogénase (G-6-P desH₂^{ase}) qui oxyde le G-6-P en phospho-6- glucono-lactone en présence de NADP⁺. La quantité de NADPH,H⁺ formée est proportionnelle à la quantité de substrat hydrolysé et est déterminée par spectrophotométrie à 340 nm.

β-Mode opératoire

100 µl de solution enzymatique

200 µl de tampon phosphate de sodium 100 mM, pH 6,5

100 µl de lactose 500 mM dans le même tampon soit 125 mM final. Après 15 minutes à 37°C, la réaction enzymatique est arrêtée par chauffage à 100°C pendant 3 minutes.

-100 µl d'échantillon sont prélevés, auxquels on ajoute :

-900 µl d'eau

-500 µl d'une solution tampon de chlorure de triéthanolamine 950 mM contenant du NADP⁺, de l'ATP et du MgSO₄ en concentrations respectives de 3 mM ; 9,78 mM et de 4,1 mM . Le pH de cette solution est ajusté à 7,6.

-10µl d'hexokinase et de G-6-PdesH₂^{ase} (BOERHINGHER)

Après 30 minutes l'absorbance est lue à 340 nm.

Une unité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme libérant une µmole de glucose à partir de lactose par minute sous les conditions standard.

b-Dosage du galactose

α-Principe

Le galactose libéré par la galactosidase est oxydé par la galactodéshydrogénase en présence de NAD⁺, qui est réduit en NADH,H⁺. La quantité de ce dernier déterminée par spectrophotométrie est directement proportionnelle à

l'hydrolyse du lactose.

β -Mode opératoire

Le milieu d'incubation est le même que précédemment.

Le milieu de dosage du galactose est le suivant:

-150 μ l d'échantillon prélevés

-750 μ l de tampon Tris HCl 666 mM pH 8,6 ; NAD⁺ 666 μ M

-100 μ l de galactodéshydrogénase (50 mU ; BOERHINGHER)

Après 30 minutes à température ambiante, la lecture s'effectue à 340 nm.

B- DOSAGE DE L'ACTIVITE TRANSFERASIQUE

1-PRINCIPE

les produits de transfert synthétisés lors de l'incubation de l'enzyme en présence de lactose, sont séparés par une technique de chromatographie liquide haute performance sur des colonnes de type Q15 S et détectés par réfractométrie.

2-MODE OPERATOIRE

Le milieu d'incubation est le suivant :

-100 μ l de solution enzymatique

-100 μ l de lactose 500 mM soit 125 mM final, en tampon citrate- phosphate de sodium pH 4,25 (50 mM/100 mM)

-200 μ l de tampon citrate/phosphate pH 4,25 (50 mM/100 mM)

Après 4 heures d'incubation à 45°C la réaction enzymatique est arrêtée par chauffage à 100°C pendant 5 minutes puis centrifugée à 10 000 rpm (rotor J 18.1 ; centrifugeuse BECKMAN J 2/21) pendant 30 minutes. Le surnageant est dilué quatre fois avant d'être analysé en HPLC (SP 8100 SPECTRA-PHYSICS). Le volume injecté est de 10 μ l (injecteur automatique).

Les 3 colonnes (30 * 0,3 cm) Q15 S montées en série, sont maintenues à une température de 85°C dans le four de l'appareil. Les saccharides sont élués par de l'eau de qualité milli Q®, à un débit de 0,75 ml/min. Les oligosaccharides sont détectés par réfractométrie (réfractomètre SP 8430 ; SPECTRA-PHYSICS) et la quantité d'oligosaccharide est calculée à l'aide d'un intégrateur (SP 4290 ; SPECTRA-PHYSICS) par utilisation de la méthode du standard externe (lactose 20 mM).

3-EXPRESSION DES RESULTATS

a-Quantité de trisaccharides (Q)

La quantité de produits formés, basée sur la calibration externe, est ramenée en nmoles de trisaccharide après addition de l'ensemble des aires des oligosaccharides supérieurs (tri, tetra et pentasaccharides séparés).

$$Q = (A \text{ Oligo} / A \text{ Lac}) * 200 * 10^{-9} * (FD / FC) * 500 / 10$$

avec **Q** = nmoles de trisaccharide

A Oligo = aire totale des oligosaccharides

A Lac = aire témoin externe lactose équivalent à 200 nmoles

FD = facteur de dilution post incubation (= 4)

FC = facteur de corrélation entre le trisaccharide et le lactose = 1,43

500 = volume total de l'incubat (500 μ l)

10 = volume injecté (10 μ l)

b-Activité transférante (Act.Tr.)

Une unité enzymatique correspond à la quantité d'enzyme nécessaire pour synthétiser à partir de lactose 125 mM, une micromole d'équivalent trisaccharide par minute à 45°C et pH 4,25 pour le suivi de la purification, et à pH 4,80 pour la détermination des paramètres enzymatiques.

$$\text{Act.tr. (mU/ml)} = Q * FD' * 10/t$$

avec **FD'** = facteur de dilution de l'enzyme

10 = facteur pour ramener en ml d'enzyme

t = 4*60 min = 240 min

V-DOSAGES DES PROTEINES

Au cours des étapes de chromatographie, la détection des protéines est suivie par spectrophotométrie à 280 nm. Le dosage des protéines dérive de la méthode de BRADFORD (24). Nous utilisons le réactif au bleu de coomassie (BIORAD) et la sérum albumine bovine (SIGMA) comme standard.

VI-TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES

Toutes les étapes chromatographiques sont effectuées à 20°C

A-CHROMATOGRAPHIE SUR HYDROXYLAPATITE-ULTROGEL

L'extrait cellulaire obtenu après le traitement aux ultra-sons est appliqué sur une colonne (5*20 cm) d'Hydroxyapatite-Ultrogel (IBF biotechnics) équilibrée en tampon phosphate de sodium 30 mM pH 6,8. Les débits d'injection et d'élution sont de l'ordre de 350 ml/h. Après lavage, on élue par un gradient discontinu de phosphate de sodium 100 et 300 mM pH 6,8. Les fractions recueillies (18 ml) sont rassemblées puis concentrées et dialysées dans des cellules de concentration Amicon de 450 ml sur des membranes AMICON PM 10 ou 30 (seuil de coupure 10 000 ou 30 000 daltons) selon les fractions.

B-CHROMATOGRAPHIE D'ÉCHANGE D'IONS SUR Q FAST FLOW®

Une colonne (1,6*15 cm) de gel Q FAST FLOW (PHARMACIA-LKB Biotechnology) est équilibrée en tampon phosphate de sodium 10 mM pH 6,8 à un débit de 250 ml/h. Après injection des fractions dialysées et lavage par le tampon d'équilibration, l'élution est faite en tampon phosphate de sodium 10 mM pH 6,8 ; soit en gradient par palier de NaCl (0 ; 100 ; 250 ; 500 ; 1000 mM) soit en gradient continu de NaCl. Des fractions de 10 ml sont recueillies puis réunies et concentrées sur membrane AMICON.

C-CHROMATOGRAPHIE D'ÉCHANGE D'IONS SUR MONO P

Cette chromatographie est réalisée en FPLC sur une colonne (0,5*20 cm) Mono P HR 5/20 (PHARMACIA-LKB Biotechnology) équilibrée en tampon Bis-Tris/HCl 25mM pH 6,5 à un débit de 30 ml/h. Un gradient de pH est ensuite appliqué sur la colonne, par l'intermédiaire d'ampholine (Polybuffer 74®, pH 4,5).

Des fractions de 2 ml sont recueillies et celles contenant les activités enzymatiques sont rassemblées et concentrées.

D-CHROMATOGRAPHIE SUR SUPEROSE 6

Une colonne (1*30 cm) de Superose 6 HR 10/30 (PHARMACIA-LKB Biotechnology) est équilibrée en tampon phosphate de sodium 50 mM NaCl 500 mM pH 6,5 sous un débit de 24 ml/h. Les fractions injectées et recueillies sont de 0,5 ml.

VII- ELECTROPHORESES EN GEL DE POLYACRYLAMIDE

A-ELECTROPHORESE EN CONDITIONS DENATURANTES

Les électrophorèses (plaques de 10*13 cm) sont réalisées en présence de SDS

à la concentration de 0,1 % selon la méthode de WEBER et OSBORNE (121) en gradient d'acrylamide de 5 à 15 %.

Les échantillons sont traités à 100°C pendant 5 minutes, par un tampon contenant du SDS (BDH) à 2% avec ou sans β -mercaptoéthanol (SIGMA) à 4,5 % et en présence de bleu de bromophénol servant de témoin de migration. L'électrophorèse des échantillons (environ 50 μ g de protéine) est réalisée sous courant constant de 40 mA, en présence de témoins de masse moléculaire (BIORAD). Après migration, les protéines sont révélées au bleu de coomassie R 250.

B-ELECTROPHORESE EN CONDITIONS NON DENATURANTES

Ce type d'électrophorèse est effectué de la même manière que l'électrophorèse dénaturante mais en supprimant le SDS dans le gel, et le SDS et le β -mercaptoéthanol dans le tampon échantillon, les fractions enzymatiques ne sont pas traitées à 100°C.

Après l'électrophorèse, une partie du gel est révélée au bleu de coomassie, l'autre partie est découpée en fines bandelettes (5 mm de large) et broyée en tampon phosphate de sodium 100 mM pH 6,5. L'activité est révélée par le pNP- β -D-Gal.

C-TRANSFERT DES ACTIVITES ENZYMATIQUES

Le transfert se fait sur feuille de nitrocellulose selon la méthode de BURNETTE (26). Après mise en contact du gel d'électrophorèse et de la feuille de nitrocellulose, le tout est déposé dans une cuve de transfert contenant du tampon Tris/HCl 25 mM pH 8,4. Le transfert s'effectue sous courant continu (15 mA et 40 volts) durant 16 heures à 4°C.

Les protéines sont révélées par l'Amido schwartz.

Les activités sont révélées en déposant la feuille de nitrocellulose sur un gel d'agarose à 1,5 % dans lequel se trouve du methylombelliféryl- β -D-galactoside à une concentration finale de 100 μ M dans le tampon phosphate de sodium 100 mM pH 6,5. Après une heure de contact à 37°C, la réaction est arrêtée en plaçant le tout dans une chambre saturée en ammoniacque et la présence des activités est révélée sous une lampe à 354 nm.

VIII- ETUDES IMMUNOLOGIQUES

Des immunséra pluri- et monospécifique ont été préparés à partir de solutions enzymatiques brute (extrait cellulaire) et purifiée selon la méthode de VAITUKAITIS

(118) pour la première injection. Les rappels ont été faits par injection sous-scapulaire.

A-METHODE D'OUCHTERLONY

La double immunodiffusion est réalisée dans un gel d'agarose (Indubiose IBF Biotechnics) à 1,1 % (p/v) en tampon véronal sodé 65 mM pH 8,2.

Des dépôts de 10 μ l d'antigènes ou d'anticorps dilués sont effectués. Après 24 heures de diffusion en chambre humide, le gel est lavé dans du sérum physiologique pendant 24 heures, séché à l'étuve et relavé à l'eau courante. Les arcs de précipitation sont colorés à l'amidoschwartz, puis le gel est décoloré dans une solution de méthanol/acide acétique (3 : 1) (v/v).

B-IMMUNOELECTROPHORESE

Après séparation des protéines des solutions enzymatiques par électrophorèse dans un gel d'agarose, on fait diffuser un immunosérum pluri-spécifique des constituants du mélange.

La gélose (Indubiose à 0,9 % p/v en tampon véronal sodé pH 8,2) est coulée sur plaque de verre. Les puits destinés à recevoir l'antigène (10 - 20 μ l) sont découpés.

Après avoir placé la plaque préparée entre les ponts de papier Whatman, avec de part et d'autre du tampon véronal sodé pH 8,2, la migration électrophorétique se déroule sous une différence de potentiel de 20 volts (4 volts par cm) durant deux heures.

Une gouttière centrale est réalisée, dans laquelle le sérum plurispécifique est déposé (75 μ l). 24 heures de diffusion suffisent pour obtenir les arcs de précipitation. Les étapes de lavage et coloration sont les mêmes que précédemment citées.

C-INHIBITION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE PAR UN IMMUNSERUM MONOSPECIFIQUE

Plusieurs fractions enzymatiques à 50 mU/ml sont incubées 30 min. en présence de différentes dilutions d'immunosérum monospécifique "anti-transgalactosylase".

Le mode opératoire est le suivant :

50 μ l de β -D-galactosidase

50 μ l de sérum dilué (facteur de dilution de 2 à 508)

Après 30 min., on ajoute :

200µl de tampon phosphate de sodium 100 mM pH 6,5

100 µl de pNP-β-Gal 5 mM

Arrêt de la réaction après 10 min par 600 µl de Na₂CO₃ 500mM, et lecture de l'absorbance à 400 nm.

IX- ETUDE DES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

A-DETERMINATION DES MASSES MOLECULAIRES

La masse moléculaire de la transgalactosylase a été déterminée par chromatographie de tamisage moléculaire sur une colonne (1,6 * 90 cm) de TSK HW 55 S, équilibrée en tampon phosphate de sodium 50 mM NaCl 0,5 M pH 6,5, sous un débit de 21,3 ml/h . La zone de linéarité de la colonne est comprise entre 1 et 700 KDa et les protéines suivantes ont permis sa calibration : thyroglobuline (669 000) ; ferritine (440 000) ; catalase (232 000) ; sérum albumine bovine dimérique (134 000) et monomérique (67 000) et son volume d'exclusion déterminé par injection de Bleu Dextran (confirmé par le calcul théorique du volume mort).

Les fractions injectées sont de 500 µl, les protéines sont suivies par l'absorbance à 280 nm, les fractions recueillies sont de 1 ml et les activités enzymatiques sont mesurées sur chacune d'entre elles.

Une deuxième technique de chromatographie sur gel a été utilisée : une colonne (1*30 cm) de superose 6 HR 10/30 (PHARMACIA-LKB Biotechnology) avec le système FPLC. La colonne est équilibrée dans un tampon phosphate de sodium 50 mM, NaCl 0,5 M, pH 6,5 à un débit de 24 ml/h. Les fractions injectées et recueillies sont respectivement de 200 et de 500 µl. Les mêmes témoins de masses moléculaires sont employés pour la calibration de la colonne.

B-DETERMINATION DU POINT ISOELECTRIQUE

Le point isoélectrique de la fraction transglycosylante a été déterminé en FPLC sur une colonne (0,5*20 cm) Mono P HR 5/20 (PHARMACIA-LKB Biotechnology) équilibrée en tampon Bis-Tris/ HCl 25mM pH 6,3 à un débit de 30 ml/h. L'élution est effectuée par passage de POLYBUFFER 74 (PHARMACIA-LKB Biotechnology) dilué au dixième et ajusté à pH 4,5 par addition d'HCl 1 M. Lors de l'élution, les protéines sont suivies à 280 nm, les fractions recueillies de 1 ml permettent de vérifier le pH d'élution et l'activité enzymatique.

C-DETERMINATION DE LA STABILITE A LA TEMPERATURE

1-PRINCIPE

On effectue une cinétique avec l'enzyme purifiée en présence ou non de lactose ou de calcium et à des températures différentes. L'activité hydrolytique est ensuite mesurée dans les conditions standard.

2-MODE OPERATOIRE

Trois milieux de préincubation sont utilisés. Ils renferment :

-100 μ l d'enzyme (équivalent à 82 mU d'activité galactosidasique)

et :

- 400 μ l de tampon phosphate sodique 100 mM pH 6,5 (milieu A)

ou - 400 μ l de tampon phosphate sodique 100 mM pH 6,5 ; calcium 2,5 mM (milieu B)

ou - 400 μ l de tampon phosphate sodique 100 mM pH 6,5 ; lactose 250 mM (milieu C)

Les températures varient de 18°C à 55°C. et les temps de pré- incubation sont de 0, 30, 60, 120 ,180, et 240 minutes .

Les activités hydrolytiques sont mesurées après dilution, dans les conditions standard décrites page 45.

D-STABILITE AU PH**1-PRINCIPE**

De la même manière, on a effectué une préincubation du système enzymatique purifié dans différentes solutions tampon, à des temps donné , avec et sans calcium ou lactose.

2-SOLUTION MERE DE TAMPON CITRATE/PHOSPHATE/BORATE

-Acide citrique cristallisé (1 H ₂ O)	34,67 g
-Acide orthoborique	10,20 g
-Acide phosphorique	11,66 ml
-Soude 5 M	343 ml
-H ₂ O	qsp 1 litre

La solution est à une concentration de 165 mM.

3-TAMPON CITRATE PHOSPHATE BORATE 100 mM

A 20 ml d'eau milli Q[®], on ajoute 60 ml de solution mère et le pH désiré est ajusté par addition d'HCl 12 M. La solution est ensuite amenée à 100 ml.

4-MILIEUX DE PREINCUBATION

- 20 µl de solution enzymatique soit 90 mU de β-D-galactosidase
- 220 µl des différentes solutions tampons couvrant la zone de pH 4 à pH 10
- 10 µl d'eau ou de calcium 10 mM ou de lactose 600 mM

Après une préincubation de 4 heures à 37 °C, les activités hydrolytiques sont détectées (après dilution) dans les conditions standard.

E- STABILITE A LA CONGELATION

Des solutions d'enzyme purifiée ou d'extrait cellulaire total ont été soumis à plusieurs cycles de congélation à -20°C en présence ou non de glycérol comme agent stabilisant.

Les activités hydrolytiques résultantes ont été mesurées dans les conditions standard.

X- ETUDE DES PROPRIETES ENZYMATIQUES**A- DETERMINATION DES PH OPTIMAUX**

Le pH optimal a été déterminé pour l'activité hydrolytique selon le protocole décrit page 51 en utilisant le système citrate/ phosphate/borate de sodium couvrant une zone de pH de 3,5 à 10.

Pour l'activité transgalactosylasique, le milieu d'incubation est le suivant :

- 50 µl de solution enzymatique équivalent à 32 mU de galactosidase
- 250 µl des solutions tampon aux différents pH
- 200 µl de lactose 600 mM

Le pH des solutions incubées est vérifié après adjonction du substrat et de l'enzyme. Après 20 heures à 45°C, la réaction est arrêtée par chauffage à 100°C (5 min.).

La visualisation des saccharides après TLC permet de mesurer, par lecture au densitomètre BIORAD modèle 620 couplé à l'intégrateur CR 4 A (SHIMADZU), l'intensité des taches révélées. Les résultats sont exprimés en activité relative par rapport au maximum de production.

B-DETERMINATION DES TEMPERATURES OPTIMALES D'ACTION

Les activités hydrolytiques sont mesurées dans les conditions standard décrites à la page 45.

Les conditions d'incubation pour les activités transgalactosylasiques sont les suivantes:

-100 µl d'enzyme (65 mU)

-200 µl de tampon citrate-phosphate 100-200mM pH 4,80

-200 µl de lactose 600 mM

Après 20 heures d'incubation, les incubats sont déposés sur couche mince et les produits de réaction sont visualisés de la même manière que précédemment.

Dans les deux cas, les incubations sont réalisées à des températures variant de 4°C à 60°C.

C-DETERMINATION DES K_m ET V_{max}

Les paramètres apparents K_m et V_{max} sont déterminés selon la méthode de LINEWEAVER et BURK (73) [$1/V = f(1/S)$] pour l'activité transgalactosylasique et par la méthode de HANES (47) [$S/V = f(S)$] pour l'activité hydrolytique.

1-ACTIVITES β -D-GALACTOSIDASIQUES

Pour les activités galactosidasiques, ces paramètres ont été déterminés sur trois substrats différents :

a-Détermination à l'aide de pNP- β -D-Gal

L'activité sur le substrat synthétique a été déterminée après 10 minutes de réaction dans les conditions optimales d'hydrolyse, avec des concentrations en substrat allant de 0,5 à 10 mM.

b-Détermination à l'aide de lactose

L'activité sur le lactose a été mesurée par dosage du galactose libéré ou du glucose libéré (protocoles page 46) dans les conditions optimales d'hydrolyse ou de transfert. Les concentrations utilisées en substrat varient de 5 à 300 mM.

c-Détermination sur le trisaccharide : Gal(β 1-3)Gal(β 1-4)Glc

Nous avons déterminé les activités relatives de deux fractions galactosidasiques distinctes de *Bifidobacterium bifidum* sur le produit majeur de transfert. Nous nous sommes placés dans les conditions optimales d'hydrolyse suivantes : tampon phosphate 100 mM pH 6,5 à 37°C pendant 20 minutes pour comparer avec l'activité sur le lactose et nous avons utilisé des concentrations en trisaccharide variant de 10 à 100 mM. L'activité a été mesurée en fonction du galactose libéré.

2-ACTIVITE TRANSGALACTOSYLASIQUE

Cette détermination a été menée dans les conditions optimales de transfert en

tampon citrate-phosphate de sodium pH 4,8 et à 45°C, durant 4 heures d'incubation. La quantité de produits synthétisés a été déterminée par HPLC selon le protocole décrit pages 47-48. Les concentrations finales en lactose variant de 50 à 400 mM.

D- ETUDE DE LA SPECIFICITE D'HYDROLYSE

La spécificité d'hydrolyse de deux fractions enzymatiques de même activité sur pNP- β -D-Gal (350 mU/ml) a été déterminée sur trois disaccharides différents (lactose, allolactose et β Gal(1-3)Glc) à une concentration de 10 mM en tampon phosphate de sodium 100 mM pH 6,5. Après 15 min à 37°C, la réaction est arrêtée par chauffage à 100°C et la détermination des activités est effectuée par dosage du galactose libéré.

XI- ACTION D'EFFECTEURS SUR LES ACTIVITES ENZYMATIQUES

A-ACTIVITE HYDROLYTIQUE SUR pNP- β -Gal

Les différents cations MnCl₂ ; CoCl₂ ; CaCl₂ ; MgCl₂ ; ZnCl₂ ; SnCl₂ et HgCl₂ sont incorporés dans le tampon d'hydrolyse de manière à obtenir des milieux réactionnels ayant une concentration finale en cation de 2,5 mM. De la même manière de l'EDTA (5mM final) a été ajouté au tampon. Après une préincubation de 10 minutes de la solution enzymatique en présence des effecteurs à 37°C, l'activité enzymatique est déterminée après centrifugation des milieux réactionnels selon la méthode décrite page 45.

B-ACTION DES EFFECTEURS EN PRESENCE DE LACTOSE

Les effecteurs sont identiques et le milieu réactionnel est le suivant:

- 100 μ l de solution enzymatique purifiée équivalent à 55 mU
- 125 μ l de tampon citrate-phosphate de sodium 50-100 mM pH 4,8
- 250 μ l de lactose 500 mM dans le même tampon
- 25 μ l des solutions de cations 50 mM ou d'EDTA 100mM

Après 20 heures d'incubation à 45°C, la réaction est stoppée et le milieu réactionnel est dilué au dixième avant d'être déposé sur couche mince. Après migration et révélation des sucres, l'intensité des taches est lue au densitomètre et permet d'exprimer des activités relatives en fonction des monosaccharides libérés et des trisaccharides synthétisés.

L'influence du calcium et de l'EDTA sur le lactose ou sur le pNP- β -D-Gal a été plus particulièrement étudié et les paramètres cinétiques ont pu être définis par la méthode des doubles inverses décrite dans le chapitre précédent.

XII- CINETIQUE DE LA REACTION DE TRANSGALACTOSYLATION

Les cinétiques de transfert sont effectuées en présence de culot membranaire à 45°C, à différentes concentrations en lactose (400 ; 250 ; 100 mM), avec ou sans calcium et en tampon citrate-phosphate de sodium 100-200 mM, pH 4,25 pour un volume final de 10 ml. Des prélèvements de 400 μ l sont faits pour des temps variant de 30 min à 48 h. Les réactions enzymatiques sont arrêtées par chauffage. Après centrifugation et dilution (de manière à obtenir une concentration équivalente à 25 mM en lactose), les sucres synthétisés sont analysés par HPLC dans les conditions décrites page 48

XIII- ETUDE DES SPECIFICITES DE LA TRANSGALACTOSYLASE

A- SPECIFICITE DU DONNEUR

Différents β -D-galactosides naturels ou de synthèse ont été essayés, soit avec l'enzyme purifiée à pH 4,8 soit avec un extrait total à pH 4,25. Les conditions opératoires sont les suivantes:

-25 μ l de solution enzymatique (50 mU et 200 mU respectivement pour l'enzyme purifiée et pour l'extrait total)

-125 μ l de tampon citrate-phosphate de sodium 100-200 mM

-100 μ l de donneur naturel 0,5 M soit 200 mM final ou

-100 μ l de donneur synthétique 50 mM soit 20 mM final

Après une incubation de 5 heures à 45°C, la réaction est arrêtée par chauffage et 2 μ l du milieu préalablement dilué au dixième sont déposés sur couche mince de silice. Les systèmes de migration et de révélation sont identiques à ceux décrits page 43.

B-SPECIFICITE D'ACCEPTEUR

1-GLUCIDES ET ACIDES AMINES

Différents accepteurs hydroxylés, de nature glycosidique ou non ont été essayés en présence de deux donneurs différents : le lactose et le pNP- β -Gal et du

système enzymatique purifié ou non.

Les milieux réactionnels sont les suivants :

-25 µl de solution enzymatique (200 et 50 mU respectivement pour les membranes et la fraction purifiée)

-25 µl de lactose 500 mM ou pNP-β-Gal 50 mM

-50 µl d'accepteur 1,5 M (sauf thréonine et GalNH₂ : 0,75 M et pNP-α-Glc et pNP-α-Man : 50 mM)

-25 µl de tampon citrate-phosphate de sodium 150-300 mM (pH 4,25 pour les membranes ou pH 4,8 pour la fraction purifiée)

Après 1 heure à 45°C pour les milieux réactionnels comportant le donneur synthétique et 4 heures pour les autres, les incubats sont portés 5 minutes à 80°C, et dilués au trentième avant d'être déposés (5 µl) sur couche mince de silice. Les conditions de migration et de révélation sont celles décrites page 43.

2- LES ALCOOLS

Les hydroxyles primaires , secondaires et tertiaires de divers alcools (méthanol, éthanol, propanol, isopropanol, butanol, alcool isoamylique et glycérol) ont été testés pour vérifier l'importance de la position de l'hydroxyle sur la molécule acceptrice.

Les milieux réactionnels sont les suivants :

-20 µl de solution enzymatique purifiée (50 mU)

-80 µl de tampon citrate-phosphate de sodium 100-200 mM pH 4,8

-50 µl de lactose 500 mM

-0 à 50 µl de d'alcool

-H₂O qsp 200 µl

Après 5 heures à 45°C, les réactions sont arrêtées et les milieux d'incubation sont dilués au cinquième avant dépôt (5µl) sur couche mince de silice. Les systèmes de migration et de révélation restent identiques à ceux décrits page 43.

XIV- DIMINUTION DE LA TENEUR EN EAU

A-ADJONCTION DE SELS

Deux sels, en l'occurrence le NaCl et le (NH₄)₂ SO₄ 3 M ont été ajoutés au milieu réactionnel dans les conditions suivantes :

-20 µl de solution enzymatique purifiée (50 mU)

-80 µl de tampon citrate-phosphate de sodium 150-300 mM pH 4,8

-50 µl de lactose 500 mM

-0 à 50 μ l des différentes solutions salines 3 M

-H₂O qsp 200 μ l

Après 5 heures à 45°C, la réaction est stoppée par chauffage à 100°C et les milieux réactionnels sont dilués au dixième avant d'être déposés (2 μ l) sur couche mince de silice.

B-INCUBATION EN PRESENCE DE SOLVANTS

Outre les alcools mentionnés dans le paragraphe précédent, des solvants non hydroxylés tels que l'acétonitrile, la formamide, la diméthylformamide, le diméthylsulfoxyde ont été testés dans les conditions suivantes :

-20 μ l de solution enzymatique purifiée (50 mU)

-80 μ l de tampon citrate-phosphate de sodium 150-300 mM pH 4,8

-50 μ l de lactose 500 mM

-0 à 50 μ l de solvant soit 0 à 25 % (v/v)

-H₂O qsp 200 μ l

Après 4 heures à 45°C, la réaction est stoppée par chauffage à 100°C et les milieux réactionnels dilués au dixième avant d'être déposés (2 μ l) sur couche mince de silice.

XV- DETECTION D'UNE ACTIVITE LECTINIQUE PORTEE PAR

Bifidobacterium bifidum

La présence de lectines chez *Bifidobacterium bifidum* souche AA 2/2 a été caractérisée en collaboration avec H.DEBRAY (Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université de LILLE I).

Le pouvoir agglutinant des cellules de *Bifidobacterium bifidum* souche AA 2/2 vis-à-vis des érythrocytes de lapin traités ou non à la neuraminidase a été mis en évidence selon le protocole suivant :

1- DETECTION DU SEUIL D'HEMAGGLUTINATION

50 μ l d'une suspension cellulaire de *Bifidobacterium bifidum* (12 mg/ml) sont dilués par entraînement au 1/2 dans du tampon phosphate de sodium 10 mM pH 7,2 ; NaCl 150mM sur une plaque de microtitration.

50 μ l d'une solution d'érythrocytes (traités ou non à la neuraminidase) sont ajoutés.

Les lectures de plaques sont faites après 2 heures d'incubation à température

ambiante.

2- INHIBITION DE L'HEMAGGLUTINATION

Les solutions d'inhibiteurs d'hémagglutination (saccharide : 0,2 M ; glycoprotéines : 10 mg/ml) sont dilués au 1/2 par entraînement dans le tampon précédemment cité.

50 μ l d'une suspension cellulaire de *Bifidobacterium bifidum* à deux dilutions au dessous du seuil d'agglutination déterminé précédemment sont répartis dans les puits des plaques de microtitration.

Après 1 heure d'incubation, 50 μ l d'érythrocytes de lapin sont ajoutés.

La lecture des plaques est effectuée après 2 heures d'incubation à 20°C.

RESULTS

I-PRODUCTION DES OLIGOSACCHARIDES

A-OPTIMISATION DE LA PRODUCTION DES OLIGOSACCHARIDES

Lors de l'incubation de cellules de *Bifidobacterium bifidum* en présence de lactose, parallèlement aux monosaccharides résultant de l'hydrolyse, il apparaît des oligosaccharides.

Ils ont été mis en évidence dans un premier temps par l'observation du déficit en galactose libéré par rapport au glucose. Dans un second temps, cette synthèse a été confirmée par la visualisation en TLC des produits de réaction.

Afin d'étudier les oligosaccharides néosynthétisés, résultant de l'action du microorganisme sur le lactose, trois paramètres principaux (le pH, la température et la concentration en substrat) ont été déterminés pour en optimiser la production.

1- LE pH

L'incubation de cellules en présence de lactose et à différents pH a été menée sous les conditions décrites page 61. La visualisation des produits de synthèse après TLC et la quantification des oligosaccharides par densitométrie ont donné les résultats illustrés par la figure 7 page 63.

Le profil des activités de synthèse et d'hydrolyse en fonction du pH montre un déplacement entre le pH optimal de transfert (pH 4,4) et le pH optimal de libération des monosaccharides (pH 6,5). Ce paramètre s'est avéré essentiel pour la formation et l'élongation des produits de synthèse.

Pour éviter tout risque de contamination par une activité galactosidasique différente, capable d'effectuer des réactions de synthèse contaminantes ou d'hydrolyser les produits synthétisés, le choix de travailler à un pH légèrement inférieur (pH 4,25) a été fait délibérément. Pour ces mêmes raisons, ce pH a été employé pour la mise au point du dosage de l'activité transgalactosylasique utilisé lors des étapes de purification du système enzymatique.

Des essais avec différents tampons : acétate de sodium ; citrate de sodium et citrate-phosphate de sodium, ont montré que ce dernier était le plus favorable à la formation et à l'allongement des oligosaccharides.

On remarquera qu'il est aussi possible d'obtenir une réaction de transfert pour des pH plus basiques (7,5-8,5) avec des rendements de réaction beaucoup plus faibles.

2-TEMPERATURE OPTIMALE DE PRODUCTION D'OLIGOSACCHARIDES

La synthèse des oligosaccharides et la libération de monosaccharides ont été suivies après incubation des cellules et de lactose à différentes températures au pH optimum de production.

Comme pour le pH optimum de synthèse et d'hydrolyse, la figure 8 page 63 montre un déplacement des températures optimales. On observe que la température optimale de synthèse (40°C) est supérieure à la température d'hydrolyse (36°C). Ceci est certainement dû à une propriété particulière de l'enzyme impliquée dans la réaction de synthèse, car la majorité des β -D-galactosidases de *Bifidobacterium bifidum* présentent des températures optimales d'hydrolyse supérieures (7).

3- DETERMINATION DE LA CONCENTRATION OPTIMALE EN LACTOSE

L'incubation de cellules en présence de différentes concentrations en lactose (50-500 mM) est effectuée à pH 4,25 et à 40°C durant 20 heures.

Les résultats obtenus sont illustrés par la figure 9 page 64. Nous observons une augmentation des produits de transfert qui est proportionnelle à la concentration en substrat, celui-ci servant à la fois de donneur et d'accepteur de résidu galactosylé. Les commentaires suivants peuvent être faits :

a- La comparaison des pentes des courbes des activités hydrolytique (0,80) et transférasique (0,34) montre que pour de faibles concentrations en lactose (inférieures à 125 mM) l'activité hydrolytique augmente plus rapidement que l'activité de synthèse.

b- La libération des monosaccharides augmente jusqu'à une concentration de 200 mM pour ensuite diminuer.

c- La production des oligosaccharides est proportionnelle à la concentration en substrat mais montre deux pentes différentes. Pour des concentrations en lactose comprises entre 50 et 250 mM, la pente est de 0,34. Cette valeur tend à diminuer pour des concentrations en substrat supérieures où elle passe à 0,07 (entre 300 et 500 mM).

Comme le montre ces résultats préliminaires, la concentration en lactose est primordiale quand à l'orientation de la réaction soit vers la synthèse soit vers l'hydrolyse. Pour de faibles concentrations les rapports d'activités sont en faveur de l'hydrolyse. Au dessus d'une concentration limite en substrat (200 mM), la réaction de transgalactosylation s'accroît.

Si l'influence de la concentration en lactose semble s'atténuer pour des valeurs supérieures à 300 mM, nous avons cependant opté pour une concentration en lactose de 500 mM afin de favoriser l'allongement des oligosaccharides.

Ces expériences d'optimisation de la production des oligosaccharides nous ont amené à choisir le milieu d'incubation décrit page 42.

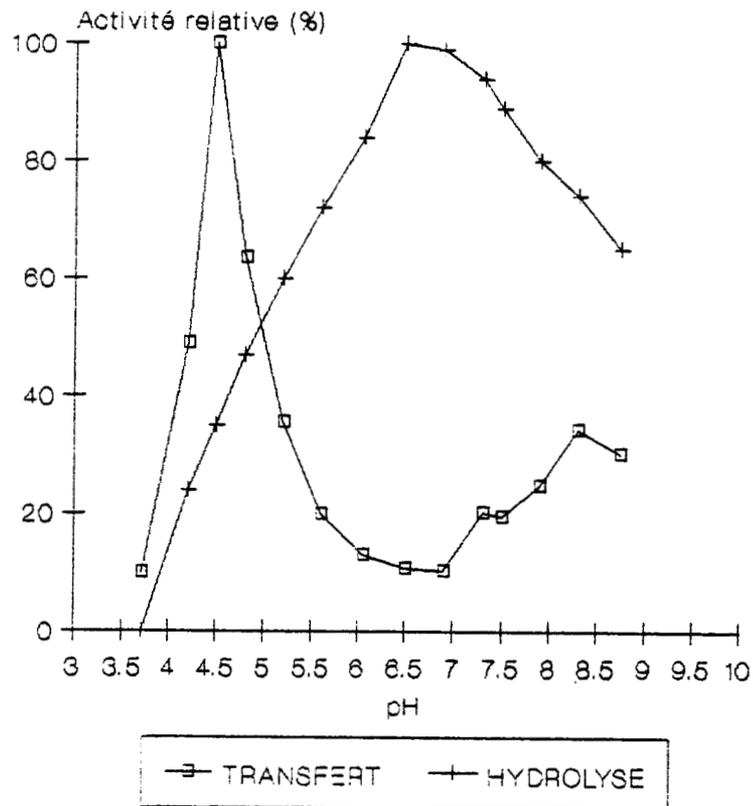


Figure 7 : Action des cellules de *Bifidobacterium bifidum* sur le lactose en fonction du pH

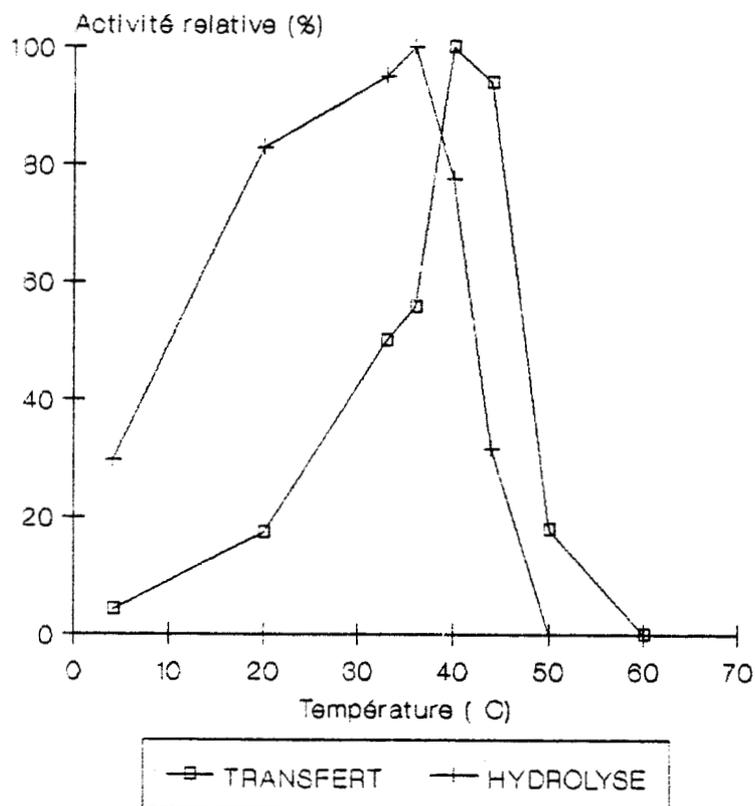


Figure 8 : Action des cellules de *Bifidobacterium bifidum* sur le lactose en fonction de la température

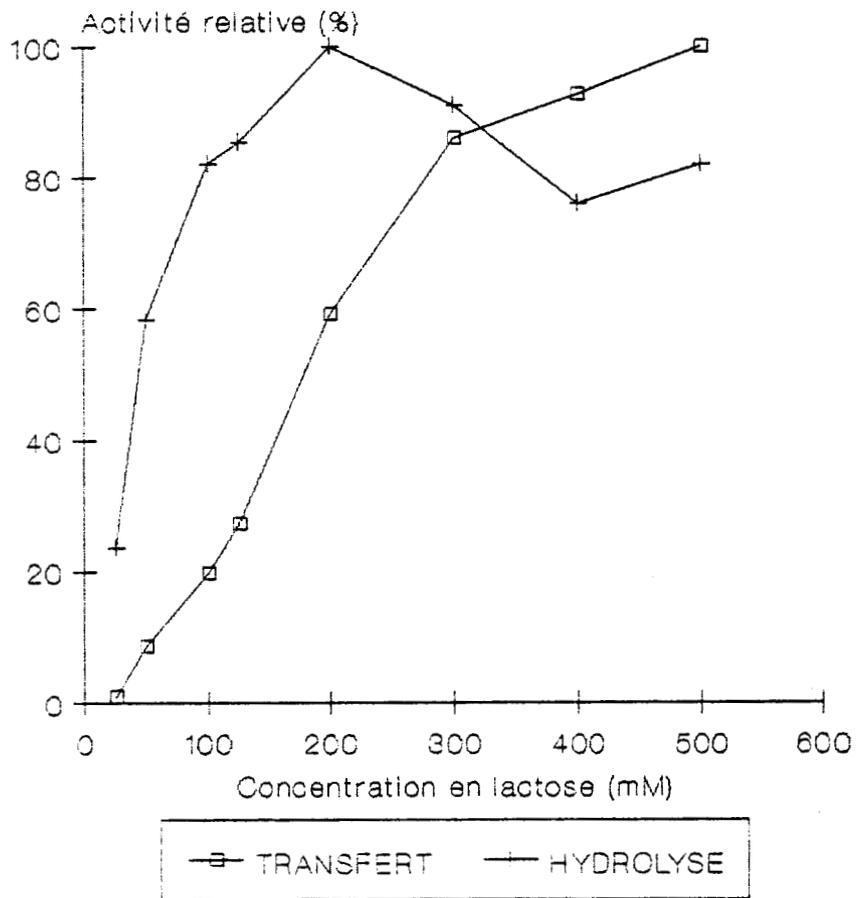


Figure 9 : Action de *Bifidobacterium bifidum* en fonction de la concentration en lactose

B-QUANTIFICATION DE LA PRODUCTION D'OLIGOSACCHARIDES

Après 80 heures d'incubation, le milieu réactionnel est porté à 100°C, centrifugé puis concentré jusqu'à un volume de 16 ml. La quantification par la technique de dosage par HPLC a nécessité la dilution préalable au 1/50^{ème} d'une partie aliquote du sirop ainsi obtenu. L'injection sur les colonnes est faite sous les conditions décrites page 47.

La méthodologie utilisée permet la séparation des monosaccharides : glucose et galactose mais ne distingue pas les disaccharides entre eux. Par contre, les oligosaccharides supérieurs (trisaccharide jusque pentasaccharide) ont pu être quantifiés. Les résultats expriment les quantités de produits formés en μ moles (quantités totales dans les 16 ml du concentré) ou en mmoles d'équivalents galactose (permettant une meilleure comparaison entre les saccharides) :

Lactose initial	13,8 mmoles	soit 13,8 mmoles d'équivalents Gal
pentasaccharide	45,3 μ moles	
tetrasaccharide	353,2 μ moles	5,30 mmoles équivalents Gal
trisaccharide	2023 μ moles	
disaccharide	5414 μ moles	5,41 mmoles équivalents Gal
glucose	5669 μ moles	5,67 mmoles équivalents Gic
galactose	1580 μ moles	<u>1,58 moles équivalents Gal</u>
		12,29 mmoles équivalents Gal

Les résultats montrent :

- que le déficit en galactose par rapport au glucose est flagrant (Rapport Gic libre / Gal libre = 3,60)
- que les trisaccharides sont les produits de synthèse dominants.

Dans l'hypothèse d'une élongation des oligosaccharides par transfert d'un résidu galactosylé sur une molécule de lactose ou de saccharide formé, une molécule de galactose est libérée dans le milieu réactionnel pour approximativement 1,80 molécules de galactose transférées.

Ainsi, sans tenir compte des disaccharides néosynthétisés et des homologues supérieurs au pentasaccharide (quantitativement négligeable), la masse pondérale des produits de synthèse peut être estimée comme représentant au minimum 29 % de la masse pondérale initiale du lactose. Ce rendement de synthèse de galacto-oligosaccharides par *Bifibobacterium bifidum* à partir de lactose est l'un des plus élevés de ceux répertoriés dans la littérature avec notamment la formation de produits de transfert par *S. fragilis* (104), *S. thermophilus* (46) et la β -galactosidase d'*E.coli* (59) avec des rendements respectifs de 44,6 ; 25 et 32 %.

CONCLUSIONS :

Bifidobacterium bifidum souche AA 2/2 montre une potentialité élevée de transfert de résidu galactosylé à partir de lactose. Cette souche présente la particularité d'effectuer ces réactions de synthèse à un optimum de pH et de température différent de celui de l'hydrolyse du lactose, contrairement à ce qui est généralement décrit dans la littérature.

Devant l'importance des oligosaccharides néosynthétisés, on peut se poser la question de savoir si nous sommes en présence du phénomène de greffage classique (résidu galactosylé sur une fonction hydroxyle primaire) ou si ce transfert s'effectue aléatoirement sur toutes les fonctions hydroxyles des saccharides en présence ?

II- STRUCTURE DES OLIGOSACCHARIDES

A-FRACTIONNEMENT DES OLIGOSACCHARIDES

L'incubat obtenu précédemment a été déposé sur couche mince de silice et soumis à migration dans le système de migration décrit page 43. La figure 10 page 67 montre la diversité des produits de réaction. Les différents oligosaccharides ont été séparés par gel filtration selon les conditions décrites page 43 et le profil d'élution du mélange réactionnel est illustré sur la figure 11 page 67.

Huit fractions ont ainsi été obtenues après passage sur les colonnes de TSK HW 40 S. Plusieurs oligosaccharides (F.7, F.6, F.5, F.3) ont été purifiés en une seule étape chromatographique, les autres ont nécessité plusieurs passages consécutifs sur ces mêmes colonnes afin d'être séparés.

Des quantités insuffisantes en certaines fractions oligosaccharidiques (F.2, F.4, F.8, F.9, F.10) n'ont pas permis une purification parfaite des produits néosynthétisés. Les structures de 10 oligosaccharides contenus dans les fractions F.1 à F.8 ont été déterminées par les méthodes décrites page 43-44.

B-DETERMINATION DES STRUCTURES

1-CARACTERISTIQUES GENERALES DES OLIGOSACCHARIDES

L'étude structurale des différentes fractions oligosaccharidiques a montré les points communs suivants :

a- La présence dans toutes les fractions de : méthyl 2,3,4,6-tetra-O-méthyl galactoside lors de l'analyse des produits méthylés et acétylés (Tableau XI page 69 montre que tous les oligosaccharides néosynthétisés possèdent un résidu galactosylé en position terminale non réductrice .

b- Les résidus de galactose qui sont transférés sont tous liés par des liaisons β -glycosidiques soit sur les résidus galactosylés (du lactose ou des oligosaccharides néosynthétisés) ou sur le glucose. En effet, seule la β -D-galactosidase de la fève Jack est susceptible d'hydrolyser les liaisons nouvellement synthétisées. L' α -D-galactosidase est inactive vis-à-vis de ces structures.

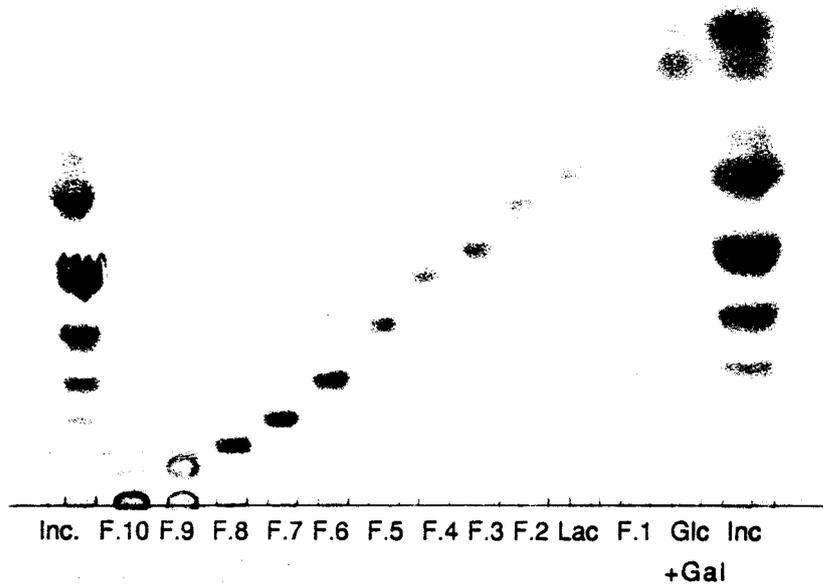


Figure 10 : Chromatographie sur couche mince des produits de transgalactosylation. (conditions expérimentales cf p. 43)

F.1 à F.10 = fractions saccharidiques ; Inc : Incubation de 80 h à 45°C à pH 4,20 ; Glc, Gal, Lac représentent le glucose, le galactose et le lactose.

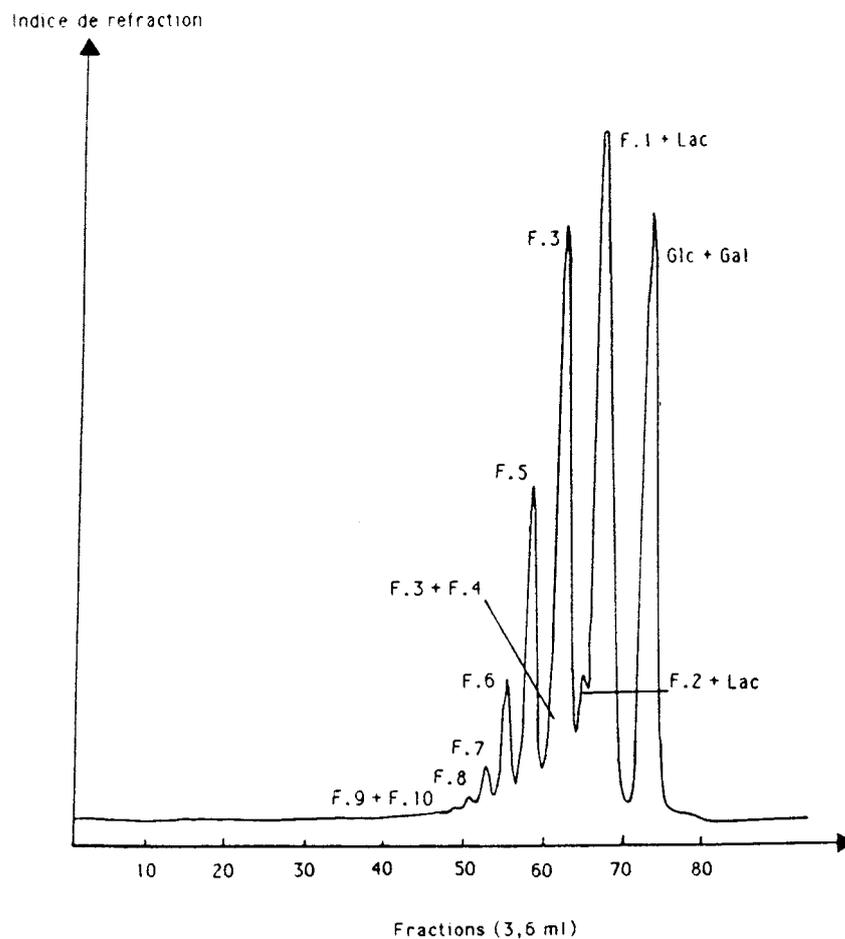
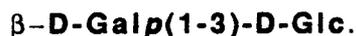


Figure 11 : Chromatographie sur TSK HW 40 S des produits de transgalactosylation. (conditions expérimentales cf p.43)
La nomenclature est la même que pour la figure 10

2- FRACTION F.1

Cette fraction renferme un disaccharide, composé de glucose et de galactose comme le prouve la composition molaire (rapport Gal/Glc = 1) et l'analyse en f.a.b.-m.s. avec l'ion à m/z 494 (M+Na)⁺ (tableau XII page 70).

Le greffage du galactose sur le carbone 3 du glucose est démontré par la présence de 1,2,4,5,6-penta-O-méthyl glucitol lors de l'étude des produits méthylés et acétylés (Tableau XI, page 75). La structure a été établie comme étant :

3-FRACTION F.2

Les oligosaccharides constituant cette fraction ont été identifiés comme des disaccharides par l'analyse en f.a.b.-m.s. par la présence de l'ion à m/z 494(M+Na)⁺. Cependant, l'étude des rapports molaires a montré que le rapport Gal/Glc était de l'ordre de 1,2 (tableau XII, page 70).

L'excès de galactose n'est pas un artéfact de dosage car il a été confirmé lors de l'étude des produits de méthylation de cette fraction. On a caractérisé en effet deux 6-O-acétyl 1,2,3,4,5 penta-O-méthyl hexitol dérivant du glucose et du galactose en position terminale réductrice. Le 6-O-acétyl penta méthyl galactitol ne représentait que 10 % de la quantité total des hexitols dosés. On a pu lui attribuer la structure suivante :



Cela nous permet de conclure que 90 % des oligosaccharides de cette fraction ont la structure suivante :

4- FRACTION F.3

Le produit majeur de transgalactosylation a été identifié comme un trisaccharide d'après les études de f.a.b.-m.s. avec la détection de l'ion à m/z (M+Na)⁺ 698. La détermination du rapport molaire en monosaccharides a donné le résultat suivant : 2 résidus de galactose pour un résidu de glucose (tableau XII, page 70). L'analyse des produits méthylés et acétylés en spectrométrie de masse a mis en évidence, outre le perméthyl galactoside et le 4-O-acétyl penta-O-méthyl glucitol ; une molécule de méthyl 3-O-acétyl 2,4,6-O-méthylgalactoside (tableau XI page 69). Ce méthyl galactoside sera le marqueur particulier de la série d'oligosaccharides de F.5 à F.8.

Sur la base de ces résultats et de l'hydrolyse enzymatique, la structure de F.3 est :



TABLEAU XI :

**RAPPORT MOLAIRE DES METHYL O-ACETYL-O-METHYL
GLYCOSIDES ET O-ACETYL-O-METHYLHEXITOLS PROVENANT DE
LA METHANOLYSE DES OLIGOSACCHARIDES REDUITS ET
PERMETHYLES**

Méthyl ethers	Fractions							
	F.1	F.2	F.3	F.4	F.5	F.6	F.7	F.8
<u>Méthyl galactoside</u>								
2,3,4,6-tétraMe*	1	1	1	1	1	1	1	+
2,4,6-triMe*			0,92	0,44	1,70	2,65	3,99	++++
2,3,6-triMe*				0,16				
<u>Galactitol</u>								
1,2,3,4,5-pentaMe*		0,15		0,10				
<u>Glucitol</u>								
1,2,4,5,6-pentaMe*	1,07							
1,2,3,5,6-pentaMe*			0,83	0,12	0,74	0,87	0,72	+
1,2,3,4,5-pentaMe*		1,04		0,42				
1,3,4,5-tétraMe*				0,15				
1,2,3,5-tétraMe*				0,21				

Les rapports molaires sont exprimés en prenant le méthyl 2,3,4,6-tétra-O- méthylgalactoside comme référence.

+, ++++ Méthyl glycosides et méthylglycositols détectés par excès, dû à la contamination par la fraction F.7

* triMe, tétraMe, pentaMe : tri-, tétra-, et pentaméthyl glycoside ou glycositol

TABLEAU XII :

**TEMPS DE RETENTION RELATIF, NATURE ET COMPOSITION
MOLAIRE EN MONOSACCHARIDES DES PRODUITS DE
TRANSFERT OBTENUS A PARTIR DU LACTOSE PAR ACTION DE
Bifidobacterium bifidum (pH 4,2)**

Fraction	R_{Lac}^a	Rapport molaire	Sucre terminal	Nature ^b des	Ion à m/z
		Gal/Glc	réducteur	oligosaccharides	(M+Na) ⁺
F.1	1,10	1,0 :1	Glc	Disaccharide	494
F.2	0,91	1,2 :1	Glc + Gal	Disaccharide	494
F.3	0,75	1,9 :1	Glc	Trisaccharide	698
F.4	0,67	2,2 :1	Glc + Gal	Trisaccharide	698
F.5	0,55	2,9 :1	Glc	Tetrasaccharide	902
F.6	0,41	3,9 :1	Glc	Pentasaccharide	1106
F.7	0,28	4,8 :1	Glc	Hexasaccharide	1310
F.8	0,20	5,35 :1	Glc	Heptasaccharide	1514

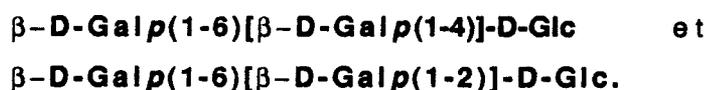
^a Migration relative de l'oligosaccharide néosynthétisé mesurée par rapport à celle du lactose en TLC dans le système solvant butanol-eau-acide acétique (2 : 1 : 1) (v/v)

^b Nature basée sur l'analyse en f.a.b.-m.s des oligosaccharides réduits et perméthylés.

5- FRACTION F.4

Cette fraction mineure de la réaction de transgalactosylation a été difficilement séparée de la fraction F.3. Elle est composée de différents trisaccharides car l'étude en f.a.b.-m.s a démontré la présence de l'ion m/z 698 ($M+Na$)⁺.

Cependant, l'analyse des produits de méthylation a montré que l'on était en présence d'un mélange de trisaccharides branchés et linéaires comme cela est figuré dans le tableau XI (p.69) avec la présence de 2 tri-O-méthyl galactosides, trois penta-O-méthyl hexitols et deux tetra-O- méthyl hexitols. Seules les structures des oligosaccharides branchés ont pu être déterminées par l'identification de 4,6-di-O-acétyl 1,2,3,5-tétra-O-méthyl et 2,6-di-O-acétyl 1,3,4,5-tétra-O-méthyl-glucitol (tableau XI, p. 69) comme étant :



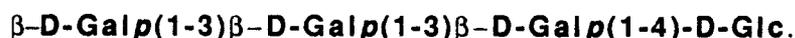
Néanmoins ces structures ne sont pas les formes trisaccharidiques majoritaires de cette fraction. La proportion des deux di-O-acétyl tétra-méthyl hexitol est faible par rapport aux hexitols mono acétylés et notamment du 6-O-acétyl penta méthyl glucitol qui représente près de 42 % des hexitols totaux.

6- FRACTION F.5

Le rapport galactose sur glucose de 2,9 / 1 et le spectre de masse de l'oligosaccharide alditol perméthylé avec un ion à m/z 902 ($M+Na$)⁺ (tableau XII, p.70) indiquent que cette fraction est constituée d'un tétrasaccharide.

L'analyse des méthyl méthyl-galactosides et hexitols par g.l.c.-m.s. montre des composés identiques à ceux précédemment décrits lors de l'étude de la fraction F.3. On note une augmentation du rapport méthyl 2,4,6-tri-O-méthyl par rapport au perméthyl galactoside de 1,7 au lieu de 0,92 pour 1 (tableau XI, p. 69).

Le doublement de cette valeur, l'étude des produits de méthylation et d'acétylation et l'étude enzymatique permettent de conclure que la structure de l'oligosaccharide F.5 est :

7- FRACTION F.6

Le rapport Gal/Glc est égal à 3,9 et l'analyse en f.a.b.-m.s., avec l'ion à m/z ($M+Na$)⁺ de 1106 (tableau XII, p. 70), montrent que cette fraction est constituée d'un pentasaccharide.

Comme précédemment, l'analyse en g.l.c.-m.s. a permis l'identification des mêmes produits de méthylation que pour les fractions F.3 et F.5 mais avec une augmentation du rapport de résidus galactosylés internes (2,4,6-tri-O-méthyl galactoside) sur le résidu en position terminale non réductrice (2,65 / 1) (tableau XI

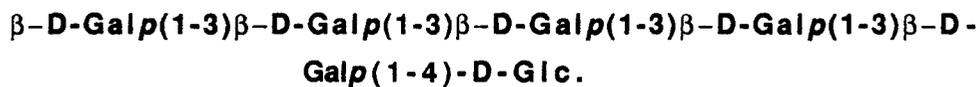
page 69).

La structure suggérée par les études de g.l.c.-m.s. et enzymatique est la suivante :



8- FRACTION F.7

La détection d'un ion m/z $(M+Na)^+$ 1310 lors de l'étude en f.a.b.- m.s. et la détermination du rapport galactose/glucose (tableau XII, p.70) permettent de conclure à la présence d'un hexasaccharide. Ceci est confirmé par l'analyse en g.l.c.-m.s. dont le rapport : perméthyl galactoside / méthyl-2,4,6-tri-O-méthylgalactoside / 1,2,3,5,6-penta-O-méthylglucitol est de 1 / 4 / 1. Ces résultats, cumulés à ceux de l'étude enzymatique permettent de conclure à la structure suivante :

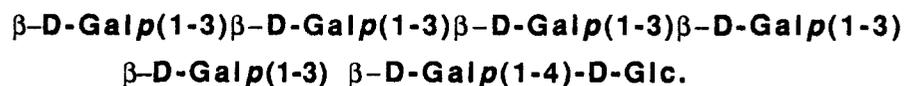


9- FRACTION F.8

C'est une fraction mineure et non homogène. Les analyses en f.a.b.-m.s. montrent que le constituant majeur était un heptasaccharide (ion à m/z $(M+Na)^+$ de 1514) contaminé par l'oligosaccharide de la fraction F.7.

L'analyse des produits méthylés et réacétylés après méthanolyse a mis en évidence les mêmes composés que pour les fractions F.3, F.5, F.6 et F.7 en montrant que l'allongement des oligosaccharides s'effectue par du galactose et par l'intermédiaire de liaisons $\beta(1\text{-}3)$ (tableau XI, page 69).

Sur la base de ces analyses et de l'hydrolyse enzymatique, la structure de l'oligosaccharide majoritaire de F.8 est la suivante :



10- FRACTIONS F.9 ET F.10

Les faibles quantités de fractions F.9 et F.10 n'ont pas permis de mener à bien la détermination des structures des oligosaccharides composant ces fractions. L'hypothèse de la synthèse d'octa- et de nonasaccharides peut cependant être avancée, de même que le regreffage par des liaisons de type $\beta 1\text{-}3$.

CONCLUSIONS :

Comme la plupart des microorganismes possédant une ou plusieurs β -D-galactosidases, *Bifidobacterium bifidum* souche AA 2/2 se montre capable d'effectuer des réactions de transgalactosylation lors de son incubation en présence de lactose.

Avec plus de 30 % du substrat initial converti en galacto- oligosaccharides, cette aptitude n'est pas négligeable et se rapproche quantitativement de celle d'*E.coli* (59) tout en restant éloignée du rendement de *S.fragilis* qui était proche de 45 %

(104).

Pour expliquer ce rendement élevé de la réaction de transgalactosylation, outre la forte concentration en substrat nécessaire et communément reportée dans la littérature, il faut signaler l'intervention de deux phénomènes particuliers :

a- un déplacement vers les pH acides (pH 4,4) du pH optimum de la réaction de transfert par rapport à celui de l'hydrolyse. Ce glissement vers les pH acides est une condition *sine qua non* pour observer une augmentation de la production et un allongement des produits de transfert. On remarquera aussi, que ce pH acide favorise l'apparition et le maintien des liaisons $\beta(1-3)$. En effet les oligosaccharides présentant des liaisons $\beta(1-6)$ sont en très faibles concentrations voire même artéfactuels. Par contre si on se place au pH optimum d'hydrolyse, les oligosaccharides à liaison $\beta(1-6)$ deviennent prédominants et l'élongation des produits de transfert est limité au tri et tétrasaccharides.

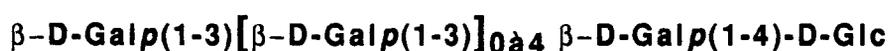
b- une différence entre les températures optimales de synthèse des oligosaccharides (40°C) et d'hydrolyse (36°C). Ce déplacement reste cependant moins conséquent que l'action du pH car une incubation à 36°C n'empêche pas la formation des galacto-oligosaccharides.

Dans la littérature, ces deux paramètres ont été peu étudiés quant à leur influence sur la réaction de transfert. HUBER *et al.* (59) ont signalé la modification du rapport transfert/hydrolyse en fonction du pH, préconisant l'utilisation de pH plutôt basique pour l'accroître cependant que AJISAKA *et al.* (1) ont signalé une différence des optimums pour le pH de transglycosylation (pH 4) et d'hydrolyse (pH 5,5) pour une β -glucosidase.

Le rôle de la température sur les réactions de transfert n'a pas été plus étudié. L'utilisation de fortes concentrations en substrat permet d'augmenter la stabilité à la température des différents systèmes enzymatiques impliqués dans des réactions de transgalactosylation.

Outre ces deux caractéristiques essentielles pour l'observation de la réaction de transgalactosylation par *Bifidobacterium bifidum*, il faut signaler que le caractère remarquable de cette synthèse réside surtout dans la structure des molécules formées.

Le greffage privilégié et spécifique sur un hydroxyle secondaire en l'occurrence sur le carbone 3 de la molécule acceptrice, galactose (F.3, F.5-F.8) ou glucose (F.1), rend cette réaction de transfert tout à fait particulière et donne une famille d'oligosaccharides dont la structure générale est la suivante :



L'importance d'une telle série de galacto-oligosaccharides (F.3, F.5 à F.8) n'a encore jamais été décrite comme produit de la réaction de transgalactosylation. Cette étude a fait l'objet d'une publication (Primary structure of ten galactosides formed by transglycosylation during lactose hydrolysis by *Bifidobacterium bifidum*. V. DUMORTIER, J. MONTREUIL, S. BOUQUELET, 1990 ; Carbohydr. Res., 201, 115-123).

Seuls TOBA *et al.* en 1985 ont mentionné un greffage minoritaire en position 3 sur le galactose du lactose et sur le glucose pour donner les structures correspondantes respectivement à F.3 et F.1.

Cependant, cette série d'oligosaccharides possédant des liaisons en $\beta(1-3)$ a été caractérisée par MESSER *et al.* (76) et par COLLINS *et al.* (32) dans le lait de marsupiaux, animaux dépourvus de lactase intestinale. A notre connaissance, la biosynthèse de ces galacto-oligosaccharides reste ignorée à ce jour.

Cette activité de synthèse à partir de lactose a été mise en évidence lors de l'utilisation de cellules entières, tuées de *Bifidobacterium bifidum*.

Ceci nous laisse supposer que l'activité transférante est peut-être localisée sur les membranes externes de la bactérie.

De plus, cette activité est-elle le fait d'une ou de plusieurs des activités β -D-galactosidasiques détectées chez *Bifidobacterium bifidum* par APPOURCHAUX (7), ou bien résulte-t-elle de l'action d'une "transgalactosylase" spécifique ?

C'est pour répondre à cette question que nous avons entrepris la séparation des β -D-galactosidases, et la caractérisation physico-chimique et enzymatique du (ou des) système (s) impliqué (s) dans les réactions de transgalactosylation.

III- PURIFICATION DE LA TRANSGALACTOSYLASE

Durant toutes les étapes d'extraction et de purification, deux dosages ont été effectués afin de permettre la comparaison entre l'activité exo- β -D-galactosidasique et l'activité transgalactosylasique responsable de la synthèse des oligosaccharides à pH 4,40. Elles ont été mesurées respectivement sur substrat synthétique au pH optimum d'hydrolyse (pH 6,50) et sur lactose à pH 4,25 selon les protocoles décrits pages 45 et 47.

A- EXTRACTION DU SYSTEME ENZYMATIQUE

Les activités exoglycosidasiques de *Bifidobacterium bifidum* souche AA 2/2 sont toutes cellulaires, peu d'activités se retrouvent excrétées dans le milieu de fermentation (7, 22). Après traitement aux ultra-sons en présence de Triton X 100, la réactivité des galactosidases a été dosée à la fois sur des culots réhomogénéisés et sur des surnageants d'extraction.

Le tableau XIII page 76 illustre les résultats obtenus lors d'une extraction réalisée selon les conditions décrites page 44.

Des différences de comportement significatives entre les deux activités ont été observées :

a- Le rendement total d'extraction (culot et surnageant) est voisin de 150 % pour l'activité hydrolytique et il est égal à 70 % pour l'activité transférasique

b- Concernant les activités retrouvées dans l'extrait cellulaire (surnageant limpide), l'activité hydrolytique représente 89 % de l'activité initiale, alors que l'activité de transfert est récupérée avec un rendement d'extraction de 14,2 % seulement.

c- On observe que plus de 55 % de cette activité reste intégrée au niveau des débris cellulaires après trois traitements aux ultra-sons.

d- Les rapports (activité extraite sur activité membranaire : $U_{T\text{EC}}/U_{T\text{CC}}$) pour l'activité hydrolytique et transférasique montrent, avec des valeurs respectives de 1,5 et 0,25, que l'activité responsable de la synthèse est plus difficilement extractible des cellules que l'activité β -D- galactosidasique (6 fois moins).

Ceci renforce l'hypothèse d'une localisation membranaire pour le système enzymatique porteur de l'activité transférasique, alors qu'une partie de l'activité galactosidasique est intracellulaire et facilement extractible.

TABLEAU XIII :

**EXTRACTION DES ACTIVITES HYDROLYTIQUE ET TRANSFERANTE
DES CELLULES DE *Bifidobacterium bifidum***

	CI	CC	EC	R ^{dt} T	R ^{dt} E	U _T EC/U _T CC
U _T Hydrolyse (U _T H)	2176 U	1293 U	1941 U	149 %	89 %	1,50
U _T Transfert (U _T T)	11,2 U	6,24 U	1,59 U	70 %	14,2 %	0,25
Rapport U _T T / U _T T	5,14.10 ⁻³	4,83.10 ⁻³	0,82.10 ⁻³			

C I = cellules intactes ;

C C = culot cellulaire ;

E C = extrait cellulaire ;

R^{dt} T = rendement total ;

R^{dt} E = rendement d'extraction du surnageant

U_TH = Unité β-D-galactosylasique ;

U_TT = Unité transgalactosylasique

U_TEC = activité totale de l'extrait cellulaire

U_TCC = activité totale du culot cellulaire

TABLEAU XIV :

**EXTRACTION DE L'ACTIVITE TRANSFERASIQUE PAR
ULTRA-SONS ET PAR PRESSE DE FRENCH**

Extraction	Culc. cellulaire	Extrait cellulaire	Rapport ^{Extrait} / _{Culot}
Ultra-sons	1,84 U/g	0,37 U/g	0,2
French press	1,24 U/g	0,10 U/g	0,08

U/g = Unité transgalactosylasique par gramme de cellules

Cependant, nous pouvons remarquer au cours de cette première étape, une perte en activité transgalactosylasique avec une diminution du rapport (activité transférasique/activité hydrolytique) de $5,14 \cdot 10^{-3}$ à $0,82 \cdot 10^{-3}$ entre les cellules intactes et l'extrait cellulaire.

Un essai d'extraction à la presse de French (cf page 45) permet d'aboutir aux mêmes conclusions quant à la localisation du système enzymatique. Le tableau XIV page 75 illustre la comparaison des deux types d'extraction pour l'activité transférasique.

Comme cela avait déjà été décrit pour les activités galactosidasiques (22), ce type d'extraction donne de plus mauvais résultats qu'une extraction classique aux ultra-sons. De plus, avec un gain de 40 % d'activité transférasique à la fin du traitement aux ultra-sons, la "transgalactosylase" semble mieux supporter ce type d'extraction que le broyage des cellules par la presse de French.

Nous avons donc choisi le traitement aux ultra-sons pour extraire le matériel enzymatique responsable de la formation des oligosaccharides. La purification de l'activité transgalactosylasique a été effectuée à partir de l'extrait cellulaire obtenu après traitement aux ultra-sons.

B- CHROMATOGRAPHIE SUR HYDROXYLAPATITE-ULTROGEL

100 ml de surnageant de centrifugation sont déposés sur la colonne dans les conditions décrites page 48. Le profil d'élution des protéines est représenté par la figure 12 page 78 et les résultats de cette étape sont résumés sur le tableau XV page 79.

Cette chromatographie nous permet d'obtenir trois fractions ("HA 30", "HA 100" et "HA 300") renfermant l'activité β -D-galactosidasique. Le rendement global de la chromatographie est de 85,7 % par rapport à l'activité hydrolytique initiale.

La fraction non retenue ("HA 30") représente 3,5 % de l'activité hydrolytique initiale et très peu d'activité transférasique (visible sur couche mince mais non quantifiable en HPLC). Elle est opalescente après chromatographie et pourrait contenir des fragments de membranes ou des micelles bien que la concentration en triton utilisée soit inférieure au seuil critique de formation des micelles.

La fraction "HA 300", éluee par le tampon phosphate sodique 300 mM renferme plus de 70 % de l'activité hydrolytique et présente un taux de purification de 2,6. Elle ne possède en fait aucune activité transférasante à pH 4,25.

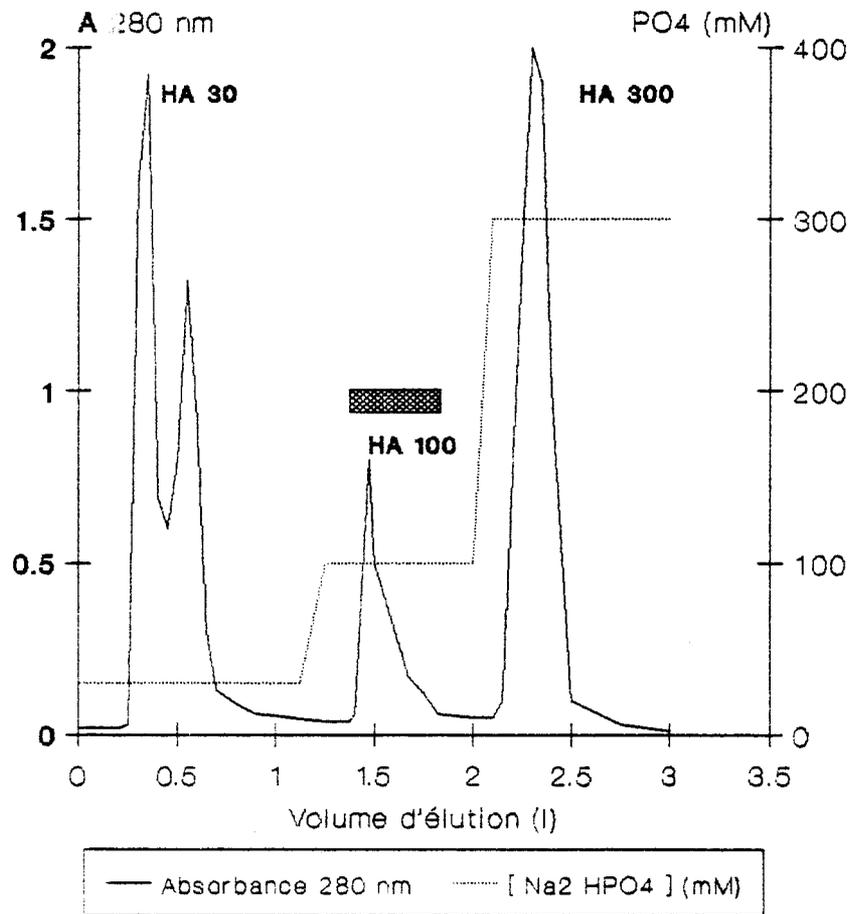


Figure 12 : Profil d'élution sur colonne d'Hydroxyapatite-Ultrogel

L'extrait cellulaire est injecté sur la colonne d'Hydroxyapatite-Ultrogel équilibrée en tampon phosphate de sodium 30 mM pH 6,8 et éluée par du tampon phosphate de sodium 100 et 300 mM.

■ Activité transgalactosylasique pH 4,25 ; fractions recueillies

**TABLEAU XV : PURIFICATION DES ACTIVITES β -D-GALACTOSIDASIQUE
ET TRANSGALACTOSYLASIQUE SUR HYDROXYAPATITE**

	E C	"HA 30"	"HA.100"	"HA.300"
Act. Hydrolytique (U Hydr)	1553	48,8	187	1096
Act.Spécifique (U Hydr/mg)	0,92	0,16	0,66	2,37
FP Hydrolyse	1,00	0,17	0,72	2,60

Act. Transférasique (mU Trans)	1272	N.Q.	710	0
Act. Spécifique (mU _{Trans} /mg)	0,82	-	2,22	0
FP Transgalactosylasique	1,00	-	2,70	0

E C = Extrait cellulaire

"HA 30" = Fraction non retenue ;

"HA100" = Fraction éluée en tampon phosphate de sodium 100 mM ;

"HA 300" = Fraction éluée en tampon phosphate de sodium 300 mM ;

N.Q. = Non quantifiable ;

FP Hydrolyse = Facteur de purification pour l'activité hydrolytique ;

FP Transgalactosylasique = Facteur de purification pour l'activité
transgalactosylasique

Cette fraction, sur laquelle nous reviendrons à la fin du mémoire (cf page 127), est cependant active à pH 6,5 vis-à-vis du lactose, elle est capable de former des di- et des trisaccharides migrant respectivement en TLC comme la fraction F.2 et F.4 (cf pages 68 et 71).

La fraction éluée par le tampon phosphate sodique 100 mM dite "HA 100" ne renferme que 12 % de l'activité hydrolytique et montre un facteur de purification de 0,71. Cependant cette fraction enzymatique représente la totalité de l'activité transférasique à pH 4,25. Le rendement de la chromatographie est de 56 % et le facteur de purification est de 2,70 pour cette activité de transfert.

La comparaison des facteurs de purification pour cette étape montre que la chromatographie sur Hydroxyapatite-Ultrogel permet la séparation de deux activités β -D-galactosidasiques différentes.

La fraction "HA 100" renferme proportionnellement peu d'activité hydrolytique mais la majeure partie du système enzymatique responsable de la synthèse et de l'allongement des galacto-oligosaccharides. Cette fraction présente un rapport des activités transférasique/activité hydrolytique de $3,8 \cdot 10^{-3}$, valeur qui est 4,6 fois plus élevée que celui de l'extrait cellulaire initial ($0,8 \cdot 10^{-3}$).

La deuxième fraction majeure est la fraction "HA 300" renfermant plus de 70 % de l'activité hydrolytique mais incapable de réaliser une réaction de synthèse à pH acide.

L'extrait cellulaire obtenu après passage à la presse de French a été soumis à ce même type de chromatographie (conditions opératoires identiques).

Le dosage de l'activité hydrolytique a montré une répartition légèrement différente de cette dernière :

- un enrichissement en activité hydrolytique de la fraction HA 300 (gain de 12 %), cette activité représente alors 92 % de l'activité initiale
- la fraction "HA 100" ne représente plus que 7,1 % de l'activité galactosidasique finale (au lieu de 14 % lors d'une extraction par les ultra-sons en présence de détergent).

Cette expérience apporte deux indications sur le matériel enzymatique contenu chez *Bifidobacterium bifidum* :

a- La β -D-galactosidase de la fraction "HA 300" de masse moléculaire inférieure (7) ne provient pas d'un phénomène de modification de la fraction "HA 100" lors du traitement par les ultra-sons car sa proportion augmente lors de l'extraction à la presse de French.

b- Contrairement à la fraction "HA 100", l'extraction de la fraction "HA 300" est moins dépendante de la présence de détergent. Ceci renforce les premières conclusions tirées lors de l'extraction quant à la localisation de la transgalactosylase

au niveau membranaire.

C- CHROMATOGRAPHIE SUR Q FAST FLOW®

La fraction "HA 100" est déposée sur la colonne d'échange d'ions après concentration et dialyse dans une cellule Amicon sur membrane Filtron (seuil de coupure 30 KDa). Après lavage par le tampon d'équilibration, l'élution est effectuée par un gradient discontinu en NaCl et les paliers sont respectivement de : 100, 250, 500 mM et 1M. Les résultats obtenus pour cette étape de purification sont illustrés par la figure 13 page 82 et le tableau XVI page 83.

Le rendement global de la chromatographie est de 72,3 % pour l'activité hydrolytique. Celle-ci est répartie majoritairement dans deux fractions dénommées "QFF 0,1M" et "QFF 0,5M" représentant respectivement 30,7 et 35,4 % de l'activité initiale. Le reste de l'activité hydrolytique se retrouve dans 2 fractions : la fraction non retenue et celle éluée avec le NaCl 1M. Elles représentent respectivement 2,7 et 3,6 % de l'activité initiale.

L'activité transgalactosylasique est révélée au niveau de deux fractions. La fraction non retenue présente une réactivité très faible ne pouvant être quantifiée par la méthode HPLC. Par contre l'activité éluée par le NaCl 100 mM s'est révélée être la plus importante. L'activité transférasique à pH 4,25 éluée dans cette fraction représente en fait toute l'activité détectée en HPLC soit : 62,8 % de l'activité transférasique initiale. Le facteur de purification obtenu lors de cette étape est de 22,6. Le facteur de purification pour l'activité hydrolytique est de 8,33.

Le rapport (activité transférasique / activité hydrolytique) des fractions concentrées après Q Fast Flow est égal à $9,7 \cdot 10^{-3}$ soit un facteur de purification en activité transférasique de 2,55 par rapport à la fraction "HA 100" de l'étape précédente. La chromatographie sur Q Fast Flow permet encore l'élimination d'une activité galactosidasique contaminante. La fraction "HA100 QFF 0,1M" a été soumise à une purification plus poussée sur une colonne de Mono P®.

D- CHROMATOGRAPHIE SUR MONO P®

La fraction "QFF 0,1M" est concentrée et dialysée contre le tampon Bis-Tris/HCl 25 mM pH 6,3 puis déposée sur la colonne. L'élution a été effectuée soit par un gradient de sel (NaCl ; 0 à 100 mM) soit par un gradient de pH (Polybuffer 74®). Nous ne reportons ici que l'élution par un gradient de pH.

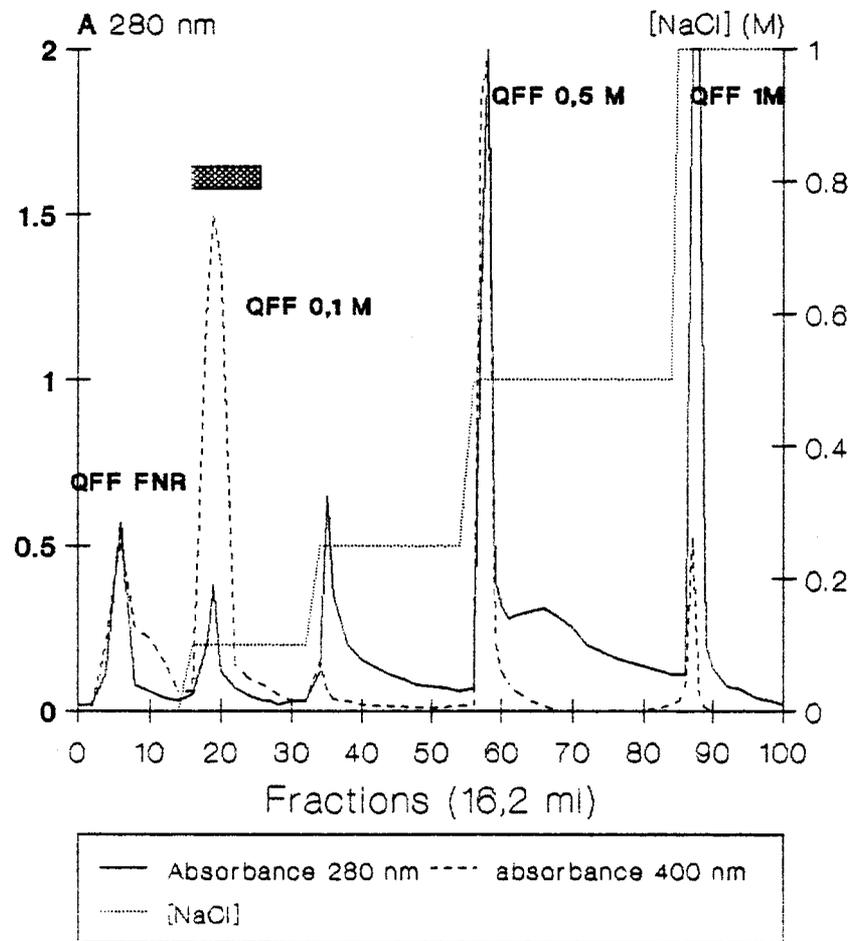


Figure 13: Chromatographie sur colonne de Q Fast Flow Sepharose®

La fraction HA 100 est injectée en tampon phosphate de sodium 10 mM pH 6,8. Les activités enzymatiques sont éluées par un gradient discontinu de NaCl. Les protéines sont suivies à 280 nm et l'activité β -D-galactosidasique à 400 nm.

 Activité transgalactosylasique à pH 4,25 ; fractions recueillies

**TABLEAU XVI : PURIFICATION DES ACTIVITES β -D-GALACTOSIDASIQUE
ET TRANSGALACTOSYLASIQUE SUR Q FAST FLOW
SEPHAROSE®**

	<u>DEPOT</u>	<u>FRACTIONS ELUEES</u>			
	"HA 100"	"QFF FNR"	QFF 0.1M"	QFF 0.5M"	QFF 1M"
Act. Hydrolytique (U Hydr)	187	5,03	57,4	66,17	6,7
Act. Spécifique (U Hydr/mg)	0,66	3,48	5,50	0,32	ND
FP Hydrolyse	1,00	5,3	8,33	0,50	

Act. Transférasique (mU Trans)	710	N.Q.	446	0	0
Act. Spécifique (mU _{Trans} /mg)	2,22	-	50,2	0	0
FP Transgalactosylasique	1,00	-	22,60	0	0

"HA 100" = Fraction déposée ;

QFF FNR , QFF 0,1M QFF 0,5M , QFF 1M : Fractions non retenue et éluées par NaCl respectivement 0 ; 0,1 ; 0,5 ; et 1 M

FP Hydrolyse = Facteur de purification de l'activité β -D-galactosidasique ;

FP Transgalactosylasique = Facteur de purification de l'activité transgalactosylasique ;

N.Q. = Non quantifiable par la technique HPLC.

Quelque soit le type d'élution (figure 14 page 85) qui est choisi, la fraction précédente est résolue sous la forme de 2 pics majeurs. Les fractions "Mono P A" et "Mono P B" représentant respectivement 40,3 et 32,8 % de l'activité hydrolytique initiale.

Ces deux activités hydrolytiques supportent également l'activité transférasique. Le rendement de cette étape de purification est de l'ordre de 64,3 % lors d'une élution par un gradient de pH, il est voisin de 58 % dans le cas de l'utilisation d'un gradient de sel.

Les résultats sont exposés dans le tableau XVII de la page 86.

La fraction "Mono P A" représente près de 53,3 % de l'activité transférasique et présente un facteur de purification de 16,6. Par contre le rapport d'activité transgalactosylasique / activité hydrolytique évolue peu par rapport à celui de l'étape précédente, avec un facteur de purification de l'ordre de 1,3.

Quantitativement, la fraction "Mono P B" s'avère moins intéressante car moins de 11 % de l'activité transférasique initiale y est retrouvée. En outre, cette fraction présente une activité spécifique et un rapport d'activités (transgalactosylasique / hydrolytique) plus faible. A ce stade de la purification, nous pensons que la fraction "Mono P B" est une β -D-galactosidase contaminée par l'activité transgalactosylasique. Seule la fraction "Mono P A" a été étudiée de façon plus détaillée.

E- CHROMATOGRAPHIE SUR SUPEROSE 6®

La purification de la fraction "Mono P A" ("Mono P") est achevée par une chromatographie de gel filtration sur Superose 6®. Elle ne permet pas de séparer l'activité β -D-galactosidasique associée à l'activité transgalactosylasique.

Le facteur de purification est de 1,7 pour les deux activités, le rapport des activités (transgalactosylasique / hydrolytique) n'évolue plus. Le rendement de cette étape est de 65 %.

CONCLUSIONS :

Les résultats du protocole de purification sont illustrés dans le tableau récapitulatif XVIII de la page 88. Cette méthodologie nous a permis de séparer une activité β -D-galactosidasique responsable des réactions de transfert de résidus galactosylés parmi trois activités hydrolytiques majeures ("HA 100 QFF 0,1M", "HA 100 QFF 0,5M" et "HA 300").

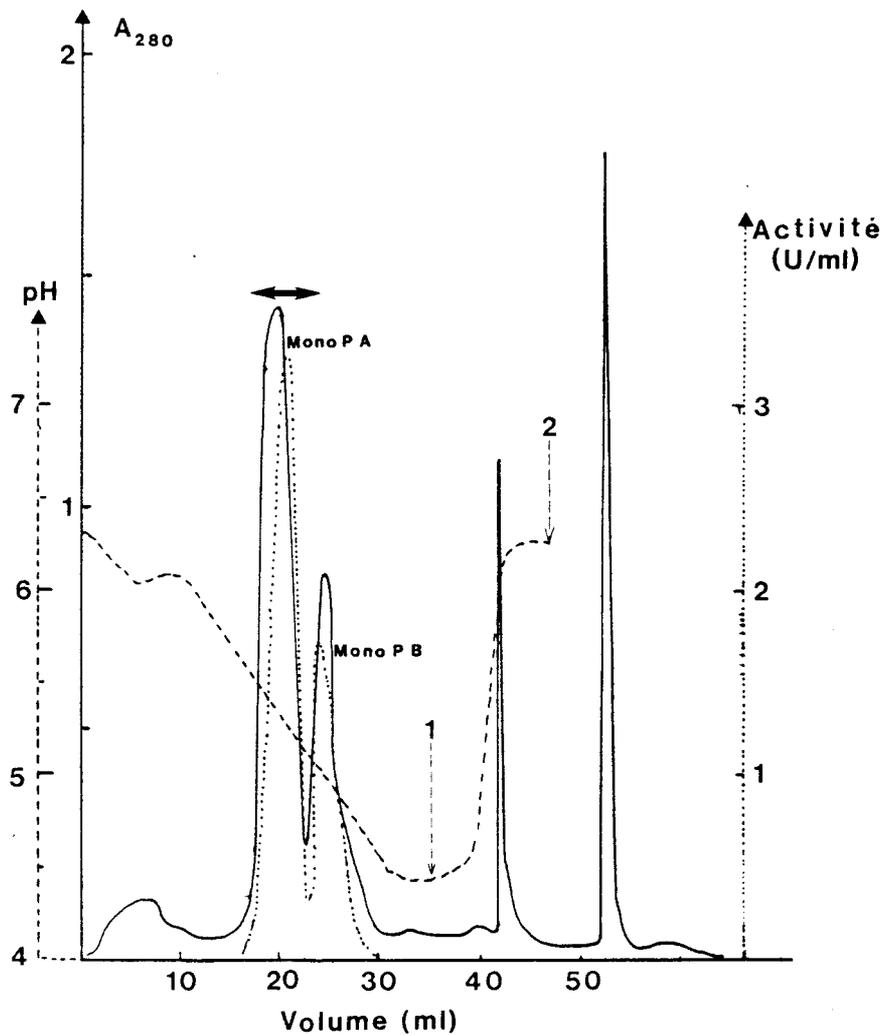


Figure 14 : Chromatographie sur Mono P[®] de la fraction QFF 0,1M

La fraction QFF 0,1 M est déposée sur la colonne Mono P HR 5/30 (Pharmacia) équilibrée en tampon Bis Tris/ HCl 25 mM pH 6,3 puis éluee par un gradient de pH (Polybuffer 74 pH 4,5) de 6,00 à 4,50.

1 - Tampon Bis Tris /HCl 25 mM pH 6,3

2 - Tampon Bis Tris/ Hcl 25 mM NaCl 500 mM pH 6,3

———— Absorbance à 280 nm

..... Activité hydrolytique

- - - - gradient de pH

↔ Activité transgalactosylasique ; fractions recueillies

**TABLEAU XVII : PURIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE SUR MONO P
DES ACTIVITES HYDROLYTIQUE ET TRANSGALACTOSYLASIQUE**

	<u>"QFF 0.1 M"</u>	<u>"Mono P A"</u>	<u>"Mono P B"</u>
Act. Hydrolytique (U Hydr)	42,23	17	13,85
Act. Spécifique (U Hydr/mg)	5,5	29,3	4,3
FP Hydrolyse	1,00	5,33	0,78

Act. Transférante (mU Trans)	409	217,8	44,8
Act. Spécifique (mU _{Trans} /mg)	50,2	831,6	134
FP Transgalactosylasique	1,00	16,60	2,70

"QFF 0,1M" = Fraction déposée ;

"Mono P A" et "Mono P B" = Fractions éluées respectivement par le gradient d'ampholine à pH 5,25 et pH 5,00 ;

FP Hydrolyse = Facteur de purification de l'activité β -D-galactosidasique ;

FP Transgalactosylasique = Facteur de purification de l'activité transgalactosylasique

La présence de plusieurs β -D-galactosidases chez un même microorganisme a déjà été reportée chez *Neurospora crossa* (72) et chez *Bacillus circulans* (82).

Les deux premières étapes permettent d'éliminer deux activités β -D-galactosidasiques importantes. Les fractions "HA 300" et "QFF 0,5 M" qui représentent près de 75 % de l'activité hydrolytique initiale sont incapables d'effectuer des réactions de synthèse à pH 4,25. Elles peuvent cependant former un produit de transfert migrant en TLC comme la fraction F.2 (allolactose).

L'activité transgalactosylasique responsable de l'allongement des oligosaccharides par greffage sur les hydroxyles secondaires (C_3) n'est pas une propriété générale des différentes β -D-galactosidases caractérisées chez *Bifidobacterium bifidum*. Elle est caractéristique d'une forme enzymatique particulière, isolée après trois étapes chromatographiques et retrouvée dans la fraction "Mono P A".

Son enrichissement est illustré par l'évolution du rapport (activité transférasique / activité hydrolytique) au cours de la purification (tableau XVIII, partie B) avec une multiplication par un facteur 15,65 entre l'extrait cellulaire et la fraction "Mono P A". Il faut remarquer que ce rapport est 2,5 fois supérieur à celui déterminé sur les cellules intactes.

L'activité transférasique a ainsi été purifiée 1720 fois avec un rendement de 12 %. Elle ne représente que 0,8 % de l'activité β -D-galactosidasique initiale. La difficulté d'obtenir des quantités importantes d'activité transgalactosylasique provient du fait, outre que cette enzyme est en faible proportion par rapport à l'activité galactosidasique totale, celle-ci est de plus fortement intégrée au niveau membranaire ce qui rend l'extraction très délicate. On peut même considérer que l'extraction n'est pas adaptée à notre problème. On remarquera :

- Un rendement d'extraction très faible obtenu lors des traitements aux ultra-sons (14,2 % de l'activité transférasique est extraite)
- Des différences de comportement chromatographique (échange d'ions) apparaissent en fonction des conditions d'extractions.

Cette hétérogénéité dans le comportement chromatographique, ajouté au faible quantité de matériel enzymatique pouvant être extraite des cellules, nécessite un travail de purification important qui ne se justifie que pour l'étude du système enzymatique moléculaire. Dans le cas d'une production d'oligosaccharides, il est certain qu'on aura intérêt à utiliser le système cellulaire dans son intégralité, bien que dans ce dernier cas, plusieurs β -D-galactosidases puissent intervenir et exprimer leur réactivité en fonction des conditions du milieu.

TABLEAU XVIII :

**TABLEAU RECAPITULATIF DE LA PURIFICATION DU
SYSTEME ENZYMATIQUE RESPONSABLE DE LA
SYNTHESE DES OLIGOSACCHARIDES A pH ACIDE**

A- ACTIVITE HYDROLYTIQUE

	<u>Ext.Cell.</u>	<u>HA 100</u>	<u>QFF 0.1 M</u>	<u>Mono P</u>	<u>Superose 6</u>
Activité totale (U)	1553	187	57,4	18,5	12,02
Rendement (%)	-	12	3,7	1,2	0,80
Activité spécifique (U/mg)	0,92	0,66	5,50	29,3	49,8
Facteur de purification	1,00	0,71	5,98	31,85	54,13

B- ACTIVITE TRANSFERASIQUE

	<u>Ext.Cell.</u>	<u>HA 100</u>	<u>QFF 0.1 M</u>	<u>Mono P</u>	<u>Superose 6</u>
Activité totale (mU)	1272	710	446	237,5	155
Rendement (%)	-	55,8	35,1	18,8	12,2
Activité spécifique (mU/mg)	0,82	2,22	50,2	831,6	1410
Facteur de purification	1,00	2,70	61,2	1014	1720

Rapport (UT/UH .10 ³)	0,82	3,80	7,75	12,82	12,90
------------------------------------	------	------	------	-------	-------

F- PURETE DE LA SOLUTION ENZYMATIQUE

1- IMMUNOELECTROPHORESE (IEP)

L'obtention d'un immunsérum plurispécifique de lapin contre l'extrait cellulaire total nous a permis de suivre la purification du système enzymatique.

Les IEP ont été effectuées selon le protocole expérimental décrit page 51. La figure 15 (page 90) est une illustration d'un suivi de purification par immunoélectrophorèse.

La fraction "Mono P A - Superose 6" réagit contre l'immunsérum total plurispécifique pour ne donner finalement qu'un seul arc de précipitation.

2- CHROMATOGRAPHIE SUR MONO P® (IEE)

Comme il a été précédemment écrit, les éluions en gradient continu de sel ont indiqué que le système enzymatique pouvait avoir un comportement chromatographique variable selon les extractions (présence de pics plus ou moins traînant selon le type de gradient adopté). Ce comportement "aléatoire" peut souligner une hétérogénéité de la fraction protéique porteuse de l'activité transgalactosylasique.

3- ELECTROPHORESE EN CONDITIONS NON DENATURANTES

Cette électrophorèse est réalisée en gel de polyacrylamide selon le protocole décrit page 50. Elle permet la séparation des différentes protéines en fonction de leur charge et éventuellement de leur masse moléculaire.

Les résultats obtenus sont illustrés par la figure 16 page 91.

On remarque dans ces conditions que la fraction transgalactosylasique pénètre difficilement dans le gel d'électrophorèse ce qui implique une masse moléculaire importante. Le découpage du gel après électrophorèse permet de mettre en évidence que la fraction "Mono P A- Superose 6" est homogène : superposition de la bande de protéine (Coomassie) et de l'activité hydrolytique (pNP- β -Gal).

Lors de la détermination des paramètres de l'enzyme, l'homogénéité enzymatique de cette fraction a été vérifiée après transfert sur feuilles de nitrocellulose selon le protocole décrit page 50.

4- ELECTROPHORESE EN CONDITIONS DENATURANTES (SDS-PAGE)

Les électrophorèses sont réalisées en gel de polyacrylamide 5-15 % en présence de SDS et de β -mercapto-éthanol selon le protocole décrit page 49. Les SDS-PAGE permettent une séparation des protéines en fonction de leur masse moléculaire. La relation linéaire existant entre le logarithme de la masse moléculaire et le coefficient de migration (Rf) des protéines nous a permis de déterminer graphiquement la masse moléculaire apparente des différentes sous-unités.

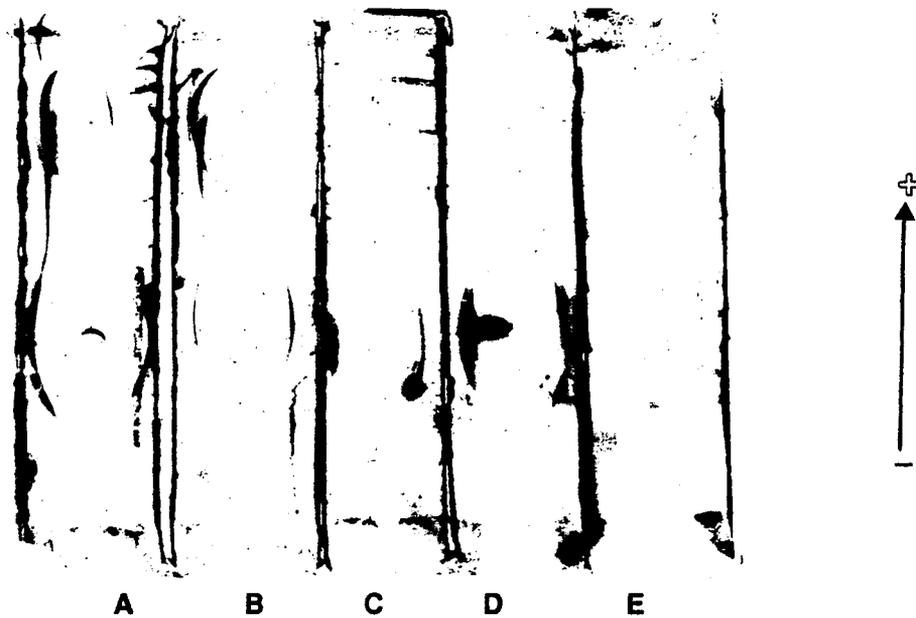
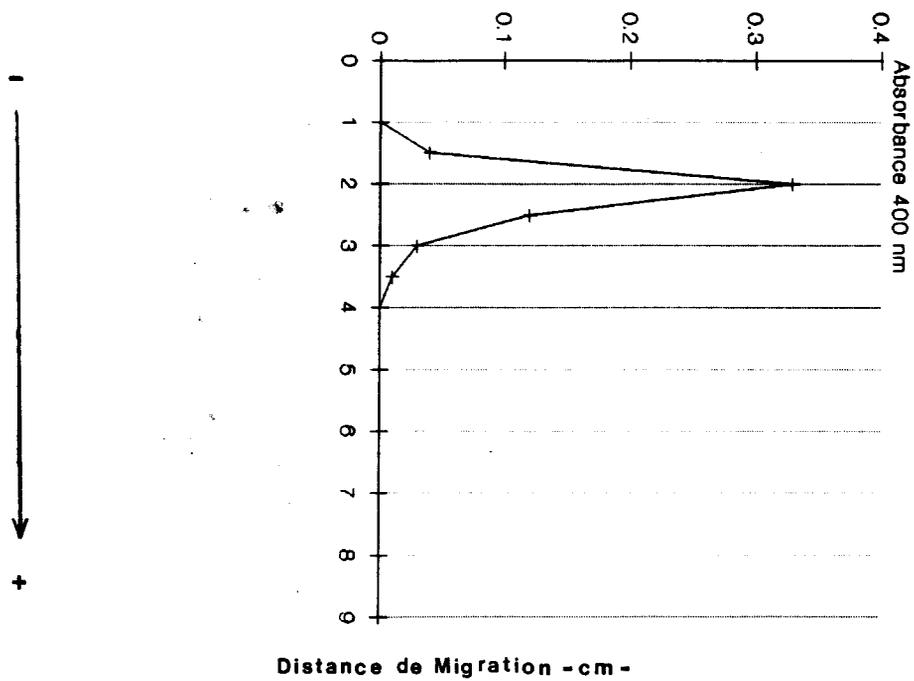


Figure 15 : Immunoélectrophorèse des différentes fractions enzymatiques contre un antiserum plurispécifique (anti-extrait cellulaire)

(électrophorèse en gel d'agarose à 0,9 % en tampon véronal sodique pH 8,2 : 4 volts / cm ; 2 heures , Immunodiffusion : 24 h en chambre humide)

- A- Extrait cellulaire total
- B- Fraction "HA 100"
- C- Fraction "QFF 0,1M"
- D- Fraction "Mono P A"
- E- Fraction "Superose 6"



A

B

Figure 16 : Electrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions non dénaturantes de la transgalactosylase purifiée.

FRACTION "Superose 6"

A-Révélation au bleu de Coomassie

B- Révélation de l'activité hydrolytique après découpage du gel

La figure 17 page 93 illustre les résultats obtenus lors de la purification de la transgalactosylase.

La fraction "Mono P A" colorée au bleu de Coomassie révèle quatre bandes majeures de masse moléculaire 190 000 ; 178 000 ; 170 000 et 163 000 daltons, en présence ou en absence de β -mercapto-éthanol.

Il faut signaler, cependant, qu'il est possible d'obtenir des profils différents quant aux nombres de bandes et aux valeurs de masses moléculaires selon les extractions. Ces variations n'entraînent pas pour autant de différences au niveau de l'activité spécifique des enzymes.

Cela tend à prouver que nous sommes en présence d'un système enzymatique pluricaténaire possédant plusieurs sous-unités.

CONCLUSIONS :

Le protocole de purification a permis d'obtenir une solution enzymatique homogène : seule la β -D-galactosidase présente dans la fraction "Mono P A" est responsable de la synthèse à pH acide des nouveaux oligosaccharides.

Cette activité enzymatique doit exister sous forme d'un complexe enzymatique de haute masse moléculaire, renfermant au moins quatre sous-unités protéiques différentes non reliées par des ponts disulfures.

Cette hétérogénéité des constituants protéiques n'entraîne aucune modification de la réactivité enzymatique.

Dans l'optique d'obtention d'une solution protéique présentant une meilleure homogénéité, divers supports chromatographiques ont été essayés (Octyl sépharose, phényl sépharose, chélate sépharose, chromatographie d'affinité sur lactose ou lactulose sépharose) sans qu'aucune de ces méthodes ne permettent ni une amélioration quant à l'augmentation des facteurs de purification ou la simplification de l'agencement moléculaire.

Pour le moment, nous ne savons pas si l'hétérogénéité constatée est prétraductionnelle ou post-traductionnelle.

Lors de la détermination des différents paramètres physico-chimiques et enzymatiques de la "transgalactosylase", seule la fraction "Mono P A" a été étudiée.

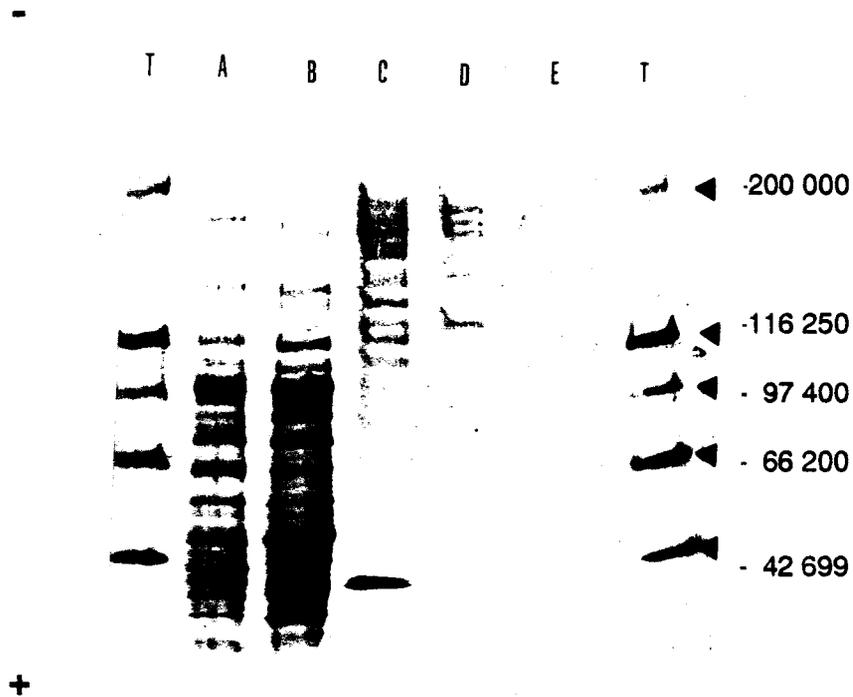


Figure 17 : Electrophorèse en gel de polyacrylamide (5-15%) en conditions dénaturantes.

T : Témoins de masses moléculaires ;

A : Extrait cellulaire ;

B ; Fraction "HA 100" ;

C : Fraction "QFF 0,1M" ;

D : Fraction "Mono P A" ;

E : Fraction "Superose 6".

IV- CARACTERISATION DE LA TRANSGALACTOSYLASE

A- DETERMINATION DES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES

1- MASSE MOLECULAIRE

Lors de la détermination de la pureté du système enzymatique, les contrôles effectués en SDS-PAGE et en électrophorèse non dénaturante nous ont indiqué la possibilité d'être en présence d'un complexe enzymatique de haute masse moléculaire.

La transgalactosylase purifiée (fraction "Mono P A") possède une masse moléculaire apparente de 362 000 daltons en chromatographie sur colonne de TSK HW 55 S.

En SDS-PAGE, cette fraction se décompose majoritairement en quatre bandes de masses moléculaires de 163 , 170, 178 et 190 KDa.

On remarquera une très grande différence entre les valeurs trouvées par gel filtration et par SDS-PAGE. On ne peut pas imaginer que la fraction "Mono P A" soit composée de 4 sous unités : la masse moléculaire obtenue serait alors de 700 KDa, soit le double de ce qui est déterminée par gel filtration. On ne peut pas invoquer une interaction aussi importante entre la transgalactosylase et la matrice de chromatographie. Les quatre bandes obtenues en SDS-PAGE apparaissent comme étant en même concentration, ce qui permet de minimiser les modifications de conformation par attaque protéolytique. Nous pensons que la fraction "Mono P A" pourrait être l'assemblage de deux sous-unités dont la masse moléculaire globale serait de l'ordre de 350 KDa. Dans cette hypothèse, il y aurait assemblage des sous-unités à 163 KDa et 190 KDa et des sous-unités à 170 KDa et 177 KDa. Cet assemblage différent pourrait provenir de leur lieu d'insertion membranaire.

2-DETERMINATION DU POINT ISOELECTRIQUE

Cette étude a été faite par chromatofocalisation sur colonne Mono P[®] sous les conditions décrites page 52.

L'activité transgalactosylasique se retrouve sous la forme de deux fractions actives présentant un point isoélectrique à 5,00 et 5,25.

La fraction la plus importante (pI = 5,00) représente 0,8 % de l'activité hydrolytique initiale.

3- STABILITE DU SYSTEME ENZYMATIQUE

a- Stabilité au pH

La détermination de la stabilité du complexe enzymatique a été menée à 37°C pendant 4 heures en présence ou en absence de lactose et de calcium. Les résultats déterminés en fonction de l'hydrolyse du pNP-β-D-Gal et exprimés en activités relatives sont illustrés sur la figure 18 page 95.

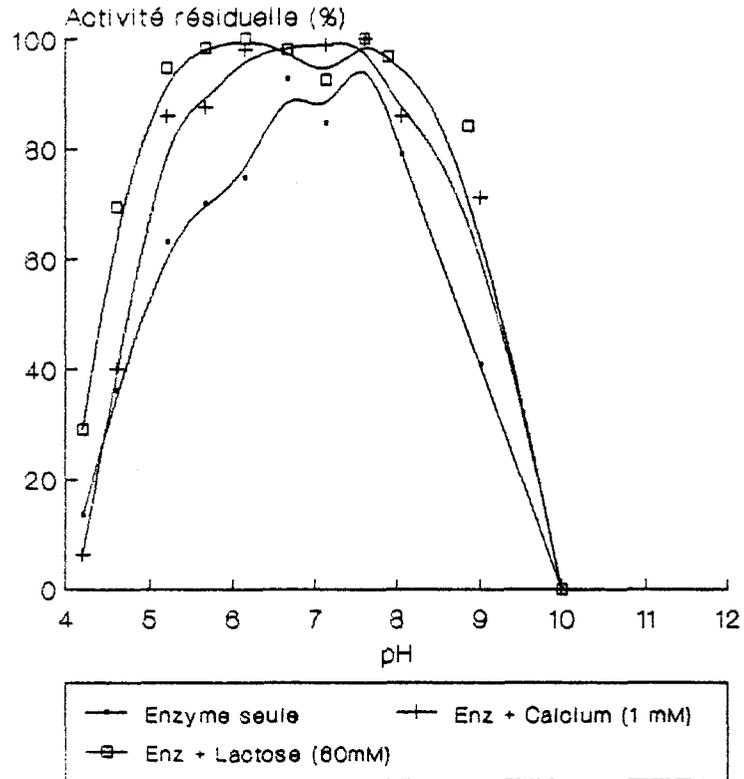


Figure 18 : Stabilité du système enzymatique en fonction du pH

-Effet protecteur du calcium et du lactose-

La transgalactosylase est pré-incubée 4 heures dans des tampons Citrate/Phosphate / Véronal de sodium .

L'enzyme seule est stable à neutralité (pH 7,0-7,5), alors qu'en présence de calcium sa zone de stabilité est élargie. Le lactose montre un effet protecteur plus fort que le calcium et notamment vers les pH plus acides. Ainsi à pH 5,20 ; 94,7 % de l'activité est conservée après 4 heures d'incubation en présence de lactose et seulement 67 % si l'enzyme est incubée seule.

b- Stabilité à la température

Des cinétiques de préincubation à différentes températures ont été faites en présence et en absence de lactose et de calcium.

La figure 19 page 97 illustre les résultats obtenus. L'enzyme est stable jusqu'à des températures de l'ordre de 45°C .

Par contre pour des températures supérieures à 45°C, la perte d'activité est sensible. A 55°C, l'enzyme est complètement inactive après 1 heure d'incubation. La représentation linéaire [Log (% activité hydrolytique) = f(Temps)] montre que la dénaturation est une cinétique d'ordre 1. La molécule se dénature de façon uniforme. Cela sous entend : que les différentes sous-unités de la transgalactosylase possèdent la même stabilité thermique, ou que la sous-unité porteuse de l'activité biologique est dénaturée indépendamment du reste de la molécule.

L'action du substrat et du calcium a en outre, été étudiée (cf figure 20 page 97).

La présence du substrat permet de stabiliser l'enzyme d'une façon très importante. Ainsi après trois heures de préincubation à 50°C, l'activité résiduelle en présence de lactose est de 98,5 % et seulement 62,5 % en présence de calcium. L'enzyme seule a perdu 75 % de sa réactivité.

Ces résultats sont en accord avec ceux décrits dans la littérature quant à l'effet stabilisant des sucres, des polyols ou des substrats enzymatiques sur la structure protéique (11, 23, 64).

c- Stabilité à la congélation

Dans un souci de conserver l'activité enzymatique purifiée durant des temps plus long, la stabilité de la solution enzymatique vis-à-vis de la congélation a été testée.

L'enzyme a ainsi été soumise à plusieurs cycles de congélation -décongélation en présence et en absence de glycérol à 25 % (v/v).

Le complexe enzymatique s'est en fait révélé très peu stable car après seulement une seule congélation, avec ou sans glycérol, la perte d'activité était supérieure à 80 %.

L'enzyme a été conservée à + 4°C durant plusieurs semaines sans observer de perte sensible de l'activité hydrolytique.

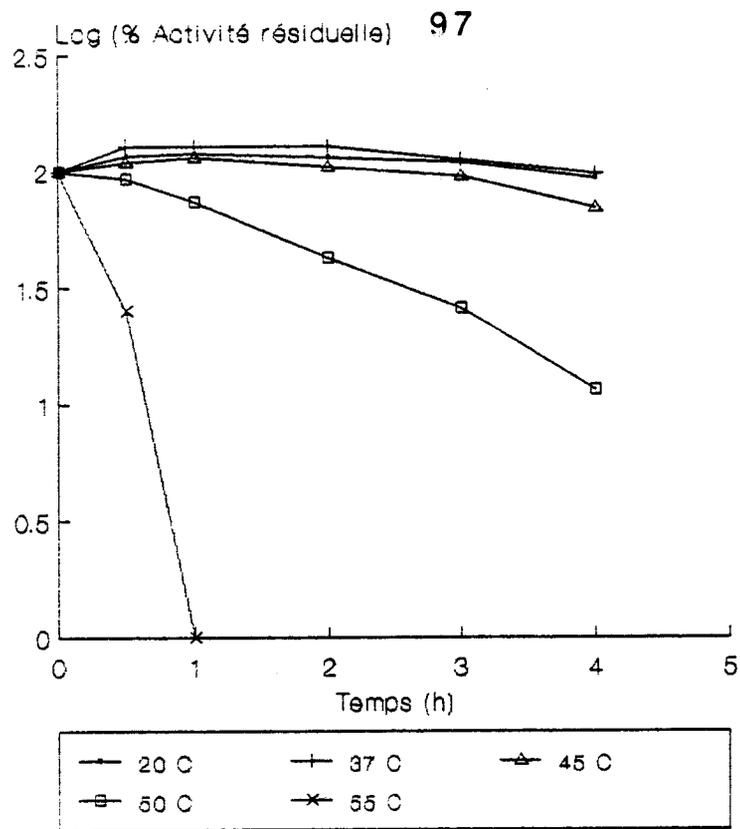


Figure 19 : Stabilité du système enzymatique en fonction de la température

Les cinétiques de stabilité sont effectués à différentes températures. L'activité mesurée est l'activité hydrolytique sur pNP- β -Gal à pH 6,5

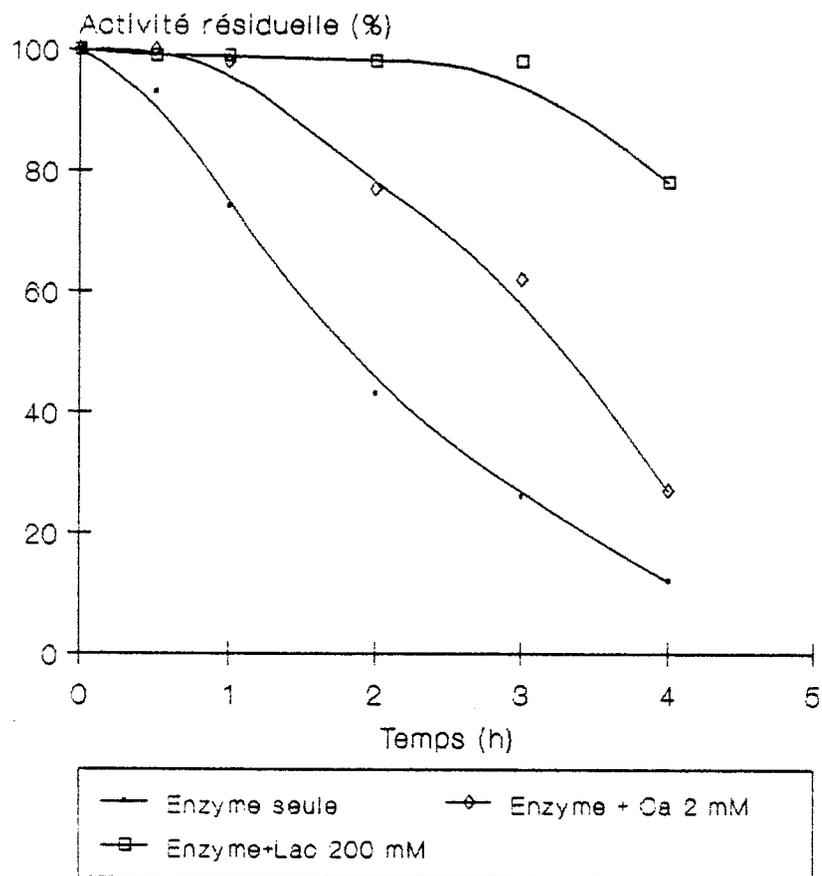


Figure 20 : Effet protecteur du calcium et du lactose sur la transgalactosylase à 50°C

B- DETERMINATION DES PARAMETRES ENZYMATIQUES

Certains paramètres enzymatiques ont été déterminés sur les cellules intactes afin d'optimiser la production d'oligosaccharides. Nous avons voulu vérifier la valeur de ces paramètres sur l'enzyme purifiée.

1- pH OPTIMAUX D'HYDROLYSE ET DE TRANSFERT

La détermination des pH optimaux de transfert et d'hydrolyse a été menée en tampon citrate de sodium, phosphate de sodium et véronal sodé comme cela a été décrit page 54.

Les valeurs sont regroupées dans le tableau XIX page 99.

Pour la transgalactosylase purifiée, il existe toujours une différence entre les pH optimaux d'hydrolyse et de synthèse.

En effet, l'utilisation de la fraction "Mono P A" à la place soit des cellules ou d'un extrait cellulaire total entraîne un déplacement de l'optimum de pH vers des pH plus neutres. Ce glissement peut s'expliquer par l'élimination de β -D-galactosidases contaminantes capables d'hydrolyser les produits de synthèse.

C'est ce pH optimum (pH 4,80) qui sera utilisé pour la détermination des constantes enzymatiques de l'enzyme vis-à-vis des réactions de transgalactosylation.

2- TEMPERATURES OPTIMALES DE SYNTHÈSE ET D'HYDROLYSE

Les activités ont été mesurées comme cela a été décrit page 54 dans les conditions optimales de pH pour le transfert ou l'hydrolyse.

Les résultats obtenus sur les cellules et la fraction "Mono P A" sont résumés dans le tableau XX page 99.

Comme cela a déjà été observé lors de l'optimisation de la production d'oligosaccharides avec les cellules intactes (page 61), la température optimale de transfert (45°C) de la fraction "Mono P" est supérieure à la température optimale d'hydrolyse (37°C) à pH 4,8. Nous ne reviendrons pas sur les comparaisons avec la littérature.

Cependant, on peut noter que la différence entre les températures optimales d'hydrolyse et de transfert est plus élevée pour le système enzymatique purifié que pour les cellules ou l'extrait cellulaire.

Pour expliquer cette augmentation de température de 40°C à 45°C, on peut émettre deux hypothèses :

a- lorsque le système enzymatique est purifié, son environnement est modifié.

b- Le système non purifié est en présence d'autres galactosidases dont les températures optimales sont plus élevées (7). La purification permet d'éliminer ces contaminants capables d'hydrolyser les produits de transfert comme nous le verrons dans un chapitre ultérieur.

TABLEAU XIX :

**pH OPTIMUM D'HYDROLYSE ET DE TRANSFERT DE LA
FRACTION ENZYMATIQUE TOTALE ET PURIFIEE**



	TYPE DE LA REACTION		
	HYDROLYSE		TRANSGALACTOSYLATION
	Substrat		Substrat
	pNP-β-D-Gal	Lactose	Lactose
Cellules	6,50	6,50	4,40
Fraction "Mono P A"	6,00 (6,50 *)	6,50	4,80

* en tampon phosphate de sodium 100 mM pH 6,5

**TABLEAU XX : TEMPERATURES OPTIMALES DE TRANSFERT ET
D'HYDROLYSE DE LA FRACTION ENZYMATIQUE
TOTALE ET PURIFIEE**

	TYPE DE LA REACTION		
	HYDROLYSE		TRANSGALACTOSYLATION
	Substrat		Substrat
	pNP-β-Gal	Lactose	Lactose
Cellules	37°C	37°C*	40°C
Fraction "Mono P A"	39°C	37°C*	45°C

* Essais effectués au pH optimum de transfert soit pH 4,4 pour les cellules et pH 4,8 pour la fraction purifiée

La température de 45°C a été utilisée pour la détermination des différents paramètres enzymatiques de la réaction de transgalactosylation.

3- DETERMINATION DES PARAMETRES ENZYMATIQUES K_m ET V_m DES ACTIVITES HYDROLYTIQUES ET TRANSGALACTOSYLASIQUES

a- Détermination de K_m et V_m sur le pNP- β -D-Gal et le lactose

Cette étude a été réalisée avec ces deux substrats à pH 6,5 sous les conditions décrites page 55. Les représentations de HANES ($[S]/V = f ([S])$) ont donné les résultats suivants :

- avec le pNP- β -D-Gal $K_m = 2,2 \text{ mM}$
 $V_m = 3,04 \text{ } \mu\text{moles / min}$
- avec le lactose $K_m = 13 \text{ mM}$
 $V_m = 2,70 \text{ } \mu\text{moles / min}$

Ces deux derniers paramètres sont déterminés en mesurant la libération de glucose ou de galactose.

La β -D-galactosidase est plus affine envers le substrat synthétique que vis-à-vis de son substrat naturel. Sa réactivité est 8 fois plus élevée pour le substrat synthétique par rapport au lactose.

b-détermination des paramètres enzymatiques sur l'activité transférasique à partir de lactose

Cette étude a été réalisée à pH 4,8 et à 45°C en présence de concentration en lactose variant de 50 à 400 mM.

Jusqu'à ces concentrations, la quantité de produit formé est proportionnelle à la quantité de substrat. La représentation de LINEWEAVER et BURK (figure 21, page 101) nous a permis de déterminer un K_m et un V_m pour cette activité :

$$K_m = 800 \text{ mM}$$

$$V_m = 470 \text{ nmoles de trisaccharide synthétisé / min}$$

L'affinité est 60 fois plus faible dans cette réaction par rapport à une hydrolyse normale.

Cette perte d'affinité de l'enzyme en réaction de transgalactosylation peut être due :

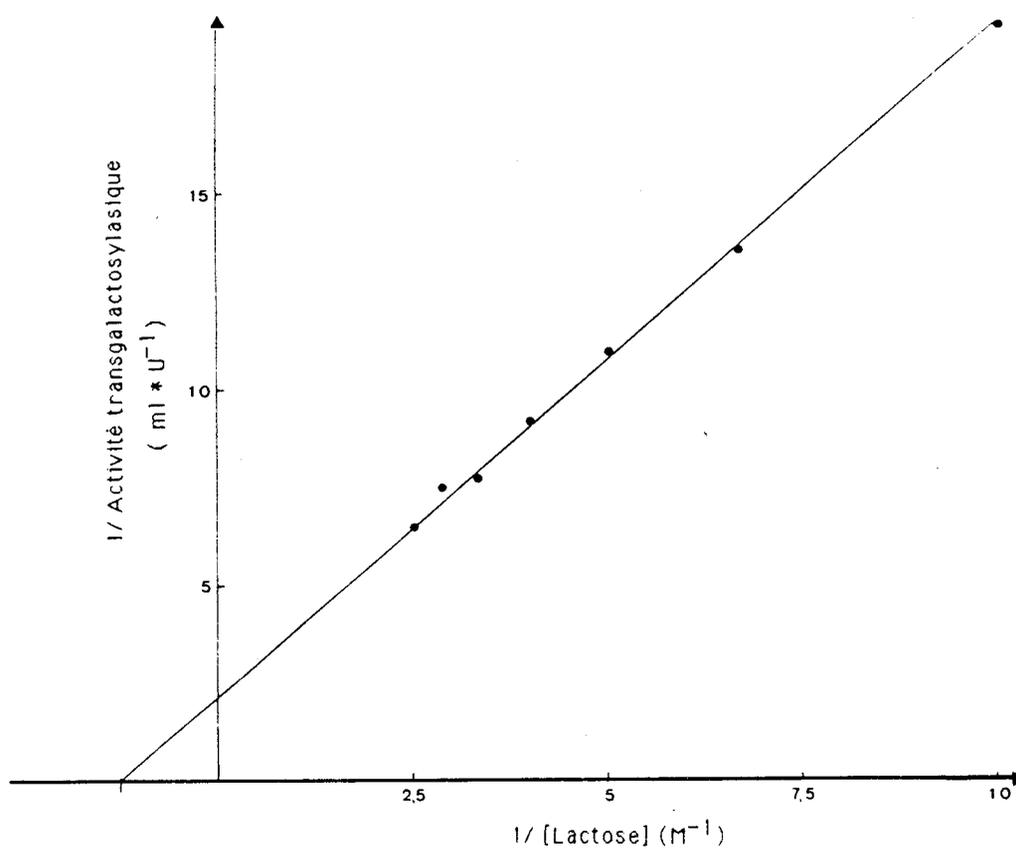


Figure 21 : Transgalactosylase "Mono P A" :

-Détermination de K_m et de la V_m -

L'activité transgalactosylasique a été mesurée après 4 heures d'incubation à pH 4,8 et à 45°C. La représentation de LINEWEAVER et BURK a été préférée à celle d' HANES afin de pouvoir déterminer le K_m élevé.

a- au fait que la réaction de transfert s'effectue à un pH plus acide entraînant une modification de conformation de l'enzyme.

b- à la nécessité d'avoir une concentration importante en lactose pour pouvoir initier la réaction de transglycosylation. Il est nécessaire d'avoir au moins deux molécules de lactose présentes au niveau du site de catalyse pour obtenir une molécule de trisaccharide.

En fait la première explication s'est avérée fautive, car lors de différents essais de détermination de K_M et de V_m sur le substrat synthétique et en modifiant les paramètres (pH et température) indépendamment, l'affinité de l'enzyme pour son substrat n'est que peu modifiée.

A notre connaissance, aucun paramètre enzymatique concernant la réaction de transgalactosylation n'a encore jamais été publié.

Pour vérifier si la variation de cette constante était due uniquement à une perte d'affinité de l'enzyme pour son substrat, une détermination de K_M et V_m , basée sur la libération de galactose et de glucose dans les conditions optimales de transfert a été effectuée. La représentation de HANES a donné les résultats suivants :

- Galactose	$K_M = 7 \text{ mM}$
	$V_m = 0,250 \text{ } \mu\text{mole} / \text{min}$
- Glucose	$K_M = 29,5 \text{ mM}$
	$V_m = 0,435 \text{ } \mu\text{mole} / \text{min}$

Plusieurs remarques sont à faire :

a- les K_M sont différents selon que l'on dose le galactose ou le glucose. Ils sont en outre différents de celui déterminé sous les conditions optimales d'hydrolyse.

b- les vitesses maximales de réaction montrent une grande disparité.

L'interprétation de ces paramètres se justifie puisque si le glucose s'accumule dans le milieu et rend compte de la réaction d'hydrolyse, il n'en est pas de même du galactose qui se trouve transféré sur le lactose ou les oligosaccharides.

Dans le cas du dosage du galactose, l'affinité pour le lactose augmente, mais la réactivité diminue.

4- INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN LACTOSE SUR DES CINÉTIQUES DE RÉACTION

La détermination des paramètres enzymatiques et en particulier du K_M montre clairement que la quantité de produits synthétisés est fortement dépendante de la concentration en lactose. Ceci nous a amené à étudier les effets de la concentration en

substrat sur des cinétiques réactionnelles selon les conditions opératoires décrites page 57.

Nous avons utilisé les "culots" membranaires pour effectuer ce type d'étude. Ils renferment des galactosidases et la majeure partie de l'activité transférasique. Ceci nous oblige à travailler à pH 4,25 de façon à inhiber l'activité des galactosidases ne possédant pas d'activité transférasique.

Trois concentrations en lactose ont été utilisées : 100 (A), 250 (B) et 400 (C) mM, correspondant à 1 ; 2,5 et 4 mmoles d'équivalent lactose, des prélèvements ont été effectués à des temps différents variant de 30 minutes à 48 heures.

Les résultats obtenus lors de cette étude sont exprimés dans les figures 22 A ; 22 B et 22 C pages 104-105.

Les trois courbes montrent des profils de production des galacto-oligosaccharides similaires :

- un déficit en galactose par rapport au glucose.
- une production rapide d'oligosaccharide suivi par une hydrolyse de ces mêmes produits de transfert.

De plus, ces cinétiques nous permettent d'examiner la relation pouvant exister entre la quantité de produits de transfert et la concentration initiale en lactose.

Ainsi après deux heures d'incubation, la quantité d'oligosaccharides synthétisés dans les différents milieux représente respectivement pour les concentrations (A), (B) et (C) : 6,5 ; 10,2 et 9,8 % du lactose initial soit exprimée en μ mole de trisaccharide : 46 ; 178 et 275 μ moles.

Au maximum de production des oligosaccharides, ces chiffres sont encore plus significatifs : l'incubat A (100mM) atteint son maximum après 2 heures avec 46 μ moles de trisaccharide. Pour l'incubat B, après 3 heures d'incubation, les oligosaccharides synthétisés représentent 11 % des sucres totaux soit 192 μ moles d'équivalent trisaccharide. L'incubat C voit son maximum de production atteint après 5 heures d'incubation et représente 14,8 % des saccharides totaux ce qui équivaut à 417 μ moles d'équivalent trisaccharide.

Ces valeurs, résumées sur la figure 23 page 107, illustrent la proportionnalité existant entre la réaction de transgalactosylation et la concentration en lactose.

D'autre part, pour une concentration en lactose initiale de 100 mM, la totalité des galactosides est dégradée après 24 heures de réaction. Cela n'est pas observé après 48 heures en présence de lactose 250 et 400 mM initial. Tous les oligosaccharides ne sont pas hydrolysés et le pourcentage en monosaccharides est

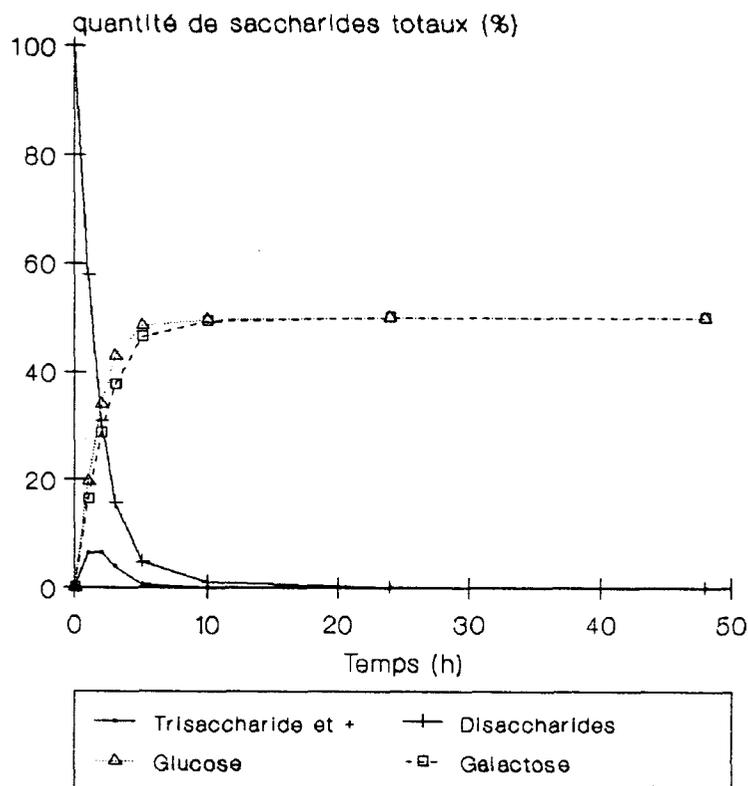
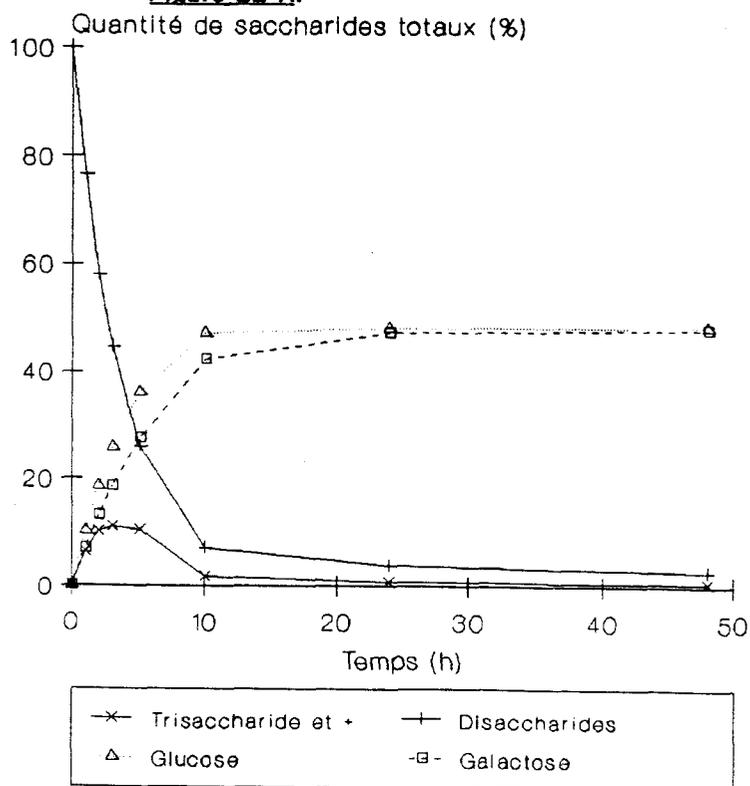
**Figure 22 A:****Figure 22 B:**

Figure 22 : Cinétique enzymatique à différentes concentrations en lactose à pH 4,25 et en présence de culot membranaire

22 A : Concentration en lactose de 100 mM

22 B : Concentration en lactose de 250 mM

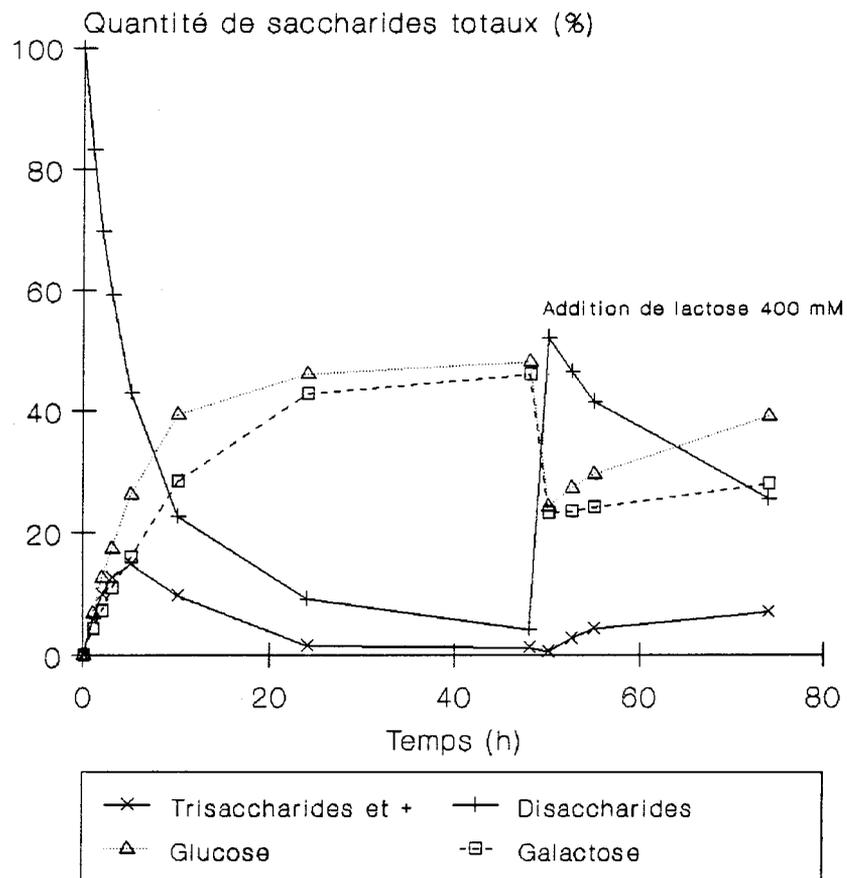


Figure 22 : Cinétique enzymatique à différentes concentrations en lactose à pH 4,25 et en présence de culot membranaire 22 C : Concentration en lactose de 400 mM
Après 48 heures, adjonction de lactose 400 mM

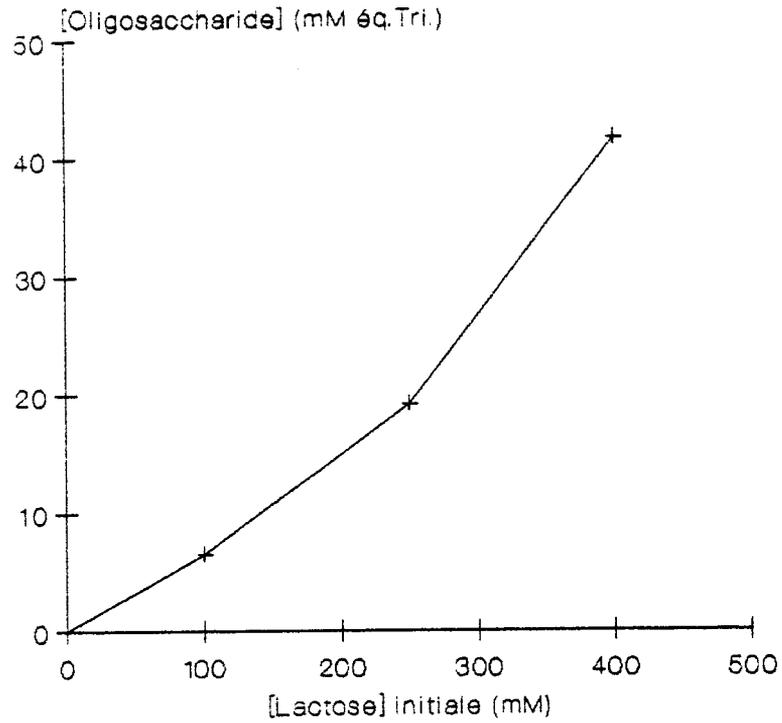


Figure 23 : Influence de la concentration en lactose sur la synthèse des oligosaccharides

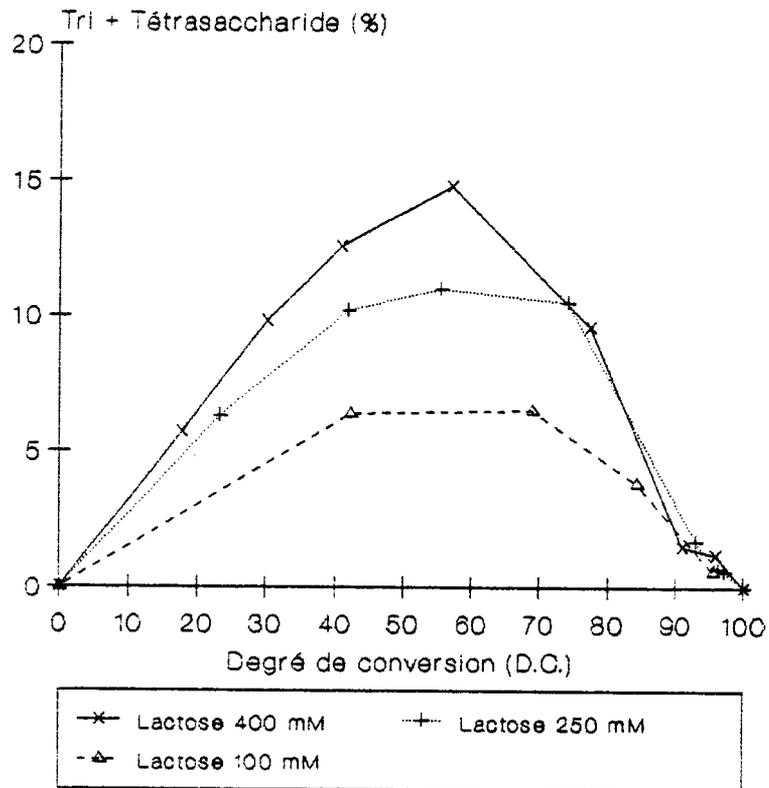


Figure 24 : Production d'oligosaccharides en fonction du degré de conversion des disaccharides

respectivement de 96,5 et 94 % pour B et C.

Pour vérifier si la réaction est régie par un équilibre réactionnel ou si le système enzymatique est dénaturé, du lactose 400 mM (v/v) a été ajouté à l'incubation C après 48 heures (figure 22 C, p.105).

Une relance de l'hydrolyse et de la réaction de transfert (plus lente) indique clairement l'intégrité du système enzymatique et favorise l'hypothèse d'un équilibre réactionnel pour lequel le galactose doit jouer un rôle prépondérant.

La figure 24 page 106 exprime la quantité de produit synthétisé (tri et tétrasaccharide confondus) en fonction du degré de conversion (D.C.) des disaccharides. Ce dernier est calculé selon la formule suivante :

$$\text{D.C.} = \frac{100 - \% \text{ Dis}}{100} \text{ et } \% \text{ Dis} = \text{pourcentage de disaccharide}$$

Pour les trois concentrations étudiées, le maximum de production d'oligosaccharides apparait pour un degré de conversion de l'ordre de 60 %. Cette valeur, est retrouvée lors des cinétiques en présence d'EDTA ou de calcium. Il semblerait que cette valeur soit une constante de l'enzyme et qu'elle soit indépendante de la concentration initiale en lactose.

Elle est plus faible que celles avancées par ROBERTS *et al.*(104) ; HUBER *et al.* (59) ; BURVALL *et al.* (28) et GREENBERG *et al.* (46) qui étaient voisines ou supérieures à 80 %.

BETSCHART *et al.* (16) ont estimé le maximum de production atteint pour des valeurs moindres de 50 à 57 % de conversion et NAKANISHI *et al.*(86) l'ont déterminé pour un taux de conversion du lactose de 40 %.

5- INHIBITION PAR LE GALACTOSE ET LA GLUCOSAMINE

Parmi les monosaccharides testés en tant qu'accepteur potentiel de résidu galactosylé, certains se sont avérés modifier la réactivité du système enzymatique vis-à-vis du lactose et du pNP-β-Gal. Deux inhibiteurs ont été étudiés : le galactose et la glucosamine.

a- Le galactose

L'action inhibitrice du galactose sur les β-D-galactosidases a souvent été répertoriée dans la littérature. La fraction "Mono P A", porteuse de l'activité transférasiq ue est, elle aussi, sensible à ce monosaccharide libéré lors de l'hydrolyse.

L'inhibition est de type compétitif. Le K_I est égal à 25,5 mM vis-à-vis de l'activité hydrolytique en présence de substrat synthétique.

b- La glucosamine

Moins courante est l'inhibition par cette osamine. Pour la fraction "Mono P A", l'inhibition observée est aussi de type compétitif.

La constante d'inhibition a été déterminée avec des concentrations en glucosamine de 10 à 100 mM.

Le K_I de la glucosamine est égal à 68 mM vis-à-vis de l'activité hydrolytique en présence de substrat synthétique.

Nous avons constaté une action activatrice de la N-acétyl galactosamine sur l'activité hydrolytique du lactose et du pNP- β -D-gal au pH optimum d'hydrolyse. Cette activation est encore plus sensible au pH de la réaction de transgalactosylation. Cette réactivité n'a pas été étudiée.

6- ACTION DES EFFECTEURS

Les effecteurs ont été étudiés selon la méthodologie décrite page 56. L'action des différents cations et de l'EDTA sur l'activité hydrolytique (pNP- β -D-Gal et lactose) et transférasique est reportée sur la figure 25 page 109.

La première constatation est le rôle activateur joué par le calcium au cours de l'hydrolyse.

Dans les conditions optimales de température et de pH, l'hydrolyse du pNP- β -Gal est augmentée de 50 %. L'effet de ce cation est encore plus marqué dans les conditions réactionnelles de transgalactosylation où l'activité hydrolytique est multipliée par un facteur supérieur à 2. Par contre, la réaction de transgalactosylation est diminuée par un facteur 2.

Dans un degré moindre, l'action du manganèse est identique à celle du calcium. Lors de l'hydrolyse, le gain est de 26 % et lors de la réaction de transfert, la perte est de 13 %.

Le magnésium et le zinc sans d'effet notable sur l'une ou l'autre des activités. Les métaux lourds comme l'étain et surtout le mercure inhibe le système enzymatique.

Enfin, il faut souligner le rôle non négligeable de l'EDTA sur les deux activités enzymatiques exprimées par la β -D-galactosidase de la fraction "Mono P A".

Il entraîne un effet antagoniste à celui du calcium en diminuant de 30 % l'activité hydrolytique de l'enzyme sur le substrat synthétique à pH 6,5.

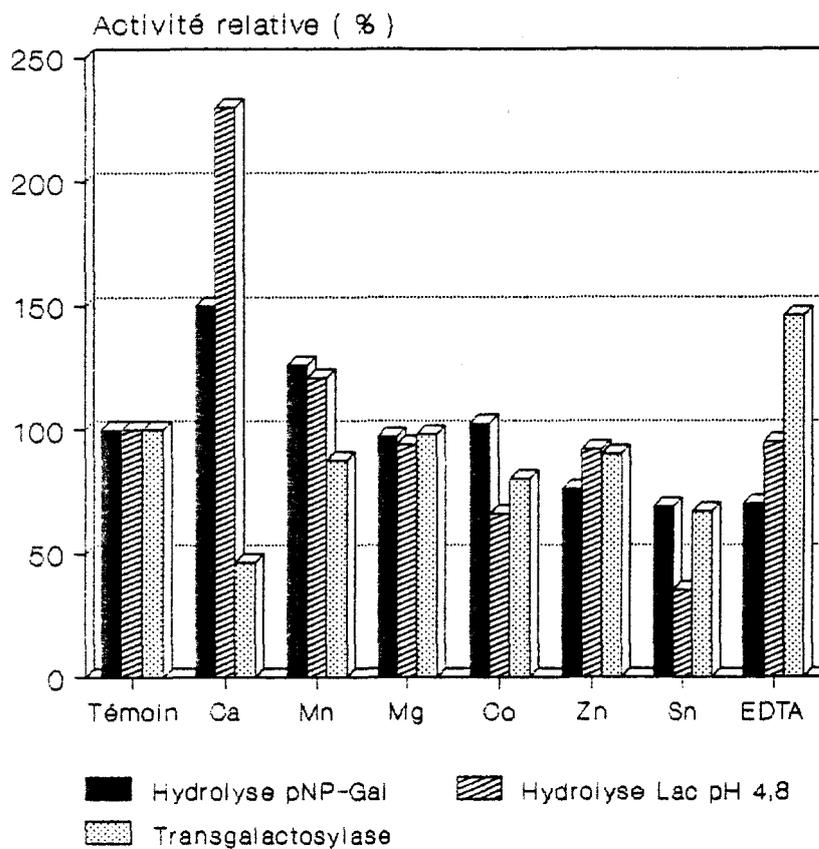


Figure 25 : Influence des cations (2,5mM) et de l'EDTA (5 mM) sur les activités hydrolytique et transgalactosylasique

Par contre, son action lors de l'incubation de l'enzyme en présence de lactose à pH acide (pH ne favorisant pas les interactions entre le cation et le chélateur) est importante car il entraîne une augmentation de plus de 45 % de l'activité transférasique tout en maintenant l'activité hydrolytique (la perte n'est que de l'ordre de 5 %).

Afin de mieux comprendre l'action de ces deux principaux effecteurs - Calcium et EDTA - une étude plus complète vis-à-vis de l'activité hydrolytique et transférasique a été menée.

a- Influence du calcium et de l'EDTA sur le pH optimum d'hydrolyse

Dans le système tampon citrate / phosphate/ véronal de sodium, le pH optimum d'hydrolyse de la β -D-galactosidase porteuse de l'activité transgalactosylasique est de pH 6,0. La modification de la réaction de synthèse en présence de ces deux effecteurs, nous a conduit à vérifier si l'adjonction du métal ou du chélateur dans le milieu pouvait changer la réactivité du système enzymatique en fonction du pH.

Les résultats de cette expérience montrent que seul le calcium déplace légèrement le pH optimum d'hydrolyse pour le ramener vers des pH plus acides (pH optimal = pH 5,55).

Cette variation du pH optimum d'hydrolyse vers le pH optimum de transfert, alliée à une augmentation de l'hydrolyse peut nous amener à penser que les produits de synthèse sont hydrolysés plus rapidement dès leur formation.

L'action de ces deux effecteurs sur les deux activités catalysées par l'enzyme a été comparée.

b- Effet du calcium et de l'EDTA sur l'activité hydrolytique

Les représentations de LINEWEAVER et BURK en présence ou en absence de calcium et d'EDTA sont illustrées respectivement par les figures 26 et 27 pages 111 et 112.

L'activation par l'ion métallique est classique : il augmente la vitesse d'hydrolyse sans modifier l'affinité de l'enzyme pour son substrat.

Par contre l'action de l'EDTA est beaucoup plus discutable car cette molécule a tendance à agir en 2 temps.

Pour de faibles concentrations comprises entre 0 et 15 μ M, il se comporte comme un inhibiteur incompétitif, avec une affinité apparente qui augmente et une diminution de la vitesse de réaction. On peut envisager à ce stade que l'EDTA va venir chélater le calcium du complexe enzyme-substrat.

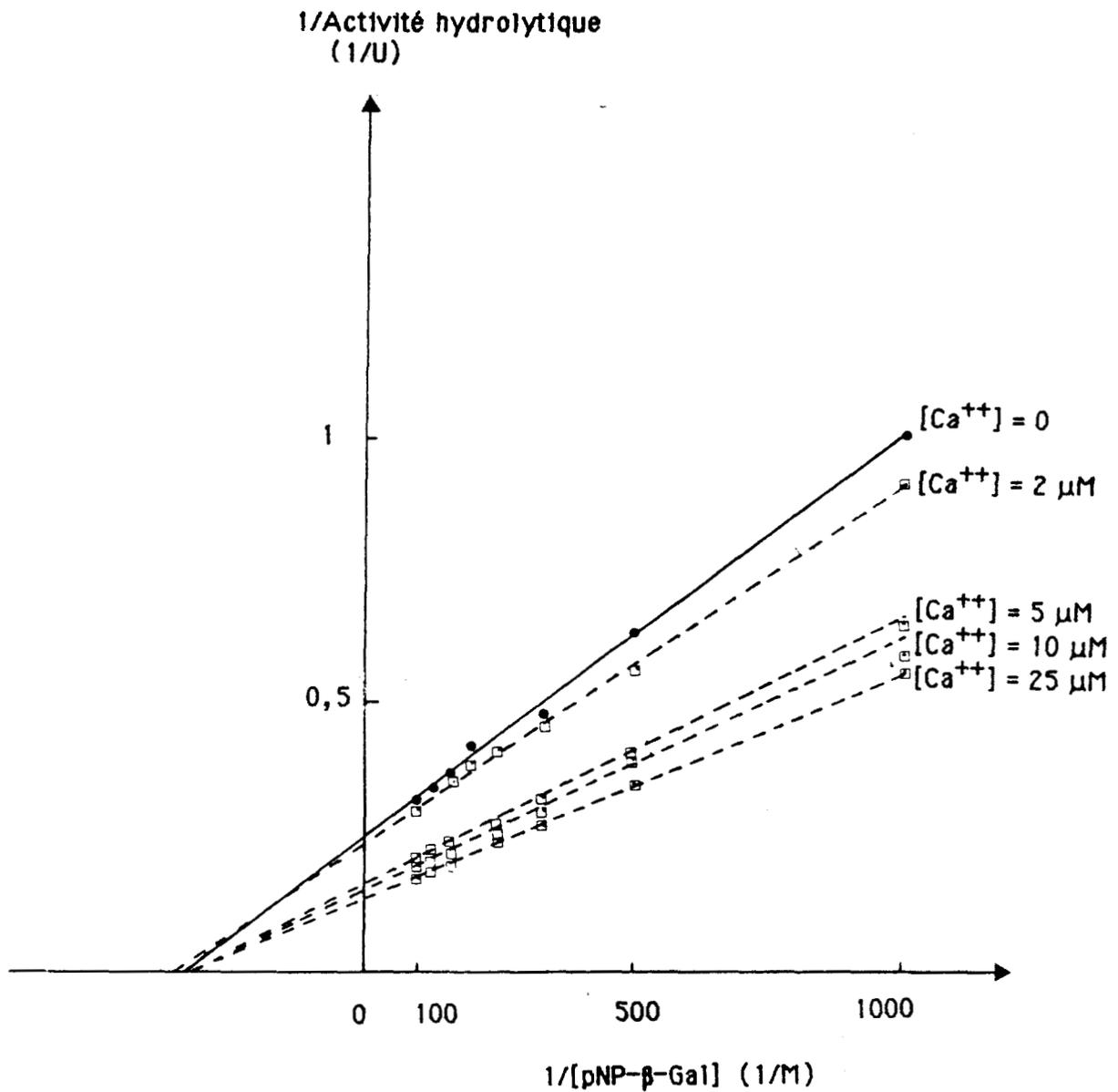


Figure 26 : Influence du calcium sur l'activité hydrolytique :

La transgalactosylase est incubée en présence de différentes concentrations en pNP-β-Gal à pH 6,5 et à 37°C pendant 10 minutes et en présence ou non d'effecteur

————— Témoïn enzyme

- - - - - Enzyme + Calcium (1 à 25 μM)

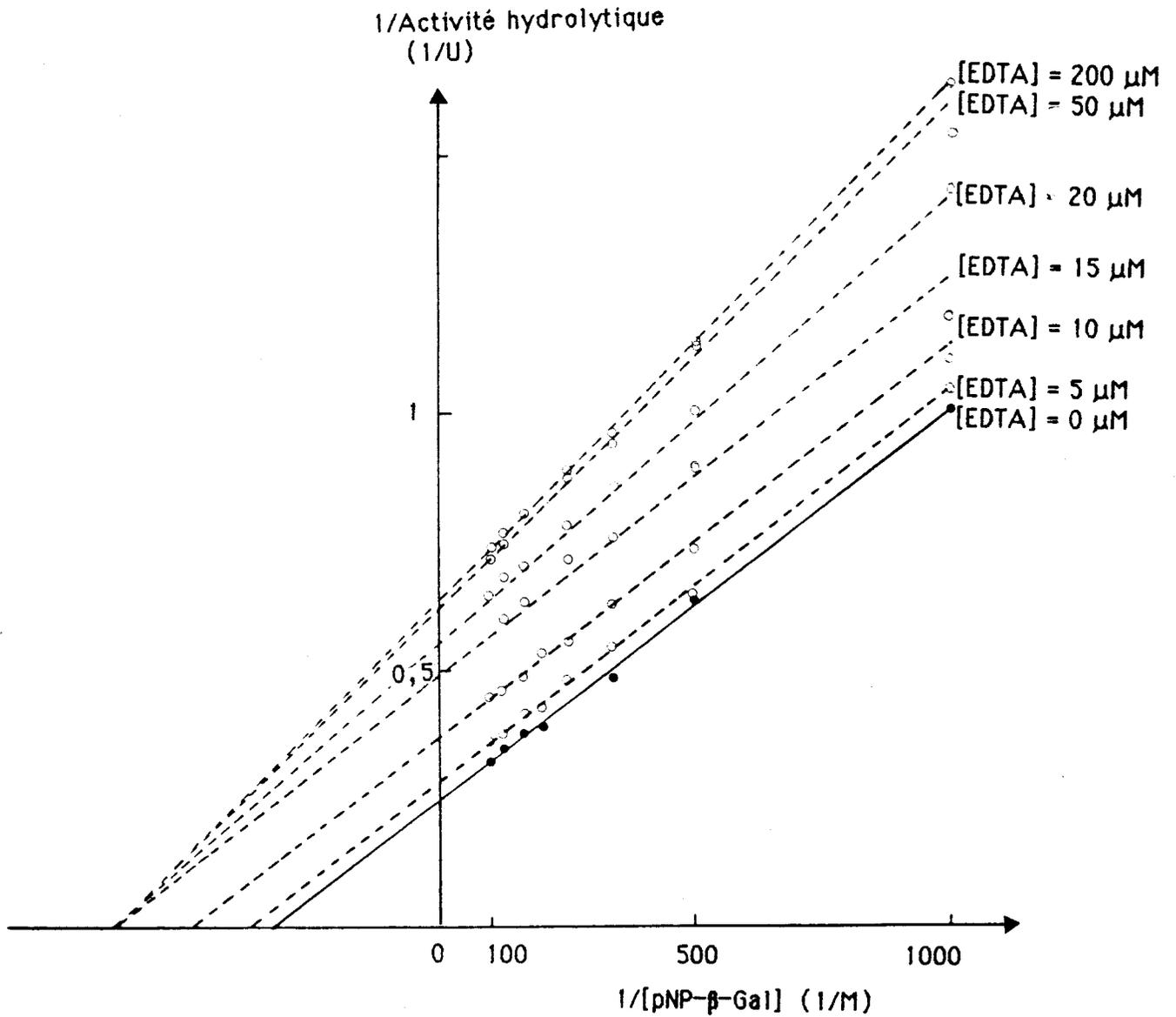


Figure 27 : Influence de l'EDTA sur l'activité hydrolytique :

La transgalactosylase est incubée en présence de différentes concentrations en pNP- β -D-Gal à pH 6,5 et à 37°C pendant 10 minutes et en présence ou non d'effecteur

——— Témoin enzyme

----- Enzyme + EDTA (5 à 200 μ M)

Pour des concentrations plus importantes, comprises entre 15 et 50 μM , l'EDTA possède le comportement d'un inhibiteur non compétitif. On peut émettre l'hypothèse que cette molécule chélate un cation plus fortement associé à l'enzyme, cation modifiant la vitesse de la réaction mais sans effet sur l'affinité de l'enzyme pour son substrat. Au-delà de 50 μM , il n'y a plus de modification des paramètres.

Ainsi, le calcium augmente la vitesse d'hydrolyse (la V_m passe de 1,57 à 7,8 mM) et l'EDTA entraîne une augmentation de l'affinité de l'enzyme vis-à-vis de son substrat (K_m passe de 3,3 mM à 1,6 mM).

c- Effet du calcium et de l'EDTA sur la réaction de transgalactosylation

L'influence des deux effecteurs a été étudiée à pH 4,8 en présence de lactose de façon à déterminer leur action vis-à-vis de la transgalactosylase.

La figure 28 page 114 est une représentation selon LINEWEAVER et BURK de l'activité transférante en fonction de différentes concentrations en effecteur.

L'EDTA qui agit comme un inhibiteur de l'activité hydrolytique se comporte comme un activateur analogue au calcium dans la réaction inverse. L'effet activateur sur la réaction de transfert est peu marqué, on peut expliquer cela d'une part par le fait, qu'en milieu acide, l'interaction entre le calcium ou les ions divalents et l'EDTA (même à forte concentration) est très faible. Il y a de ce fait peu de modification de la teneur en calcium au niveau de l'enzyme. D'autre part, comme l'enzyme se trouve en milieu acide en présence de tampon phosphate et citrate de sodium, qui sont des chélateurs, elle a pu perdre une partie de son calcium avant l'addition de l'EDTA. A ce stade, nous pouvons rappeler que le tampon acétate de sodium, molécule moins chélatrice de métaux que les précédentes, à pH identique, entraînait moins de formation de produits de transfert (cf page 61).

Par contre, le calcium a une action différente selon que l'on se place à forte ou à faible concentration en lactose :

- à faible concentration les deux paramètres (K_m et V_m) sont modifiés
- à forte concentration en substrat, seule la vitesse maximale de formation des trisaccharides est diminuée.

CONCLUSIONS :

Cette étude a permis de mettre en évidence l'importance des ions calcium sur les deux activités transférante et hydrolytique. On remarque :

- a- Augmentation de l'hydrolyse des galactosides
- b- Diminution de l'activité de synthèse.

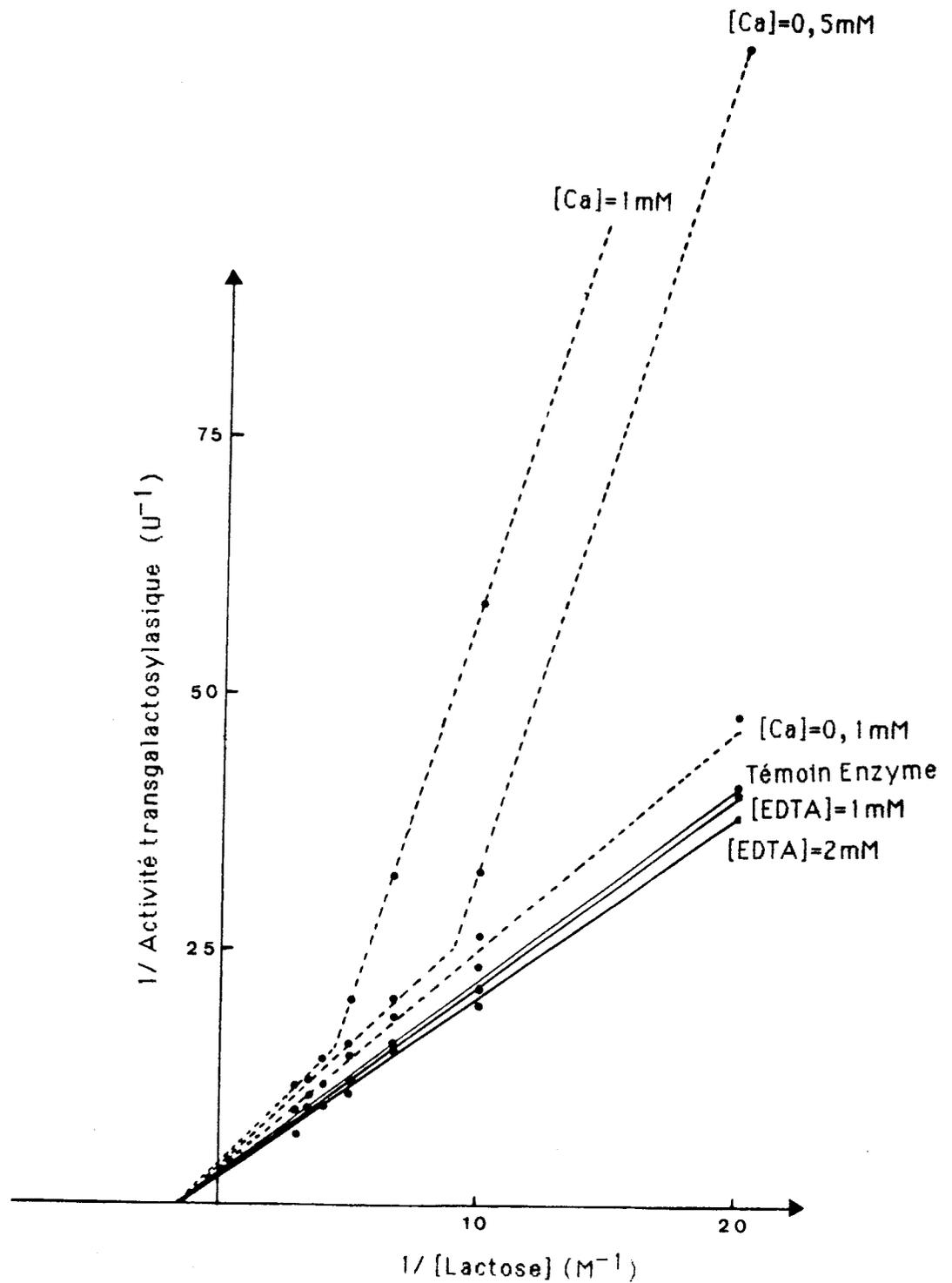


Figure 28 : Influence du calcium et de l'EDTA sur l'activité transgalactosylasique

La transgalactosylase est incubée en présence de différentes concentrations en lactose à pH 4,8 et à 45 C pendant 4 heures avec ou sans effecteur
 Courbes des doubles inverses en présence de différentes concentrations en

calcium (0,1 à 1mM) et d'EDTA (1 et 2 mM)

Des cinétiques enzymatiques en présence de calcium et d'EDTA (5mM) ont permis de vérifier que :

- la formation de galacto-oligosaccharides en présence de calcium n'atteignait jamais le tiers d'une production effectuée en absence de cation.
- le déficit en produits formés ne provient pas de leur hydrolyse accélérée mais bien d'une diminution de leur synthèse.

Ces résultats montrent qu'il existe une relation entre les réactions d'hydrolyse et de synthèse et que ces dernières sont antagonistes : favoriser l'une, entraîne une diminution de la deuxième.

Le calcium produit une modification de conformation des sous-unités du système enzymatique au niveau du site de catalyse (modification de l'affinité) ou à un endroit autre du complexe, et forçant un éloignement entre le site "d'hydrolyse" et le site "accepteur".

Les résultats obtenus avec le calcium et l'EDTA sont identiques à ceux obtenus en faisant varier le pH et la température. Les résultats (tableau XXI p. 116) montre que :

a- la température modifie l'affinité de l'enzyme pour le substrat (diminution du K_m de 3,33 mM à 1,80 mM lorsqu'on passe d'une incubation à une température de 37°C à une température de 45°C). Cette action est analogue à celle de l'EDTA.

b- Le pH modifie les charges des groupements ionisables au niveau du site de catalyse. La V_m est 8 fois plus élevée pour une incubation à pH 6,5 qu'une incubation à pH 4,8 et cela sans intervenir sur l'affinité de l'enzyme vis-à-vis de son substrat.

C- ETUDE DU MECANISME REACTIONNEL

Devant l'incapacité de discerner les disaccharides entre eux par la méthode HPLC, les produits de réaction ont été visualisés par TLC.

La figure 29 page 117 est une illustration d'une cinétique en présence de lactose 400 mM. Elle montre que la production de trisaccharide est rapide. Après 1 heure de réaction, le trisaccharide est en quantité plus importante que les produits d'hydrolyse.

Par contre, la synthèse du disaccharide F.1 (β Gal(1-3)Glc), a lieu après une période d'incubation plus longue (7 heures). Cette synthèse nécessite donc que le glucose libéré atteigne une concentration critique afin de pouvoir servir d'accepteur. Ainsi, contrairement aux observations de HUBER *et al.* (59) pour lesquels l'allolactose est formé dès le début de la réaction par un mécanisme intramoléculaire, la synthèse de ce disaccharide F.1 se produit par un mécanisme intermoléculaire, analogue à celui de la synthèse des oligosaccharides supérieurs tel que le trisaccharide majeur F.3 en utilisant obligatoirement deux molécules :

**TABLEAU XXI : INFLUENCE DE LA TEMPERATURE ET DU PH SUR LES
PARAMETRES ENZYMATIQUES DE L'ACTIVITE
HYDROLYTIQUE DE LA TRANSGALACTOSYLASE**

TEMPERATURE	37°C		45°C	
	4,8*	6,5*	4,8*	6,5*
V _m (U/ml)	1,23	10	0,91	7,40
K _m (mM)	3,33	3,33	1,80	1,80
V _m /K _m	0,37	3,00	0,51	4,11

* pH 4,8 : tampon citrate-phosphate de sodium 100-200mM pH 4,8

* pH 6,5 : tampon phosphate de sodium 100 mM pH 6,5

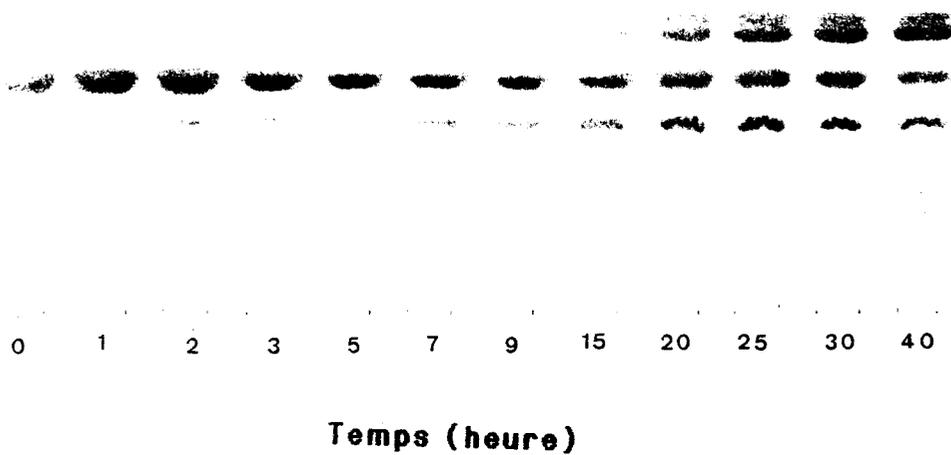


Figure 29 : Chromatogramme des produits de réaction obtenu lors d'une cinétique d'incubation de cellules de *Bifidobacterium bifidum* en présence de lactose

Milieu réactionnel : 2,5 ml de cellules (10 U_{Hydr.}/ml) + 10 ml lactose 500mM en tampon citrate phosphate de sodium 100-200mM pH 4,20.
Prélèvement de 0,4 ml à différents temps et arrêt au bain marie à 80°C.
Après dilution au 1/12,5 , dépôt de 2 µl ; système de migration (cf page 43)

- un donneur : le lactose
- un accepteur : le glucose pour F.1 (le lactose pour F.3)

L'enzyme peut travailler en présence de deux molécules distinctes. Cela nous a incité à regarder si il existait une spécificité au niveau des différents sites possibles de l'enzyme.

1- SPECIFICITE DU DONNEUR

Plusieurs substrats ont été testés, leurs produits de réaction ont été visualisés après 5 heures d'incubation par TLC et révélation à l'orcinol sulfurique. Les conditions opératoires sont exposées page 57.

Toutes les structures renfermant du galactose en position terminale non réductrice sont susceptibles de donner des réactions de transfert. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau XXII page 119

Le galactose libre n'est pas intégré dans des oligosaccharides, même en présence d'un accepteur typique de la réaction de transgalactosylation tel que le glucose. La fraction "Mono P A" n'est pas capable d'effectuer des réactions de réversion quantitatives

2- SPECIFICITE D'ACCEPTEUR

Cette spécificité d'accepteur a été étudiée en présence des deux donneurs potentiels : le lactose et le pNP- β -Gal à des concentrations respectives de 100 et 10 mM.

Des concentrations plus élevées en accepteur (600 mM) sont utilisées pour orienter le greffage des résidus galactosylés sur ces accepteurs.

Les accepteurs utilisés peuvent être divisés en trois catégories :

- Les mono- et oligosaccharides et leurs dérivés, molécules porteuses de plusieurs groupes hydroxylés, qui ont donc plus de possibilités d'accepter un résidu galactosylé
- Les acides aminés hydroxylés : sérine et thréonine (300 mM)
- Les alcools primaires, secondaires ou tertiaires à chaîne carbonée variable.

a- les accepteurs glycosidiques

L'ensemble des résultats obtenus avec ces molécules est répertorié dans le tableau XXIII page 120.

De manière générale, les deux donneurs essayés, le lactose et le pNP- β -D-Gal donnent des résultats identiques pour les réactions de transfert. Le substrat synthétique présente l'avantage de migrer avec le front de solvant ce qui permet de visualiser des produits de transfert possédant des migrations identiques ou voisines

**TABLEAU XXII : SPECIFICITE DU DONNEUR GALACTOSYLE ENVERS
L'HYDROLYSE ET LA REACTION DE
TRANSGALACTOSYLATION**

SUBSTRAT (200mM)	FRACTION " Mono PA "	
	Hydrolyse	Transfert
GALACTOSE	/	-
LACTOSE	+	+
LACTULOSE	+	+
β Gal(1-3) β Gal(1-4)Glc	+	+
β Gal(1-3)Glc	+	+
β Gal(1-6) β Glc	+	+
LACTITOL	+	+
pNP- β -D-Gal (20 mM)	+	+

**TABLEAU XXIII : DETERMINATION DE LA SPECIFICITE ENVERS DES
ACCEPTEURS GLYCOSIDIQUES EN PRESENCE DE
LACTOSE ET DE pNP- β -D-Gal (Fraction "Mono P A")**

T R A N S F E R T

Accepteur (600 mM)	Donneur LACTOSE (100 mM)	Remarques pNP- β -D-Gal (10 mM)
GALACTOSE	ND	+
GLUCOSE	+++	+
MANNOSE	ND	-
FUCOSE	-	-

GlcNAc	-	-
GlcNH ₂	-	- inhibe l'hydrolyse
GalNAc	-	- active l'hydrolyse
GalNH ₂	-	ND [GalNH₂] = 300 mM
DéoxyGal	-	- active l'hydrolyse

CH ₃ -Glc	++++	+++ active l'hydrolyse
CH ₃ -Gal	++++	+++ active l'hydrolyse
CH ₃ -Man	-	-
pNP- α -Glc	+	+ [pNP-α-Glc] = 40 mM
pNP- α -Man	-	- [pNP-α-Man] = 40 mM

XYLOSE	++++	++
FRUCTOSE	-	-

SACCHAROSE	+	+
β -cyclodextrine	-	-

ND : non détecté

de celle du lactose ou de ses produits de réaction, lorsque le substrat naturel est utilisé comme donneur.

La transgalactosylase présente des comportements différents selon les accepteurs glucidiques externes.

Si le glucose et le galactose sont des accepteurs, il n'en est pas de même pour le mannose et le fucose.

Dans le premier cas la non-réaction peut s'expliquer par le fait de la position différente de l'hydroxyle du C₂. L'importance réactionnelle de cette fonction est confirmée par les tests négatifs obtenus en présence des accepteurs tels que la GlcNH₂, la GlcNAc, la GalNAc, la GalNH₂ et du 2 désoxy-D-galactose. Dans ces conditions, il n'y a aucune réaction de transfert bien que l'hydrolyse du donneur se produise toujours. Cependant nous avons remarqué, d'une part que la glucosamine inhibe l'hydrolyse (cf page 108) et d'autre part qu'un phénomène d'activation de cette même hydrolyse se produit lors de l'incubation en présence des dérivés du galactose (GalNH₂ et 2-déoxy-Gal).

Dans le deuxième cas, la non-réactivité en présence du fucose peut s'expliquer soit par la présence d'un radical hydrophobe au niveau du C₆ ou par son appartenance à la série L et sa non reconnaissance par l'enzyme.

Les méthyl-glucoside et galactoside présentent une réactivité beaucoup plus importante que leur monosaccharide vis-à-vis de la réaction de transfert se traduisant par une accélération apparente de l'hydrolyse du donneur. Il faut souligner que la méthyl-oxidation ne permet pas dans le cas du mannose d'instaurer une réaction de transgalactosylation. De la même manière un greffage peut être observé sur le pNP- α -D-glucopyranoside sans pour autant détecter de produits de transfert sur le pNP- α -D-mannopyranoside (à des concentrations en accepteur beaucoup plus faibles). Ceci confirme l'importance primordiale de la substitution de l'hydroxyl du carbone 2. La figure 30 page 122 illustre la différence de réactivité de l'enzyme envers les accepteurs glucosidiques ou mannosidiques.

Le xylose est aussi bon accepteur que le glucose. Ceci s'explique par une conformation spatiale similaire en raison de son existence sous forme xylopyranose. Par contre le fructose qui, en solution est majoritairement sous forme pyranique mais avec un hydroxyle en position axiale, ne donne pas lieu à des réactions de transfert.

Dans le cas du saccharose, la réaction de transfert peut être imputée à la présence de la molécule de glucose.

Les β -cyclodextrines ne sont pas des accepteurs valables pour la réaction de transgalactosylation, l'empêchement stérique en raison du volume de ces molécules cycliques peut être invoqué même si des penta- ou des hexasaccharides linéaires sont des accepteurs potentiels pour la réaction de transgalactosylation.

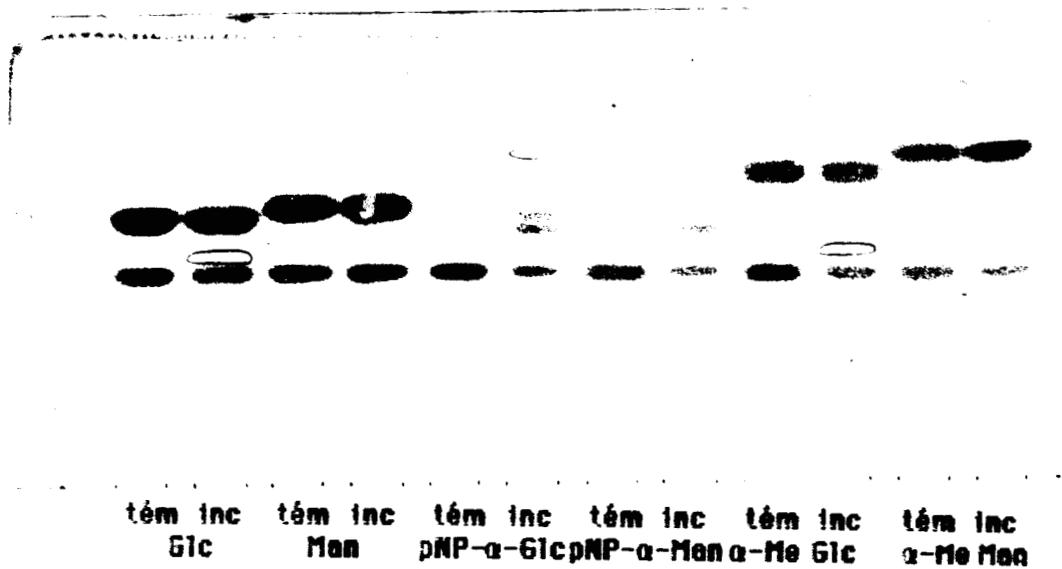


Figure 30 : Chromatographie sur couche mince des produits de transgalactosylation en présence de différents accepteurs glucosidiques ou mannosidiques

la fraction "Mono P A" est incubée 4 heures à 45°C en présence de lactose et des accepteurs suivants : Glc, Man, pNP-α-Glc, pNP-α-Man, α-Me Glc et α-Me Man

les produits de transfert sont soulignés

Tém = témoin sans enzyme

En conclusion, nous pensons pouvoir affirmer que dans le cas de l'utilisation ou de la présence d'accepteurs potentiels, la réaction de transgalactosylation est facilitée par l'existence :

- a- d'un hydroxyle libre en position équatoriale au niveau du C₂
- b- d'une conformation de type pyranique
- c- d'une fonction hémiacétalique bloquée.

b- Les acides aminés

Aucun transfert ne peut être mis en évidence lors de l'utilisation de la sérine ou de la thréonine en tant qu'accepteur (tableau XXIV page 124).

c- Les alcools

Pour satisfaire à la tradition nous avons étudié la réaction de transgalactosylation en présence de différents alcools (tableau XXIV page 124).

Dans le cas des alcools primaires aliphatiques (méthanol, éthanol, propanol et butanol), nous avons remarqué une réaction de transfert importante sur la molécule d'alcool introduite dans le milieu réactionnel. Les produits obtenus ne présentent pas de phénomène d'élongation comme dans le cas de la réaction de transgalactosylation en présence de haute teneur en donneur.

La réaction de transfert est diminuée en présence des alcools secondaires et inexistante en présence d'alcool tertiaire. Ces observations ne mettent pas en évidence une identité de réaction avec l'utilisation des accepteurs d'origine glucidique (transfert spécifique sur une fonction hydroxylée secondaire). Cette divergence quant au mécanisme réactionnel impliqué nous amène à nous poser la question suivante :

Le transfert du résidu galactosyl sur un alcool doit-il être considéré comme une véritable réaction de transglycosylation ou plutôt comme un cas particulier d'hydrolyse ?

Afin d'apporter une réponse à cette interrogation, nous avons effectué des incubations en présence d'alcool (méthanol et éthanol) et d'EDTA ou de calcium.

Contrairement à ce que l'on a pu constater lors de l'utilisation des accepteurs glycosylés, le calcium et l'EDTA sont sans action sur la réaction de transfert du résidu galactosylé sur les alcools. Cette réaction est analogue à la réaction d'hydrolyse.

Dans le cas de l'utilisation de polyols comme accepteur, un comportement différent est observé :

- le glycérol est un bon accepteur, propriété souvent décrite dans la littérature, de la même manière que le glucitol et le mannitol

TABLEAU XXIV :

**DETERMINATION DE LA SPECIFICITE ENVERS DES ACCEPTEURS
HYDROXYLES : ACIDES AMINES (600 mM) OU ALCOOLS (25 %
v/v) EN PRESENCE DE LACTOSE ET DE pNP- β -D-Gal**

T R A N S F E R T

Accepteur	Donneur		Remarques
	LACTOSE	pNP- β -Gal	
SERINE	-	-	
THREONINE	-	-	[Thr] = 300 mM

METHANOL	+	+	
ETHANOL	+	+	
PROPANOL	+	+	
BUTANOL	+	+	
ISOPROPANOL	±	±	
ALCOOL AMYLIQUE TERTIAIRE	-	-	

GLYCEROL	++	++	
GLUCITOL	+	+	
MANNITOL	+	+	
ETHYLENE GLYCOL	-	-	

- l'éthylène glycol possédant deux fonctions hydroxylées n'est pas une molécule acceptrice valable. Nous manquons encore d'éléments pour pouvoir discuter ce résultat.

3- INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN EAU

Si la concentration en accepteur est un des facteurs déterminants pour orienter la réaction de transgalactosylation, la teneur en eau est primordiale pour orienter la réaction vers l'hydrolyse. Cette concentration en eau ou plus précisément l'activité de l'eau est exprimée en fonction du nombre de molécule de soluté par rapport au nombre de molécules de solvant (H₂O). Elle est déterminée par la formule suivante :

$$a_w = \exp (Osm / [H_2O])$$

où **Osm** est l'osmolalité de la solution.

Des modifications de cette activité lors d'essais de la réaction de transgalactosylation effectués soit par l'enzyme purifiée soit par un extrait total n'ont malheureusement pas permis d'augmenter la rapport (Transfert / Hydrolyse). Dans les cas suivants :

- le NaCl et le sulfate d'ammonium ne modifie pas l'hydrolyse et le transfert pour des concentrations en sels de 0,75 M ($a_w = 0,97$).

Différents solvants ont été testés dans les conditions décrites page 59, pour des concentrations variant de 6,25 % à 25 % (v/v) :

- la diminution des deux activités : hydrolytique et transgalactosylasique est proportionnelle à la concentration en solvant pour l'acétonitrile, la formamide et la diméthylformamide.

- le DMSO ($a_w = 0,92$, concentration 25 % v/v) ne dénature pas le complexe enzymatique, et ne modifie pas le rapport (activité transférante / activité hydrolytique). Pour des concentrations supérieures, une diminution de l'hydrolyse et du transfert a été observée.

Pour des concentrations en lactose de 125 mM, la modification de la teneur en eau libre par adjonction de sels ou de solvant n'est pas suffisante pour orienter la réaction.

CONCLUSIONS :

La réaction de transgalactosylation effectuée par *Bifidobacterium bifidum* souche AA 2/2 peut-être considérée comme une réaction à 2 substrats, l'un donneur de groupement galactosylé, l'autre accepteur du résidu.

- Tous les β -D-galactosides sont des donneurs et des accepteurs potentiels.
- Toute autre molécule doit, pour pouvoir accepter un résidu de galactose, posséder une structure pyranique avec un hydroxyle libre en position équatoriale sur le C₂.

En présence d'alcools, la transgalactosylase montre un comportement différent, avec une spécificité plus élevée pour les fonctions hydroxylées primaires. De plus, ce greffage est indépendant de la présence ou non de calcium.

Ces deux faits nous entraînent à faire la distinction entre les réactions de transglycosylation sur les alcools et sur les molécules glycosidiques.

V- COMPARAISON AVEC LES AUTRES

β -D-GALACTOSIDASES DE *Bifidobacterium bifidum*

L'étude entreprise par APOURCHAUX (7) et la purification de la transgalactosylase montrent que *Bifidobacterium bifidum* possède plusieurs β -D-galactosidases. Nous nous sommes intéressés à la fraction β -D-galactosidasique majeure présentant une faible réactivité de transfert.

A- REACTION DE TRANSGALACTOSYLATION PAR LA β -D-GALACTOSIDASE DE LA FRACTION "HA 300 / QFF"

1- PURIFICATION DE LA FRACTION HA 300 / QFF

La β -D-galactosidase obtenue après chromatographie sur hydroxy-apatite après élution en tampon phosphate de sodium 300 mM (représentant 70 % de l'activité β -D-galactosidasique totale) s'est révélée susceptible de pouvoir transgalactosyler (cf page 77).

La purification de l'enzyme s'est poursuivie par passage sur une colonne de Q Fast Flow sépharose en tampon phosphate de sodium 10 mM, pH 6,8 comme le montre la figure 31 page 128. L'activité galactosidasique est éluee par un gradient de NaCl de 250 à 400 mM.

Nous avons comparé la réactivité de cette enzyme à celle que nous venons de décrire.

2- DETERMINATION DES OPTIMAUX DE PRODUCTION

Cette fraction a été testée dans les mêmes conditions que la fraction "Mono P A" pour la détermination de ces paramètres optimaux de production de galacto-oligosaccharides et pour l'hydrolyse du pNP- β -Gal.

Les résultats sont présentés dans le tableau XXV page 129.

La caractérisation des optimaux de transfert de la fraction "HA 300 / QFF" présente deux différences essentielles avec ceux déterminés pour la transgalactosylase de la fraction "Mono P A" :

- La température optimale d'hydrolyse du lactose est identique à celle de la synthèse des oligosaccharides contrairement à ce qui est observée pour la fraction "Mono P A" .

- Le pH optimum pour la réaction de transgalactosylation est légèrement supérieur à celui de l'hydrolyse.

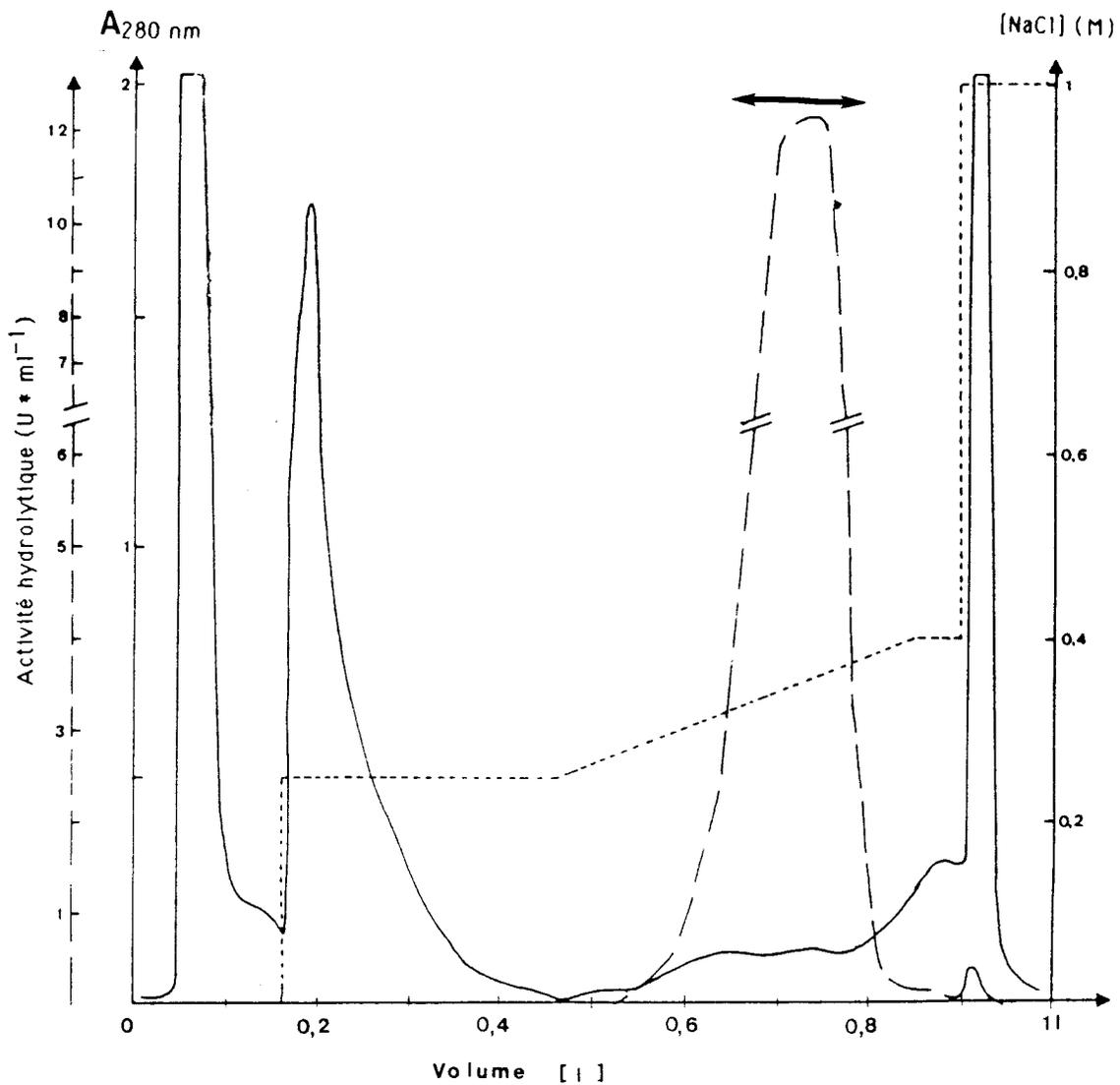


Figure 31 : Profil d'élution de la fraction HA 300 sur Q Fast Flow

La fraction HA 300 dialysée contre du tampon Phosphate de sodium 10 mM pH 6,8 est déposée sur la colonne de Q Fast Flow (1,6 * 15 cm) à un débit de 250 ml/h. L'activité galactosidasique est repérée par dosage du pNP libéré et les protéines sont suivies à 280 nm.

- protéine
- - - - - activité β -D-galactosidasique
- gradient de NaCl

TABLEAU XXV :

**TEMPERATURES ET pH OPTIMUMS D'HYDROLYSE ET DE
LA REACTION DE TRANSGALACTOSYLATION DE LA
FRACTION "HA 300/ QFF"**

	HYDROLYSE		TRANSGALACTOSYLATION
	<u>PNP-β-Gal</u>	<u>Lactose</u>	<u>Lactose</u>
TEMPERATURE	40°C	37°C	37°C
pH	6,00	6,00	6,75

La correspondance des optimums des réactions d'hydrolyse et de transglycosylation est une caractéristique générale de toutes les réactions de transgalactosylation décrites dans la littérature.

3- LES PRODUITS DE TRANSGALACTOSYLATION

Deux espèces de produits sont synthétisées : des disaccharides et des trisaccharides .

Le phénomène d'élongation est donc beaucoup moins prononcé que dans le cas d'une incubation en présence de la fraction purifiée "Mono P A".

Le comportement chromatographique des oligosaccharides sur couche mince nous incite à penser qu'ils possèdent une structure renfermant des liaisons en $\beta(1-6)$. Ceci repose sur des expériences de comigration en présence des témoins suivants : les di et trisaccharide F.2 et F.4 (cf pages 68, 71). Cette prédominance pour le regreffage sur la fonction hydroxyle primaire est généralement décrite dans la littérature lors de l'étude des réactions de transgalactosylation. L'étude structurale devrait nous permettre de confirmer ces observations.

Ainsi *Bifidobacterium bifidum* possède au moins 2 β -D-galactosidases susceptibles de donner des réactions de synthèse. Les produits néosynthétisés sont différents les uns des autres : structure allongée à liaison $\beta(1-3)$ ou structure courte à liaison $\beta(1-6)$. Nous avons voulu savoir si cette différence de spécificité de synthèse se retrouvait parallèlement au niveau de l'hydrolyse.

B- SPECIFICITE D'HYDROLYSE DES β -D-GALACTOSIDASES

Les résultats sont rassemblés dans le tableau XXVI page 131. Nous avons utilisé la même réactivité enzymatique, déterminée par l'intermédiaire du substrat de synthèse.

Les structures galactosidiques qui ont été testées sont des disaccharides à liaison $\beta(1-4)$ (lactose) ; $\beta(1-3)$ et $\beta(1-6)$ (cf fractions F.1 et F.2 , page 74).

Les résultats montrent que la fraction "Mono P A" hydrolyse plus rapidement les substrats naturels que la fraction "HA 300". On remarque qu'à taux identique d'activité hydrolytique (sur pNP- β -Gal), la fraction "Mono P A" libère 31 fois plus de monosaccharides à partir de lactose que l'enzyme de la fraction "HA 300". La fraction " Mono P A" se montre plus réactive envers les liaisons $\beta(1-3)$ puis les liaisons $\beta(1-4)$ et enfin les liaisons $\beta(1-6)$. La fraction "HA 300" présente la réactivité suivante : $\beta(1-3) > \beta(1-6) > \beta(1-4)$.

Ces résultats sont évidemment sujets à discussion puisqu'on a pris arbitrairement la même réactivité exprimée par rapport au substrat synthétique.

TABLEAU XXVI :

**SPECIFICITE DES β -D-GALACTOSIDASES DE *Bifidobacterium*
bifidum VIS-A-VIS DES LIAISONS GALACTOSIDIQUES**

FRACTION ENZYMATIQUE (35 mU pNP β -Gal)	SUBSTRAT (Activité exprimé en nmol/min)		
	β Gal(1-3)Glc	β Gal(1-6)Gl	β Gal(1-4)Glc
"Mono P A"	933	96	404
HA 300 QFF	318	54	13

TABLEAU XXVII :

**PARAMETRES ENZYMATIQUES DES FRACTIONS "HA100
Mono P" ET "HA 300" PURIFIEES SUR LE LACTOSE ET LE
TRISACCHARIDE**

ENZYME	SUBSTRAT	K_m (mM)	V_m (μ mole /min)	V_m / K_m
" Mono P A"	Lactose	13	0,96	$7,38 \cdot 10^{-5}$
	Trisaccharide	35	0,99	$2,84 \cdot 10^{-5}$
"HA 300 QFF"	Lactose	52,5	1,19	$2,27 \cdot 10^{-5}$
	Trisaccharide	27	19,70	$72,96 \cdot 10^{-5}$

Nous avons voulu connaître le comportement de ces activités β -D-galactosidasiques vis-à-vis des produits majeurs de transgalactosylation (F.3 cf page 68).

A la vue du tableau XXVII page 131, on remarque dans le cas de la fraction "Mono P A" que l'enzyme présente une affinité plus marquée pour le lactose par rapport au trisaccharide (facteur de l'ordre de 3). La liaison galactosidique est hydrolysée à la même vitesse mais l'élongation du substrat diminue l'affinité de l'enzyme. On peut donc expliquer par cette propriété, l'accumulation des galacto-oligosaccharides pendant les premiers temps de la réaction. Quand le lactose aura disparu, ces oligosaccharides seront à leur tour hydrolysés.

Dans la cas de la fraction "HA 300 QFF", l'affinité de l'enzyme est augmentée quand on compare le trisaccharide par rapport au lactose. Il en est de même pour la vitesse de réaction. Le rapport est très en faveur de l'hydrolyse des galacto-oligosaccharides à liaison $\beta(1-3)$.

Bifidobacterium bifidum possède au moins deux β -D-galactosidases différentes capables d'hydrolyser avec des spécificités différentes.

Cette différenciation quant à la réactivité des systèmes enzymatiques a été confirmée d'une part par la comparaison des propriétés physico-chimiques de la fraction "HA 300 QFF" faites par APPOURCHAUX (7) et celles décrites précédemment. D'autre part, le comportement vis-à-vis des anticorps anti-"Mono P A" monospécifiques renforce cette hypothèse.

C- DIFFERENCIATION IMMUNOLOGIQUE

L'obtention d'un immunsérum monospécifique à partir de la fraction "Mono P A" nous a permis d'étudier les réactions croisées entre ces deux β -D-galactosidases présentant des comportements physico-chimiques et enzymatiques différents. Deux types de réactions ont été effectuées :

- Après incubation des différentes enzymes et des anticorps à température ambiante, seule l'activité hydrolytique de la fraction "Mono P A" est inhibée par la réaction antigène-anticorps. La figure 32 page 134 illustre l'effet du sérum monospécifique à la fraction "Mono P A" sur les enzymes des fractions "HA 300 QFF" et de la fraction "Mono P A".

- La technique d'Ouchterlony ne montre aucune reconnaissance de cet immunsérum monospécifique de la fraction "Mono P A" envers la β -D-galactosidase de la fraction "HA 300 QFF". Cette enzyme n'a pas de site antigénique commun avec ceux de la fraction "Mono P A" ou encore ceux-ci ne sont pas accessibles. Cette dernière hypothèse est la plus plausible puisque l'enzyme de la fraction "Mono P A" possède une masse moléculaire plus élevée (362 000) par rapport à celle de la fraction "HA 300 QFF" (200 000) (7).

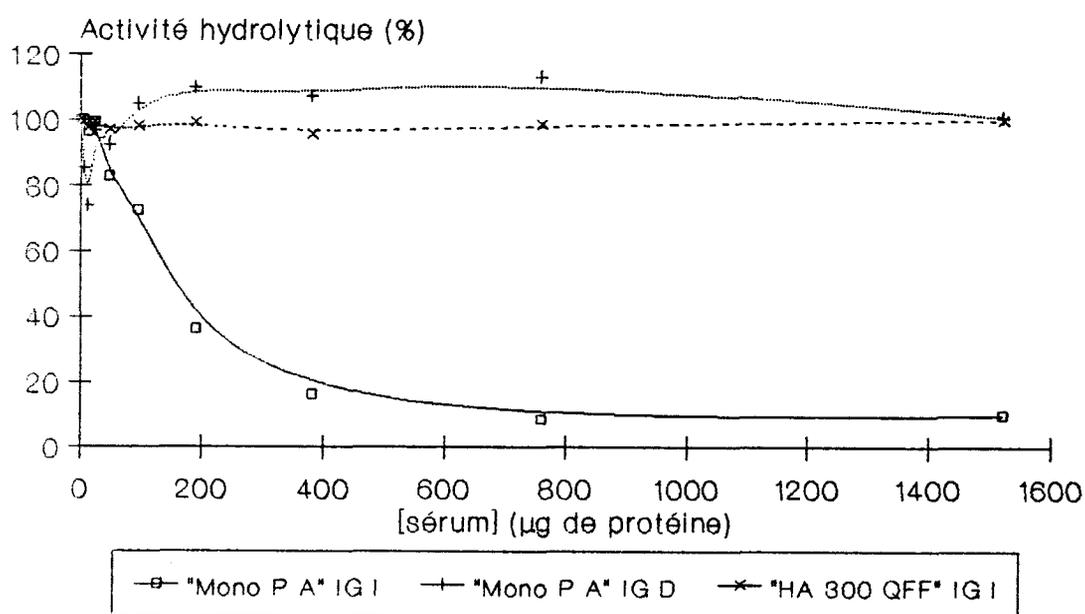


Figure 32 : Influence de la concentration d'immunsérum monospécifique de la fraction "Mono P A" sur l'expression de l'activité galactosidasique des fractions "Mono P A" et "HA 300 QFF"

Les solutions enzymatiques sont incubées 30 min. à 20°C en présence de différentes concentrations en sérum. l'activité hydrolytique est mesurée sous les conditions décrites page 45.

IG I = immunoglobulines actives

IG D = immunoglobulines dénaturées par la chaleur

VI- ROLE DES PRODUITS DE TRANSGALACTOSYLATION

Bifidobacterium bifidum souche AA 2/2, bactérie anaérobie, hôte caractéristique de l'intestin des enfants nourris au sein nécessite des facteurs de croissance appelés : "facteur bifidigènes". Ces composés sont de nature très différente, et ils se rencontrent plus particulièrement parmi la fraction oligosaccharidique du lait de femme. La mise en évidence par TANAKA *et al.* (112) d'une part et par HIKADA *et al.* (56) et MITSUOKA *et al.* (81) d'autre part ont montré que des produits tels que des galacto- ou des fructo-oligosaccharides obtenus par transglycosylation étaient des facteurs bifidigènes. Ces observations nous ont amenés à étudier l'influence des produits de transgalactosylation sur la croissance des *Bifidobacterium bifidum* en culture.

L'activité bifidigène des fractions oligosaccharidiques F.3 et F.5 (cf page 77) a été étudiée dans le service de bactériologie de l'UER de Pharmacie de Lille II (Dir. C.ROMOND). Les résultats se sont avérés négatifs pour la souche AA 2/2 et confortent les observations antérieures quant au rôle prépondérant joué par la N-acétyl glucosamine dans les structures oligosaccharidiques à activité bifidigène. Des produits de transgalactosylation tels que la N-acétyllactosamine se sont avérés porteur d'une activité bifidigène (125).

De nombreux travaux montrent que la présence de *Bifidobacterium bifidum* au niveau intestinal entraîne une diminution des bactéries putréfiantes ou pathogènes (18, 21, 80).

Nous avons voulu voir si les galacto-oligosaccharides néosynthétisés étaient capables d'intervenir sur un hypothétique mécanisme d'interaction de type lectinique dans les associations bactéries-mucines ou bactéries- bactéries.

Bifidobacterium bifidum donne des réactions d'hémagglutination avec des érythrocytes de lapin, traités ou non à la neuraminidase.

Différentes structures (mono ou oligosaccharidiques, glycoprotéines) ont été testées afin de définir les spécificités de l'interaction. Les résultats sont rassemblés dans le tableau XXVIII page 135.

Dans un premier temps, nous avons étudié la réactivité des produits de transfert, ainsi que des saccharides testés habituellement lors des interactions lectines-saccharides.

Aucun des produits de transfert testés (F.1, F.3, F.5) et des saccharides ne s'est révélé capable de lever l'hémagglutination *Bifidobacterium bifidum* - hématie. Ce résultat ne semble pas confirmer la présence de lectines membranaires "classiques" chez *Bifidobacterium bifidum*.

TABLEAU XXVIII : INHIBITION DE L'AGGLUTINATION *Bifidobacterium bifidum* - HEMATIES DE LAPIN TRAITEES OU NON A LA NEURAMINIDASE

<u>INHIBITEUR</u>	<u>RESULTAT</u>
Saccharides	
* Gal, Fuc, Man, Glc	-
* GlcNAc	-
* GlcNH ₂	-
* βGlcNAc(1-6)GlcNAc	-
* Lactose	-
* βGal(1-3)Glc	-
* βGal(1-3) βGal(1-4)Glc	-
* βGal(1-3) βGal(1-3) βGal(1-4)Glc	-
* Mélézitose, Mélibiose, pNP-α-D-Gal	-
Glycoprotéines	
* Orosomucoïde	-
* Mannanes	-
* Thyroglobuline	+
* Mucine gastrique de porc	+
*Glycannes de mucine après β-élimination	-

Dans un deuxième temps, nous avons testé des structures plus complexes (orosomucoïde, mannane, thyroglobuline et mucine).

La thyroglobuline bovine s'est révélée être un puissant inhibiteur de l'hémagglutination, indiquant l'existence possible de lectines dont la spécificité repose sur le galactose lié par des liaisons en α . Pour vérifier ce résultat, une série d' α -galactosides plus simples (mélézitose, mélibiose et pNP- α -Gal) a été essayée et a donné des résultats négatifs.

La mucine gastrique de porc inhibe fortement l'hémagglutination. Cependant la copule polysaccharidique, obtenue après réaction et β -élimination sur les mucines ne semble pas impliquée dans les phénomènes de reconnaissance. Ces résultats nous amènent à penser que les saccharides ne sont pas seuls, impliqués dans les interactions Bifidobactérie-hématie.

C O N C L U S I O N

Les conclusions générales que nous pouvons tirer de notre étude peuvent se résumer de la manière suivante :

1- PURIFICATION

Il est possible de distinguer chez *Bifidobacterium bifidum* différents types de β -D-galactosidases susceptibles d'effectuer des réactions de transgalactosylation.

L'étude que nous avons entreprise pour expliciter ce système réactionnel, nous a amené dans un premier temps, à effectuer la purification d'un système enzymatique responsable de la formation de galacto- oligosaccharides à pH acide.

Le protocole retenu pour la préparation de l'activité transgalactosylasique permet de purifier l'enzyme 1720 fois, avec un rendement voisin de 13 %. Si on se réfère à l'activité hydrolytique, cette enzyme ne représente que 0,8 % de l'activité initiale et son facteur de purification est de 54.

Au cours du procédé de purification, nous avons remarqué que :

-le système était difficilement extractible.

-l'enzyme responsable de la réaction de synthèse avait une localisation membranaire.

-le comportement chromatographique sur gel échangeur d'ions pouvait varier d'une extraction à une autre. Cette hétérogénéité protidique est sans influence sur la réactivité enzymatique elle-même.

-Le rapport (activité transgalactosylasique/activité galactosidasique) évolue en fonction des étapes de purification.

L'activité étudiée n'est donc pas portée par l'ensemble des β -D-galactosidases de *Bifidobacterium bifidum*. L'élimination de β -D-galactosidases dépourvues d'activité transgalactosylasique à pH acide est obtenue lors des deux premières étapes chromatographiques.

2- PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES ET ENZYMATIQUES

L'étude des paramètres physico-chimiques n'a pas été très poussée en raison des difficultés de purification de l'enzyme.

Le point isoélectrique déterminée par chromatofocalisation sur Mono P[®] de la "transgalactosylase" est de 5,25 pour la fraction majoritaire (80 %). La fraction minoritaire (20 %) présente un pI de 5,00.

La "transgalactosylase" présente une structure pluricaténaire. On peut caractériser quatre sous-unités dont les masses moléculaires déterminées par SDS PAGE sont de l'ordre de 163, 170, 177 et 190 KDa.

La masse moléculaire de l'enzyme native, déterminée par gel filtration sur TSK HW 55 S, est de 362 KDa. On ne peut pas imaginer des interactions matrice-molécule telles que la masse apparente ne soit que de la moitié de celle déterminée en condition

dénaturante (somme des masses moléculaires des sous-unités).

Il nous faut donc envisager une association à 2 sous-unités en se demandant si l'hétérogénéité est de nature prétraductionnelle ou si au contraire, la protéolyse doit être mise en cause. A cet égard, il n'a pas été caractérisé d'activité protéolytique à spécificité large dans nos fractions enzymatiques.

L'enzyme obtenue peut être conservée plusieurs semaines à +4°C sans agent de protection. Par contre, il n'est pas possible de la congeler même en présence de cryoprotecteur (glycérol par exemple).

La stabilité de l'enzyme en milieu réactionnel en absence de substrat est limitée : perte de 50 % d'activité après 2 heures à 50°C, alors qu'en présence de substrat, l'activité est intégralement conservée.

La stabilité aux pH acides est elle-même augmentée en présence de substrat.

Dans ces conditions, il est possible de stabiliser l'enzyme pendant au moins 80 heures à 45°C (conditions de production et d'élongation des oligosaccharides).

L'étude des paramètres enzymatiques du système transgalactosylasique purifié nous a permis de déterminer que le pH optimal de synthèse des oligosaccharides est de 4,8 et sa température optimale de 45°C. Les paramètres de l'activité hydrolytique de cette enzyme sont : pH 6,5 et une température de 37°C.

Les paramètres cinétiques sont les suivants :

Un K_m de 800 mM et une V_m de 470 nmoles de trisaccharide formé par min dans le sens de la synthèse d'oligosaccharides alors qu'ils sont respectivement de 13 mM et de 2,7 μ moles de monosaccharide libéré par min pour le K_m et la V_m dans le sens de l'hydrolyse, en utilisant le lactose comme substrat.

La valeur élevée du K_m pour la réaction de transgalactosylation doit s'expliquer en partie par la nécessité pour l'enzyme de réunir plusieurs molécules de substrat au niveau de son site de catalyse.

La réactivité est modifiée en présence d'effecteur. Nous avons mis en évidence que le calcium jouait un rôle prépondérant. Il active l'hydrolyse sans modification de l'affinité de l'enzyme pour son substrat et il diminue le taux de produits synthétisés.

L'EDTA est un inhibiteur de l'activité hydrolytique et un activateur de l'activité transférasique.

Ces deux actions antagonistes peuvent s'expliquer de la façon suivante : une enzyme saturée en calcium est dans une conformation telle qu'elle favorise uniquement l'hydrolyse (la vitesse de réaction est élevée bien que l'affinité soit faible). Une enzyme sans calcium présente une affinité plus importante pour le

substrat mais possède une vitesse d'hydrolyse plus faible permettant les réactions de synthèse.

3- PRODUCTION D'OLIGOSACCHARIDES

L'étude des différents paramètres enzymatiques nous a permis d'optimiser la production d'oligosaccharides à partir de lactose. Nous avons constaté que la réaction de transfert dépendait (outre la concentration en calcium) :

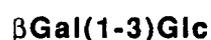
- des conditions de pH et de température
- du taux de conversion du lactose

Dans ce dernier cas, la transgalactosylase de *Bifidobacterium bifidum* présente un maximum de transfert quand la conversion du substrat est de 60 %. Cette valeur ne varie pas quelque soit la concentration initiale en lactose. Cet indice qui est intéressant pour suivre une production d'oligosaccharides n'est pas le reflet exact d'une relation directe entre substrat et transfert. En effet, notre technique de dosage ne nous permet pas d'une part de faire la distinction entre le lactose (substrat) et les autres disaccharides (produits de transfert). D'autre part nous ne pouvons pas connaître le taux réel d'oligosaccharides qui peuvent être hydrolysés après leur synthèse. Ce qui fait qu'en réalité, la transformation du substrat (lactose) est certainement beaucoup plus importante. Ceci est confirmé lorsque le taux de conversion est supérieur à 60 %. Dans ces conditions, à faibles concentrations en lactose, les produits de transfert sont dégradés par le système enzymatique.

A cet égard, nous avons mis en évidence que le système transgalactosylasique hydrolysait plus rapidement les liaisons $\beta(1-3)$ par rapport aux liaisons $\beta(1-4)$ et $\beta(1-6)$ des disaccharides. La réactivité est beaucoup plus faible quand on est en présence de trisaccharide (type F.3), ce qui nous permet d'expliquer l'accumulation des oligosaccharides et leur élévation.

Ainsi après 80 heures à pH 4,25 et à 45°C, à partir de lactose 500 mM les oligosaccharides néosynthétisés représentent 30 % (p/p) du substrat initial.

Ces oligosaccharides ont été purifiés et l'étude structurale a permis de mettre en évidence une spécificité de synthèse originale. Outre une élévation considérable allant jusqu'à la formation de nonasaccharides, le greffage s'effectue de façon prépondérante sur la fonction hydroxylée du carbone 3 des résidus de glucose comme c'est le cas pour la fraction F.1



ou des résidus de galactose comme c'est le cas pour les oligosaccharides F.3, F.5, F.6, F.7, F.8, F.9 et F.10, correspondant au modèle suivant :



Une telle famille de galacto-oligosaccharides n'avait jusqu'à présent jamais encore été décrite en tant que produit de transgalactosylation. Le greffage sur l'hydroxyle primaire est le plus communément reporté. Cependant TOBA (117) a récemment caractérisé lors de la réaction de transgalactosylation chez *Aspergillus oryzae* plusieurs structures minoritaires renfermant des liaisons de type $\beta(1-3)$.

Chez *Bifidobacterium bifidum*, la transgalactosylation en liaison $\beta(1-6)$ est minoritaire à pH 4,25. Par contre à des pH neutres, on voit l'accumulation de ces oligosaccharides sous la forme de di et de trisaccharides. Cette synthèse est le fait d'une autre entité enzymatique que nous avons caractérisée chez *Bifidobacterium bifidum*.

4- PROPOSITION DU MECANISME D'ACTION

La réaction de transgalactosylation met en œuvre une activité hydrolytique de type "lactase". Il s'est avéré très intéressant d'étudier la spécificité de l'enzyme vis-à-vis du donneur de résidus galactosylés et vis-à-vis des accepteurs potentiels afin d'explicitier le mécanisme réactionnel.

Toutes les structures renfermant du β -D-galactose en position terminale non réductrice sont susceptibles de se lier au site de reconnaissance du galactose et d'induire la formation des produits de synthèse. Le galactose libre n'est pas un bon substrat et on remarque que les réactions de réversion à partir du monosaccharide seul sont toujours plus difficile à mettre en œuvre (réactivité très faible).

A côté de ce site à spécificité étroite, il doit exister un site à spécificité plus large capable de donner des interactions avec des résidus glycosidiques. L'interaction sera évidemment meilleure dans le cas du glucose.

Les expérimentations de transfert réalisées à l'aide de monosaccharides à forte concentration et de lactose ou de p-nitrophényl- β -D-galactoside ont montré que le monosaccharide accepteur du résidu galactosylé doit présenter un hydroxyle non substitué en position équatoriale sur le carbone 2. Il faut qu'il soit sous forme pyranique. Enfin l'interaction est favorisée lorsque la fonction hémiacétalique est bloquée.

Lorsqu'on examine les cinétiques de transgalactosylation, on remarque l'apparition des galacto-oligosaccharides (tri et oligosaccharides supérieurs) dans les premiers temps de la réaction, les disaccharides néosynthétisés n'apparaissant qu'en fin de réaction, lorsque la concentration en glucose est plus importante. Quand la réaction est effectuée avec de forte concentration initiale en glucose libre, on obtient d'emblée la fabrication de ces disaccharides (type F.1).

En rassemblant les différentes observations effectuées au cours de notre travail, nous pouvons imaginer deux modèles possibles pour la transgalactosylase de *Bifidobacterium bifidum*.

a- Modèle à 2 sous-unités catalytiques identiques

On imagine que la β -D-galactosidase-transgalactosylase "Mono P A" est constituée de 2 sous-unités protéiques similaires portant chacune un site de catalyse du lactose. Ce site est constitué par un sous-site reconnaissant le galactose et un sous-site de positionnement du glucose. Il n'a pas été mis en évidence de phénomène de coopérativité ; les cinétiques sont michaeliennes. Ces deux sites des deux sous-unités doivent être situés au voisinage l'un de l'autre et ils sont sous la dépendance du calcium. Lorsque le calcium est présent, les deux sites s'écartent l'un de l'autre et favorisent l'hydrolyse. Lorsqu'il n'y a pas de calcium dans le milieu, l'hydrolyse est diminuée et la réaction de transfert est facilitée par anchimérisme (figure 33 page 142).

En présence de lactose, les séquences réactionnelles seront les suivantes :

- Reconnaissance et interaction du galactose au niveau de son sous-site spécifique suivi du positionnement du glucose au niveau de la même sous-unité.
- Mécanisme identique au niveau de la deuxième sous-unité.
- Rupture d'une liaison β -D-galactosidique.
- Soit transfert spécifique du galactose sur le résidu de galactose de la deuxième sous-unité par effet de proximité \rightarrow formation de trisaccharide.
- Soit transfert sur une molécule d'eau \rightarrow libération de monosaccharide.
- Dans le cas de l'élongation des oligosaccharides (formation de tétrasaccharide et plus), le trisaccharide vient occuper l'un des sites de catalyse par l'intermédiaire de son galactose en position terminale non réductrice.
- Dans le cas de monosaccharides utilisés comme accepteurs, ces derniers, de par leur concentration, peuvent occuper les différents sous-sites.

Ces hypothèses des réactions de transferts sont illustrées sur la figure 34 page 143.

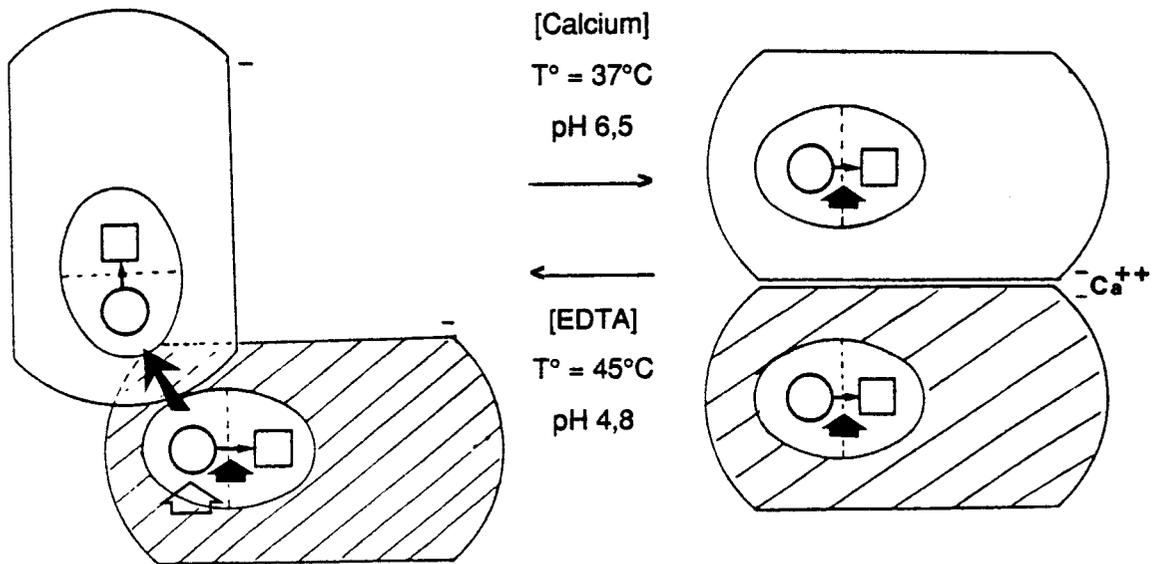
- dans le cas de l'utilisation de solvants hydroxylés (alcools) ou de dérivés hydrogénés des monosaccharides, les résultats expérimentaux sont en faveur d'une réaction identique à l'hydrolyse. C'est un transfert non spécifique de résidus galactosylés dû à l'action perturbante de ces molécules au niveau des sites de catalyse.

b- Modèle à 1 sous-unité catalytique

La transgalactosylase est constituée par des sous-unités protéiques différentes. On peut envisager que les entités ne possèdent pas la même réactivité et qu'il est possible d'avoir une sous-unité catalytique responsable de l'hydrolyse du lactose et une sous-unité renfermant un site accepteur de structures saccharidiques dont les caractéristiques ont été définies précédemment. Cette dernière sous-unité n'a pas d'activité catalytique. La mise en conformation (effet de proximité) et la réactivité sont identiques à celles décrites pour le modèle à deux sous-unités.

TRANSFERT

HYDROLYSE

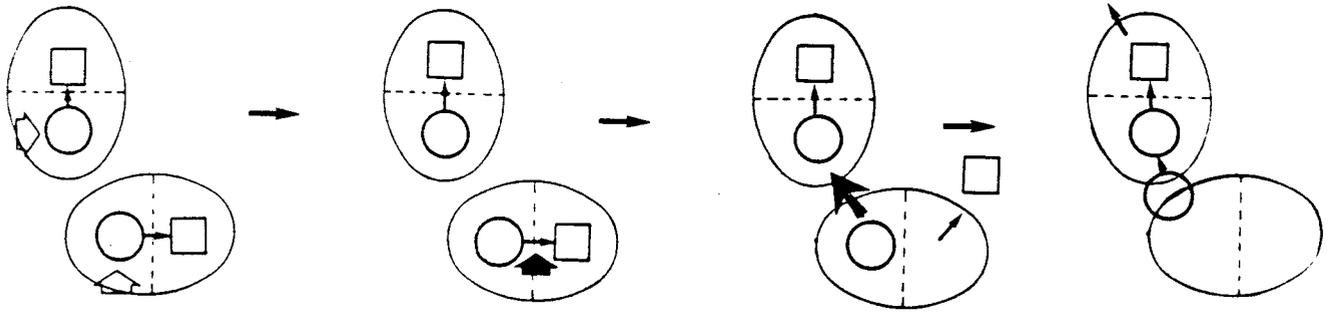


- Rapprochement des sites
- Affinité forte
- Diminution de la vitesse d'hydrolyse
- Transfert facilité

- Eloignement des sites
- Affinité faible
- Vitesse d'hydrolyse maximale
- Réaction de transfert difficile

Figure 33 : Hypothèse de la mise en conformation de la β -galactosidase de *Bifidobacterium bifidum* -système à 2 sous-unités catalytiques-

-  Reconnaissance du galactose terminal non réducteur
-  Hydrolyse
-  Transfert du résidu galactosylé
-  Galactose
-  Glucose

Formation de trisaccharide

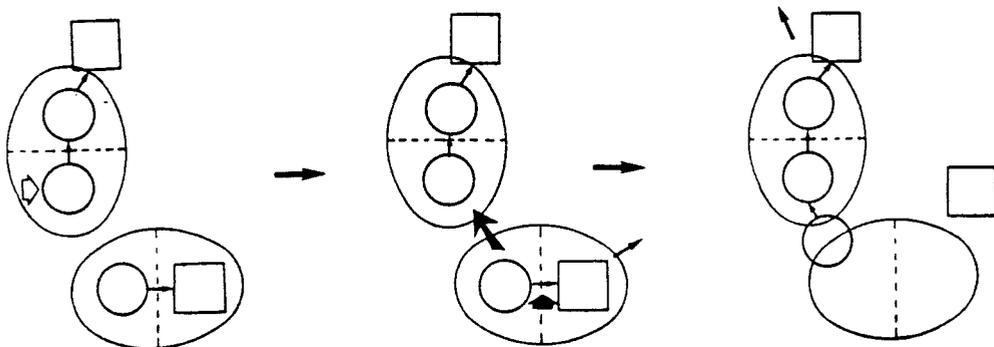
1- Reconnaissance par le galactose en position terminale non réductrice

2- Rupture de la liaison galactosidique

3- Diffusion du glucose hors du site

-Formation de liaison $\beta(1-3)$

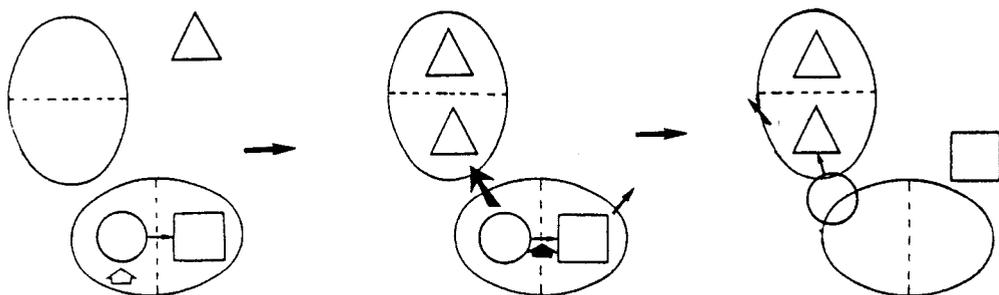
4- Diffusion du trisaccharide

Formation de tétrasaccharide (élongation)

1- Mise en place du lactose
- Mise en place du trisaccharide par le galactose terminal non réducteur

2- Rupture de la liaison galactosidique
- Diffusion du glucose
- Transfert spécifique du résidu galactosylé

3- Diffusion du tétrasaccharide

Formation de disaccharide

1- Mise en place du lactose
- Mise en place du monosaccharide

2- Rupture de la liaison galactosidique
- Transfert du résidu galactosylé

3- Diffusion du disaccharide

Figure 34 : Mécanisme de la synthèse de galacto-oligosaccharides par la β -galactosidase de *Bifidobacterium bifidum* -système à 2 sous-unités catalytiques-

Les symboles sont identiques à ceux de la figure 33

Monosaccharide

En présence de lactose, les séquences seront les suivantes :

- Reconnaissance et fixation du galactose au niveau du sous-site spécifique du site de catalyse suivi du positionnement du glucose.
- Reconnaissance et interaction d'une molécule de lactose au niveau du site accepteur par l'intermédiaire du résidu en position terminale non réductrice.
- Rupture d'une liaison β -D-galactosidique.
- Soit transfert spécifique du galactose sur le lactose occupant le site accepteur
 - > trisaccharide.
 - Soit transfert sur une molécule d'eau —> monosaccharide.
 - Dans le cas de l'élongation des oligosaccharides (formation de tétra-saccharide et plus), le trisaccharide réoformé vient occuper le site accepteur par l'intermédiaire de son galactose en position terminale non réductrice.
 - Dans le cas de l'utilisation de monosaccharides, ceux-ci viennent occuper le site accepteur.

Ces hypothèses de réactions de transferts sont illustrées sur la figure 35 page 145.

- dans le cas de l'utilisation des alcools, le procédé est identique à celui exposé page 141.

P E R S P E C T I V E S

Les orientations du travail peuvent être multiples. On peut envisager d'une part une voie fondamentale concernant les relations structure tridimensionnelle et réactivité de l'enzyme et d'autre part une voie plus appliquée concernant l'étude des propriétés biologiques des oligosaccharides synthétisés.

a- Réactivité enzymatique

Dans un premier temps, l'étude cinétiques de l'inhibition des activités d'hydrolyse et de synthèse de la β -D-galactosidase-transgalactosylase de la fraction "Mono P A" nous permettra de définir laquelle des deux hypothèses avancées est valable (2 sites catalytiques ou 1 site catalytique et 1 site accepteur).

Dans un deuxième temps, il s'agira de comparer les différentes transgalactosylases de *Bifidobacterium bifidum*. L'existence de différents types d'oligosaccharides à liaison $\beta(1-3)$ et à liaison $\beta(1-6)$ produits par des entités enzymatiques différentes nous amène à nous poser les questions suivantes :

Mise en conformation

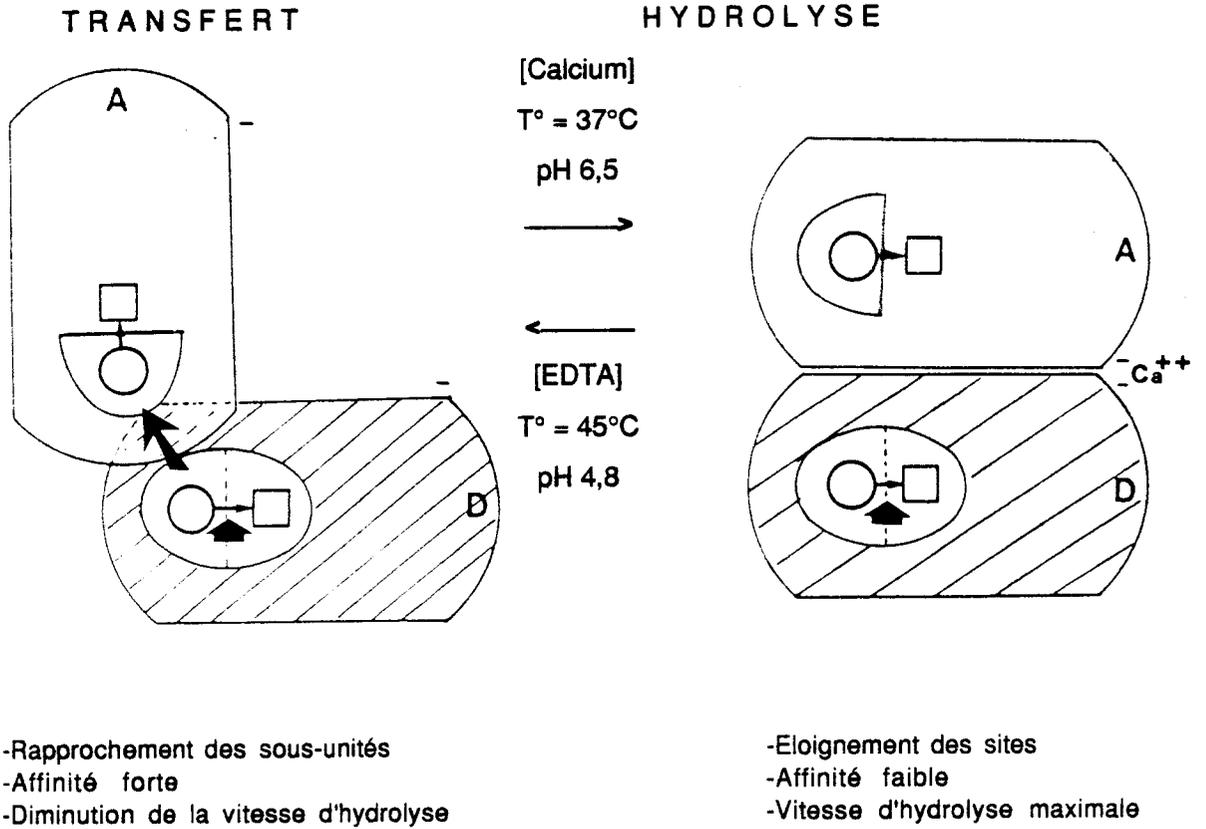


Figure 35.2- Formation de trisaccharide

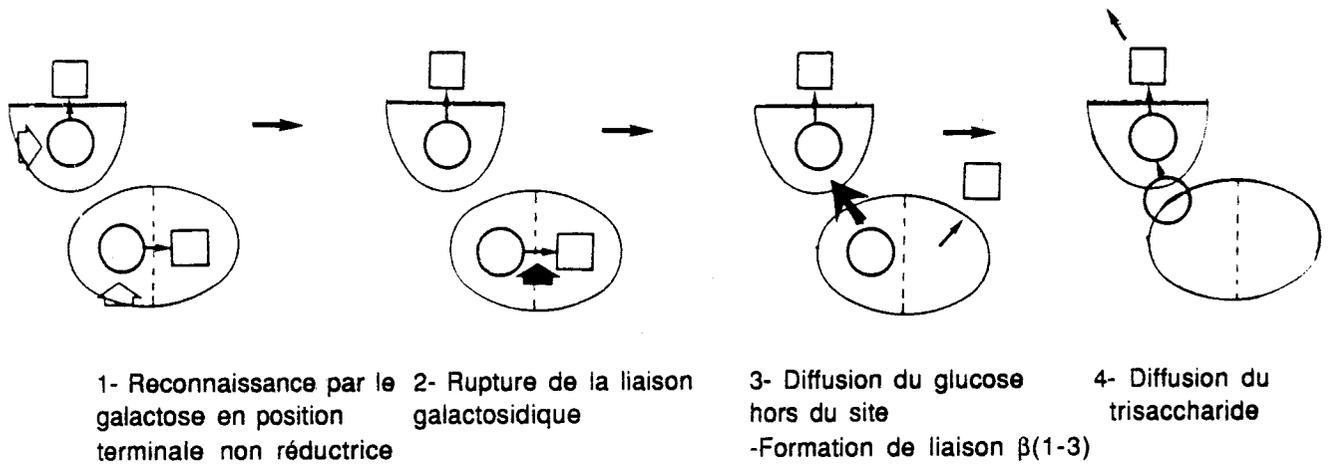


Figure 35 : Mécanisme de la synthèse de galacto-oligosaccharides

par la β-galactosidase de *Bifidobacterium bifidum*

-système à 1 sous-unité catalytique et à 1 site accepteur-

- Reconnaissance du galactose terminal non réducteur
- Hydrolyse
- Transfert du résidu galactosylé
- Glucose
- Galactose

Ces deux enzymes, qui possèdent des propriétés physico-chimiques différentes, sont-elles dues à l'existence de deux gènes différents ou sont-elles le fait d'un assemblage différent post-traductionnel ? A cet égard, il ne faut pas oublier que les β -D-galactosidases sont essentiellement des systèmes membranaires (certaines fractions renfermant des copules lipidiques ; OURCEAU, communication personnelle) et sont très difficiles à obtenir sans modifier trop fortement leur assemblage.

Cette étude devrait au moins permettre de comparer les séquences N-terminales de ces protides et d'envisager la fabrication de sonde pour le clonage éventuelle de la (ou des) activité(s) enzymatique(s).

La comparaison des systèmes enzymatiques nous permettra de connaître un peu mieux le (ou les) mécanisme(s) de la réaction de transgalactosylation. Elle devrait préciser dans notre cas, si la variation de réactivité est fonction des conditions expérimentales d'hydrolyse ou encore sous la dépendance de l'assemblage des sous-unités de ces molécules.

b- Propriétés biologiques des oligosaccharides synthétisés

Les réactions enzymatiques sont le fait de bactéries tuées. On peut évidemment se demander si cela peut se produire avec des bactéries vivantes et dans un tractus digestif ?

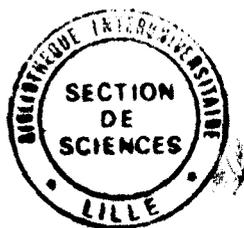
Les laits fermentés industriels aux Bifidobactéries renferment des structures analogues à certaines de celles que nous avons caractérisées *in vitro* et les conditions de production de ces oligosaccharides (milieu acide, absence de calcium) sont compatibles avec une muqueuse colonique. Nous avons déjà démontré que les oligosaccharides n'étaient pas des facteurs de croissance et qu'ils n'étaient pas impliqués dans l'association des *Bifidobacterium bifidum* entre eux. On peut envisager d'autres propriétés à ces oligosaccharides et en particulier, leurs interactions avec d'autres microorganismes du tractus digestif, afin de diminuer leur adhérence au niveau des muqueuses intestinales. Cette orientation nécessiterait le choix de modèles bactériens et ne peut se concevoir qu'en collaboration avec une équipe de microbiologistes.

Ces oligosaccharides peuvent jouer un rôle au niveau de la balance hydrique (diminution de la perte en eau) de l'intestin comme le prétend MESSER (77) qui a caractérisé dans les laits de marsupiaux (animaux allactasiques) des structures identiques à celles synthétisées par *Bifidobacterium bifidum*.

Enfin, on peut envisager l'interaction de *Bifidobacterium bifidum* avec la muqueuse intestinale de l'hôte. La caractérisation d'activités glycosidasi-ques membranaire ou périplasmiques implique que ces enzymes doivent intervenir au niveau des mucines coloniques. *Bifidobacterium bifidum* pourrait intervenir à 2

niveaux : décapage de la mucine de façon à obtenir de nouveaux sites de fixation pour lui-même ou pour empêcher la fixation d'autres bactéries. Les produits de décapage pourraient être des facteurs de croissance pour les Bifidobactéries présentes.

Comme on peut le voir, les perspectives d'études des glycosidases-transglycosylases de *Bifidobacterium bifidum* souche AA 2/2 sont très larges. La meilleure connaissance des mécanismes de réaction devra nous permettre d'une part de mieux comprendre le rôle important que semble jouer ces bactéries au niveau du tractus digestif, et d'autre part, d'envisager la synthèse par glycoingénierie d'oligosaccharides possédant des activités biologiques.



BIBLIOGRAPHIE

- 1 **AJISAKA K., NISHIDA H., FUJIMOTO H., 1987**
Biotechnol. lett., 9, 243-248
The synthesis of oligosaccharides by the reversed hydrolysis reaction of β -glucosidase at high substrate concentration and at high temperature
- 2 **AJISAKA K., NISHIDA H., FUJIMOTO H., 1987**
Biotechnol. lett., 9, 387-392
Use of an activated carbon column for the synthesis of disaccharides by use of a reversed hydrolysis activity of β -galactosidase
- 3 **AJISAKA K., FUJIMOTO H., NISHIDA H., 1988**
Carbohydr. Res. 180, 35-42
Enzymic synthesis of disaccharides by use of the reversed hydrolysis activity of β -galactosidases
- 4 **AJISAKA K., FUJIMOTO H., 1989**
Carbohydr. Res. 188, 139-146;
Regioselective synthesis of trisaccharides by use of a reversed hydrolysis activity of α - and β -D-galactosidases
- 5 **ALESSANDRINI A., SCHMIDT E., ZILLIKEN F., GYORGY P., 1956**
J. Biol. Chem. 220, 71-78
Enzymatic synthesis of β -D-galactosides of N-acetyl-D-glucosamine by various mammalian tissues
- 6 **ANAGNOSTOPOULOS C., COURTOIS J.E., PETEK F., 1955**
Arch. Sc. Biol. Ital., 39, 631-
- 7 **APPOURCHAUX L., 1989**
Thèse de l'Université de Lille
Purification et propriétés des β -D-galactosidases et des N-acétyl- β -D-glucosaminidases de *Bifidobacterium bifidum* souche AA 2/2
- 8 **ARONSON M., 1952**
Arch. Biochem. Biophys., 39, 370-377
Transgalactosidation during lactose hydrolysis
- 9 **ASP N.G., BURVALL A., DALQVIST A., HALLGREN P., LUNDBLAD A., 1980**
Food Chem., 5, 147-153
Oligosaccharides formation during hydrolysis of lactose with *saccharomyces lactis* lactase (Maxilact®): Part 2- Oligosaccharides structures
- 10 **BACON J.S.D., EDELMAN J., 1950**
Arch. Biochem. Biophys., 28, 467-
- 11 **BACK J.F., OAKENFULL D., SMITH M.B., 1979**
Biochemistry., 18, 5191-5196
- 12 **BALLIO A., RUSSI S., 1960**
J. Chromatogr., 4, 117-129
Chromatographic fractionation and chemical characterization of some oligosaccharides synthesized from lactose by *Penicillium chrysogenum* thom
- 13 **BARDALES R.M., BHAVANANDAN V.P., 1989**
J. Biol. Chem., 264, 19893-19897
Transglycosylation and transfert reaction activities of endo- α -N-acetyl-D-galactosaminidase from *Diplococcus (Streptococcus) pneumoniae*

- 1 4 **BARKER S.A., BOURNE E.J., HEWITT G.C., STACEY M., 1955**
 Amer. J. Chem. Soc., 3734-3740
 Studies of *Aspergillus niger* : Part 4- The synthesis of β -linked
 glucosaccharides
- 1 5 **BARKER S.A., FOSTER A.B., KMELNITSHI L.I., WEBBER J.M., 1960**
 Bull. Soc. Chim. Biol., 42, 1799-
 Some enzyme transfer reactions involving 2-acetamido-2-deoxy-D-glucose
- 1 6 **BETSCHART H.F., PRENOSIL J.E., 1984**
 J. Chromatogr., 299, 498-502
 High performance liquid chromatographic analysis of the products of enzymatic
 lactose hydrolysis
- 1 7 **BEYER T.A., SADLER J.E., REARICK J.I., PAULSON J.C., HILL R.L.,
 1981**
 Adv. Enzymol., 52, 23-175
- 1 8 **BEZIRTOGLOU E., 1981**
 Thèse de Paris Sud
 Contribution à l'étude de l'implantation de la flore fécale anaérobie du
 nouveau-né mis au monde par césarienne.
- 1 9 **BOOS W., LEHMANN J., WALLENFELS K., 1969**
 Carbohydr. Res., 7, 381-394
 Untersuchungen zur induktion der lac-enzyme: Teil 3- Synthese radioaktiv
 markierter induktoren durch enzymatischen galaktosyl-transfer und direkte
 enzymatische verknüpfung von glycon und aglycon mit β -galaktosidase
- 2 0 **BOURQUELOT E., BRIDEL M.J., 1912**
 J.Pharm. Chim.(Paris), 7, 569-573
- 2 1 **BOURRILLON A., BOUSSOGANT Y., LEJEUNE C., BAILLERET F.,
 1980**
 in "Les anaérobies" (Symposium Paris) Ed. MASSON 96-107
 Etablissement et cinétique des anaérobies dans la flore fécale du nouveau-né.
- 2 2 **BOUTRY E., 1989**
 Thèse de l'Université de Lille I
 Exoglycosidases de *Bifidobacterium bifidum* souche AA 2/2 : Optimisation de la
 production des enzymes en fermenteur - Purification et propriétés d'une
 α -D-neuraminidase
- 2 3 **BOVETTO L., 1988**
 Thèse de l'université de Lille I
 La cyclodextrine glucosyl transférase de *Bacillus circulans*
- 2 4 **BRADFORD M., 1976**
 Anal. Biochem., 72, 248-254
 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of
 protein utilising the principle of protein-dye binding
- 2 5 **BUNTON C.A., LEWIS T.A., LEWELLYN D.R., TRISTRAM H., VERNON
 C.A., 1954**
 Nature 174, 560-

- 2 6 **BURNETTE N.W., 1981**
 Anal. Biochem., 111, 195-203
 "Western blotting": Electrophoretic transfer of protein from sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibodies and radioionised protein A
- 2 7 **BURSTEIN C., COHN M., KEPES A., MONOD J., 1965**
 Biochem. Biophys. Acta, 95, 634-639
 Rôle du lactose et de ses produits métaboliques dans l'induction de l'opéron lactose chez *Escherichia coli*
- 2 8 **BURVALL A., ASP N.G., DALQVIST A., 1979**
 Food Chem., 4, 243-250
 Oligosaccharides formation during hydrolysis of lactose with *saccharomyces lactis* lactase (Maxilact®): Part 1-Quantitative aspects
- 2 9 **BURVALL A., ASP N.G., DALQVIST A., 1980**
 Food Chem., 5, 189-194
 Oligosaccharides formation during hydrolysis of lactose with *saccharomyces lactis* lactase (Maxilact®): Part 3-digestibility by human intestinal enzymes *in vitro*
- 3 0 **CHIBA S., ASADA-KOMATSU Y., KIMURA A., KAWASHIWA K., 1984**
 agric. Biol. Chem., 48, 1173-1178
 A new trisaccharide, 3^G- α -D-glucosyl-sucrose, synthesized by the transglucosidase action of immobilized buckwheat α -glucosidase
- 3 1 **CIUCANU I., KEREK F., 1984**
 Carbohydr. Res., 131, 209-217
 A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates
- 3 2 **COLLINS J.G., BRADBURY J.H., TRIFONOFF E., MESSER M., 1981**
 Carbohydr. Res., 92, 136-140
 Structure of four new oligosaccharides from marsupial milk, determined mainly by ¹³C-n.m.r. spectroscopy
- 3 3 **CONCHIE J. (1954)**
 Biochem. J., 58, 552-560
 β -Glucosidase from rumen liquor- Preparation, assay and kinetics of action
- 3 4 **COTE G.L., ROBYT J.F., 1982**
 Carbohydr. Res., 111, 127-142
 Acceptor reactions of alternansucrase from *Leuconostoc mesenteroides*
- 3 5 **COURTOIS J.E., PETEK F., 1957**
 Bull. Soc. Chim. Biol., 39, 715-723
 Obtention d'épimélibiose par action transférante de l' α -galactosidase
- 3 6 **DELEYN F., CLAESSENS M., DEBRUYNE C.K., DEBRUYNE A., 1985**
 Can. J. Biochem. Cell Biol., 63, 204-211
 Transfer reactions catalysed by β -D-xylosidase from *Penicillium wortmanni*
- 3 7 **DEY P.M., PRIDHAM J.B., 1972**
 Adv. Enzymol., 36, 91-130
 Biochemistry of α -galactosidase

- 3 8 **DICKSON R.C., DICKSON L.R., MARVIN J.S., 1979**
J. Bacteriol., 137, 51-61
Purification and properties of an inducible β -galactosidase isolated from the yeast *Kluyveromyces lactis*
- 3 9 **EDELMAN J., 1956**
Adv. Enzymol., 17, 189-232
The formation of oligosaccharides by enzymic transglycosylation
- 4 0 **FINCH P.R., YUEN R., SCHAHTER H., MOSCARELLO M.A., 1969**
Anal. Biochem., 31, 296-305
Enzymatic method for micro assay of D-mannose, D-glucose, D-galactose and L-fucose from acid hydrolysates of glycoproteins
- 4 1 **FISHMAN P.H., 1980**
In M. FIELD, J.S.FORDTRAN, S.G.SCHULTS (Ed), Secretory diarrhea. American Physiological Society, Waverly Press (Baltimore), 85-106
Mechanism of action of cholera toxin : events on the cell surface
- 4 2 **FOURNET B., STRECKER G., LEROY Y., MONTREUIL J., 1981**
Anal. Biochem., 116, 489-502
Gas-liquid chromatography and mass spectrometry of methylated and acetylated methyl glycosides. Applications to the structural analysis of glycoproteins glycans
- 4 3 **FRANTZ J.C., JASO-FRIEDMAN L., ROBERTSON D.C., 1984**
Infect. Immun., 43, 622-630
Binding of *E.coli* heat-stable enterotoxin to rat intestinal cells and brush border membranes
- 4 4 **FRENCH D., PAZUR J.H., LEVINE M.L., NORBERG E., 1948**
J. Amer. Chem. Soc., 70, 3145-3145
Reversible action of *Macerans* amylase
- 4 5 **FRENCH D., LEVINE M.L., NORBERG E., NORDIN P., PAZUR J.H., WILD G.M. 1954**
J. Amer. Chem. Soc., 76, 2387-2390
Studies on the Schardinger dextrans : Part 7- Co-substrate specificity in coupling reactions of *Macerans* amylase
- 4 6 **GREENBERG N.A., MAHONEY R.R., 1983**
Food Chem., 10, 195-204
Formation of oligosaccharides by β -galactosidase from *Streptococcus thermophilus*
- 4 7 **HANES C.S., 1932**
Biochem. J., 26, 1406
- 4 8 **HASSID W.Z., 1970**
In The Carbohydrate Vol II A 2nd Ed. W.PIGMAN and D.HORTON Ed., Academic Press, pp 301-373
Biosynthesis of sugars and polysaccharides
- 4 9 **HEDBYS L., JOHANSSON E., MOSBACH K., LARSSON P.O., 1989**
Carbohydr. Res., 186, 217-223
Synthesis of 2-acetamido-2-deoxy-3-O- β -D-galactosyl-D-galactose by the sequential use of β -galactosidases from bovine testes and *E.coli*

- 5 0 **HEDBYS L., JOHANSSON E., MOSBACH K., LARSSON P.O., GUNNARSSON A., SVENSSON S., LÖNN H., 1989**
Glycoconjugate. J., 6, 161-168
Synthesis of β Gal(1-3)GlcNAc and β Gal(1-3)GlcNAcb-S-Et by an enzymatic method comprising the sequential use of β -galactosidases from bovine testes and *E.coli*
- 5 1 **HEHRE E.J., 1941**
Science, 93, 327-
- 5 2 **HEHRE E.J., 1951**
Adv. Enzymol., 11, 297-337
Enzymic synthesis of polysaccharides : A biological type of polymerisation
- 5 3 **HESTRIN S., AVINFRI-SHAPIRO S., 1944**
Biochem. J., 38, 2-10
The mechanism of polysaccharide production from sucrose
- 5 4 **HESTRIN S., FEINGOLD D.S., AVIGAD G., 1956**
Biochem. J., 64, 340-351
The mechanism of polysaccharide production from sucrose : Part 3- Donor acceptor specificity of levansucrase from *Aerobacter levanicum*
- 5 5 **HEYRAUD A., RINAUDO M., TARAVEL F.R. (1987)**
Carbohydr. Res. 185, 315-319
Isolation and characterization of oligosaccharides containing D-fructose from the juices of the Jerusalem artichoke. Kinetics constants for the acid hydrolysis
- 5 6 **HIDAKA H., EIDA T., TAKIZAWA T., TOKUNAGA T., TASHIRO Y., 1986**
Bifidobacteria Microflora, 5, 37-50
Effects of fructo-oligosaccharides on intestinal flora and human health
- 5 7 **HOLMGREN J., LONNROTH I., 1980**
In O. OUCHTERLONY J. HOLMGREN (Ed), Cholera and related diarrheas, 43rd Nobel Symposium, Stockolm. S.KARGER, (Basel). 88-103
Structure and functions of enterotoxins and their receptors
- 5 8 **HOWARD B.H., JONES G., PURDOM M.R., 1966**
Biochem. J., 98, 46-
- 5 9 **HUBER R.E., KURZ G., WALLENFELS K., 1976**
Biochemistry, 15, 1994-2001
A quantitation of the factors which affect the hydrolase and transgalactosylase activities of β -galactosidase (*E.coli*) on lactose
- 6 0 **HUBER R.E., GAUNT M.T., HULBURT K.L., 1984**
Arch. Biochem. Biophys., 234, 151-160
Binding and reactivity at the "glucose" site of galactosyl- β -galactosidase (*E.coli*)
- 6 1 **HUBER R.E., HURLBURT K.L., 1986**
Arch. Biochem. Biophys., 246, 411-418
Reversion reactions of β -galactosidase (*E.coli*)
- 6 2 **JERMYN , 1957**
Science, 125, 12-15
Mechanism of carbohydrase action

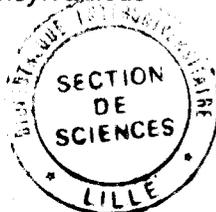
- 6 3 **JOBE A., BOURGEOIS S.,1972**
 J. Mol. Biol.,69, 397-408
 Lac repressor-operator interaction -The naturel inducer of the lac operon
- 6 4 **JOHANSSON E., HEDBYS L., LARSSON P.O., MOSBACH K.,
 GUNNARSSON A., SVENSSON S., 1986**
 Biotechnol. Lett., 8, 421-424
 Synthesis of mannose oligosaccharides via reversal of the α -mannosidase reaction
- 6 5 **KAMERLING J.P., GERWIG G.J., VLIEGENTHART J.F.G., CLAMP
 J.R., 1975**
 Biochem. J., 151, 491-495
 Characterization by gas liquid chromatography - mass spectrometry of pertrimethylsilyl glycosides obtained in the methanolysis of glycoproteins and glycolipids
- 6 6 **KIMURA A., YOSHIDA-KITAHARA F., CHIBA S., 1987**
 Agric. Biol. Chem., 51, 1859-1864
 Characteristics of transglucosylation of honeybee α -glucosidase I
- 6 7 **KOSLAND D.E. 1954**
 "Symposium on the mechanism of enzyme action" W.D. Mc ELROY , B. GLASS
 Eds , J. HOPKINS Press
- 6 8 **KRIVAN H.C., CLARK G.F., SMITH D.F., WILKINS T.D., 1986**
 Infect. Immun., 53, 573-581
 Cell surface binding site for *Clostridium difficile* enterotoxin : Evidence for a glycoconjugate containing the sequence Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc
- 6 9 **KUHN R., BAER H.H., GAUHE A., 1955**
 Chem. Ber., 88, 1713-1723
 Chemische und enzymatische synthese des 6 β -D-galaktosido-N-acetyl-D-glucosamin ; Enzymatische synthese des allolactose
- 7 0 **KYOSAKA S., MURATA S., TSUDA Y., TANAKA M.,1986**
 Chem. Pharm. Bull., 34, 5140-5143
 Isolation and identification of self-transfer products formed by guinea pig liver β -mannosidase
- 7 1 **LEMIEUX R.U., 1978**
 Chem. Soc. Rev., 7, 423-452
 Human blood groups and carbohydrate chemistry
- 7 2 **LESTER G., BYER S., 1965**
 Biochem. Biophys. Res. Comm., 18, 725-734
 Properties of two β -galactosidases of *Neurospora crossa*
- 7 3 **LINEWEAVER H., BURK D., 1934**
 J. Amer. Chem Soc., 56, 658-666
 The determination of enzyme dissociation constants
- 7 4 **LUBBERS S., 1989**
 DEA des Sciences de la Vie et de la Santé de l'UST Lille Flandres Artois
 Etudes des activités enzymatiques de *Bifidobacterium bifidum* souche AA 2/2 :
 Réaction de transglycosylation et réaction de désacétylation

- 7 5 **MEGA T., IKENAKA T., MATSHUSHIMA Y., 1972**
 J. Biochem., 72, 1197-1203
 Studies on N-acetyl- β -D-glucosaminidase of *Aspergillus oryzae* Part 3-
 Transglycosylation by the enzyme and preparation of crystalline phenyl
 NN'-diacetyl- β -chitobioside
- 7 6 **MESSER M., TRIFONOFF E., STERN W., COLLINS J.G., BRADBURY
 J.H., 1980**
 Carbohydr. Res., 83, 327-334
 Structure of a marsupial-milk oligosaccharide
- 7 7 **MESSER M., FITZGERALD P.A., MERCHANT J.C., GREEN B., 1987**
 Comp. Biochem. Physiol., 88 B, 1083-1086
 Changes in milk carbohydrates during lactation in the eastern quoll, *Dasyurus
 viverrinus* (Marsupiala)
- 7 8 **MIRANDA M.T.M., CHENG E., MURADIAN T., SEIDEL W.F.,
 TOMINAGA , 1986**
 Bioorg. Chem., 14, 182-193
 Thermolysin as a catalyst in enzymatic synthesis of asparagin- containing
 peptides
- 7 9 **MIRELMAN D., IZHAR M., ESHDAT Y., 1982**
 Tokai J. Exp. Clin. Med., 7, 177-183
 Carbohydrate recognition mechanisms which mediate microbial adherence to
 mammalian mucosal surfaces
- 8 0 **MITSUOKA T., 1974**
 Jap. J. Bact., 29, 773-788
 Studies on intestinal flora
- 8 1 **MITSUOKA T., HIKADA K., EIDA T., 1987**
 Die Nahrung.,5, 427-436
 Effect of fructo-oligosaccharides on intestinal microflora
- 8 2 **MOZAFFAR Z., NAKANASHI K., MATSUNO R., KAMIKUBO T.,1984**
 Agric. Biol. Chem., 48, 3053-3061
 Purification and properties of β -galactosidases from *Bacillus circulans*
- 8 3 **MOZAFFAR Z., NAKANASHI K., MATSUNO R.,1987**
 Appl. Microbiol. Biotechnol., 25, 426-429
 Effect of glutaraldehyde on oligosaccharide production by β -galactosidase from
Bacillus circulans
- 8 4 **MULLER-HILL R., RICKENBERG W., WALLENFELS K., 1964**
 J. Mol. Biol., 10, 303-318
 Specificity of the induction of the enzyme of the Lac operon in *Escherichia coli*
- 8 5 **MURAMATSU M., KAINUMA S., MIWA T., NAKAKUKI T., 1986**
 Agric. Biol. Chem., 52 ,1303-1304
 Structures of some oligosaccharides produced from sucrose by mycelia of
Aspergillus sydowi IAM 2544
- 8 6 **NAKANISHI K., MATSUNO R., TORII K., YAMAMOTO K., KAMIKUBO
 T., 1983**
 Enzyme Microb. Technol., 5, 115-120
 Properties of immobilised β -D-galactosidase from *Bacillus circulans*

- 87 **NILSSON K.G.I.,1987**
"Studies in organic Chemistry" (LAANE C.,TRAMPER J., LILLY M.D. Eds),29,
369-374
- 88 **NILSSON K.G.I.,1987**
Carbohydr. Res., 167, 95-103
A simple strategy for changing the regioselectivity of glycosidase- catalysed
formation of disaccharides
- 89 **NILSSON K.G.I.,1988**
Trends Biotechnol., 6, 256-264
Enzymatic synthesis of oligosaccharides
- 90 **NILSSON K.G.I.,1988**
Carbohydr. Res., 180, 53-59
A simple strategy for changing the regioselectivity of glycosidase-catalysed
formation of disaccharides part 2-Enzymatic synthesis (*in situ*) of various
acceptor glycosides
- 91 **OOI Y., HASHIMOTO T., MITSUO N., SATOH T., 1984**
Tetrahedr. Lett., 25, 2241-2241
Enzymatic synthesis of chemically unstable cardiac glycosides by
 β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*
- 92 **OUCHTERLONY O., 1949**
Acta Pathol. Microbiol. Scand., 26, 507-
- 93 **PAN S.C., NICHOLSON L.W., KOLACHOV P.,1953**
Arch. Biochem. Biophys., 42, 406-420
Enzymic synthesis of oligosaccharides - A transglycosidation
- 94 **PAULSEN H., 1984**
Chem. Soc. Rev., 13, 15-45
Synthesis of complex oligosaccharides chains of glycoproteins
- 95 **PAZUR J.H., 1953**
Science, 117, 355-356
The enzymatic conversion of lactose into galactosyl oligosaccharides
- 96 **PAZUR J.H., TIPTON C.L., BUDOVICH T.,MARSH J.M.,1958**
J.Am. Chem. Soc.,80 , 119-121
Structural characterization of products of enzymatic disproportionation of
lactose
- 97 **PAZUR J.H., SHADAKSHARASWAMY M., CEPURE A., 1961**
Arch. Biochem. Biophys., 94, 142-147
The use of o-nitrophenyl β -D-galactoside for the synthesis of galactosyl
oligosaccharides
- 98 **PEAT S., WHELAN W.J., HINSON K.A.,1952**
Nature, 170, 1056-
- 99 **PETEK F., COURTOIS J.E.,1964**
Bull. Soc. Chim. Biol., 46, 1093-1100
Obtention de trois monogalactosides du cellobiose par action transférante de l' α -
galactosidase du café
- 100 **PETUELY F., 1957**
Z. Kinderheik, 79, 174-179
Bifidus flora bei flaschen kindern durch bifidogene substanzen (bifidus factor)

- 1 0 1 **PETUELY F., KRISTEM G., 1949**
Ann. Paediat., 172, 183-184
Changing the intestinal flora of infants
- 1 0 2 **PRAKASH S., SUYAMA K., ITOH T., ADACHI S.,1987**
Biotechnol. Lett.,9, 249-252
Oligosaccharide formation by *Trichoderma harzianum* in lactose containing medium
- 1 0 3 **PRENOSIL J.E., STUKER E., BOURNE J.R., 1987**
Biotechnol. Bioeng., 30, 1026-1031
Formation of oligosaccharides during enzymatic lactose hydrolysis and their importance in a whey hydrolysis process : part 2- Experimental
- 1 0 4 **ROBERTS H.R., PETTINATI J.D.,1957**
Agric. Food Chem.,5, 130-134
Concentration effects in the enzymatic conversion of lactose to oligosaccharides
- 105 **SHARON N., 1987**
F E B S Lett., 217, 145-157
Bacterial lectins, cell-cell recognition and infectious disease
- 1 0 6 **SHINOYAMA H., KAMIYAMA Y., YASOI T.,1988**
Agric. Biol. Chem., 52, 2197-2202
- 1 0 7 **SICARD P.J., SANIEZ M.H., 1987**
in "Cyclodextrines and their Industrial Use" Ed. DUCHENE D., Edition De Sante, Paris 77-102
- 1 0 8 **STIEVENARD S. 1986**
Thèse de l'Université de Lille I
Hydrolyse industrielle du lactose. Mise au point au stade du laboratoire d'un réacteur à lactase immobilisée
- 1 0 9 **SUYAMA K., ADACHI S., TOBA T., SOHMA T., HWANG C.J., ITOH T., 1986**
Agric. Biol. Chem., 50, 2069-2075
Isoraffinose synthesized by the intermolecular transgalactosylation reaction of *Escherichia coli* β -galactosidase
- 1 1 0 **TAKAHASHI K., YOSHIMOTO T., AJIMA A., TAMAURA Y.,INADA Y., 1984**
Enzyme, 32, 235-240
Modified lipoprotein lipase catalyses ester synthesis in benzene - Substrate specificity
- 1 1 1 **TAKANO K., MIWA T., 1950**
J. Biochem. (Tokyo)) 37, 435-
- 1 1 2 **TANAKA T., OI S., 1984**
J. Biochem., 95, 847-854
Purification and some properties of β -transglucosylase of *Trichoderma longibrachiatum*
- 1 1 3 **TANAKA R., TAKAYAMA H., MOROTOMI M., KUROSHIMA T., UEYAMA S., MATSUMOTO K., KURODA A., MUTAI M., 1983**
Bifidobacteria Microflora , 2, 17-24
Effect of administration of TOS and *Bifidobacterium breve* 4006 on the human fecal flora

- 114 **TENU J.P., VIRATELLE O.M., GARNIER J., YON J., 1971**
Eur. J. Biochem., 20, 363-370
pH dependance of the activity of β -D-galactosidase from *Escherischia coli*
- 115 **TISSIER H., 1900**
Thèse de l'Université de Paris
Recherche sur la flore intestinale des nourrissons (état normal et pathologique)
- 116 **TOBA T., TOMITA Y., ITOH T., ADACHI S., 1981**
J. Dairy Sci., 64, 185-192
 β -Galactosidase of acid lactic bacteria: Characterization by oligosaccharides formed during hydrolysis of lactose
- 117 **TOBA T., YOKOTA A., ADACHI S., 1985**
Food Chem., 16, 147-162
Oligosaccharide structures formed during the hydrolysis of lactose by *Aspergillus oryzae* β -galactosidase
- 118 **VAITUKAITIS J., ROBBINS J.B., NIESCHLAG E., ROSS T.G., 1971**
J. Clin. Endocrinol. Metab., 33, 988-994
- 119 **VIDALUC J.L., BABOULENE M., SPEZIALE V., LATTES A., MONSON P., 1983**
Tetrahed. Lett., 39, 269-274
Optimization of the enzymatic synthesis of amino acid esters. Reaction in polyphasic medium
- 120 **WALLENFELS K., MALHOTRA O.P., 1961**
Adv. Carbohydr. Chem., 16, 239-298
Galactosidases
- 121 **WEBER K., OSBORN M., 1969**
J. Biol. Chem., 224, 4406-4412
The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis
- 122 **WIERZBICKI L.E., KOSINKOWSKI F.V., 1972**
J. Dairy Sci., 56, 1400-1404
Formation of oligosaccharides during β -galactosidase action on lactose
- 123 **YAMASHITA K., KAWAI K., ITAKURA M., 1984**
Nut. Res., 4, 961-966
Effects of fructo-oligosaccharides on blood glucose and serum lipid in diabetic subjects
- 124 **ZILLIKEN F. SMITH P.N., ROSE C.S., GYÖRGY P., 1954**
J. Biol. Chem., 208, 299-305
Enzymatic synthesis of a growth factor for *Lactobacillus bifidus* var *pennsylvanicus*
- 125 **ZILLIKEN F. SMITH P.N., ROSE C.S., GYÖRGY P., 1955**
J. Biol. Chem., 217, 79-82
Synthesis of 4 O- β -Dgalactopyranosyl-N-acetyl-D-glucosamine by intact cells of *Lactobacillus bifidus* var *pennsylvanicus*



R E S U M E

En milieu acide, l'hydrolyse du lactose par *B. bifidum* entraîne la formation d'oligosaccharides. Les produits néosynthétisés (depuis les disaccharides jusqu'aux nonasaccharides) représentent 30 % (p/p) des saccharides totaux. Ils se caractérisent par un greffage spécifique du galactose par des liaisons beta (1-3) glycosidiques.

L'enzyme responsable de cette activité de transgalactosylation a été purifiée. C'est une beta-D-galactosidase membranaire qui ne représente que 0,8 % de l'activité hydrolytique initiale. Elle résulte d'un assemblage de plusieurs sous-unités, sa masse moléculaire apparente est de l'ordre de 362 KDa. Son point isoionique est de 5,25. D'un point de vue immunologique, il n'y a pas de réaction croisée avec une autre beta-D-galactosidase de *B. bifidum*.

L'étude des propriétés enzymatiques a montré que les conditions de transfert (pH 4,8 et température de 45°C, Km 800 mM) sont très différentes des conditions d'hydrolyse (pH 6,5 et 37°C, Km 13 mM). La réaction est sensible au calcium qui est un activateur de l'activité hydrolytique au détriment de la réaction de transfert. La transgalactosylation ne peut s'effectuer que sur des accepteurs glycosylés possédant une structure parfaitement définie (fonction hémiacétalique bloquée, structure pyranique, fonction hydroxyle du C2 en position équatoriale). L'ensemble des résultats nous amène à proposer deux modèles pour expliquer la synthèse par mécanisme intermoléculaire des oligosaccharides.

Le rôle biologique des produits de transgalactosylation à partir de lactose a été abordé.

