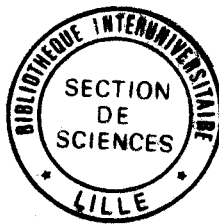


50376
1991
248



66347

50376
1991
248

N d'ordre: 817

UFR de Biologie

THESE

A RETOURNER

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE
Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

par
Jacques VILLETTE

ETUDE DES RELATIONS STRUCTURE-FONCTION DE LA
CYCLOMALTODEXTRINE GLUCANOTRANSFERASE
DE *BACILLUS CIRCULANS* E 192



030 031705 4

Présentée le 18 Décembre 1991 devant la commission d'examen

Président :	A. VERBERT
Rapporteurs :	A. BULEON
	H. DRIGUEZ
Examineurs :	J. MONTREUIL
	P. SICARD
	S. BOUQUELET

A Brigitte,
A Martin et Guillaume;

Vous êtes mon repère de valeurs, la source de mon bonheur et de mon énergie. Que cette thèse soit un jalon dans la construction de notre avenir.

A mes parents et beaux-parents;

Vous m'avez toujours aidé, réconforté et entouré. Que cet ouvrage soit le témoignage de mon éternel et profond attachement.

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une convention C.I.F.RE (Convention Industrielle de Formation par la REcherche) de l'Association Nationale de la Recherche Technique, contractée entre :

- La société ROQUETTE-Frères (Lestrem, France), d'une part,
et

- Le Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille, Unité Mixte de Recherche n°111 du C.N.R.S (Directeur : Professeur Jean MONTREUIL puis Professeur André VERBERT), sous la direction du Professeur Stéphane BOUQUELET, d'autre part,

(contrat n°774/88).

Certains résultats obtenus au cours de ces travaux ont fait l'objet des publications scientifiques suivantes :

- Isolation and Mechanism of Action of the Cyclodextrin-Glucosyltransferase from *Bacillus circulans*.

VILLETTE, J., BOUQUELET S., LELEU, J-B., & SICARD, P.J. (1990), in *Minutes of the 5th International Symposium on Cyclodextrins* (D. Duchène, Ed.), Paris, pp 32-38.

- Fast Purification of Cyclodextrin-Glucosyltransferase from *Bacillus circulans* E 192 by Affinity Chromatography Using an Epichlorhydrin-Reticulated Copolymer of Beta-Cyclodextrin.

VILLETTE, J.R., LOOTEN, P.J., & BOUQUELET, S.J-L. (1991). *Chromatographia* 32, sous presse.

- Cyclomaltodextrin Glucanotransferase from *Bacillus circulans* E 192. I- Purification and Characterisation of the Enzyme.

BOVETTO, L.J., BACKER, D.P., VILLETTE, J.R., SICARD, P.J., & BOUQUELET, S.J-L. (1991).

Biotechnol. Appl. Biochem., accepté pour publication.

- Cyclomaltodextrin Glucanotransferase from *Bacillus circulans* E 192. II- Action Patterns.

BOVETTO, L.J., VILLETTE, J.R., FONTAINE, I.F., SICARD, P.J., & BOUQUELET, S.J-L. (1991).

Biotechnol. Appl. Biochem., accepté pour publication.

- Cyclomaltodextrin Glucanotransferase from *Bacillus circulans* E 192. III- Chemical Modification by Diethylpyrocarbonate : Evidence for an Induced Fit at the Active Site Resulting from the Binding of an Acceptor.

VILLETTE, J.R., SICARD, P.J., & BOUQUELET, S.J-L. (1991).

Biotechnol. Appl. Biochem., accepté pour publication.

A Monsieur le Professeur Jean MONTREUIL,

C'est avec une grande bienveillance que vous m'avez accueilli dans votre laboratoire. Vous avez su transmettre à vos équipes votre amour de la recherche scientifique, et ces trois années évoqueront toujours pour moi l'épanouissement et la passion dans le travail.

Votre réputation internationale, forgée au cours d'une brillante carrière, a toujours suscité en moi une grande admiration. Vous me faites l'honneur de juger mon travail; veuillez trouver ici l'expression de mon plus profond respect et de mes vifs remerciements.

A Monsieur le Professeur André VERBERT,

Je m'associe à tous mes camarades du "C₉" pour vous féliciter et vous encourager dans vos nouvelles fonctions de directeur du laboratoire. Nous avons tous mesuré votre volonté, votre dynamisme et vos talents de "manager". Votre sens des relations humaines nous a toujours inspiré la plus grande confiance.

C'est vous qui m'avez enseigné les bases de l'Enzymologie et qui acceptez aujourd'hui la présidence de ce jury. C'est pour moi un grand honneur et je vous assure de mon plus profond respect.

A Monsieur le Professeur Stéphane BOUQUELET,

Je ne saurais jamais assez vous remercier des trois années passées sous votre direction. Elles évoqueront en effet toujours pour moi l'épanouissement de la curiosité scientifique qui vous caractérise, mais aussi le sens de l'application que vous avez toujours tenté de communiquer à vos élèves. Si vous m'avez toujours guidé dans mes recherches, vous m'avez aussi témoigné une grande confiance dans le choix des stratégies à adopter, et cette marge de manoeuvre m'a permis de mûrir sous bonne protection.

Vos qualités humaines, et tout particulièrement votre simplicité et votre sincérité, incitent à un dialogue sans équivoque. Mais votre principale qualité professionnelle réside dans votre grande rigueur scientifique. Puissent de nombreux futurs élèves en bénéficier.

Enfin, comme on dit souvent chez nous, "Vive les enfants du Lycée Jean Bart, ce sont de fameux gaillards..."

A Monsieur le Docteur Philippe SICARD,

Malgré vos lourdes charges au sein de l'entreprise, ce fut toujours avec une grande curiosité et un vif encouragement que vous avez suivi et discuté mes travaux. Au cours de nos nombreuses rencontres, vous avez toujours mis en avant l'intérêt de nos industries à ne pas négliger l'aspect fondamental de la recherche scientifique, tout en l'harmonisant à la nécessité de ses débouchés. Cette conception de la recherche, associée à votre forte personnalité, m'inspirent le plus profond respect.

Vous me faites aujourd'hui l'honneur de juger cette thèse. Veuillez trouver l'expression de ma reconnaissance.

A Monsieur le Docteur Hugues DRIGUEZ,

Je garde toujours en mémoire le souvenir de notre rencontre à Lestrem, et du débat constructif qui nous a animés autour d'un sujet qui nous est cher. L'intérêt que vous avez porté à la conciliation de nos différentes approches expérimentales m'a fait découvrir votre grande ouverture d'esprit et votre honnêteté scientifique. C'est pour moi une joie et un honneur de vous retrouver aujourd'hui comme juge et rapporteur. Soyez assuré de mes plus profonds remerciements.

A Monsieur le Docteur Alain BULÉON,

Vous avez accepté avec bienveillance de juger ce travail et d'en prendre la responsabilité de rapporteur, malgré les charges qui vous incombent et notre éloignement régional. Je vous prie de croire en l'expression de mes plus vifs remerciements et de mon profond respect.

Je tiens également à remercier ici, toutes les personnes qui ont été liées, de près ou de loin, à l'élaboration de ce travail :

- Toute l'équipe du service Recherche & Développement de la Société ROQUETTE-Frère, et tout particulièrement Monsieur Jean-Jacques CABOCHE, Directeur Scientifique, et le Docteur Jean-Bernard LELEU, Adjoint au Directeur Scientifique. Merci aussi au Docteur Philippe LOOTEN qui assurait la coordination Entreprise-Université.

- Monsieur Pierrick DUFLOT (ROQUETTE-Frères) et toute son équipe technique, pour la production à grande échelle d'une culture de *Bacillus circulans* E 192 et le support technique dans les premières étapes de la préparation de l'extrait enzymatique. Merci aussi au Docteur Daniel BACKER pour la coordination.

- L'équipe du Professeur André TARTAR (CNRS, Institut Pasteur de Lille), et tout particulièrement le Docteur Pierrette MAES, pour la microséquence N-terminale de l'enzyme.

- M^{lle} Colette BRASSARD, pour les analyses d'acides aminés.

- L'équipe du Professeur Jean-Pierre HENICHART (INSERM U-16), et plus particulièrement le Docteur Nicole HELBEQUE, pour les spectres de dichroïsme circulaire et les discussions concernant les aspects d'ordre physico-chimique.

- Monsieur le Docteur Jihad ALBANI, pour son aide dans l'élaboration et l'interprétation des spectres de fluorescence.

- Le Docteur DUPUY (Bio Merieux) pour le don de pNP-G₇-bloqué, et les Docteurs MÖLLER et MARDIN (Bayer AG) pour leur généreux envoi d'Acarbose.

- Enfin, je tiens à remercier tous les membres du Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille, pour leur soutien technique ou leurs conseils, mais aussi pour la formidable sympathie qu'ils m'ont toujours témoignée.

LISTE DES ABBREVIATIONS

CCM	Chromatographie sur couche mince
CD	Cyclodextrine
Cétavlon®	N-cétyl-N,N,N-triméthyl-ammonium bromide
CGTase	Cyclomaltodextrine Glucanotransférase
DE	Dextrose Equivalent
DEP	Diéthylpyrocarbonate
EDTA	Acide Ethylène-diamine tétraacétique
FPLC	Chromatographie liquide rapide des protéines
G _n	Maltooligosaccharide à n résidus glucosidiques
HEPES	Acide N-2-Hydroxyéthylpipérazine-N-2-Ethane- sulfonique
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
NBS	N-bromosuccinimide
PAGE	Electrophorèse en gel de polyacrylamide
P _i	Point isoélectrique
pNP-G _n	Paranitrophényl- α -D-maltooligosaccharide
pNP-G ₇ -bloqué	4,6-Benzylidène-paranitrophényl- α -D-malto- heptaoside
SDS	Dodécyl-sulfate de sodium
TNM	Tetranitrométhane
Tris-HCl	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane tamponné HCl
Waxy maïs	Amidon riche en amylopectine (99 %) provenant d'un maïs hybride.

TABLE DES MATIERES

	page
INTRODUCTION	
	2
GENERALITES	
I	
LES CYCLODEXTRINES	
I-A- Définition.	5
I-B- Historique.	5
I-C- Structure des α -, β - et γ -CD.	7
I-D- Propriétés d'inclusion par les α -, β - et γ -CD.	7
I-E- Principales applications des cyclodextrines.	9
1- Complexes d'inclusion.	10
2- Cyclodextrines immobilisées.	10
3- Enzymes artificielles.	11

II

LES CYCLODEXTRINE GLUCANOTRANSFERASES (CGTases)

II-A- Définition.	12
1- Nomenclature.	12
2- Substrats utilisés.	12
3- Principales réactions catalysées.	13
4- Réaction secondaire de type amylolytique.	14
II-B- Historique.	15
II-C- Origine et principales caractéristiques des CGTases.	15
II-D- Spécificité des CGTases.	17
II-E- Isolement et purification des CGTases.	18
II-F- Structure des CGTases.	20
1- Structure primaire.	20
2- Structure tridimensionnelle.	21
II-G- Réactivité des CGTases : aspect enzymologique et recherche d'un mécanisme réactionnel.	29
1- Importance et spécificité de l'accepteur.	30
2- Sensibilité aux inhibiteurs des α -glucohydrolases.	31
3- Notion de site du donneur et de site de l'accepteur.	32
4- Les modèles proposés pour le site actif des CGTases.	34

II-H- Etudes relatives aux relations structure-réactivité.	38
1- Homologies de séquences avec d'autres α -glucohydrolases dans des régions de fonctions connues.	38
2- Réactivité des CGTases "chimériques", tronquées dans la partie C-terminale.	40
3- Modifications chimiques spécifiques, appliquées à des résidus d'acides aminés fonctionnels.	42
4- Homologies de séquences, dans la région C-terminale, avec d'autres glucohydrolases affines pour l'amidon cru.	43

III

LA CGTase DE *BACILLUS CIRCULANS* # E 192.

III-A- Principales caractéristiques physicochimiques.	44
III-B- Paramètres enzymatiques.	45
1- Conditions optimales.	45
2- Substrats.	45
3- Spécificité.	46
4- Autres caractéristiques.	46

MATERIEL ET METHODES

I

TECHNIQUES ANALYTIQUES

I-A- Dosage des protéines.	48
I-B- Dosage des hexoses neutres totaux.	48
I-C- Dosage colorimétrique des β -CD et de l'activité cyclisante.	49
I-D- Dosage de l'activité pseudo-dextrinifiante (consommation du substrat)	51
1- Principe.	51
2- Méthodes.	52
a- Dosage à l'iode (méthode "B.A.U." modifiée).	52
b- Utilisation du Phadebas [®] amylase test.	53
I-E- Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM) des mono- et oligosaccharides libérés dans l'incubat enzymatique.	55
I-F- Techniques électrophorétiques.	57
1- Analyse des protéines par électrophorèse dénaturante en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)	57
2- Analyse isoélectrophorétique de l'enzyme.	58
I-G- Analyse des compositions en amino-acides.	59

II

TECHNIQUES RELATIVES A LA PURIFICATION DE L'ENZYME

II-A- Préparation de l'extrait à chromatographier.	60
II-B- Synthèse chimique du copolymère de β -CD.	61
II-C- Estimation de la capacité du copolymère de β -CD.	62
II-D- Purification de l'enzyme par chromatographie d'affinité sur le copolymère de β -CD.	62
1- Purification préparative.	62
2- Purification analytique et micro-préparative.	63
II-E- Séparation analytique ou micropréparative des isoformes de l'enzyme par chromatographie d'échange d'ions.	64

III

TECHNIQUES RELATIVES A LA PARTIE ENZYMATIQUE

III-A- Détermination des paramètres cinétiques (K_M et V_{max}) de l'activité cyclisante mesurée sur amidon soluble.	64
III-B- Détermination des constantes de dissociation observées (K_{dobs}) de l'enzyme sur grains d'amidon cru et sur copolymère de β -CD.	65
III-C- Réactivités comparées de l'enzyme ou d'une α -amylase sur grains d'amidon de maïs, en présence ou non d'accepteur.	66
III-D- Comparaison des réactions de couplage catalysées par α - ou β -CGTases.	67

III-E- Influence comparée de l'hélicine sur l'activité pseudo-dextrinifiante de la CGTase et sur l'activité dextrinifiante d'une α -amylase.	68
III-F- Action diproportionnante de l'enzyme sur les pNP-maltooligosaccharides en présence ou non d'accepteurs exogènes.	68
III-G- Influence de deux types d'effecteurs du site actif (salicine et acarbose).	70
1- Caractérisation en CCM de l'action des effecteurs sur la réactivité enzymatique.	70
2- Effets comparés des effecteurs sur les activités cyclisantes et pseudo-dextrinifiante de l'enzyme.	71
3- Détermination des types d'inhibition et des constantes d'inhibition (K_i) de l'activité cyclisante.	71
4- Influence de l'acarbose sur l'affinité de l'enzyme pour l'amidon cru de maïs.	72

IV

TECHNIQUES RELATIVES A LA MODIFICATION CHIMIQUE DES ACIDES AMINES ET DE LA REACTIVITE DE L'ENZYME

IV-A- Etude de l'influence de l'oxydation des résidus tryptophanyles de l'enzyme par la N-bromosuccinimide (NBS).	73
1- Conditions générales d'oxydation des résidus tryptophanyles de l'enzyme par la NBS.	73

2- Effet de l'oxydation par la NBS sur la solubilité de l'enzyme, son activité résiduelle, et son affinité résiduelle pour l'amidon cru de maïs ou pour le copolymère de β -CD.	74
3- Influence des effecteurs (salicine et/ou acarbose) lors de l'action de la NBS sur l'enzyme.	75
IV-B- Etude de l'influence de la nitration des résidus tyrosyles de l'enzyme par le tétranitrométhane (TNM).	76
1- Principe.	76
2- Cinétiques de nitration de l'enzyme par le TNM 20 mM en présence ou non des effecteurs (salicine et/ou acarbose).	76
3- Etude de la nitration de l'enzyme par des concentrations croissantes en TNM.	77
a- Préparation des échantillons d'enzyme nitrée.	77
b- Analyse des échantillons d'enzyme nitrée.	78
c- Détermination du nombre de résidus 3-nitrotyrosyles.	78
d- Analyse spectrofluorimétrique des échantillons d'enzyme nitrée.	79
e- Analyse par dichroïsme circulaire des échantillons d'enzyme nitrée.	79
4- Etude de l'effet protecteur des effecteurs (salicine et/ou acarbose) lors de la nitration de l'enzyme.	80
a- Préparation et analyse des échantillons d'enzyme nitrée.	80

b- Analyse spectrofluorimétrique de l'enzyme nitrée en présence ou non d'acarbose.	80
IV-C-Etude de l'influence de l'éthoxyformylation des résidus histidyles de l'enzyme par le diéthylpyrocarbonate.	81
1- Conditions générales d'éthoxyformylation.	81
2- Etude cinétique des variations d'activité enzymatique lors de l'éthoxyformylation.	82
3- Comparaison des paramètres cinétiques (K_M et V_{max}) de l'enzyme native et modifiée.	82
4- Traitement à l'hydroxylamine de l'enzyme modifiée.	83
5- Détermination du nombre de résidus éthoxyformyl-histidyles.	83
6- Etude de l'effet protecteur des effecteurs (salicine et/ou acarbose) lors de l'éthoxyformylation.	85

V

ANALYSE COMPARATIVE PAR DICHROISME CIRCULAIRE DES STRUCTURES SECONDAIRES DE L'ENZYME EN PRESENCE DES EFFECTEURS (SALICINE ET/OU ACARBOSE)

85

RESULTATS

I

PURIFICATION DE L'ENZYME PAR UN NOUVEAU PROCEDE RAPIDE UTILISANT LA CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR COPOLYMERE DE β -CD RETICULE PAR L'EPICHLORHYDRINE

I-A- Préparation et capacité du copolymère de β -CD.	88
I-B- Détermination de la constante de dissociation observée (K_{dobs}) de l'enzyme sur le copolymère de β -CD.	88
I-C- Préparation de l'extrait à chromatographier.	90
I-D- Purification de l'enzyme sur le copolymère de β -CD.	92
I-E- Analyse (SDS-PAGE) des fractions de purification.	95
I-F- Discussion.	95

II

CARACTERISATION DE L'ENZYME PURIFIEE

II-A- Masse moléculaire.	97
II-B- Caractérisation des isoenzymes.	97
1- Mise en évidence des isoenzymes.	97
2- Détermination des points isoélectriques et des activités spécifiques relatives des isoenzymes.	97

3- Séparation préparative des isoenzymes.	99
II-C- Composition en résidus d'amino-acides de l'enzyme.	99
II-D- Séquence N-terminale de la chaîne polypeptidique de l'enzyme (30 premiers résidus).	99
II-E- Discussion.	103

III

MISE EN EVIDENCE D'UN SITE A AFFINITE POUR L'AMIDON CRU, DIFFERENT DU SITE ACTIF

III-A- Constante de dissociation observée (K_{dobs}) de l'enzyme sur grains crus d'amidon de maïs.	104
III-B- Effets de l'oxydation des résidus tryptophanyles de l'enzyme par la NBS.	104
1- Effet de l'oxydation par la NBS sur la solubilité de l'enzyme.	106
2- Effets comparés de l'oxydation par la NBS sur l'activité résiduelle de l'enzyme et son affinité résiduelle pour l'amidon cru ou pour le copolymère de β -CD.	108
III-C- Discussion.	108

IV

ETUDE DU SITE ACTIF SUIVANT LE MODELE DE BOVETTO (1988). MISE EN EVIDENCE D'UNE TRANSCONFORMATION DU SITE DU DONNEUR INDUITE PAR L'OCCUPATION DU SITE DE L'ACCEPTEUR

IV-A- Stratégie d'étude.	111
IV-B- Visualisation de la nécessité d'un accepteur glucosidique dans la réactivité de l'enzyme.	112
1- Influence d'un accepteur sur l'activité dextrinifiante: comparaison entre l'enzyme et une α -amylase.	112
2- Réactivités comparées de l'enzyme vis-à-vis du pNP-G7 et du pNP-G7-bloqué, en présence ou non d'un accepteur: rôle de l'extrémité non réductrice libre.	112
3- Discussion.	115
IV-C- Mise en évidence de deux types d'inhibiteurs de la cyclisation: la salicine et l'acarbose. Etude de leur réactivité en présence de l'enzyme.	116
1- Effets comparés des deux types d'inhibiteurs.	116
2- Analyse en CCM de la réactivité de l'enzyme en présence des deux types d'inhibiteurs.	119
3- Discussion.	119

IV-D- Influence de la nitration des résidus tyrosyles de l'enzyme par le tétranitrométhane (TNM). Mise en évidence d'une tyrosine importante dans le site actif.	121
1- Cinétiques de nitration de l'enzyme par le TNM 20 mM en présence ou non des effecteurs (salicine et/ou acarbose).	121
2- Influence de la nitration de l'enzyme par des concentrations croissantes en TNM.	128
a- Comparaison globale des effets mesurés.	128
b- Influence de la nitration sur la perte de fluorescence de l'enzyme.	130
c- Mise en évidence par dichroïsme circulaire d'une altération de la conformation de l'enzyme lors de sa nitration.	134
3- Effet protecteur des effecteurs (salicine et/ou acarbose) lors de la nitration de l'enzyme.	136
a- Activité résiduelle et nombre de résidus 3-nitrotyrosyles.	136
b- Fluorescence résiduelle.	136
4- Discussion.	139
IV-E- Influence de l'éthoxyformylation des résidus histidyles de l'enzyme par le diéthylpyrocarbonate (DEP).	141
1- Effet de la modification chimique sur l'activité enzymatique.	141
2- Nombre de résidus histidyles modifiés et effet protecteur des effecteurs (salicine et/ou acarbose).	144

3- Corrélation entre activité enzymatique résiduelle et nombre de résidus histidyles modifiés.	147
4- Activité résiduelle après modification par le DEP 5 mM de l'enzyme non-protégée, semi-protégée ou protégée.	147
5- Discussion.	151
IV-F- Influence des effecteurs (salicine et/ou acarbose) sur la conformation de l'enzyme étudiée par dichroïsme circulaire. Confirmation d'une transconformation induite par l'accepteur.	156
1- Comparaison des spectres.	156
2- Discussion.	158
IV-G- Comparaison de la réaction de couplage catalysée par les CGTases de <i>B. circulans</i> et <i>K. pneumoniae</i> . Confirmation de la flexibilité du site actif, expliquant la spécificité des différentes CGTases.	159
1- Résultats.	159
2- Discussion.	161

V

RELATIONS ENTRE LE SITE DE FIXATION DE L'AMIDON CRU ET LE SITE ACIF

V-A- Confirmation de l'indépendance des deux sites: non protection par les effecteurs du site actif vis-à-vis de l'action de la NBS sur le site de fixation de l'amidon cru.	162
V-B- Proximité des deux sites: inhibition de l'interaction enzyme/amidon cru par addition d'acarbose.	164

V-C- Réactivité de l'enzyme sur grains d'amidon de maïs. Comparaison avec la réactivité d'une α -amylase dégradant l'amidon cru.	164
V-D- Discussion.	167

CONCLUSION

170

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

176

ANNEXE

L'ACARBOSE ET SES DERIVES

UNE NOUVELLE GENERATION D'INHIBITEURS COMPETITIFS DES
 α -GLUCOHYDROLASES, A HAUTE SPECIFICITE POUR LEUR SITE CATALYTIQUE

198

INTRODUCTION

Les cyclodextrines (maltooligosaccharides cycliques) furent longtemps considérées comme des curiosités de laboratoire. Elles connaissent pourtant, depuis les vingt dernières années, un regain d'intérêt et un essor considérable, principalement pour leurs applications basées sur leur propension à inclure des micromolécules (arômes, médicaments, composés amers, pesticides, etc.). Aussi, le marché des cyclodextrines est-il considéré comme porteur, et l'industrie amidonnière se prépare à répondre à une demande croissante de cette catégorie de produits.

Aujourd'hui, le seul procédé rentable pour fabriquer des cyclodextrines est la bioconversion de l'amidon à l'aide d'enzymes bactériennes : les cyclomaltodextrine-glucanotransférases, ou CGTases. Cependant, ces enzymes catalysent plusieurs réactions secondaires à la cyclisation, et leur spécificité d'action est peu élevée (coexistence de différentes classes de cyclodextrines dans le réacteur). Ces inconvénients alourdissent les procédés d'extraction, notamment par l'utilisation de solvants organiques (trichloroéthylène par exemple) comme agents sélectifs de précipitation.

L'industrie productrice de cyclodextrines a donc rapidement mesuré la nécessité de mieux connaître le système enzymatique et son mécanisme d'action, souvent décrit comme complexe et difficile à étudier compte-tenu de la diversité des réactions catalysées. En effet, la connaissance approfondie du fonctionnement de la molécule peut être le point de départ de divers programmes visant à améliorer ses fonctions par les techniques d'ingénierie des protéines. C'est dans ce contexte que nous avons étudié, en collaboration avec la société ROQUETTE-Frères, les relations entre la structure et la réactivité de la cyclomaltodextrine-glucanotransférase de *Bacillus circulans* E 192.

Notre étude fait suite aux travaux de BACKER (1988) et de BOVETTO (1988) concernant cette même enzyme. Après avoir purifié la molécule, ces auteurs ont décrit les principales caractéristiques physico-chimiques et les paramètres enzymatiques de cette CGTase. D'autre part, BOVETTO propose un modèle du site actif permettant d'expliquer les diverses réactions catalysées par l'enzyme. Ces réactions procèdent toutes d'un même mécanisme de transglucosylation intra- ou intermoléculaire entre un accepteur et un donneur glucosidiques. Son modèle fait appel à la coexistence et à l'interdépendance, dans le site actif, d'un site du donneur et d'un site de l'accepteur. Cette dualité du site actif fut le point de départ de notre étude.

Afin de vérifier la validité de ce modèle, nous avons dans un premier temps recherché des molécules spécifiques de chaque site, et étudié la réactivité de l'enzyme en présence de ces deux catégories d'effecteurs. Nous avons ensuite utilisé ces molécules comme agents protecteurs vis-à-vis de modifications chimiques (spécifiques) de résidus d'acides aminés, afin d'obtenir une approche plus moléculaire du site actif.

Après quelques généralités concernant les cyclodextrines et les CGTases, la description de nos travaux s'articulera selon le plan suivant :

- 1- Purification de l'enzyme.
- 2- Caractérisation de l'enzyme purifiée.
- 3- Etude du site à haute affinité pour l'amidon cru.
- 4- Etude du site actif.
- 5- Relations entre le site actif et le site à haute affinité pour l'amidon cru.

Tous les résultats importants seront repris en conclusion.

GENERALITES

I- LES CYCLODEXTRINES.

I-A- Définition.

Les cyclodextrines (CD), ou dextrines de Sharding, sont des maltooligosaccharides non réducteurs car cycliques. Les trois cyclodextrines les plus répandues sont l' α -, la β - et la γ -CD, formées respectivement de 6, 7 et 8 unités glucopyranosyles liées en α -1,4 (Fig.1, p.6).

I-B- Historique.

L'existence des cyclodextrines est connue depuis maintenant cent ans, avec l'isolement par VILLIERS (1891) de deux "cellulosines" à partir d'une culture de *Bacillus amylobacter* dont la source de carbone était l'amidon.

SCHARDINGER (1904) isolera ensuite fortuitement un bacille résistant à la stérilisation, *Bacillus macerans*, qui semble "excréter" dans le milieu de fermentation des dextrines qui cristallisent par traitement alcoolique. En étudiant, plus tard, ces composés, il détermine leur nature cyclique et les nomme α - et β -dextrine cristallisées (SCHARDINGER, 1911).

Plus tard, FREUDENBERG & JACOBI (1935) préparent et purifient les cyclodextrines à partir de cultures de *Bacillus macerans*, et découvrent la γ -CD.

Vers 1950, les caractéristiques et la structure des trois principales cyclodextrines sont connues (FREUDENBERG & CRAMER, 1948; FRENCH et al., 1949). Enfin, FRENCH et al. (1965) isolent et caractérisent des cyclodextrines de tailles plus importantes : δ , ϵ , ζ et η -CD (delta, epsilon, dzêta et êta-CD) correspondant respectivement à des cycles de 9, 10, 11 et 12 résidus de glucose.

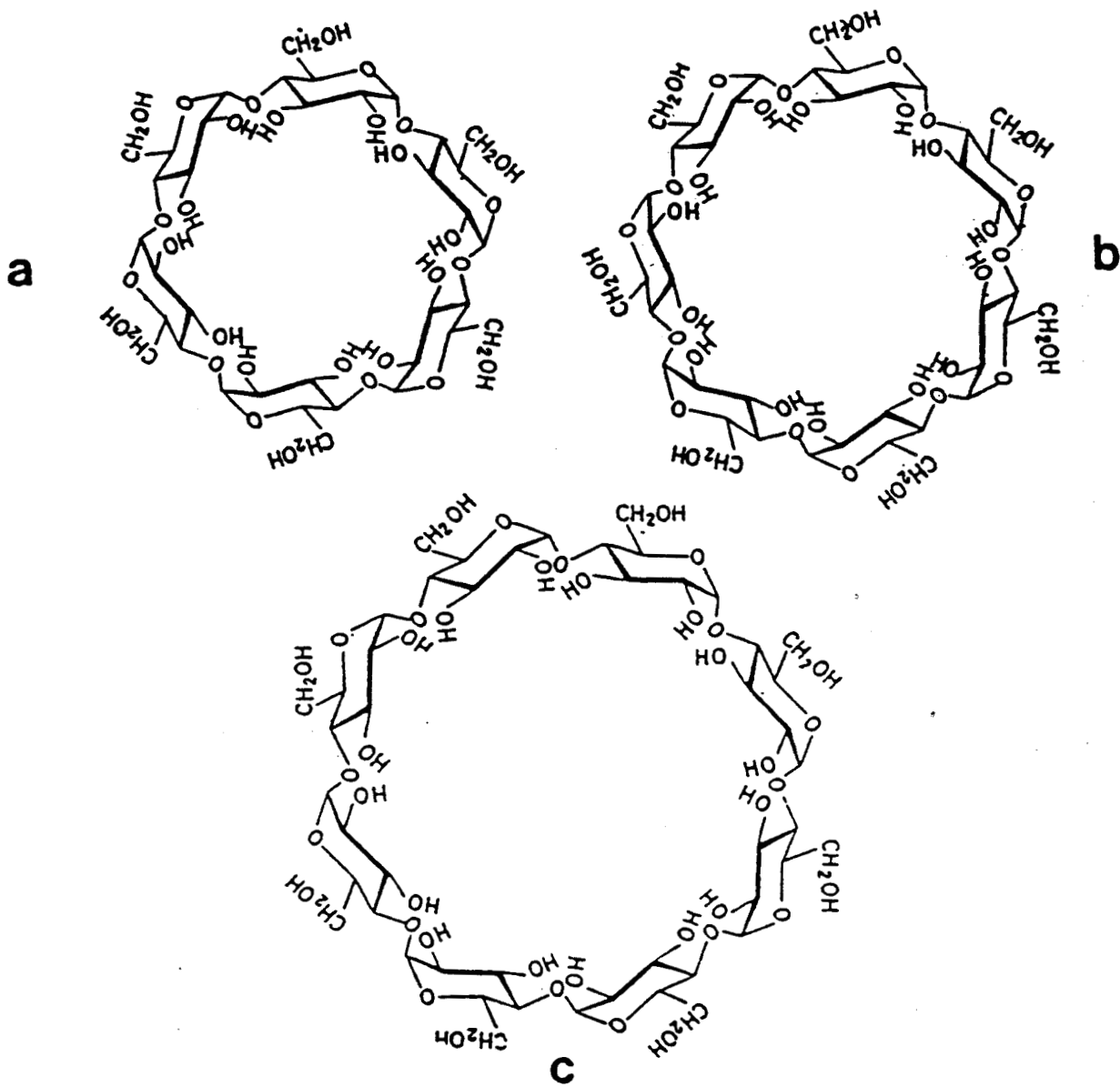


Figure n°1

Formule développée des trois principales cyclodextrines.

a: α -cyclodextrine; b: β -cyclodextrine; c: γ -cyclodextrine.

I-C- Structure des α -, β - et γ -CD.

Les cyclodextrines forment un anneau légèrement conique présentant tous les hydroxyles secondaires des résidus glucose constitutifs vers sa base, et tous les hydroxyles primaires (C-6) vers son extrémité supérieure (Fig.2, p.8). La structure est rigidifiée par des liaisons hydrogène contractées entre les hydroxyles en C-2 et les hydroxyles en C-3 de résidus de glucose voisins (LE BAS & RYSANEK, 1987). Ce phénomène est particulièrement efficace dans le cas de la β -CD, conférant à cette dernière une rigidité supérieure. La γ -CD, par contre, est la plus flexible. Les tensions maximales imposées à l' α -CD rendent impossible l'existence de cyclodextrines plus courtes.

L'intérieur du tore est tapissé par les groupements alkyles et les atomes d'oxygène portés par les C-4 et C-5 des résidus glucose constitutifs. Les paires d'électrons libres, dirigés vers l'intérieur de la cavité, produisent une haute densité électronique du "revêtement interne" (caractère des bases de Lewis).

Cette structure torique particulière confère aux cyclodextrines leur propriété la plus exploitée : leur capacité à former des complexes d'inclusion de molécules "invitées".

I-D- Propriété d'inclusion par les α -, β - et γ -CD.

Les cyclodextrines sont capables, en solution comme à l'état cristallin, de former des complexes d'inclusion avec des composés "invités" de taille compatible avec l'intérieur du tore. Outre le critère de taille, la formation du complexe dépend aussi de la polarité de la molécule " invitée".

Ce sont les résidus ou les molécules les plus hydrophobes qui présentent la plus grande affinité pour la cavité de la cyclodextrine. Celles-ci s'orientent de manière à favoriser le maximum de contacts entre leurs parties hydrophobes et la cavité

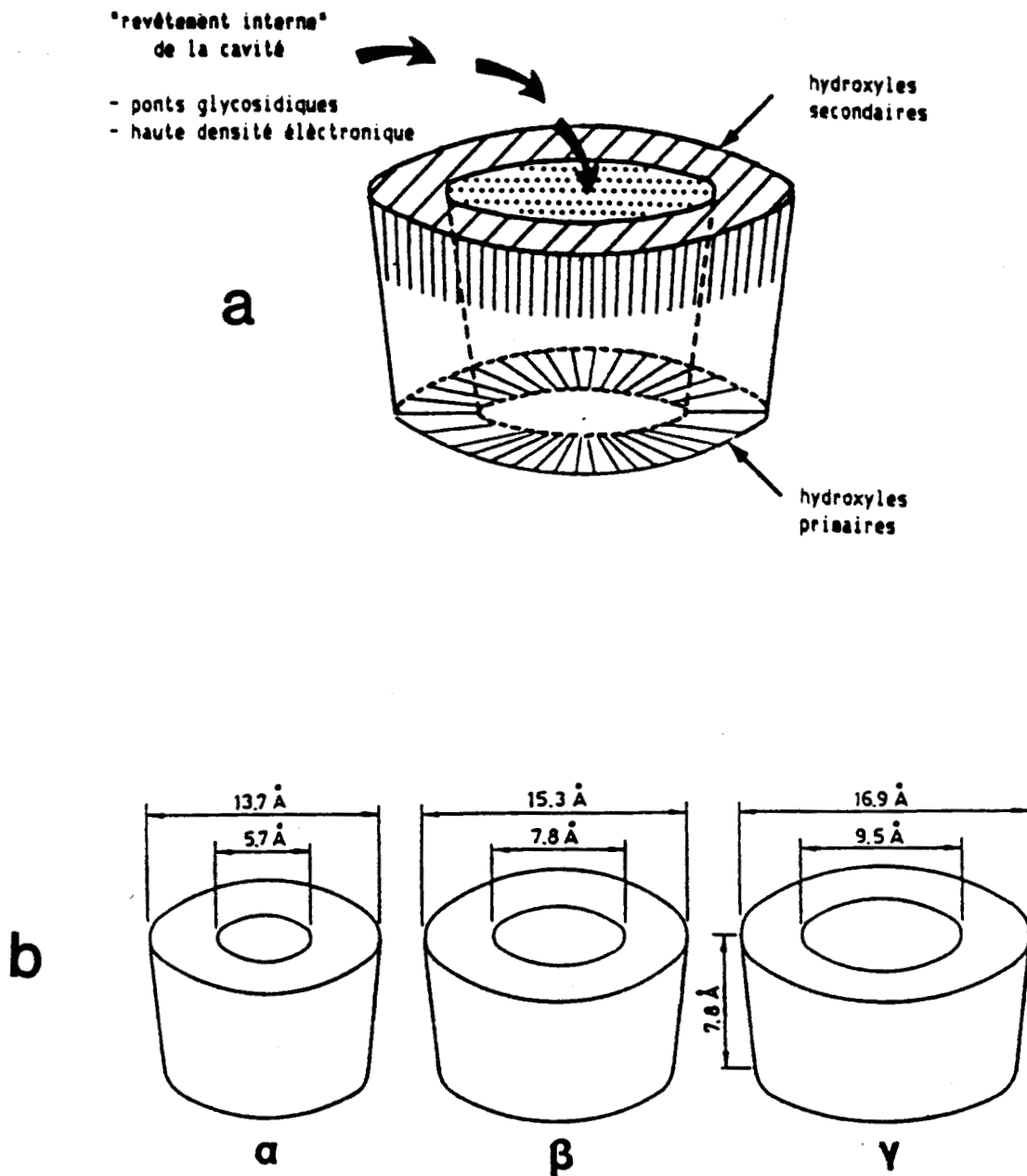


Figure n°2

a: Représentation schématique illustrant les différentes caractéristiques structurales d'une cyclodextrine.

b: Dimension des trois principales cyclodextrines.

apolaire de la cyclodextrine "hôte".

Cette encapsulation permet de modifier les propriétés physico-chimiques du composé "invité" (solubilité, stabilité, bio-disponibilité, absorbance, etc). De ce fait découlent les principales applications des cyclodextrines.

De nombreux complexes d'inclusion ont été décrits au cours de cette dernière décennie. Pour de plus amples informations, nous renvoyons le lecteur à la revue générale de SAENGER (1980).

I-E- Principales applications des cyclodextrines.

Le marché des cyclodextrines est actuellement en plein essor car ces molécules connaissent un vaste domaine d'applications dans les industries chimiques, phyto-sanitaires, agro-alimentaires, cosmétiques, et un grand espoir pour les industries pharmaceutiques. Selon SICARD (ROQUETTE-Frères), elles sont "typiquement des produits d'amidonnerie, du fait qu'elles vont passer d'un statut de spécialité à un statut de commodité" (rapporté par A. MILLET, 1990).

Les applications sont aujourd'hui en nombre croissant, depuis l'apparition sur le marché de cyclodextrines dites "de seconde génération", chimiquement fonctionnalisées par substitution de certains hydroxyles. Ainsi, le dérivé hydroxypropylé de la β -CD, commercialisé par ROQUETTE-Frères, permet d'augmenter 25 fois la solubilité de cette dernière dans l'eau.

Plusieurs auteurs ont passé en revue les différentes applications des cyclodextrines (SAENGER, 1980; BENDER, 1986; SZEJTLI, 1990), et celles-ci sont trop nombreuses pour pouvoir les citer toutes. Cependant, parmi les principales applications, trois principaux thèmes peuvent être dégagés : utilisation des cyclodextrines pour leurs complexes d'inclusion; utilisation de polymères de cyclodextrines ou de cyclodextrines greffées; utilisation des cyclodextrines comme catalyseurs (enzymes

artificielles).

1- Complexes d'inclusion.

Dans un document de 300 pages environ, SZEJTLI (1982) fait le point des divers complexes d'inclusion de molécules par les cyclodextrines, et des applications qui en découlent. Parmi celles-ci, nous pouvons citer :

- Augmentation des solubilités ou de la bio-disponibilité en milieu aqueux (médicaments, cholestérol...).
- Stabilisation de molécules.
- Conservation des arômes.
- Extractions (également à l'aide de cyclodextrines immobilisées) : cholestérol, caféïne, composés amers...

2- Cyclodextrines immobilisées (polymères, CD couplées sur gels de dextrans).

Dans une revue générale, SZEJTLI *et al.* (1978) font le point sur les nombreuses applications découlant de l'immobilisation des cyclodextrines. Les techniques d'immobilisation utilisent en général des agents de pontages difonctionnalisés (épichlorhydrine, etc.) capables de réagir avec les résidus hydroxyles de la cyclodextrine (copolymérisation), ou des dextrans fonctionnalisés (couplage sur matrice). Parmi les principales applications de ces produits, nous pouvons citer :

- Utilisation comme phases chromatographiques (RP-HPLC, chromatographie chirale, chromatographie d'affinité, séparations de micro-molécules).

- Concentration ou extraction de molécules par formation de complexes d'inclusion insolubilisés (désamérisation des jus de fruits, purification d'arômes, isolement d'antibiotiques, filtres pour tabac, raffinage du pétrole...).

3- Enzymes artificielles.

Ce développement plus récent des cyclodextrines est promis à un grand avenir, surtout par fonctionnalisation chimique des cyclodextrines à l'aide de résidus d'acides aminés, de manière à copier les sites actifs des enzymes, afin d'obtenir des activités catalytiques diverses. Dans cette application, l'aptitude de la cyclodextrine à piéger un "substrat" dans sa cavité est mise à profit, de sorte que celui-ci puisse présenter sa partie à transformer aux radicaux fonctionnalisés de la cyclodextrine. L'avantage de telles enzymes artificielles, par rapport aux protéines enzymatiques, réside surtout dans leur grande stabilité (température, pH, temps).

De nombreux exemples de catalyse chimique par les cyclodextrines ont été passés en revue (BRESLOW, 1982; VINCENT, 1983; BENDER (M.L.), 1989; HOSSEINI, 1989). Parmi ceux-ci, on peut citer l'activité estérase de la β -CD pour de nombreux substrats, la chloration sélective de noyaux aromatiques (ex. anisole) en présence d' α -CD, ou les activités de type transaminase ou RNase obtenues à l'aide de cyclodextrines fonctionnalisées.

II- LES CYCLODEXTRINE GLUCANOTRANSFERASES (CGTases).

La seule façon envisageable pour produire des cyclodextrines à une échelle industrielle est la bioconversion de l'amidon, à l'aide d'une enzyme excrétée par différentes souches microbiennes : la cyclomaltodextrine glucanotransférase (CGTase).

II-A- Définition.

1- Nomenclature.

D'après l'*International Union of Biochemistry* (IUB), les CGTases (E.C. 2.4.1.19) ou Cyclomaltodextrine glucanotransferases : 1,4- α -D-Glucan 4- α -D-(1,4- α -D-glucano)-transferase (cyclising), sont des enzymes d'origine bactérienne qui agissent par cyclisation d'une partie d'un 1,4- α -D-glucane en cyclodextrines constituées d'au moins 6 unités glucopyranosyles. La classification "transférase" est en fait inadaptée car l'enzyme n'utilise pas de glucanes fonctionnalisés par des liaisons riches en énergie (type phospho-nucléotidiques). Il s'agit en fait d'une transglucanase car elle agit par simple échange de liaison α -1,4 entre un donneur et un accepteur.

La fonction de cette enzyme est à rapprocher de :

a) la 4- α -D-glucanotransférase (E.C. 2.4.1.25) ou "D-Enzyme" ("Disproportionating enzyme"), qui catalyse la même réaction chez les végétaux mais sans cyclisation;

b) l'amyloamylase (E.C. 2.4.1.3), analogue de la D-Enzyme mais chez les bactéries.

2- Substrats utilisés.

Tous les α -1,4 glucanes peuvent être dégradés en cyclodextrines par les CGTases (glycogène, amylopectine, amylose)

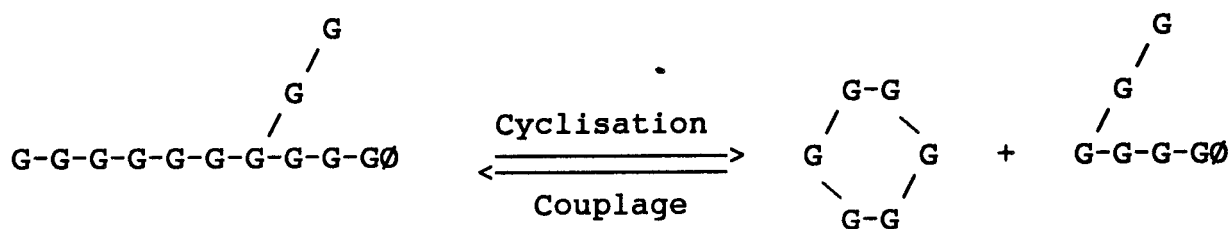
avec des efficacités relatives. Les CGTases ne débranchent pas les chaînes latérales (liaisons α -1,6). Des dextrans limites seront donc retrouvées lors de leur action sur amylopectine ou glycogène. Enfin, à ce jour, aucune CGTase n'a été décrite comme agissant directement sur les grains d'amidon non gélatinisé (amidon cru).

3- Principales réactions catalysées par les CGTases.

Depuis les travaux de FRENCH et al. (1948), il est admis que les CGTases catalysent indifféremment trois réactions, selon que la transglucosylation est intra- ou intermoléculaire (substrat unique ou substrat et co-substrat).

3-a- Cyclisation et couplage.

La cyclisation est une transglucosylation intramoléculaire entre un donneur (une liaison α -1,4 de la chaîne, située suffisamment près de l'extrémité non réductrice) et un accepteur (le glucose terminal de la chaîne, coté non réducteur). Le couplage est la réaction inverse : c'est une transglucosylation intermoléculaire dans laquelle une cyclodextrine joue le rôle de donneur et un résidu de glucose terminal (non-réducteur) constitue l'accepteur.



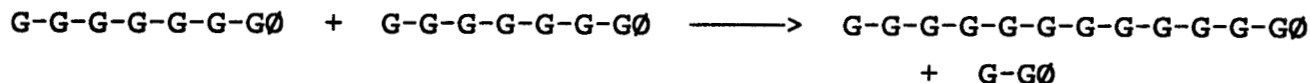
G : résidu glucopyranosyle

- : liaison α -1,4

\emptyset : extrémité réductrice

3-b- Activité disproportionnante

Cette troisième réaction est une transglucosylation intermoléculaire pour laquelle l'échange de liaison α -1,4 s'opère entre deux chaînes amyliques linéaires.



Cette activité est donc tout à fait comparable à celle catalysée par la "D-Enzyme" des végétaux (E.C. 2.4.1.25) ou par l'amyloamylase des bactéries (E.C. 2.4.1.3).

3-c- Résultante globale.

La coexistence de ces trois réactions (cyclisation, couplage, activité disproportionnante) aboutit à une pseudo-dextrinification du substrat amylic, souvent appelée à tort "activité dextrinifiante". En effet, le terme de dextrinification est plus adapté à la saccharification catalysée par les amylases car dans le cas des CGTases, cette pseudo-dextrinification s'opère sans augmentation notable du pouvoir réducteur.

4- Réaction secondaire de type amylolytique.

Les amylases, catalysant l'hydrolyse des liaisons α -1,4 des chaînes amyliques, sont connues pour leur légère activité de transfert sur des accepteurs divers. La réciproque est vraie aussi pour les CGTases qui présentent une très légère activité hydrolytique mise en évidence pour de fortes concentrations en enzyme. BOVETTO (1988) montre que cette activité, mesurée par augmentation du pouvoir réducteur à partir de β -CD est 1700 fois moins rapide que la cyclisation.

II-B- Historique.

L'histoire des CGTases commence fortuitement avec SCHARDINGER (1904) qui isole un germe résistant à l'autoclavage. Celui-ci, lorsqu'il est cultivé sur amidon, semble "excréter" des dextrines, cristallisables par traitement alcoolique. Il nomme ce germe *Bacillus macerans*.

C'est TILDEN & HUDSON (1939) qui prouvent que *B. macerans* excrète une enzyme capable de convertir l'amidon gélatinisé en dextrines non réductrices, dont l' α - et la β -CD. Ils nomment cette enzyme "amylase de *Bacillus macerans*" (BMA).

A partir de cette découverte, plusieurs équipes vont travailler à l'optimisation des cultures de *B. macerans* afin de purifier BMA et d'améliorer la production de cyclodextrines. A cette période, il faut associer les travaux de Mc. CLENAHAN et al. (1942), NORBERG & FRENCH (1950), HALE & RAWLINS (1951), SCHWIMMER et al. (1951, 1952).

C'est SCHWIMMER & GARIBALDI (1952) qui seront les premiers à annoncer la pureté de leur préparation de BMA. SCHWIMMER (1953) décrit l'enzyme comme un polypeptide de 100 kDa présentant un point isoélectrique de 4,5.

II-C- Origine et principales caractéristiques des CGTases.

C'est DE PINTO & CAMPBELL (1968) que l'on associe le plus souvent à la purification de BMA et à la description de ses principales caractéristiques. L'enzyme purifiée présente une masse moléculaire apparente de 139300 Da et un point isoélectrique compris entre 6,1 et 6,2. Sa composition en acides-aminés est proche de celle des amylases, et la présence de cystéine n'est pas décelée.

Depuis, de nombreuses CGTases, provenant d'autres espèces microbiennes, ont été isolées et caractérisées. Le tableau I

Tableau I Origine et principales caractéristiques des CGTases

Microorganisme	PM (kDa)	pH _i	pH _{opt}	t ^o _{opt}	Auteur
<i>B. macerans</i>	100	4,5	-	-	Schwimmer (1953)
<i>B. macerans</i>	139	-	6,2	-	De Pinto (1968)
<i>B. macerans</i>	2×74	-	6,5	60°	Kobayashi (1978)
<i>B. macerans</i> # IFO 3490	75	4,6	5,5	55°	Kitahata (1974 ^a)
<i>B. megaterium</i> # n°5	75	{ 6,1 6,8	5,4	55°	Kitahata (1974 ^a)
<i>B. sp alcalophile</i>	88	5,4	4,5	-	Nakamura (1976 ^a)
<i>B. sp alcalophile</i> # n°38-2	86,5	5,4	7,0	50°	Nakamura (1976 ^b)
<i>B. sp alcalophile</i>	70,5	4,9	-	-	Makela (1988)
<i>B. circulans</i> ATCC 9995	-	{ 5,8 6,6	5,5	55°	Okada (1973)
<i>B. circulans</i> # C 31	103	-	5,5	60°	Pongsawasdi (1988)
<i>B. circulans</i> # E 192	73	{ 6,1 6,9	5,5	60°	Bovetto (1988)
<i>B. circulans</i> # n°8	74	{ 8,0 8,4	-	-	Hofmann (1989)
<i>B. stearo- thermophilus</i>	68	4,5	6,0	70°	Kitahata (1982)
<i>B. ohbensis</i>	-	-	5,5	-	Sato (1985)
<i>B. licheniformis</i> # IT 25	72	4,3	5,5	67°	Aoki (1988)
<i>B. coagulans</i>	36	4,8	6,5	65°	Horikoshi (1989)
<i>K. pneumoniae</i> # M 5 al	68,5	4,8	6,8	-	Bender (1977)
<i>Micrococcus sp.</i>	88	4,2	6,5	-	Yagi (1980)

Les CGTases des *Bacilli macerans*, *stearothermophilus*, et de *K. pneumoniae* produisent principalement des α -cyclodextrines.

Les CGTases des *Bacilli megaterium*, *alcalophilus*, *circulans*, *licheniformis*, *coagulans*, et de *Micrococcus sp.* produisent principalement des β -cyclodextrines.

(p.16) résume leur origine et leurs principales caractéristiques.

La grande majorité des CGTases isolées provient de Bacilles. Cependant, une Klebsielle et un microcoque ont aussi été décrits comme producteurs de CGTase. Ainsi, l'aptitude d'un microorganisme à produire et excréter la CGTase ne dépend pas de sa classification Gram +/-, puisque les Klebsielles sont Gram -.

Concernant les principales caractéristiques des CGTases, il s'agit d'un groupe de protéines relativement homogène, actives à des températures élevées (50°-60°C), plutôt acides ($4,2 < p_i < 6,9$, sauf pour *B. circulans* # n°8), travaillant à des pH plutôt acides ($4,5 < pH_{opt} < 7,0$). Elles sont monomériques à l'exception de celle décrite par KOBAYASHI et al. (1978). Leur masse moléculaire est le plus souvent comprise entre 70 et 90 kDa, à quelques exceptions près.

Toutes les CGTases sont induites (croissance des microorganismes en présence d'amidon ou de composés voisins) et excrétées dans le milieu extracellulaire (BENDER, 1986). Leur culture est aérobie, en fermenteur agité. Il faut cependant citer le cas d'une production de CGTases thermostables (jusqu'à 90°C) par la société NOVO, à partir de cultures anaérobies de *Thermobacter* sp. et *Thermoanaerobium* sp. (STARNES et al., 1989).

II-D- Spécificité des CGTases.

Du point de vue de la spécificité de l'enzyme, il existe en l'état de nos connaissances, deux classes de CGTases : les α -CGTases et les β -CGTases. La première forme préférentiellement des α -CD, l'autre des β -CD. La spécificité n'est cependant pas totale car les deux types de CGTases sont capables de synthétiser les trois principales cyclodextrines, dans des rapports différents et caractéristiques. Enfin, aucune CGTase ne forme la γ -CD comme produit majoritaire. Ceci explique le coût plus élevé de cette dernière.

Le tableau II (p.19) montre les différents rapports $\alpha/\beta/\gamma$ -CD caractéristiques des principales CGTases aujourd'hui isolées. Ces ratios sont mesurés dans les premiers stades de la réaction. En effet, pour des temps longs, l'activité disproportionnante et le couplage entraînent une modification du substrat (augmentation du nombre d'accepteurs exogènes à l'amylopectine) accompagnée d'une évolution des rapports $\alpha/\beta/\gamma$ -CD. Ces ratios sont à considérer avec prudence car ils dépendent des conditions expérimentales utilisées.

II-E- Isolement et purification des CGTases.

Nous n'aborderons pas dans cette partie les aspects relatifs au mode de culture des microorganismes producteurs de CGTase. Le point sur cette question a été fait par SICARD & SANIEZ (1987). Dans une revue générale, ces auteurs décrivent les techniques de sélection et de fermentation de ces microorganismes, jusqu'à l'obtention de leurs produits de bioconversion à une échelle industrielle.

Comme les CGTases sont des enzymes excrétées, leur isolement est relativement aisé à partir du filtrat ou du surnageant du milieu de culture (extrait enzymatique brut). Il n'est cependant pas rare que l'extrait brut soit contaminé par des activités protéolytiques entraînant une rapide perte de l'activité cyclisante.

La méthode de purification la plus couramment utilisée est la chromatographie d'affinité. Cette technique permet :

- d'obtenir rapidement (une ou deux étapes) une préparation enzymatique homogène,
- de concentrer l'enzyme.

Les premières contributions relatives à la purification de l'enzyme (BMA) par chromatographie d'affinité rapportent l'utilisation d'amidon cru comme support chromatographique (NORBERG & FRENCH, 1950; SCHWIMMER, 1953). Plus récemment,

Tableau II Spécificité des CGTases (ratios α -/ β -/ γ -CD).

Origine	Spécificité	ratios*			Auteur
		α	β	γ	
<i>B. macerans</i> # IFO 3490	α	2,7	1	1	Kitahata (1974 ^b)
<i>K. pneumoniae</i> # M5 al.	α	1,6	1	0	Bender (1977)
<i>B. megaterium</i> # n°5	β	1	2,4	1	Kitahata (1974 ^b)
<i>B. circulans</i> ATCC 9995	β	1,2	2,9	1	Okada (1973)
<i>B. circulans</i> # C 31	β	1	10,5	0	Pongsawasdi (1988)
<i>B. circulans</i> # E 192	β	1	8,5	3,8	Bovetto (1988)
<i>B. licheniformis</i> # IT 25	β	1,6	4	1	Aoki (1988)

(*) : les ratios sont déterminés pour des temps réactionnels courts.

GOTTVALDOVA *et al.* (1987, 1988) améliorèrent l'adsorption sur amidon en utilisant des amidons physiquement modifiés. La méthode fut également généralisée à l'emploi de cyclodextrines (OKADA & KITAHATA, 1975).

Une autre technique d'affinité adaptée aux CGTases a été développée par utilisation de cyclodextrines immobilisées sur dextrans (Sépharose) via l'épichlorhydrine (SZEJTLI *et al.*, 1977; LASZLO *et al.*, 1981), et rencontra un vif succès.

Enfin, dans un brevet relatif à la production et à l'utilisation d'une CGTase thermostable, la société NOVO fait état de l'utilisation d'acarbose (inhibiteur compétitif des α -glucohydrolases) lié sur Sépharose comme matrice d'affinité (STARNES *et al.*, 1989).

II-F- Structure des CGTases.

Les résultats obtenus ces dix dernières années concernant la structure des CGTases laissent apparaître des homologies remarquables entre ces enzymes et les α -amylases, dont la structure est connue depuis plus longtemps. Ces homologies concernent non seulement certaines régions de la séquence primaire (Cf. p.38), mais également la structure tertiaire de la protéine. Aussi, les stratégies d'étude structurale des CGTases sont-elles basées le plus souvent sur des comparaisons avec les résultats obtenus pour les α -amylases.

1- Structure primaire.

Ce n'est que depuis six ans que la première séquence peptidique d'une CGTase a été définie (TAKANO *et al.*, 1986) après clonage, séquençage et expression du gène de la CGTase de *B. macerans* (BMA) dans des cellules de *Bacillus subtilis*. Les auteurs en concluent que BMA est formée de deux sous-unités identiques (seul cas cité dans la littérature) de 74 kDa (687 résidus) et

confirment l'absence de cystéine. Le gène complet code pour un polypeptide de 714 résidus comprenant à son extrémité N-terminale un peptide signal de 27 résidus, éliminé lors de l'excrétion de l'enzyme.

Depuis, d'autres CGTases, d'origines diverses, ont été clonées et séquencées. L'analyse du tableau III (p.22) montre que toutes les enzymes recombinantes excrétées, actives, possèdent en fait le même nombre de résidus d'acides aminés compris entre 683 et 687.

Concernant plus particulièrement la CGTase de *Bacillus circulans* # n°8, les travaux de NITSCHKE et al. (1990) montrent que la protéine recombinante excrétée est constituée de 684 résidus d'acides aminés (74,4 kDa) et possède la même réactivité que l'enzyme de la souche sauvage. La molécule recombinante présente 75 % d'homologie de séquence avec une α -amylase recombinante de *Bacillus circulans* # F 2 (NISHIZAWA et al., 1987), définie par Mac GREGOR & SVENSSON (1989) et par NITSCHKE et al. (1990) comme étant une CGTase. D'autre part, 71 % de résidus sont communs à la séquence de la CGTase d'un *Bacillus sp.* alcalophile # n°1110 (KIMURA et al., 1987). Enfin, les récents travaux de BENDER (1990^a) mettent en évidence 90,8 % d'homologie de séquence avec une CGTase recombinante provenant d'une souche de *Bacillus licheniformis* (HILL et al., 1990), dont 94 % dans la région N-terminale.

2- Structure tridimensionnelle.

Avant publication des premiers résultats cristallographiques, Mac GREGOR & SVENSSON (1989) montrent par des calculs de prédiction de structure secondaire et à partir des alignements de séquences que les CGTases (*Bacillus sp.* # n°1011, *Bacillus circulans*, *Bacillus macerans*, *Klebsiella pneumoniae*) possèdent la même structure en tonneau $(\alpha/\beta)_8$ ("TIM barrel") que celle décrite pour la Taka-amylase A d'*Aspergillus oryzae* (MATSUURA et al., 1984) et pour l' α -amylase pancréatique porcine (BUISSON et al.,

Tableau III Principales CGTases clonées et séquencées.

origine	codons	Expression	Auteur
<i>Bacillus macerans</i> # IAM 1243	714 (687)	<i>B. subtilis</i> *	Takano (1986)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> # M 5 al.	655 (625)	<i>E. coli</i> & <i>K. pneumoniae</i>	Binder (1986)
<i>Bacillus sp. alcalophile</i> # n°38-2	586 (559)	<i>E. coli</i>	Hamamoto (1987)
<i>Bacillus sp. alcalophile</i> # n°38-2	712	<i>E. coli</i> *	Kaneko (1988)
<i>Bacillus sp. alcalophile</i> # n°1011	713 (686)	<i>E. coli</i> * & <i>B. subtilis</i> *	Kimura (1987 ^{a, b})
<i>Bacillus licheniformis</i>	718 (684)	<i>E. coli</i> *	Hill (1990)
<i>Bacillus circulans</i> # n°8	718 (684)	<i>E. coli</i> *	Nitschke (1990)
<i>Bacillus ohbensis</i>	-	<i>E. coli</i> *	Sin (1991)

* indique l'expression d'une activité enzymatique.

() indique le nombre de résidus de la protéine excrétée fonctionnelle.

1987). Les CGTases rejoignent donc le club des enzymes dont l'archétype structural est la Triose-phosphate isomérase (TIM).

2-a- Les enzymes à tonneau (α/β)₈ (ou "TIM barrel").

Toutes les enzymes présentant une telle structure de base possèdent un domaine principal en forme de tonneau plutôt elliptique, formé d'une succession de huit feuillets β parallèles entre lesquels s'insèrent sept ou huit hélices α (FARBER & PETSKO, 1990). C'est à partir de l'étude cristallographique de la Triose-phosphate isomérase (TIM) que cette structure particulièrement rigide et stable fut découverte (BANNER et al., 1975), d'où l'appellation anglo-saxonne qui en dérive. Ces enzymes possèdent d'autres domaines qui précèdent, interrompent ou suivent le tonneau dans la séquence polypeptidique. Leur grand nombre (10 % des enzymes connues) évoque une évolution depuis un ancêtre commun. Enfin, le site actif de toutes ces enzymes est situé à l'extrémité C-terminale du tonneau, le plus souvent dans une boucle reliant un feuillet β à l'hélice α suivante.

2-b- Cas de la CGTase de *Bacillus circulans* # n°8 : études cristallographiques par diffraction des rayons-X.

Parallèlement aux prédictions de Mac GREGOR & SVENSSON (1989), plusieurs équipes obtiennent des cristaux de CGTase qu'ils tentent de faire diffracter aux rayons-X afin d'en élucider la structure tridimensionnelle (KUBOTA et al., 1988; LAWSON et al., 1990). C'est l'équipe de SCHULZ (HOFMANN et al. 1989) qui publiera la première structure tridimensionnelle d'une CGTase (*B. circulans* # n°8) à 3,4 Å de résolution, puis à 2,0 Å de résolution (KLEIN et al., 1991). La ressemblance structurale avec les α -amylases est frappante.

- Repliement de la chaîne polypeptidique.

Les 664 premiers résidus (sur 684 au total) ont pu être replacés dans la carte des densités électroniques. L'enzyme apparaît constituée de cinq domaines, et sa structure de base en tonneau (α/β)₈ est confirmée. Les trois premiers domaines (A, B et C, côté N-terminal) correspondent à la structure obtenue pour les α -amylases (MATSUURA *et al.*, 1984; BUISSON *et al.*, 1987) et deux domaines supplémentaires (D et E), formés presque exclusivement de feuillets plissés β , apparaissent côté C-terminal.

Le domaine A (résidus 1-140 et 195-403) est formé du tonneau (α/β)₈. Dans sa séquence constitutive s'insère le domaine B (résidus 140-195), dont la séquence diffère sensiblement de celle des amylases. Le domaine C comprend les résidus 403 à 492.

La chaîne formant le domaine D (résidus 492-570) présente un repliement identique à celui observé dans les immunoglobulines (HUBER, 1976). Une telle structure a déjà été décrite dans une protéine de Bence-Jones (SCHIFFER *et al.*, 1973). Enfin, le domaine E (résidus 570-664) vient coiffer le tonneau (α/β)₈, à l'extrémité opposée du domaine C.

D'après les homologues de séquence avec les α -amylases, les auteurs replacent le site catalytique en C-terminal des feuillets β du tonneau, dans une crevasse formée entre les domaines A et E.

La figure 3 (p.25) replace les cinq domaines dans la séquence peptidique. La figure 4 (p.26) compare les éléments de structure secondaire, représentés en double dimension, de la Taka-amylase A (*A. oryzae*) et de la CGTase (*B. circulans* # n°8). Enfin, la figure 5 (p.27) représente le repliement du squelette peptidique de l'enzyme.

TTTGTTCAGCTCTTCCGGTGCATTTGTCTCGATTCGGTATCG
 -187 TCTTATTATCAATGCGCAAGAAGTATGAGGTTGGGGCCCTAATCAATCGAGAGCCCTCT
 -188 GCTACTGCTACACTCTCGCACTCACTAGCAGACGGGTTAAGA TGAGCCAGTGGCCCTCCCG
 8/8
 -90 AATCCGRCACCAAAAATCCGCGCAACAACTTGTACTACA TTCACGAAAGGTGGAATTACC

1 ATG TTT CAA ATG GGC AAA GCG GCA TTC CTC AGC ACC ACA CTG ACC
 Met Phe Gln Met Ala Lys Arg Ala Phe Leu Ser Thr Thr Leu Thr

46 CTC GGC TTG CTT GCC GCG AGC GCG CTG GCG TTC TTG CCA GCT TCC
 Leu Gly Leu Leu Ala Gly Ser Ala Leu Pro Phe Leu Pro Ala Ser

91 GCT GTA TAC GCG GAT CCG GAC ACT GCT GTG ACC AAC AAA CAG AGC
 Ala Val Tyr Ala Asp Pro Asp Thr Ala Val Thr Asn Lys Gln Ser

136 TTC AGT ACA GAT GTG ATC TAC CAA GTA TTT ACC GAT GCG TTT TTG
 12 Phe Ser Thr Asp Val Ile Tyr Gln Val Phe Thr Asp Arg Phe Leu

181 GAC GCG AAT CCC TCC AAC AAC CCG ACC GCA GCG GCT TAT GAT GCG
 27 Asp Gly Asn Pro Ser Asn Asn Pro Thr Gly Ala Ala Tyr Asp Ala

226 ACA TGC AGC AAT TTG AAG CTG TAC TGC GCG GGA GAC TGG CAA GCG
 42 Thr Cys Ser Asn Leu Lys Leu Tyr Cys Gly Gly Asp Trp Gln Gly

271 TTA ATC AAC AAA ATC AAC GAT AAC TAT TTC AGT GAT CTG GGT GTC
 57 Leu Ile Asn Lys Ile Asn Asp Asn Tyr Phe Ser Asp Leu Gly Val

318 ACA GCG TTG TGG ATC TCC CAG CCT GTG GAA AAT ATT TTT GCG AGC
 72 Thr Ala Leu Trp Ile Ser Gln Pro Val Gln Asn Ile Phe Ala Thr

361 ATC AAC TAT ACG GGT GTA ACC AAT ACT GCG TAC CAC GCG TAC TGG
 87 Ile Asn Tyr Ser Gly Val Thr Asn Thr Ala Tyr His Gly Tyr Trp

406 GCT GGA GAC TTC AAA AAG ACC AAT CCG TAC TTC GCG AGS ATG GCG
 102 Ala Arg Asp Phe Lys Lys Thr Pro Tyr Phe Tyr Thr Met Ala

451 GAC TTT CAG AAC CTG ATT ACG ACG GCT CAT GCG AAA GCG ATC AAG
 117 Asp Phe Gln Asn Leu Ile Thr Thr Ala His Ala Lys Gly Ile Lys

486 ATT GTC ATT GAC TTT GCA CCG AAT CAC ACC TCT GCA GCG ATG GAA
 132 Ile Val Ile Asp Phe Ala Pro Asn His Thr Ser Pro Ala Met Gly

541 ACC GAC ACC TCT TTT GCG GAA AAT GCG AGA CTG TAC GAT AAC GGT
 147 Thr Asp Thr Ser Phe Ala Glu Asn Gly Arg Leu Tyr Asp Asn Gly

586 ACA CTG GTA GCG GGT TAT ACC AAT GAT ACC AAC GCG TAC TTC CAT
 162 Thr Leu Val Gly Gly Tyr Thr Asn Asp Thr Asn Gly Tyr Phe His

631 CAC AAT GCG GCG TCC GAC TTC TCT TCC CTG GAG AAC GCG ATC TAC
 177 His Asn Gly Gly Ser Asp Phe Ser Ser Leu Glu Asn Gly Ile Tyr

676 AAA AAC CTG TAT GAC CTG GCG GAC TTC AAC CAC AAT AAT GCG ACC
 182 Lys Asn Leu Tyr Asp Leu Ala Asp Phe Asn His Asn Asn Ala Thr

721 ATC GAC AAA TAC TTC AAA GAT GCG ATC AAA CTG TGG CTT GAT ATG
 207 Ile Asp Lys Tyr Phe Lys Asp Ala Ile Lys Leu Trp Leu Asp Met

786 GCG GTT GAC GGT ATT CCG GTG GAT GCG GTG AAA CAT ATG CCT CTC
 222 Gly Val Asp Gly Ile Arg Val Asp Ala Val Lys His Met Pro Leu

811 GGT TGG CAA AAG AGC TGG ATG TCC TCC ATC TAC GCA CAC AAA GCG
 237 Gly Trp Gln Lys Ser Trp Met Ser Ser Ile Tyr Ala His Lys Pro

856 GTG TTC ACT TTT GGA GAA TGG TTC TTG GGA TCA GCT GCA TCC GAT
 252 Val Phe Thr Phe Gly Glu Trp Phe Leu Gly Ser Ala Ala Ser Asp

901 GCA GAT AAC ACG GAT TTT GCT AAC AAG TCT GGT ATG AGC CTG CTC
 267 Ala Asp Asn Thr Asp Phe Ala Asn Lys Ser Gly Met Ser Leu Leu

946 GAC TTC GCG TTT AAC TCT GCG GTG GGT AAT GTG TTC GGT GAC AAC
 282 Asp Phe Arg Phe Asn Ser Ala Val Arg Asn Val Phe Arg Asp Asn

981 ACG TCC AAC ATG TAC GCT CTG GAT TCC ATG ATT AAC AGC ACA GCT
 297 Thr Ser Asn Met Tyr Ala Leu Asp Ser Met Ile Asn Ser Thr Ala

1036 ACG GAC TAC AAC CAA GTG AAC GAT CAG GTG ACG TTC ATC GAC AAC
 312 Thr Asp Tyr Asn Gln Val Asn Asp Gln Val Thr Phe Ile Asp Asn

A

1081 CAT GAT ATG GAT GGT TTC AAA ACA AGT GCG GTC AAC AAT GCG GGT
 327 His Asp Met Asp Arg Phe Lys Thr Ser Ala Val Asn Asn Arg Arg

1128 CTG GAA CAG GCT TTG GCG TTC ACA TTG ACT TCA GGT GGT GTA CCT
 342 Leu Glu Gln Ala Leu Ala Phe Thr Leu Thr Ser Arg Gly Val Pro

1171 GCG ATC TAC TAT GGT ACT GAA CAG TAT TTG ACG GCG AAT GCG GAT
 357 Ala Ile Tyr Tyr Gly Thr Glu Gln Tyr Leu Thr Gly Asn Gly Asp

1216 GCA GAT AAC CCG GCG AAA ATG GCT TCG TTC TCC AAA TCC ACT ACA
 372 Pro Asp Asn Arg Ala Lys Met Pro Ser Phe Ser Lys Ser Thr Thr

1261 GCT TTT AAC GTC ATA AGT AAA CTC GCG GCT CTG GCG AAA TCC AAT
 387 Ala Phe Asn Val Ile Ser Lys Leu Ala Pro Leu Arg Lys Ser Asn

1306 GCG GCG ATT GCG TAC GGT TCC ACA CAG CAG GCG TGG ATT AAT AAT
 402 Pro Ala His Ala Tyr Gly Ser Thr Gln Gln Arg Trp Ile Asn Asn

1351 GAT GTA TAT GTT TAT GAG GGT AAA TTC GCG AAC AGC GTA GCG GTT
 417 Asp Val Tyr Val Tyr Glu Arg Lys Phe Gly Lys Ser Val Ala Val

1396 GTC GCG GTA AAC GCG AAT CTT TCC ACG TCT GCA AGC ATT ACA GCG
 432 Val Ala Val Asn Arg Asn Leu Ser Thr Ser Ala Ser Ile Thr Gly

1441 TTA AGC ACT TCC CTG CCT ACA GCG TCA TAC ACG GAT GTG CTT GCG
 447 Leu Ser Thr Ser Leu Pro Thr Gly Ser Tyr Thr Asp Val Leu Gly

1486 GCG GTG CTG AAC GGA AAT AAC ATC ACC TCC ACG AAT GGT AGC ATT
 462 Gly Val Leu Asn Gly Asn Asn Ile Thr Ser Ala Ser Asn Gly Ser Ile

1531 AAC AAC TTC ACC CTT GCT GCG GGT GCA AGC GCA GTA TGG CAA TAC
 477 Asn Asn Phe Thr Leu Ala Ala Gly Ala Thr Ala Val Trp Gln Tyr

1578 ACA ACT GCG GAA ACA ACA CCA ACC ATC GGT CAT GTT GGT CCG GTT
 492 Thr Thr Ala Glu Thr Thr Pro Thr Ile Gly His Val Gly Pro Val

1621 ATG GCG AAA CCC GGT AAT GTG GTG ACA ATT GAT GCG GGT GGA TTC
 507 Met Gly Lys Pro Gly Asn Val Val Thr Ile Asp Gly Arg Gly Phe

1688 GCG TCG ACG AAA GCG ACG GTC TAC TTC GCG ACT ACA GCG GTT ACC
 522 Gly Ser Thr Lys Gly Thr Val Tyr Phe Gly Thr Ala Val Thr

1711 GGA GCA GCG ATT ACG TCT TGG GAA GAT ACA CAG ATT AAA GTA ACC
 537 Gly Ala Ala Ile Thr Ser Trp Glu Asp Thr Gln Ile Lys Val Thr

1756 ATC CTT TCC GTT GCG GCT GCG AAC TAT GCA GTC AAA GTT GCG GCA
 552 Ile Pro Ser Val Ala Ala Gly Asn Tyr Ala Val Lys Val Ala Ala

1801 AGC GCG GTA AAC AGC AAT GCA TAC AAC AAC TTC ACC ATC CTG ACT
 567 Ser Gly Val Asn Ser Asn Ala Tyr Asn Asn Phe Thr Ile Leu Thr

1848 GCG GAT CAG GTC ACC GTT GCG TTC GTC GTA AAC AAT GCG TCC ACA
 582 Gly Asp Gln Val Thr Val Arg Phe Val Val Asn Asn Ala Ser Thr

1881 ACG CTT GGA CAG AAC CTC TAT TTG ACA GCG AAC GTA GCG GAG CTT
 597 Thr Leu Gly Gln Asn Leu Tyr Leu Thr Thr Gly Asn Val Ala Gln Leu

1936 GCG AAC TGG AGC ACC GGT TCG ACT GCG ATT GGA CCG GCA TTC AAT
 612 Gly Asn Trp Ser Thr Gly Ser Thr Ala Ile Gly Pro Ala Phe Asn

1981 CAG GTC ATT CAT CAA TAC CCA ACC TGG TAC TAT GAT GTC AGC GTA
 627 Gln Val Ile His Gln Tyr Pro Thr Trp Tyr Tyr Asp Val Ser Val

2028 CCG GCA GCG AAA CAG CTG GAG TTC AAA TTT TTC AAG AAA AAC GGT
 642 Pro Ala Gly Lys Gln Leu Glu Phe Lys Phe Phe Lys Lys Asn Gly

2071 TCA ACG ATT ACA TGG GAA AGC GGT TCT AAC CAC ACA TTC ACT ACA
 657 Ser Thr Ile Thr Trp Glu Ser Gly Ser Asn His Thr Phe Thr Thr

2116 CCA GCG AGC GGA ACA GCG ACC GTT ACG GTG AAC TGG CAG TAA AGCTT
 872 Pro Ala Ser Gly Thr Ala Thr Val Thr Val Asn Trp Gln -c-

B

C

D

E

Figure n°3

Séquence peptidique de la CGTase de *Bacillus circulans* # n°8 déduite de sa séquence nucléotidique (numérotée à partir du codon ATG d'initiation). Le résidu N-terminal (flèche) est déduit d'une analyse peptidique et la séquence précédente (34 résidus) correspond au peptide signal. (D'après NITSCHKE et al., 1990).

Les 5 domaines structuraux ont été replacés dans la séquence primaire (D'après HOFMANN et al., 1989).

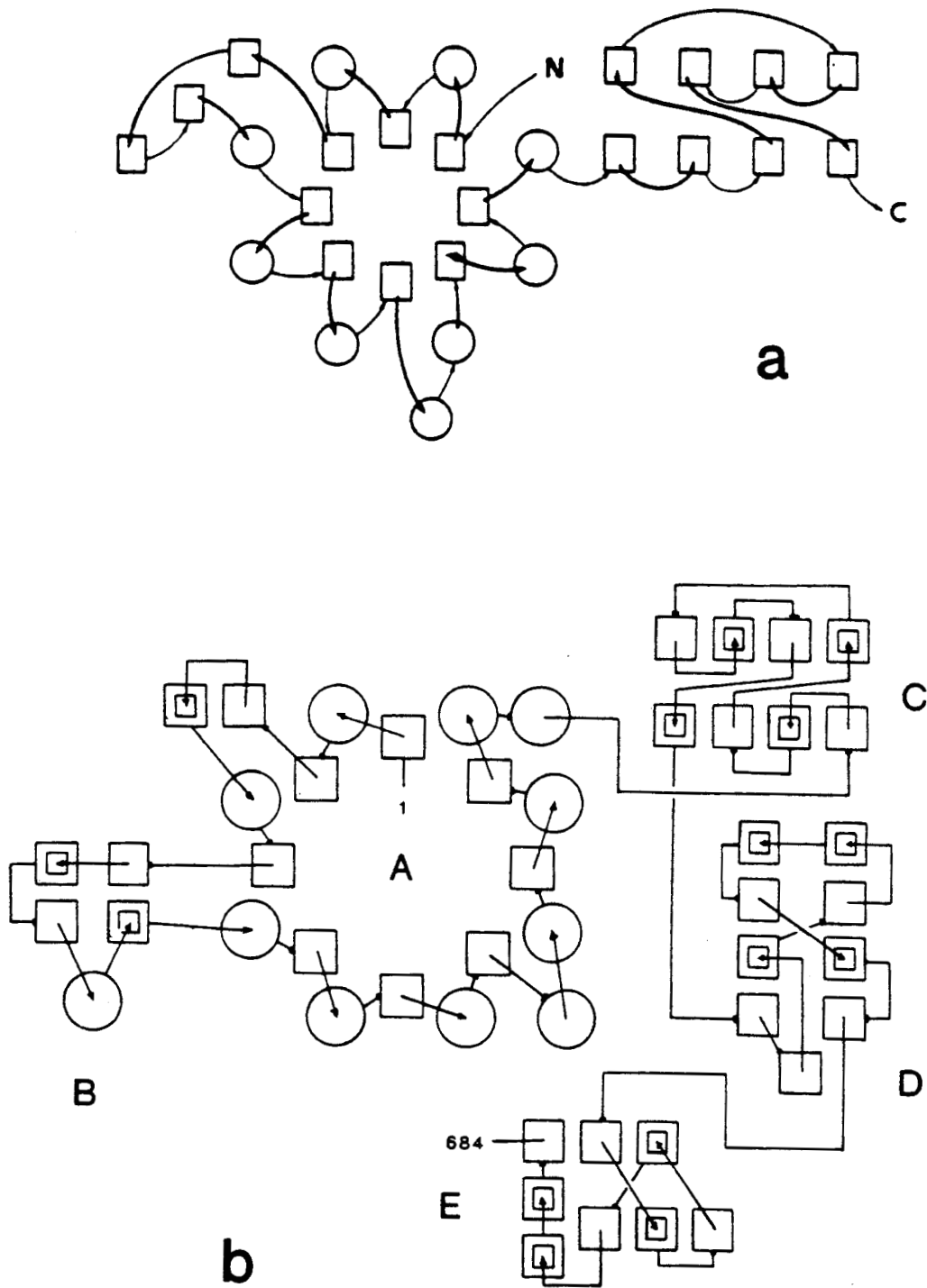


Figure n°4

Comparaison des éléments de structure secondaire, représentés en double dimension, de la Taka-amylase d'*Aspergillus oryzae* (a) et de la CGTase de *Bacillus circulans* # n°8 (b). (\square): feuillets plissés β ; (O): hélices α .

D'après MATSUURA et al. (1984) et KLEIN et al. (1991).

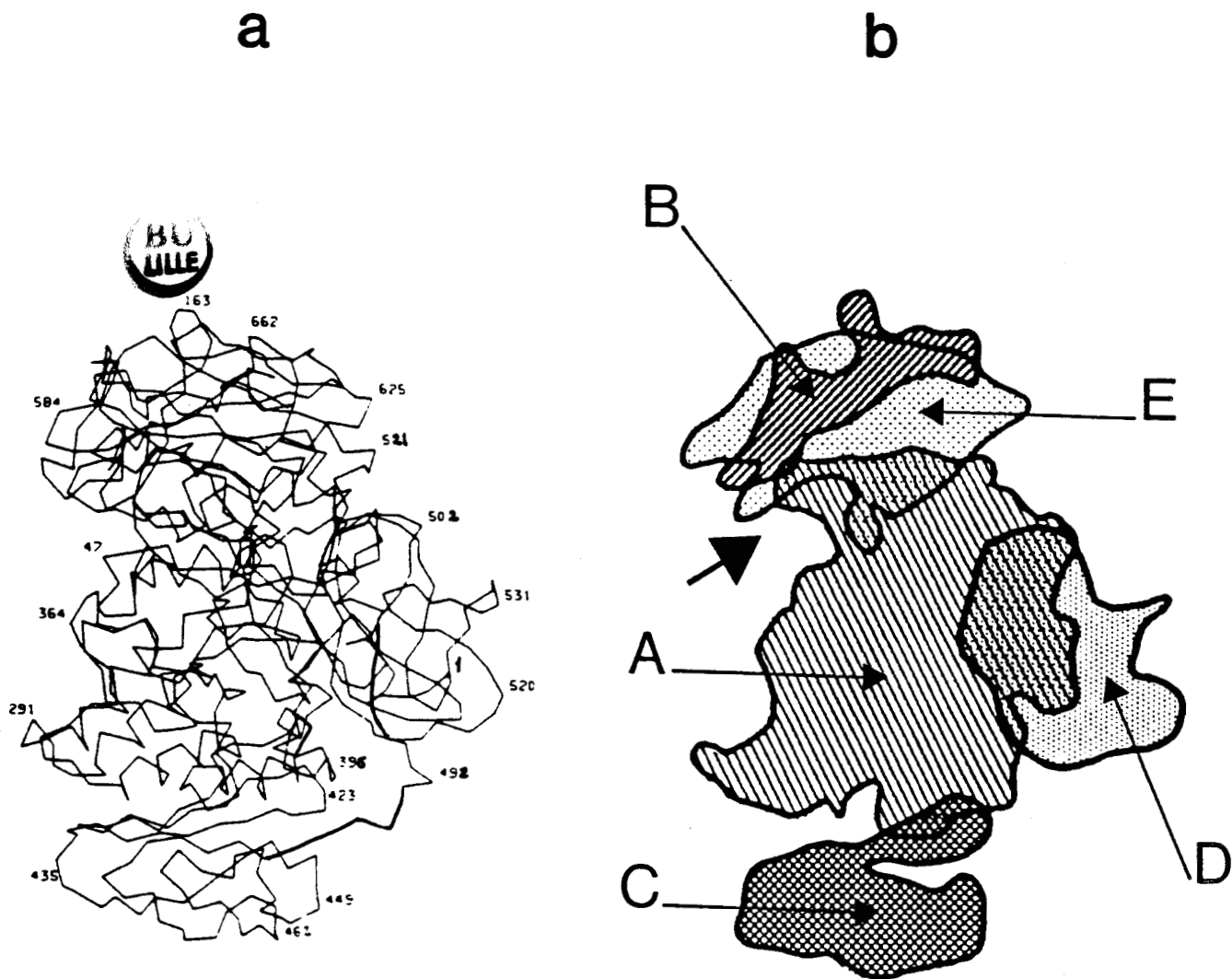


Figure n°5

a) repliement du squelette peptidique de la CGTase de *Bacillus circulans* # n°8. (D'après HOFMANN et al., 1989).

b) Les 5 domaines sont replacés dans la chaîne polypeptidique repliée. (→ : site actif).

- Structure détaillée à 2,0 Å de résolution.

L'affinement de la structure décrite par HOFMANN et al. (1989) à été rendu possible par remplacements isomorphiques (diffusion d'atomes lourds dans le cristal) facilités notamment par l'utilisation de cristaux de CGTase mutée pour laquelle une cystéine remplace une sérine (KLEIN et al., 1990). Les résultats ont permis de replacer les hypothétiques résidus catalytiques du site actif et de mettre en évidence deux sites de fixation du calcium.

Les auteurs situent le site catalytique de la CGTase de *B. circulans* n°8 dans sa partie N-terminale et plus précisément en C-terminal du tonneau $(\alpha/\beta)_8$, comme pour la Taka-amylase A (MATSUURA et al., 1984) et l' α -amylase pancréatique porcine (BUISSON et al., 1987). Par analogie structurale avec les amylases, les résidus Asp₂₂₉ et Asp₃₂₈ seraient les résidus catalytiques. Glu₂₅₇, proche des deux résidus précités, devrait aussi jouer un rôle dans la catalyse. Ce troisième résidu, considéré comme secondaire dans le cas de l' α -amylase pancréatique (BUISSON et al., 1987), a été au contraire considéré comme le donneur de proton dans la coupure acide catalysée par la Taka-amylase A (MATSUURA et al., 1984).

D'autres résultats, non cités dans la contribution de KLEIN et al., sont rapportés par BENDER (1991). His₃₂₇, situé dans le site actif à l'opposé de Asp₂₂₉, devrait également jouer un rôle important. Enfin, His₁₇₇ et His₁₇₈, proches du site actif, font partie d'une courte séquence homologue à la CGTase de *K. pneumoniae* M 5 al. (BINDER et al., 1986), et partiellement conservée dans la Taka-amylase A. Ces deux histidines pourraient aussi être importantes dans la catalyse.

Concernant les deux sites de fixation du calcium, les résultats sont là encore comparables à ceux obtenus pour les α -amylases. Un seul site de fixation du calcium a d'abord été caractérisé pour la Taka-amylase A (MATSUURA et al., 1984) et l' α -amylase pancréatique (BUISSON et al., 1987). Depuis, BOEL et

al. (1990) ont identifié un second site sur deux amylases d'*Aspergillus*, dont la Taka-amylase. Dans le cas de la CGTase de *Bacillus circulans* # n°8, les deux sites de fixation du calcium sont disposés de part et d'autre du site actif, de sorte que deux ions calcium stabilisent la conformation du tonneau $(\alpha/\beta)_8$. Comme décrit depuis bientôt 15 ans (BENDER, 1977), le calcium est donc indispensable à la stabilité des CGTases. Le site I lie le calcium par les résidus Asp₁₉₉, Asn₁₃₉, His₂₃₃ et Ile₁₉₀, alors que le site II utilise les résidus Asp₂₇, Asp₅₃, Asn₂₉, Asn₃₂, Asn₃₃ et Gly₅₁.

II-G- Réactivité des CGTases : aspect enzymologique et recherche d'un mécanisme réactionnel.

C'est très tôt que FRENCH et al. (1948) montrent que BMA catalyse une transglucosylation entre un donneur et un accepteur, qu'il s'agisse de la cyclisation ou du couplage. Dans ce dernier cas, la cyclodextrine constitue le donneur. NORBERG & FRENCH (1950) définiront l'action de BMA comme la "recherche d'un état d'équilibre dynamique passant par une série de redistributions concourantes" (sous-entendu redistribution des liaisons α -1,4). Cette définition est intéressante car elle tient compte de l'activité disproportionnante.

Dans une revue générale, FRENCH (1957) résume les connaissances acquises à l'époque, à savoir que les trois principales réactions catalysées par l'enzyme, cyclisation, couplage et activité disproportionnante ("homologizing reactions") procèdent d'un même mécanisme de transglycosylation. Il compare la cyclisation par BMA à l'action d'une β -amylase, car celle-ci doit nécessairement débiter à l'extrémité non-réductrice de la chaîne d'amidon, constituant l'accepteur, et s'arrêter à la fin de la chaîne ou à un point de branchement. D'un autre côté, l'action de BMA ressemble aussi à celle d'une α -amylase, puisque le substrat est "dextrinifié".

1- Importance et spécificité de l'accepteur.

Le rôle prédominant de l'accepteur dans la réactivité des CGTases est mis en évidence par FRENCH (1954) qui conclut que la cyclisation s'opère à partir de l'extrémité non-réductrice de la chaîne d'amidon (glucose dont l'hydroxyle en C-4 n'est pas substitué). KITAHATA & OKADA (1975) observent que l'addition d'un accepteur exogène accélère la "dextrinification" de l'amidon. Enfin, BENDER (1978) montre que la concentration en accepteurs exogènes à l'amylopectine est le facteur essentiel à l'orientation de la réaction vers un produit linéaire au détriment d'un produit cyclique. Ce constat lui permettra d'expliquer pourquoi l'amylose est un mauvais substrat (en phase initiale) pour la cyclisation, à l'inverse de l'amylopectine : l'amylose (chaîne non-branchée) présente en effet beaucoup moins d'amorces que l'amylopectine.

C'est finalement BOVETTO (1988) qui prouve le caractère formellement indispensable de l'accepteur dans les réactions catalysées par les CGTases. En comparant les réactivités du pNP- α -D-maltoheptaoside et du 4,6-benzylidène-pNP- α -D-maltoheptaoside (substrat précédent dont l'extrémité non-réductrice est bloquée par substitution des hydroxyles portés en C-4 et C-6), il montre que la formation du complexe E-S productif débute par la liaison de l'accepteur à l'enzyme.

La spécificité de l'accepteur fut en général étudiée en analysant les produits de transglycosylation de divers donneurs sur ce dernier, après action de l'enzyme (couplage ou activité disproportionnante). Dans ce but, FRENCH & WILD (1953) développèrent une technique permettant l'identification de ces produits par chromatographie sur papier. Ainsi, FRENCH et al. (1954) montrèrent que la spécificité de l'accepteur était liée à son arrangement D-glucoyranose non-substitué sauf en C-1. Des travaux parallèles sont développés par KITAHATA & OKADA (1975) qui comparent les spécificités d'une α - et d'une β -CGTase. KITAHATA et al. (1978) généralisent les résultats de FRENCH et al. à la nécessité d'une structure pyranosidique de même configuration que le glucoyranose non-substitué en 2, 3 et 4. Enfin, BENDER (1982)

compare l'effet accélérateur de différents maltooligosaccharides exogènes sur la vitesse de dégradation de l'amidon ("chain-shortening"), et montre que la taille du substituant lié O-glucosidiquement au glucose non-réducteur peut également influencer l'efficacité de l'accepteur.

2- Sensibilité aux inhibiteurs des α -glucohydrolases.

Parallèlement à la restriction liée au rôle de l'accepteur, la réactivité des CGTases présente cependant des points communs avec celle des α -glucohydrolases en général. Parmi ces points communs, il faut citer l'inhibition des CGTases par des inhibiteurs spécifiques du site catalytique des α -glucohydrolases (α -amylases, glucoamylases, sucrases, α -glucosidases...), et dont le mode d'action a déjà été décrit (LALEGERIE et al., 1982). Dans ce contexte, HIDAKA et al. (1980) rapportent l'inhibition de BMA par l'acarbose, un pseudo-saccharide analogue du maltotétraose (voir annexe), et BOVETTO (1988) décrit l'inhibition de la CGTase de *B. circulans* par la désoxynojirimycine, un analogue aminé en C-5 du glucitol. Cependant, si ces inhibiteurs sont décrits comme compétitifs vis-à-vis des α -glucohydrolases, les résultats de BOVETTO (1988) concernant la désoxynojirimycine montrent qu'il n'en va pas de même pour les CGTases.

Ainsi, les CGTases doivent présenter un site catalytique analogue à celui des α -glucohydrolases, procédant par l'intermédiaire de deux résidus carboxyliques (catalyse acide) comme décrit par BLAKE et al. (1967) pour le lysozyme. Ce site catalytique doit cependant être disposé différemment dans le site actif de manière à ce que la coupure du donneur soit exploitée par un accepteur.

3- Notion de "site du donneur" et de "site de l'accepteur".
(BOVETTO, 1988).

A la suite des travaux de ROBYT & FRENCH concernant l'étude du site actif de l'amylase de *B. amyloliquefaciens* (1963) et de l' α -amylase pancréatique porcine (1970), puis des travaux de NITTA et al. (1971) relatifs à la Taka-amylase d'*Aspergillus oryzae*, il est admis que le site actif des enzymes dégradant l'amidon est constitué d'une succession de sous-sites spécifiques du D-glucose, permettant le positionnement de la chaîne amyliacée. La coupure s'effectue au niveau des résidus catalytiques placés entre deux sous-sites caractéristiques. Aussi, toutes les études relatives au site actif des CGTases ont-elles suivi le même concept, en adaptant la topologie du site à la forme d'une cyclodextrine. Cependant, la transposition directe du modèle des amylases ne permet pas d'expliquer ni l'importance ni la spécificité de l'accepteur, et son extension au mécanisme de transglucosylation présente certaines difficultés.

En se basant sur les fréquences de coupure de différents pNP-maltooligosaccharides, et en mesurant les affinités respectives vis-à-vis de ces substrats, BOVETTO (1988) propose pour la CGTase un modèle du site actif à double spécificité comprenant un site du donneur et un site de l'accepteur.

Il définit le site du donneur comme un site analogue à celui des α -amylases, avec au moins cinq sous-sites à D-glucose, et place le site de coupure entre les sous-sites n°2 et n°3 (à partir du côté réducteur de la chaîne).

Le site de l'accepteur, spécifique lui aussi du D-glucose, est séparé du cinquième sous-site d'une distance équivalente à la taille d'une molécule de maltose, mais se trouve suffisamment proche du point de coupure (donneur) pour permettre la transglucosylation.

La figure 6 (p.33) illustre cette dualité du site actif. Les conclusions émises a posteriori par HOFMANN et al. (1989)

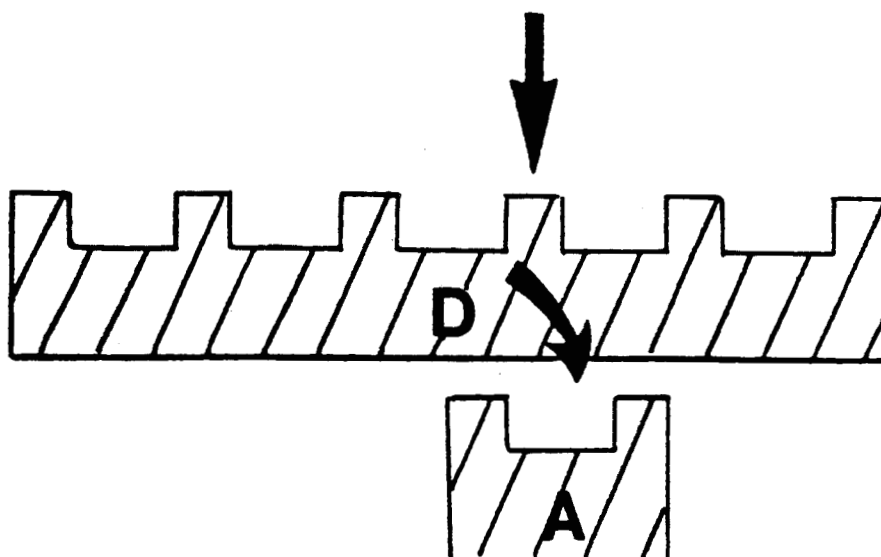


Figure n°6

Représentation schématique illustrant la coexistence d'un site du donneur (D, type α -amylase) et d'un site de l'accepteur (A) dans le site actif des CGTases.

D'après BOVETTO, 1988.

concernant la structure de la CGTase de *B. circulans* # n°8 confortent la validité du modèle de BOVETTO. En effet, HOFMANN et al. décrivent la CGTase comme une amylase présentant deux domaines supplémentaires.

4- Les modèles proposés pour le site actif des CGTases.

En analysant les produits de couplage sur glucose radioactif obtenus à partir d'une cyclodextrine monobranchée, KOBAYASHI et al. (1988^a, 1988^b) proposent un modèle du site actif à trois sous-sites et dont la forme permet d'accueillir une cyclodextrine par interaction avec trois de ses résidus glucopyranosyles constitutifs (Fig.7^a, p.35). Ce modèle, basé sur l'étude du couplage, nécessite pour fonctionner un mécanisme en deux temps : ouverture du cycle au site de coupure, puis transfert du glucanosyle formé sur l'accepteur. Ainsi, une fois adapté à un substrat de type α -(1,4)-glucane, ce modèle ne peut fonctionner que par un type de coupure analogue à celui des α -amylases (coupure "endo").

Un modèle relativement proche est proposé par COTTAZ & DRIGUEZ (1991) (Fig.7^b, p.35). Il comprend deux paires de sous-sites à D-glucose, séparées par le site de coupure. Les deux premiers sous-sites (R & S), plus restrictifs, sont spécialisés dans l'accueil du donneur, et les deux autres (T & U), peu spécifiques, concernent l'accepteur. Si leur modèle convient parfaitement au positionnement "à la queue leu leu" de deux molécules de fluorure de maltosyle, il s'adapte cependant difficilement au positionnement de la chaîne d'amidon puisque l'extrémité non-réductrice devrait alors se placer au sous-site n°3 (sous-site "T").

Le modèle proposé par BENDER (1990^b) (Fig.7^c, p.35) est basé, comme pour BOVETTO (1988), sur l'étude des énergies de liaisons aux différents sous-sites formant le site actif : les paramètres de la cyclisation sont mesurés pour des maltooligosaccharides de tailles variables (G_2 à G_9). BENDER va plus loin car il compare

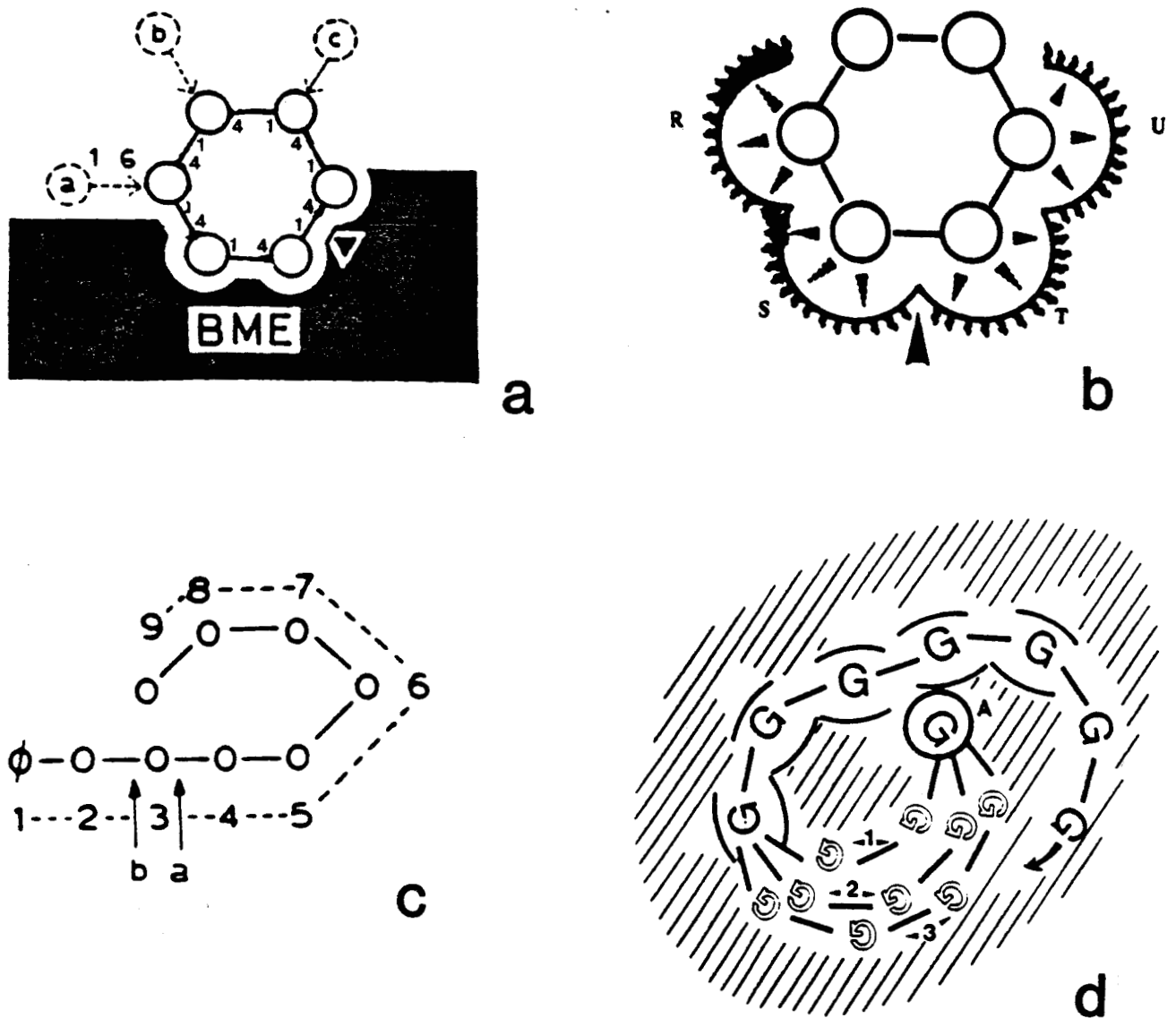


Figure n°7 Comparaison des différents modèles proposés pour illustrer le site actif des CGTases.

(a) KOBAYASHI et al., 1988. Flèche: site catalytique; 14 et 16: liaisons α -(1,4) et α -(1,6); a, b, c : positions possibles des glucosyles branchés; BME: Enzyme de *B.macerans*.

(b) COTTAZ & DRIGUEZ, 1991. Flèche: site catalytique; R, S, T, U : sous-sites (Cf. texte). D'après COTTAZ, 1989.

(c) BENDER, 1990. a & b : positions probables du site catalytique pour l' α - & la β -CGTase respectivement; Ø: glucose réducteur.

(d) BOVETTO, 1988. Flèche: vers le réducteur; A: site de l'accepteur, proche du site catalytique; 1, 2, 3 : trois dispositions possibles de la chaîne dans la zone variable, entraînant respectivement la formation d'une α -, β -, γ -CD.

dans son étude les comportements d'une α - et d'une β -CGTase. Le site actif des deux types de CGTases est formé d'une succession de neuf sous-sites à D-glucose, et son arrangement dans l'espace est recourbé de manière à rapprocher le sous-site n°9 du sous-site n°3. Pour des substrats suffisamment longs, il décrit le sous-site n°9 (à l'opposé de l'extrémité réductrice) comme étant, autant que faire se peut, toujours occupé. On retrouve donc dans ses résultats la spécialisation d'un sous-site (le n°9) dans la fixation de l'accepteur ("site de l'accepteur" décrit par BOVETTO (1988)). Le site catalytique est placé entre les sous-site n°3 et n°4 pour l' α -CGTase de *K. pneumoniae*, et entre les sous-sites n°2 et n°3 pour la β -CGTase de *B. circulans*. Cette différence permet à BENDER d'expliquer la spécificité α ou β des deux enzymes. Cependant, ce modèle ne permet pas d'expliquer les ratios $\alpha/\beta/\gamma$ mesurés, puisque la spécificité des CGTases n'est jamais absolue.

Enfin, dans le modèle qu'il propose pour décrire le site actif de la CGTase de *B. circulans* (Fig.7^d, p.35), BOVETTO (1988) replace les deux sites (site du donneur et site de l'accepteur) de sorte que le site de l'accepteur soit suffisamment proche des résidus catalytiques (situés entre les sous-site n°2 et n°3 du site donneur, à partir de l'extrémité réductrice). La grande originalité de son modèle réside dans le degré de liberté autorisé à la chaîne d'amidon entre le sous-site n°5 (à partir de l'extrémité réductrice) du site du donneur, et le site de l'accepteur. En effet, suivant la place qu'occupera la chaîne d'amidon dans cette région (2, 3 ou 4 résidus glucopyranosyles), il y aura formation d'une α -, β - ou γ -cyclodextrine lors de l'acte catalytique.

Ce dernier modèle est donc adapté au caractère récurrent de la cyclisation, à l'importance et à la spécificité de l'accepteur, et à la formation des trois cyclodextrines (le ratio $\alpha/\beta/\gamma$ est directement lié au degré de liberté de la chaîne dans la région intermédiaire du site actif). Enfin, suivant la nature des substrats que l'on y place, les trois réactions catalysées par les CGTases (cyclisation, couplage et activité disproportionnante) peuvent y être représentées (Fig.8, p.37).

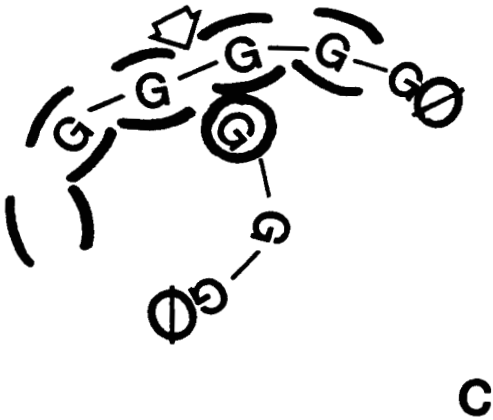
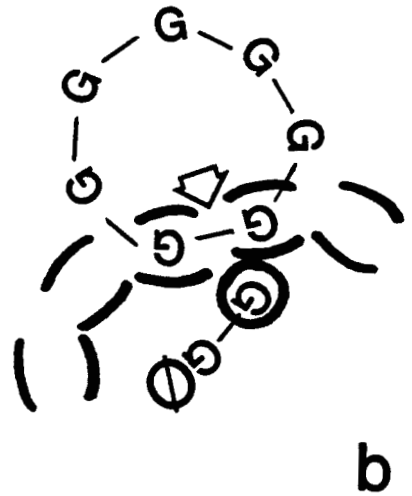
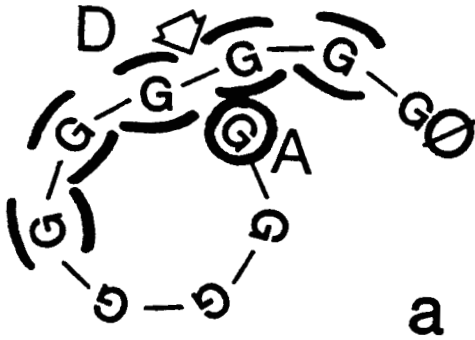


Figure n°8

Représentations schématiques du complexe E-S pour les 3 modes de transglucosylations catalysés par les CGTases, dans le modèle de BOVETTO (1988). a) cyclisation; b) couplage; c) activité disproportionnante.

A: Site de l'accepteur; D: site du donneur; Ø: extrémité réductrice.

II-H- Etudes relatives aux relations structure-réactivité.

1- Homologies de séquences avec d'autres α -glucohydrolases dans des régions de fonctions connues.

1-a- Séquences conservées dans la structure des α -amylases.

En comparant onze séquences peptidiques d' α -amylases d'origines variées (bactériennes, fongiques, végétales et animales) NAKAJIMA et al. (1986) définissent quatre régions très conservées. En y replaçant les résidus définis par MATSUURA et al. (1984) comme essentiels au fonctionnement de la Taka-amylase A d'après les résultats cristallographiques, ils constatent que les régions 2, 3 et 4 constituent le site catalytique de ces enzymes.

1-b- Cas des CGTases.

BINDER et al. (1986), en clonant et séquençant le gène de la CGTase de *Klebsiella pneumoniae* M5 al, sont les premiers à décrire des séquences homologues à celles des quatre régions conservées dans les α -amylases. La plus forte homologie est retrouvée pour les régions 2 et 4. La figure 9 (p.39) montre l'alignement de la séquence obtenue par BINDER et al. avec les séquences d' α -amylases. Les quatre régions conservées sont encadrées. Comme pour les α -amylases, ces quatre régions se retrouvent dans la moitié N-terminale du polypeptide. Les auteurs concluent donc à l'existence d'un site catalytique commun entre les CGTases et les α -amylases.

Toutes les séquences de CGTases publiées par la suite renferment ces quatre régions conservées, à l'exception toutefois de celle décrite par KIMURA et al. (1987). Ces auteurs montrent que la séquence de la CGTase d'un *Bacillus alcalophile* # n°1011 ne présente que trois régions alignées aux séquences d' α -amylases. Elles sont homologues aux régions 1, 2 et 4 décrites par NAKAJIMA et al. (1986).

CGT K.pn.	49	GGDLRGLINKLPYLKSLGVTSIYITPFIQVNVNTDAAGNT	GYNGTWGADYPRID
AMY B.st.	20	GTLWTRVANEANLSSLGITLWML	PPAYKGTSRSDVGYGYDLYDLGZFNQKCAVR
AMY B.am.	17	GQMKRLQNDAEHLSDGITAVMI	PPAYKGLSQSDMGYCYPTDLYDLGZFNQKCAVR
AMY B.su.	16	NWSPNTLKHNRDINDAGYTAIQT	SPINQVKEGNGDQKSRHWYWLQPTSTQIGN
AMY A.or.	36	KYCGGTWOGIIDKLDYIQCGFTA	IWITPVTYAGLPODCAYGDAYTTGTWQIYSLN
AMY Rat	15	HLPEWRVADIAKECERYLAPKPGFC	GVQVSPPHENIINHPSPRWERYQPIYKIC
AMY Hog	15	HLPEWRVADIAKECERYLAPKPGFC	GVQVSPPHENIVVTCNPRPWRERYQPIYKIC
AMY H.s.	18	HLPEWRVADIAKECERYLAPKPGFC	GVQVSPPHENIVVTCNPRPWRERYQPIYKIC
AMY Bar.	20	GFHWESWQSGGWYNNHNGKVDDI	AAAGVTRVWLPFPSPHSVSNEGTNPGLYDIDA
CGT K.pn.	103	EHFGNLDOPKELT	SLHNSPDYNNKLVLDYAPRNSNANDENEPGALY
AMY B.st.	76	TKYGTKAQY	LQ AIQAAHAAGHQVYVDDVFPKGGADGTENVDAYEVNFSORNQE
AMY B.am.	73	TKYGTKSE	LQDAIGSLHSRNVQVYQDVVLMKAGADATEDVTAVEVWPAHRNQE
AMY B.su.	72	RYLGTQZEP	KE NCAAAEEYGIKIVYDAVINHTSDYAAISNEVKS
AMY A.or.	92	ENYGTADOL	KA LSSALHERGHTLVVAVANHTGTCGAGSVDVSY
AMY Rat	71	SRSCHNEZEP	KD HVTRCNVGVRIYVDAVINHCQSGHAGTSTC
AMY Hog	71	SRSCHNEZEP	KD HVTRCNVGVRIYVDAVINHCQSGHAGTSTC
AMY H.s.	74	SRSCHNEZEP	RN HVTRCNVGVRIYVDAVINHCQSGHAGTSTC
AMY Bar.	76	SKYGNAAEL	KS LIGALHGKGVQAINQIYVTRHCADYKDSRGTYCI
CGT K.pn.	149		RDCVFTDYPINVAANTGWNHNGG
AMY B.st.	130	ISGTYYQIOAWTKPFPFGRGNTYSSFKWRWYHPOGVWDESRKLSRIYKFGIGKA	
AMY B.am.	127	TSEZYQIKANTDPRFPGRGNTYSDPKWYVYHPOGADWDESRKLSRIYKFGIGKA	
AMY B.su.	117		IPWVTRGWTQ
AMY A.or.	137		FKPSSQDYFHPFPCIQNYE
AMY Rat	116		GSYFNPHNREPSAVPYSAMYPNDRC NCE
AMY Hog	116		GSYCNPGNREPPAVPYSAMVFNCGKCKTASGG
AMY H.s.	119		GSYFNPGSRDFPVVYPSGWDFNDGCKTCSGD
AMY Bar.	138		CRDQTK
CGT K.pn.	174	VTHNNDFFQVKNHNLFNLSDLRQSNTOVYQYLLDQSKFWDIAGVCAIRIDAKKNDK	
AMY B.st.	185	WDNEVDTEHNGYDLYMADLNDHPEVVTLEKSWGKVVYVTTNIDCFRLDAVXHKFP	
AMY B.am.	182	WDNEVSEENGNQYDLYMADVDYDHPQVVAETKHWGIVYANLSSLGCFRLDAVXHKFP	
AMY B.su.	127	IXNWSDRWDVTQNSLLGLYDNTQNTQVQSYLKRFLDRALNDGACDFRFDAAKHIEL	
AMY A.or.	157	DQTOVEDCWLGDNTVSLPOLDTTKDVVKNENYDWDVGLSVNSYIDGLRIDVTKHWQ	
AMY Rat	145	INNYNDANGVRNCRSLGLLDLALDKDYVRTKVAADYPMNLIDIGVAGFRIDASKHWFP	
AMY Hog	148	IESYNOPYQVROGCVLLLDLALDKDYVRSMIADYLNKRLIDIGVAGFRIDASKHWFP	
AMY H.s.	151	IENYHDATQVRCRLSGLLDLALDKDYVRSKIAEYNNHLLIDIGVAGFRIDASKHWFP	
AMY Bar.	121		FEGGTSDGRLDNGPHMI
AMY Bar.	144	YSOGTANLDTGADFAAAPDIDHLNDRVQRFLEWLLWLSKDLGFTANWRLDARGSS	
CGT K.pn.	231	SPIQKWTSDIYDYSKSIKREGFFFTGQVFCASANTTGVGDGNAIDYANTSG	
AMY B.st.	242	SFFFDWLSDVRSQTKPLFT	VGEYWSYDINKLHNYIMKTNGTMSLFD
AMY B.am.	239	SFLRDWVQAVRQATGKEMFT	VAEYWNAGKLENYLNKTSFNQSVFD
AMY B.su.	184	PODCSYGSOFPNPIINTSAEFO	YCEIILQDSASRDAAANYVMDTASNYP
AMY A.or.	213	KDFWPCYNKAAGVYC	ICEVLDLDDPAYTCPYQNVMDGVLYNYP
AMY Rat	202	GDIAKAVLDKLNHLNLTNKFSGSRPFI	FOEVIDLGCCEAIKGSSEYFNGRVTEFK
AMY Hog	205	GDIAKAVLDKLNHLNLTNWFPAQSRPFI	FOEVIDLGCCEAIKGSSEYFNGRVTEFK
AMY H.s.	208	GDIAKAILDKLNHLNLSNWFPEGSKRFI	YOEVIDLGCCEAIKSSDYFNGRVTEFK
AMY Bar.	200	PENAKVYIDGTSPLA	VAEYVMDHATGGDKPKPYDQDAHRQNL
CGT K.pn.	282	SALLDFGFRDTLERVLVGRSGNTHRTLNLSYLIKRTVFTSDDWQ	
AMY B.st.	289	APLHINKFYTASKSGGTF	DNRTLMTNLTAKKDOPTLA
AMY B.am.	286	VPLHFNLQAASSQGGGY	DMRRLDCTVYVSRHPEKA
AMY B.su.	233	HSIRSA	LKHRN
AMY A.or.	254	YPLLNAFKSTSGMDD	LGVSMSHSHYASDVSADKL
AMY Rat	255	YCAKLGTVIRKTNQEKH	LYNMINTVKSDCPDSTLL
AMY Hog	258	YCAKLGTVVRKWSGEXH	SYLKNWEGMGVFPVTDRA
AMY H.s.	261	YCAKLGTVIRKWTGEXH	SYLKGPLKNGKLPMSDRA
AMY Bar.	243	VNVVDRVGGAAASAGVDFDFTTKGILNAAVEGELNRLIDPQKAPGVHGWPAKA	SYLKNWEEGCMFMSDRA
CGT K.pn.	326	VVFDNHDMA	
AMY B.st.	323	VTFVNDHDE	
AMY B.am.	321	VTFVENHDTQ	
AMY B.su.	262	VTFVESHDTY	
AMY A.or.	290	GTFVNHNDP	
AMY Rat	290	LVFVNDHNDQ	
AMY Hog	293	LVFVNDHNDQ	
AMY H.s.	296	LVFVNDHNDQ	
AMY Bar.	297	ATVFVNDHDC	

Figure n°9

Alignement des séquences en amino-acides de la CGTase (CGT) de *Klebsiella pneumoniae* M 5 al. (K.pn.) et de différentes α -amylases (AMY), permettant de replacer les quatres régions conservées pour les amylases (NAKAJIMA et al., 1986) dans la séquence de la CGTase. Ces régions sont encadrées.

B.st., B.su., B.am. : *Bacilli stearothermophilus*, *subtilis*, *amyloliquefaciens*; A.or.: *Aspergillus oryzae*; Rat: pancréatique murine; Hog: pancréatique porcine; Bar.: orge.

D'après BINDER et al., 1986.

Enfin SVENSSON (1988) élargit l'étude en comparant les séquences de 21 glucosidases, dont BMA. Elle montre que BMA présente une bonne homologie de séquence, par rapport aux autres glucosidases, dans les régions n°2 et n°4 définies par NAKAJIMA et al. (1986). Or, les fonctions de ces régions sont toujours liées au site actif. En effet, la région n°2 comprend les résidus catalytiques Asp₁₇₆, Glu₁₇₉ et Glu₁₈₀ de la glucoamylase d'*Aspergillus niger* (SVENSSON et al., 1990). D'autre part, la région n°4 comprend un résidu Asp catalytique dans la Taka-amylase A (MATSUURA et al., 1984) et dans l' α -amylase pancréatique porcine (BUISSON et al., 1987). L'existence d'un site catalytique commun entre les CGTases et les autres glucosidases est donc clairement établie.

De toutes ces études, une hypothèse naît à l'époque : la partie N-terminale des CGTases (à forte homologie avec les α -amylases) serait responsable de la coupure de la chaîne amylacée, et la partie C-terminale, caractéristique des CGTases, porterait la fonction de transfert (KIMURA et al., 1987^a).

2- Réactivité des CGTases "chimériques", tronquées dans la partie C-terminale.

De nombreux auteurs, séduits ou en désaccord avec l'hypothèse de KIMURA et al. (1987^a), tentèrent d'élucider la fonction de la région C-terminale des CGTases. Leur stratégie, basée sur l'étude des propriétés enzymatiques de CGTases tronquées, donnera cependant des résultats très contradictoires.

A partir de l'isolement du gène d'une CGTase issue d'un *Bacillus* sp. alcalophile (# n°17-1), KANEKO et al. (1988) construisent 12 chimères diversement tronquées, et étudient les propriétés enzymatiques des protéines recombinantes correspondantes. Ils montrent que la stabilité thermique dépend de la région N-terminale mais que l'influence du pH a une incidence en N- et C-terminal. En outre, une délétion de 30 résidus du côté C-terminal entraîne la perte de l'activité enzymatique, suggérant

une participation de cette région au site actif.

KIMURA et al. (1989) préparent deux CGTases mutées à partir du gène de la CGTase du *Bacillus sp.* alcalophile # n°1011, avec une délétion de 10 à 13 résidus du côté C-terminal. Les protéines recombinantes donnent toujours des β -CD en dégradant l'amidon, mais d'importantes quantités de glucose, de maltooligosaccharides et d' α -CD sont détectées dans les incubats par rapport à l'enzyme de la souche sauvage. En accord avec leur hypothèse (KIMURA et al., 1987^a), les auteurs concluent que la coupure de la chaîne amyliacée est assurée par la partie N-terminale de l'enzyme et que la partie C-terminale permet de reconstituer la liaison α -1,4 sous la forme d'une cyclodextrine.

HELLMAN et al. (1990), à partir de chimères d'une CGTase d'un *B. circulans*, montrent que l'inactivation de l'enzyme par délétion de 36 et 84 résidus C-terminaux concerne à la fois les activités "dextrinifiante" et cyclisante (0,5 % d'activité résiduelle), et que la fusion du gène muté avec le gène d'une phosphatase alcaline permet d'"augmenter" l'activité de la CGTase tronquée (2 % d'activité résiduelle, en fait...). Les auteurs infirment donc l'hypothèse de KIMURA et al. (1987^a) et pensent que la partie C-terminale des CGTases n'a qu'un rôle de maintien conformationnel. En fait, si l'on prend en compte les conclusions de BOVETTO (1988) relatives au caractère indispensable de l'accepteur pour obtenir une coupure, ce résultat n'infirme plus l'hypothèse de KIMURA et al., mais la conforte. En effet, l'enzyme ne peut plus "dextrinifier" son substrat, au même titre qu'elle ne peut plus cycliser, puisque toute transglucosylation est impossible après tronquage du site de l'accepteur. Par contre, il est en contradiction avec l'hypothèse de BENDER (1988) relative à un mécanisme de type "Ping-pong" (en deux temps : 1-hydrolyse de la chaîne et libération de la partie non-réductrice; 2-positionnement de l'accepteur et transfert de la partie réductrice sur ce dernier) puisqu'un tel mécanisme ne nécessite pas d'accepteur pour couper.

Enfin, les résultats obtenus par BENDER (1990^b) ne sont pas en accord avec une région C-terminale impliquée dans le site actif. La CGTase de *Klebsiella pneumoniae* délétée de 90 résidus du côté C-terminal ne présente pas de différences réactionnelles significatives par rapport à l'enzyme de la souche sauvage. Il s'agit là du premier et unique cas d'un maintien d'activité ou de spécificité après tronquage de la partie C-terminale d'une CGTase, et il faut noter qu'il est le seul à concerner une α -CGTase. Si on le compare au résultat de KIMURA et al. (1989) concernant une β -CGTase (augmentation de la production d' α -CD et de réducteurs après tronquage de la partie C-terminale), on est tenté d'attribuer à la partie C-terminale un rôle dans la spécificité α ou β des CGTases.

3- Modifications chimiques spécifiques, appliquées à des résidus d'acides aminés fonctionnels.

Malgré la large utilisation des réactifs spécifiques d'un type donné d'acide-amino dans les études concernant les relations structure-fonction des enzymes (GLAZER, 1970; EYZAGUIRRE, 1987) cette stratégie n'a presque pas été appliquée à l'étude des CGTases. Seul BENDER a étudié l'influence de la modification des résidus tryptophanyles (1990^c) et des résidus histidyles (1991) sur la réactivité de l'enzyme.

3-a- Résidus tryptophanyles.

BENDER (1990^c), en modifiant par la N-bromosuccinimide certains résidus tryptophanyles d'une α - et d'une β -CGTase, montre que ces résidus n'affectent pas outre mesure les propriétés catalytiques des CGTases. Par contre, ces derniers semblent impliqués dans la liaison au substrat, comme décrit pour le Trp₈₃ de la Taka-amylase A (MATSUURA et al., 1984), ou pour le Trp₁₂₀ de la glucoamylase d'*A. niger* (CLARKE & SVENSSON, 1984).

3-b- Résidus histidyles.

En modifiant par le Diéthylepyrocarbonate une moyenne de 1,5 résidus histidyls^e de l' α -CGTase de *K. pneumoniae* M 5 al. et de la β -CGTase de *B. circulans* # n°8, BENDER (1991) perd 90 % de leur activité cyclisante et observe : une diminution de l'affinité, un maintien relatif des activités disproportionnante et de couplage, et une augmentation de la production des sucres réducteurs. En se référant d'une part à la structure tridimensionnelle de la CGTase de *B. circulans* n°8 (HOFMANN et al., 1989) et les premiers résultats de son affinement alors en cours (KLEIN et al., 1991), et d'autre part sur la structure fine des amylases (MATSUURA et al., 1984, BUISSON et al., 1987), il attribue aux résidus His₃₃₂ pour la CGTase de *K. pneumoniae* et His₃₂₇ pour la CGTase de *B. circulans* un rôle de liaison au substrat et une orientation de ce dernier vers une transglucosylation cyclique plutôt que linéaire.

4- Homologies de séquences, dans la région C-terminale, avec d'autres glucohydrolases affines pour l'amidon cru (grains d'amidon).

En alignant les séquences peptidiques de 21 glucosidases dans un souci de rapprochement entre structures conservées et fonction, SVENSSON (1988) trouve une homologie de séquences, dans la partie C-terminale, entre la CGTase de *B. macerans* et la glucoamylase d'*Aspergillus niger*. En élargissant le champ d'investigation par comparaison de huit séquences C-terminales de différentes enzymes dégradant l'amidon, dont deux CGTases, SVENSSON (1989) met en évidence quatre zones d'homologies sur une distance totale de 96 à 103 résidus dont 21 à 44 % sont invariables. Ce motif conservé est le premier exemple d'une homologie claire entre α - et β -glucosidases, quel que soit leur mode d'attaque (endo ou exo) de l'amidon.

Pour toutes les glucoamylases, cette région est nécessaire à l'adsorption sur granule d'amidon. La glucoamylase d'*Aspergillus niger* perd cette faculté (mais hydrolyse toujours l'amidon

soluble) après tronquage de sa partie C-terminale ou oxydation des résidus tryptophanyles de cette région (SVENSSON, 1986). D'autre part, une protéine recombinante issue de la fusion de la β -galactosidase et des résidus 486-616 de la glucoamylase d'*A. niger* acquiert la faculté de s'adsorber sur l'amidon cru (CHEN et al., 1988). SVENSSON suggère donc que les CGTases, comme de nombreuses glucosidases, présentent dans leur partie C-terminale des résidus impliqués dans la reconnaissance de l'amidon cru ("Raw-starch-binding Site" des glucoamylases).

III- LA CGTase DE *BACILLUS CIRCULANS* # E 192.

Au vu du considérable développement potentiel qu'offrent les cyclodextrines depuis ces dernières années, la société ROQUETTE-Frères (Lestrem, France), forte de sa position dans le domaine des produits amylicés, se lance dans la production industrielle de cette spécialité. C'est dans ce contexte que fut sélectionné, après analyse de nombreuses terres agricoles, un Bacille producteur de β -cyclodextrine, appartenant à l'espèce *Bacillus circulans*. La souche, constamment améliorée dans un souci de productivité de la β -cyclodextrine, donnera naissance au *Bacillus circulans* # E 192.

BACKER (1988) et BOVETTO (1988) purifieront la CGTase produite par *B. circulans* # E 192 et en décriront les principales caractéristiques physico-chimiques. Leurs travaux concernant les paramètres enzymatiques de la molécule permettront, outre une optimisation de la production de la β -CD, de définir les conditions idéales d'étude de cette enzyme.

III-A- Principales caractéristiques physico-chimiques.

La CGTase excrétée par *B. circulans* # E 192 est une protéine monomérique d'une masse de 73000 Da (SDS-PAGE). Elle n'est pas glycosylée et reste stable en solution à 4°C, une fois purifiée.

Deux isoenzymes d'activités spécifiques identiques ont été isolées : une forme majeure (70 %, p_i 6,9) et une forme mineure (30 %, p_i 6,1).

L'enzyme est thermolabile : après 20 minutes de préincubation à 50°C ou 2 minutes à 60°C, la perte d'activité est totale. Le calcium permet cependant de protéger l'enzyme contre cette dénaturation : aucune dénaturation n'est observée après une heure de préincubation à 50°C en présence de CaCl_2 2mM ou à 60°C en présence de CaCl_2 5 mM. Les divers substrats amylicés protègent également l'enzyme contre la dénaturation thermique. L'effet protecteur augmente avec la longueur des chaînes et la quantité de branchements α -1,6.

Enfin, la stabilité maximale est obtenue dans une zone de pH comprise entre pH 7,0 et pH 8,0.

III-B- Paramètres enzymatiques.

1- Conditions optimales.

Les conditions optimales de cyclisation sont les suivantes :

$$\begin{aligned} 5,3 < \text{pH}_{\text{opt}} < 5,7 \\ 55^\circ\text{C} < t'_{\text{opt}} < 60^\circ\text{C} \end{aligned}$$

2- Substrats.

La production des cycles est favorisée par l'utilisation de substrats amylicés branchés en α -1,6 (nombreuses amorces car nombreuses extrémités non-réductrices) présentant des chaînes suffisamment longues entre les branchements. Le WAXY-maïs s'est avéré être le meilleur substrat pour la cyclisation, alors que les hydrolysats d'amidon (Glucidex[®]) entraînent un important couplage et favorisent les réactions disproportionnantes.

Enfin, la constante de Michaelis (K_M) mesurée sur amidon soluble de blé a été estimée à 0,57 % (p/v).

3- Spécificité.

Les ratios α -/ β -/ γ -CD obtenus sur amidon soluble varient en fonction du temps d'incubation. Ceci est lié au fait que l' α -CD apparaît plus lentement alors que le taux maximal de β - ou de γ -CD est très rapidement atteint. Enfin, pour des temps très longs, la β -CD est la plus susceptible vis-à-vis de la réaction de couplage.

Les ratios α -/ β -/ γ -CD sont respectivement de :

1 / 8,5 / 3,8	en début de cinétique,
3 / 3,1 / 1	à l'équilibre.

4- Autres caractéristiques.

Les auteurs ont également mis en évidence une légère activité hydrolytique (de type amylase) en utilisant la β -CD comme substrat. Son activité moléculaire serait 1700 fois moins rapide que la cyclisation, mais suffit à expliquer la faible augmentation du pouvoir réducteur mesurée pour des temps longs dans les incubats à forte concentration en enzyme.

Enfin, il faut signaler que l'enzyme n'est pas métallo-dépendante, malgré le caractère indispensable du calcium dans le maintien de sa structure.

MATERIEL ET METHODES

I- TECHNIQUES ANALYTIQUES.

I-A- Dosage des protéines.

La concentration en protéine est déterminée en utilisant un kit commercialisé (BIORAD), le biorad[®] protein assay, et la Sérum Albumine Bovine (IBF) comme standard d'étalonnage. Ce dosage est basé sur la méthode de BRADFORD (1976).

Dans le cas d'un dosage de l'enzyme pure (à l'exception des expériences de modification chimique de l'enzyme), la concentration est parfois directement déduite de la mesure photométrique de l'absorbance à 280 nm, en utilisant le coefficient d'extinction suivant :

$$\epsilon_{280} = 2,49 \text{ l.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}.$$

Ce coefficient est lui-même basé sur une mesure de concentration déterminée par le biorad[®] avec étalonnage par la Sérum Albumine Bovine.

I-B- Dosage des hexoses neutres totaux.

La quantité d'hexoses neutres totaux est déterminée suivant la méthode de TILLMANS & PHILIPPI (1929), en utilisant la technique de RIMINGTON (1931). L'étalonnage est réalisé à l'aide de glucose et les résultats sont exprimés en Molarité d'Equivalents Glucose.

Méthode.

A 100 μl de la solution à doser (ou 100 μl de solution étalon de glucose 0 - 1 - 2 mM) sont ajoutés 200 μl de réactif à l'orcinol (ALDRICH) 1,5 % (p/v) dans H_2SO_4 (R.P.) à 30 % (v/v), puis 1500 μl d' H_2SO_4 à 60 % (v/v). Après homogénéisation, les tubes sont placés 20 minutes à 80°C, puis refroidis dans un bain de glace. Les absorbances sont mesurées par colorimétrie à 510 nm

après un séjour de 45 minutes à l'obscurité.

I-C- Dosage colorimétrique des β -CD et de l'activité cyclisante.

1- Principe.

L'activité cyclisante de l'enzyme est déterminée selon la méthode de VIKMON (1982). Les β -CD formées au cours de la transformation d'un substrat amylicé sont dosées par mesure de la diminution de coloration de la phénolphtaléine (rose à pH basique), induite par la formation d'un complexe d'inclusion entre la β -CD et l'indicateur coloré.

2- Définition de l'Unité enzymatique.

Une Unité enzymatique (U) représente la quantité d'enzyme catalysant la formation d'une micromole de β -CD par minute dans des conditions standard de température (50°C) et de pH (pH 7.0), en présence de Glucidex 12[®] à 5 % (p/v) comme substrat.

3- Méthode.

3-a- Etalonnage du dosage des β -CD.

La décoloration de la phénolphtaléine est proportionnelle à la quantité de β -CD pour des concentrations comprises entre 0 et 25 μ M.

Témoin : 4 ml d'une solution Na_2CO_3 100 mM

Echantillon 10 μ M : 4 ml d'une solution β -CD (ALDRICH) 12,5 μ M dans Na_2CO_3 100 mM

Lors du dosage, on ajoute dans chaque tube 1 ml d'une solution de phénolphtaléine (MERCK) 0,165 mM (fraîchement préparée

par dilution au 50^{ème} d'une solution mère éthanolique 8,25 mM). Après homogénéisation, les absorbances sont lues à 550 nm.

Le coefficient de conversion du dosage (en général 0,012 μM^{-1}) est obtenu en ramenant la différence d'absorbance (Témoin - échantillon) à 1 μM β -CD.

$$c = \frac{\Delta A}{10} \quad (\mu\text{M}^{-1})$$

3-b-Dosage de l'activité cyclisante.

Le substrat utilisé est le Glucidex 12[®] (ROQUETTE), un hydrolysat d'amidon caractérisé par un D.E. voisin de 12.

A chaque incubat correspond un incubat témoin pour lequel l'extrait enzymatique dosé a été préalablement inactivé par la chaleur, ou remplacé par le tampon dans le cas d'un extrait pur.

100 μl d'extrait enzymatique à titrer (ou d'extrait témoin), dilué F fois dans un tampon Tris-HCl 10 mM pH 7,5, CaCl_2 10 mM, sont préincubés 1 minute à 50°C. La réaction est déclenchée par addition de 900 μl d'une solution de Glucidex 12[®] à 5 % (p/v) dans un tampon Tris-HCl 100 mM pH 7.0, préalablement préincubée à 50°C. Après 15 minutes d'incubation, la réaction est stoppée par addition de 3 ml de Na_2CO_3 100 mM.

La quantité de β -CD formées dans l'incubat est mesurée de la manière suivante :

A 3,8 ml de Na_2CO_3 100 mM sont ajoutés 200 μl du mélange préparé ci-dessus (un témoin et un échantillon). Après addition de 1 ml de phénolphtaléine 0,165 mM et homogénéisation, les absorbances sont lues à 550 nm et la différence d'absorbance (ΔA) est calculée par rapport à l'absorbance obtenue pour le témoin.

Le calcul suivant permet d'obtenir la valeur de l'activité cyclisante (en U/ml) :

$$\text{Activité} = \frac{\Delta A \times F}{c \times t} \quad (\text{U/ml})$$

avec, F = facteur de dilution de l'extrait enzymatique;
c = coefficient de conversion (en μM^{-1});
t = temps d'incubation (15 minutes).

I-D- Dosage de l'activité pseudo-dextrinifiante (consommation du substrat).

1- Principe.

Par ses activités cyclisante et disproportionnante, la CGTase raccourcit les chaînes amyliques. Il est donc possible de mesurer ce phénomène de "dextrinification" comme pour une amylase, bien qu'il ne s'agisse pas de la même activité. En effet, l'activité dextrinifiante d'une amylase s'accompagne d'une augmentation du pouvoir réducteur et correspond à une saccharification. L'activité pseudo-dextrinifiante d'une CGTase ne présente pas (ou très peu) de tel phénomène (pas de variation du pouvoir réducteur) mais peut néanmoins être mesurée par les méthodes classiques de dosage d'une activité dextrinifiante.

Deux méthodologies différentes ont été utilisées au cours de cette étude pour mesurer l'activité pseudo-dextrinifiante :

1) Méthode de dosage des α -amylases bactériennes (B.A.U.) selon la technique proposée par le *Committee on codex specifications* (1981). Celle-ci est basée sur la mesure du temps de dextrinification par suivi colorimétrique à 620 nm de la décoloration du chromophore Amidon/réactif iodo-ioduré. Nous proposerons ici une simplification de cette méthode par linéarisation de la courbe de vitesse de diminution de l'absorbance à 620 nm, permettant l'obtention du temps de dextrinification avec moins de mesures.

2) Utilisation d'un kit commercial : Le Phadebas[®] amylase test (PHARMACIA-LKB). Ce test, utilisé en biologie clinique pour doser les amylases, utilise un substrat amylicé insoluble coloré en bleu. Ce substrat est solubilisé par dextrinification, et l'intensité de la coloration bleue libérée dans le surnageant de centrifugation est mesurée à 620 nm. L'absorbance est proportionnelle à l'activité dextrinifiante.

2- Méthodes.

2-a- Dosage à l'iode (méthode "B.A.U." modifiée).

L'amidon soluble (MERCK) est préparé à 1,5 % (p/v) dans un tampon Tris-HCl 100 mM pH 7,0. L'amidon est préalablement solubilisé par ébullition sous agitation dans une faible quantité de tampon avant d'ajuster le volume final de la solution.

La solution colorée de référence est composée d'un mélange de bichromate de potassium (R.P.) à 3,84 % (p/v), chlorure de cobalt, 6 H₂O (R.P.) à 25 % (p/v), HCl à 0,307 %.

A 1 ml d'extrait enzymatique convenablement dilué dans un tampon Tris-HCl 10 mM pH 7,5, CaCl₂ 10 mM, (en général 0,2 U/ml d'activité cyclisante) et préalablement préincubé à 50°C, on ajoute 1 ml d'amidon soluble préincubé à 50°C. L'incubate homogénéisé (CGTase 0,1 U/ml, Amidon 0,75 % (p/v)) est placé à 50°C.

Des prélèvements de 200 µl sont effectués toutes les 5 minutes et immédiatement dilués dans 1 ml d'une solution fraîchement préparée d'iode (MERCK) à 88 mg.l⁻¹ dans IK (R.P.) à 4 % (p/v), acidifié par 40 µl d'acide sulfurique (R.P.) 1 M et placé à 4°C.

Lorsque tous les prélèvements sont effectués, les tubes sont placés 5 minutes à 37°C avant de mesurer les absorbances à 620 nm (les absorbances supérieures à 1,5 ne sont pas prises en compte).

En portant graphiquement A_{620} en fonction du temps d'incubation, on détermine le temps de dextrinification (T_d , en minutes) pour lequel l'absorbance obtenue correspond à celle de la solution colorée de référence (Fig.10^a, p.54).

La valeur de $(T_d)^{-1}$ permet d'obtenir une vitesse relative de dextrinification.

Linéarisation de la courbe $A_{620} = f(t)$.

La courbe $A_{620} = f(t)$ est de type double exponentielle pour une dextrinification suffisamment significative ($T_d < 300$ min.). Il est donc possible de la linéariser en traçant :

$$\text{Log } A_{620} = f(\text{Log } t).$$

Cette représentation est illustrée sur la Figure 10^b (p.54).

Le calcul de l'équation de la droite de régression :

$$y = ax + b$$

nous permet d'accéder facilement à $x = \text{Log } T_d$
pour $y = \text{Log } (A_{620})_{\text{témoin}}$.

Ainsi, T_d peut être obtenu directement par calcul sans qu'il soit nécessaire d'utiliser une méthode graphique et sans être obligé de poursuivre l'expérience jusqu'à l'obtention d'une absorbance voisine de celle du témoin de référence. Enfin, peu de mesures sont nécessaires pour calculer l'équation de la droite de régression linéaire.

2-b- Utilisation du Phadebas[®] amylase test.

4 ml d'extrait enzymatique convenablement dilué (en général 0,01 U/ml d'activité cyclisante) dans un Tampon Tris-HCl 100 mM pH 7,0, CaCl₂ 10 mM, sont préincubés 5 minutes à 50°C. La réaction est déclenchée par addition d'une pastille de Phadebas[®] et la suspension est homogénéisée. Un incubat témoin sans enzyme est également préparé.

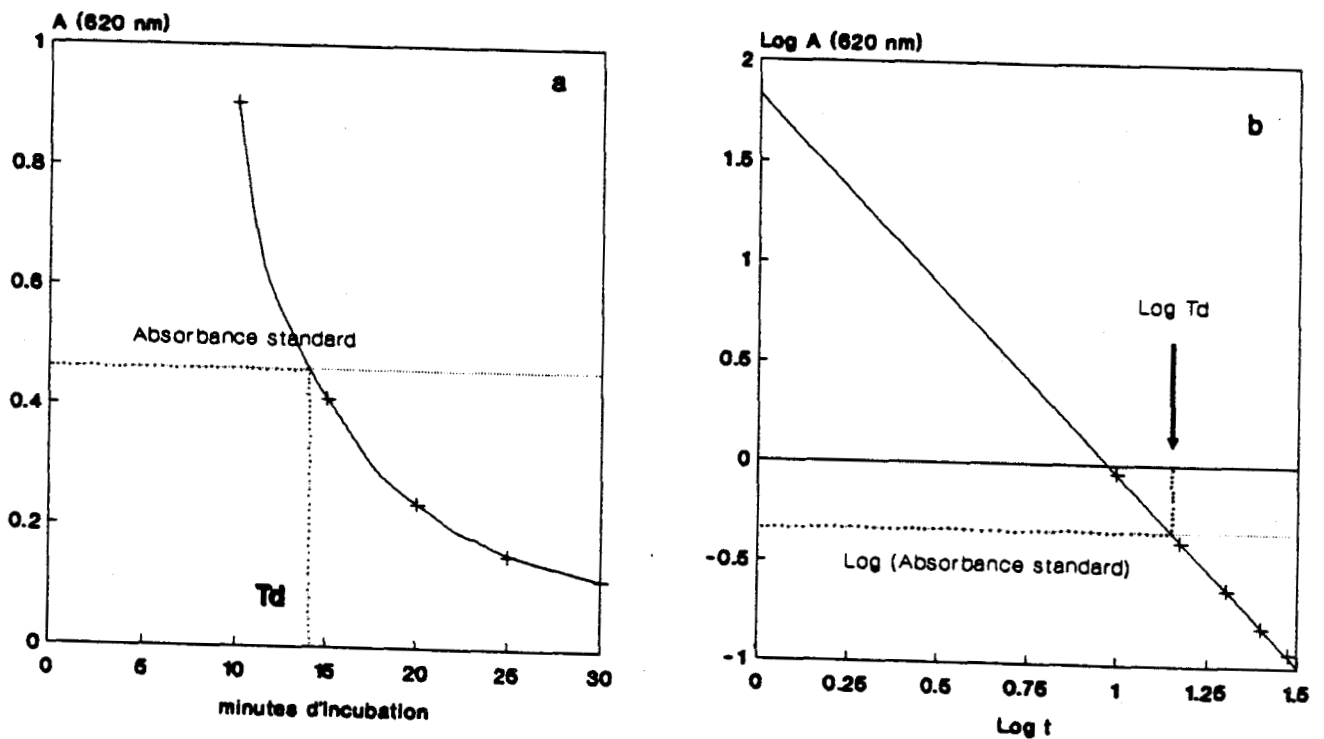


Figure n°10

a) Exemple d'une détermination graphique du temps de dextrinification (T_d). Concentrations dans l'incubat : CGTase 0,1 U/ml; Amidon soluble 0,75 % (p/v). Conditions expérimentales : voir texte (p.52).

b) Linéarisation de la courbe.

Après 10 minutes d'incubation à 50°C, la réaction est stoppée par addition de 1 ml de soude 0,5 M. Après homogénéisation, les tubes sont centrifugés 5 minutes à 2500 g.

L'absorbance à 620 nm des surnageants est enfin mesurée contre le surnageant provenant de l'incubat sans enzyme, et ramenée à une minute afin d'obtenir une vitesse relative de dextrinification (en min.⁻¹) :

$$v_d = \frac{A_{620}}{t} ; \quad \text{avec } t = 10 \text{ minutes.}$$

I-E- Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM) des mono- et oligosaccharides libérés dans l'incubat enzymatique.

1- Séparation.

Les prélèvements de 100 µl effectués dans les incubats enzymatiques sont toujours alcalinisés par addition de 20 µl d'ammoniaque à 28 % pour stopper la réaction.

5 µl de ce mélange sont utilisés pour un dépôt sur gel de silice 60 (MERCK). Les dépôts sont effectués "en traits" sur 1 cm de long, à la même hauteur (1,5 cm du bas) et séparés d'au moins 0,5 cm.

La migration s'effectue de manière ascendante, en cuve fermée, à l'aide du système solvant

n-propanol / eau / acétate d'éthyle / ammoniaque
6 / 3 / 1 / 1 (v/v).

jusqu'à ce que le front du solvant atteigne le haut de la plaque (environ 7 h à 20°C).

Dans le cas d'un mélange de maltodextrines, la séparation peut s'effectuer une nuit (14 heures) en cuve ouverte sous hotte ventilée.

2- Révélation des produits séparés.

2-a- Révélation spécifique des cyclodextrines.

Les cyclodextrines sont révélées spécifiquement par leur capacité à former des complexes avec l'iode (THOMA & FRENCH, 1958).

On pulvérise sur la plaque séchée une solution iodo-iodurée composée d'iode à 0,85 % (p/v) dans IK 2,67 % (p/v). Après séchage, les trois principales cyclodextrines prennent les colorations suivantes :

α -CD : marron;
 β -CD : orange;
 γ -CD : jaune.

Dans le cas de l'utilisation d'un substrat de type amidon, on observe une intense coloration par l'iode de ce dernier à l'endroit du dépôt.

Cette révélation étant peu sensible, le volume du produit déposé sera augmenté en conséquence (10 à 20 μ l).

2-b- Révélation des oligosaccharides totaux.

Les oligosaccharides totaux sont révélés suivant le principe déjà indiqué pour le dosage des hexoses neutres, par pulvérisation d'une solution d'orcinol sulfurique (ALDRICH) à 0,2 % (p/v) dans H₂SO₄ 20 % (v/v), puis chauffage à 110°C jusqu'à apparition des tâches violettes sur fond jaune.

I-F- Techniques électrophorétiques.

1- Analyse des protéines par électrophorèse dénaturante en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE).

Cette technique, proposée par LAEMMLI (1970), permet d'une part d'apprécier la composition en chaînes polypeptidiques d'un extrait protéique (donc sa pureté), et d'autre part de déterminer la masse moléculaire d'un polypeptide donné par rapport à des témoins de masses connues.

Les gels d'électrophorèse (10 × 13 × 0,1 cm) sont préparés en présence de SDS (BDH) à 0,1 % (p/v) selon la méthode de WEBER & OSBORN (1969). Les gradients utilisés en polyacrylamide (acrylamide + N,N'-méthylènebisacrylamide (BDH)) sont de 5-24 % ou 10-24 % (p/v).

Les échantillons protéiques (\approx 1 mg/ml) sont traités 10 minutes à 100°C dans un tampon Tris-HCl (BDH) 250 mM pH 8,9, SDS (BDH) 5 % (p/v), β -mercaptoéthanol (ALDRICH) 4,5 % (v/v), glycérol 18 % (v/v), en présence de bleu de bromophénol (SIGMA). Les volumes déposés varient de 5 et 40 μ l suivant la composition de l'échantillon et la méthode utilisée pour la révélation. Les échantillons témoins composés d'un mélange de protéines de masses connues, entre 14,4 et 94 kDa (PHARMACIA) subissent le même traitement.

Les électrophorèses sont conduites sous courant constant de 60 mA jusqu'à ce que le bleu de bromophénol ait atteint le bas du gel.

Les protéines séparées sur le gel sont immédiatement fixées et révélées par la méthode au nitrate d'argent (MORRISSEY, 1981) en cas de faible quantité, ou plus généralement par le bleu brillant R (SIGMA) à 0,2 % (p/v) dans un mélange éthanol/acide acétique/eau (5/2/9 (v/v)). Dans ce cas, le même solvant est utilisé pour décolorer les parties du gel ne portant pas de protéines, afin de faire apparaître les bandes.

2- Analyse isoélectrophorétique de l'enzyme.

2-a- Mise en évidence des isoformes par isoélectrophorèse sur PhastSystem™ (PHARMACIA).

La méthodologie utilisée est décrite dans la notice du fabricant. La séparation est effectuée dans un gel type IEF 3-9 (PHARMACIA) permettant de séparer des protéines dont le point isoélectrique est compris entre pH 3 et pH 9.

Les échantillons (4 μ l) sont déposés de manière centrale (à équidistance entre la cathode et l'anode). Trois échantillons sont analysés en double (deux fois trois dépôts) :

- un mélange de protéines témoins $2,5 < p_i < 6,5$ (PHARMACIA);
- un mélange de protéines témoins $3,0 < p_i < 10$ (PHARMACIA);
- un échantillon de CGTase pure 2 mg/ml.

Après migration, le gel est fixé puis révélé par le bleu de Coomassie suivant la méthodologie décrite par le fabricant.

2-b- Analyse quantitative des isoformes et de leur activité enzymatique après séparation par système Multiphor (L.K.B.).

Séparation des isoenzymes.

On utilise un gel de polyacrylamide à 5 % (p/v) commercialisé (L.K.B.) en couche mince sur feuille de plastique (245 \times 110 mm) et contenant un mélange d'ampholines à 2,2 % (p/v) de point isoélectrique compris entre 5,5 et 8,5. Le montage est réalisé comme spécifié par le fabricant, avec une solution de soude 0,1 M à la cathode et une solution d'HEPES 0,4 M à l'anode. Le gel est réfrigéré à l'eau courante (environ 10°C).

500 μ l d'une solution de CGTase pure 2mg/ml sont déposés à l'aide d'une pipette à la surface du gel, sur toute sa largeur.

La migration est effectuée pendant trois heures dans le sens de la longueur du gel, sous une puissance imposée de 30 W.

Analyse des isoenzymes séparées.

Le gel est découpé sur toute sa longueur en deux parties égales et l'orientation cathode/anode est repérée sur chaque partie.

Une moitié de gel sera révélée au bleu brillant R (SIGMA), puis séchée sous vide sur papier blanc. Un profil densitométrique est réalisé afin de déterminer les concentrations relatives en isoenzymes séparées.

On effectue sur la seconde moitié du gel un découpage latéral en 49 bandelettes de 5 mm de large. Chaque bandelette est immergée dans 1 ml d'eau (qualité milli-Q[®]) dégazée, et les 49 tubes sont placés une nuit (14 heures) à 4°C. Pour chaque tube, on effectue :

- un dosage d'activité cyclisante de l'extrait dilué au 10^{ème} dans un tampon Tris-HCl 100 mM pH 7,5, CaCl₂ 10 mM;
- une mesure directe, à 10°C, du pH de l'extrait non dilué.

Ainsi, on peut superposer graphiquement les trois paramètres (pH, activité et concentration relative en protéine) en fonction de la distance de migration, et en déduire le point isoélectrique, la quantité relative et l'activité spécifique relative pour chaque isoenzyme (ou groupe d'isoenzymes) séparée.

I-G- Analyse des compositions en amino-acides.

Les acides aminés libres provenant de l'hydrolyse acide de la protéine sont dérivés par le PITC avant d'être séparés et dosés par analyse HPLC.

L'hydrolyse et la dérivation sont pratiquées suivant la méthode de BIDLINGMEYER et al. (1984) décrite dans le bulletin technique Pico.Tag[®] WATERS (WM02, Rev.1). Pour déterminer la composition en tryptophane, une hydrolyse plus douce par l'acide méthane-sulfonique est pratiquée, suivant la méthode de COHEN et al. (1987).

Les hydrolysats dérivés sont analysés par HPLC (SPECTRA PHYSICS 8100) en phase inverse, à l'aide d'une colonne CHROMATEM C-18, 5 μm (4,6 \times 250 mm) et en utilisant un gradient d'élution d'un solvant A à un solvant B, de 0 à 80 % de B en 20 minutes à 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$;

A = Acétate d'éthyle 0,1 M,
Triéthylamine 0,065 % (v/v),
Acétonitrile à 6 % (v/v);

B = Acétonitrile à 60 % (v/v).

II- TECHNIQUES RELATIVES A LA PURIFICATION DE L'ENZYME.

II-A- Préparation de l'extrait à chromatographier.

Cette étape, réalisée au sein de l'entreprise, a nécessité l'utilisation d'installations semi-industrielles. Le procédé de culture de *Bacillus circulans* E 192 est propre aux E^{ts} ROQUETTE-Frères.

Mille litres (1 m^3) d'une culture de *Bacillus circulans* E 192 sont filtrés sur terre de cellulose (filtre rotatif) et le filtrat (extrait brut : 3 U/ml; 1,04 mg/ml de protéines) est acheminé dans une cuve équipée d'une turbine d'agitation et maintenue à 20°C.

On y ajoute une solution de 30 litres contenant 1,21 kg de Tris (BDH), 1,86 kg d'EDTA (MERCK) et 2,0 kg de Cétavlon[®] (MERCK), afin de précipiter tous les constituants visqueux (notamment un polysaccharide excrété par *B. circulans*). L'EDTA permet également d'inhiber les éventuelles activités protéolytiques. Le pH résultant est de 7,2.

Après deux heures d'agitation vigoureuse, la fraction insoluble est éliminée sur filtre-presse équipé de plaques de cellulose (SEITZ) coupant à 0,45 μm . Six cents litres de filtrat

(3 U/ml) sont récupérés.

Trois cent cinquante litres de filtrat, soit 1,05 MU, sont concentrés à 30 litres par ultrafiltration tangentielle, à 4°C et sous 1 bar de pression (novasette® FILTRON, 10 kDa de seuil de coupure). Le rétentat est lavé 4 fois par trente litres de tampon phosphate de potassium 2,5 mM pH 7,5, NaN₃ 0,02 % (p/v). Finalement, vingt litres de rétentat à 42 U/ml et 1,84 mg/ml en protéines sont obtenus et stockés à -80°C en vingt portions de un litre.

II-B- Synthèse chimique du copolymère de β-CD.

La matrice est préparée suivant la méthode de SHAW et al. (1984).

Dans un réacteur agité de deux litres, on introduit 50 g de β-CD (ROQUETTE) et 22 ml d'eau. L'agitation (maintenue constamment) permet d'obtenir une pâte qui sera plus ou moins solubilisée par addition d'une solution encore chaude, composée de 27 g de soude dans 27 g d'eau. 100 mg de borohydrure de potassium sont également introduits. La température du mélange est maintenue entre 50 et 60°C. 50 ml d'épichlorhydrine sont enfin ajoutés en 2 minutes au goutte-à-goutte. La réaction est exothermique et brutale. L'apparition du copolymère est visualisée par un gonflement et une rapide prise en masse du mélange, accompagnée d'une légère coloration brun-orangé. Le système est alors laissé sous agitation 30 minutes supplémentaires.

Le copolymère est récupéré sur Buchner et lavé successivement par 800 ml d'acétone puis 8 l d'eau. Il est ensuite broyé en suspension aqueuse à l'aide d'un mixer (POLYTRON) et les "fines" (particules de surface) sont éliminées par décantations successives.

Enfin, le copolymère est déshydraté par lavage à l'éthanol (400 ml environ) sur Buchner, séché une nuit à 37°C dans un

réceptient taré, puis pesé.

II-C- Estimation de la capacité du copolymère de β -CD.

100 mg (moins si nécessaire) de copolymère sec sont mis en suspension dans 1 ml d'une solution pure de CGTase (80 U/ml) tamponnée à pH 7,5 par du Tris-HCl 10 mM, CaCl_2 10 mM. Après une heure d'incubation à température ambiante sous agitation douce ("roller"), 4 ml de tampon sont ajoutés et le mélange est décanté. L'activité du surnageant est alors dosée et comparée à celle d'un témoin sans copolymère. Le déficit d'activité, ramené à 1 g de copolymère sec représente la capacité de la matrice, exprimée en U/g de copolymère sec.

Cette capacité est aussi directement confirmée de la manière suivante. Le culot de décantation, lavé à trois reprises par le tampon, est incubé 15 minutes à 50°C dans 1 ml de Glucidex 12[®] à 5 % (p/v) dans un tampon Tris-HCl 100 mM, pH 7,0, et la quantité de β -CD formée est dosée (Cf. p.49) de manière à confirmer la présence de CGTase active sur la matrice. Un témoin sans enzyme est également testé afin d'éliminer toute possibilité d'artefact liée à la composition du copolymère (relargage de β -CD).

II-D- Purification de l'enzyme par chromatographie d'affinité sur le copolymère de β -CD.

1- Purification préparative.

Tous les tampons sont filtrés à 0,22 μm (MILLIPORE) et dégazés par ébullition sous agitation et sous vide.

50 g de copolymère de β -CD sont mis en suspension dans un tampon Tris-HCl 10 mM pH 7,5, CaCl_2 10 mM, NaN_3 0,02 % (tampon d'équilibrage) et dégazés sous vide pendant environ deux heures à 60°C. La suspension est ensuite coulée dans une colonne de 4,4 cm de diamètre, et le lit de gel (4,4 x 12,2 cm) est équilibré par

passage d'environ 1500 ml de tampon d'équilibrage. Le débit est maintenu à 130 ml/h (8,5 cm/h).

Un litre (1 l) d'extrait enzymatique (Cf. p.60) fraîchement décongelé est alors chargé sur la colonne, à température ambiante et au débit de travail, puis la colonne est lavée par passage de 2500 ml de tampon d'équilibrage. Les protéines de l'éluat sont détectées à 280 nm. La CGTase est éluée à l'aide d'une solution de β -CD à 1 % (p/v) dans le tampon d'équilibrage.

La fraction enzymatique ainsi purifiée est alors concentrée à environ 50 ml à l'aide d'une membrane d'ultrafiltration (AMICON, type YM 10), et le rétentat est lavé par environ 20 volumes de tampon d'équilibrage.

La matrice d'affinité est régénérée par un simple lavage à contre-courant utilisant environ 500 ml d'une solution de soude 0,1 M, puis rééquilibrée dans le tampon d'équilibrage (ou neutralisée par rinçage à l'eau puis séchée et stockée).

2- Purification analytique et micro-préparative.

Cette chromatographie utilise les mêmes tampons et matrice que la précédente, mais elle est réalisée à partir d'enzyme pure, sur système PHARMACIA F.P.L.C. (Fast Protein Liquid Chromatography) à l'aide d'une colonne type HR 5/5 (0,5 x 5 cm). Cet appareillage permet une reproductibilité parfaite du profil d'éluat grâce à l'emploi d'un gradient de β -CD.

Pour cette micro-méthode, les conditions chromatographiques sont les suivantes : 0,05 à 1 mg de CGTase pure (native ou chimiquement modifiée) sont chargés sur la colonne. Le débit est de 0,25 ml/min.. Après 7,5 ml de rinçage, l'enzyme retenue est éluée à l'aide d'un gradient de 0 à 1 % en β -CD effectué sur 7,5 ml.

II-E- Séparation analytique ou micropréparative des isoformes de l'enzyme par chromatographie d'échange d'ions.

L'échantillon à injecter est préparé en diluant l'enzyme pure (2 mg/ml) à 400 µg/ml dans un tampon Tris-HCl 10 mM pH 8,0 (tampon d'équilibrage).

500 µl d'échantillon (200 µg d'enzyme) sont injectés sur une colonne HR 5/5 de mono QTM (PHARMACIA) équilibrée dans le tampon précité, et connectée à l'appareillage FPLC (PHARMACIA). L'élution est réalisée à un débit de 1 ml/min., à l'aide d'un gradient de 0 à 125 mM en NaCl dans le tampon d'équilibrage, avec une pente de 2,5 moles.l⁻². Un palier est effectué à 22,5 mM NaCl jusqu'à l'élution complète de l'isoforme majeure.

III- TECHNIQUES RELATIVES A LA PARTIE ENZYMATIQUE.

III-A- Détermination des paramètres cinétiques (K_M et V_{max}) de l'activité cyclisante mesurée sur amidon soluble.

7 × 100 µl de CGTase pure à 10 µg/ml (native ou chimiquement modifiée) sont préincubés 1 minute à 50°C dans un tampon Tris-HCl 10 mM pH 7,5, CaCl₂ 10 mM . 7 témoins sans enzyme sont préparés de la même façon. On ajoute alors 900 µl d'amidon soluble (MERCK) préparé dans un tampon Tris-HCl 100 mM pH 7,0 et préincubé à 50°C de manière à obtenir les 14 incubats suivants :

- CGTase 1 µg/ml (ou absente pour la série témoin)
- en présence de
- amidon 0,4 - 0,6 - 0,8 - 1 - 1,2 - 1,4 - 1,6 % (p/v);
 - Tris-HCl 90 mM pH 7,0, CaCl₂ 1 mM.

Sitôt homogénéisés, les 14 incubats sont placés 15 minutes à 50°C.

La vitesse de cyclisation (en $\mu\text{mol } \beta\text{-CD}$ par minute) est alors déterminée pour chaque concentration en amidon soluble présent dans l'incubat, suivant la même procédure que pour la détermination de l'activité cyclisante (le facteur F de dilution à utiliser étant égal à 0,1).

Les paramètres K_M et V_{max} sont déterminés graphiquement selon la représentation de EADIE (BARMAN, 1969) en traçant la droite d'équation

$$S/v = f(S)$$

correspondant à la linéarisation de la courbe de saturation de l'enzyme par le substrat (HANES, 1932).

III-B- Détermination des constantes de dissociation observées ($K_{\text{d}_{\text{obs}}}$) de l'enzyme sur grains d'amidon cru et sur copolymère de $\beta\text{-CD}$.

1- Principe.

La fixation de la CGTase sur grains d'amidon cru ou sur le copolymère de $\beta\text{-CD}$ est une réaction équilibrée qui dépend donc de la concentration en CGTase puisque les deux matrices sont insolubles. Aussi, à quantité de matrice constante (excès), on obtient une courbe de saturation de la concentration en enzyme fixée en faisant varier la concentration en enzyme totale.

Cette courbe de saturation peut être aisément linéarisée selon la méthode de SCATCHARD (1949) en traçant

$$B/F = f(B)$$

avec B (Bound) = concentration en CGTase liée (en μM),
 F (Free) = concentration en CGTase libre (en μM).

L'inverse de la pente de cette droite (obtenue par régression linéaire) nous donne ainsi la valeur du K_d observé (en μM), sans tenir compte des interactions non spécifiques entre l'enzyme et la matrice.

2- Méthode.

Des incubats de 1 ml sont préparés à concentration croissante en CGTase pure dans un tampon Tris-HCl 80 mM pH 7,5, CaCl₂ 2 mM, en présence d'une quantité fixe de matrice. Un témoin CGTase sans matrice est également préparé pour servir de référence dans le dosage. Enfin, un témoin sans enzyme permet de s'assurer de l'inexistence de toute interférence due à la matrice dans le dosage.

Les quantités utilisées sont les suivantes :

- CGTase 30 - 50 - 60 - 75 - 100 - 120 µg/ml
- 50 mg d'amidon cru de maïs (ROQUETTE) par essai;
- ou
- CGTase 200 - 300 - 400 - 500 - 600 µg/ml
- 10 mg de copolymère sec de β-CD par essai.

Les incubats sont placés une nuit (14 heures) à 4°C sous agitation douce ("roller").

Après 15 minutes de centrifugation à 2500 g, la quantité de protéine libre (F) est dosée dans les surnageants convenablement dilués par le tampon. La concentration en CGTase liée (B) correspond à la différence entre CGTase incubée et CGTase libre.

III-C- Réactivités comparées de l'enzyme ou d'une α-amylase sur grains d'amidon de maïs, en présence ou non d'accepteur.

Les incubats (enzyme + amidon cru) sont préparés de la même manière que pour l'expérience précédente mais en utilisant :

- soit la CGTase à 240 µg/ml,
- soit l'α-amylase de *B.subtilis* (CALBIOCHEM®) à 200 µg/ml.

Dans ces incubats, la salicine est absente ou présente à 50 mM.

Après une nuit (14 heures) d'incubation à 4°C sous agitation douce ("roller"), 15 µl de surnageant de centrifugation de chaque incubat sont prélevés pour analyse en CCM.

III-D- Comparaison des réactions de couplage catalysées par α - ou β -CGTases.

1- Enzymes.

α -CGTase :

CGTase de *K. pneumoniae* souche K 40 (ROQUETTE) : surnageant de culture de la bactérie.

β -CGTase :

CGTase pure de *Bacillus circulans* E 192 en solution (1 U/ml) dans un tampon Tris-HCl 10 mM, CaCl₂ 10 mM, NaN₃ 0,02 % (p/v).

2- Méthode.

Les deux activités (CGTase *B. circulans* 0,1 U/ml ou surnageant de *K. pneumoniae* dilué au 10^{ème} dans l'incubat) sont séparément incubées 15 heures à 50°C dans 500 µl d'un tampon Tris-HCl 90 mM pH 7,0 en présence d' α - ou β - ou γ -CD (ALDRICH) à 1 % (p/v) et de salicine 80 mM. Des témoins sans enzyme sont également incubés.

La réaction est ensuite arrêtée par addition de 40 µl d'ammoniaque à 28 % (v/v) et les produits sont analysés par CCM. La présence ou l'absence de produits de transfert sur salicine est plus particulièrement contrôlée.

III-E- Influences comparées de l'hélicine sur l'activité pseudo-dextrinifiante de la CGTase et sur l'activité dextrinifiante d'une α -amylase.

1- Principe.

L'activité dextrinifiante relative est comparée pour la CGTase de *B. circulans* et l' α -amylase de *B. subtilis* en présence de concentrations croissantes en accepteur. L'accepteur utilisé est un β -D-glucoside : l'hélicine.

Les quantités respectives de chaque enzyme sont choisies de sorte à produire la même vitesse de dextrinification de l'amidon sans addition d'hélicine.

2- Méthode.

La CGTase (*B. circulans* E 192) et l' α -amylase (*B. subtilis*, CALBIOCHEM[®]) sont incubées respectivement à 0,066 et 0,025 μ g/ml, en présence de 0 - 2,5 - 5 - 7,5 - 10 - 15 mM d'hélicine et des autres constituants présents lors du dosage de l'activité dextrinifiante par le Phadebas[®] amylase test. Les vitesses de dextrinification sont ramenées à un pourcentage d'activité dextrinifiante résiduelle par rapport à la vitesse mesurée sans accepteur.

III-F- Action disproportionnante de l'enzyme sur les PNP-maltooligosaccharides en présence ou non d'accepteur exogène.

1- Principe.

Les produits résultants de l'action de l'enzyme sur différents substrats sont analysés par CCM. Les substrats testés sont :

- un accepteur seul : le pNP-G₁ (KNOCH-LIGHT LABORATORIES LTD) ou p-Nitrophenyl- α -D-glucopyranoside;
- le pNP-G₇ (KNOCH-LIGHT LABORATORIES LTD) ou p-Nitrophenyl- α -D-maltoheptaoside;
- le pNP-G₇-bloqué : blocage de l'extrémité non-réductrice entre les hydroxyles 4 et 6 du dernier résidu (4, 6-benzylidène-p-Nitrophenyl- α -D-maltoheptaoside), généreusement offert par le Dr DUPUY (BIO MERIEUX).

Les pNP- G₇ et G₇-bloqué sont testés en présence et en absence d'accepteur (pNP-G₁), afin d'évaluer le caractère nécessaire ou facultatif de l'accepteur exogène pour leur transformation.

2- Méthode.

Les différents incubats (volume final : 100 μ l) sont préparés dans des tubes Eppendorf immergés dans un bain d'eau glacée.

La CGTase est apportée lors d'une ultime étape par addition de 10 μ l d'une solution pure à 1 U/ml dans un tampon Tris-HCl 10 mM pH 7,5, CaCl₂ 10 mM. Pour les témoins sans enzyme, seuls 10 μ l de tampon sont ajoutés.

Les concentrations finales dans les différents incubats sont les suivantes :

- enzyme 0 ou 0,1 U/ml.
- chaque substrat 0 ou 20 mM.
- Tampon Tris-HCl 90 mM pH 7,0, CaCl₂ 1 mM.

Sitôt l'addition de CGTase (ou de tampon) effectuée, les incubats homogénéisés sont placés 10 minutes à 50°C, puis immédiatement replacés dans le bain d'eau glacée et dilués au 1/3.

Les dépôts sont aussitôt effectués pour analyse en CCM.

III-G- Influence de deux types d'effecteurs du site actif (salicine et acarbose).

Deux inhibiteurs "type" ont été comparés dans cette étude.

1- un β -D-glucoside accepteur dans la réaction de transglucosylation : la salicine (ALDRICH), équivalent de l'hélicine dont la fonction aldéhyde salicylique est réduite en alcool salicylique.

2- Un pseudo-saccharide analogue du maltotétraose et inhibiteur compétitif des α -glucohydrolases: l'acarbose, généreusement offert par les Drs E.MÖLLER & M.MARDIN (BAYER AG).

1- Caractérisation en CCM de l'action des effecteurs sur la réactivité enzymatique.

1-a- Principe.

Cette étude permet de visualiser :

- 1- si l'inhibiteur testé seul est un substrat pour la CGTase;
- 2- l'influence de l'inhibiteur sur le type de produit obtenu par action de la CGTase sur son substrat (l'amidon soluble);
- 3- l'influence de l'inhibiteur sur le type de produit obtenu par action de la CGTase sur β -CD.

1-b- Méthode.

On réalise différents incubats de 200 μ l dans un tampon Tris-HCl 90 mM pH 7,0, CaCl₂ 2,5 mM. Les concentrations finales utilisées dans ces incubats sont les suivantes :

- CGTase 0 ou 0,1 U/ml;
- substrat : amidon soluble (MERCK) 0 ou 0,5 % (p/v),
ou β -CD (ROQUETTE) 0 ou 0,5 % (p/v);

- inhibiteur : salicine 0 ou 60 mM,
ou acarbose 0 ou 5 mM.

Les incubats (200 μ l) sont placés 6 heures à 50°C, puis la réaction est stoppée par addition de 20 μ l d'ammoniaque à 28 % (v/v).

Les dépôts sont alors effectués pour l'analyse en CCM.

2- Effets comparés des effecteurs sur les activités cyclisante et pseudo-dextrinifiante de l'enzyme.

Les activités cyclisante et pseudo-dextrinifiante relatives sont mesurées en présence de différentes concentrations en inhibiteur, d'amidon soluble à 0,75 % (p/v) et de CGTase 0,1 U/ml, dans un tampon Tris-HCl 90 mM pH 7,0, CaCl₂ 2,5 mM. (concentrations finales des incubats).

Le volume final des incubats dépend de la méthodologie utilisée : 1 ml pour le dosage de l'activité cyclisante, et 2 ml pour le dosage de l'activité pseudo-dextrinifiante par la méthode à l'iode.

Les concentrations finales des deux inhibiteurs dans les incubats sont les suivantes :

l'acarbose est testé à 0 - 0,25 - 0,5 - 0,75 - 1 μ M,
la salicine est testée à 0 - 20 - 40 - 60 - 80 mM.

Les incubats sont placés à 50°C et les activités sont mesurées comme à l'accoutumée.

3- Détermination des types d'inhibition et des constantes d'inhibition (K_i) de l'activité cyclisante.

Les paramètres cinétiques (K_M et V_{max}) de la CGTase sont déterminés en présence:

1) d'acarbose 0 - 1 - 2 - 4 μM ,

2) de salicine 0 - 5 - 10 - 20 mM,

(concentrations dans l'incubat) suivant la méthodologie décrite p.64.

Les variations de K_M et/ou de V_{max} pour chaque concentration en inhibiteur sont étudiées afin de déterminer le type d'inhibition et de calculer le K_i en conséquence. Le K_i correspond à la moyenne des K_i obtenus pour chaque concentration en inhibiteur.

4- Influence de l'acarbose sur l'affinité de l'enzyme pour l'amidon cru de maïs.

La CGTase pure (60 $\mu\text{g/ml}$) est incubée dans 1 ml en présence de concentrations croissantes en acarbose (0 - 0,5 - 1 - 2 - 5 mM) et de 50 mg d'amidon cru de maïs dans un tampon Tris-HCl 80 mM pH 7,0, CaCl_2 1 mM. Un témoin CGTase seule est également préparé pour servir de référence au dosage. Les incubats sont placés 1 nuit à 4°C sous agitation douce ("roller"), puis centrifugés 15 minutes à 2500 g. La concentration en protéine libre (F) est alors dosée dans les surnageants convenablement dilués dans le tampon. La non-interférence de l'acarbose dans le dosage est préalablement vérifiée.

La concentration en CGTase liée (B) correspond à la différence entre CGTase totale (60 $\mu\text{g/ml}$) et la CGTase libre (F). La fixation est exprimée en % de B par rapport à l'essai sans acarbose.

En portant graphiquement

$$\% B = f(\text{mM acarbose}),$$

il est possible de déterminer la concentration en acarbose (I_{50}) nécessaire à 50 % d'inhibition de la fixation.

IV- TECHNIQUES RELATIVES A LA MODIFICATION CHIMIQUE DES ACIDES AMINES ET DE LA REACTIVITE DE L'ENZYME.

IV-A- Etude de l'influence de l'oxydation des résidus tryptophanyles de l'enzyme par la N-bromosuccinimide (NBS).

Cette étude est rendue délicate par le fait que le traitement de l'enzyme par la NBS entraîne une précipitation de la protéine proportionnellement à la quantité de NBS utilisée. Aussi, les mesures décrites ci-dessous sont-elles réalisées sur l'enzyme restant encore en solution.

1- Conditions générales d'oxydation des résidus tryptophanyles de l'enzyme par la NBS.

1-a- Principe.

La NBS fut initialement utilisée pour réaliser la coupure sélective de la chaîne peptidique après un résidu tryptophanyle (PATCHORNIK et al., 1958). Après oxydation de l'indole en oxyindole, un réarrangement moléculaire aboutit au clivage de la liaison peptidique. Cependant, la mise en oeuvre de conditions plus douces (2 à 4 moles de NBS pour 1 mole de Trp) permet d'arrêter la réaction à l'étape d'oxydation.

L'oxydation est généralement pratiquée à des pH acides (pH 4,0) et l'estimation du nombre de tryptophanes résiduels peut être déterminée spectrophotométriquement à 280 nm (SPANDE & WITKOP, 1967).

Enfin, SCHMIR & COHEN (1961) montrent que des réactions secondaires peuvent apparaître : oxydation des résidus Tyrosyles et, dans une moindre mesure, histidyles. L'oxydation du tryptophane reste cependant la réaction principale.

1-b- Méthode.

Les incubats (1 ml) sont composés de la manière suivante : CGTase pure 0,6 mg/ml en présence de NBS (FLUKA) 0 à 200 μM , dans un tampon acétate de sodium 80 mM pH 6,2, CaCl_2 1 mM (la NBS est apportée sous forme de 100 μl d'une solution aqueuse fraîchement préparée 10 fois concentrée, dans le préincubats de 900 μl). Dans le cas d'une modification en présence d'effecteurs (salicine ou acarbose), ceux-ci sont présents à 5 mM dans l'incubat final et ont été préalablement apportés dans le préincubat.

La réaction se déroule pendant une heure à température ambiante.

2- Effet de l'oxydation par la NBS sur la solubilité de l'enzyme, son activité résiduelle, et son affinité résiduelle pour l'amidon cru de maïs ou pour le copolymère de $\beta\text{-CD}$.

La CGTase (0,6 mg/ml) est traitée par des concentrations croissantes en NBS : 0 - 25 - 50 - 100 - 150 - 200 μM . On réalise ensuite trois séries comprenant chacune les six échantillons traités, dilués au $10^{\text{ème}}$ dans 1 ml de tampon Tris-HCl 90 mM pH 7,0 (valeurs finales).

Dans une série, 50 mg d'amidon cru de maïs (ROQUETTE) sont également présents dans chaque tube; cette série servira à mesurer l'influence de la modification des tryptophanes de l'enzyme sur son affinité vis-à-vis de l'amidon cru.

Dans la seconde série, il s'agit de 10 mg du copolymère de $\beta\text{-CD}$ afin de tester une éventuelle modification de l'affinité pour cette matrice.

La troisième série permet de mesurer la quantité d'enzyme soluble (S) pour chaque concentration en NBS utilisée, ainsi que son activité spécifique résiduelle.

Les 18 tubes sont placés une nuit (14 heures) à 4°C sous agitation douce ("roller"), puis sont centrifugés 15 minutes sous

2500 g. Les protéines sont alors dosées dans tous les surnageants convenablement dilués, ainsi que l'activité cyclisante dans les surnageants de la série n°3.

Pour les séries n°1 et 2, l'affinité résiduelle est exprimée en % d'enzyme liée par rapport à l'essai sans NBS. Pour chaque concentration en NBS testée, la concentration en enzyme liée correspond à la différence entre les concentrations en enzyme soluble (déterminée dans la série n°3) et en enzyme libre (déterminée dans les séries n°1 ou 2).

3- Influence des effecteurs (salicine et/ou acarbose) lors de l'action de la NBS sur l'enzyme.

L'enzyme (0,6 mg/ml) est traitée par la NBS 100 μ M en présence ou non de salicine et/ou d'acarbose 5 mM (quatre combinaisons : enzyme seule, avec salicine, avec acarbose, avec les deux). Des témoins non traités par la NBS sont également réalisés.

On prépare alors deux séries comprenant chacune les 8 échantillons dilués au 10^{ème} dans 1 ml de tampon Tris-HCl 90 mM pH 7,0 (valeurs finales). Pour l'une des deux séries, chaque tube renferme également 50 mg d'amidon cru de maïs (ROQUETTE), afin de tester l'affinité résiduelle de l'enzyme pour cette matrice. L'autre série permet de tester la quantité d'enzyme qui n'a pas précipitée.

La méthodologie est donc la même que pour l'expérience précédente, ainsi que la détermination de la concentration en enzyme fixée.

IV-B- Etude de l'influence de la nitration des résidus tyrosyles de l'enzyme par le tétranitrométhane (TNM).

1- Principe.

Le TNM est un réactif de nitration des phénols, introduit par SOKOLOVSKY et al. (1966) dans l'étude des protéines. Lorsqu'il est utilisé à pH 8,0, il est hautement spécifique des résidus tyrosyles. Dans ces conditions, le produit de la réaction est une 3-nitrotyrosine. Celle-ci présente une absorbance particulière à 428 nm permettant de quantifier la réaction. A pH 4,0, les cystéines sont également nitrées.

Enfin, lorsque le TNM est utilisé à des concentrations trop importantes, d'autres résidus (His, Trp, ou Met) peuvent réagir (RIORDAN & VALLEE, 1972).

2- Cinétiques de nitration de l'enzyme par le TNM 20 mM en présence ou non des effecteurs (salicine et/ou acarbose).

L'enzyme (1 mg/ml) est incubée à température ambiante dans 1 ml en présence de TNM (ALDRICH) 20 mM (apporté par 20 μ l d'une solution éthanolique de TNM 1 M) dans un tampon Tris-HCl 35 mM pH 8,0, CaCl₂ 1 mM. Les effecteurs (salicine ou acarbose) sont absents ou présents à 5 mM. Dans ce cas, le TNM n'est ajouté qu'après 5 minutes de préincubation de l'enzyme avec les effecteurs. Pour chaque incubat, un témoin sans TNM est également préparé (addition de 20 μ l d'éthanol uniquement). Deux fois quatre incubats peuvent ainsi être préparés : enzyme seule; avec salicine; avec acarbose; avec les deux (une seule de ces quatre conditions est envisagée par expérience).

Des prélèvements de 200 μ l sont effectués à différents temps de la réaction (entre 30 et 500 minutes) et sont immédiatement dessalés par gel filtration sur une colonne (0,5 x 20 cm) de Fractogel[®] TSK HW 40 S (MERCK) dans un tampon Tris-HCl 10 mM pH 7,5, CaCl₂ 10 mM, NaN₃ 0,02 % (p/v) à un débit de 0,5 ml/min.,

afin de stopper la réaction. 200 µl du témoin sont injectés de la même façon en dernier lieu et correspondront au temps zéro de nitration.

1 ml des différents prélèvements d'enzyme dessalée est récupéré et chromatographié par affinité sur le copolymère de β-CD comme décrit plus haut (Cf. p.63).

Les fractions d'enzyme nitrée retenue (FR) et non retenue (FNR) sur le copolymère sont récupérées au maximum des pics. L'intégration des pics permet d'évaluer le pourcentage de fraction non retenue apparaissant :

$$\% \text{ FNR} = \frac{\text{FNR}}{\text{FR} + \text{FNR}} \times 100$$

et les éventuels décalages à l'élution de la FR par le gradient de β-cyclodextrine sont vérifiés.

Pour chaque fraction, la concentration en protéines est déterminée et l'échantillon est ramené (si possible) à 10 µg/ml dans le tampon d'équilibrage. Dans ce cas, le pourcentage d'activité résiduelle (cyclisation) est déterminé en utilisant l'amidon soluble à 2 % (p/v) comme substrat. Le 100 % correspond toujours à la fraction retenue obtenue au temps zéro de nitration. Les vitesses résiduelles relatives de dextrinification sont également mesurées à partir de ces échantillons. Enfin, les paramètres cinétiques (K_M et V_{max}) sont définis.

3- Etude de la nitration de l'enzyme par des concentrations croissantes en TNM.

3-a- Préparation des échantillons d'enzyme nitrée.

Sept incubats de nitration sont préparés comme dans l'expérience précédente, sans effecteur, à des concentrations croissantes en TNM de 0 - 0,25 - 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8 mM. Dans tous les cas, le TNM est apporté par addition de 10 µl d'une solution

éthanolique de TNM cent fois concentrée.

Après 18 heures d'incubation à température ambiante, la réaction est stoppée par dessalage de l'incubat (1 ml) sur une colonne (2,2 × 30 cm) de Fractogel[®] TSK HW 40 S (MERCK) dans un tampon Tris-HCl 10 mM pH 7,5, CaCl₂ 10 mM, NaN₃ 0,02 % (p/v), à un débit de 1 ml/min..

2 ml de chaque échantillon nitré et dessalé sont alors chromatographiés par affinité sur le copolymère de β-CD puis récupérés comme décrit précédemment, et les profils chromatographiques sont analysés de la même façon.

3-b- Analyse des échantillons d'enzyme nitrée.

Après dosage des protéines, les activités résiduelles sont mesurées sur amidon soluble à 2 % (p/v) pour les différents échantillons ramenés à 10 µg/ml dans un tampon Tris-HCl 10 mM pH 7,5, CaCl₂ 10 mM, NaN₃ 0,02 % (p/v).

3-c- Détermination du nombre de résidus 3-Nitrotyrosyles.

La concentration en résidus 3-Nitrotyrosyles est déterminée photométriquement selon SOKOLOVSKY & RIORDAN (1966) par mesure de l'absorbance à 428 nm, en milieu alcalin, de la protéine nitrée, en utilisant un coefficient d'extinction molaire de 4200 M⁻¹cm⁻¹.

1 ml de chaque échantillon est ramené à pH voisin de 9 par addition de 5 µl d'ammoniaque à 28 % (v/v). L'absorbance à 428 nm est alors mesurée sur 1 cm de chemin optique. Le nombre (n) de résidus 3-Nitrotyrosyles est calculé de la manière suivante :

$$n = A_{428} \times \frac{MM}{\epsilon_{428} \times c} ,$$

avec MM = poids moléculaire de l'enzyme (en Da),
 $\epsilon_{428} = 4200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$,
 c = concentration de la protéine (en g/l).

3-d- Analyse spectrofluorimétrique des échantillons d'enzyme nitrée.

Les différents échantillons ramenés à 50 $\mu\text{g/ml}$ dans un tampon Tris-HCl 10 mM pH 7,5, CaCl_2 10 mM, NaN_3 0,02 % (p/v) sont analysés par fluorimétrie dans des cuves en quartz de 1 cm de chemin optique à l'aide d'un spectrofluorimètre (PERKIN-ELMER LS-5B). Les fentes sont de 2,5 nm à l'excitation comme à l'émission. La fluorescence des résidus tryptophanyles après excitation à 295 nm est mesurée entre 300 et 400 nm. La fluorescence des résidus tyrosyles et tryptophanyles après excitation à 273 nm est mesurée entre 280 et 400 nm. Enfin, la fluorescence du tryptophane est également mesurée pour une gamme de L-tryptophane 0 - 5 - 10 - 15 - 20 μM en solution dans le tampon.

3-e- Analyse par dichroïsme circulaire des échantillons d'enzyme nitrée.

Les échantillons ramenés à 50 $\mu\text{g/ml}$ pour l'analyse fluorimétrique, et correspondant à la nitration par le TNM 0 ou 8 mM, sont analysés par dichroïsme circulaire à l'aide d'un dichrographe JOBIN-YVON Mark III, équipé d'une chambre de mesure placée sous courant d'azote.

Les échantillons sont analysés dans une cuve en quartz de 0,1 cm de chemin optique. Les spectres sont mémorisés sous la forme de 2 mesures tous les 2 nm. Un spectre correspondant au tampon seul est également mémorisé. Les spectres définitifs sont obtenus en soustrayant le spectre du tampon aux différents enregistrements, puis en lissant le spectre différentiel obtenu.

Pour chaque échantillon, la structure secondaire de la protéine (repliement de la chaîne polypeptidique) ne peut être analysée qu'entre 210 et 250 nm, car les mesures aux longueurs d'ondes inférieures se sont avérées irréalisables (absorbance du Tris et du calcium).

L'environnement conformationnel des résidus tryptophanyles est également analysé, entre 240 et 330 nm, en utilisant une sensibilité plus importante.

4- Etude de l'effet protecteur des effecteurs (salicine et/ou acarbose) lors de la nitration de l'enzyme.

4-a- Préparation et analyse des échantillons d'enzyme nitrée.

Les incubats sont préparés comme pour l'étude cinétique de la nitration (Cf. p.76) mais en présence de TNM 4 mM au lieu de 20 mM.

Après 18 heure d'incubation, les échantillons d'enzyme nitrée sont obtenus et analysés de la même façon que dans l'expérience précédente (Cf. p.78), mais seules les fractions retenues sur le copolymère de β -CD sont dosées (protéines - activité résiduelle - nombre de résidus 3-Nitrotyrosyles).

4-b- Analyse spectrofluorimétrique de l'enzyme nitrée en présence ou non d'acarbose.

Les échantillons d'enzyme ramenés à 10 μ g/ml dans un tampon Tris-HCl 10 mM pH 7,5, CaCl_2 10 mM, NaN_3 0,02 % (p/v) après nitration en présence ou non d'acarbose puis dessalage et chromatographie d'affinité sont analysés en fluorescence comme dans l'expérience précédente (Cf. p.79). Seule la fluorescence des résidus tryptophanyles est étudiée et les fentes sont de 10 nm à l'excitation comme à l'émission.

IV-C- Etude de l'influence de l'éthoxyformylation des résidus histidyles de l'enzyme par le diéthylpyrocarbonate (DEP).

1- Conditions générales d'éthoxyformylation.

1-a- Principe.

Le diéthylpyrocarbonate (ou anhydre éthoxyformique) réagit avec l'imidazole des résidus histidyles pour donner un dérivé N-carbéthoxy-histidyle (ou éthoxyformyl-histidyle). A pH 6,0, sa spécificité pour les résidus histidyles serait totale (OVADI et al., 1967). Cette réaction peut être suivie photométriquement car le chromophore d'éthoxyformyl-histidine absorbe à 240 nm.

Enfin, il faut rappeler que le dérivé d'éthoxyformyl-histidine est peu stable : sa demi-vie est de 55 h à pH 7,0, et 25°C (MELCHIOR & FAHRNEY, 1970).

1-b- Méthode.

5 μ l d'une solution éthanolique anhydre et fraîchement préparée de DEP (FLUKA) 100 fois concentrée sont ajoutés à la solution d'enzyme pure préincubée 5 minutes à 30°C (volume final : 500 μ l). Le mélange final renferme un tampon phosphate de potassium 80 mM pH 6,2, du Tris 1 mM, du CaCl₂ 1 mM, et de l'éthanol à 1 % (v/v). L'enzyme est présente à 1,12 mg/ml. Les effecteurs sont éventuellement présents aux concentrations suivantes : 5 mM pour la salicine, l'acarbose ou la β -CD (ROQUETTE), et 10 % (p/v) pour le glucose (JANSSEN) ou le Glucidex 12[®]. Dans ce cas, ils sont préalablement préincubés avec l'enzyme pendant 5 minutes à 30°C. Seuls 5 μ l d'éthanol absolu sont ajoutés dans le mélange témoin.

La réaction s'effectue 30 minutes à 30°C de manière à modifier toutes les histidines réactives.

2- Etude cinétique des variations d'activité enzymatique lors de l'éthoxyformylation.

Des prélèvements de 50 μ l sont effectués toutes les minutes dans un incubat réactionnel (DEP 2,5 mM, 20°C), et immédiatement dilués 20 fois dans une solution de L-Histidine (FLUKA) 20 mM pH 7,0, de manière à stopper la réaction. Un prélèvement est également effectué dans l'incubat témoin afin de servir de référence au temps zéro. Après une nouvelle dilution au 10^{ème} dans un tampon Tris-HCl 10 mM pH 7,5, CaCl₂ 10 mM, l'activité cyclisante résiduelle est mesurée, ainsi que les vitesses relatives de dextrinification.

3- Comparaison des paramètres cinétiques (K_M et V_{max}) de l'enzyme native et modifiée.

Des prélèvements de 100 μ l sont effectués dans l'incubat réactionnel (DEP 1 mM, 20°C) ou témoin, à des temps appropriés, et sont immédiatement dilués 10 fois dans une solution de L-Histidine 20 mM pH 7,0, de manière à stopper la réaction.

Les 1 ml résultants sont alors chromatographiés par affinité sur le copolymère de β -CD comme décrit précédemment (Cf. p.63).

Les fractions d'enzyme (native ou modifiée) retenue sur le copolymère sont récupérées. Les éventuels décalages à l'élution de la FR par le gradient de β -cyclodextrine sont vérifiés.

Ces fractions sont enfin dessalées dans un tampon Tris-HCl 10 mM pH 7,5, CaCl₂ 10 mM, NaN₃ 0,02 % (p/v) à l'aide d'une colonne PD10 (PHARMACIA-LKB) afin d'éliminer les β -CD provenant du gradient d'élution de l'étape d'affinité. Les fractions exclues contenant la plus grande quantité d'enzyme native ou modifiée sont alors ramenées à 10 μ g/ml dans le même tampon après dosage des protéines.

Les paramètres cinétiques (K_M et V_{max}) sont alors mesurés et

comparés.

4- Traitement à l'hydroxylamine de l'enzyme modifiée.

Selon MELCHIOR & FAHRNEY (1970), l'implication directe de résidu(s) histidyle(s) essentiel(s) est vérifiée par traitement à l'hydroxylamine de l'enzyme inactivée au DEP (restitution des résidus histidyles par élimination douce du substituant éthoxyformyle).

A 450 μ l d'incubat DEP ou témoin sont ajoutés 50 μ l d'une solution d'hydroxylamine (JANSSEN) 4,4 M neutralisée à pH 7,0 par l'ammoniaque. Les mélanges sont placés une nuit (14 heures) à 4°C avant de doser l'activité résiduelle.

5- Détermination du nombre de résidus éthoxyformyl-histidyles.

Pour mesurer le nombre de résidus histidyles éthoxyformylés, l'augmentation de l'absorbance de la protéine est suivie photométriquement à 240 nm, comme décrit par OVADI et al. (1967), mais en utilisant un coefficient d'extinction molaire approprié.

5-a- Procédure générale.

Les conditions d'éthoxyformylation sont les mêmes que celles décrites p.81 mais la réaction prend place dans une cuve en quartz de 2 mm de chemin optique. La solution de référence est préparée comme le mélange témoin.

Après addition du DEP, la cuve de lecture est rapidement agitée quatre fois puis replacée dans le spectrophotomètre thermostaté à 30°C (SHIMADZU MPS 2000). L'augmentation différentielle de l'absorbance à 240 nm (0,1 AUFS) est alors mesurée en fonction du temps, avec une fente de 5 nm.

Afin d'éliminer l'absorbance du DEP suivie de sa dégradation dans le tampon, une ligne de base sans enzyme est toujours impérativement tracée, puis retranchée du profil obtenu avec enzyme. (A titre indicatif, le temps de vie du DEP est significativement rallongé lorsque le solvant contient de la β -CD.)

Le nombre n de résidus d'éthoxyformyl-histidyles obtenu après 30 minutes de réaction est calculé comme suit.

$$n = \Delta A_{240 \text{ nm}}^{30 \text{ min.}} \times \frac{MM}{0,2 \times \epsilon_{240} \times c} \quad , \text{ avec :}$$

$\Delta A_{240 \text{ nm}}^{30 \text{ min.}} = (\delta A_{240} \text{ (enz.)} - \delta A_{240} \text{ (ligne de base)})$ après 30 min.

0,2 = chemin optique (en cm)

ϵ_{240} = coefficient d'extinction molaire approprié, à 240 nm
(en $M^{-1}cm^{-1}$)

c = concentration pondérale en enzyme (en g/l)

MM = poids moléculaire de l'enzyme (en Da).

5-b- Détermination des coefficients d'extinction molaire appropriés.

Comme décrit par ROOSEMONT (1978), le coefficient d'extinction molaire à 240 nm du chromophore d'éthoxyformyl-imidazole dépend de la concentration en DEP surtout si celui-ci est utilisé en larges excès. Cette augmentation d'absorptivité, due à la formation de dérivés N,N'-dicarbéthoxylés, ne permet pas l'utilisation systématique du coefficient classique de $3200 M^{-1}cm^{-1}$ dans notre étude.

Aussi, un coefficient d'extinction molaire approprié doit être mesuré pour chaque concentration en DEP utilisée (et chaque tampon) en testant un échantillon de L-Histidine (FLUKA) dans les mêmes conditions que celles décrites pour l'enzyme.

6- Etude de l'effet protecteur des effecteurs (salicine et /ou acarbose) lors de l'éthoxyformylation.

Après 30 minutes de réaction avec le DEP 5 mM (avec ou sans effecteurs), 250 μ l de chaque incubat sont dessalés dans un tampon phosphate de potassium 100 mM pH 6,5 à l'aide d'une colonne PD10 (PHARMACIA-LKB) de manière à éliminer le DEP et les effecteurs. L'activité spécifique des fractions exclues est alors dosée et comparée à un témoin sans DEP incubé et dessalé dans les mêmes conditions.

V- ANALYSE COMPARATIVE PAR DICHROISME CIRCULAIRE DES STRUCTURES SECONDAIRES DE L'ENZYME EN PRESENCE DES EFFECTEURS (SALICINE ET/OU ACARBOSE).

L'enzyme pure (0,6 mg/ml) est incubée à température ambiante en présence de salicine et/ou d'acarbose (0 ou 5 mM) dans un tampon acétate de sodium 70 mM pH 6,2 (CaCl_2 et Tris, 1 mM résiduels). Des témoins sans enzyme sont également préparés, ainsi qu'un témoin tampon seul.

Les échantillons sont ensuite dilués au demi dans l'eau (forte absorbance de la salicine dans la région 200 nm) juste avant d'être analysés par dichroïsme circulaire à l'aide d'un dichrographe JOBIN-YVON Mark III, équipé d'une chambre de mesure placée sous courant d'azote.

Les échantillons sont analysés dans une cuve en quartz de 0,01 cm de chemin optique. Les spectres sont mémorisés sous la forme de 2 mesures tous les 2 nm. Les spectres définitifs sont obtenus en soustrayant les spectres des témoins sans enzyme aux différents enregistrements avec enzyme, puis en lissant le spectre différentiel obtenu. Enfin, les spectres des effecteurs seuls sont obtenus de la même manière en soustrayant le spectre du tampon aux différents spectres des témoins sans enzyme.

Pour chaque échantillon, la structure secondaire de la protéine (repliement de la chaîne polypeptidique) ne peut être analysée qu'entre 200 et 250 nm, car les mesures aux longueurs d'ondes inférieures se sont avérées irréalisables (absorbance de la salicine et de l'acétate).

RESULTATS

I- PURIFICATION DE L'ENZYME PAR UN NOUVEAU PROCÉDE RAPIDE UTILISANT LA CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR COPOLYMERE DE β -CD RETICULE PAR L'EPICHLORHYDRINE.

I-A- Préparation et capacité du copolymère de β -CD.

A partir de 50 g de β -CD, 60 g de copolymère sec ont été obtenus avec un rendement pondéral de 55 %.

La capacité de la matrice est de 750 U/g (1,6 mg d'enzyme pure par ml de gel) et sa granulométrie (mesurée sur tamis) est comprise entre 60 et 120 mesh. Le copolymère s'est avéré stable vis-à-vis de la chaleur ou du séchage, et mécaniquement très résistant.

Nous avons également pu disposer d'autres copolymères de β -CD, différents les uns des autres par leur degré de réticulation. Leur capacité varie considérablement, de 0 à 2500 U/g, illustrant l'existence d'une corrélation entre le degré de réticulation du copolymère et sa capacité. En effet, celle-ci augmente quand la réticulation diminue. Nous avons attribué ce fait à un phénomène d'exclusion (accessibilité des sites reconnus).

Enfin, 3 jours d'incubation de l'enzyme (3 U/ml dans 1 ml) à différentes températures en présence de 100 mg de copolymère n'ont pas entraîné l'apparition d'hexoses neutres dans le surnageant, suggérant qu'aucune digestion de la matrice n'a lieu.

I-B- Détermination de la constante de dissociation observée ($K_{d_{obs}}$) de l'enzyme sur le copolymère de β -CD.

Comme illustré par la figure 11^a (p.89), les mesures ont été effectuées dans la zone correspondant au début de la courbe de saturation, bien que des concentrations importantes en CGTase soient utilisées. Ce fait est dû à l'importante capacité de la

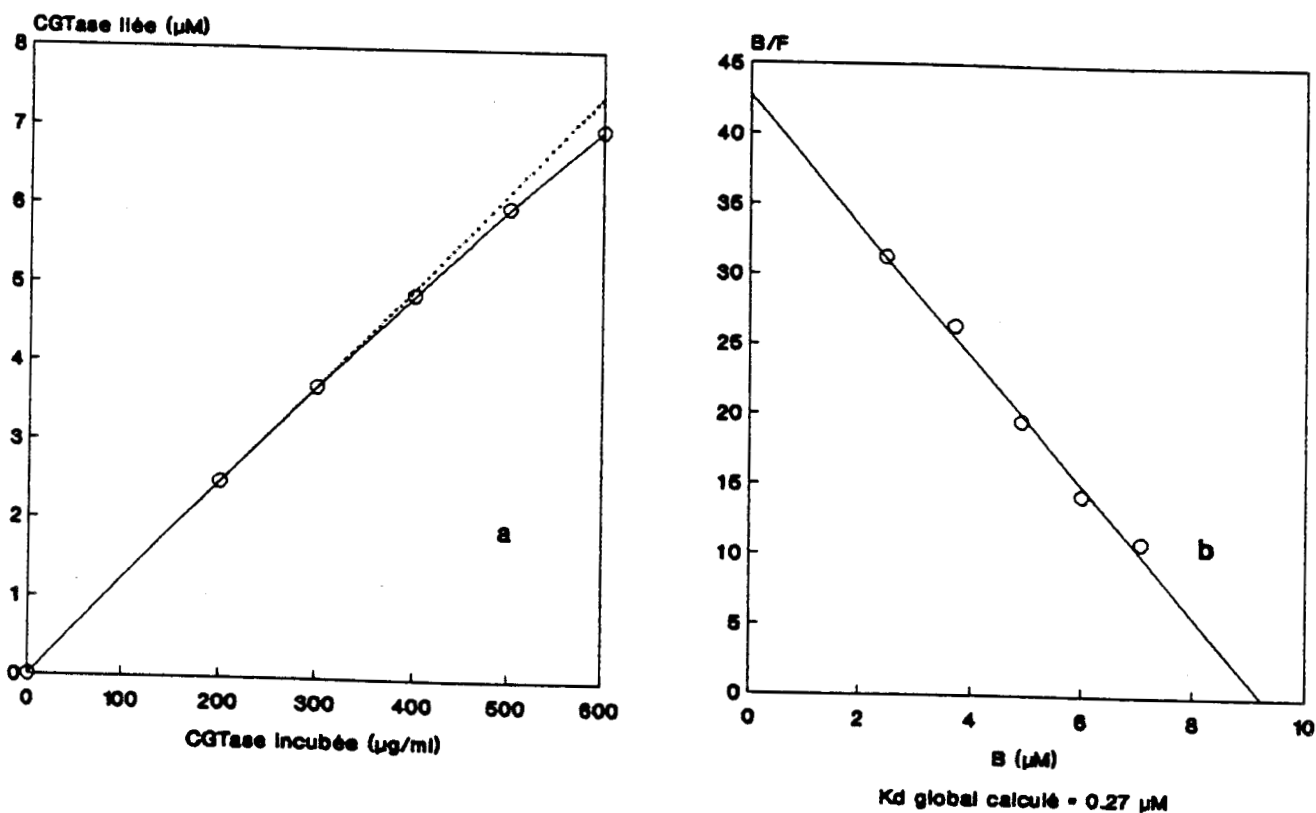


Figure n° 11.

Détermination de la constante de dissociation observée ($K_{d_{obs}}$) de l'enzyme sur le copolymère de β -CD.

a) Début de la courbe de saturation illustrant la zone des concentrations en CGTase utilisées pour la détermination.

b) Représentation de Scatchard.

B = CGTase liée (μM); F = CGTase libre (μM).

matrice (nombre de sites par quantité de copolymère). Ces mesures permettent néanmoins d'obtenir une droite par linéarisation de Scatchard (Fig. 11^b, p.89), dont l'inverse de la pente correspond à la constante de dissociation observée (Kd_{obs}) de l'enzyme sur le copolymère de β -CD :

$$Kd_{obs} = 0,27 \mu M.$$

Cette constante de dissociation englobe les interactions spécifiques ainsi que d'éventuelles interactions non-spécifiques, puisque la méthode utilisée ne permet pas de dissocier ces deux types d'interactions.

I-C- Préparation de l'extrait à chromatographier.

La CGTase contenue dans l'extrait brut ne s'est jamais fixée au copolymère de β -CD. De manière à définir le facteur limitant cette fixation, nous avons effectué un test de capacité pour l'enzyme contenue dans l'extrait brut différemment traité. La capacité a été ainsi mesurée pour l'extrait brut, pour son surnageant de précipitation Cétavlon[®]-EDTA, pour l'extrait brut dialysé (coupure à 3,5 kDa), pour le rétentat d'ultrafiltration (coupure à 10 kDa) de son surnageant de précipitation Cétavlon[®]-EDTA, et enfin, pour son culot de précipitation au sulfate d'ammonium (65 % de saturation) resolubilisé. Les hexoses neutres totaux ont été dosés dans chaque extrait respectivement à 116, 95, 38, 31, et 3 mM équivalents glucose.

Comme illustré par la figure 12 (p.91), il apparaît clairement que la faculté du copolymère à lier la CGTase dépend de la quantité d'hexose-équivalents contenue dans l'extrait enzymatique, et plus probablement de sa teneur en maltooligosaccharides et cyclomaltooligosaccharides, capables d'entrer en compétition avec les cyclodextrines immobilisées. Dans notre cas, la concentration critique avoisine les 35 mM équivalents glucose.

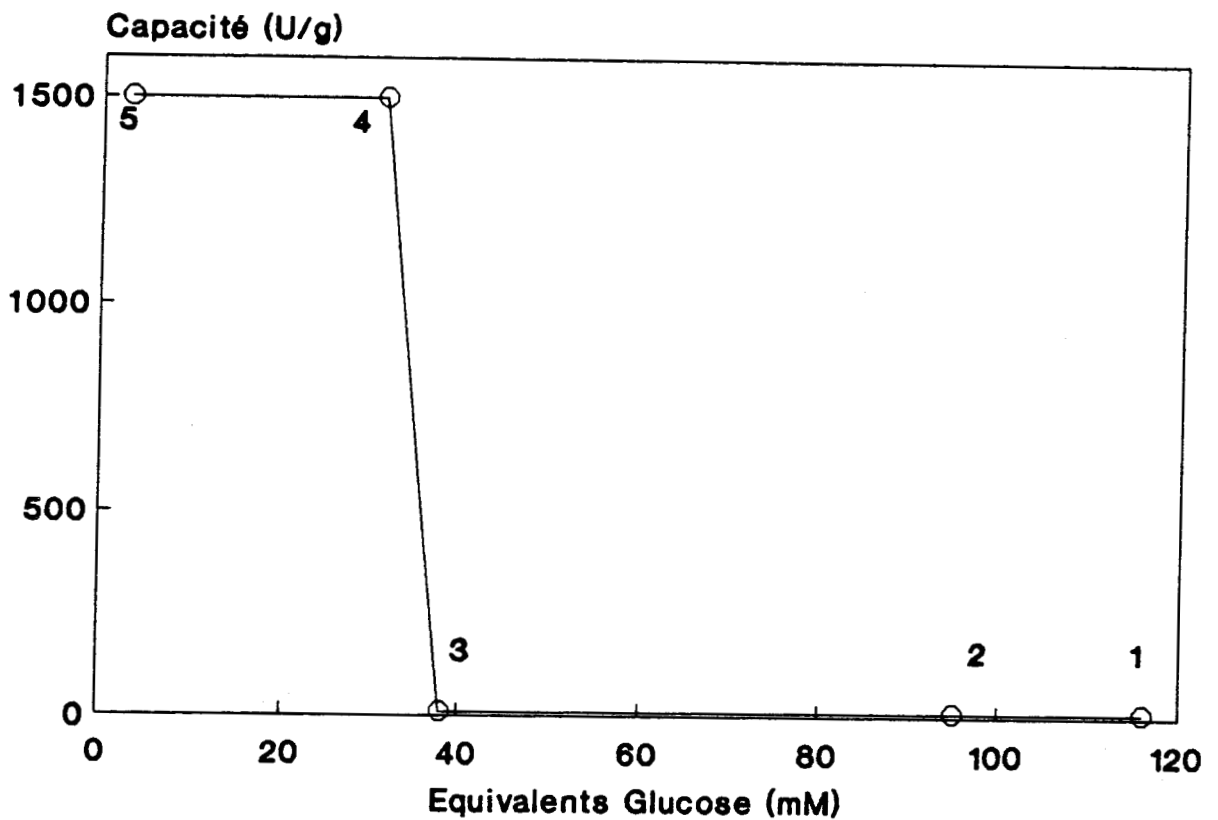


Figure n° 12.

Action des maltooligosaccharides contenus dans l'extrait enzymatique sur la fixation de l'enzyme au copolymère de β -CD.

1 = Extrait brut; 2 = surnageant de l'extrait brut précipité au Cétavlon[®]-EDTA; 3 = extrait brut dialysé à 3,5 kDa; 4 = rétentat d'ultrafiltration à 10 kDa de 2; 5 = culot resolubilisé de précipitation de l'extrait brut à 65 % de saturation en sulfate d'ammonium.

Ainsi, l'extrait brut précipité au sulfate d'ammonium puis resolubilisé (3 mM équivalents glucose) ou l'extrait brut traité au Cétavlon[®]-EDTA puis concentré par ultrafiltration (31 mM équivalents glucose) peuvent être chromatographiés sur le copolymère. Par contre, ni l'extrait brut dialysé à 3,5 kDa de seuil de coupure (38 mM équivalents glucose), ni l'extrait brut non traité (116 mM équivalents glucose) ne peuvent l'être.

I-D- Purification de l'enzyme sur le copolymère de β -CD.

Le bilan de purification de l'enzyme à partir d'un litre d'extrait partiellement purifié (extrait brut traité au Cétavlon[®]-EDTA puis concentré par ultrafiltration) est dressé dans le tableau IV (p.93).

La capacité totale de la colonne (37,5 kU) étant voisine de la quantité d'enzyme injectée (35 kU), nous retrouvons en général environ 10 % de l'activité injectée dans la fraction non retenue. Environ 20 % de l'enzyme retenue sur la matrice n'ont pas été récupérés lors de l'élution par la β -CD car ils présentent une vitesse de désorption lente (phénomène de traîne correspondant à l'enzyme fixée sur des sites peu accessibles du copolymère).

Les 70 % complémentaires (environ 200 mg de CGTase) sont élués sous la forme d'un pic unique et symétrique, par le tampon contenant la β -CD. Cinq répétitions de cette étape nous ont permis d'obtenir environ 1 g de CGTase pure (10 à 20 mg/ml) avec une activité spécifique de 115 ± 5 U/mg.

Les régénérations successives de la colonne par la soude 0,1 M, ou d'ultérieures utilisations en chromatographie préparative (11 réalisées au total) n'ont entraîné aucune diminution de capacité, suggérant qu'aucune dégradation chimique ou enzymatique de la matrice n'est intervenue au cours de son utilisation.

La figure 13 (p.94) illustre un chromatogramme typique de la purification de l'enzyme.

Tableau IV

Bilan de purification de l'enzyme à partir d'un litre d'extrait brut traité au Cétavlon[®]-EDTA (rétentat d'ultrafiltration du surnageant de précipitation) injecté sur 50 g de copolymère de β -CD.

Etape	Volume (ml)	Unités (U)	Protéines (mg)	U/mg	FP	Rendement (%)
Extrait cétavlon	1000	35000	2060	17	1	100
Fraction* affinité	92	24000	212	113	6,6	69

* : Concentrée et lavée par ultrafiltration.

FP: Facteur de purification.

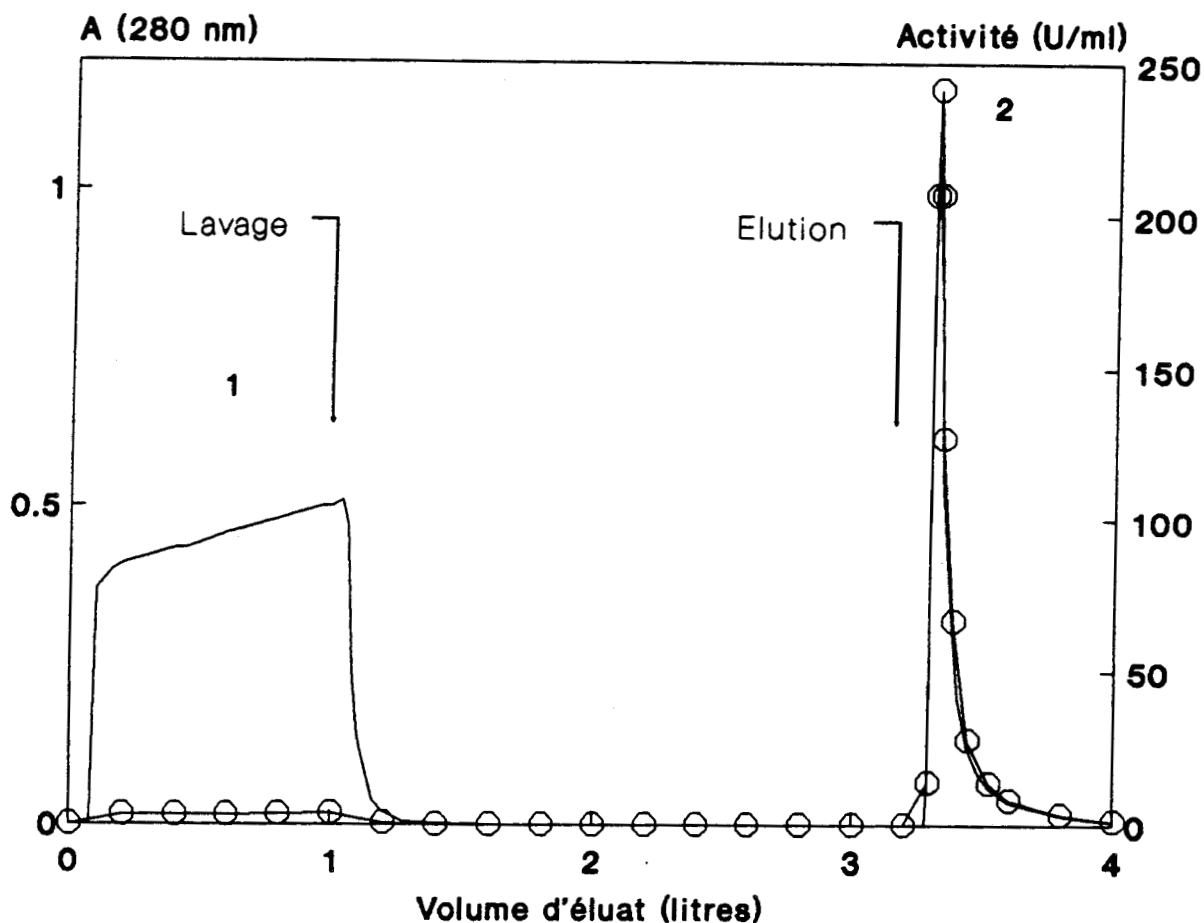


Figure n°13

Chromatographie sur 50 g de copolymère de β -CD d'un litre d'extrait enzymatique traité au Cétavlon®-EDTA (rétentat d'ultrafiltration du surnageant de précipitation).

(—) = Absorbance à 280 nm; (O—O) = activité cyclisante.

Pics : 1 = fraction non retenue; 2 = fraction retenue (CGTase).

I-E- Analyse (SDS-PAGE) des fractions de purification.

L'homogénéité de la CGTase obtenue après purification par chromatographie d'affinité sur le copolymère de β -CD est illustrée par la figure 14 (p.96).

I-F- Discussion.

C'est en comparant notre méthode avec celle de LASZLO et al. (1981), utilisant une cyclodextrine immobilisée sur Sépharose, que l'on peut dégager les intérêts qu'offre l'utilisation d'un copolymère de cyclodextrine comme matrice d'affinité pour purifier la CGTase de *Bacillus circulans* # E 192. En effet, si l'utilisation d'une β -CD immobilisée sur Sépharose 4-B nous a permis de purifier de faibles quantités d'enzyme (BOVETTO, 1988), nous avons rencontré de sérieuses difficultés pour une purification à grande échelle.

Par comparaison, les intérêts de notre méthode appliquée à la purification de l'enzyme sont les suivants :

- La préparation du copolymère ne dure qu'une journée au lieu de 4 à 5 jours.
- Le rendement pondéral de synthèse est supérieur : 55 % au lieu de 10 %.
- La capacité de fixation s'est avérée supérieure : 1,6 mg d'enzyme par ml de gel contre 0,3 mg/ml de gel.
- La méthode proposée permet de travailler à des débits élevés sans empêcher la fixation de l'enzyme.
- D'un point de vue mécanique, la matrice obtenue est beaucoup plus stable. Enfin, les phénomènes de tassage sont inexistantes.

La méthode proposée est donc plus adaptée à une purification à l'échelle industrielle d'une CGTase, de par sa simplicité, sa rapidité, et l'utilisation d'une matrice peu onéreuse, durable et de bonne capacité.

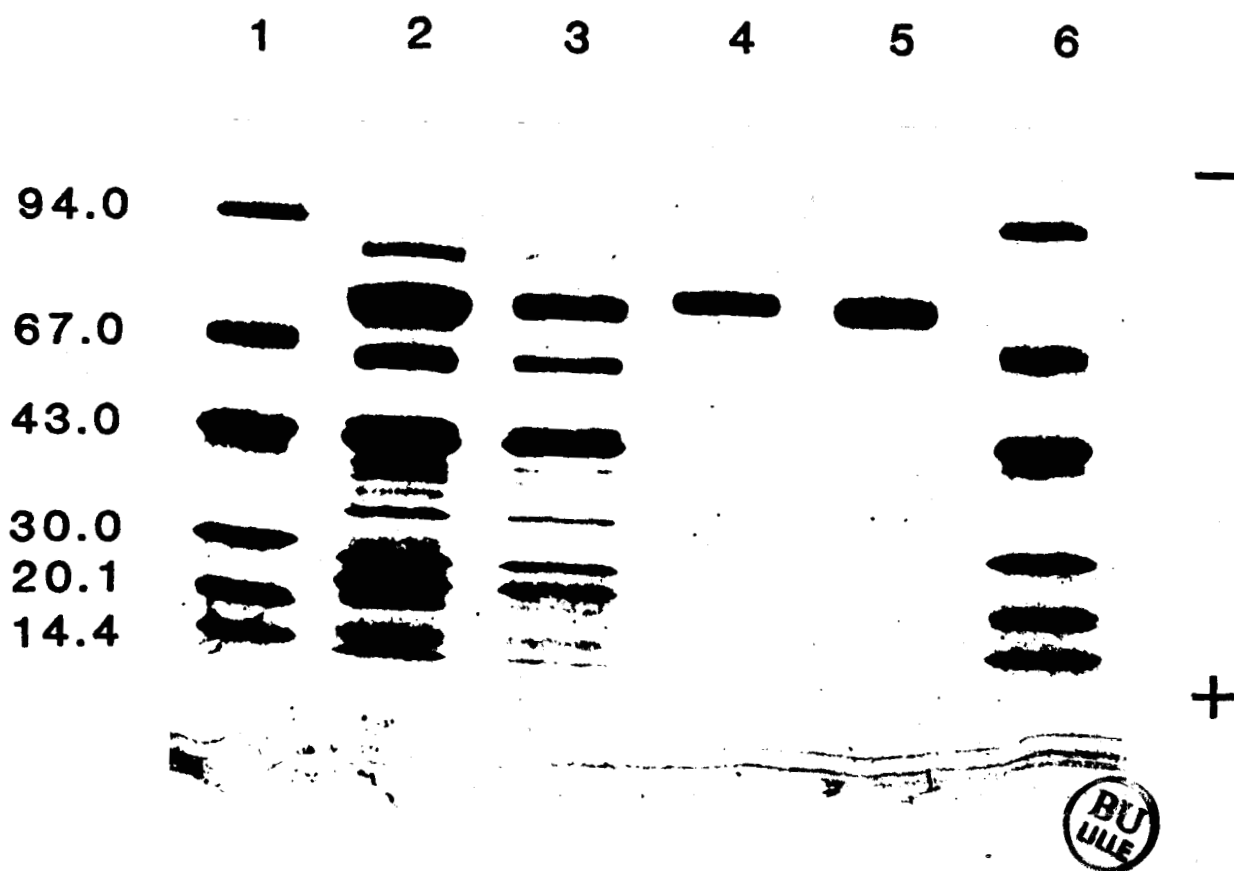


Figure n°14

Analyse par SDS-PAGE (5-25 %) des fractions obtenues par chromatographie d'affinité sur le copolymère de β -CD.

Les poids moléculaires indiquées sont exprimées en kDa.

Pistes : 1 et 6 = protéines témoins; 2 = extrait traité au Cétavlon[®]-EDTA, concentré par ultrafiltration; 3 = fraction non retenue; 4 = fraction retenue (CGTase) éluée; 5 = id. 4 après ultrafiltration.

II- CARACTERISATION DE L'ENZYME PURIFIEE.

II-A- Masse moléculaire.

Une détermination par SDS-PAGE de la masse moléculaire de l'enzyme est illustrée dans la partie traitant de la purification de l'enzyme (Cf. Fig.14, p.96).

Après de nombreuses déterminations, la masse moléculaire de l'enzyme a été estimée à

$$MM = 78000 (\pm 2500)$$

II-B- Caractérisation des isoenzymes.

1- Mise en évidence des isoenzymes.

L'analyse des isoformes sur PhastSystem™ (PHARMACIA) de l'enzyme purifiée permet de distinguer deux populations majeures (Fig.15, p.98). A l'aide des mélanges protéiques témoins analysés sur les pistes voisines, il est possible de situer les points isoélectriques des isoenzymes entre pH 6,0 et pH 7,0.

2- Détermination des points isoélectriques et des activités spécifiques relatives des isoenzymes.

L'analyse des fractions isoélectrophorétiques préparées sur système Multiphor 2117 (LKB) est illustrée sur la figure 16 (p.98). Les deux populations d'isoenzyme sont détectées avec les rapports et les points isoélectriques suivants :

Isoenzyme majeure (86 %) : $p_i = 6,9$.

Isoenzyme mineure (14 %) : $p_i = 6,7$.

Ces rapports correspondent aussi bien à l'activité mesurée qu'à la quantité de protéine relative (estimée par analyse densitométrique de la partie du gel révélée au bleu de Coomassie).

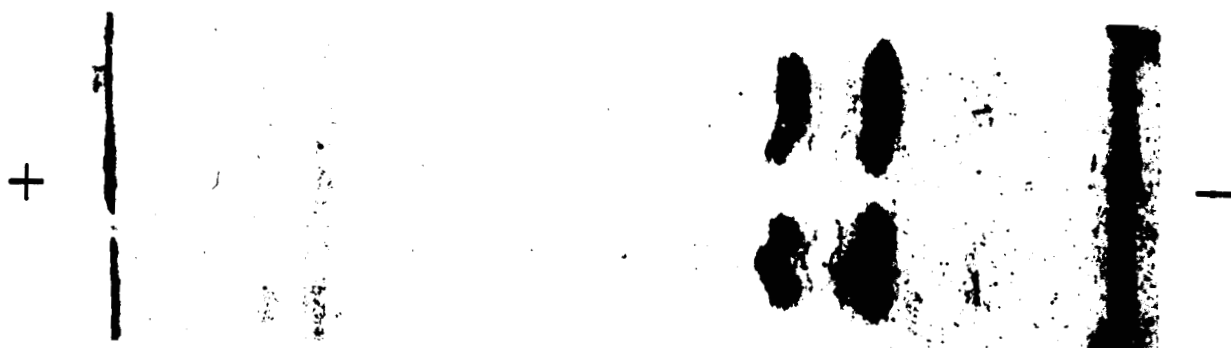


Figure 15 : Mise en évidence des isoformes de l'enzyme par isoélectrophorèse sur PhastSystem™ utilisant un gel IEF 3-9 (PHARMACIA). Dépôts centraux de 4 μ l d'enzyme pure (2 mg/ml). Révélation au bleu de Coomassie.

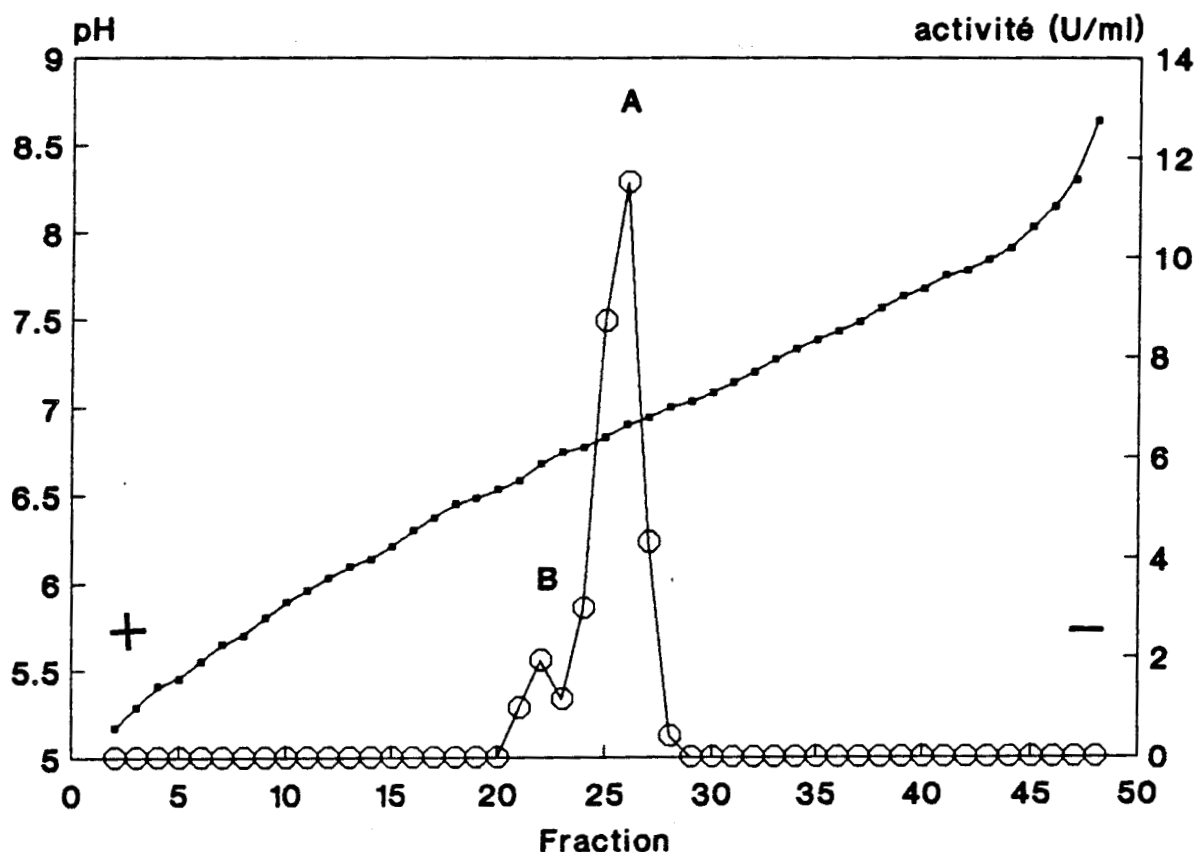


Figure 16 : Détermination des points isoélectriques des isoenzymes par mesure de l'activité et du pH des fractions isoélectrophorétiques préparées sur système Multiphor 2117 (LKB). (·—·) courbe de pH; (O—O) activité enzymatique. A : Isoforme majeure ($p_i = 6,9$); B : Isoforme mineure ($p_i = 6,7$).

Les deux populations isoenzymatiques ont donc une activité spécifique identique.

3- Séparation préparative des isoenzymes.

Les deux isoformes sont facilement séparées sur mono QTM sous la forme d'un pic majeur (90 %) suivi d'un pic mineur (10 %). Les activités enzymatiques mesurées après fractionnement de l'éluat donnent là encore les mêmes rapports, indiquant une activité spécifique identique pour les deux isoformes.

Sauf pour l'analyse des compositions en acides aminés, c'est le mélange des deux isoformes qui sera utilisé dans toutes les expériences.

II-C- Composition en résidus d'acides-amino de l'enzyme.



La composition en résidus d'acides-amino de l'isoforme majeure de l'enzyme est décrite dans le tableau V (p.100), en comparaison avec les compositions de CGTases provenant de quelques microorganismes voisins. Comme cela a été fréquemment constaté pour les CGTases, la cystéine n'entre pas dans la composition de l'enzyme.

Les différences de composition entre les isoformes mineure et majeure de l'enzyme se sont avérées peu significatives.

II-D- Séquence N-terminale de la chaîne polypeptidique de l'enzyme (30 premiers résidus).

Le séquençage des 30 premiers résidus N-terminaux de la chaîne peptidique de l'enzyme a été réalisé par l'équipe du professeur André TARTAR (URA CNRS 1309, Institut Pasteur de Lille) à l'aide d'un microséquenceur APPLIED-BIOSYSEMS.

Tableau V

Composition en amino-acides de l'isoforme majeure de l'enzyme (*B. circulans* E 192) et comparaison avec celles d'autres CGTases : CGTases de *B. macerans* (TAKANO *et al.*, 1986), *Bacillus* sp. alcalophile souche n° 38-2 (KANEKO *et al.*, 1988) et *B. circulans* souche n° 8 (NITSCHKE *et al.*, 1990).

Nombre de résidus de l'acide-amino par mole d'enzyme				
	<i>Bacillus circulans</i> # E 192	<i>Bacillus macerans</i>	<i>Bacillus alcalophile</i> # n° 38-2	<i>Bacillus circulans</i> # n° 8
Asx	119	101	110	107
Glx	37	40	48	33
Ser	45	47	39	53
Gly	67	79	64	59
His	12	9	12	12
Thr	78	67	58	75
Arg	8	21	23	18
Ala	74	57	57	59
Pro	25	24	29	23
Tyr	28	34	34	32
Val	45	49	48	49
Met	9	12	14	11
Cys	0	0	2	2
Ile	37	36	43	33
Leu	40	40	36	37
Phe	40	32	32	37
Trp	19	13	13	14
Lys	33	26	23	30
TOTAL	716	687	685	684

Asx : Asp + Asn

Glx : Glu + Gln

L'échantillon analysé a été préparé par concentration de 10 ml d'enzyme pure 53,4 µg/ml sur membrane d'ultrafiltration (YM10 AMICON) puis dialyse en sac (coupure à 3,5 kDa) du rétentat contre deux fois 5 l d'eau, sous agitation, à 4°C. Un léger précipité blanc (problème d'insolubilité de l'enzyme dans l'eau) à été éliminé lors d'une filtration stérilisante (MILLIPORE, 0,22 µm). Le filtrat (84 µg/ml) est stocké stérilement à 4°C avant d'être analysé.

L'analyse a donné le résultat suivant :

1 Gly-Ala-Asp-Thr-Ala-Val-Thr-Asn-Lys-Gln-
11 Asn-Phe-Ser-Thr-Asp-Val-Ile-Tyr-Gln-Ile-
21 Phe-Thr-Asp-XXX-Phe-Leu-Asp-Gly-Asn-Pro-

avec XXX = Trp ou His.

La figure 17 (p.102) aligne cette séquence avec celles déterminées pour des CGTases provenant de microorganismes voisins, de manière à comparer les homologues de séquences. Les séquences N-terminales d'une amylase et d'une β-amylase provenant toutes deux d'un *Bacillus circulans* sont également alignées.

Les homologues de séquences N-terminales entre l'enzyme et les autres CGTases sont fortes. Les nombres de résidus alignés homologues sont respectivement de 25 (*B. circulans* n° 8), 23 (*B. sp alcalophiles* n° 1011 et 38-2) et 19 (*B. macerans*), sur 29 résidus comparés.

Par contre, aucune homologie n'est décelée en comparant les séquences N-terminales de l'enzyme avec celles d'une amylase (3 résidus sur 29) et d'une β-amylase (0 résidu sur 29) provenant de la même espèce.

	*	
CGT Bc E192	GADTAVTNKQNFSTDVIYQIFTDXFLDGNP	
CGT Bc n°8	DPDTAVTNKQSFSTDVIYQVFTDRFLDGNP	25/29
CGT Bm	SPDTSVDNKVNFSTDVIYQVVTDRFADGDR	19/29
CGT Ba 1011	APDTSVSNKQNFSTAVIYQIFTDRFSDGNP	23/29
CGT Ba 38-2	APDTSVSNKQNFSTAVIYQIFTDYFSDGNP	23/29
Amy Bc F-2	GSVAPAEAAPATSVSNKQNNFSTDVIYQIV	3/29
β Amy Bc	AVAGDFQVSMGPLAKVTDWNSFKNQLTTL	0/29

(*) : X = Trp ou His

Figure n°17

Comparaison de la séquence N-terminale (30 premiers résidus) de l'enzyme (CGT Bc E192) avec celles de CGTases ou d'amylases issues de microorganismes voisins ou communs. Les résidus homologues sont indiqués dans les autres séquences en caractères gras. Le score, à droite de chaque séquence, indique le nombre de résidus homologues.

CGT Bc n°8 : CGTase de *Bacillus circulans* souche n° 8 (NITSCHKE et al., 1990); CGT Bm : CGTase de *Bacillus macerans* (TAKANO et al., 1986); CGT Ba 1011 : CGTase de *Bacillus* sp. alcalophile souche n° 1011 (KIMURA et al., 1987^a); CGT Ba 38-2 : CGTase de *Bacillus* sp. alcalophile souche n° 38-2 (KANEKO et al. 1988); Amy Bc F-2 : Amylase de *Bacillus circulans* souche F-2 (NISHIZAWA et al., 1987); β Amy Bc : β -amylase de *Bacillus circulans* (SIGGENS, 1987).

II-E- Discussion.

L'analyse des différentes caractéristiques de l'enzyme est conforme avec les résultats cités dans la littérature et concernant des CGTases d'origines diverses (Cf. p.15) : absence de cystéine, poids moléculaire (SDS-PAGE) compris entre 70 et 90 kDa, points isoélectriques compris entre 4,2 et 6,9. D'autre part, l'homologie de la séquence N-terminale avec celles de CGTases issues d'autres microorganismes est très forte, mais en fait relativement classique. Ces différents résultats nous montrent que nous sommes en présence d'une enzyme qui diffère peu des CGTases déjà décrites.

La coexistence d'isoformes d'une même enzyme est particulièrement fréquente chez les bactéries. En effet, pour les organismes monocellulaires, la probabilité d'apparition et de conservation d'une hétérogénéité génomale est grande. Cependant, l'hypothèse de l'apparition de formes tronquées par protéolyse est à retenir. En effet, en travaillant à partir de moûts de fermentation beaucoup plus riches en activité protéasique, BOVETTO (1988) et BACKER (1988) ont isolé à partir de la souche de *B. circulans* # E 192 une CGTase de 73000 Da, composée d'une isoforme majeure (70 %) de $p_i = 6,9$ et d'une isoforme mineure (30 %) de $p_i = 6,1$. En partant de moûts pratiquement exempts d'activité protéasique, nous obtenons ici une CGTase de 78000 Da, dont l'isoforme majeure ($p_i = 6,9$) représente 90 % et l'isoforme mineure est légèrement plus basique ($p_i = 6,7$ au lieu de 6,1).

III- MISE EN EVIDENCE D'UN SITE A AFFINITE POUR L'AMIDON CRU, DIFFERENT DU SITE ACTIF.

III-A- Constante de dissociation observée ($K_{d_{obs}}$) de l'enzyme sur grains crus d'amidon de maïs.

Comme dans le cas de nombreuses glucosidases possédant un site de fixation de l'amidon cru ("Raw-starch-binding Site"), nous avons pu mettre en évidence une affinité de la CGTase pour l'amidon cru de maïs (Fig.18^a, p.105).

La figure 18^b (p.105) représente la droite obtenue par linéarisation de Scatchard. La constante de dissociation observée ($K_{d_{obs}}$) de l'enzyme pour les grains d'amidon cru est :

$$K_{d_{obs}} = 0,18 \mu\text{M}.$$

Cette valeur englobe les interactions spécifiques mais également d'éventuelles interactions non spécifiques qui ne peuvent être extraites par la technique expérimentale utilisée.

Nous pouvons remarquer qu'elle est comparable à la constante de dissociation de l'enzyme sur le copolymère de β -CD ($K_{d_{obs}} = 0,27 \mu\text{M}$). Enfin, la constante d'affinité (K_a) de la glucoamylase d'un *Rhizopus sp.*, mesurée sur amidon cru de maïs, est de $1,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (TAKAHASHI et al., 1985), soit un K_d de $8,33 \mu\text{M}$. L'affinité apparente obtenue pour l'enzyme sur amidon cru est donc 50 fois supérieure à celle de cette glucoamylase.

III-B- Effets de l'oxydation des résidus tryptophanyles de l'enzyme par la NBS.

En comparant l'influence de l'oxydation des résidus tryptophanyles sur l'affinité de l'enzyme pour les grains d'amidon cru et sur sa réactivité vis-à-vis de l'amidon soluble, nous avons pu mettre en évidence l'existence d'un site à affinité pour l'amidon cru différent du site actif.

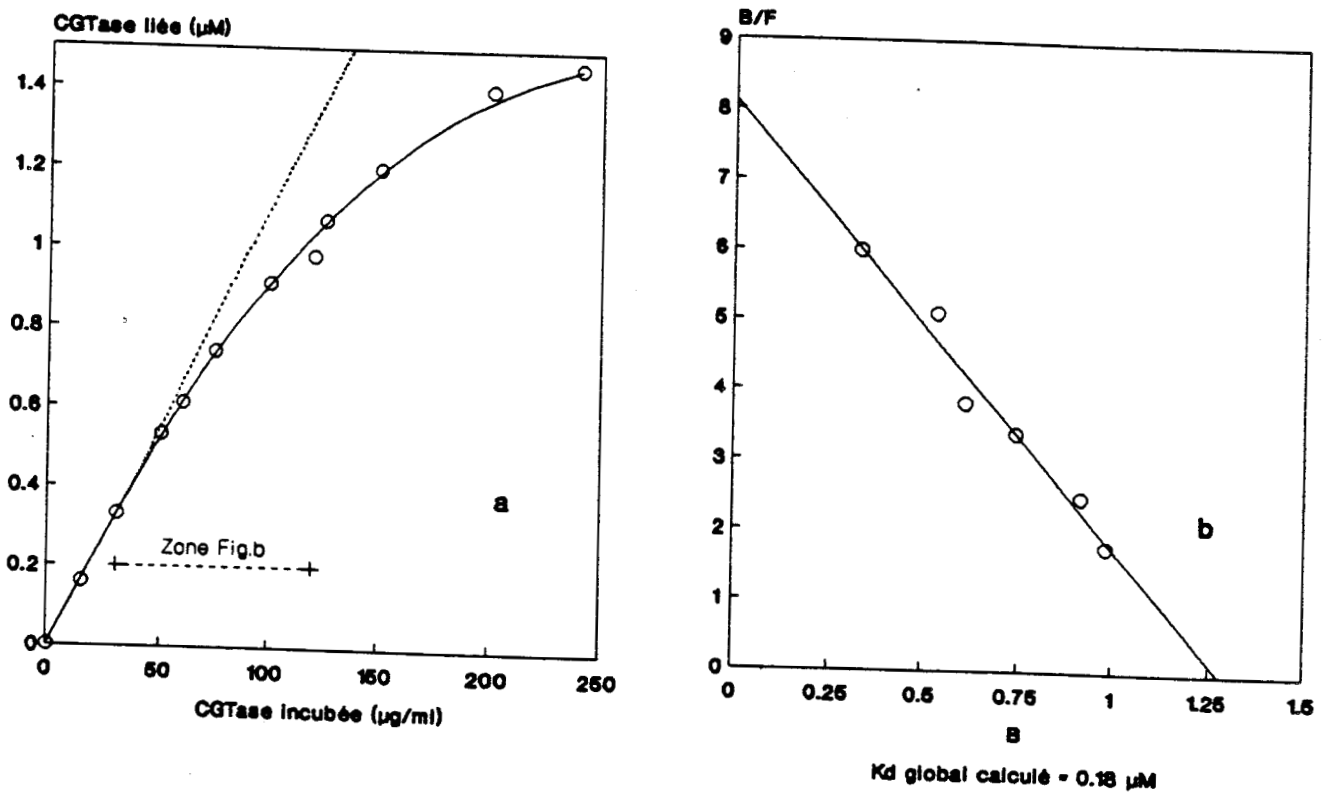


Figure n°18

Détermination de la constante de dissociation observée ($K_{d_{obs}}$) de l'enzyme sur grains d'amidon cru de maïs.

a) Courbe de saturation illustrant les concentrations en CGTase utilisées pour la détermination.

b) Représentation de Scatchard. B = CGTase liée (μM); F = CGTase libre (μM).

1- Effet de l'oxydation par la NBS sur la solubilité de l'enzyme.

Le problème majeur limitant l'étude de la modification chimique des résidus tryptophanyles de l'enzyme par la NBS s'est avéré être un problème de précipitation d'une certaine quantité d'enzyme modifiée, proportionnelle à la quantité de NBS utilisée (visible à partir de 25 μ M en NBS). Ces résultats sont illustrés par la figure 19 (p.107).

Ce phénomène n'est pas négligeable puisque 37 % de l'enzyme sont précipités après traitement par la NBS 200 μ M, dans les conditions standard d'oxydation. Des analyses par SDS-PAGE ont montré que cette précipitation n'est pas due à une rupture de liaison(s) peptidique(s) par réarrangement du 3-méthoxyindole formé. Nous pouvons donc conclure qu'une oxydation trop importante du tryptophane par la NBS entraîne un probable changement conformationnel de l'enzyme aboutissant à sa précipitation.

Ce phénomène nous contraint à certaines précautions :

1- La détermination spectrophotométrique directe du nombre de tryptophanes oxydés selon PATCHORNIK *et al.* (1958), adaptée par SPANDE *et al.* (1967) puis MYER *et al.* (1972), est impossible, car la précipitation d'une partie de l'enzyme s'accompagne d'une augmentation de son absorptivité dans l'UV.

2- Les dosages d'activité et d'affinité résiduelles effectués dans le surnageant doivent être ramenés à la quantité d'enzyme soluble après traitement par la NBS.

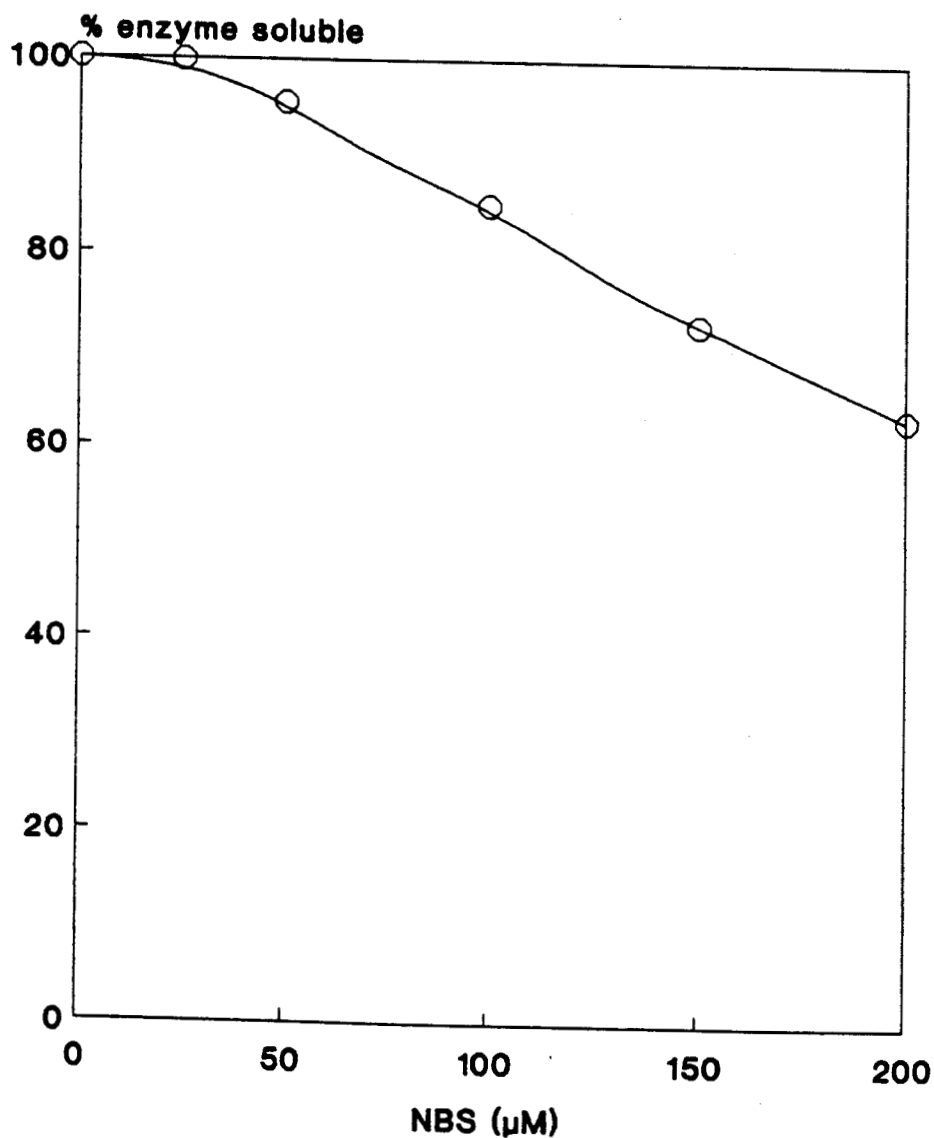


Figure n°19

Influence de l'oxydation des résidus tryptophanyles par la NBS sur la solubilité de l'enzyme.

Le pourcentage d'enzyme soluble correspond à la quantité de protéine dosée dans le surnageant de centrifugation après action de la NBS sur 0,6 mg/ml d'enzyme pure dans les conditions standard d'oxydation.

2- Effets comparés de l'oxydation par la NBS sur l'activité résiduelle de l'enzyme et son affinité résiduelle pour l'amidon cru ou pour le copolymère de β -CD.

Les résultats sont rassemblés dans la figure 20 (p.109). Les mesures sont ramenées à la quantité d'enzyme encore soluble après action de la NBS. Il apparaît clairement que si l'activité résiduelle varie relativement peu, l'affinité pour l'amidon cru ou pour le copolymère de β -CD est rapidement perdue. En effet, après traitement de l'enzyme par la NBS 200 μ M, l'affinité pour l'amidon cru de maïs ou pour le copolymère de β -CD est nulle alors qu'il subsiste encore 70 % d'activité enzymatique résiduelle. D'autre part, les courbes de perte d'affinité en fonction du degré d'oxydation sont relativement identiques concernant l'amidon cru et le copolymère de β -CD.

Nous pouvons donc conclure de cette expérience que :

- Le site de fixation de l'amidon cru ou du copolymère de β -CD n'est pas le site catalytique de l'enzyme.

- L'affinité de l'enzyme pour le copolymère de β -CD s'effectue probablement par l'intermédiaire du site de fixation de l'amidon cru ("Raw starch binding site").

III-C- Discussion.

L'existence d'une interaction spécifique entre la CGTase et l'amidon cru est confirmée par la valeur significative du K_d observé sur grains d'amidons de maïs (0,18 μ M). Cette affinité étant 50 fois supérieure à celle d'une glucoamylase de *Rhizopus* sp. décrite comme possédant un site de fixation de l'amidon cru (TAKAHASHI et al., 1985), nous sommes donc en présence d'un site à haute affinité pour cette catégorie d'amidon.

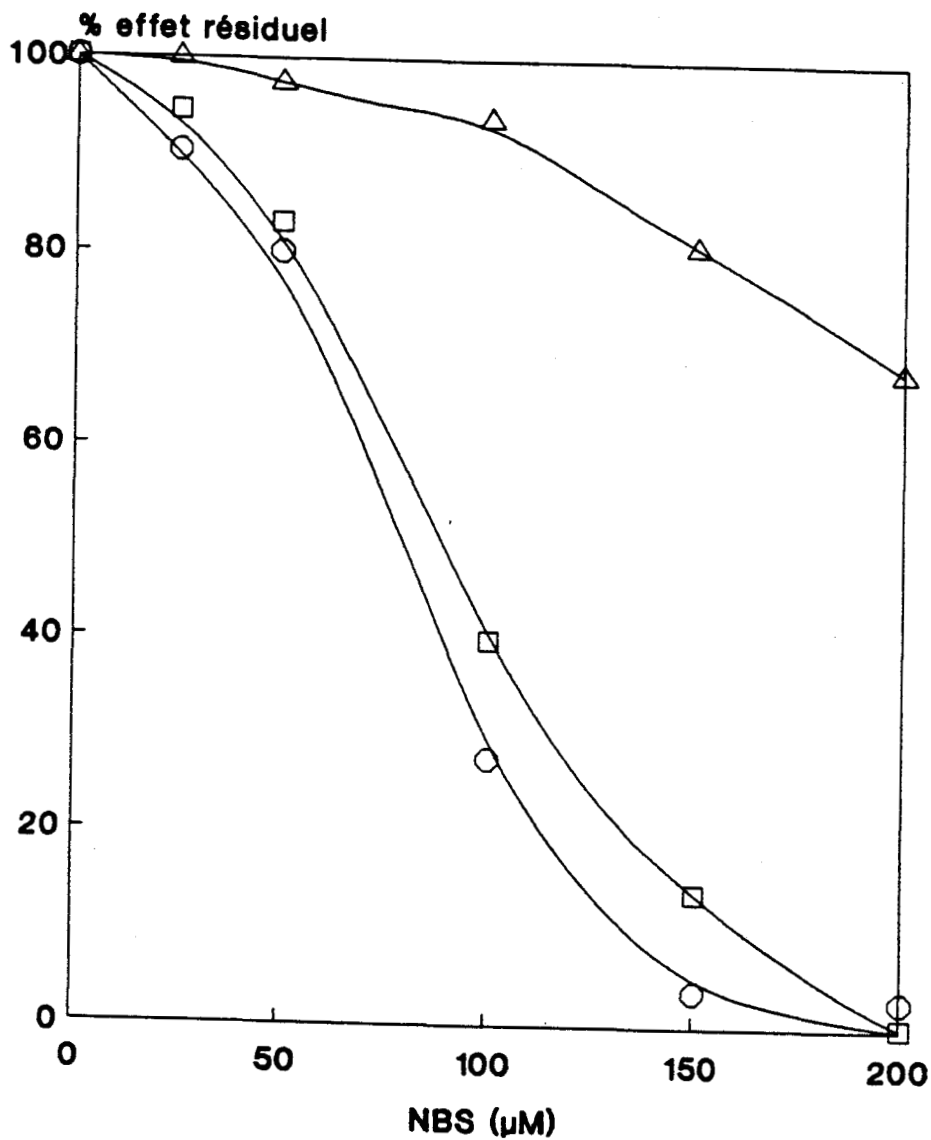


Figure n°20

Influence de l'oxydation des résidus tryptophanyles de l'enzyme par la NBS sur l'activité cyclisante résiduelle (Δ—Δ), l'affinité résiduelle pour l'amidon cru de maïs (O—O), et l'affinité résiduelle pour le copolymère de β-CD (□—□). Ces trois mesures sont ramenées à la quantité d'enzyme restée soluble après traitement par la NBS.

Ce résultat confirme l'hypothèse de SVENSSON (1988, 1989) basée sur les homologies de séquences dans la partie C-terminale entre les CGTases et le site de fixation de l'amidon cru de la glucoamylase d'*Aspergillus niger*. D'après ces homologies de séquences, ce site à haute affinité pour l'amidon cru doit être situé dans la partie C-terminale de l'enzyme, et plus particulièrement dans le domaine E mis en évidence par HOFFMAN et al. (1989) pour la CGTase de *Bacillus circulans* # n°8. Rappelons que ce domaine participe, avec le domaine A, à la formation de la crevasse contenant le site actif de l'enzyme.

Le maintien de l'activité de l'enzyme ayant perdue toute affinité pour l'amidon cru montre qu'il s'agit bien là d'un site indépendant du site actif (ce résultat sera confirmé plus loin par l'utilisation des effecteurs du site actif lors de l'oxydation par la NBS, et par le maintien de l'affinité sur copolymère de β -CD après inactivation de l'enzyme par modification des résidus histidyles). Ce résultat n'est pas surprenant car il présente des antécédents pour d'autres glucosidases : l'oxydation des tryptophanes de la glucoamylase d'*Aspergillus niger* (SVENSSON et al., 1986) entraîne une altération du site de fixation de l'amidon cru (perte totale de l'affinité) avec un maintien de la réactivité de l'enzyme sur amidon soluble.

Enfin, puisque l'affinité de la CGTase pour le copolymère de β -CD procède par l'intermédiaire de ce site de fixation de l'amidon cru (K_d comparables et résultat identique après action de la NBS), de nouvelles perspectives s'offrent dans l'application du copolymère comme matrice d'affinité. En effet, toutes les glucosidases munies d'un site de fixation de l'amidon cru devraient pouvoir être purifiées par chromatographie d'affinité sur le copolymère de β -CD.

IV- ETUDE DU SITE ACTIF SUIVANT LE MODELE DE BOVETTO (1988). MISE EN EVIDENCE D'UNE TRANSCONFORMATION DU SITE DU DONNEUR INDUITE PAR L'ACTIVATION DU SITE DE L'ACCEPTEUR.

IV-A- STRATEGIE D'ETUDE.

Notre étude du site actif est basée sur la coexistence et l'interdépendance, dans le site actif, d'un site spécifique du donneur (type α -amylase) possédant les résidus catalytiques et spécialisé dans l'accueil de l' α -D-glucane, et d'un site de l'accepteur, spécialisé dans l'accueil de l'extrémité non-réductrice de la chaîne ou de tout autre accepteur exogène (BOVETTO, 1988). Ce modèle est décrit dans la partie GENERALITES (pp. 32-37).

Après avoir confirmé la nécessité de l'accepteur dans la réactivité de l'enzyme (p.112), nous avons pu définir deux types d'inhibiteurs de la cyclisation : Un accepteur (la salicine), spécifique du site de l'accepteur, et un inhibiteur des α -glucohydrolases (l'acarbose), spécifique du site du donneur (p.116). L'action de ces inhibiteurs est étudiée.

En utilisant des agents chimiques spécifiques de tel ou tel type d'acide aminé (p.121, p.141), nous avons tenté, en mesurant les paramètres cinétiques de l'enzyme modifiée, de mieux comprendre le fonctionnement de ce site actif à double spécificité (donneur/accepteur). Dans ce contexte, l'utilisation des effecteurs (salicine et acarbose) comme agents protecteurs spécifiques de l'un ou l'autre des deux sites nous donna des informations complémentaires, dont, notamment, la mise en évidence d'une mise en conformation du site du donneur. Une analyse par dichroïsme circulaire (p.156) de l'enzyme en présence des effecteurs confirmera ce résultat.

Dans un souci de limiter l'étude au seul site actif, les enzymes modifiées étaient toujours purifiées par affinité sur le copolymère de β -CD, afin d'éliminer les éventuelles populations d'enzyme dont le site de fixation pour l'amidon cru aurait été

altéré.

Enfin, la flexibilité du modèle de BOVETTO (1988), permettant d'expliquer les ratios α -/ β -/ γ -CD, est illustrée par la différence de couplage entre une α - et une β -CGTase (p.159). Le résultat est discuté par rapport aux résultats précédents.

IV-B- VISUALISATION DE LA NECESSITE D'UN ACCEPTEUR GLUCOSIDIQUE DANS LA REACTIVITE DE L'ENZYME.

1- Influence d'un accepteur sur l'activité dextrinifiante : comparaison entre l'enzyme et une alpha-amylase.

Comme l'illustre la figure 21 (p.113), l'accélération de la dextrinification d'un substrat amylicé par addition d'un accepteur glucosidique (hélicine) est spécifique à la CGTase. Une légère accélération est cependant observée dans le cas de l' α -amylase. Ce faible effet peut s'expliquer par le fait que les amylases sont susceptibles de transférer sur des accepteurs autres que l'eau (alcools, etc..) avec peu d'efficacité.

2- Réactivités comparées de l'enzyme vis-à-vis du pNP-G₇ et du pNP-G₇-bloqué, en présence ou non d'un accepteur : rôle de l'extrémité non-réductrice libre.

Les résultats sont illustrés par la figure 22 (p.114).

L'action de l'enzyme sur le pNP-G₇ permet de visualiser la formation de pNP-maltooligosaccharides dont le nombre de résidus α -D-glucosyles est supérieur ou inférieur à celui du substrat de départ (piste 3). Ceci montre que l'enzyme fonctionne par la réaction dite disproportionnante (transglucosylation intermoléculaire). Par contre, dans le cas du pNP-G₇-bloqué à son extrémité non-réductrice, (piste 5), on peut considérer qu'il n'y a pas modification du substrat.

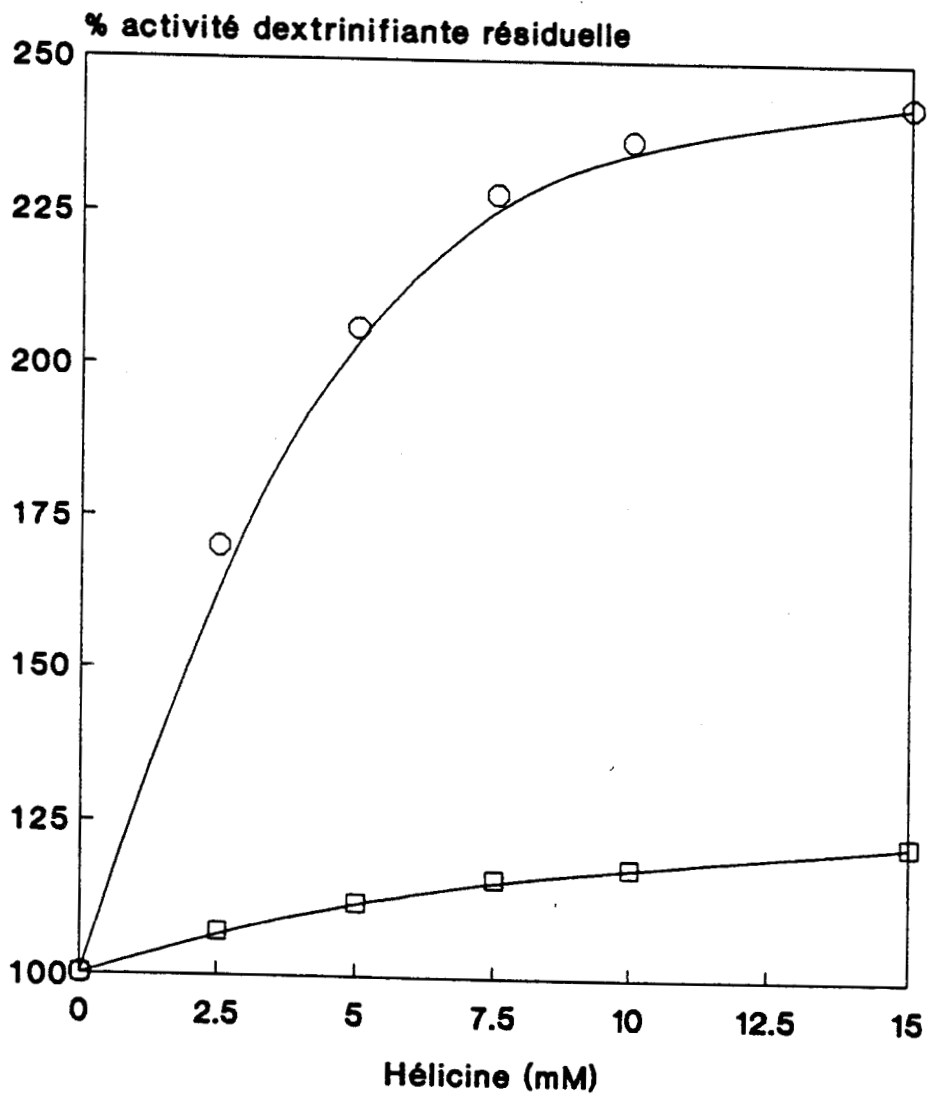


Figure n°21

Influence de la concentration en accepteur sur l'activité dextrinifiante : effets comparés entre l'enzyme (CGTase, *B. circulans*), et une α -amylase (*B. subtilis*).

(O—O) = CGTase; (\square — \square) = α -amylase.

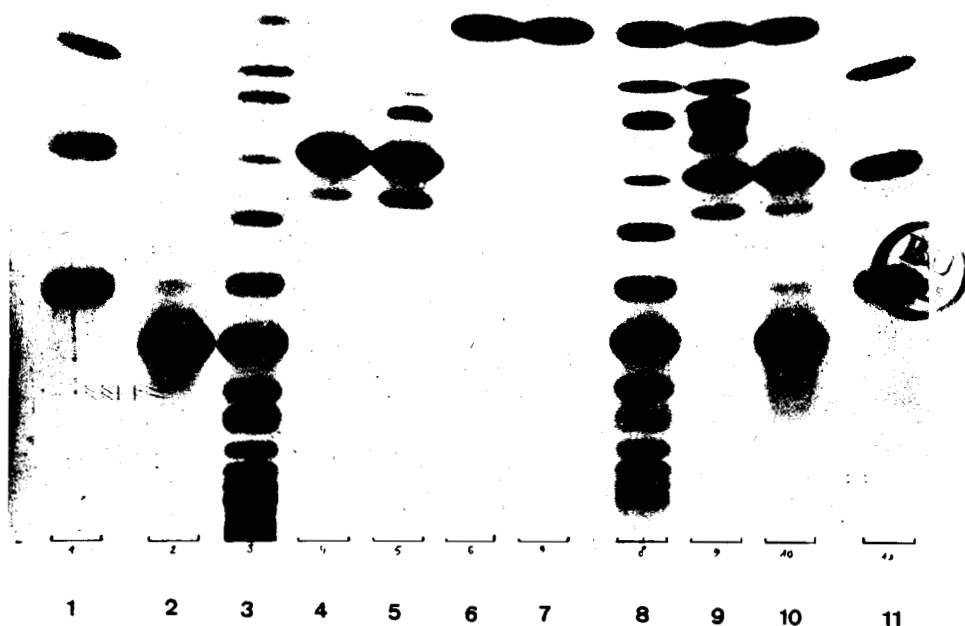


Figure n°22

Chromatogramme de CCM comparant les digestions du pNP-G₇ et du pNP-G₇-bloqué après 10 minutes à 50°C en présence de l'enzyme, avec ou sans accepteur (pNP-G₁).

Pistes : 1 et 11= témoins pNP-G₂ + pNP-G₄ + pNP-G₆; 2= témoin pNP-G₇; 3= pNP-G₇ + enzyme; 4= témoin pNP-G₇-bloqué; 5= pNP-G₇-bloqué + enzyme; 6= témoin pNP-G₁; 7= pNP-G₁ + enzyme; 8= pNP-G₇ + pNP-G₁ + enzyme; 9= pNP-G₇-bloqué + pNP-G₁ + enzyme; 10= témoins pNP-G₁ + pNP-G₇ + pNP-G₇-bloqué.

L'addition d'un accepteur exogène (le pNP-G₁) dans le milieu réactionnel n'entraîne pas de modifications profondes pour l'action de l'enzyme sur le pNP-G₇ (piste 8), sauf peut-être une augmentation de la proportion de produits dont le nombre de résidus glucosyles est plus faible. Par contre, elle est indispensable à la dégradation du pNP-G₇-bloqué (piste 9), et dans ce cas, seuls des produits de masses plus faibles que celle du substrat apparaissent.

Le pNP-G₇ présentant une extrémité non-réductrice libre peut jouer à la fois le rôle de donneur (liaisons α -1,4) et d'accepteur, et donner des produits disproportionnés. Le pNP-G₇-bloqué, de par sa structure, ne peut jouer que le rôle de donneur, et ne sera dégradé qu'en présence d'extrémités non-réductrices libres ajoutées au milieu réactionnel.

3- Discussion.

A la différence des α -amylases, l'enzyme n'agit donc que par transglucosylation entre un accepteur et un donneur (BOVETTO, 1988), de manière à ce que la coupure du donneur soit exploitée sur l'accepteur.

Ainsi, l'accélération de la pseudo-dextrinification en présence d'un accepteur exogène comme l'hélicine correspond à une transglucosylation intermoléculaire entre la chaîne amyliacée et une micromolécule. Cette accélération n'a pas lieu pour l' α -amylase car l'enzyme ne possède pas de site spécifique de l'accepteur. L'eau est donc le seul accepteur qu'elle puisse reconnaître.

D'autre part;

de la première expérience, nous pouvons conclure que l'accepteur gouverne la cinétique, puisque l'accélération de l'activité moléculaire (mesurée par la pseudo-dextrinification) est directement liée à la quantité d'accepteurs présents.

De la seconde expérience, nous pouvons conclure que la nature de l'accepteur oriente la réaction : l'addition d'un accepteur plus petit que le pNP-G7 déséquilibre l'activité disproportionnante pour favoriser l'apparition de produits plus petits.

Enfin, la très faible digestion du pNP-G₇-bloqué (non visible sur la photo) en absence d'accepteur illustre néanmoins une légère activité de type amylase (hydrolytique) catalysée par l'enzyme. Dans ce cas, une molécule d'eau joue le rôle d'accepteur. Malgré sa faible activité moléculaire, cette action est intéressante car elle peut, en agissant de manière "endo", créer de nouvelles amorces pour la transglucosylation.

IV-C- MISE EN EVIDENCE DE DEUX TYPES D'INHIBITEURS DE LA CYCLISATION : LA SALICINE ET L'ACARBOSE. ETUDE DE LEUR REACTIVITE EN PRESENCE DE L'ENZYME.

1- Effets comparés des deux types d'inhibiteurs.

La figure 23 (p.117) résume les effets comparés des deux types d'inhibiteurs :

- détermination du type d'inhibition (pour la cyclisation) et de la constante d'inhibition (K_i) associée, par analyse des droites $S/v = f(S)$ obtenues pour des concentrations croissantes en inhibiteur;

- comparaison de l'effet de l'inhibiteur sur les activités cyclisante et pseudo-dextrinifiante de l'enzyme.

1-a- Inhibition par un glucoside accepteur dans la réaction de transglucosylation : la salicine.

Comme déjà décrit pour l'hélicine dans le chapitre précédent (p.112), la salicine accélère la réactivité globale de l'enzyme (mesurée par la vitesse de pseudo-dextrinification) car sa présence correspond à une addition de molécules acceptrices dans

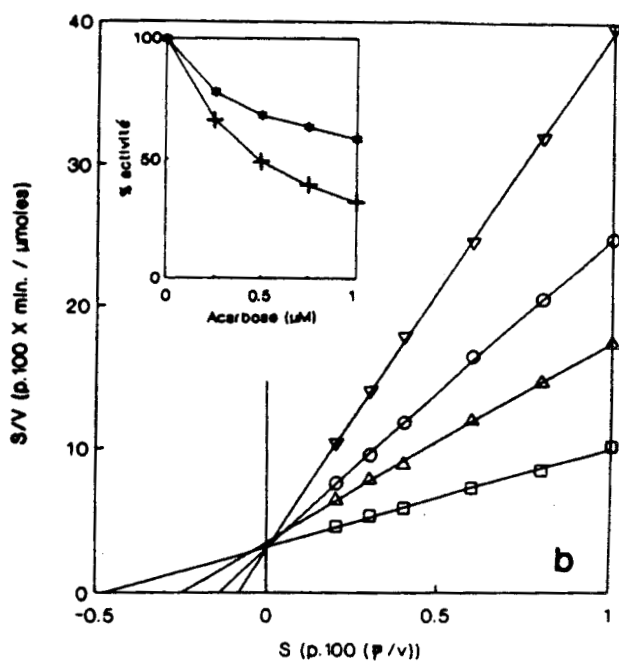
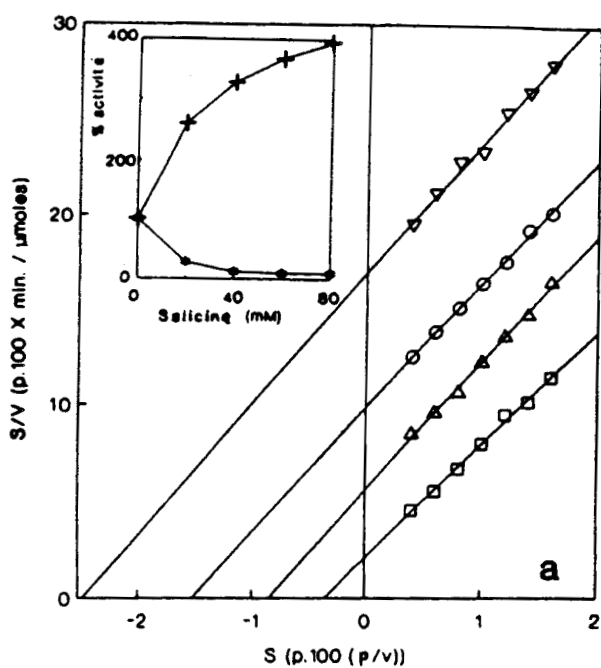


Figure n°23

Effets inhibiteurs comparés de la salicine (a) et de l'acarbose (b) sur la cyclisation, déterminés par les représentation de $S/v = f(S)$.

Les cinétiques sont réalisées sans inhibiteur (\square — \square) ou en présence de salicine 5 mM (Δ — Δ), 10 mM (O—O) et 20 mM (∇ — ∇) (a), ou d'acarbose 1 μ M (Δ — Δ), 2 μ M (O—O) et 4 μ M (∇ — ∇) (b). L'influence des inhibiteurs sur la cyclisation (*—*) et sur l'activité "dextrinifiante" (+—+) est représentée en encadré

la réaction de transglucosylation. L'amidon est donc dégradé plus rapidement. Par contre, la cyclisation est inhibée.

Il y a donc inhibition de la transglucosylation intramoléculaire (cyclisation) au profit de la transglucosylation intermoléculaire (activité disproportionnante) induite par l'addition d'un accepteur exogène.

Les caractéristiques de cette inhibition de la cyclisation par la salicine sont les suivantes :

INHIBITION COMPETITIVE,

$$K_i = 3,4 \text{ mM.}$$

(Fig.23^a, p.117).

Ce résultat suggère que cet inhibiteur peut se lier au site actif de l'enzyme au même titre que le substrat (l'amidon).

1-b- Inhibition par un pseudo-glucoside inhibiteur compétitif des α -glucohydrolases : l'acarbose.

Dans ce cas et contrairement à la salicine, l'activité globale de l'enzyme est inhibée, cyclisation comme pseudo-dextrinification, suggérant une liaison de l'inhibiteur à un site catalytique commun à celui des α -glucohydrolases. Cependant, la CGTase se distingue des autres α -glucohydrolases car l'inhibition n'est pas de type compétitive. En effet, les caractéristiques de cette inhibition sont :

INHIBITION INCOMPETITIVE,

$$K_i = 1 \text{ } \mu\text{M.}$$

(Fig.23^b, p.117).

Ce résultat suggère que cet inhibiteur ne se lie au site catalytique qu'après la liaison préalable du substrat (l'amidon) à l'enzyme.

2- Analyse en CCM de la réactivité de l'enzyme en présence des deux types d'inhibiteurs.

Les chromatogrammes de CCM (Fig.24^a & 24^b, p.120) illustrent la réactivité de l'enzyme en présence des deux types d'inhibiteurs. Le caractère accepteur de la salicine est visualisé par l'apparition de produits migrant rapidement en CCM, en présence d'amidon (Fig.24^b, piste 8), ou de β -CD (Fig.24^b, piste 11) comme donneur. Dans ce dernier cas, c'est la réaction de couplage qui est visualisée. En présence d'acarbose, aucun substrat n'est transformé. Ces résultats sont donc en accord avec les précédents.

Enfin, la figure 24^a montre que la salicine seule (piste 6), l'acarbose seul (piste 4) ou l'acarbose en présence d'accepteur (piste 7) ne sont pas des substrats pour l'enzyme car ils ne donnent aucun produit de transformation.

3- Discussion.

Le fait que ces deux inhibiteurs entraînent deux types différents d'inhibition de la cyclisation confirme la validité du modèle du site actif des CGTases décrit par BOVETTO (1988). En effet, l'un est inhibiteur compétitif des α -amylases (haute spécificité pour leur site catalytique) et l'autre est un accepteur. Le site actif peut donc être divisé en deux sites spécialisés : le site du donneur, analogue à celui des α -amylases et présentant les résidus catalytiques, et le site de l'accepteur, propre aux CGTases.

L'influence de ces deux types d'inhibiteurs sur la réactivité de l'enzyme montre clairement que l'acarbose est spécifique du site du donneur (inhibition de l'activité moléculaire), et la salicine du site de l'accepteur (comportement classique d'un accepteur visualisé par le couplage et l'accélération de la pseudo-dextrinification).

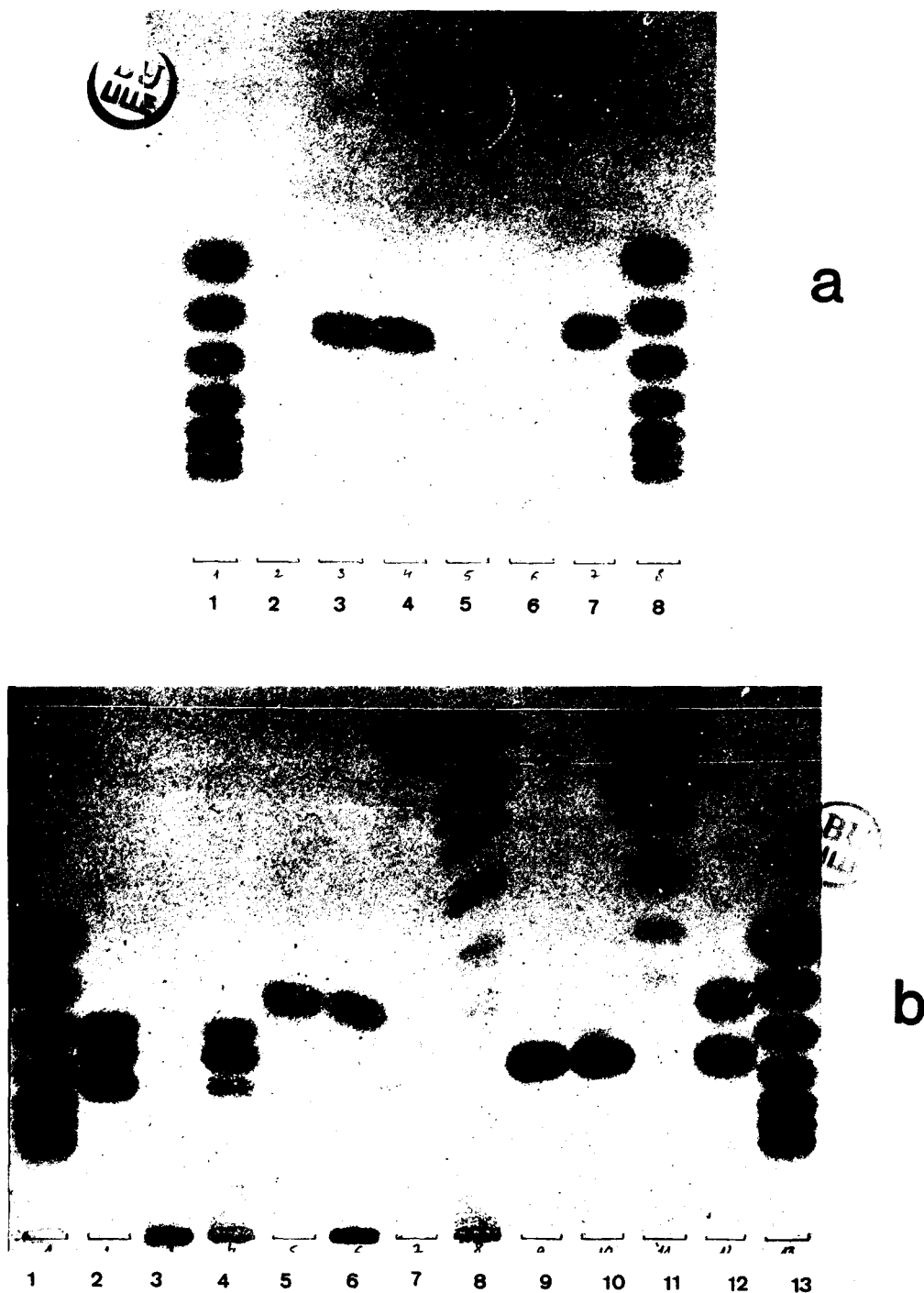


Figure 24 : Chromatogrammes de CCM illustrant la réactivité de l'enzyme en présence des deux types d'inhibiteurs (salicine et acarbose).

a) pistes : 1 et 8= maltooligosaccharides témoins G_1 à G_7 ; 2= témoin enzyme; 3= témoin acarbose; 4= acarbose + enzyme; 5= témoin salicine; 6= salicine + enzyme; 7= Salicine + acarbose + enzyme.

b) pistes : 1 et 13= maltooligosaccharides témoins G_1 à G_7 ; 2= témoins α - + β - + γ -CD; 3= témoin amidon; 4= amidon + enzyme; 5= témoin acarbose; 6= amidon + acarbose + enzyme; 7= témoin salicine; 8= amidon + salicine + enzyme; 9= témoin β -CD; 10= β -CD + enzyme; 11= β -CD + salicine + enzyme; 12= β -CD + acarbose + enzyme.

Le caractère compétitif de la salicine et incompétitif de l'acarbose suggère deux conclusions :

- La liaison de l'accepteur (extrémité non-réductrice du substrat) gouverne la réaction.

- L'inhibition par l'acarbose (analogue du donneur) étant postérieure à la fixation du substrat, le positionnement du donneur sur son site ne peut s'effectuer qu'après liaison de l'extrémité non réductrice de la chaîne amyliacée sur le site de l'accepteur.

Cette conclusion suggère que la liaison de l'accepteur (l'extrémité non réductrice d'un α -D-glucane) sur son site induise une mise en conformation du site du donneur pour permettre l'accueil du reste de la chaîne et l'acte catalytique.

Enfin, en plus de leur spécificité propre, la salicine et l'acarbose ne sont pas transformés par l'enzyme. Ces caractéristiques en font des candidats privilégiés pour les études ultérieures du site actif de la CGTase. Aussi, nous leur attribuerons par la suite le terme d'effecteurs du site actif.

IV-D- INFLUENCE DE LA NITRATION DES RESIDUS TYROSYLES DE L'ENZYME PAR LE TETRANITROMETHANE (TNM). MISE EN EVIDENCE D'UNE TYROSINE IMPORTANTE DANS LE SITE ACTIF.

1- Cinétiques de nitration de l'enzyme par le TNM 20 mM en présence ou non des effecteurs (salicine et/ou acarbose).

L'analyse des figures 25^a et 25^b (p.123) montre que la nitration de l'enzyme par le TNM 20 mM à température ambiante et à pH 8,0 entraîne une perte lente ($\tau_{1/2} = 109$ minutes) de l'activité résiduelle. Cette perte suit une cinétique d'ordre 2 comme le

suggère la linéarité de la relation

$$(\% \text{ activité résiduelle})^{-1} - (100)^{-1} = kt,$$

avec une constante de vitesse $k = 9,17 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$. La perte d'activité pseudo-dextrinifiante (mesurée sur les mêmes échantillons) suit une cinétique identique.

Cette perte d'activité est très légèrement accélérée si la salicine (5 mM) est présente lors de la nitration ($\tau_{1/2} = 83$ minutes), mais est considérablement freinée en présence d'acarbose 5 mM ($\tau_{1/2} = 781$ minutes sans salicine et 625 minutes avec salicine).

L'analyse différentielle des courbes de perte d'activité lors de la nitration en présence ou non d'acarbose (Fig.25^a) permet d'extraire la perte d'activité engendrée par une modification spécifique du site actif, puisque celle-ci n'a pas lieu en présence d'acarbose. Cette altération spécifique du site actif s'effectue en début de nitration (la courbe différentielle n'évolue plus après 300 minutes) et correspond à une perte finale de 47 % d'activité. Ce phénomène, probablement lié à la nitration de résidu(s) tyrosyle(s) du site actif, est expérimentalement inexploitable car se confond dans un phénomène de perte globale de l'activité, faisant suite à la nitration de l'enzyme.

L'étude cinétique de la nitration permet également de constater l'apparition lente d'une fraction enzymatique non-retenue par chromatographie d'affinité sur copolymère de β -CD. Ce phénomène d'altération de l'affinité de l'enzyme pour le copolymère de β -CD est proportionnel au temps de nitration, comme le suggère la linéarité de la relation

$$\% \text{ enzyme non retenue} = kt.$$

D'autre part, cette altération suit une loi du type "tout ou rien" car aucune population d'enzyme à affinité "intermédiaire" n'a été isolée par chromatographie d'affinité.

La figure 26 (p.124) illustre les vitesses d'apparition de cette fraction non-retenue (pente des droites), selon la présence ou non des effecteurs (salicine et/ou acarbose) dans l'incubation de

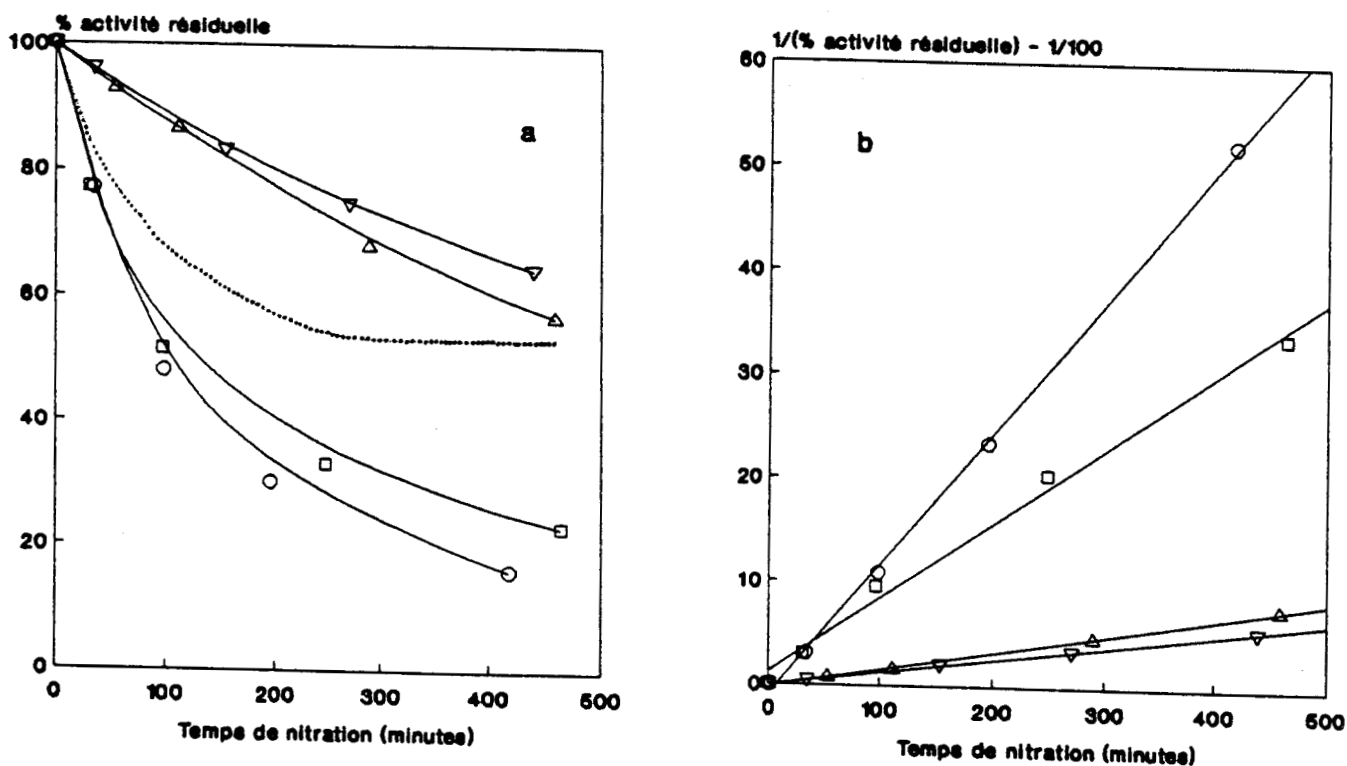


Figure n°25

a) Etude cinétique de l'influence de la nitration par le TNM 20 mM de l'enzyme seule (\square — \square), en présence de salicine (\circ — \circ), en présence d'acarbose (∇ — ∇), ou en présence de salicine et d'acarbose (Δ — Δ), sur l'activité résiduelle.

Les incubats de nitration sont dessalés puis chromatographiés sur le copolymère de β -CD. Seules les fractions retenues sont analysées.

La courbe en pointillés (—) représente la différence entre les activités résiduelles mesurées après nitration avec ou sans acarbose.

b) Linéarisations des cinétiques (caractéristiques de cinétiques d'ordre 2), permettant la comparaison des vitesses de perte d'activité (pentes des droites) influencées par la présence des effecteurs lors de la nitration.

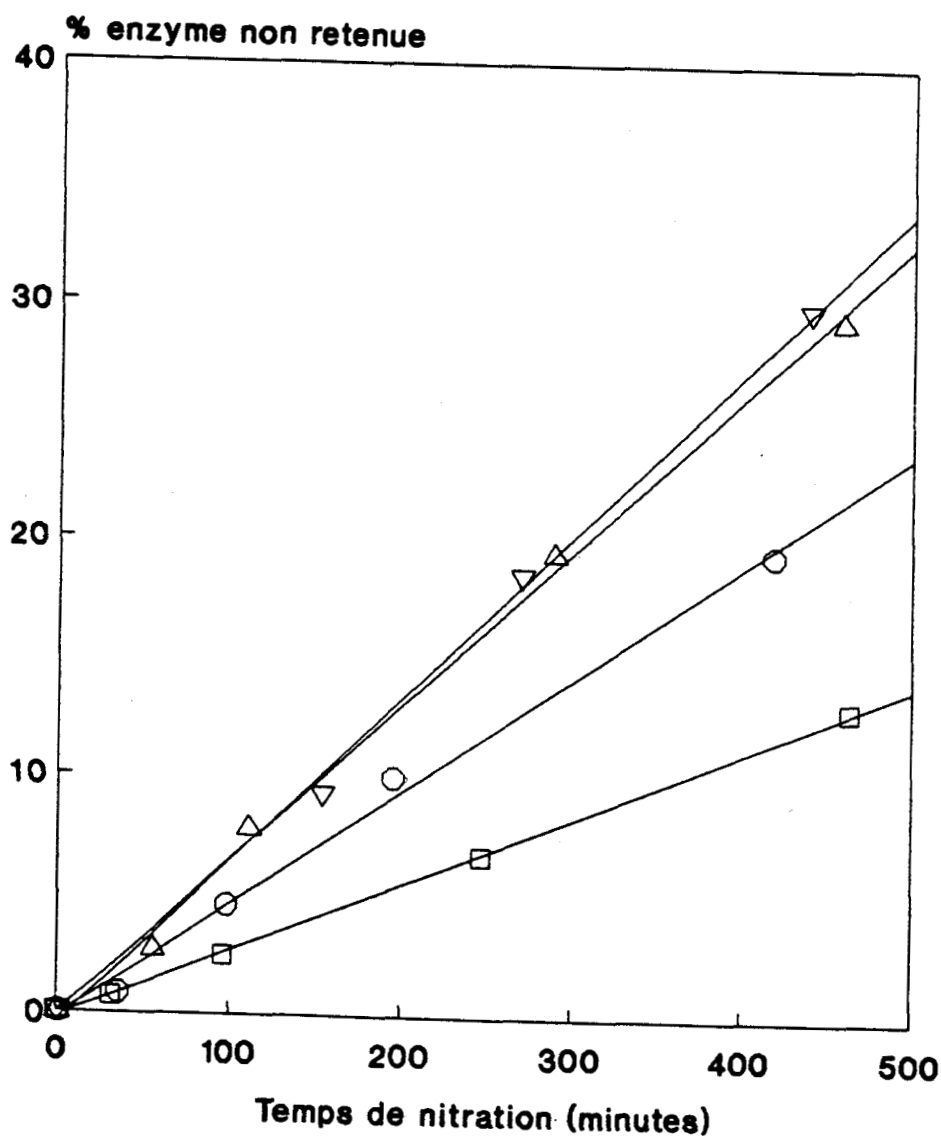


Figure n°26

Etude cinétique de l'apparition d'une fraction enzymatique non retenue sur copolymère de β -CD lors de la nitration par le TNM 20 mM de l'enzyme seule (\square — \square), ou en présence de salicine (O—O), en présence d'acarbose (∇ — ∇), ou en présence de salicine et d'acarbose (Δ — Δ).

Les prélèvements effectués dans les incubats de nitration sont immédiatement dessalés avant d'être chromatographiés sur le copolymère de β -CD.

nitration. On peut constater que la présence d'un accepteur (salicine) lors de la nitration accélère le phénomène d'un facteur 1,7, et celle de l'acarbose (avec ou sans accepteur) d'un facteur 2,4.

L'apparition d'une fraction enzymatique non retenue sur copolymère de β -CD au cours de la nitration de l'enzyme correspond à un phénomène indépendant de celui observé par la perte d'activité, puisque :

1- l'acarbose a une influence antagoniste sur les deux effets mesurés,

2- les cinétiques d'apparition des deux phénomènes ne sont pas du même type.

La figure 27 (p.126) superpose les droites $S/v = f(S)$ obtenues pour l'enzyme après différents temps de nitration (fractions retenues sur copolymère de β -CD). Il apparaît clairement que seule la V_{max} est altérée par la modification de l'enzyme. En effet, les k_{cat} des fractions retenues sur copolymère de β -CD de l'enzyme native, ou après 96, 247, et 463 minutes de nitration par le TNM 20 mM sont respectivement de 12,3 - 6,63 - 3,74 et 2,34 min^{-1} , alors que les K_M sont constants à 0,39 % (p/v) d'amidon soluble.

Enfin, pour un même temps de nitration, la V_{max} résiduelle est la même pour les enzymes nitrées retenue et non retenue sur le copolymère de β -CD (Fig.28, p.127). Seule une légère augmentation du K_M (0,5 % (p/v) d'amidon soluble au lieu de 0,4 %) permet de différencier la fraction non retenue de la fraction retenue après nitration. Ce résultat confirme donc que la non rétention sur copolymère de β -CD et la perte d'activité engendrées par la nitration de l'enzyme sont des phénomènes indépendants.

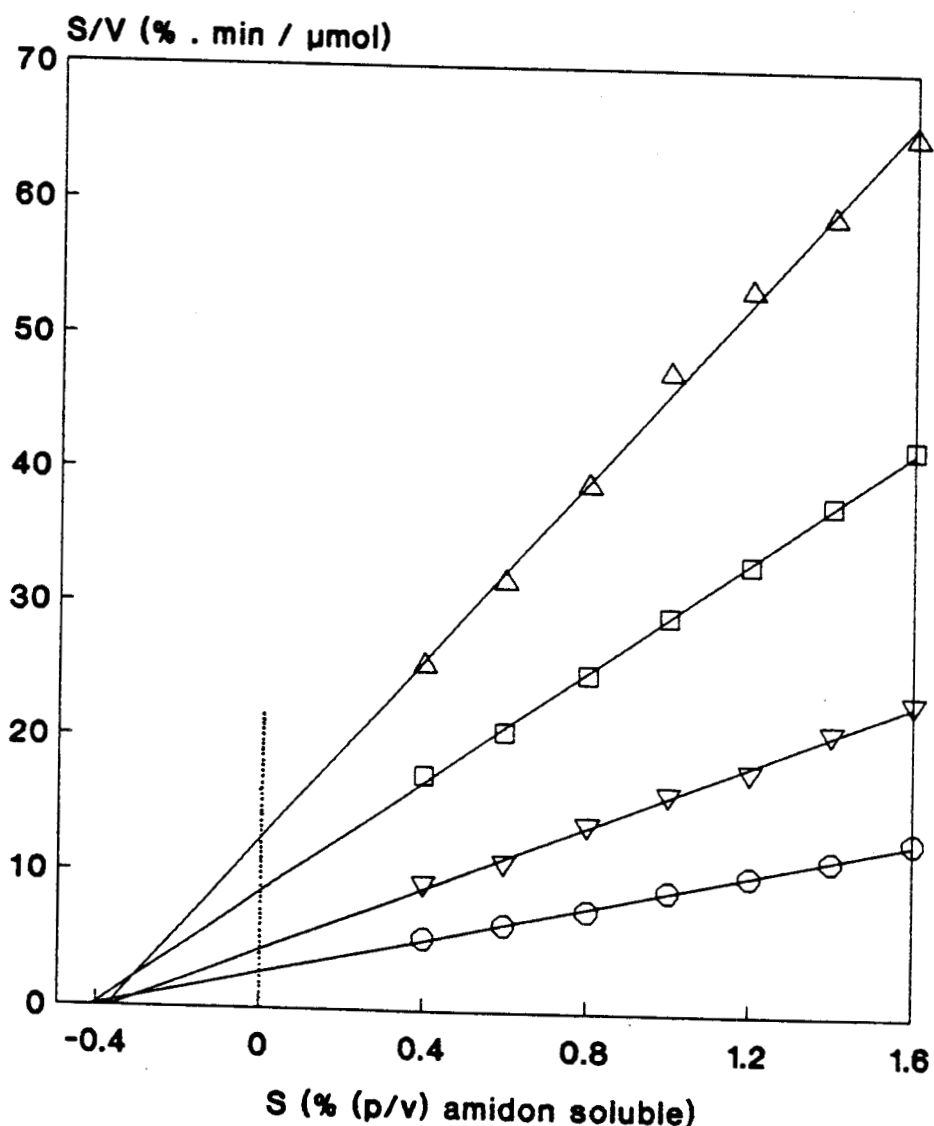


Figure n°27

Influence du temps de nitration (TNM 20 mM) sur les paramètres cinétiques (K_M et V_{max}) de l'enzyme, déterminés par l'analyse des droites $S/v = f(S)$. Enzyme: 1 $\mu\text{g/ml}$; substrat: amidon soluble.

Des prélèvements sont effectués après 0 (O—O), 96 (∇ — ∇), 247 (\square — \square), et 463 (Δ — Δ) minutes de nitration et immédiatement dessalés puis chromatographiés par affinité sur le copolymère de β -CD. Les déterminations sont effectuées à partir des fractions retenues ramenées à 10 $\mu\text{g/ml}$.

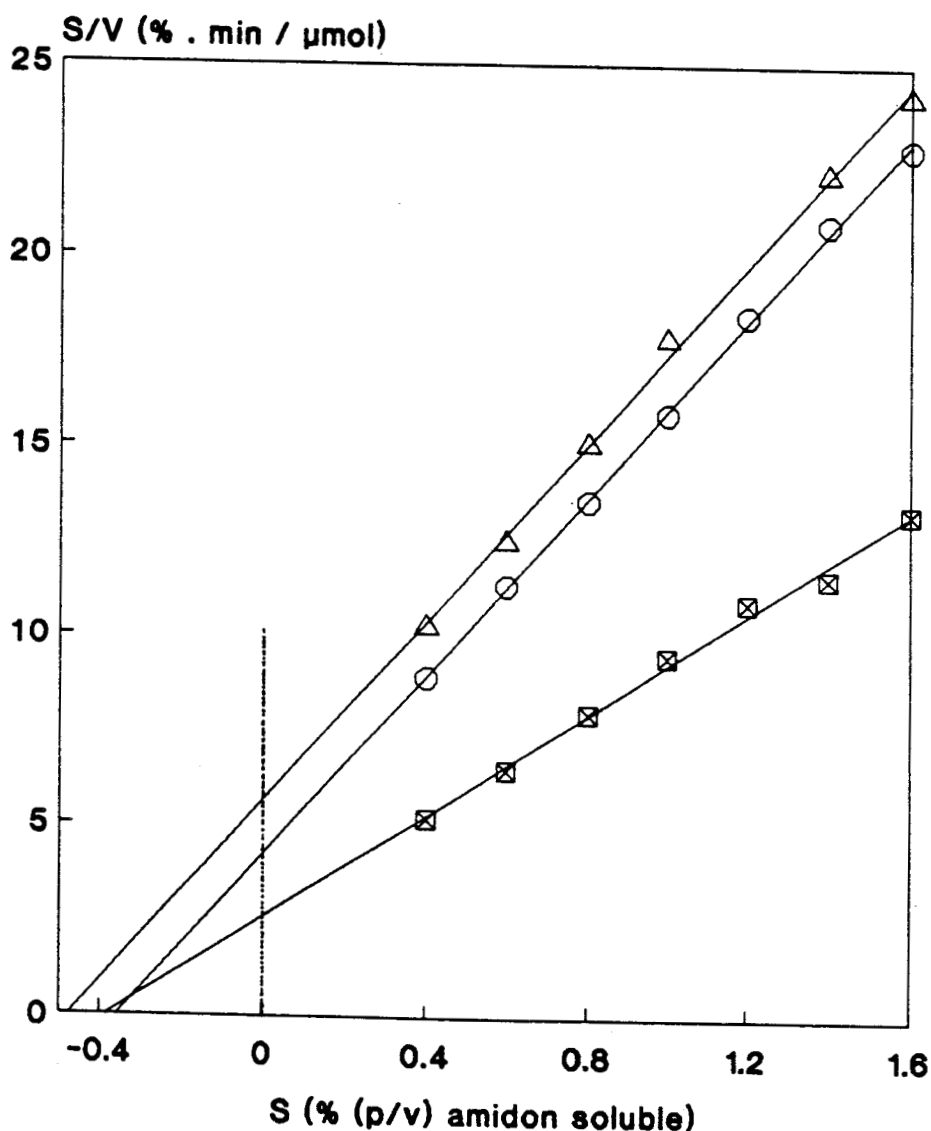


Figure n°28

Comparaison des paramètres cinétiques (K_M et V_{max}) des fractions retenue (O—O) et non retenue (Δ — Δ) sur le copolymère de β -CD de l'enzyme déssalée après 431 minutes de nitration (TNM 20 mM), et de la fraction retenue obtenue par chromatographie du témoin sans TNM (■—■).

Enzyme: 1 μ g/ml; substrat: amidon soluble.

La nitration est effectuée en présence d'acarbose 5 mM de manière à augmenter la quantité d'enzyme nitrée non-retenue sur copolymère de β -CD (Cf. texte). Le témoin est préparé en conséquence.

2- Influence de la nitration de l'enzyme par des concentrations croissantes en TNM.

Cette étude nous a permis d'obtenir des préparations d'enzyme avec des proportions croissantes en résidus 3-nitrotyrosyles, et en quantités suffisantes pour permettre diverses mesures physico-chimiques. En plus des mesures d'activité résiduelle et de rétention de l'enzyme nitrée sur le copolymère de β -CD, nous avons mesuré, pour chaque échantillon, le nombre de résidus 3-nitrotyrosyles formés. Une analyse spectrofluorimétrique a été également réalisée. Celle-ci nous a montré que la nitration des résidus tyrosyles de l'enzyme aboutit à une perte quasi-totale et proportionnelle de la fluorescence du tryptophane.

2-a- Comparaison globale des effets mesurés après nitration.

La figure 29 (p.129) résume et compare les différents effets mesurés à partir des fractions d'enzyme nitrée retenues sur copolymère de β -CD.

La nitration de l'enzyme aboutit à l'apparition d'un maximum de 15 résidus 3-nitrotyrosyles (sur 28 résidus dosés). Ce maximum est atteint à partir de 8 mM en TNM. Pour chaque concentration en TNM utilisée, le nombre de résidus 3-nitrotyrosyles des fractions enzymatiques retenue et non retenue sur le copolymère de β -CD est le même (résultat non montré).

Les courbes d'activité et de fluorescence résiduelles de l'enzyme sont parfaitement superposables et on peut les relier directement au profil d'apparition des résidus 3-nitrotyrosyles. Ce n'est pas le cas pour la courbe de rétention résiduelle de l'enzyme sur le copolymère de β -CD : celle-ci présente une allure différente.

Ces résultats montrent que la perte d'activité et la perte de fluorescence du tryptophane, engendrées par la nitration de l'enzyme, mesurent le même phénomène, directement lié au nombre de

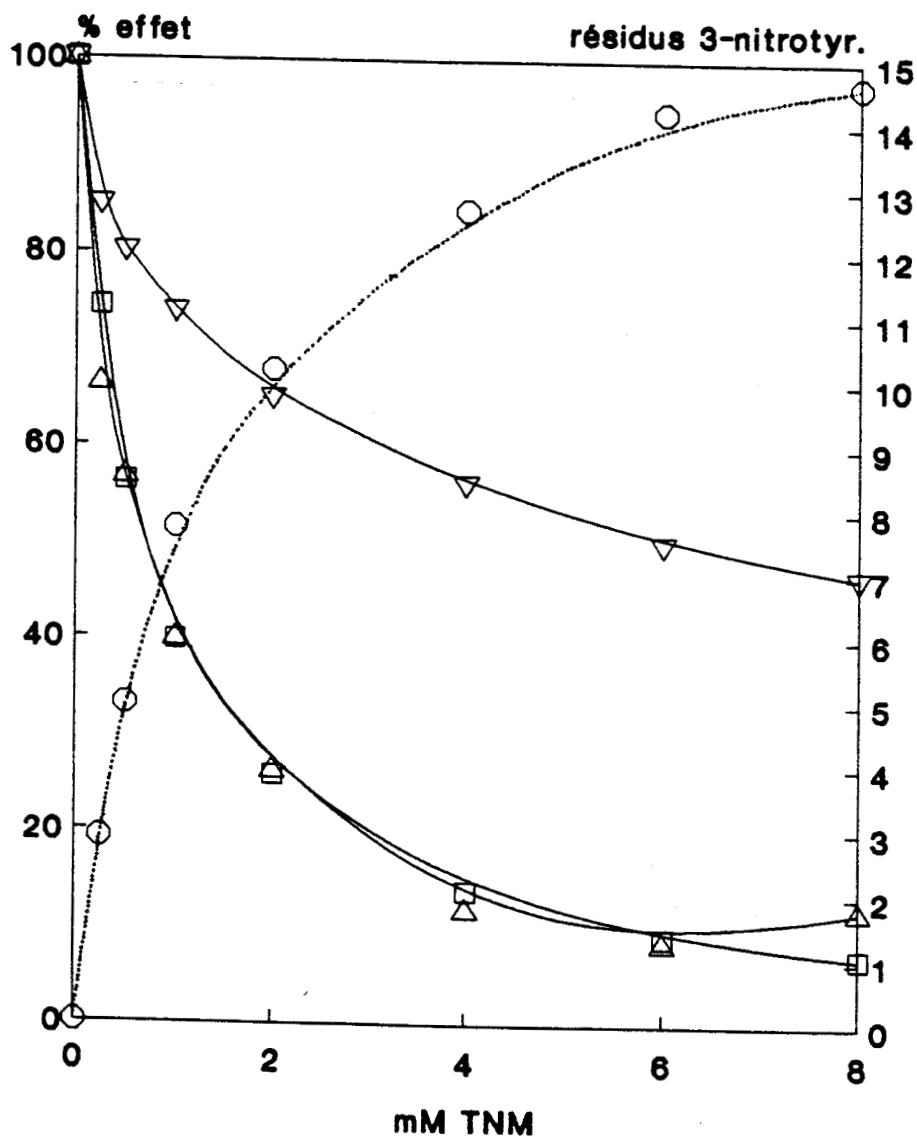


Figure n°29

Effets comparés de la nitration de l'enzyme sur différents paramètres, en fonction de la concentration en TNM utilisée : nombre de résidus 3-Nitrotyrosyles (O—O); activité cyclisante résiduelle (Δ — Δ); fluorescence résiduelle du tryptophane après excitation à 295 nm (\square — \square); rétention résiduelle en chromatographie d'affinité sur copolymère de β -CD (∇ — ∇).

Après 18 heures de nitration, l'enzyme est dessalée puis chromatographiée sur copolymère de β -CD. Les mesures sont effectuées à partir des fractions retenues sur la matrice.

résidus 3-nitrotyrosyles formés, alors que la perte d'affinité de l'enzyme sur copolymère de β -CD est un phénomène indépendant induit secondairement par la nitration.

2-b- Influence de la nitration sur la perte de fluorescence de l'enzyme.

La figure 30 (p.131) montre que l'intensité de fluorescence du tryptophane de l'enzyme nitrée décroît pour des concentrations croissantes en TNM. Ces spectres sont obtenus à partir d'échantillons d'enzyme nitrée retenue sur le copolymère de β -CD.

Les figures 31^a et 31^b (p.132) permettent une meilleure interprétation de ces spectres en comparant, à des échelles appropriées, la fluorescence du tryptophane (a) ou de l'ensemble tryptophane + tyrosine (b) pour l'enzyme native ou pour les fractions retenue et non retenue sur copolymère de β -CD de l'enzyme nitrée par le TNM 8 mM.

- fluorescence du tryptophane.

A quantité égale de tryptophane, l'enzyme native fluoresce 8 fois plus ($0,36 \mu\text{M}^{-1}$ Trp) qu'une solution de L-tryptophane ($0,045 \mu\text{M}^{-1}$). Ce résultat suggère un transfert de fluorescence de résidu(s) tyrosyle(s) sur résidu(s) tryptophanyle(s) (HENICHART, communication personnelle). La perte globale de fluorescence du tryptophane accompagnant la nitration de l'enzyme correspond donc à l'annulation d'un transfert de fluorescence (Tyr \rightarrow Trp) soit par transformation de résidus tyrosyles en résidus 3-nitrotyrosyles, soit par un changement conformationnel aboutissant à l'éloignement des deux chromophores. Après nitration de l'enzyme par le TNM 8 mM, cette perte correspond à une diminution de 92 % de l'intensité de fluorescence du tryptophane pour l'enzyme nitrée retenue sur copolymère de β -CD, et de 95 % pour l'enzyme non retenue. Ainsi, l'intensité de fluorescence ramenée à la quantité de tryptophane devient respectivement $0,03 \mu\text{M}^{-1}$ et $0,02 \mu\text{M}^{-1}$, ce qui nous

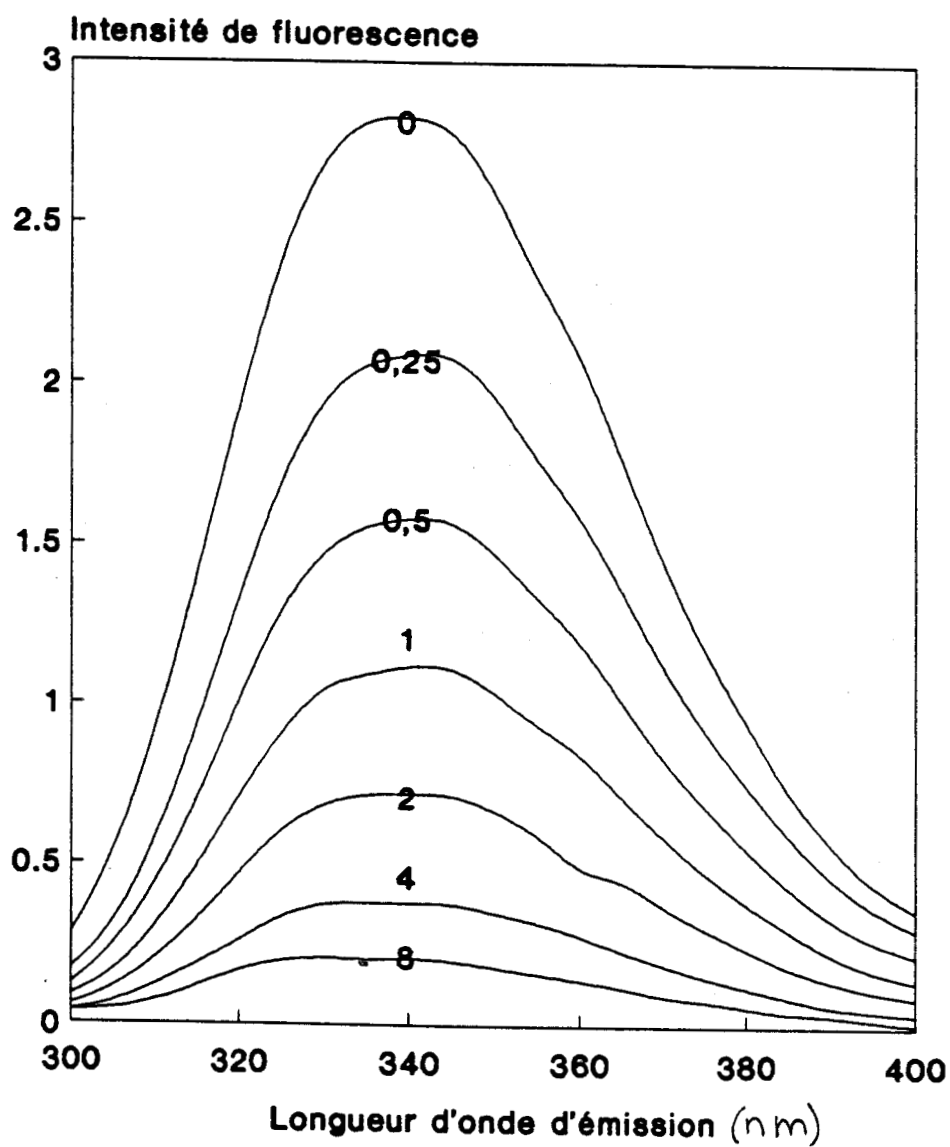


Figure n°30

Spectres de fluorescence du tryptophane de l'enzyme (50 $\mu\text{g/ml}$) retenue sur copolymère de $\beta\text{-CD}$ après 18 heures de nitration des résidus tyrosyles par le TNM 0 - 0,25 - 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8 mM. Excitation à 295 nm.

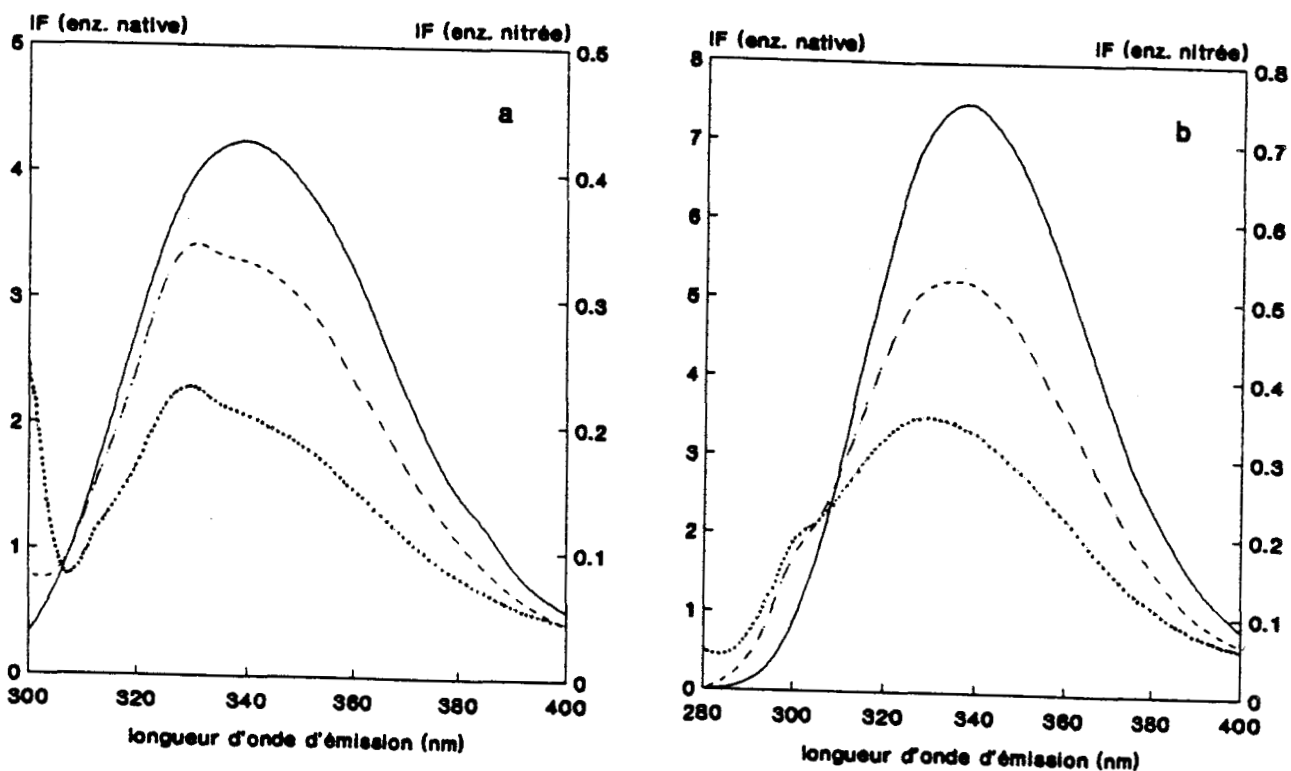


Figure n°31

Détails des spectres de fluorescence du tryptophane (a) et de l'ensemble tryptophane + tyrosine (b) de l'enzyme (50 μ g/ml) retenue (-----) et non retenue (—) sur copolymère de β -CD après 18 heures de nitration par le TNM 8 mM, et comparaison avec les spectres de l'enzyme native (—) témoin.

IF : intensité de fluorescence.

Excitation à 295 nm (a) ou 273 nm (b).

rapproche de la valeur obtenue pour le tryptophane libre ($0,045 \mu\text{M}^{-1}$).

D'un point de vue qualitatif, le spectre de fluorescence du tryptophane de l'enzyme native est caractéristique d'un compromis entre tryptophanes de surface et tryptophanes enfouis, car on observe un maximum d'émission à 340 nm avec un pic de 55 nm de largeur à mi-hauteur (ALBANI, communication personnelle). La nitration de l'enzyme par le TNM 8 mM entraîne un déplacement de 11,5 nm vers l'UV ($\lambda_{\text{max}} = 328,5 \text{ nm}$), correspondant à une prépondérance de la fluorescence des tryptophanes enfouis. Il est donc probable que le(s) résidu(s) tryptophanyle(s) bénéficiant d'un transfert de fluorescence se trouve(nt) à la surface de la protéine.

- Fluorescence de la tyrosine.

Après excitation à 273 nm de l'enzyme native (Fig.31^b), la fluorescence de la tyrosine n'est pas visualisée et seule la fluorescence du tryptophane apparaît ($\lambda_{\text{max}} = 338 \text{ nm}$). Ce phénomène est classique en cas de transfert d'énergie (Tyr → Trp) ou suite à une inhibition de la fluorescence de la tyrosine par les résidus voisins. Cependant, après nitration de l'enzyme par le TNM 8 mM, la fluorescence de la tyrosine apparaît (épaulement caractéristique à 302 nm). Ceci confirme l'existence du transfert de fluorescence (Tyr → Trp) pour l'enzyme native et sa disparition consécutive à la nitration.

- Différences de fluorescence entre les enzymes nitrées retenue et non retenue sur copolymère de β -CD.

La différence d'intensité de fluorescence du tryptophane des enzymes nitrées retenue et non-retenue sur le copolymère de β -CD est négligeable comparativement à l'intensité de fluorescence de l'enzyme native. Cependant, le tryptophane de l'enzyme nitrée non retenue fluoresce moins que pour l'enzyme nitrée retenue

(intensité diminuée au deux tiers). D'autre part, la fluorescence de la tyrosine est la même pour les deux populations d'enzyme nitrée et nous savons déjà que le nombre de résidus 3-nitrotyrosyles est le même dans les deux cas. Ce résultat suggère que la perte d'affinité de l'enzyme nitrée pour le copolymère de β -CD pourrait être due à une réaction secondaire entraînant la nitration d'un ou plusieurs résidu(s) tryptophanyle(s) (RIORDAN et al., 1972) avec une altération consécutive du site de fixation de l'amidon cru (Cf. p.109).

2-c- Mise en évidence par dichroïsme circulaire d'une altération de la conformation de l'enzyme lors de sa nitration.

La figure 32^a (p.135) compare les spectres de dichroïsme circulaire de l'enzyme avant et après nitration par le TNM 8 mM, dans une région permettant l'analyse des structures secondaires de la chaîne polypeptidique. L'allure des deux pics enregistrés pour l'enzyme native (212 nm et maximum à 220 nm) est caractéristique d'une succession de feuillets β et d'hélices α dans un même domaine (domaine A : tonneau $(\alpha\beta)_8$). L'analyse d'une telle structure en dichroïsme circulaire est même "académique" avec l'exemple de la Triose Phosphate Isomérase donnant les mêmes pics à 211 et 220 nm (BRAHMS & BRAHMS, 1980). Il apparaît très nettement qu'après nitration de l'enzyme, les spectres prennent une allure différente dans cette même région : le signal est moins intense et ne donne plus qu'un pic global à 219 nm. Cette diminution de l'ellipticité nous indique que la nitration de l'enzyme entraîne une légère perte de la structure secondaire de sa chaîne polypeptidique, donc : une modification de sa conformation. Le pic à 219 nm est rigoureusement identique pour les enzymes nitrées retenue et non retenue sur copolymère de β -CD. Ce résultat suggère que la perte d'affinité de l'enzyme pour le copolymère induite par la nitration semble indépendante de cette modification de conformation.

La figure 32^b (p.135) compare les régions 250-320 nm des

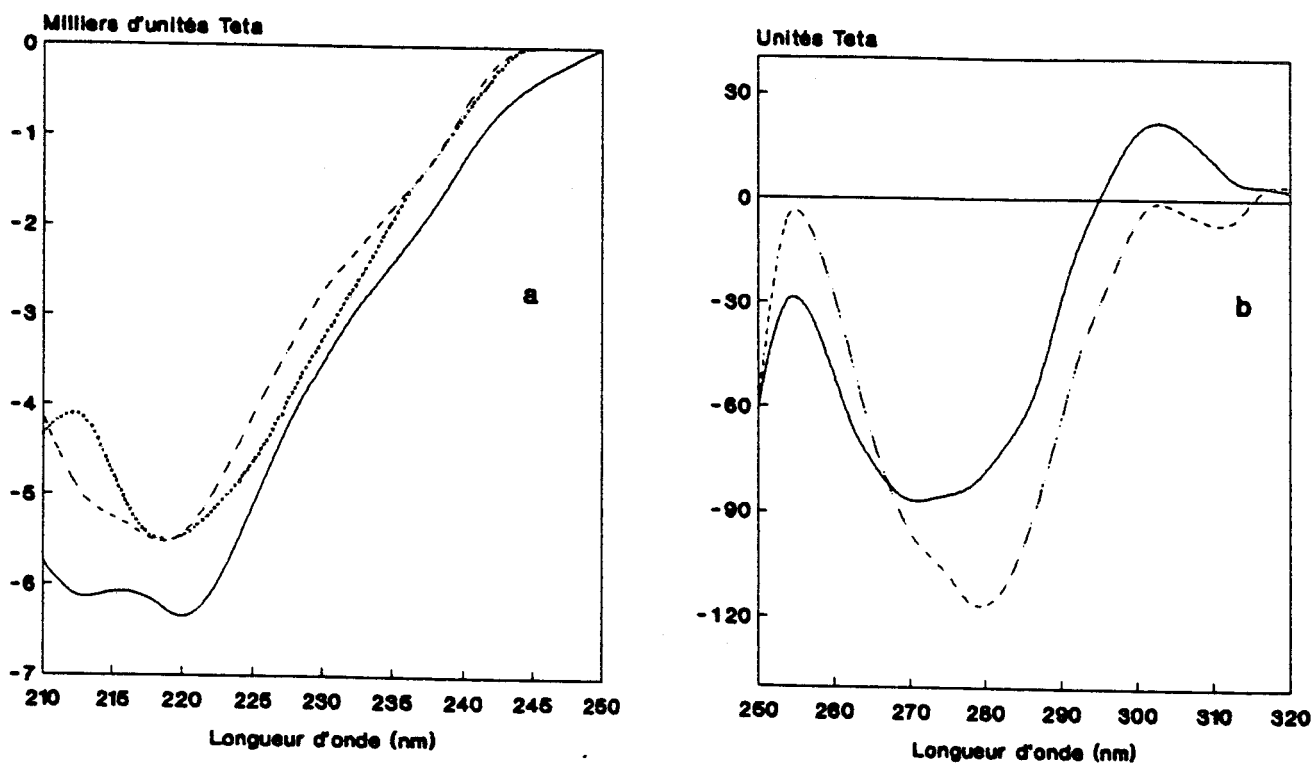


Figure n°32

Spectres de dichroïsme circulaire dans la région 210-250 nm (a) et 250-320 nm (b) de l'enzyme (50 $\mu\text{g/ml}$) retenue (-----) et non retenue (—) sur copolymère de $\beta\text{-CD}$ après 18 heures de nitration par le TNM 8 mM, et comparaison avec les spectres du témoin enzyme native (.....). Le spectre du tampon est retranché dans tous les cas.

Unité Têta : $[\theta]$ deg $\text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$. Chemin optique : 0,1 cm.

spectres de dichroïsme circulaire de l'enzyme avant et après nitration par le TNM 8 mM, de manière à visualiser l'environnement conformationnel du tryptophane (≈ 280 nm). La différence entre enzyme native et enzyme nitrée apparaît clairement dans cette région, tant en intensité d'ellipticité qu'en longueur d'onde. L'environnement conformationnel de certains résidus tryptophanyles a donc changé au cours de la nitration de l'enzyme. Ce résultat est compatible avec l'annulation du transfert de fluorescence (Tyr \rightarrow Trp) par éloignement des résidus impliqués.

3- Effet protecteur des effecteurs (salicine et/ou acarbose) lors de la nitration de l'enzyme.

3-a- Activité résiduelle et nombre de résidus 3-nitrotyrosyles.

Le tableau VI (p.137) compare les résultats obtenus quand la nitration de l'enzyme par le TNM 4 mM a lieu en présence ou en absence des effecteurs. L'activité résiduelle et le nombre de résidus 3-nitrotyrosyles sont mesurés sur les fractions d'enzyme nitrée retenues sur copolymère de β -CD. Comme déjà observé lors de l'étude cinétique de la nitration (Cf. p.121), seule la présence d'acarbose, avec ou sans accepteur, permet de préserver une partie (ici 40 à 50 %) de l'activité vis-à-vis de la nitration. Cette protection s'accompagne de la non-nitration d'un résidu tyrosyle.

Ce résultat suggère qu'un résidu tyrosyle situé dans le site actif de l'enzyme a un rôle important et qu'il contribue pour 50 à 60 % de l'efficacité de l'acte catalytique.

3-b- Fluorescence résiduelle.

La figure 33 (p.138) montre que l'effet protecteur de l'acarbose présent lors de la nitration est également répercuté sur la fluorescence résiduelle de l'enzyme nitrée retenue (Fig. 33^a) ou non retenue (Fig.33^b) sur copolymère de β -CD. En effet, si

Tableau VI

Effet protecteur des effecteurs (salicine et/ou acarbose, 0 ou 5 mM) lors de la nitration de l'enzyme par le TNM 4 mM. Après 18 heures de nitration, les incubats sont dessalés puis chromatographiés par affinité sur copolymère de β -CD. Les mesures sont effectuées à partir des fractions retenues sur la matrice et comparées aux témoins sans TNM.

effecteurs présents lors de la nitration	% activité résiduelle	nombre de résidus 3-nitrotyrosyles
sans effecteur	16,3	11,7
salicine	17,6	11,6
acarbose	63,0	10,5
salicine + acarbose	51,2	10,8

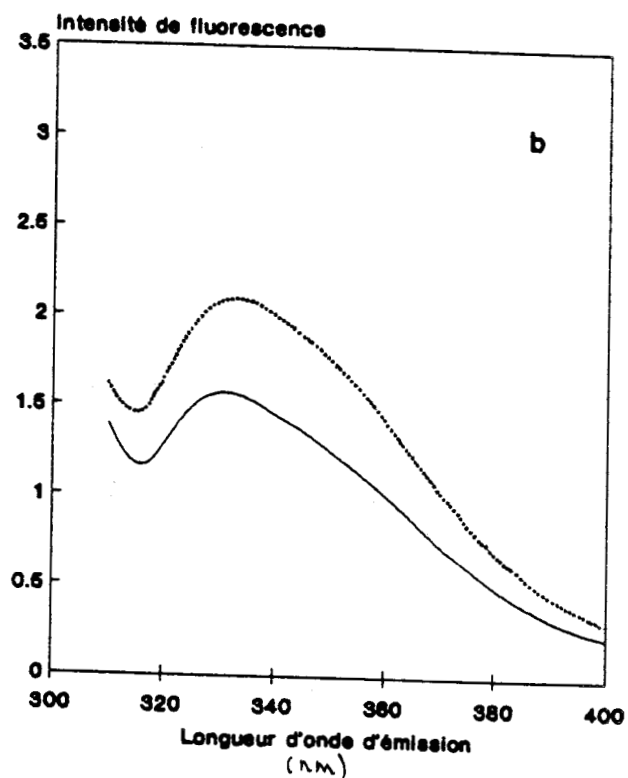
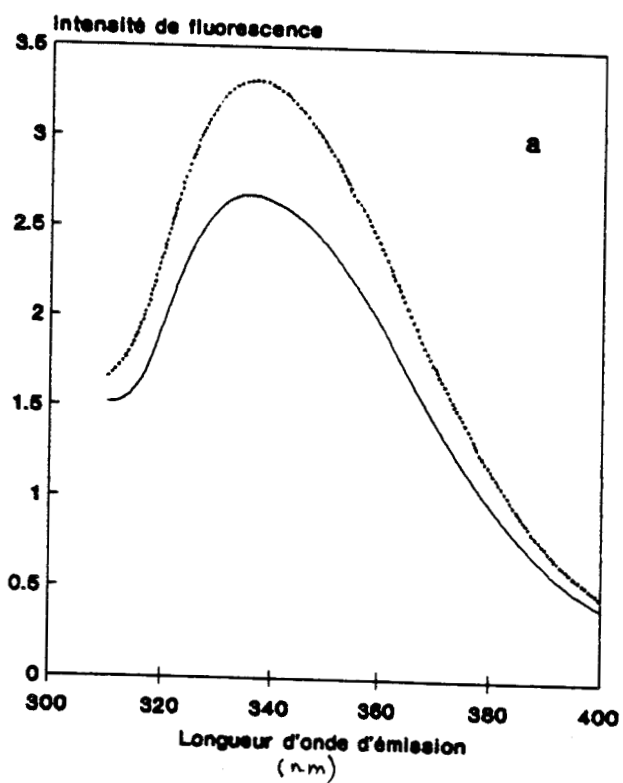


Figure n°33

Spectres de fluorescence du tryptophane de l'enzyme (10 $\mu\text{g/ml}$) retenue (a) et non retenue (b) sur copolymère de $\beta\text{-CD}$ après 18 heures de nitration par le TNM 4 mM en absence (—) ou en présence (—) d'acarbose 5 mM, puis dessalage. Excitation à 295 nm.

la perte globale de fluorescence (respectivement 92 et 95 %) a toujours lieu, un gain de 25 à 30 % de fluorescence est observé dans les deux cas par rapport à l'enzyme nitrée sans acarbose. Ce phénomène illustre la faible contribution du résidu tyrosyle protégé par l'acarbose sur la fluorescence globale du tryptophane de l'enzyme. D'autre part, il confirme que la non rétention sur copolymère de β -CD de l'enzyme nitrée est indépendante de la nitration du résidu tyrosyle situé dans le site actif.

4- Discussion.

La protection par l'acarbose d'un résidu tyrosyle vis-à-vis de la nitration, accompagnée d'un maintien de 40 à 50 % d'activité met en évidence l'importance d'une tyrosine dans le site actif de l'enzyme. Cette tyrosine ne semble pas impliquée dans le site de l'accepteur, comme le suggère l'absence d'effet protecteur de la salicine lors de la nitration.

Malheureusement, la perte d'activité directement liée à la nitration de cette tyrosine est masquée dans un phénomène global d'inactivation de l'enzyme (Cf. p.121) engendré par la nitration d'autres parties de la protéine. Les analyses fluorimétriques et de dichroïsme circulaire de l'enzyme lors de sa nitration suggèrent que cette perte globale d'activité doit être reliée à une altération de la conformation de la protéine nitrée par rapport à la protéine native. Quoiqu'il en soit, il en résulte que l'étude de la tyrosine impliquée dans le site actif par nitration au TNM est techniquement inexploitable.

Cette altération de la conformation de l'enzyme nitrée et plus particulièrement les changements intervenus dans l'environnement de certains résidus tryptophanyles, suffisent à expliquer la perte de 92 % de fluorescence du tryptophane faisant suite à la disparition d'un transfert de fluorescence par l'éloignement des résidus tyrosyles et tryptophanyles impliqués. Cependant, on ne peut exclure une disparition de ce transfert par simple nitration d'un (des) résidu(s) tyrosyles donneur(s).

Un phénomène secondaire apparaît également lors de la nitration et concerne la perte d'affinité de l'enzyme nitrée pour le copolymère de β -CD. Cette perte (incomplète) de l'affinité pour le copolymère est indépendante du phénomène global de perte de l'activité de l'enzyme, et n'est pas directement liée à l'apparition des résidus 3-nitrotyrosyles. Cette indépendance peut être visualisée par la comparaison du nombre de résidus 3-nitrotyrosyles et de la fluorescence des enzymes nitrées retenue ou non-retenue, ainsi que par les cinétiques de nitration ou l'influence contradictoire des effecteurs lors de la nitration. Par contre, ces mêmes résultats suggèrent que cette diminution de l'affinité de l'enzyme nitrée pour le copolymère de β -CD est la conséquence d'une altération du site de fixation pour l'amidon cru (Cf. p.104) induite par la nitration de résidu(s) tryptophanyle(s). En effet, la nitration du tryptophane est une réaction secondaire que l'on peut rencontrer lors de l'utilisation de fortes concentrations en TNM (RIORDAN & VALLEE, 1972).

Enfin, l'accélération du phénomène secondaire de diminution de l'affinité de l'enzyme nitrée pour le copolymère de β -CD, observée lorsque la nitration a lieu en présence des effecteurs du site actif, peut s'expliquer par la proximité des deux sites (Cf. p.109). Ainsi, les événements liés au site actif entraîneraient-ils une répercussion sur le site de fixation de l'amidon cru.

En conclusion, nous avons pu mettre en évidence le rôle important d'une tyrosine dans le site actif. Au vu des nombreux effets secondaires accompagnant la nitration de cette tyrosine par le TNM, nous avons soulevé le problème des limites d'utilisation de cette technique, et surtout la prudence nécessaire à l'interprétation des résultats.

IV-E- INFLUENCE DE L'ETHOXYFORMYLATION DES RESIDUS HISTIDYLES DE L'ENZYME PAR LE DIETHYLPYROCARBONATE (DEP).

1- Effet de la modification chimique sur l'activité enzymatique.

La modification chimique de l'enzyme par le DEP entraîne une rapide perte de son activité (Fig.34, p.142). L'activité pseudo-dextrinifiante de l'enzyme modifiée est altérée de la même façon que l'activité cyclisante. Cette inactivation semble suivre une cinétique d'ordre 2, comme le suggère la linéarité de la relation

$$(\% \text{ activité résiduelle})^{-1} - (100)^{-1} = kt,$$

avec une constante de vitesse $k = 2,07 \text{ min}^{-1}$ et un temps de demi-vie d'inactivation $\tau_{1/2} = 0,48$ minutes, pour une réaction en présence de DEP 2,5 mM, à 20°C.

L'affinité de l'enzyme modifiée pour le copolymère de β -CD n'est absolument pas altérée, après 1, 6, ou 35 minutes de réaction avec le DEP 1 mM, à 20°C, pH 7,0. En effet, les profils chromatographiques sont rigoureusement identiques à celui obtenu pour l'enzyme native : aucune fraction non retenue n'est détectée et l'enzyme est toujours éluee à $2,33 \pm 0,04$ mM β -CD dans le gradient (non montré). De plus, seul le k_{cat} de ces fractions éluees d'enzyme modifiée diminue (respectivement 13,5 - 9,7 - 4,6 min^{-1} après 0 - 1 - 6 minutes de modification par le DEP) sans aucune modification de K_M (0,39 % (p/v) amidon soluble) (Fig.35, p.143).

Enfin, quelles que soient les conditions de modification par le DEP, environ 95 % de l'activité enzymatique initiale est retrouvée après hydrolyse des groupements éthoxyformyles par traitement à l'hydroxylamine de l'enzyme modifiée. Donc, selon le concept de MELCHIOR & FARHNEY (1970), l'inactivation de l'enzyme par traitement au DEP peut être corrélée à la modification de résidu(s) histidyle(s).

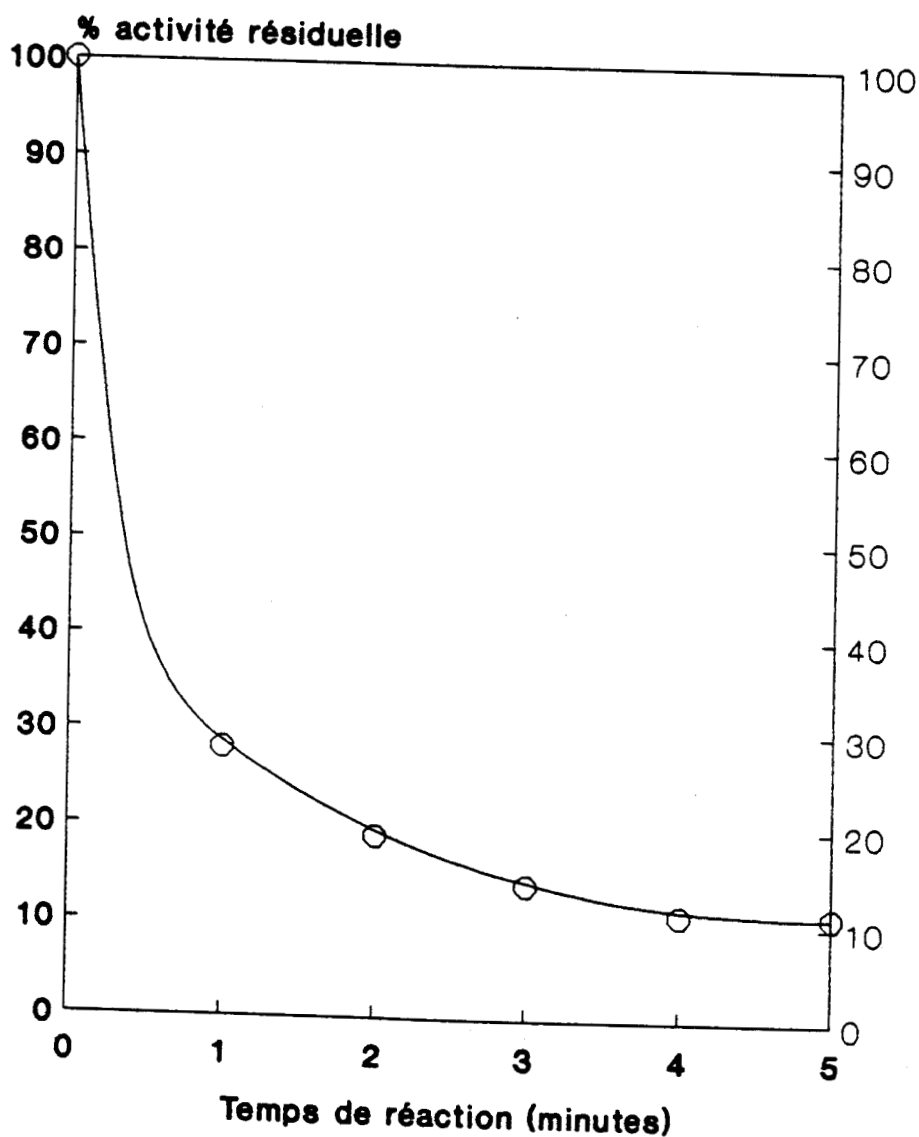


Figure n°34

Etude cinétique de l'influence de l'éthoxyformylation de l'enzyme ($14,2 \mu\text{M}$) par le DEP $2,5 \text{ mM}$, à 20°C , pH $6,2$, sur l'activité enzymatique résiduelle. La réaction est stoppée par dilution de l'incubat réactionnel en présence de L-histidine 20 mM .

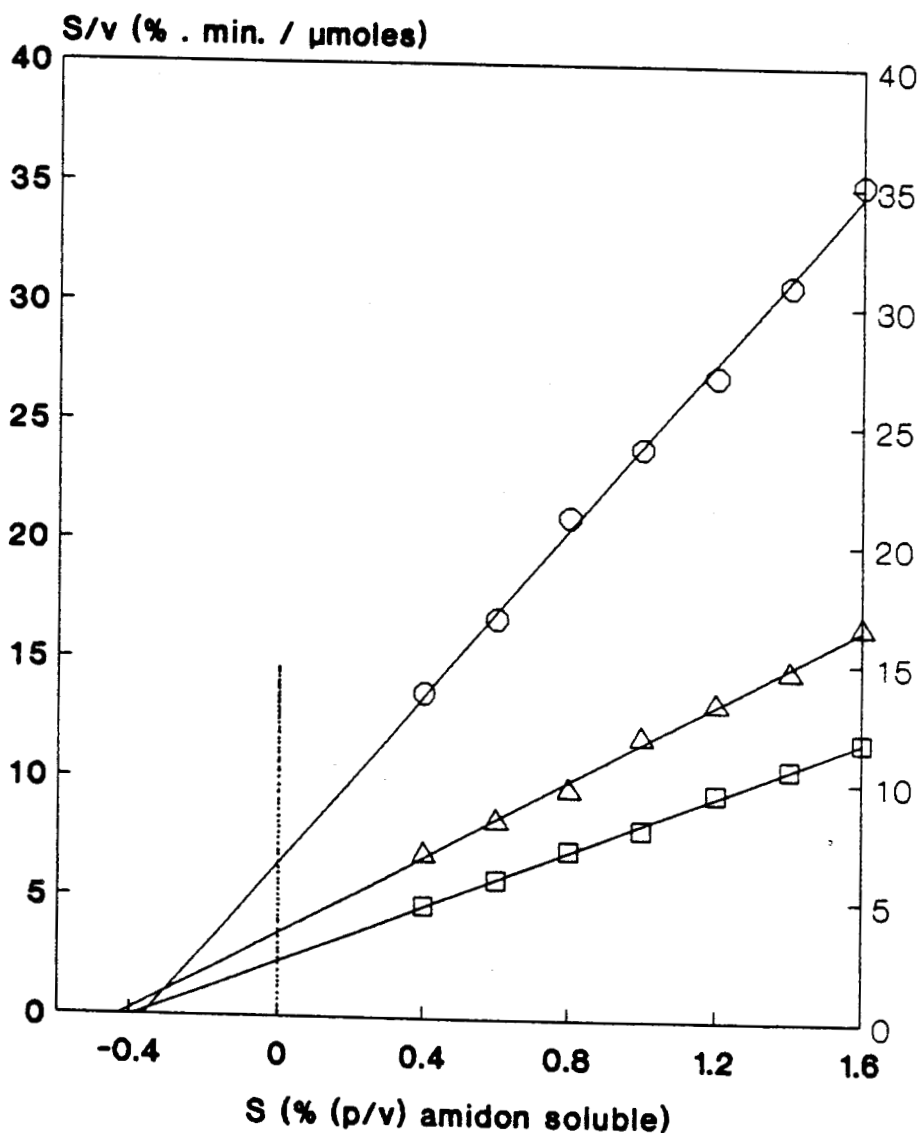


Figure n°35

Influence de l'éthoxyformylation de l'enzyme ($14,2 \mu\text{M}$) par le DEP 1 mM , à 20°C , pH $7,0$, sur les paramètres cinétiques (K_M et V_{max}) déterminés par l'analyse des droites $S/v = f(S)$.

L'éthoxyformylation est stoppée par dilution de l'incubat réactionnel en présence de L-histidine 20 mM . Les enzymes, native (□—□), ou après 1 minute (Δ—Δ) et 6 minutes (O—O) d'éthoxyformylation, sont purifiées sur copolymère de $\beta\text{-CD}$ puis dessalées. Les paramètres cinétiques sont déterminés sur amidon soluble (enzyme $1 \mu\text{g/ml}$).

2- Nombre de résidus histidyles modifiés et effet protecteur des effecteurs (salicine et/ou acarbose).

Lors d'une éthoxyformylation par le DEP à une concentration inférieure à 1,5 mM, le coefficient d'extinction molaire classique ($\epsilon_{240} = 3200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) peut être utilisé pour déterminer spectrophotométriquement le nombre de résidus éthoxyformyl-histidyles formés. Par contre, lors de l'utilisation du DEP à 2, 3, 4, et 5 mM, nous avons utilisé respectivement 3275, 3528, 3630, et 3672 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ comme coefficient d'extinction molaire. Ces valeurs ont été déterminées expérimentalement.

La figure 36 (p.145) illustre les variations typiques des différences d'absorbance à 240 nm de l'enzyme lors d'une expérience d'éthoxyformylation (ici, DEP 5 mM). Ces mêmes expériences ont été réitérées en utilisant différentes concentrations en DEP, de 0,25 à 5 mM, de manière à déterminer le nombre maximal de résidus histidyles réactifs. Les résultats sont illustrés par la figure 37 (p.146). Sept résidus histidyles sur les douze existant sont modifiés par le DEP 5 mM lors de l'éthoxyformylation de l'enzyme seule ou en présence de salicine 5 mM. Ce nombre chute à six résidus en présence d'acarbose 5 mM, et aboutit à cinq résidus lorsque salicine et acarbose sont tous deux présents lors de la modification. Cette protection de un ou de deux résidus est constante pour des concentrations en DEP comprises entre 2 et 5 mM.

Donc, l'addition d'un accepteur (salicine) lors de l'éthoxyformylation augmente l'effet protecteur de l'acarbose vis-à-vis des histidines puisqu'un résidu supplémentaire n'est pas modifié. Cette augmentation n'est pas due à un effet cumulatif car la salicine seule ne protège jamais de résidu histidyle, et ceci quelle que soit sa concentration.

En présence d'acarbose, la β -CD 5 mM peut jouer le même rôle que la salicine (protection d'un résidu histidyle supplémentaire par l'acarbose). Avec les concentrations utilisées en enzyme ($\approx 1 \text{ mg/ml}$), la β -CD est rapidement hydrolysée entraînant l'apparition

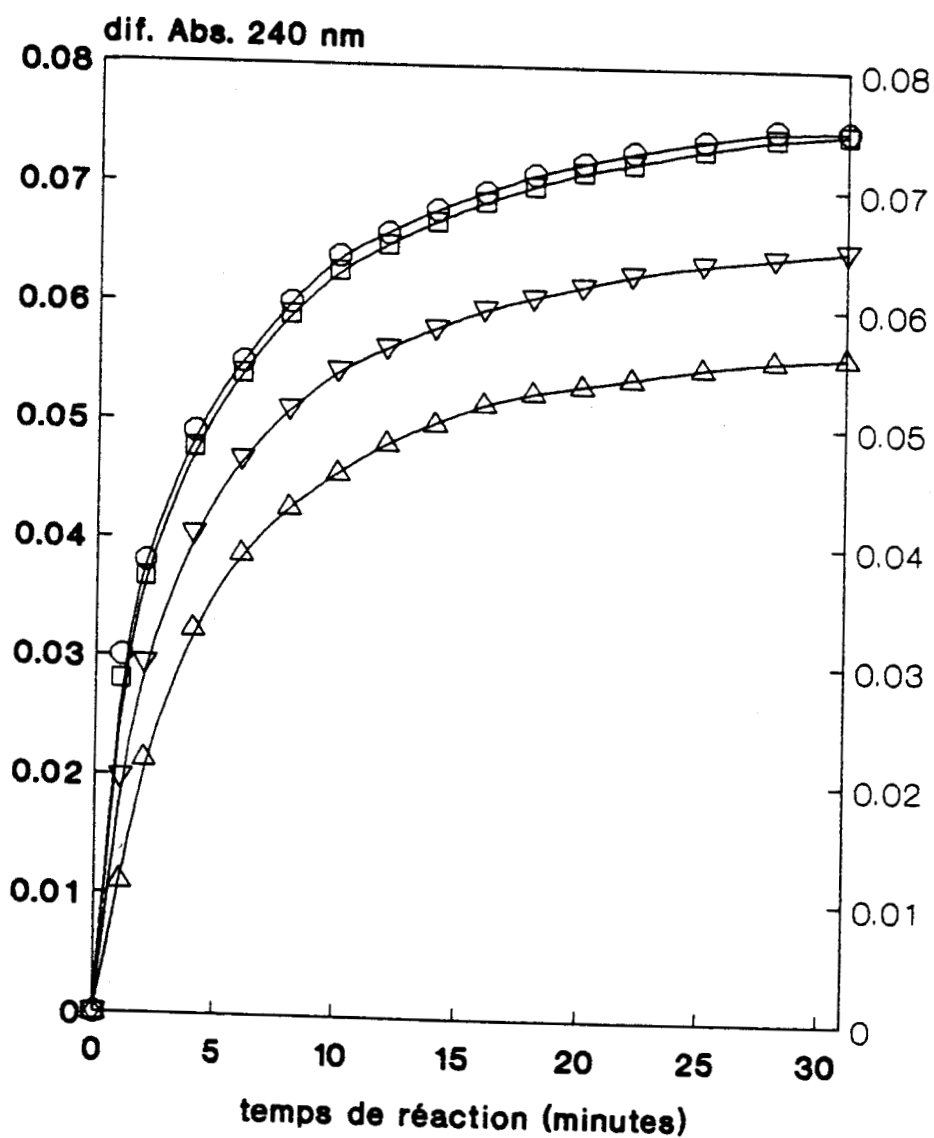


Figure n°36

Variation des différences d'absorbance à 240 nm lors de l'éthoxyformylation par le DEP (ici 5 mM) de l'enzyme (14,2 μM) seule (□—□), ou en présence de salicine (O—O), d'acarbose (▽—▽), de salicine et d'acarbose (Δ—Δ).

Les lignes de base obtenues sans enzyme sont retranchées.

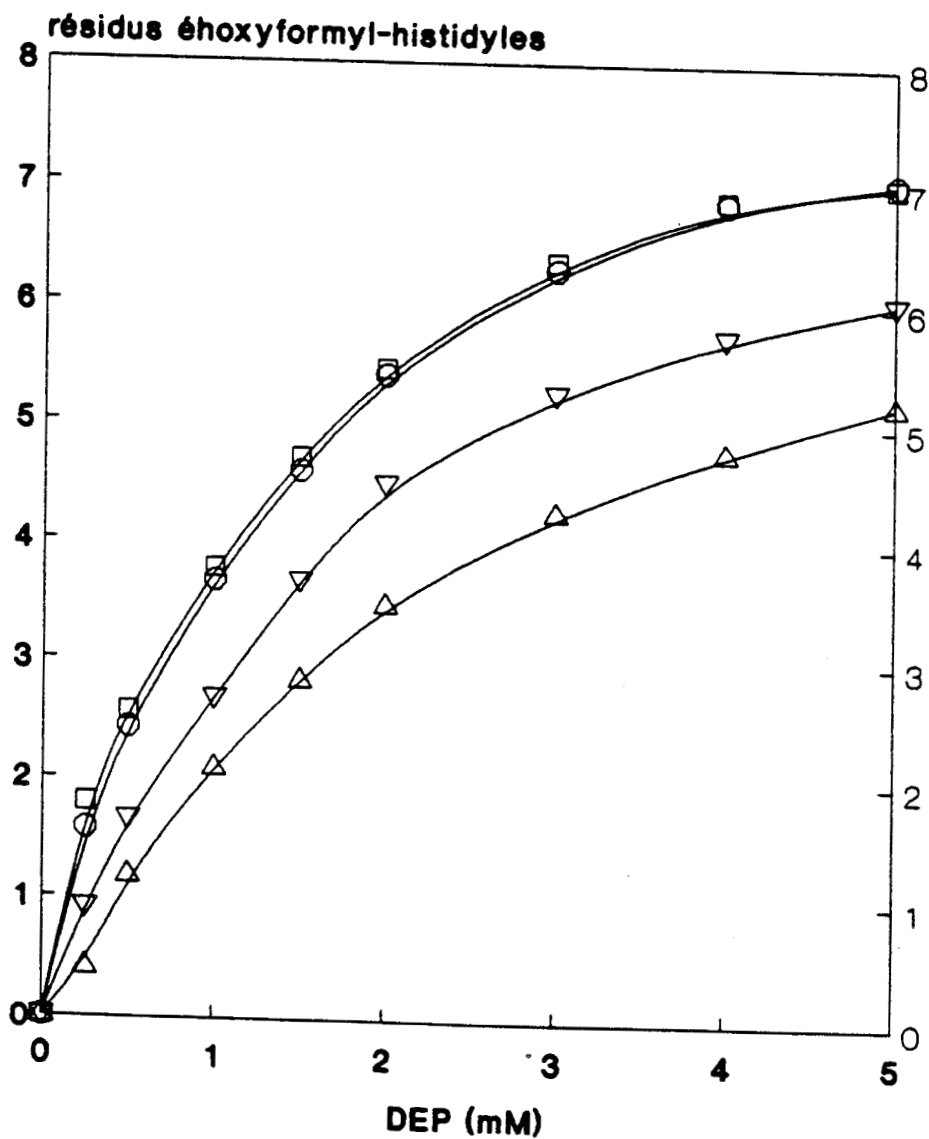


Figure n°37

Détermination du nombre de résidus éthoxyformyl-histidyles calculé par différence d'absorbance à 240 nm après 30 minutes de modification de l'enzyme (14,2 μ M) seule (□—□), ou en présence de salicycine (O—O), d'acarbose (▽—▽), de salicycine et d'acarbose (Δ—Δ), par des concentrations croissantes en DEP.

d'accepteurs par ouverture des cycles. Pour cette raison, l'effet protecteur de la β -CD seule n'a pu être mesuré. Cependant, en présence d'un excès d'acarbose (5 mM soit 5000 fois le K_i) et de β -CD, aucun accepteur artefactuel n'a été détecté en CCM (non montré). L'augmentation de l'effet protecteur de l'acarbose est donc bien le fait de la β -CD.

Enfin, lorsqu'un substrat naturel, adapté à la cyclisation, est ajouté à l'enzyme dans l'incubation de modification, des résultats similaires à celui de la combinaison accepteur-acarbose sont obtenus. Ainsi, l'addition de Glucidex 12[®] seul à 10 % (p/v) induit aussi la protection de deux résidus histidyles vis-à-vis de l'éthoxyformylation, alors que le glucose seul à 10 % (p/v) est sans effet.

Les résultats sont résumés dans le tableau VII (p.148).

3- Corrélation entre activité enzymatique résiduelle et nombre de résidus histidyles modifiés.

La figure 38 (p.149) montre qu'il existe une relation linéaire entre le nombre de résidus histidyles modifiés et la perte d'activité enzymatique, et ceci pour une zone comprise entre 0 et 2 résidus. Ce résultat suggère qu'il y a une corrélation directe entre la modification préliminaire de deux histidines plus réactives que les autres et la perte des fonctions catalytiques de l'enzyme. On peut donc conclure à l'implication de un ou deux résidu(s) histidyle(s) dans l'acte catalytique.

4- Activité résiduelle après modification par le DEP 5 mM de l'enzyme non protégée, semi-protégée ou protégée.

Comme l'indique la figure 39 (p.150), 92,4 % d'activité enzymatique résiduelle est récupérée après que la modification chimique a eu lieu en présence d'acarbose 5 mM plus salicine 5 mM. Par contre, seulement la moitié (49,7 %) est récupérée si seul

Tableau VII

Effet protecteur de divers effecteurs lors de l'éthoxyformylation de l'enzyme (14,2 μ M) par le DEP 5 mM. Les activités spécifiques résiduelles sont mesurées après dessalage des incubats réactionnels.

Effecteur	n	résidus protégés	% activité résiduelle
sans effecteur	7,0	0	13,7
salicine	7,0	0	16,9
acarbose	6,1	1	49,7
salicine + acarbose	5,3	2	92,4
β -CD + acarbose	5,3	2	ND
glucose	6,8	0	ND
glucidex 12 [®]	5,4	2	ND

n : nombre de résidus histidyles modifiés

ND : non déterminé

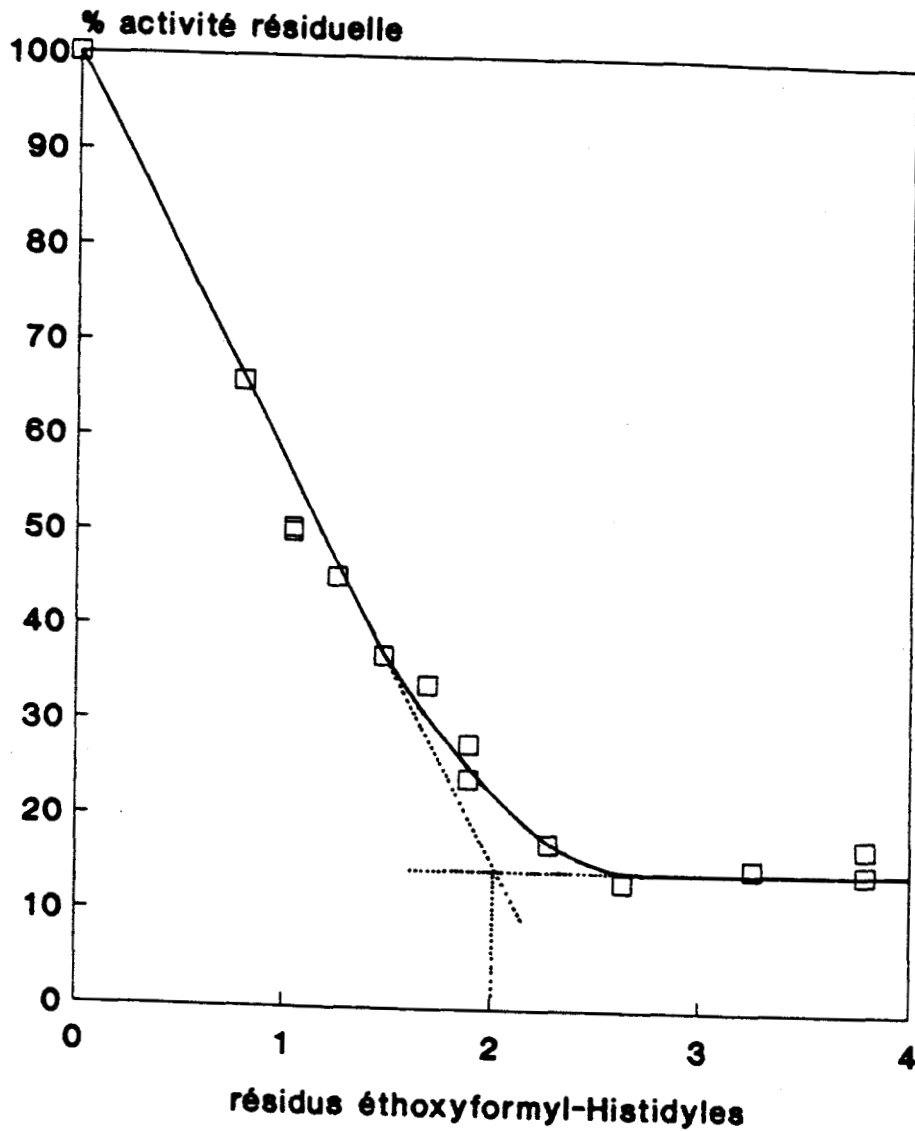


Figure n°38

Activité enzymatique résiduelle en fonction du nombre de résidus éthoxyformyl-histidyles (déterminé par régression logarithmique des valeurs portées Fig.37 (p.146) obtenues pour l'enzyme seule). L'activité résiduelle est dosée à partir d'échantillons préparés dans les mêmes conditions d'éthoxyformylation, à concentrations croissantes en DEP.

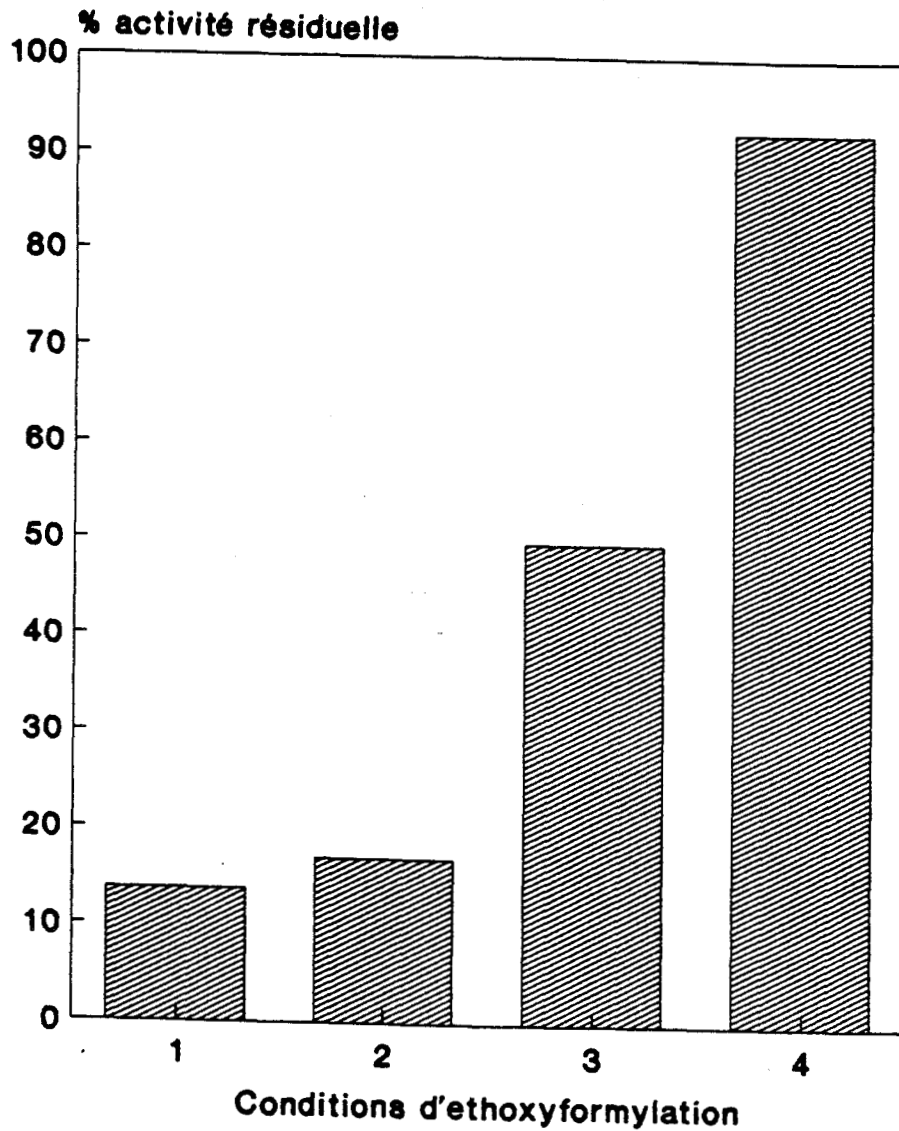


Figure n°39

Influence de la présence des effecteurs (salicine et/ou acarbose, 0 ou 5 mM) lors de l'éthoxyformylation de l'enzyme par le DEP 5 mM, sur l'activité résiduelle. Après 30 minutes de réaction de l'enzyme seule (1), ou en présence de salicine (2), d'acarbose (3), de salicine et d'acarbose (4), avec le DEP, les échantillons modifiés sont dessalés et leur activité spécifique est comparée à celle d'un témoin incubé sans DEP puis dessalé.

l'acarbose 5 mM était présent, et environ 13 % dans le cas de la salicine 5 mM.

Ainsi, il existe une corrélation directe entre le nombre de résidus histidyles protégés (0, 1 ou 2) et l'activité enzymatique résiduelle (10, 50 ou 90 %). Ce résultat suggère également que les deux histidines les plus réactives, impliquées dans la perte d'activité enzymatique, sont les deux résidus protégés par l'acarbose et situés dans le site actif.

5- Discussion.

Dans un sens, nos résultats suggèrent une grande homologie avec ceux décrits pour les α -amylases : La modification des histidines de l' α -amylase pancréatique par le DEP entraîne aussi une perte rapide de l'activité, corrélée à la modification de deux histidines plus exposées, sans aucun changement d'affinité pour le substrat (ELODI, 1972). Plusieurs auteurs rapportèrent ensuite qu'une seule des deux histidines avait un rôle catalytique, dans le site actif de l' α -amylase pancréatique (HOSCHKE et al., 1980), de la Taka-amylase A (KITA et al., 1982), ou de l' α -amylase de *Bacillus amyloliquefaciens* (DUA & KOCHHAR, 1985).

BENDER (1991) a récemment montré que les CGTases de *Bacillus circulans* # n°8 ou *Klebsiella pneumoniae* # M 5 al., modifiées par le DEP, ne cyclisaient plus mais conservaient l'aptitude à former de grandes quantités de sucres linéaires par leur activité disproportionnante. Il propose que l'histidyle 327 (*B. circulans*) oriente le substrat dans le site actif de manière à permettre la cyclisation. Ce résultat implique nécessairement le maintien de la transglucosylation intermoléculaire. Dans notre cas, un tel résultat n'a pas été observé puisque l'activité pseudo-dextrinifiante de la CGTase DEP-modifiée de *Bacillus circulans* E 192 est perdue autant que l'activité cyclisante.

Nous avons vu (Cf. p.119) que les caractères compétitif de la salicine et incompétitif de l'acarbose pouvaient suggérer une mise

en conformation du site du donneur induite par l'occupation du site de l'accepteur, permettant un bon positionnement de la chaîne pour la transglucosylation. Cette hypothèse d'une transconformation induite par l'accepteur s'adapte parfaitement aux résultats présents. Les accepteurs (salicine ou glucose) n'ont pas d'effet protecteur lors de l'action du DEP (Fig.40, p.153). Par contre l'acarbose protège en moyenne un résidu histidyle en occupant le site du donneur de l'enzyme non induite par l'accepteur (Fig.41, p.154), et deux résidus histidyles dans le cas de l'enzyme induite par l'accepteur (Fig. 42^a, p.155), confirmant ainsi une modification de l'adaptation du donneur à son site. De plus, un substrat amylicé convenant à la cyclisation, comme le Glucidex 12[®], protège également deux résidus histidyles. Il est suffisamment long pour que son extrémité non réductrice libre occupe le site de l'accepteur, alors que le reste de la chaîne se positionne au site du donneur transconformé (Fig.42^b, p.155).

Comme l'affinité pour les accepteurs n'est pas altérée, la modification de l'enzyme par le DEP n'affecte pas les propriétés du site de l'accepteur. Ce résultat confirme le fait que le site de l'accepteur ne joue qu'un rôle dans la liaison préliminaire du substrat. Ainsi, les deux histidines les plus réactives doivent être situées dans le site du donneur. Ce résultat démontre la grande homologie entre le site du donneur des CGTases et le site actif des α -amylases, car les deux enzymes sont modifiées de la même manière par le DEP.

Bien que deux résidus histidyles du site actif puissent être protégés par l'acarbose, ils ne sont pas nécessairement impliqués tous les deux dans une fonction catalytique. Une réponse affirmative (première hypothèse) impliquerait une contribution égale de chaque résidu, comme le suggère le fait que 50 % de l'activité est conservée lorsqu'une seule histidine est protégée. Une telle possibilité semble cependant peu probable. Dans la seconde hypothèse, seule une des deux histidines serait impliquée dans une fonction catalytique, comme décrit pour les α -amylases (HOSCHKE *et al.*, 1980; KITA *et al.*, 1982; DUA & KOCHHAR, 1985).

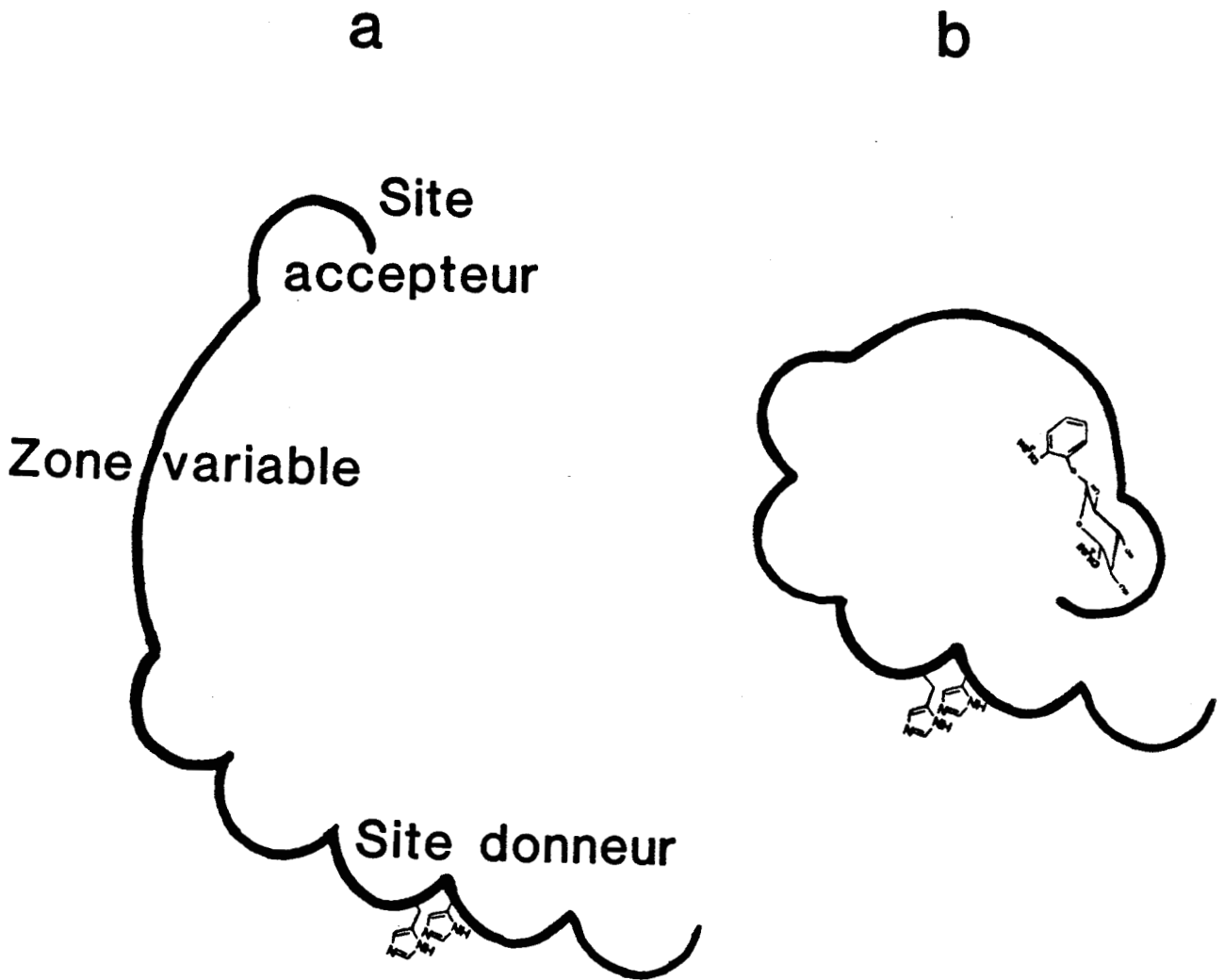


Figure n°40

Illustration schématique du site actif de l'enzyme dont les deux histidines sensibles au DEP ne sont pas protégées. Ces deux histidines sont localisées au point de coupure (site catalytique) du site du donneur, entre les sous-sites n°2 et n°3.

a) Enzyme non-induite par l'accepteur.

b) Enzyme induite par l'accepteur (salicine).

Dans les deux cas de figure, l'activité enzymatique est totalement perdue en présence de DEP.

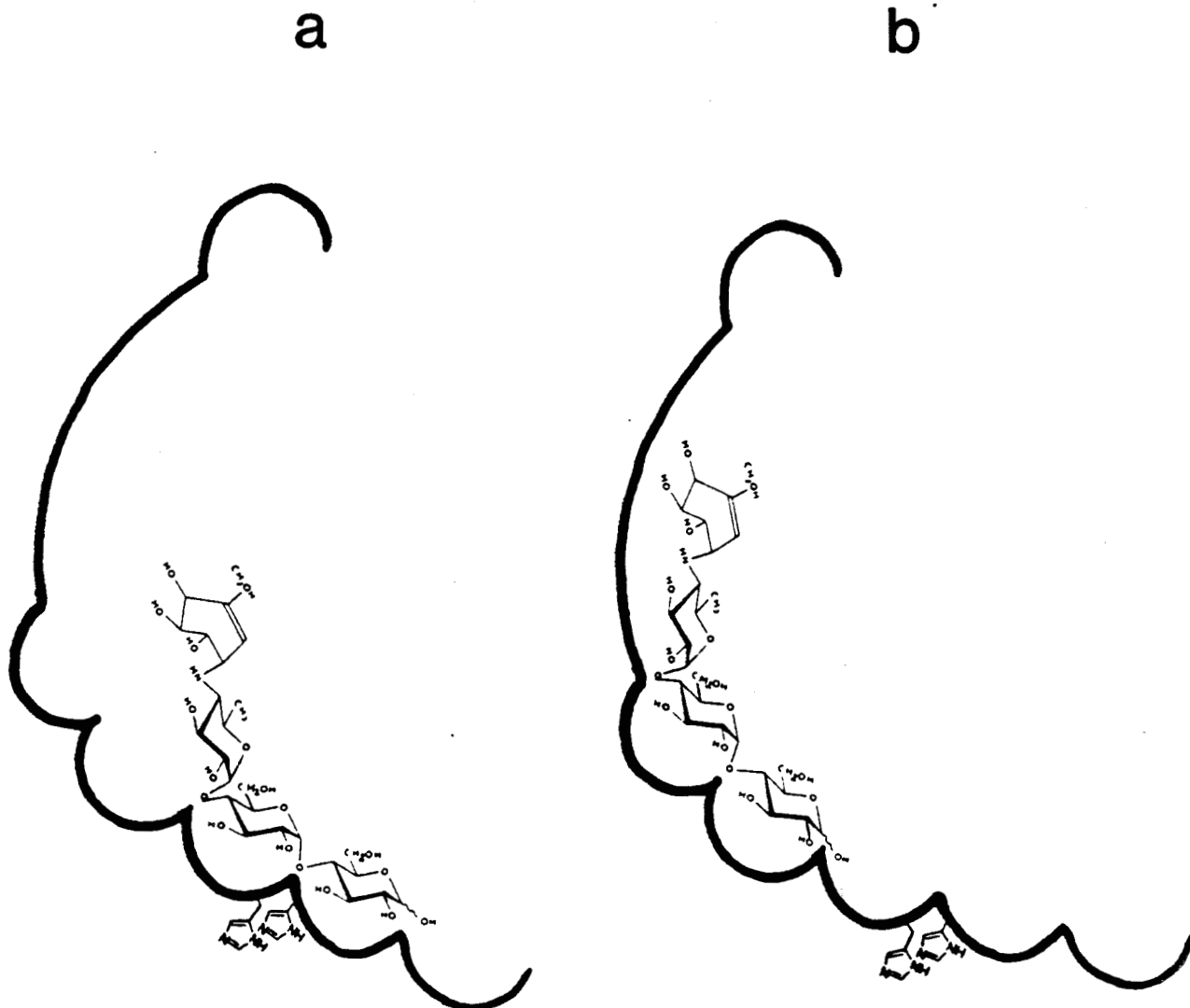


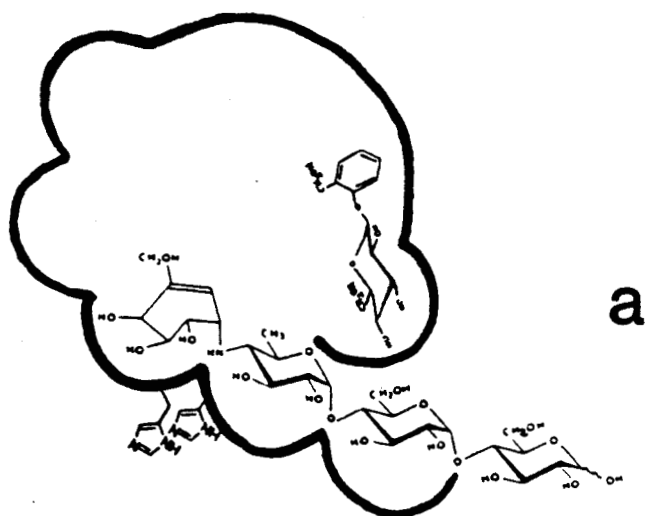
Figure n°41

Illustration schématique du site actif pour lequel une moyenne de une histidine sur les deux histidines sensibles au DEP est protégée par l'acarbose.

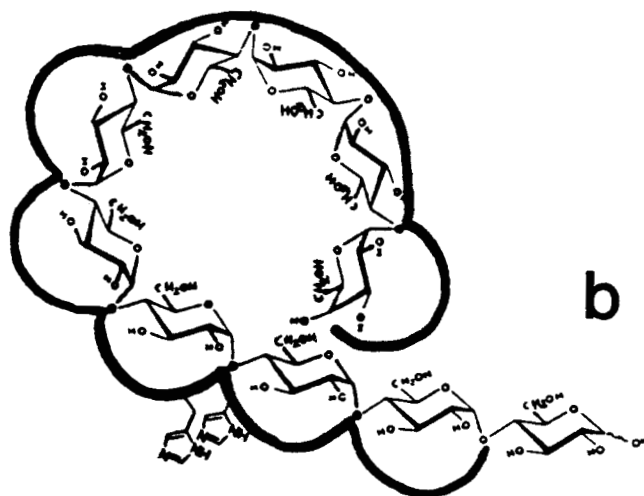
a) Exemple d'une protection des deux histidines par l'acarbose.

b) Exemple montrant la non protection des deux histidines en présence d'acarbose.

La moyenne des différents cas de figure aboutit à une perte de 50 % de l'activité enzymatique en présence de DEP.



a



b

Figure n°42

Illustration schématique du site actif pour lequel les deux histidines sensibles au DEP sont efficacement protégées.

a) Protection des deux histidines par l'acarbose. Celui-ci lie convenablement le site du donneur de l'enzyme induite par l'accepteur (salicine). L'acarviosine présente son amine au point de coupure.

b) Protection identique par un substrat naturel apte à la cyclisation. L'extrémité non-réductrice de la chaîne occupe le site de l'accepteur et le reste de la chaîne peut lier efficacement le site du donneur mis en conformation.

Dans les deux cas de figure, aucune perte d'activité enzymatique n'est observée en présence de DEP.

Dans ce cas, lorsque le site du donneur n'est pas en conformation (sans accepteur), l'acarbose pourrait s'y fixer de deux manières équiprobables dont une seule permettrait la protection des histidines du site actif, aboutissant ainsi à une moyenne de 50 % de l'effet protecteur (Fig.41). En présence de l'accepteur, l'acarbose s'adapterait parfaitement au site du donneur mis en conformation, protégeant ainsi les deux histidines vis-à-vis du DEP, avec une rétention totale de l'activité (Fig.42^a).

Enfin, un dernier aspect de la réactivité des CGTases concerne leur faible activité hydrolytique (Cf. p.14), plus particulièrement observée lors de l'utilisation de cyclodextrines comme substrat, en présence de larges excès d'enzyme. Les CGTases, n'agissant que par transglucosylation, ne devraient pas être capables de dégrader les cyclodextrines sans la présence d'un accepteur exogène ajouté au milieu réactionnel. Or une telle activité est faiblement observée. Ainsi, nous suggérons que cette activité hydrolytique soit le résultat de l'ouverture d'une cyclodextrine au site du donneur, activée par l'occupation d'une cyclodextrine au site de l'accepteur, sans possibilité de transfert excepté sur l'eau.

Cette hypothèse est en accord avec l'effet protecteur du couple β -CD/acarbose vis-à-vis de la modification par le DEP des deux histidines du site actif. Comme la salicine, la β -CD est donc capable d'occuper le site de l'accepteur et d'induire ainsi une meilleure interaction de l'acarbose au site du donneur conformé.

IV-F- INFLUENCE DES EFFECTEURS (SALICINE ET/OU ACARBOSE) SUR LA CONFORMATION DE L'ENZYME ETUDIEE PAR DICHROISME CIRCULAIRE. CONFIRMATION D'UNE TRANSCONFORMATION INDUITE PAR L'ACCEPTEUR.

1- comparaison des spectres.

La figure 43 (p.157) donne le détail des spectres de dichroïsme circulaire de l'enzyme en présence ou non des effecteurs. Les spectres obtenus pour l'enzyme seule ou en

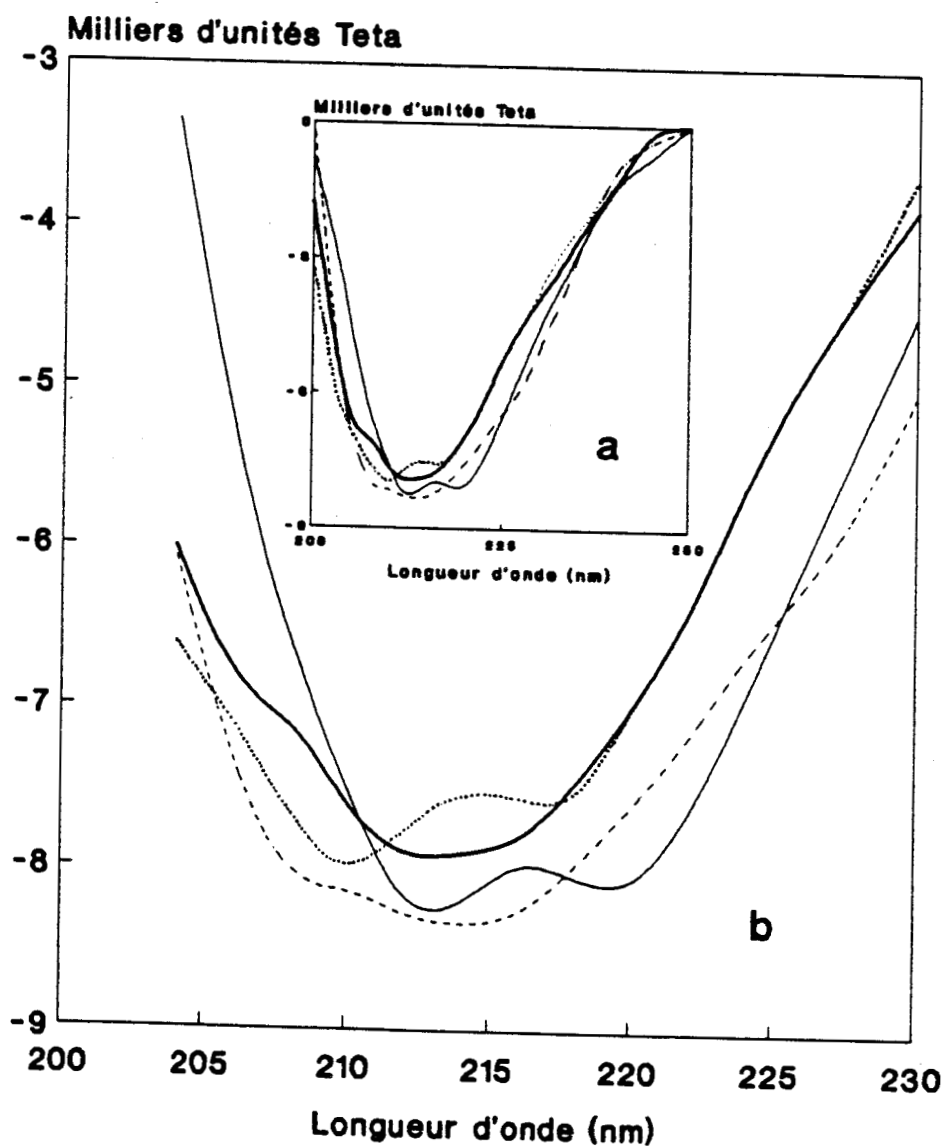


Figure n°43

a) Spectres de dichroïsme circulaire dans la région 200-250 nm de l'enzyme (0,3 mg/ml) seule (—), ou en présence de salicine 2,5 mM (---), d'acarbose 2,5 mM (.....), et des deux (— · —). Les spectres des témoins sans enzyme sont retranchés. Unité Têta : $[\theta]$ deg cm² dmol⁻¹. Chemin optique : 0,01 cm.

b) Détail des spectres dans la région 200-230 nm.

présence d'acarbose sont relativement comparables, sauf un léger étalement du spectre en présence d'acarbose. Ces spectres donnent un maximum d'ellipticité à 213 nm accompagné d'un léger épaulement à 207 ou 209 nm.

Par contre, en présence de salicine, on observe une nette différenciation du spectre de l'enzyme, avec deux pics caractéristiques d'une alternance d'hélices α et de feuillets β . Les maxima d'ellipticité sont à 209 et 217 nm.

Enfin, lorsque l'acarbose est ajouté à la salicine, le spectre (enzyme + salicine) se déplace de 4 nm vers les fortes longueurs d'onde, et les maxima d'ellipticité sont alors à 213 et 220 nm.

De la comparaison de ces spectres, nous pouvons conclure que dans les conditions de l'expérience, l'enzyme peut être observée sous trois conformations différentes :

enzyme seule,
enzyme + accepteur,
et enzyme + accepteur + acarbose.

Les différences relativement peu importantes des spectres dichroïques correspondants suggèrent que ces modifications de conformation ont peu de répercussion sur les éléments de structure secondaire de l'enzyme (pas de dénaturation). Ainsi, ils suggèrent plutôt une modification de l'emplacement ou de l'orientation des domaines les uns par rapport aux autres.

2- Discussion.

Ce résultat, obtenu par une approche expérimentale différente des précédentes, est en parfait accord avec le concept d'une mise en conformation du site actif induite par l'accepteur (ici la salicine). En effet, ce phénomène est parfaitement illustré par la comparaison des spectres dichroïques de l'enzyme en présence ou non des effecteurs (salicine et/ou acarbose). D'autre part, il

suggère que la conformation de l'enzyme induite par l'accepteur est encore modifiée, suivant la présence ou non du donneur.

Cependant, les possibilités offertes par la technique du dichroïsme circulaire sont exclusivement limitées à l'emploi d'effecteurs non transformés par l'enzyme, de manière à pouvoir enregistrer les spectres témoins sans enzyme. Dans ce contexte, l'influence du substrat naturel n'a pu être analysée. D'autre part, l'influence de la combinaison β -CD/acarbose n'a pas été analysée car le signal de la β -CD masque la réponse de l'association. Enfin, les analyses n'ont pu être effectuées que dans une étroite gamme de longueurs d'ondes, étant donnée l'absorbance considérable des effecteurs (aux concentrations requises) en dessous de 200 nm.

**IV-G- COMPARAISON DE LA REACTION DE COUPLAGE CATALYSEE PAR
LES CGTases DE *B. CIRCULANS* ET *K. PNEUMONIAE*.
CONFIRMATION DE LA FLEXIBILITE DU SITE ACTIF, EXPLIQUANT
LA SPECIFICITE DES DIFFERENTES CGTases.**

1- Résultats.

Le tableau VIII (p.160) résume les résultats d'analyse CCM des produits de couplage des trois principales cyclodextrines en présence de salicine, pour les deux types de CGTases. L'enzyme de *B. circulans* E 192 (β -CGTase) ne présente aucune spécificité de couplage : les produits de transfert sur salicine sont observés à partir d' α -, β -, ou γ -CD. Par contre, l'enzyme de *K. pneumoniae* K 40 (α -CGTase) n'effectue le couplage qu'à partir d' α -CD, et très légèrement à partir de γ -CD.

Donc, seules les cyclodextrines à fort rayon de courbure (α -CD) peuvent jouer le rôle de donneur dans la réaction de couplage catalysée par une α -CGTase, et cette restriction n'est pas nécessaire dans le cas d'une β -CGTase. Il faut donc considérer, dans le cas de l' α -CGTase, que la chaîne d'amidon soit plus courbée lors de l'acte catalytique, et admettre que cette tension imposée soit presque possible pour une γ -CD.

Tableau VIII

Comparaison des réactions de couplage catalysées par alpha ou bêta-CGTases

substrat	produits de transfert sur accepteur*	
	α -CGT <i>K. pneumoniae</i>	β -CGT <i>B. circulans</i>
α -CD	+	+
β -CD	-	+
γ -CD	+/-	+

* : Accepteur utilisé = Salicine

2- Discussion.

Sans remettre en cause les résultats obtenus par BENDER (1991) concernant la différence d'emplacement du site catalytique entre les deux classes de CGTase, ce résultat permet une autre approche du problème. En effet, il permet de considérer la spécificité de l'enzyme en fonction du degré de liberté du positionnement de la chaîne amyliacée au site du donneur, après la liaison de son extrémité non réductrice au site de l'accepteur (BOVETTO, 1988). Ainsi, ce positionnement doit présenter un degré de liberté plus important dans le cas d'une β -CGTase (spécificité large) que dans le cas d'une α -CGTase (spécificité étroite), si on se base sur les résultats de couplage obtenus en fonction du degré de courbure du donneur. Par ailleurs, cette interprétation pourrait également expliquer les résultats de BENDER (1991), puisque ceux-ci sont basés comme pour BOVETTO (1988) sur les énergies des liaisons du substrat aux différents sous-sites, selon sa longueur. En effet, l'interprétation de BENDER n'explique pas les ratios (α -, β -, γ -CD) obtenus après action des CGTases sur l'amidon puisque son modèle du site actif, de par sa rigidité, est implicitement du type "tout ou rien" (tout α ou tout β). Par contre, notre modèle plus "souple" explique ces ratios en plus de la spécificité.

Enfin, la mise en conformation du site actif de l'enzyme induite par l'accepteur cadre parfaitement avec la souplesse de ce modèle. Elle permet de considérer le fonctionnement du site actif comme celui d'un emporte-pièce plus ou moins précis (spécificité plus ou moins grande). Après avoir "emporté" l'extrémité non-réductrice de la chaîne amyliacée, le site actif est transconformé de manière à rapprocher celle-ci de la partie plus éloignée formant le donneur, avec une précision plus ou moins prononcée (ratios α -, β -, γ -CD) avant que l'acte catalytique n'intervienne. Dans le cas de la CGTase de *Bacillus circulans* # E 192, le positionnement le plus probable de la chaîne, induit par cette transconformation, aboutit à la formation d'une β -CD.

V- RELATIONS ENTRE LE SITE DE FIXATION DE L'AMIDON CRU ET LE SITE ACTIF.

Les résultats obtenus après oxydation des résidus tryptophanyles de l'enzyme par la NBS (Cf. p.108) nous ont prouvé la coexistence de deux sites distincts :

- un site de fixation de l'amidon cru ("Raw-starch-binding Site"), responsable de l'adsorption spécifique de l'enzyme sur grains d'amidon ou sur le copolymère de β -CD;

et

- le site actif, étudié dans le chapitre IV (p.111).

Les résultats obtenus par nitration de l'enzyme au TNM (Cf. p.140) ont confirmé le caractère distinct de ces deux fonctions.

V-A- Confirmation de l'indépendance des deux sites : non protection par les effecteurs du site actif vis-à-vis de l'action de la NBS sur le site de fixation de l'amidon cru.

L'effet majeur observé après oxydation de l'enzyme par la NBS est la perte d'affinité pour l'amidon cru et pour le copolymère de β -CD. C'est la modulation de cette activité biologique que nous étudions après oxydation de l'enzyme en présence ou non des effecteurs. Nous avons choisi une concentration en NBS aboutissant à 50 % de perte d'affinité sur l'amidon cru de maïs, soit : NBS 100 μ M.

La première constatation faite au cours de cette expérience est que l'oxydation par la NBS pratiquée en présence d'acarbose 5 mM (avec ou sans salicine 5 mM), n'entraîne aucune précipitation de l'enzyme.

Par contre, et comme l'illustre la figure 44 (p.163), aucun effet protecteur n'est observé sur l'affinité résiduelle en cas de présence des effecteurs (salicine et/ou acarbose) lors de

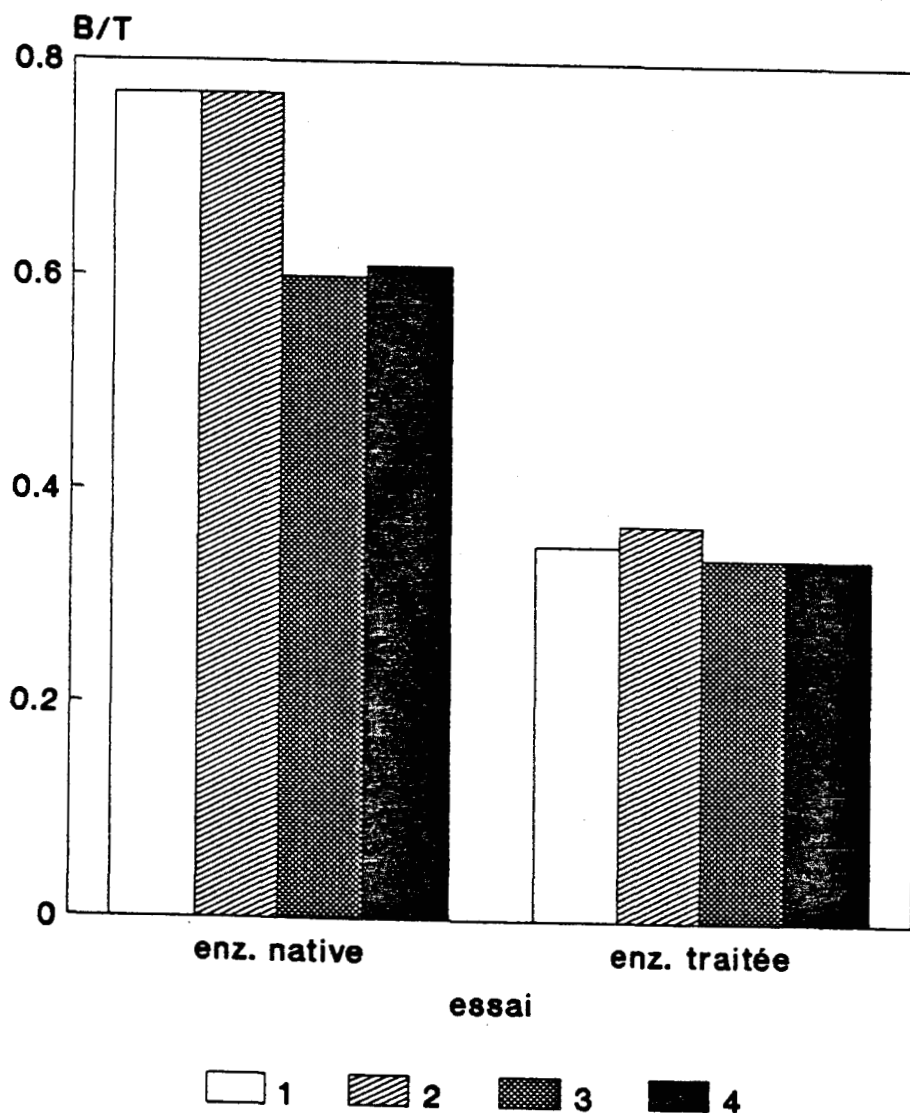


Figure n°44

Influence des effecteurs (salicine et/ou acarbose) présents lors de l'action de la NBS sur l'enzyme : recherche d'un effet protecteur de l'affinité résiduelle sur amidon cru de maïs.

B = enzyme liée ($\mu\text{g/ml}$); T = enzyme totale (liée + libre) ou enzyme totale non-précipité après action de la NBS ($\mu\text{g/ml}$). L'oxydation par la NBS $100 \mu\text{M}$ est réalisée sur l'enzyme ($0,6 \text{ mg/ml}$) seule (1), ou en présence des effecteurs 5 mM : salicine (2), acarbose (3), salicine + acarbose (4).

l'oxydation de l'enzyme par la NBS. En effet, dans tous les cas, l'affinité a chuté de 50 % par rapport à l'enzyme non modifiée (et sans effecteurs). Notons que la diminution d'affinité observée pour les témoins enzyme + acarbose (avec ou sans salicine) est due à l'effet inhibiteur de l'acarbose (encore présent après dilution au 10^{ème} du mélange réactionnel) sur la fixation de l'enzyme à l'amidon cru. Cet aspect est développé dans le paragraphe suivant.

V-B- Proximité des deux sites : inhibition de l'interaction enzyme/amidon cru par addition d'acarbose.

La figure 45 (p.165) montre que la présence d'acarbose gêne l'interaction enzyme/amidon cru, avec une diminution significative de la quantité d'enzyme fixée. Cette inhibition dépend de la concentration en acarbose présent dans l'incubat, et la concentration nécessaire à 50 % d'inhibition (I_{50}) peut être déterminée graphiquement :

$$I_{50} = 2,95 \text{ mM acarbose.}$$

Il faut également préciser qu'aucune inhibition de la fixation de l'enzyme sur l'amidon cru n'a été observée lors de l'addition de salicine à des concentrations comprises entre 0 et 20 mM, c'est-à-dire une gamme de concentrations correspondant à celles utilisées lors de l'étude du site actif.

V-C- Réactivité de l'enzyme sur grains d'amidon de maïs. Comparaison avec la réactivité d'une α -amylase dégradant l'amidon cru.

Par analyse CCM des surnageants de centrifugation des incubats enzyme/amidon cru, la figure 46 (p.166) compare les réactivités sur grains d'amidon de maïs de la CGTase de *Bacillus circulans* # E 192 et de l' α -amylase de *Bacillus subtilis*. Cette dernière a déjà été décrite comme capable de dégrader les grains d'amidon cru (COLONNA et al., 1988).

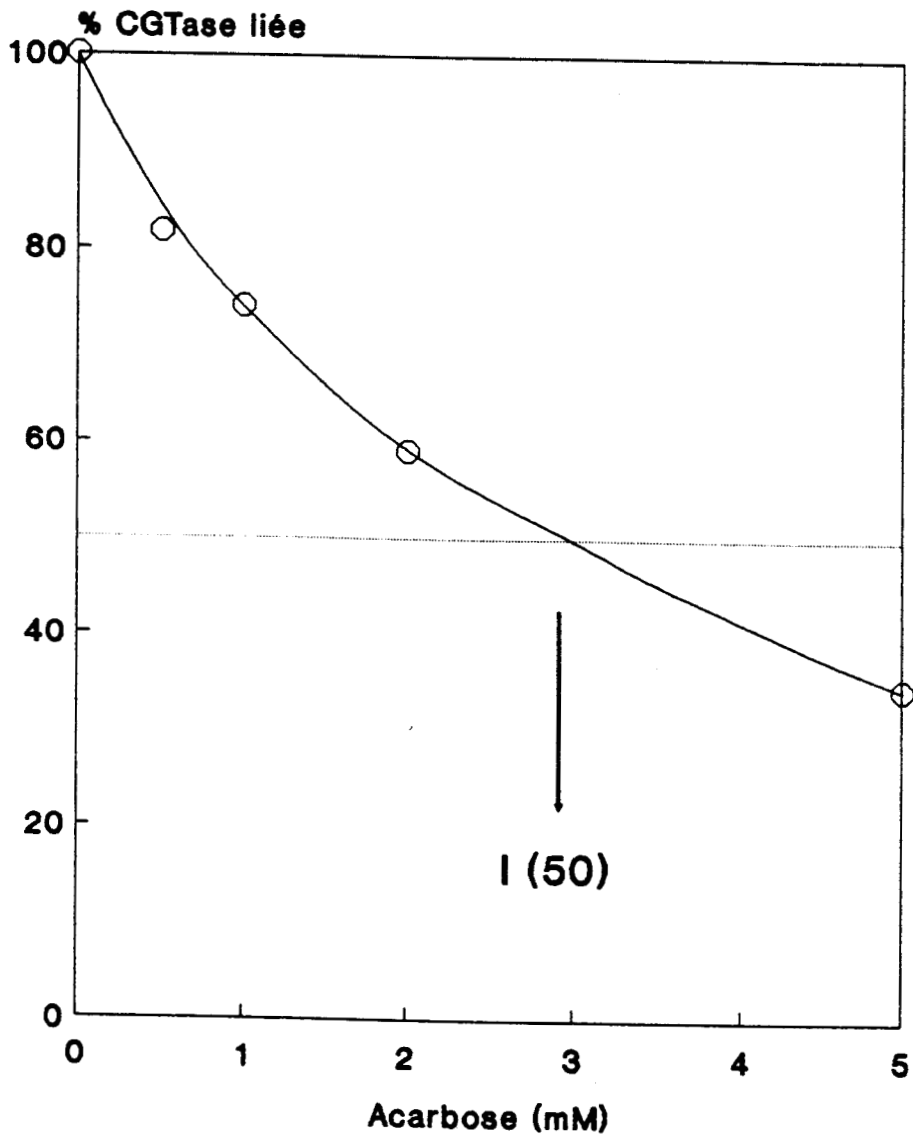


Figure n°45

Inhibition de la fixation de l'enzyme sur l'amidon cru de maïs par l'acarbose.

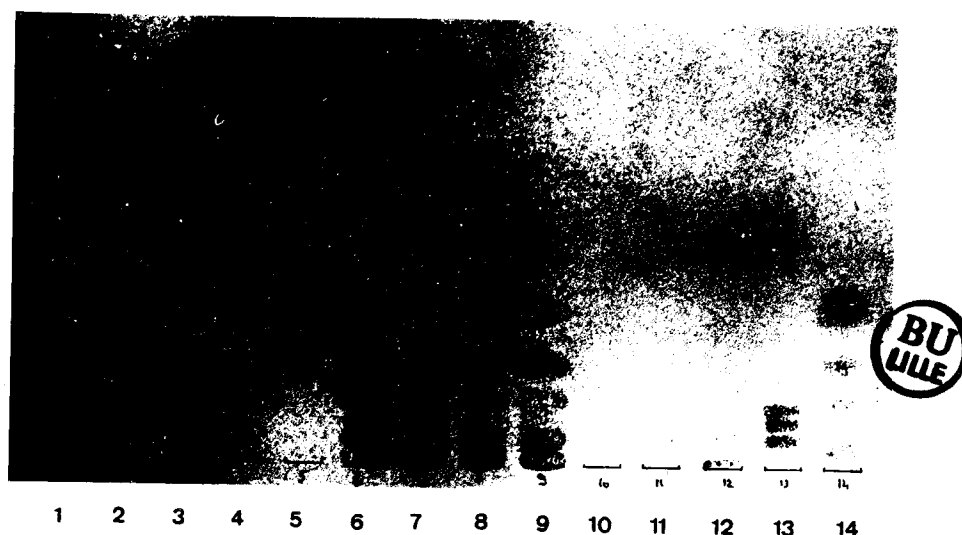


Figure n°46

Analyse par CCM des surnageants de centrifugation des incubats CGTase/grains d'amidon ou α -amylase/grains d'amidon.

(CGTase: *B. circulans*; α -amylase: *B. subtilis*.)

Pistes : 1 & 14: maltooligosaccharides témoins G_1 à G_7 ; 2 & 13: témoins α -, β -, γ -CD; 3: témoin salicine; 4: témoin CGTase + salicine; 5: témoin α -amylase + salicine; 6: α -amylase + salicine + amidon cru; 7: CGTase + salicine + amidon cru; 8: CGTase + amidon cru; 9: α -amylase + amidon cru; 10: témoin α -amylase; 11: témoin CGTase; 12: Témoin amidon cru.

L'action de la CGTase sur les grains d'amidon cru est tout à fait inattendue. En effet, elle est non seulement capable de dégrader légèrement ce substrat (piste 8), mais en plus, pour ne donner exclusivement que des produits identiques à ceux formés par l'action de l' α -amylase (piste 9). La CGTase semble donc se comporter, vis-à-vis de l'amidon cru, comme une α -amylase mais avec une vitesse de réaction plus faible. Son aptitude à transglucosyler est cependant retrouvée par simple addition d'un accepteur exogène, ici la salicine (piste 7). Dans ce cas, on peut visualiser des produits de transglucosylation sur salicine. On peut également noter une légère activité de transfert catalysée par l' α -amylase en présence d'amidon cru et de salicine (piste 6).

Ce résultat montre que l'interaction CGTase/grain d'amidon permet un positionnement adéquat du site actif de l'enzyme sur l'amidon cru pour engendrer un acte catalytique. Cependant, ce complexe ne permet pas l'accessibilité d'extrémités non réductrices au site de l'accepteur, et seule une faible activité secondaire de type hydrolytique peut être visualisée, comme dans le cas de l'utilisation de la β -CD comme substrat.

V-D- Discussion.

L'absence d'effet protecteur par les effecteurs du site actif (salicine et/ou acarbose) lors de la modification par la NBS, du site de l'amidon cru confirme l'indépendance des deux sites. Ce résultat permet aussi de rejeter l'hypothèse d'une fixation directe de l'acarbose sur le site de l'amidon cru, qui aurait pu être déduite au vu du déplacement de l'interaction enzyme/grain d'amidon, observé en présence d'acarbose. Il faut donc admettre que les deux sites soient suffisamment proches l'un de l'autre pour que l'acarbose fixé au site du donneur entraîne un phénomène d'encombrement au niveau du site de fixation de l'amidon cru.

Cette hypothèse de proximité des deux sites est tout à fait probable au vu des connaissances structurales des CGTases. En effet, la comparaison des séquences des différentes

glucohydrolases affines pour l'amidon cru (SVENSSON, 1988, 1989) montre que le site de fixation de l'amidon cru est situé en C-terminal. Il est même possible de le localiser, pour les CGTases, dans le domaine E décrit par HOFMANN et al. (1989). Or, le domaine E participe, avec le domaine A, à la formation de la crevasse portant le site actif. La proximité des deux sites devient donc une évidence.

Enfin, la réactivité de type α -amylase de l'enzyme sur grains d'amidon est particulièrement intéressante. C'est le seul exemple jamais décrit du comportement d'une CGTase sur un substrat amylicé pour lequel les accepteurs ne sont pas accessibles au site actif. En effet, puisqu'aucune transglucosylation n'est possible dans ce cas, seule la faible activité secondaire de type hydrolytique est visualisée.

Puisqu'aucun cycle n'est visualisé dans cette expérience, ce résultat confirme le modèle du site catalytique de BOVETTO (1988), et particulièrement l'importance de la liaison première de l'accepteur, et rejette le mécanisme "Ping-pong" (en deux temps) de BENDER (1988). Dans ce dernier modèle, les deux étapes sont :

- 1- coupure par hydrolyse et dissociation de l'extrémité non-réductrice;

- 2- transfert de l'extrémité réductrice formée sur une autre extrémité non-réductrice.

D'après ce modèle, puisqu'à partir de l'amidon cru nous observons des produits d'hydrolyse, nous devrions donc observer aussi des cycles. Or ce n'est pas le cas.

CONCLUSIONS

Les conclusions générales que nous pouvons tirer de notre étude peuvent se résumer de la façon suivante.

1- Le procédé de purification que nous proposons nous a permis d'obtenir rapidement d'importantes quantités d'enzyme pure (de l'ordre du gramme). Ce procédé, faisant appel à la chromatographie d'affinité sur un copolymère de β -CD, met en jeu des interactions spécifiques entre le site de fixation de l'amidon cru et la matrice. Il pourrait donc être appliqué à la purification de nombreuses glucosidases puisque bon nombre d'entre elles présentent également un site de fixation spécifique de l'amidon cru ("Raw-starch-binding Site").

Enfin, les caractéristiques de cette matrice, ainsi que son moindre coût de fabrication confèrent à ce procédé rapide et simple un caractère bien adapté à une purification (ou concentration) de l'enzyme à l'échelle industrielle.

2- L'analyse de la composition en acides aminés de l'enzyme purifiée, et surtout la séquence N-terminale de sa chaîne peptidique nous ont révélé une grande homologie structurale (structure primaire) par rapport à d'autres CGTases décrites dans la littérature. Les analyses de masse moléculaire et de composition isoenzymatique diffèrent légèrement par rapport aux résultats de BACKER (1988) et de BOVETTO (1988). Ces différences suggèrent que la préparation de ces auteurs contenait une enzyme légèrement tronquée par protéolyse.

3- Les études enzymatiques montrent le caractère indispensable de l'accepteur glucosidique dans les différentes réactions catalysées par l'enzyme. Celui-ci gouverne la cinétique, et sa nature (endogène ou exogène au substrat) oriente le type de réaction (cyclisation, couplage ou activité disproportionnante).

L'utilisation de deux types différents d'inhibiteurs de la cyclisation prouve la validité du modèle de BOVETTO (1988) concernant le site actif. Celui-ci peut être subdivisé en deux sous-sites spécialisés : le site du donneur et le site de l'accepteur.

Le site du donneur, composé d'au moins cinq sous-sites à D-glucose, est de même type que le site actif des α -amylases. Spécialisé dans l'accueil de la chaîne d' α -(1,4) glucane constituant le donneur, il comporte les résidus catalytiques et assure la coupure de la chaîne entre les sous-sites n°2 et n°3.

Le site de l'accepteur est spécialisé dans l'accueil du glucosyle de l'extrémité non réductrice de la chaîne d'amidon, ou de tout autre accepteur ayant la même configuration.

L'acarbose, inhibiteur compétitif des α -glucohydrolases, est spécifique du site du donneur. La salicine (β -D-glucoside) est spécifique du site de l'accepteur. Enfin, l'enzyme ne transforme pas ces deux produits. Ces effecteurs du site actif peuvent donc être utilisés comme agents protecteurs spécifiques lors de la modification chimique de certains résidus d'acides aminés de l'enzyme.

4- Une tyrosine du site actif semble jouer un rôle dans l'acte catalytique. Sa nitration par le TNM entraîne une diminution d'environ 50 % de l'activité enzymatique. L'acarbose est capable de protéger ce résidu vis-à-vis de la nitration. Ce résultat suggère que cette tyrosine est localisée dans le site du donneur.

5- Deux résidus histidyles du site du donneur peuvent aussi être protégés par l'acarbose. Ces deux histidines sont les plus facilement modifiées lors de l'action du DEP et, comme dans le cas des α -amylases, l'une d'elles est indispensable à l'expression de l'activité enzymatique.

6- Par différentes approches expérimentales mettant en jeu l'action des effecteurs du site actif (salicine et/ou acarbose, ou substrat) sur l'enzyme, nous avons pu mettre en évidence une mise en conformation du site du donneur induite par l'occupation du site de l'accepteur.

-Par une approche cinétique : comparaison des types d'inhibition respectifs des deux effecteurs.

-Par une approche chimique : mesure de l'effet protecteur des effecteurs différemment combinés (ou du substrat) vis-à-vis de l'éthoxyformylation des résidus histidyles.

- Par une approche physico-chimique : analyse comparée des spectres de dichroïsme circulaire de l'enzyme en présence des effecteurs.

Cette mise en conformation du site actif, induite par l'accepteur, permet une approche plus souple dans l'étude de la dynamique du système enzymatique. En effet, le site actif n'étant pas une entité "figée", il peut exister un certain degré de liberté dans le positionnement du donneur dans son site avant que l'acte catalytique n'intervienne. D'après les résultats de BOVETTO (1988) relatifs aux affinités des différents sous-sites, c'est dans la zone séparant le sous-site n°5 du site de l'accepteur que les décalages de la chaîne se produiraient. Cette souplesse permet d'expliquer la coexistence des trois classes de cyclodextrines (α , β , γ), dans des rapports caractéristiques, après action des CGTases sur l'amidon. Pour une CGTase donnée, le rapport $\alpha / \beta / \gamma$ sera régi suivant la dynamique moléculaire, par la fréquence des erreurs de positionnement du donneur, consécutives à d'éventuelles désynchronisations lors des périodes de contrainte/relaxation de la molécule.

7- Un site de fixation de l'amidon cru, à haute affinité pour les grains d'amidon, a été mis en évidence. Cette affinité est perdue après oxydation des résidus tryptophaniques par la NBS, alors que la cyclisation est toujours possible. Ce site est donc indépendant du site actif, malgré leur proximité régionale. La mise en évidence d'un tel site sur une CGTase présente un caractère inédit. Elle est cependant conforme aux prédictions de SVENSSON (1988, 1989) basées sur des homologies de séquences de différentes α -glucohydrolases dans la région C-terminale.

8- Enfin, nous avons tenté de trouver les relations pouvant exister entre le site actif et le site de fixation de l'amidon cru. En effet, leur proximité et les différences de réactivité de l'enzyme sur grains d'amidon ou sur amidon soluble indiquent une possible interdépendance des deux sites. De fait, il semblerait que lors de la formation du complexe Enzyme-Grain d'amidon, la CGTase ne puisse réagir qu'à la manière d'une α -amylase. L'attaque de type *endo* aboutit à une faible hydrolyse des chaînes superficielles d'amidon du grain. Cette observation mérite donc une investigation plus approfondie concernant la réactivité des CGTases sur amidon cru.

En conclusion, si la grande ressemblance structurale des CGTases avec les α -amylases a souvent été décrite, nos travaux quant à eux mettent également l'accent sur une homologie fonctionnelle avec les β -amylases.

En premier lieu, comme pour la CGTase de *Bacillus circulans* # E 192 mais aussi comme pour de nombreuses glucosidases, l'existence d'un site de fixation de l'amidon cru a déjà été rapportée sur une β -amylase (SAHA et al., 1988; SVENSSON et al., 1989).

Enfin, comme les CGTases, ces enzymes agissent à partir de l'extrémité non-réductrice de la chaîne d' α -(1,4) glucane. De plus, THOMA & KOSHLAND JR (1960) ont montré que l'association de l'extrémité non-réductrice de la chaîne d'amylose avec la β -amylase de pomme-de-terre induit une mise en conformation du site actif permettant l'acte catalytique. Cette enzyme partage donc quelques propriétés avec les CGTases, puisque nous avons observé un phénomène identique. En fait, le site spécifique de l'extrémité non-réductrice de l'amylose doit être placé différemment dans les deux enzymes, expliquant ainsi leur réactivité propre. Dans le cas des CGTases, la mise en conformation permet de rapprocher l'accepteur du donneur pour permettre la transglucosylation, alors que pour les β -amylases, elle facilite seulement l'hydrolyse.

Cette mise en conformation du site actif, induite par la liaison de l'accepteur à son site, ouvre de nouvelles perspectives dans les études physico-chimiques actuellement en cours et concernant la structure des CGTases. En effet, seules les données cristallographiques de l'enzyme en présence du substrat permettront, dans un proche avenir, de définir avec certitude le mécanisme d'action de la molécule. Dans ce contexte, les conclusions que nous rapportons pourraient être mises à profit dans l'élucidation des diagrammes de diffraction aux rayons-X de tels cristaux. Mieux encore, une tentative de cristallisation de l'enzyme en présence des différentes combinaisons d'effecteurs (salicine et/ou acarbose) s'avèrerait particulièrement intéressante car elle permettrait d'obtenir des cristaux d'enzyme "figée" dans ses différents états conformationnels, ce qui est irréalisable en présence d'un substrat naturel.

Ainsi, la connaissance de la structure fine du site actif devrait permettre, grâce aux techniques d'ingénierie des protéines, d'améliorer la sélectivité des CGTases afin d'envisager la production de telle ou telle cyclodextrine.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AOKI, H., & MISAWA, M. (1988)
Process for preparing cyclodextrins.
World Pat. WO 88/08031.

BACKER, D. (1988)
La Cyclodextrine-glycosyltransferase de *Bacillus circulans*. I. Purification. II. Propriétés physico-chimiques et enzymatiques. Thèse d'Ingénieur du Conservatoire National des Arts et Métiers, Lille.

BANNER, D.W., BLOOMER, A.C., PETSKO, G.A., PHILLIPS, D.C., POGSON, C.I., WILSON, I.A., CORRON, P.H., FURTH, A.J., MILMAN, J.D., OFFORD, R.E., PRIDDLE, J.D., & WALEY, S.G. (1975)
Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 Å resolution using amino acid sequence data.
Nature (London) 255, 609-614.

BARMAN, T.E. (1969)
Enzyme Handbook, Vol.1, (Springer-Verlag, Ed.), Berlin - Heidelberg - New-York, pp 1-15.

BENDER, H. (1977)
Cyclodextrin glucanotransferase from *Klebsiella pneumoniae*. 1. Formation, purification and properties of the enzyme from *Klebsiella pneumoniae* M 5 al..
Arch. Microbiol. 111, 271-282.

BENDER, H. (1978)
(1→4)- α -D-Glucopyranosyltransferprodukte aus cyclohexaamylose.
Carbohydr. Res. 65, 85-97.

BENDER, H.
(1982) Effect of various acceptors on the rate of the cyclisation and chain-shortening of amylose catalysed by cyclodextrin glycosyltransferase from *Klebsiella pneumoniae* M 5 al..
Improvement of new photometric assay methods.
Carbohydr. Res. 101, 279-285.

BENDER, H. (1986)

Production, characterization, and application of cyclodextrins,
Adv. Biotechnol. Proces. 6, 31-71.

BENDER, H. (1988)

Studies on the reaction mechanism of cyclodextrin
glycosyltransferases : subsite analysis.

in *Proceedings of the 4th International Symposium on Cyclodextrins*
(O. Hubert & J. Szejtli, Eds.), Kluwer Academic Publishers,
Dordrecht - Boston - London, pp 19-26.

BENDER, H. (1990^a)

Highly homologous cyclodextrin glycosyl-transferases from *Bacillus*
circulans strain n°8 and a strain of *Bacillus licheniformis*.

Appl. Microbiol. Biotechnol. 34, 229-230.

BENDER, H. (1990^b)

Studies of the mechanism of the cyclisation reaction catalysed by
the wildtype and truncated α -cyclodextrin glycosyltransferase from
Klebsiella pneumoniae M 5 al., and the β -cyclodextrin
glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 8.

Carbohydr. Res. 206, 257-267.

BENDER, H. (1990^c)

Molecular structure and reaction mechanism of cyclodextrin
glycosyltransferases.

in *Minutes of the 5th Symposium on Cyclodextrins* (D. Duchène,
Ed.), Editions de Santé, Paris, pp 39-45.

BENDER, H. (1991)

On the role of histidine residues in cyclodextrin
glycosyltransferase : Chemical modification with diethylpyro-
carbonate.

Carbohydr. Res. 209, 145-153.

BENDER, M.L. (1989)

Enzyme Models -Cyclodextrins (cycloamyloses).

in *Enzymes Mechanism*, Royal Society of Chemistry (M.I. Page & A. Williams, Eds.), pp 56-66.

BIDLINGMEYER, B.A., COHEN, S.A., & TARVIN, T.L. (1984)

Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization.

J. Chromatogr. 336, 93-104.

BINDER, F., HUBER, O., & BÖCK, A. (1986)

Cyclodextrin glycosyltransferase from *Klebsiella pneumoniae* M 5 al. : Cloning, nucleotide sequence and expression.

Gene 47, 269-277.

BLAKE, C.C.F., JOHNSON, L.N., MAIR, G.A., NORTH, A.C.T., PHILLIPS, D.C., & SARMA, V.R. (1967)

Crystallographic studies of the activity of hen egg-white lysozyme.

Proc. Roy. Soc. B 167, 378-388.

BOEL, E., BRADY, L., BRZOZOWSKI, A.M., DEREWENDA, Z., DODSON, G.G., JENSEN, V.J., PETERSEN, S.B., SWIFT, H., THIM, L., & WOLDIKE, H.F. (1990)

Calcium binding in α -amylases : an X-ray diffraction study at 2.1 Å resolution of two enzymes from *Aspergillus*.

Biochemistry 29, 6244-6249.

BOVETTO, L.J. (1988)

La Cyclodextrine glucosyltransferase de *Bacillus circulans*.

Thèse de l'Université des Sciences et Techniques de Lille.

BRADFORD, M. (1976)

A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

Anal. Chem. 72, 248-254.

BRAHMS, S. & BRAHMS, J. (1980)

Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism.

J. Mol. Biol. 138, 149-178.

BRESLOW, R. (1982)

Artificial enzymes.

Science 218, 532-537.

BUISSON, G., DUEE, E., HASER, R., & PAYAN, F. (1987)

Three dimensional structure of porcine pancreatic α -amylase at 2.9 Å resolution. Role of calcium in structure and activity.

EMBO J. 6, 3909-3916.

CALDER, P.C., & GEDDES, R. (1989)

Acarbose is a competitive inhibitor of mammalian lysosomal acid α -D-glucosidases.

Carbohydr. Res. 191, 71-78.

CHEN, L., FORD, C., NIKOLOV, Z., REILLY, P., & SVENSSON, B. (1988)

in *Proc. Int. Congr. 16th (Toronto)*, Abstr. 35.41.12.

CHERON, G., PAYAN, F., MARCHIS-MOUREN, G., & HASER, R. (1991)

Mode d'action de l'acarbose sur l' α -amylase de pancréas de porc.

Regard sur la Biochimie 2, 23.

CLARKE, A.J., & SVENSSON, B. (1984)

Identification of an essential tryptophanyl residue in the primary structure of glucoamylase G2 from *Aspergillus niger*.

Carlsberg Res. Commun. 49, 559-566.

COHEN, S.A., BIDLINGMEYER, B.A., & TARVIN, T.L. (1987)

in *Proteins : Structure and Function* (J.J. L'Italien, ed.), Plenum Press, N.Y., pp 207-213.

COLONNA, P., BULEON, A., & LEMARIE, F. (1988)

Action of *Bacillus subtilis* α -amylase on native wheat starch.

Biotechnol. Bioeng. 31, 895-904.

COMMITTEE ON CODEX SPECIFICATIONS (1981)

Bacterial alpha-amylase activity (BAU).

in *Food Chemicals Codex*, 3^d Edition (Committee on Codex specifications, Ed.), National Academy Press, Washington D.C., pp 479-482.

COTTAZ, S. (1989)

Synthèses chimiques et enzymatiques de maltodextrines modifiées. Etude du centre actif de la cyclodextrine-gluconotransferase. Thèse de l'Université de Grenoble.

COTTAZ, S., & DRIGUEZ, H. (1991)

Substrate-based investigations of the active site of CGTase. Enzymatic synthesis of regioselectively modified cyclodextrins. in *Biotechnology of Amylodextrin oligosaccharides* (R.B. FRIEDMAN, Ed.), ACS Symposium Series (458), Washington D.C., pp 44-50.

DE PINTO, J.A., & CAMPBELL, L.L. (1968)

Purification and some properties of the amylase of *Bacillus macerans*.

Biochemistry 7, 114-120.

DUA, R.D., & KOCHHAR, S. (1985)

Active site studies on *Bacillus amyloliquefaciens* α -amylase (I). *Mol. Cell. Biochem.* 66, 13-20.

ELÖDI, P. (1972)

Role of histidyl residues in the active site of porcine pancreatic α -amylase.

Acta Biochim. et Biophys. Acad. Sci. Hung. 7, 241-245.

EYZAGUIRRE, J. (1987)

Chemical modification of enzymes, an overview. The use of group-specific reagents.

in *Chemical Modification of Enzymes. Active Site Studies* (J. EYZAGUIRRE Ed.), Ellis Horwood Ltd., Chichester, pp 9-21.

- FARBER, G.K. & PETSKO, G.A. (1990)
The evolution of α/β barrel enzymes.
TIBS 15, 228-234.
- FRENCH, D., PAZUR, J., LEVINE, M.L., NORBERG, E. (1948)
Reversible action of macerans amylase.
J. Amer. Chem. Soc. 70, 31-45.
- FRENCH, D., LEVINE, M.L., PAZUR, J.H., & NORBERG, E. (1949)
Studies on the Schardinger dextrans. The preparation and solubility characteristics of alpha- beta- and gamma-dextrans.
J. Amer. Chem. Soc. 72, 5148-5152.
- FRENCH, D., & WILD, G.M. (1953)
Correlation of carbohydrate structure with papergram mobility.
J. Amer. Chem. Soc. 75, 2612-2616.
- FRENCH, D., LEVINE, M.L., NORBERG, E., NORDIN, P., PAZUR, J.H., & WILD, G.M. (1954)
Studies on the Schardinger dextrans. VII. Cosubstrate specificity in coupling reaction of BMA.
J. Amer. Chem. Soc. 76, 2387-2390.
- FRENCH, D. (1957)
The Schardinger dextrans. in *Adv. Carbohydr. Chem.* 12 (M.Wolfson & R.TIPSON, Eds.), Academic Press, N.Y., pp 189-260.
- FRENCH, D., PULLEY, A.O., EFFENBERGER, J.A., ROUGVIE, M.A., & ABDULLAH, M. (1965)
Studies on the Schardinger dextrans : XII. The molecular size and structure of the δ , ϵ , ζ , and η -dextrans.
Arch. Biochem. Biophys. 111, 153-160.
- FREUDENBERG, K., & JACOBI, R. (1935)
Über Schardinger dextrine aus stärke.
Ann. Chem. 518, 102-108.

FREUDENBERG, K., & CRAMER, F. (1948)

Die konstitution der Schardinger-dextrine α -, β -, und γ -.
Z. Naturforsch 36, 464.

FROMMER, W., JÜNGE, B., MÜLLER, L., SCHMIDT, D., & TRUSCHEIT, E.
(1979)

Neue enzyminhibitoren aus mikroorganismen.
Planta Medica 35, 195-217.

GLAZER, A.N. (1970)

Specific chemical modifications of proteins.
Ann. Rev. Biochem. 39, 101-130.

GOLDSMITH, E.J., FLETTERICK, R.F., & WITHERS, S.G. (1987)

The three-dimensional structure of acarbose bound to glycogen phosphorylase.
J. Biol. Chem. 262, 1449-1455.

GOTTVALDOVA, M., HRABOVA, H., SILLINGER, V., & KUCERA, J. (1988)

Biospecific sorption of cyclodextrin glucosyltransferase on physically modified starch.
J. Chromatogr. 427, 331-334.

HALE, W.S., & RAWLINS, L.C. (1951)

Amylase of *Bacillus macerans*.
Cereal Chem. 28, 49-58.

HAMAMOTO, T., KANEKO, T., & HORIKOSHI, K. (1987)

Nucleotide sequence of the cyclomaltodextrin glucanotransferase (CGTase) gene from alkalophilic *Bacillus* sp. strain N°38-2.
Agric. Biol. Chem. 51, 2019-2022.

HANES, C.S. (1932)

Biochem. J. 26, 1406-1421.

- HANOZET, G., PIRCHER, H.P., VANNIS, P., OESCH, B., & SEMENZA, G. (1981)
An example of enzyme hysteresis. The slow and tight interaction of some fully competitive inhibitors with small intestinal sucrase.
J. Biol. Chem., 256, 3703-3711.
- HELLMAN, J., WAHLBERG, M., KARP, M., KORPELA, T., & MANTSALA, P. (1990)
Effects of modification at the C-Terminus of cyclomaltodextrin glucanotransferase from *B. circulans* var. *alkalophilus* on catalytic activity.
Biotechnol. Appl. Biochem. 12, 387-396.
- HIDAKA, H., TAKAYA, T., & MARSHALL, J.J. (1980)
Studies on amylase inhibitor, BAY_e 4609 and BAY_g 5421 from *Actinoplanes* sp..
J. Jpn. Starch. Sci. 27, 114-119.
- HILL, D.E., ALDAPE, R., & ROZZELL, J.D. (1990)
Nucleotide sequence of a cyclodextrin glucosyltransferase gene, CgtA, from *Bacillus licheniformis*.
Nucl. Acid. Res. 18, 199.
- HOFMANN, B.E., BENDER, H., & SCHULZ, G.E. (1989)
Three-dimensional structure of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* at 3.4 Å resolution.
J. Mol. Biol. 209, 793-800.
- HORIKOSHI, K. (1989)
Cyclodextrin glucanotransferase, process for its preparation and novel microorganism useful for the process.
Eur. Pat. 0,327,099,A2.
- HOSCHKE, A., LASZLO, E., & HOLLO, J. (1980)
A study of the role of histidine side-chains at the active centre of amylolytic enzymes.
Carbohydr. Res. 81, 145-156.

HOSSEINI, M.W. (1989)

La catalyse supramoléculaire.

La Recherche 206, 24-32.

HUBER, R. (1976)

Antibody structure.

Trends Biochem. Sci. 1, 174-178.

JÜNGE, B., BÖSHAGEN, H., STOLTEFUSS, J., & MÜLLER, L. (1980)

Derivatives of acarbose and their inhibitory effects on α -glucosidases.

in *Enzyme inhibitors, Proceedings of a Meeting held in Basel, Switzerland, on 20 and 21 March 1980* (U. Brodbeck, Ed.), Verlag-Chemie, Weinheim (1980) pp 123-137.

KANEKO, T., HAMAMOTO, T., & HORIKOSHI, K. (1988)

Molecular cloning and nucleotide sequence of the cyclomaltodextrin glucanotransferase gene from the alkalophilic *Bacillus* sp. stain n° 38-2.

J. Gen. Microbiol. 134, 97-105.

KIMURA, K., KATAOKA, S., ISHII, Y., TAKANO, T., & YAMANE, K. (1987^a)

Nucleotide sequence of the β -cyclodextrin glucanotransferase gene of alkalophilic *Bacillus* sp. stain 1011 and similarity of its amino acids sequence to those of α -amylases.

J. Bacteriol. 169, 4399-4402.

KIMURA, K., TAKANO, T., & YAMANE, K. (1987^b)

Molecular cloning of β -cyclodextrin synthetase gene from an alkalophilic *Bacillus* and its expression in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*.

Appl. Microbiol. Biotechnol. 26, 149-153.

KIMURA, K., KATAOKA, S., NAKAMURA, A., TAKANO, T., KOBAYASHI, S., & YAMANE, K. (1989)

Function of the COOH-Terminal region of cyclodextrin glucanotransferase of alkalophilic *Bacillus* sp. # 1011 : Relation to catalyzing activity and pH stability.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 161, 1273-1279.

KITA, Y., SAKAGUCHI, S., NITTA, Y., & WATANABE, T. (1982)

Kinetic study on chemical modification of Taka-Amylase A. II. Ethoxycarbonylation of histidine residues.

J. Biochem. 92, 1499-1504.

KITAHATA, S., TSUYAMA, N., & OKADA, S. (1974^a)

Purification and some properties of cyclodextrin glycosyltransferase from a strain of *Bacillus* species.

Agr. Biol. Chem. 38, 387-393.

KITAHATA, S., & OKADA, S. (1974^b)

Action of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus megaterium* strain n°5 on starch.

Agr. Biol. Chem. 38, 2413-2417.

KITAHATA, S., & OKADA, S. (1975)

Transfer action of cyclodextrin glycosyltransferase on starch.

Agr. Biol. Chem. 39, 2185-2191.

KITAHATA, S., OKADA, S., & FUKUI, T. (1978)

Acceptor specificity of the transglycosylation catalyzed by cyclodextrin glycosyltransferase.

Agric. Biol. Chem. 42, 2369-2374.

KITAHATA, S., & OKADA, S. (1982)

Purification and some properties of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus* TC-60.

J. Jap. Soc. Starch Sci. 29, 7-12.

KLEIN, C., VOGEL, W., BENDER, H., & SCHULZ, G. (1990)
Engineering a heavy atom derivative for the X-ray structure
analysis of cyclodextrin glycosyltransferase.
Prot. Eng. 4, 65-67.

KLEIN, C., & SCHULZ, G.E. (1991)
Structure of cyclodextrin glycosyltransferase refined at 2.0 Å
resolution.
J. Mol. Biol. 217, 737-750.

KOBAYASHI, S., KAINUMA, K., & SUZUKI, S. (1978)
Purification and some properties of *Bacillus macerans* cycloamylose
(cyclodextrin) glucanotransferase.
Carbohydr. Res. 61, 229-238.

KOBAYASHI, S., LEE ASHRAF, H.R., BRAUN, P., & FRENCH, D. (1988^a)
The branched maltooligosaccharides resulting from the action of
Bacillus macerans cycloamylose glucanotransferase on
6-O- α -D-glucopyranosyl-cyclomaltohexaose plus D-glucose.
Carbohydr. Res. 173, 324-331.

KOBAYASHI, S., LEE ASHRAF, H.R., BRAUN, P., & FRENCH, D. (1988^b)
Coupling reaction of *Bacillus macerans* cyclodextrin
glucanotransferase on glucosyl- α -cyclodextrin and glucose.
Starch/Stärke 40, 112-116.

KUBOTA, M., MIKAMI, B., TSUJISAKA, Y., & MORITA, Y. (1988)
Crystallization and preliminary crystallographic data for *Bacillus*
stearothermophilus cyclodextrin glucanotransferase.
J. Biochem. 104, 12-13.

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

LALEGERIE, P., LEGLER, G., & YON, J.M. (1982)

The use of inhibitors in the study of glycosidases.

Biochimie 64, 977-1000.

LASZLO, E., BANKY, B., SERES, G., & SZEJTLI, J. (1981)

Purification of cyclodextrin-glycosyltransferase enzyme by affinity chromatography.

Starch/Stärke 33, 281-283.

LAWSON, C.L., BERGSMA, J., BRUINENBERG, P.M., DE VRIES, G., DIJKHUIZEN, L., & DIJKSTRA, B.W. (1990)

Maltodextrin-dependent crystallization of cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus circulans*.

J. Mol. Biol. 214, 807-809.

LEBAS, G., & RYSANEK, N. (1987)

Structural aspects of cyclodextrins.

in *Cyclodextrins and their Industrial Uses* (D. Duchène, Ed.), Editions de Santé, Paris, pp 105-130.

MAC CLENAHAN, W.S., TILDEN, E.B., & HUDSON, C.S. (1942)

A study of the products obtained from starch by the action of the amylase of *Bacillus macerans*.

J. Amer. Chem. Soc. 64, 2139-2144.

MAC GREGOR, E.A., & SVENSSON, B. (1989)

A super-secondary structure predicted to be common to several α -1,4-D-glucan-cleaving enzymes.

Biochem. J. 259, 145-152.

MAKELA, M., MATTSSON, P., SCHININA, M.E., & KORPELA, T. (1988)

Purification and properties of cyclomaltodextrin glucanotransferase from an alkalophilic *Bacillus*.

Biotechnol. Appl. Biochem. 10, 414-427.

MATSUURA, Y., KUSUNOKI, M., HARADA, W., & KAKUDO, M. (1984)

Structure and possible catalytic residues of Taka-Amylase A.

J. Biochem. 95, 697-702.

MELCHIOR, W.B. Jr, & FAHRNEY, D. (1970)

Ethoxyformylation of proteins. reaction of ethoxyformic anhydride with α -chymotrypsin, pepsin, and pancreatic ribonuclease at pH 4. *Biochemistry* 9, 251-258.

MILLET, A. (1990)

Industrie des Amylacés : de la Spécialité à la Commodity. Un Entretien avec Philippe SICARD.

Biofutur 90, 76-78.

MORRISEY, J.H. (1981)

Silver stain for proteins in polyacrylamide gels : a modified procedure with enhanced uniform sensitivity.

Anal. Biochem. 117, 307-310.

MÜLLER, L., JÜNGE, B., FROMMER, W., SCHMIDT, D., & TRUSCHEIT, E. (1980)

Acarbose (BAY g 5421) and homologous α -glucosidase inhibitors from actinoplanaceae.

in *Enzyme inhibitors, Proceedings of a Meeting Held in Basel, Switzerland, on 20 and 21 March 1980* (U. Brodbeck, Ed.), Verlag-Chemie, Weinheim, pp 109-122.

MYER, Y.P., & PAL, P.K. (1972)

Spectroscopic properties of N-bromosuccinimide-modified horse heart cytochrome C.

Biochemistry 11, 4209-4216.

NAKAJIMA, R., IMANAKA, T, & AIBA, S. (1986)

Comparaison of amino acid sequences of eleven different α -amylases.

Appl. Microbiol. Biotechnol. 23, 355-360.

NAKAMURA, N., & HORIKOSHI, K. (1976^a)

Purification and properties of cyclodextrin glycosyltransferase of an alkalophilic *Bacillus* sp..

Agr. Biol. Chem. 40, 935-941.

- NAKAMURA, N., & HORIKOSHI, K. (1976^b)
Purification and some properties of neutral cyclodextrin glycosyltransferase of an alkalophilic *Bacillus* sp..
Agr. Biol. Chem. 40, 1785-1791.
- NISHIZAWA, M., OZAWA, F., & HISHINUMA, F. (1987)
Molecular cloning of an amylase gene of *Bacillus circulans*.
DNA 6, 255-265.
- NITSCHKE, L., HEEGER, K., BENDER, H., & SCHULZ, G.E. (1990)
Molecular cloning, nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of the β -cyclodextrin glycosyltransferase gene from *Bacillus circulans* strain n° 8.
Appl. Microbiol. Biotechnol. 33, 542-546.
- NITTA, Y., MIZUSHIMA, M., HIROMI, K., & ONO, S. (1971)
J. Biochem. 69, 567-571.
- NORBERG, E., & FRENCH, D. (1950)
Studies on the Schardinger dextrans. III. Redistribution reactions of macerans amylase.
J. Amer. Chem. Soc. 72, 1202-1205.
- OKADA, S., & KITAHATA, S. (1973)
in *Proc. Sym. Amylases (Osaka)* 8, 21.
- OKADA, S., & KITAHATA, S. (1975)
A method for purifying cyclodextrin-producing enzymes
U.S. Pat. 3-888-738.
- OVADI, J., LIBOR, S., & ELODI, P. (1967)
Spectrophotometric determination of histidine in proteins with diethylpyrocarbonate.
Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. 2, 455-458.

- PATCHORNIK, A., LAWSON, W.B., & WITKOP, B. (1958)
Selective cleavage of peptide bonds. II. The tryptophanyl peptide bond and the cleavage of glucagon.
J. Amer. Chem. Soc. 80, 4747-1748.
- PONGSAWASDI, P., & YAGISAWA, M. (1988)
Purification and some properties of cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus circulans*.
Agric. Biol. Chem. 52, 1099-1103.
- PULS, W., KEUP, U., KRAUSE, H.P., THOMAS, G., & HOFFMEISTER, F. (1977)
Glucosidase inhibition. A new approach to the treatment of diabetes, obesity, and hyperlipoproteinaemia.
Naturwissenschaften 64, 536-537.
- RIMINGTON, C. (1931)
Carbohydrate complex of the serum proteins. II. Improved method for isolation and redetermination of glucoaminodiamannose from proteins of ox blood.
Biochem. J. 25, 1062-1071.
- RIORDAN, J.F. & VALLEE B.L. (1972)
Nitration with tetranitromethane.
in *Methods Enzymol.* 25 (S.Kolowick & N.Kaplan, Eds.), Academic Press, pp 515-521.
- ROBYT, J.F., & FRENCH, D. (1963)
Action pattern and specificity of an amylase from *Bacillus subtilis*.
Arch. Biochem. Biophys. 100, 451-467.
- ROBYT, J.F., & FRENCH, D. (1970)
The action pattern of porcine pancreatic α -amylase in relationship to the substrate binding site of the enzyme.
J. Biol. Chem. 245, 3917-3927.

ROOSEMONT, J.L. (1978)

Reaction of histidine residues in proteins with diethyl-pyrocarbonate : differential molar absorptivities and reactivities.

Anal. Biochem. 88, 314-320.

SAENGER, W. (1980)

Cyclodextrin inclusion compounds in research and industry.

Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 19, 344-362.

SAHA, B.C., LE CUREUX, L.W., & ZEIKUS, J.G. (1988)

Raw starch adsorption-desorption purification of a thermostable β -amylase from *Clostridium thermosulfurogenes*.

Anal. Biochem. 175, 569-572.

SATO, M., YAGI, Y., NAGANO, H., & ISHIKURA, T. (1985)

Determination of CGTase from *Bacillus ohbensis* and its optimum pH using HPLC.

Agric. Biol. Chem. 49, 1189-1191.

SCATCHARD, G. (1949)

The attractions of proteins for all small molecules and ions.

Ann. N. Y. Acad. Sci. 51, 660-663.

SCHARDINGER, F. (1904)

Azetongärung.

Wien Klin. Wochenschr. 17, 207-209.

SCHARDINGER, F. (1911)

Bildung kristallisierter polysaccharide (dextrine) aus stärkekleister durch mikroben.

Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. 29, 188-197.

SCHIFFER, M., GIRLING, R.L., ELY, K.R., & EDMUNDSON, A.B. (1973)

Structure of a λ -type bence-jones-protein at 3.5 Å resolution.

Biochemistry 12, 4620-4630.

- SCHMIDT, D.D., FROMMER, W., JÜNGE, B., MÜLLER, L., WINGENDER, W., TRUSCHEIT, E., & SCHÄFER, D. (1977)
Alpha-glucosidase inhibitors. New complex oligosaccharides of microbial origin.
Naturwissenschaften 64, 535-536.
- SCHMIR, G.L., & COHEN, L.A. (1961)
Oxidative cleavage of tyrosyl-peptide bonds. II. Effects of variation in structure and pH.
J. Amer. Chem. Soc. 83, 723-728.
- SCHWIMMER, S., & BALLS, A.K. (1951)
Probable maximum specific activity of *maccerans* amylase.
Fed. Proc. 10, 245.
- SCHWIMMER, S. (1952)
Enzymic and chemical homogeneity of Schardinger dextrinogenase.
Fed. Proc. 11, 283-284.
- SCHWIMMER, S., & GARIBALDI J.A. (1952)
Further studies on the production, purification, and properties of the Schardinger dextrinogenase of *Bacillus maccerans*.
Cereal Chem. 29, 108-121.
- SCHWIMMER, S. (1953)
Evidence for the purity of Schardinger dextrinogenase.
Arch. Biochem. Biophys. 43, 108-117.
- SHAW, P.E., TATUM, J.H., & WILSON, C.W. (1984)
Improved flavor of navel orange and grapefruit juices by removal of bitter components with β -cyclodextrin polymer.
J. Agr. Food Chem. 32, 832-836.
- SICARD, P.J., & SANIEZ, M-H. (1987)
Biosynthesis of cycloglycosyltransferase and obtention of its enzymatic reaction products.
in *Cyclodextrins and their Industrial Uses* (D. Duchène, Ed.), Editions de Santé, Paris, pp 75-103.

- SIGGENS, K.W. (1987)
Molecular cloning and characterization of the beta-amylase gene from *Bacillus circulans*.
Mol. Microbiol. 1, 86-91.
- SIN, K.A., NAKAMURA, A., KOBAYASHI, K., MASAKI, H., & UOZUMI, T. (1991)
cloning and sequencing of a cyclodextrin glucanotransferase gene from *Bacillus Ohbensis* and its expression in *Escherichia coli*.
Appl. Microbiol. Biotechnol. 35, 600-605.
- SOKOLOVSKY, M., & RIORDAN, J.F., & VALLEE, B.L. (1966)
Tetranitromethane. A reagent for the nitration of tyrosyl residues in proteins.
Biochemistry 5, 3582-3589.
- SPANDE, T.F., & WITKOP, B. (1967)
Determination of the tryptophan content of proteins with N-bromosuccinimide.
in *Methods Enzymol.* 11 (S.Colowick & N.Kaplan, Eds.), Academic Press, pp 498-506.
- STARNES, R., TRACKMAN, P., & KATKOCIN, D. (1989)
Thermostable cyclodextrin glycosyltransferase, its production and use.
World Pat. 89/03421.
- SVENSSON, B., CLARKE, A.J., & SVENDSEN, I. (1986)
Influence of acarbose and maltose on the reactivity of individual tryptophanyl residues in glucoamylase from *Aspergillus niger*.
Carlsberg Res. Commun. 54, 61-73.
- SVENSSON, B. (1988)
Regional distant sequence homology between amylases, α -glucosidases and transglucanoylases.
FEBS Lett. 230, 72-76.

SVENSSON, B., JESPERSEN, H., SIERKS, M.R., & Mac GREGOR, E.A. (1989)

Sequence homology between putative raw-starch binding domains from different starch-degrading enzymes.

Biochem. J. 264, 309-311.

SVENSSON, B., CLARKE, A.J., SVENDSEN, J., & MOLLER, H. (1990)

Identification of carboxylic acid residues in glucoamylase G-2 from *Aspergillus niger* that participate in catalysis and substrate binding.

Eur. J. Biochem. 188, 29-38.

SZEJTLI, J., LASZLO, E., BANKY, B., & SERES, G. (1977)

Hung. Pat. 175,584.

SZEJTLI, J., FENYVESI, E., & ZSADON, B. (1978)

Cyclodextrinpolymere.

Starch/Stärke 30, 127-131.

SZEJTLI, J. (1982)

in *Cyclodextrins and their inclusions complexes*, Akademiai Kiado, Budapest, pp 1-296.

SZEJTLI, J. (1990)

The cyclodextrins and their applications in biotechnologies.

Carbohydr. Polymers 12, 375-392.

TAKAHASHI, T., KATO, K., IKEGAMI, Y., & IRIE, M. (1985)

Different behavior towards raw starch of three forms of glucoamylase from a *Rhizopus* Sp..

J. Biochem. 98, 663-671.

TAKANO, T., FUKUDA, M., MONNA, M., KOBAYASHI, K., KAINUMA, K., & YAMANE, K. (1986)

Molecular cloning, DNA nucleotide sequencing, and expression in *Bacillus subtilis* cells of the *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase gene.

J. Bacteriol. 166, 1118-1122.

THOMA, J.A., & FRENCH, D. (1958)

Studies on the Schardinger dextrans : X- The interaction of cyclohexaamylose, iodine and iodide. Part I. Spectrophotometric studies.

J. Amer. Chem. Soc. 80, 6141-6146.

THOMA, J.A., & KOSHLAND Jr, D.E. (1960)

Competitive inhibition by substrate during enzyme action. Evidence for the induced-fit theory.

J. Amer. Chem. Soc. 82, 3329-3333.

TILDEN, E.B., & HUDSON, C.S. (1939)

The conversion of starch to crystalline dextrans by the action of a new type of amylase separated from cultures of *Aerobacillus macerans*.

J. Amer. Chem. Soc. 61, 2900-2902.

TILLMANS, J., & PHILIPPI, K. (1929)

Carbohydrate content of the important proteins of food stuffs and a colorimetric procedure for the quantitative determination of N-free sugar in protein.

Biochem. Z. 215, 36-60.

TRUSCHEIT, E., FROMMER, W., JÜNGE, B., MÜLLER, L., SCHMIDT, D.D., & WINGENDER, W. (1981)

Chemistry and biochemistry of microbial α -glucosidase inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 20, 744-761.

VIKMON, M. (1981)

Rapid and simple spectrophotometric method for determination of micro-amounts of cyclodextrins.

in *Proceedings of the 1st International Symposium on Cyclodextrins* (Szejtli, J., ed.), D. Reidel Publishing Co., London, pp 69-74.

VILLIERS, A. (1891)

Chimie organique : sur la fermentation de la fécule par l'action du ferment butyrique.

C. R. Acad. Sci., 112, 536-538.

VINCENT, C. (1983)

Les enzymes artificielles.

Biofutur 13, 43-44.

WEBER, K., & OSBORN, M. (1969)

The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.

J. Biol. Chem. 224, 4406-4412.

WILCOX, E.R., & WHITAKER, J.R. (1984)

Some aspects of the mechanism of complexation of red kidney bean α -amylase inhibitor and α -amylase.

Biochemistry 23, 1783-1791.

YAGI, Y., KOUNO, K., & JUNI, T. (1980)

A process producing cyclodextrins.

Eur. Pat. 0,017,242.

ANNEXE

L'ACARBOSE ET SES DERIVES,**UNE NOUVELLE GENERATION D'INHIBITEURS COMPETITIFS DES
 α -GLUCOHYDROLASES, A HAUTE SPECIFICITE POUR LEUR SITE CATALYTIQUE.****I- Découverte.**

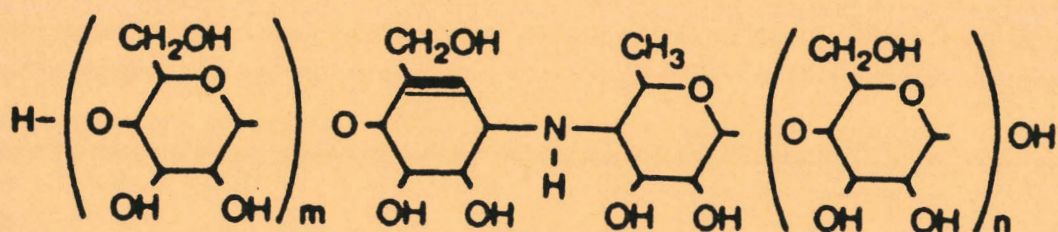
C'est dans les milieux de cultures d'*Actinoplanes sp.* qu'une série d'oligosaccharides, inhibant les α -glucosidases intestinales et l' α -amylase pancréatique *in vivo* comme *in vitro*, fut découverte et identifiée (SCHMIDT *et al.*, 1977).

II- Structure.

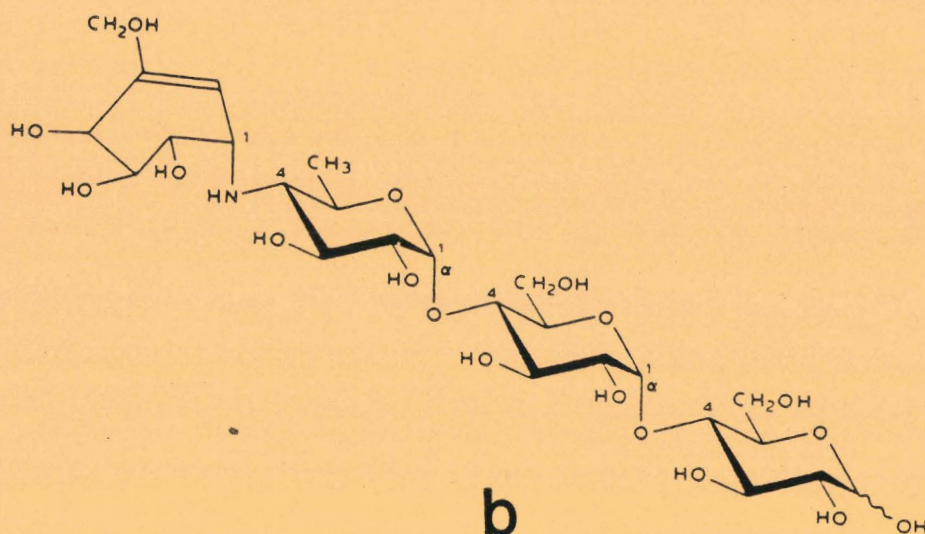
Ces inhibiteurs puissants sont des maltooligosaccharides de tailles variables dans lesquels est inséré un motif cyclitol lié à un 4,6-didésoxy-4-amino- α -D-glycopyranoside (Fig. A-1, p.199). L'acarbose (BAY g 5421), chef de file et analogue du maltotétraose, correspond à la plus petite molécule de cette série. Des études cristallographiques plus récentes ont montré que la structure tridimensionnelle de ce dernier était identique à celle d'un maltoheptaose (GOLDSMITH *et al.*, 1987).

III- Développement.

L'intérêt physiologique d'une telle série d'inhibiteurs leur confère rapidement un vif attrait pour un éventuel développement en tant que médicaments antidiabétiques (PULS *et al.*, 1977). En effet, ces produits diminuent l'hydrolyse de l'amidon en glucose et donc, *in vivo*, la glycémie. Dès lors, ces inhibiteurs sont intensivement étudiés par la société BAYER (FROMMER *et al.*, 1979; MÜLLER *et al.*, 1980).



a



b



Figure n°A-1

a) Formule générale des oligosaccharides dérivés de l'acarbose ($m=0$, $n=2$ pour ce dernier).

b) Structure de l'acarbose (BAY g 5421).

IV- Mode d'action.

Les études menées par les équipes de BAYER montrent que l'acarbose est le plus inhibiteur vis-à-vis des invertases, alors que ses dérivés de tailles supérieures inhibent plus spécifiquement les α -amylases.

Des préparations chimiques d'acarbose dégradé révéleront la nécessité, pour obtenir l'effet inhibiteur, de la présence simultanée du cyclitol insaturé et de l'amino-sucré (JUNGE *et al.*, 1980; TRUSCHEIT *et al.*, 1981). En adaptant l'acarbose au modèle catalytique à deux acides carboxyliques, décrit par BLAKE *et al.* (1967) pour le lysozyme, le cyclitol interagirait avec le site de fixation du glucopyranosyle en mimant l'intermédiaire oxonium/carbenium obtenu lors de la coupure des α -1,4 glucanes. L'amine axiale prendrait alors la place de la liaison glycosidique, mais sans pouvoir être protonée. Des études cinétiques ont confirmé ce mode d'action (HANOZET *et al.*, 1981).

Dans le cas des α -amylases, une molécule d'acarbose se fixe au site catalytique avec une forte affinité ($K_D = 9,7 \mu\text{M}$) pour engendrer une inhibition compétitive ($K_I = 18 \mu\text{M}$) vis-à-vis du substrat (WILCOX *et al.*, 1984). D'autre part, l'acarbose inhibe également les α -D-glucosidases humaines de manière compétitive (CALDER *et al.*, 1989).

La grande spécificité de l'acarbose pour le site catalytique des α -glucohydrolases fut directement prouvée par SVENSSON *et al.* (1990) dans le cas de la glucoamylase d'*Aspergillus niger*. En effet, elle montra que l'acarbose est capable de protéger les résidus catalytiques Asp₁₇₆, Glu₁₇₉ et Glu₁₈₀ de cette enzyme vis à vis de l'action d'un carbodiimide.

Enfin, des cristaux du complexe acarbose/ α -amylase pancréatique ont récemment été analysés par diffraction des Rayons-X (CHERON et al., 1991). Les résultats montrent que la fixation de l'unité maltose s'effectue par l'intermédiaire de liaisons hydrogène contractées avec les résidus Glu₆₀, Ser₁₀₅ et Asp₂₃₆. L'orientation de la molécule dans les sous-sites à D-glucose est assurée par des liaisons hydrophobes avec les résidus Trp₅₈, Trp₅₉ et Tyr₆₂. Cependant, si la fixation est assurée par l'unité maltose, c'est bien la molécule d'acarviosine qui assure la spécificité de l'inhibition.

