



HAL
open science

Découverte, ingénierie moléculaire et mise en oeuvre d'enzymes pour la synthèse de polysaccharides à façon

Claire Moulis

► To cite this version:

Claire Moulis. Découverte, ingénierie moléculaire et mise en oeuvre d'enzymes pour la synthèse de polysaccharides à façon. Sciences du Vivant [q-bio]. INP DE TOULOUSE, 2021. <tel-04779439>

HAL Id: tel-04779439

<https://hal.science/tel-04779439v1>

Submitted on 13 Nov 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

Dossier présenté devant
L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE
En vue de l'obtention de l'
HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

**Découverte, ingénierie moléculaire et mise
en œuvre d'enzymes pour la synthèse de
polysaccharides à façon**

Claire MOULIS

Maître de Conférences INSA Toulouse
Toulouse Biotechnology Institute, Bio & Chemical Engineering
UMR CNRS/INSA 5504, UMR INRAE/INSA 792

Travaux présentés le 26 mai 2021 devant le jury :

Mme J. PELLETIER	Professeure, Université de Montréal, Canada	Rapportrice
Mr P. COUTINHO	Professeur, Ecole Polytech Marseille	Rapporteur
Mr P. MICHAUD	Professeur, Université de Clermont Auvergne	Rapporteur
Mme M. DOLS-LAFFARGUE	Professeure, Ecole ENSCBP, Bordeaux	Examinatrice
Mr P. MONSAN	Professeur Emérite, INSA Toulouse	Examinateur
Mme REMAUD-SIMEON	Professeure, INSA Toulouse	Examinatrice



Table des matières

I. CURRICULUM VITAE.....	3
II. ACTIVITES D'ENSEIGNEMENT	7
III. ACTIVITES DE RECHERCHE	12
1. A la découverte de nouvelles α-transglucosylases dans la diversité naturelle	18
1.1. Etat des lieux et présentation de la famille GH70.....	18
1.2. Séquençage des génomes de <i>Leuconostoc citreum</i> NRRL B-1299 & NRRL B-742	21
1.3. A la recherche d' α -transglucosylases dans un nouveau genre bactérien, <i>Oenococcus</i> sp.	30
2. Etude des relations structure-fonction et Ingénierie des α-transglucosylases.....	34
2.1. Mécanisme de polymérisation des glucane-saccharases et déterminants structuraux impliqués dans la taille des polymères.	34
2.2. A la recherche de déterminants structuraux impliqués dans la spécificité de liaison de l'alternane-saccharase	47
2.3. Ingénierie des α -transglucosylases pour la glycosylation de molécules non-naturelles	50
3. Approches développées pour l'utilisation des nouveaux oligo & polymères de glucose en industrie	61
3.1. Comment augmenter l'expression hétérologue des α -transglucosylases de la famille GH70 ?.....	61
3.2. Développement de synthèse d'oligosaccharides et de polysaccharides pour un usage industriel	64
4. Perspectives de recherches.....	71
IV. PRODUCTION SCIENTIFIQUE & ARTICLES CHOISIS.....	72
V. LISTE DES (CO)-ENCADREMENTS	79
VI. LISTE DES PROJETS DE RECHERCHE	Erreur ! Signet non défini.
VII. ARTICLES CHOISIS	Erreur ! Signet non défini.

I. CURRICULUM VITAE

Claire MOULIS

Née le 7 Janvier 1979
Nationalité française
2 enfants

✉ : 216 rue de Lazières
31290 Vieilleville
☎ : 06 63 71 68 86



Maître de Conférences, 4^{ème} échelon Hors Classe

Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, Dpt Génie Biochimique
Laboratoire Toulouse Biotechnology Institutue
135 avenue de rangueil, 31077 Toulouse Cedex 4
☎ : 05 61 55 94 46 ; e-mail : moulis@insa-toulouse.fr

Diplômes et titres universitaires

- 2002-2006 **Doctorat**, Spécialité Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries, Filière Microbiologie et Biocatalyse Industrielle. INSA Toulouse, mention très honorable et félicitations du jury.
- 2002 **DEA**, Spécialité : Biologie, Santé, Biotechnologies, INSA Toulouse, mention Bien.
- 2002 **Diplôme d'Ingénieur** INSA Toulouse, Option Génie Biochimique et Alimentaire.
- 1997 **Baccalauréat S**, Spécialité Mathématiques, mention Très Bien.

Fonctions exercées

- Depuis 2009 **Maître de Conférences**, Département Génie Biochimique, INSA Toulouse.
- 2008-2009 **ATER**, Département Génie Biochimique, INSA Toulouse.
*192h eqTD – TD&TP de Thermodynamique, Biochimie, Microbiologie et Enzymologie.
Conception d'α-transglucosylases pour la synthèse de motifs antigéniques.*
- 2006-2008 **Post-doctorat**, Equipe de Catalyse et Ingénierie Moléculaire Enzymatiques (CIMEs), LISBP-INSA Toulouse. Projet ANR OptiGluc (2005-2008)
Conception à façon d'α-transglucosylases pour la synthèse chimio-enzymatique d'antigènes osidiques.
- 2005-2006 ½ **ATER**, Département Génie Biochimique, INSA Toulouse.
*96h eqTD - TP de Biochimie, Microbiologie et Enzymologie
Poursuite des activités de doctorat & soutenance de la thèse en avril 2006.*
- 2002-2005 **Doctorat**, bourse CIFRE (Société Béghin-Say) sous la direction de Magali Remaud-Simeon et Gabrielle Potocki-Veronèse. Equipe CIMEs, LISBP-INSA Toulouse.
Ingénierie rationnelle de la dextrane-saccharase DSR-S : compréhension du mécanisme de polymérisation pour la synthèse de dextrans de taille contrôlée.

Activités d'enseignement

Depuis 2009 : Enseignement dispensé aux élèves ingénieurs INSA en **thermodynamique** (L1, L2), **biochimie structurale** (L2), **microbiologie** (L3), **enzymologie et ingénierie enzymatique** (L3, M2), **bioinformatique** (M1, M2).

Charge d'enseignement en heures équivalent-TD depuis septembre 2009 :

Années	09/10	10/11	11/12	12/13	13/14	14/15	15/16	16/17	17/18	18/19	19/20	20/21
Heures	96	208	241	210	215	236	236	240	238	270	258	245

Depuis 2013 : Selon la demande, cours de formation continue INSA sur l'expression des protéines recombinantes (3 jours)

Depuis 2020 : Intervention dans le module « Bioconversions » du Master spécialisé Bioprocédés-Ecole CPE Lyon (7h)

Activités de recherche

Mes activités concernent essentiellement le développement et la mise en œuvre de stratégies raisonnées d'ingénierie permettant la recherche et/ou la création d'enzymes déployant de nouvelles spécificités, notamment pour la synthèse contrôlée de nouveaux oligosaccharides, polysaccharides et glucoconjugués.

Mots clefs : Catalyse enzymatique – Etude des relations structure/fonction des protéines – Ingénierie enzymatique – CAZymes (enzymes actives sur les sucres) – Glycodiversification – Polysaccharides

Contributions scientifiques :

- 47 publications dans des revues à comité de lecture (8 en dernier auteur)
- 14 brevets (2 licenciés, 1 en cours de négociation)
- 13 communications orales (congrès nationaux et internationaux)

Co-Encadrement scientifique :

- 9 thèses (de 30 à 50% de co-encadrement)
- 6 stages de Master2 ou fin d'études INSA
- 4 stages de fin d'études IUT ou cycle ingénieur INSA
- 15 post-doctorants, ingénieurs de recherche ou ingénieurs d'études

Projets financés par appel d'offres :

- 6 projets ANR : Glucodesign (2009-2011); Oenopolys (2011-2013); Engel (2012-2014); Aspire (2015-2018); CarbUnivax (2015-2019) ; Grafting (2019-2022, coordinatrice)
- 4 projets TWB-précompétitifs : Apposa (2013-2014) ; SubtilCarbs (2015-2016) ; Droopy (2017-2019) ; Biface (2019-2020, coordinatrice)
- 1 projet FUI : Projet Codex, entreprise Tate&Lyle (2010-2013)
- 1 projet 3BCar : Ecotransform (2017-2018)
- 1 projet de maturation financé par l'INRAE : Page (2019-2020)
- 8 projets en partenariat direct avec les entreprises Solvay, Tate&Lyle, Roquette, Limagrain, SNF, Olygose.

Collaborations (passées ou en cours):

- Université de Sfax, Tunisie: Prof Semia Ellouz-Chaabouni,
- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Bresil: Prof Rafael Costa Rodrigues,
- Cuban Research Institute on Sugarcane By-Products (ICIDCA) Havana, Cuba: Dr R. Fraga Vidal,
- Institut Pasteur, Paris : Dr. L. Mulard,
- Institut MICALIS UMR1319, INRA Grignon : Drs. Etienne Dervynn, Mathieu Jules, O. Berteau,
- Institut Scientifique de la vigne et du vin, ISVV, Université de Bordeaux: Prof Marguerite Dols,
- Laboratoire LBAE, IUT Paul Sabatier d'Auch : Prof Catherine Fontagné-Faucher,

- Laboratoire BIA, INRAE Nantes: Drs. A. Sabaté, D. Lourdin, B. Cathala,
- Laboratoire IPREM, Pau : Dr Susana Fernandes.
- Partenaires toulousains: Toulouse White Biotechnology (TWB) et CRITT Bioindustries

Réseaux de recherche

- Membre de la Société Française de Biochimie et de Biologie Moléculaire (SFBBM)
- Membre du Groupe Français des Glycosciences (GFG)
- Membre des GDR BioMatPro (211-2014), Symbiose (2015-2019) et Dumbio (création en 2020)

Activités d'administration et de responsabilités collectives

2009-2019 : Co-responsable de la 2^{ème} année pré-orientation ICBE (L2) (96 étudiants)

Depuis 2019 : Responsable de la 4^{ème} année Génie Biologique (M1) (48 étudiants)
Élaboration des emplois du temps, interlocutrice entre étudiants et responsables d'UFs, bilans pédagogiques.

2014 : Responsable de l'élaboration d'un semestre de formation (400h) niveau M2 commun aux étudiants des écoles d'ingénieurs INSA et ENSAT de Toulouse et dédié à l'enseignement des Biologies computationnelles pour les biotechnologies

Depuis 2019 : Responsable de l'animation du sous-groupe Enzynov (5 permanents, 8 non-permanents) au sein de l'équipe de Biocatalyse du TBI.

II. ACTIVITES D'ENSEIGNEMENT

L'INSA de Toulouse est un établissement public d'enseignement supérieur et de recherche proposant une formation d'ingénieur en 5 ans, dans 8 spécialités différentes. Le cursus commence par une 1^{ère} année post-bac commune à tous les étudiants (L1), suivie de 2 années de pré-orientation (L2, L3) au choix selon 4 grands domaines : Ingénierie Chimique, Biochimique et Environnementale (ICBE), Ingénierie de la Construction (IC), Ingénierie des Matériaux, Composants et Systèmes (IMACS), et Modélisation, Informatique et Communication (MIC). Les deux dernières années sont des années de spécialisation au sein d'un département (M1, M2), dont le département de Génie Biochimique auquel je suis rattachée.

En septembre 2008, j'ai candidaté et obtenu un poste d'attaché temporaire d'enseignement et de recherche à temps-plein, et participé à des enseignements de thermodynamique, d'électrochimie, de microbiologie et de biochimie structurale, que cela soit sous forme de TDs ou de TPs. Etudiante dans cette même école quelques années auparavant, j'en retrouvais les salles de classes. J'ai alors pu découvrir le métier d'enseignant et m'y suis pleinement investie, prenant plaisir à transmettre mes connaissances et compétences aux étudiants, expérience d'une très grande richesse scientifique et humaine. J'ai ensuite eu la chance de pouvoir pérenniser cet investissement suite à l'ouverture d'un poste de Maître de Conférences sur ce même profil d'enseignements l'année suivante. Le département m'a alors demandé de prendre la co-responsabilité pédagogique des étudiants en 2^{ème} année de la pré-orientation ICBE, en partenariat avec un collègue du département de Génie des Procédés pour l'Environnement. J'ai choisi l'an dernier de suivre désormais les étudiants de 4^{ème} année en génie biologique. En 2012, j'ai eu l'opportunité de créer un cours d'analyse bioinformatique des séquences (nucléiques et protéiques) destiné aux étudiants de M1, que j'ai accepté en laissant mes enseignements d'électrochimie. A ce jour, j'enseigne donc à la fois de la thermodynamique macroscopique pour le génie des procédés, mais aussi de la biochimie structurale, de la microbiologie, de l'ingénierie enzymatique et de la bioinformatique pour le génie biologique. A la rentrée 2021, j'espère avoir l'opportunité de reprendre le cours d'enzymologie destiné à nos étudiants de L3. Ce profil atypique dans mes activités d'enseignement n'a pas toujours été évident à gérer, couvrant de larges domaines de compétences. En effet, si je possédais des compétences transverses en enzymologie, biochimie, biologie moléculaire et microbiologie de par mes activités de doctorat et de post-doctorat, mes compétences en thermodynamique macroscopique, en génie des procédés et en électrochimie se résumaient grosso modo à ce que j'avais appris lors de ma formation d'ingénieur. Mes premières années d'enseignement ont donc été en grande partie consacrées à un approfondissement de mes connaissances dans ces matières. Ce profil mixte s'avère toutefois très intéressant, et apprécié de nos étudiants, car bien représentatif de l'alliance entre sciences des procédés et sciences du vivant qu'on souhaite leur voir acquérir.

Aujourd'hui, je suis donc tout d'abord fortement impliquée dans l'enseignement de la **thermodynamique macroscopique axiomatique**. Jusqu'en 2019, j'intervenais à la fois en L1 et en L2-ICBE, mais j'ai abandonné l'an dernier mon implication en première année. En L2-ICBE, j'assure les cours magistraux qui approfondissent l'ensemble des concepts vus en première année, à savoir la notion de gaz parfait, l'application du premier et du second principe à des systèmes fermés ou des systèmes ouverts en régime stationnaire, les notions d'équilibres entre phases d'un corps pur et le développement des machines thermiques. Un collègue se charge ensuite d'une partie traitant les systèmes chimiques et physicochimiques, abordant les notions de grandeurs molaires partielles, grandeurs de réaction, potentiel chimique et fugacité et leur application à l'étude des solutions réelles et des équilibres chimiques. Nous avons entièrement repris la constitution de ce cours à deux en 2017, retravaillant l'ensemble des notions que nous souhaitons aborder, et en les illustrant au travers d'exemples simples de la vie courante (déshumidificateur d'air, préparation de bouteilles de plongée par exemple) ou des procédés importants pour la transition énergétique (centrale géothermique,

production de Bio-hydrogène, etc), et la mise en place de quizz interactifs pendant les séances de cours. J'encadre deux groupes de 24 étudiants sur 25 séances de TDs chacun.

J'interviens ensuite, toujours en L2-ICBE, dans l'UF de **biochimie structurale** qui aborde une description complète des grandes molécules du vivant, à savoir les glucides, lipides, acides nucléiques et protéines (structure, fonction, techniques d'analyses et applications). Depuis 2013, je suis en charge du cours sur les acides nucléiques. Les étudiants revoient ou découvrent les principales fonctions de l'ADN, des ARN, leur organisation dans la cellule et sont initiés à la biologie moléculaire et au génie génétique. J'ai eu à cœur de créer un enseignement mettant en avant le caractère très récent de nos connaissances sur ces biomolécules, toujours en plein essor, qui permettent le développement d'une multitude d'outils génétiques pour les biotechnologies mais aussi la médecine personnalisée. J'essaie aussi de les sensibiliser aux questions de bioéthique. J'encadre également un groupe de 24 étudiants sur 8 séances de travaux dirigés concernant l'ensemble de l'UF.

En troisième année (L3-ICBE), j'interviens dans l'UF de **microbiologie et statistiques** en encadrant un TP d'initiation aux manipulations en microbiologie. Les étudiants apprennent à manipuler en conditions stériles et réalisent des expériences simples. J'encadre également un groupe d'étudiants en L3 sur un **projet d'initiation à la recherche** que nous appelons « **microthèse** ». Chaque année, nous proposons un sujet différent, en lien avec nos activités de recherche. L'encadrant doit proposer une thématique, mais sans connaître au préalable le résultat des expériences qui pourront être menées. Au cours de réunions régulières, nous guidons les étudiants dans leurs recherches bibliographiques, puis dans l'élaboration d'un protocole de manipulations envisageables sur une semaine, en essayant de satisfaire au mieux ce qu'ils souhaitent mettre en œuvre. La semaine de manipulation est très enrichissante, car nous devons généralement réajuster le programme au vu des premiers résultats obtenus. Les étudiants sont souvent confrontés pour la première fois aux aléas de la recherche, et à des manipulations qui peuvent ne pas donner le résultat escompté dès la première tentative. Côté enseignement, j'ai à cœur de leur permettre de mobiliser un maximum des notions vues au cours de leur formation (combinaisons de notions de biochimie structurale, chimie organique, chimie structurale, enzymologie et microbiologie).

Au sein de l'UF d'Ingénierie Enzymatique dispensée aux étudiants en 4^{ème} année de la formation en génie biologique (M1), j'assure une **initiation à l'analyse bioinformatique** des séquences. J'ai choisi de construire un enseignement basé sur un volet introductif de quelques séances de cours où j'insiste sur les techniques de séquençage de nouvelles générations (2 et 3^{ème} génération) permettant aujourd'hui le séquençage ultra-rapide des génomes et des échantillons métagénomiques, puis sur les techniques d'assemblages et les notions d'homologie de séquences. Le reste de l'apprentissage se fait de manière interactive en petits groupes, face à l'ordinateur, sous forme d'un projet sur la journée. L'objectif est de leur montrer comment interroger diverses bases de données, aller rechercher des séquences nucléiques (gènes ou génomes) ou protéiques, présenter et utiliser les outils d'alignement local (BLAST) ou global (CLUSTAL, MAFFT et d'autres) disponibles en ligne. Nous comparons les informations obtenues avec les différents outils, les différences entre recherches à partir de séquences nucléiques ou protéiques, visualisons et discutons les arbres phylogénétiques générés à partir de ces outils. Enfin, une partie est également consacrée à la recherche de motifs signatures spécifiques d'une activité enzymatique, et nous réalisons des petites prédictions de relations structure-fonction à partir d'alignements de séquences protéiques.

Enfin, j'interviens en **M2** sur un projet expérimental de 4 semaines avec des étudiants de l'**option Biocatalyse**, lorsque celle-ci est ouverte (selon les années). Comme en L3, l'objectif est de permettre aux étudiants de mobiliser un maximum des notions vues au cours de leur formation, en mettant l'accent sur ce qui a trait à l'activité des enzymes et leur potentiel industriel. Selon les années,

nous pouvons mettre en place aussi bien des projets d'ingénierie enzymatique (évolution semi-rationnelle ou dirigée) que le développement d'un procédé de synthèse batch ou continu par voie enzymatique, par exemple.

En 2014, le département m'a confié la mission **de monter une spécialisation commune** ouverte aux étudiants en M2 de l'INSA et de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Toulouse (INP-ENSAT), dédiée à **l'enseignement des biologies computationnelles pour les biotechnologies**. L'objectif de cette spécialisation était de répondre à la forte demande de formation en bioinformatique au sens large exprimée dans les secteurs des biotechnologies végétales et industrielles, et permettre ainsi d'ouvrir de nouveaux débouchés à nos élèves ingénieurs. En collaboration avec un collègue de l'ENSAT, notre objectif a été de i) définir le contenu de cette formation (de manière à répondre aux demandes des professionnels tout en proposant un parcours distinct des autres formations disponibles au niveau local, régional, national dans ce secteur), et ii) constituer l'équipe pédagogique (identifier les enseignants-chercheurs de nos deux écoles, mais aussi les chercheurs bio-informaticiens travaillant dans les laboratoires associés à l'INSA et à l'INP-ENSAT susceptibles d'intervenir au mieux dans cette formation). Le contenu de ce cursus a été essentiellement axé sur la maîtrise des outils d'automatisation et l'analyse statistique, la formation à l'analyse des données NGS (génération des séquences, assemblage, annotation), les outils nécessaires aux analyses de post-génomique (transcriptome, métabolome, protéome), de biologie des systèmes (analyse statistique, topologie des réseaux, modèles bayésiens, réseaux de régulation) et de biologie structurale computationnelle (construction de modèles 3D, analyses d'interactions protéines/ligands, dynamique fonctionnelle). Je n'interviens pas dans cette formation, mais j'ai cependant pris beaucoup de plaisir à construire un parcours à la fois rigoureux et original, et à motiver mes collègues chercheurs à s'y impliquer afin de transmettre leur savoir et savoir-faire à nos étudiants. La majorité des enseignements sont ainsi réalisés sous formes d'études de cas et de mini-projets, en lien direct avec les thématiques de recherche développées dans nos laboratoires.

Comme tous mes collègues, je participe chaque année à des **oraux de synthèse** en fin de 4^{ème} année (M1), au **jury de stages M1** et aux **jury de projets de fin d'études** et/ou master recherche des étudiants de 5^{ème} année (M2). Selon les années, je participe également aux entretiens de recrutement des futurs étudiants INSA, aux journées portes-ouvertes qui permettent de faire découvrir l'école aux futurs bacheliers, ainsi qu'à l'accompagnement d'étudiants lors de visites d'entreprises organisées par le département.

Enfin, j'ai construit en 2012 un **cours de formation continue** dédié aux techniques de clonage de gènes et à l'expression de protéines recombinantes chez *E. coli*, qu'il m'arrive de faire selon les années. Cette formation est divisée en une partie théorique (panorama des techniques de clonage, des outils permettant la simulation *in silico* des constructions à réaliser, des souches d'expression disponibles et des verrous généralement rencontrés) ainsi que d'une partie pratique (un gros TP sur 2 jours illustrant les concepts abordés). En 2020, j'ai été invitée à participer au **Master Spécialisé Bioprocédés de l'école CPE de Lyon** dans le cadre du module Bioconversions. Il s'agit d'une intervention de 7h dédiée aux biotechnologies blanches et plus particulièrement au développement des procédés enzymatiques pour la synthèse de molécules d'intérêts (secteurs agro, pharma, médical, cosmétique, chimie, chimie fine, environnement).

III. ACTIVITES DE RECHERCHE

Préambule

La glycosylation est une réaction majeure dans de nombreux processus biologiques, les molécules formées pouvant jouer un rôle de structure, constituer des réserves énergétiques ou intervenir dans les phénomènes de communication, signalisation et protection des cellules. *In cellulo*, le transfert d'un résidu glycosyle d'un substrat donneur à une molécule acceptrice est presque exclusivement catalysé par des glycosyltransférases de type Leloir, enzymes utilisant des sucres activés (nucléotide-sucres) comme substrat¹. Or, la demande en oligosaccharides, polysaccharides et glycoconjugués n'a cessé d'augmenter ces dernières décennies. Des structures bien définies sont en effet nécessaires pour étudier le rôle de la glycosylation dans les phénomènes biologiques. En outre, l'intérêt pour l'application d'oligosaccharides et de glycoconjugués bioactifs dans les industries alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques ne cesse de croître, tout comme celle des polysaccharides dans ces mêmes secteurs d'application ainsi qu'en chimie fine. Cependant, les glycosyltransférases de type Leloir ne peuvent être des candidats idéaux pour la synthèse *in vitro* et à grande échelle de produits glycosylés, car les nucléotide-sucres utilisés restent encore aujourd'hui très coûteux et peu disponibles. Certaines autres glycosyltransférases utilisant des sucres-1-phosphate se sont récemment révélées efficaces pour la synthèse à grande échelle de quelques petites molécules telles que le glycosylglycérol ou le resvératrol glucoside, par exemple². Toutefois, ces réactions peuvent également avoir des limites car un équilibre thermodynamique défavorable se produit fréquemment avec ces enzymes, et les sucres-1-phosphate restent aussi des substrats relativement chers. Une troisième alternative enzymatique existe cependant, qui consiste à utiliser certaines glycoside-hydrolases (GHs), en particulier celles qui conservent la configuration anomérique de leur substrat lors de la réaction (retaining enzymes³). Ces enzymes utilisent des substrats abondants, tels que les disaccharides, les oligosaccharides et les polysaccharides, ce qui est particulièrement avantageux dans un contexte de développement de la bioéconomie. En effet, si la majorité des GHs transfèrent leur résidu glycosyle sur des molécules d'eau –entraînant bien une hydrolyse du substrat initial-, certaines enzymes –qu'on appelle transglycosylases- vont favoriser un transfert sur une molécule acceptrice autre que l'eau.

Or, mes travaux de recherche portent –depuis mon doctorat- essentiellement sur **l'étude des relations structure-fonction et l'ingénierie d'une famille d' α -transglucosylases bactériennes** qui utilisent le saccharose pour la synthèse d'homopolymères d'unités glucosyle associées par des liaisons α -osidiques. Ces polymères (α -glucanes) sont généralement de très haute masse molaire (10^5 - 10^8 g/mol) et de structures variées ([Erreur ! Source du renvoi introuvable.](#)). Les enzymes responsables de cette synthèse sont classées dans la famille 70 des Glycoside-Hydrolases (GH70)⁴. A ce jour, seul un petit groupe restreint de bactéries lactiques est décrit comme producteur de ces enzymes et des exopolysaccharides (EPS) correspondants. Le mutane et le dextrane sont ainsi des polysaccharides essentiellement linéaires, composés respectivement à plus de 50% de liaisons α -1,3 et plus de 50% de liaisons α -1,6 par définition, mais certains ne comportent qu'un seul type de liaison. Sinon, la nature

¹ Nidetzky, B.; Gutmann, A. and Zhong, C. 2018. Leloir Glycosyltransferases as Biocatalysts for Chemical Production. *ACS Catalysis*, 8 (7): 6283–6300

² Franceus J. ; Desmet T. 2020. Sucrose Phosphorylase and Related Enzymes in Glycoside Hydrolase Family 13: Discovery, Application and Engineering. *Int J Mol Sci.* 21(7):2526.

³ Koshland, D.E. 1953 Stereochemistry and the Mechanism of Enzymatic Reactions, *Biological Reviews*, 28 (4): 416–436.

⁴ Base de données « Carbohydrate Active Enzymes », www.cazy.org

et le pourcentage de liaisons α -1,2, α -1,3 α -1,4 et/ou α -1,6 dépendront de la souche productrice. Le reuterane est quant à lui composé d'à peu près autant de liaisons α -1,4 que de liaisons α -1,6, (à la fois dans la chaîne principale et dans les ramifications), et l'alternane est composé de liaisons α -1,6 et α -1,3 alternées dans la chaîne principale.

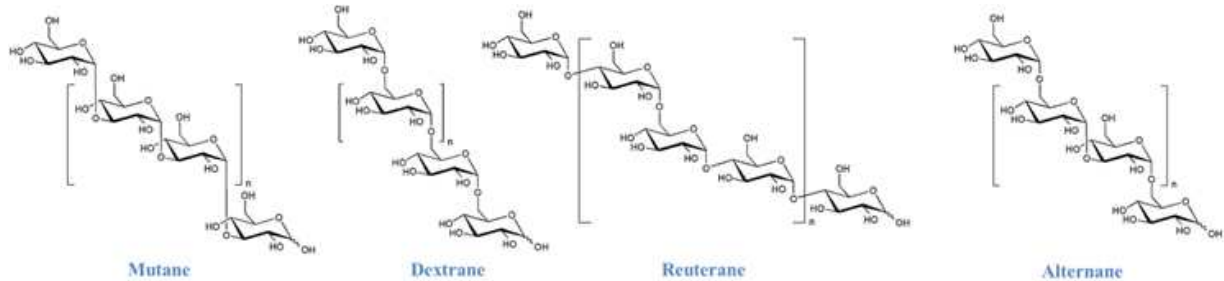


Figure 1. Représentation schématique des α -glucanes produits à partir de saccharose par les enzymes de la famille GH-70.

Brièvement, d'un point de vue réactionnel, la première étape de la réaction enzymatique consiste en la formation d'un intermédiaire covalent β -D-glucosyl-enzyme, accompagné de la libération concomitante d'une molécule de fructose (**Figure 2**). Ensuite, le résidu glucosyle peut être transféré sur différentes molécules : i) l'eau en tout début de réaction, libérant ainsi du glucose, ii) le saccharose lui-même ou le glucose préalablement formé, entraînant la formation d'oligosaccharides puis de polysaccharides de très haute masse molaire (réaction de polymérisation), iii) le fructose, formant alors des isomères du saccharose tels que le leucrose (essentiellement en fin de réaction). Enfin, iv) si des molécules hydroxylées exogènes sont présentes dans le milieu et qu'elles peuvent s'arrimer dans le site actif, elles pourront être glucosylées au détriment de la synthèse du polymère. Elles permettent alors la synthèse d'une large gamme d'oligosaccharides et/ou de gluco-conjugués d'intérêt⁵.

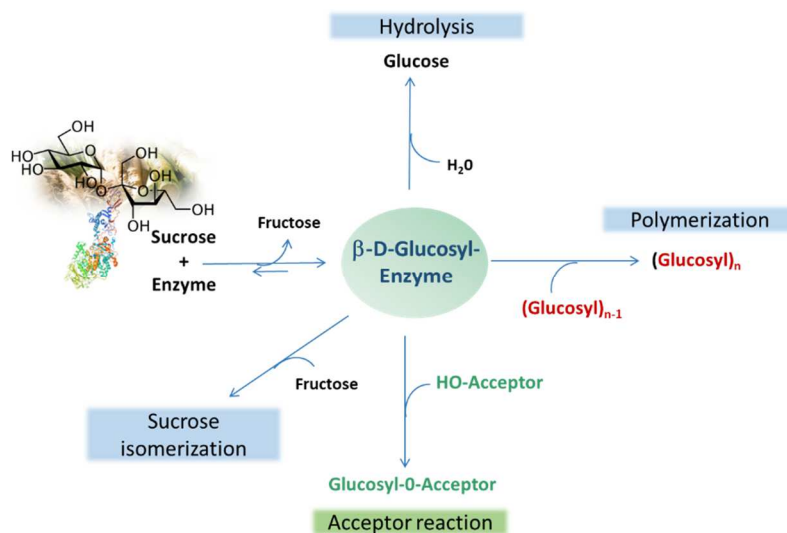


Figure 2. Les différentes réactions catalysées par les enzymes de la famille GH70 actives sur le saccharose : i) réaction d'hydrolyse, ii) réaction de polymérisation des unités glucosyle, iii) formation de leucrose et iv) réaction d'accepteur

⁵ André I, Potocki-Véronèse G, Morel S, Monsan P & Remaud-Siméon M. 210. Sucrose-utilizing transglucosidases for biocatalysis. *Top. Curr. Chem.* 294, 25–48;

Le seul substrat requis par les enzymes GH70 est donc **le saccharose**, issu de la culture de la betterave sucrière et de la canne à sucre. Ces dernières années, la production mondiale est restée relativement stable aux alentours de 160-180 millions de tonnes, pour un prix fluctuant entre 280 et 400 €/tonne depuis 2017⁶. C'est donc une agro-ressource largement disponible dont le faible coût motive la synthèse de molécules à plus forte valeur ajoutée.

On observe aujourd'hui un intérêt croissant pour les polysaccharides d'origine microbienne car leur production est généralement stable, maîtrisée, non saisonnière et indépendante d'éventuels aléas climatiques ou géopolitiques qui peuvent affecter la production des polysaccharides extraits de plantes ou d'algues, même si ces derniers dominent encore le marché⁷. **En ce qui concerne les α -glucanes, leurs applications dépendent à la fois de leur structure, mais aussi de leur taille.** Ainsi, le dextrane produit par la souche *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F, composé à plus de 95% de liaisons α -1,6, fut le premier polymère d'origine microbienne commercialisé en tant que substitut du plasma sanguin dès les années 1940. Dans le secteur pharmaceutique, les applications n'ont cessé de se développer, que cela soit pour des produits ophtalmiques, agents anticoagulants, transporteurs de fer pour le traitement de l'anémie, ou pour la formulation de vaccins et la conservation d'organes par exemple. Cependant, toutes ces applications utilisent des fractions de dextrane de masse molaire contrôlée (0,5 ; 1 ; 4 et 7. 10⁴ g.mol⁻¹), obtenues par hydrolyse acide du dextrane natif (> 2.10⁶ g.mol⁻¹) suivie de fractionnements à l'aide de solvants organiques ou par séparation membranaire. Les dextrans de masse molaire contrôlée sont aussi très utilisés dans le secteur analytique (Gels Sephadex® par exemple). Ces applications en pharmacie et chimie fine concernent des dextrans neutres, mais aussi des dextrans fonctionnalisés par divers types de groupements chimiques (DEAE-dextran, CMC-dextran, dextran-sulfate, iron-dextran, FITC-dextran, biotin-dextran, dextran méthacrylates, alkyl dextran éther, etc). A ce jour, la substitution des groupements hydroxyle par ces divers groupements est exclusivement réalisée par voie chimique, dans des conditions bien souvent extrêmes (températures élevées, utilisation de réactifs polluants)⁸. En ce qui concerne le marché des agents de texture, les glucanes natifs de masse molaire très élevée sont privilégiés. Ainsi, l'Union Européenne a autorisé, en 2001, l'incorporation du dextrane natif de la souche NRRL B-512F aux produits de panification ou aux crèmes glacées. Ce même type de dextrane est également utilisé dans certaines exploitations minières ou pétrolières, comme agent floculant. D'une manière générale, notons que **le nombre de brevets liés aux applications des dextrans est incroyablement élevé puisque nous pouvons relever plus de 135 000 brevets déposés depuis 2015 avec ce mot-clef⁹**, fournissant une preuve évidente de la popularité des α -glucanes et de leur potentiel actuel pour l'innovation.

Enfin, une dernière application prometteuse concerne les aliments-santé. En effet, les glucooligosaccharides sont reconnus depuis plus d'une vingtaine d'années pour leurs **propriétés prébiotiques**, notamment pour le microbiote intestinal. Pour rappel, un prébiotique est un substrat métabolisé de manière sélective par certains micro-organismes de la flore qui libèrent alors des molécules bénéfiques pour la santé de l'hôte. Outre les premiers travaux mettant en exergue une meilleure motilité intestinale ou une diminution des réactions inflammatoires locales (types IBD ou

⁶ Site web Isosugar : www.isosugar.org, consulté en décembre 2020

⁷ Kreyenschulte D, Krull R & Margaritis A. 2014 Recent Advances in Microbial Biopolymer Production and Purification. *Crit. Rev. Biotechnol.* 34, 1-15

⁸ Heinze T., Liebert T., Heublein B., Hornig S. 2006. Functional polymers based on dextran. In: Klemm D. (eds) Polysaccharides II. Advances in Polymer Science, vol 205. Springer, Berlin, Heidelberg

⁹ Base de données Google Patents : keyword « Dextran », priority : 01/2015, consulté en décembre 2020

maladie de Crohn) lorsque certaines bactéries bénéfiques étaient stimulées (bifidobactéries ou lactobacilles, par exemple), bon nombre de travaux récents semblent montrer un lien fort entre des anomalies du microbiote intestinal –aujourd’hui souvent considéré comme un organe à part entière– et des troubles métaboliques¹⁰ ou cardiovasculaires¹¹, mais aussi neuropsychiatriques comme l’autisme, la dépression¹², voire des maladies neurodégénératives¹³. Cependant, les derniers travaux d’écologie microbienne ou de métagénomique montrent combien ce microbiote est complexe et variable selon les individus¹⁴, ce qui stimule en partie la recherche de nouvelles molécules prébiotiques qui pourraient maintenir un environnement intestinal sain ou répondre à certaines pathologies spécifiques. Bien installé depuis plus d’une trentaine d’années en Asie, le marché de ces ingrédients est donc aujourd’hui également en plein essor aux Etats-Unis et en Europe. Ainsi, le marché mondial a été évalué à 4 milliards de dollars en 2018, et est supposé doubler d’ici 5 ans, pour atteindre 8,5 milliards de dollars en 2026¹⁵. On observe également depuis quelques années un intérêt croissant pour le traitement des autres flores commensales, telles que les flores vaginales et cutanées.

D’un point de vue commercial, on classe sous le nom d’isomaltooligosaccharides prébiotiques tous les oligosaccharides de glucose composés majoritairement de liaisons α -1,6 dans la chaîne principale, et de taux variables en liaisons α -1,4; α -1,3 et/ou α -1,2. On les trouve naturellement dans divers produits fermentés tels que le miso, le sake, la sauce soja ou le miel. Industriellement, ils sont généralement produits à partir d’hydrolysats d’amidon, et ne sont alors composés que de liaisons α -1,6 et α -1,4. Or, ces produits peuvent également être synthétisés à l’aide des enzymes de la famille GH-70, et contenir alors également des liaisons α -1,3 ou α -1,2 selon la spécificité de liaison de l’enzyme employée. Ces liaisons (α -1,3 ou α -1,2) sont plus rares dans la nature, et confèrent aux molécules des propriétés prébiotiques particulièrement intéressantes, car encore plus difficilement digestibles que les autres IMOS. Par exemple, les gluco-oligosaccharides riches en liaisons α -1,2 étaient déjà produits à hauteur d’environ 40 tonnes par an dès les années 2000 pour des applications en dermocosmétique (Europe) ou agro-alimentaire (Italie)¹⁶.

Les α -transglucosylases GH70 sont étudiées depuis une quarantaine d’années au sein de l’Equipe de Biocatalyse du Toulouse Biotechnology Institute (anciennement équipe CIMES du laboratoire LBB, renommé ensuite LISBP puis TBI), et dirigée d’abord par le Professeur Pierre Monsan, puis par le Pr Magali Remaud-Simeon. Si les premières recherches relevaient de la biocatalyse conventionnelle et portaient sur la production et la caractérisation d’ α -transglucosylases naturelles, elles se sont rapidement étendues, dès la fin des années 90, à l’étude des relations existant entre la structure de ces enzymes et leurs propriétés catalytiques afin d’identifier les facteurs structuraux responsables de leur aptitude à former des polymères de structure et de taille variable. Grâce à la

¹⁰ Serino M., Luche E., Chabo C., Mara J. Burcelin R. 2009. Intestinal microflora and metabolic diseases. *Diabetes & Metabolism*. 35(4): 262-272. Wolting A., Blaut M. 2016. The intestinal microbiota in metabolic disease. *Nutrients* 8(4): 202

¹¹ Jin M. qian Z., Yin J., Xu W., Zhou X. 2019. The role of intestinal microbiota in cardiovascular disease. *J. Cell Mol Med*. 23:2343-2350.

¹² Chevalier G., Siopsi E., ..., Eberl G., Llebo P.M. 2020. Effect of gut microbiota on depressive-like behaviors in mice is mediated by the endocannabinoid system. *Nature Comm*. 11, 6363

¹³ Cenit MC., Sanz Y., Codoner-Franch P. 2017. Influence of gut microbiota on neuropsychiatric disorders. *World Journal of gastroenterology*. 23(30): 5486-5498.

¹⁴ Clemente J., Ursell L., Parfrey L., Knight R. 2012. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell*. 148: 1258 ; Sanders, M. E. et al. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol*. 16, 605–616 (2019).

¹⁵ Consultation du site Global Market Insights, www.gminsights.com/industry-analysis/prebiotics, décembre 2020

¹⁶ Plou FJ, Martín MT, de Segura AG, Alcalde M & Ballesteros A. 2002; Glucosyltransferases acting on starch or sucrose for the synthesis of oligosaccharides. *Can. J. Chem*. 80, 743–752

démocratisation des outils de génie génétique, et parce que les bactéries lactiques sont généralement productrices de plusieurs α -transglucosylases, la caractérisation fine de ces catalyseurs n'a pu se faire que grâce au clonage des gènes et leur expression recombinante chez *E. coli*. J'ai intégré l'équipe à cette époque, fin 2002, et l'objectif majeur de mes travaux de thèse était de mieux comprendre le mécanisme de polymérisation de la dextrane-saccharase DSR-S de *L. mesenteroides* NRRL B-512F afin de guider la construction, par ingénierie rationnelle, de variants enzymatiques permettant la synthèse directe, en une seule étape, de dextranses de masse molaire contrôlée. Ces travaux ont alors ouvert la voie, en post-doctorat, à l'ingénierie semi-rationnelle des α -transglucosylases afin de générer, en particulier, des mutants capables de glucosyler des molécules non reconnues par les enzymes sauvages et produire des oligosaccharides antigéniques (projet ANR Optigluco piloté par l'Institut Pasteur). Ces travaux ont marqué une avancée décisive dans le domaine de l'ingénierie des enzymes actives sur les sucres car il s'agissait du premier exemple d'ingénierie de néo-transglucosylases arborant une capacité catalytique non décelable dans l'enzyme parentale.

Dès lors, la question des relations existant entre la structure des α -transglucosylases et leur spécificité est devenue centrale. Ayant eu l'opportunité d'obtenir très rapidement un poste d'enseignant-chercheur au sein du laboratoire, cette question a constitué la principale problématique à laquelle je me suis consacrée pour proposer, *in fine*, des voies de synthèse originales pour la production de nouveaux gluco-oligosaccharides, gluco-conjugués ou biopolymères d'intérêt applicatif. La stratégie sur laquelle je me suis appuyée revêt un caractère multidisciplinaire puisqu'elle repose avant tout sur des compétences en enzymologie, mais aussi des approches alliant génomique, bioinformatique, biologie moléculaire, biochimie et biologie structurale.

Mes activités se sont alors articulées essentiellement autour de 3 grands axes :

- i) Rechercher, dans le biotope naturel, de nouvelles α -transglucosylases originales afin d'augmenter notre bibliothèque d'outils catalytiques,
- ii) Investiguer en détail l'étude des relations structure/fonction de certains candidats pour guider, si nécessaire, le développement de techniques d'ingénierie rationnelle ou semi-rationnelle pour créer des outils de glucosylation « à façon »,
- iii) Développer des systèmes d'expression des enzymes GH70 performants, ainsi que des voies de synthèse originales de nouveaux polysaccharides et/ou gluco-conjugués pour l'utilisation de ces enzymes en industrie.

J'ai donc choisi de présenter mes principales réalisations sur la base de ces trois items plutôt que de faire une description chronologique allant de mes travaux de thèse aux derniers résultats. Ayant le souci de bien placer ces travaux dans le contexte général de l'état des connaissances, et préciser les enjeux de recherches ou « verrous à lever », mon texte sera peut-être un peu long. Au fil de la lecture, j'espère cependant vous convaincre de l'intérêt que je porte à **cette thématique, qui s'inscrit pleinement dans les enjeux actuels du développement des biotechnologies et de la biocatalyse au service de la transition écologique**. Ce bilan me permettra ensuite de vous présenter les perspectives générales qui s'offrent à nous aujourd'hui, et qui constitueront mon projet de recherche pour les années à venir. Notamment, un axe que je souhaite promouvoir concerne le développement de voies enzymatiques pour la fonctionnalisation des α -glucanes, que cela soit pour remplacer des voies chimiques existantes ou produire de nouveaux biomatériaux.

1. A la découverte de nouvelles α -transglucosylases dans la diversité naturelle

1.1. Etat des lieux et présentation de la famille GH70

En 1861, Louis Pasteur montra pour la première fois que la gélification des sirops de sucre de canne et de betterave était d'origine microbienne, nommant la substance produite « dextrane ». En 1878, VanTiehem et al. isolèrent le microorganisme, *Leuconostoc mesenteroides*, avant que Hehre et ses collaborateurs ne montrent en 1941 qu'un extrait enzymatique était responsable de la synthèse d'un α -glucane à partir de saccharose¹⁷. L'enzyme responsable de la formation du dextrane fut alors nommée « dextrane-saccharase ».

Selon la nomenclature EC, les α -transglucosylases bactériennes sont répertoriées en tant que transférases, et plus précisément en tant qu'hexosyltransférases (2.4.1.5 et 2.4.1.140). Cependant, cette classification ne tient pas compte du mécanisme d'action des enzymes, ni de leurs similarités de séquences et homologies structurales, contrairement à la base de données des enzymes actives sur les sucres, la CAZy¹⁸. En ce sens, les enzymes GH70 appartiennent à la grande famille des Glycoside-Hydrolases, bien qu'elles s'y distinguent par une très forte activité transglucosylase, l'énergie libérée lors du clivage de la liaison osidique du saccharose (6,6 kcal/mol) étant mise à profit pour transférer l'unité glucosyle sur des molécules acceptrices (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**, p14).

Ce sont des enzymes produites, sous forme extracellulaire, par un petit nombre de bactéries lactiques des genres *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* et *Weissella*¹⁹. **Elles présentent toute une masse molaire élevée allant de 140 à 313 kDa, et une même bactérie lactique produit généralement plusieurs enzymes de la même famille**, notamment les souches de *Leuconostoc* sp.²⁰. D'autres activités glucane-saccharases responsables de la synthèse d'amylose bactérienne à partir de saccharose ont été identifiées dans des souches Gram⁻ (*Neisseria*, *Deinococcus*, *Xanthomonas*, par ex) mais aussi chez des cyanobactéries comme *Synechococcus* sp.²¹. Ces enzymes, appelées amylosaccharases, appartiennent à la famille 13 des Glycoside-Hydrolases, et bien que je les ai moins étudiées au cours de mes travaux, plusieurs références aux enzymes de la famille GH13 pourront être faites au cours de ce rapport du fait de leur forte homologie mécanistique et structurale avec les enzymes de la famille GH70.

Avec les enzymes des familles GH13 et GH77, les enzymes GH70 appartiennent en effet au clan GH-H aussi appelé superfamille des α -amylases. Ces trois familles d'enzymes sont proches d'un point de vue évolutif, partageant le même mécanisme catalytique de rétention de la configuration anomérique, une même topologie de site actif en tonneau (β/α)₈ et la même machinerie catalytique Asp-Glu dont les caractéristiques seront détaillées au chapitre 2. Les enzymes GH70 sont toutes mésophiles (température d'activité optimale allant de 25 et 40°C), travaillent en milieu faiblement acide (pH optimal entre 5,2 et 6) et ne supportent que de faibles concentrations de solvant organique (5 à 20% de DMSO) lorsqu'on souhaite les utiliser pour la synthèse de glucoconjugués.

¹⁷ Pasteur, L., 1961. On the viscous fermentation and the butyrous fermentation. Bull. Soc. Chim. Franc. 30-31; Hehre EJ (1941) Production from sucrose of a sero-logically reactive polysaccharide by a sterile bacterial extract. *Science* 93(2410):237–238.

¹⁸ www.cazy.org; Lombard V, Golaconda Ramulu H, Drula E, Coutinho PM, Henrissat B. 2014. The Carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res* 42:D490–D495

¹⁹ Leemhuis H, ..., Dijkhuizen L. 2013. Glucansucrases: Three-dimensional structures, reactions, mechanism, α -glucan analysis and their implications in biotechnology and food applications. *J Biotechnol* 163:250–272.

²⁰ Jeanes A, Haynes WC, Wilham CA, Rankin JC, Melvin EH, Austin MJ, Cluskey JE, Fisher BE, Tsuchiya HM, Rist CE. 1954. Characterization and Classification of Dextrans from Ninety-six Strains of Bacteria. *J Am Chem Soc* 76:5041–5052.

²¹ Tian Y., Xu W., ..., MuW. 2018. Amylosucrase as a transglucosylation tool : from molecular features to bioengineering applications. *Biotechnol Advances*. 36(5): 1540-1552.

En 2006, année de soutenance de ma thèse, la famille GH70 ne comportait qu'une quarantaine de séquences et enzymes caractérisées. Les souches productrices identifiées sécrétant plusieurs α -transglucosylases, il est difficile d'isoler une seule de ces enzymes, d'une part à cause de leur nombre et de la présence de formes dégradées, mais aussi parce qu'elles restent très souvent associées aux cellules. Les méthodes traditionnelles de purification s'avéraient très délicates. De même, les méthodes de marche sur chromosome (permettant d'isoler un gène grâce à des amorces dégénérées ciblant des séquences consensus) restaient laborieuses, chronophages, et ne permettaient pas d'isoler des gènes présentant de longues séquences divergentes. Au cours des années suivantes, **le développement des techniques de séquençage à haut débit a permis une explosion du nombre de séquences d' α -transglucosylases putatives dans les bases de données**. En effet, les techniques de seconde génération et maintenant de 3^{ième} génération sont particulièrement faciles à adapter au séquençage de ces petits génomes bactériens de moins de 2 Mpb. Et comme les lactobacilles au sens large sont des bactéries ayant de nombreuses applications en biotechnologie, en agro-alimentaire ou en pharmaceutique, plusieurs équipes à travers le monde se sont lancées dans des campagnes de séquençage des génomes de bactéries lactiques²². Comme illustré **Figure 3**, vous pourrez constater que si le nombre de séquences a très fortement augmenté en une dizaine d'années, **le nombre d'enzymes ayant été caractérisées d'un point de vue biochimique reste en revanche très limité** (globalement, augmentation d'un facteur 1,5 en 15 ans seulement, contre un facteur 20 au niveau des séquences putatives). Encore aujourd'hui, la caractérisation biochimique de ces enzymes reste compliquée -même après production recombinante chez *E. coli* et purification par chromatographie d'affinité- du fait de leur très haute masse molaire qui entraîne souvent l'expression de formes dégradées et/ou la formation de corps d'inclusion.

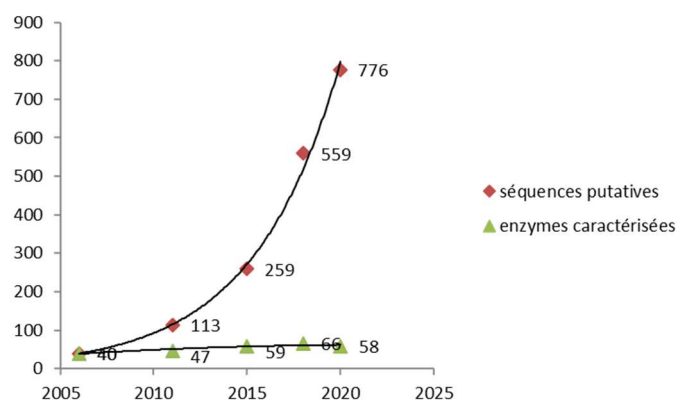


Figure 3. Etat des lieux du nombre de séquences d' α -transglucosylases de la famille GH70 (séquences putatives et enzymes caractérisées) répertoriées dans la base de données CAZy en 2006, fin 2011, fin 2014, Aout 2018 et fin 2020. *Nota bene* : En 2020, 6 références correspondant à des doublons dans les séquences caractérisées ont été retirées de la liste.

Originellement, la famille GH70 ne contenait que des polymérases d'unités glucosyle utilisant le saccharose comme substrat, et issues de bactéries lactiques. Aujourd'hui encore (février 2021), elles représentent 88% des enzymes caractérisées et portent le nom général de **glucane-saccharases**. On y distingue les mutane-saccharases, les dextrane-saccharases, les reuterane-saccharases et les alternane-saccharases en fonction du type de polymère qu'elles produisent ([Erreur ! Source du renvoi introuvable.](#), p14). De plus, leur diversité est toute relative car parmi ces glucane-saccharases, 65% d'entre elles sont des dextransucrases qui catalysent essentiellement la formation des liaisons α -1,6.

²² Sun Z., Harris H.M.B., O'Toole P.W. 2015. Expanding the biotechnology potential of lactobacilli through comparative genomics of 213 strains and associated genera. *Nature Comm.* 6, 8322.

Hormis ces polymérasés, un cas particulier, l'enzyme de branchement GBD-CD2, avait été construite en 2004 dans notre équipe CIMEs par ingénierie rationnelle d'une dextrane-saccharase très originale car dotée de deux domaines catalytiques (CD1 et CD2). Si le domaine CD1 est responsable de la synthèse de dextrane, le second domaine est quant à lui capable d'utiliser le saccharose comme substrat afin de transférer les unités glucosyle sur des chaînes de dextranses par réaction d'accepteur, *via* la formation de liaisons α -1,2²³. Il s'agit de la première enzyme de branchement décrite dans cette famille, auquel nous avons ensuite donné en 2014 le terme de « **branching sucrose** ».

En 2011, une équipe hollandaise a découvert une nouvelle sous-famille d'enzymes GH70, toujours produites par ces mêmes bactéries lactiques mais ne reconnaissant pas le saccharose comme substrat. A partir d'amidon, d'amylose, de maltodextrines voire même de reuterane, et après formation d'un intermédiaire β -D-glucosyl-ou β -glucanyl-enzyme, le résidu glucosyle ou le motif glucan est transféré sur une autre chaîne acceptrice, *via* la formation d'une liaison α -1,6 ou α -1,3²⁴. Ces enzymes portent le nom général d' **α -glucanotransférases**, et 5 enzymes issues de bactéries lactiques (LAB) ont été décrites à ce jour. De plus, deux autres α -glucanotransférases ont récemment été décrites dans des bactéries non-LAB (*Azotobacter*, *Paenibacillus* sp.) et certaines de leurs particularités structurales (comme l'absence de domaine V, ou la non-permutation circulaire du tonneau (β/α)₈) laissent suggérer que ces enzymes constitueraient un intermédiaire évolutif entre les glucane-saccharases de la famille 13 et les glucanotransférases typiques de la famille GH70²⁵.

Cependant, la grande majorité des enzymes caractérisées reste donc encore aujourd'hui des polymérasés utilisant le saccharose, et parmi elles une majorité de dextrane-saccharases ne produisant que des dextranses de très haute masse molaire. Dans l'objectif d'alimenter notre base de données pour une meilleure compréhension des déterminants structuraux impliqués dans la spécificité de taille ou de liaison des produits formés, l'identification et le profilage de nouvelles α -transglucosylases m'est vite apparu indispensable. En effet, cela devait permettre de cibler, dans la biodiversité naturelle, de nouvelles enzymes catalysant soit i) la synthèse directe de dextranses de faible masse molaire pour développer des procédés moins coûteux et plus respectueux de l'environnement, soit ii) des enzymes présentant des spécificités plus originales afin d'augmenter le nombre de représentants spécifiques des liaisons α -1,2/ α -1,3 et/ou α -1,4. L'approche génomique, - par exploration continue des séquences présentes dans les bases de données et/ou le séquençage de souches connues pour produire des glucanes originaux - s'avérait donc particulièrement attractive pour la découverte de nouveaux biocatalyseurs. Dès 2011, je me suis investie dans plusieurs projets de séquençage de génomes de souches de bactéries lactiques d'intérêt pour notre problématique, complétés depuis par un suivi régulier des nouvelles séquences putatives d'enzymes GH70 déposées dans les bases de données. Ces travaux se sont inscrits dans le cadre du projet ANR Oenopolys (2011-2013) et d'une collaboration régionale avec le Laboratoire de Biotechnologies Agroalimentaire et Environnementale (LBAE) de l'Université Paul Sabatier. Ils ont par ailleurs constitué une majeure partie des travaux de thèse de

²³ Fabre E, Bozonnet S, Arcache A, Willemot R-M, Vignon M, Monsan P, Remaud-Simeon M. 2005. Role of the Two Catalytic Domains of DSR-E Dextranase and Their Involvement in the Formation of Highly α -1,2 Branched Dextran. *J Bacteriol* 187:296–303.

²⁴ Kralj S, ..., Kamerling JP, Dijkhuizen L. 2011. 4,6- α -Glucanotransferase, a Novel Enzyme That Structurally and Functionally Provides an Evolutionary Link between Glycoside Hydrolase Enzyme Families 13 and 70. *Appl Environ Microbiol* 77:8154–8163 ; Gangoiti, J., Leeuwen, S.S. ..., Dijkhuizen, L., 2017b. 4,3- α -Glucanotransferase, a novel reaction specificity in GH family 70 and clan GH-H. *Sci. Rep.* 7, 39761; Bai X, Gangoiti J., Dijkstra B., Dijkhuizen L., Pijning T. 2017. Crystal structure of 4,6- α -Glucanotransferase supports diet-driven evolution of GH70 enzymes from α -amylases in oral bacteria. *Structure*. 25:231-242.

²⁵ Gangoiti, J., van Leeuwen, S.S., Vafiadi, C., Dijkhuizen, L., 2016. The Gram-negative bacterium *Azotobacter chroococcum* NCIMB 8003 employs a new glycoside hydrolase family 70 4,6- α -glucanotransferase enzyme (GtfD) to synthesize a reuteran like polymer from maltodextrins and starch. *Biochim. Biophys. Acta* 1860, 1224–1236; Meng, X., Gangoiti, J., Bai, Y., Pijning, T., Van Leeuwen, S.S., Dijkhuizen, L., 2016. Structure-function relationships of family GH70 glucanase and 4,6- α -glucanotransferase enzymes, and their evolutionary relationships with family GH13 enzymes. *Cell. Mol. Life Sci.* CMLS 73, 2681–2706.

Marlène Vuillemin, co-dirigée avec Magali Remaud-Simeon entre 2011 et 2014. Pour illustrer cette approche, je vous présenterai ici les résultats majeurs issus du séquençage de deux souches particulières de *Leuconostoc citreum*, les souches NRRL B-1299 et B-742, ainsi que ceux issus de l'analyse de la séquence génomique d'une souche d'*Oenococcus* sp.

1.2. Séquençage des génomes de *Leuconostoc citreum* NRRL B-1299 & NRRL B-742

Dès 1954, les souches de *L. citreum* NRRL B-1299 et NRRL B-742 ont été identifiées comme productrices de glucanes très originaux²⁶. La souche NRRL B-1299 produit un dextrane hétérogène présentant de 27 à 35% de liaisons α -1,2 dans des points de branchements²⁷. Les α -1,2 glucooligosaccharides commercialisés comme prébiotiques pour des crèmes cosmétiques sont d'ailleurs produits par fermentation de cette souche sur saccharose, ou à partir d'extraits enzymatiques en provenant. A la fin des années 90, trois gènes (*dsrA*, *dsrB* et *dsrE*) codant pour trois GH70 différentes issus de cette souche ont pu être isolés par des méthodes conventionnelles et caractérisés, mais la ou les enzyme(s) naturelle(s) responsable(s) de la synthèse du dextrane à très forte teneur en liaisons α -1,2 restaient infructueuses : DSR-A et DSR-B catalysent la production d'un dextrane composé à 95% de liaisons α -1,6²⁸ alors que DSR-E synthétise un dextrane possédant seulement 5% de liaisons α -1,2²⁹.

La souche *L. citreum* NRRL B-742 produit quant à elle deux types d' α -glucanes, dont un composé à 50% de liaisons α -1,6 et 50% de liaisons α -1,3, **avec une structure très originale car en forme de peigne** (un résidu glucosyle est greffé par une liaison α -1,3 sur chaque glucosyle d'une chaîne linéaire d'unités liées en α -1,6)³⁰. Deux brevets portent sur l'utilisation d'oligosaccharides produits à partir des extraits cellulaires de *L. citreum* NRRL B-742 lors de réactions d'accepteurs sur maltose pour leurs potentialités prébiotiques, notamment pour des compléments alimentaires destinés aux élevages aviaires³¹. Or, là encore, si un gène codant pour une dextrane saccharase (*dsrB742*) avait été isolé en 2000³², il ne code pas pour l'enzyme responsable de la synthèse du dextrane peigne, ce qui a donc motivé le séquençage du génome.

o Analyse des génomes

Ces deux génomes ont été séquencés par technologie Shotgun 454, avec constitution de bibliothèques pair-end de 8 kb et assemblage des reads par Newbler, sur la plateforme GeT-PlaGe de

²⁶ Jeanes A, Haynes WC, Wilham CA, Rankin JC, Melvin EH, Austin MJ, Cluskey JE, Fisher BE, Tsuchiya HM, Rist CE. 1954. Characterization and Classification of Dextrans from Ninety-six Strains of Bacteria. *J Am Chem Soc* 76:5041–5052

²⁷ Kobayashi M & Matsuda K. 1977. Structural characteristics of dextrans synthesized by dextransucrases from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. *Agric. Biol. Chem.* 41, 1931–1937; Brooker BE. Ultrastructural surface changes associated with dextran synthesis by *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Bacteriol.* 131, 288–292

²⁸ Monchois V, Willemot R-M, Remaud-Simeon M, Croux C & Monsan P. 1996. Cloning and sequencing of a gene coding for a novel dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 synthesizing only α (1–6) and α (1–3) linkages. *Gene* 182, 23–32 ; Monchois V (1998) Cloning and sequencing of a gene coding for an extracellular dextransucrase (DSRB) from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 synthesizing only a α (1–6) glucan. *FEMS Microbiol. Lett.* 159, 307–315

²⁹ Bozonnet S, Dols-Laffargue M, Fabre E, Pizzut S, Remaud-Simeon M, Monsan P & Willemot R-M. 2002. Molecular Characterization of DSR-E, an α -1,2 Linkage-Synthesizing Dextransucrase with Two Catalytic Domains. *J. Bacteriol.* 184, 5753–5761.

³⁰ Seymour, F.K., Knapp, R.D., Chen, E.C.M., Bishop, S.H., Jeanes, A., 1979. Structural analysis of *Leuconostoc* dextrans containing 3-O- α -d-glucosylated α -d-glucosyl residues in both linear-chain and branch-point positions, or only in branch-point positions, by methylation and by ¹³C-N.M.R. spectroscopy. *Carbohydr. Res.* 74, 41–62.

³¹ Day DF & Chung C-H Isomaltooligosaccharides from *leuconostoc* as neutraceuticals. US Patent 2008/006457 A1; 20 Day DF & Chung C-H. Isomaltooligosaccharides to inhibit avian pathogenic intestinal bacteria. US patent 7,772, 212 B2.

³² Kim H, Kim D, Ryu HJ & Robyt JF; 2000. Cloning and sequencing of the alpha-1 -> 6 dextransucrase gene from *Leuconostoc mesenteroides* B-742CB. *J. Microbiol. Biotechnol.* 10, 559–563

Toulouse. La profondeur de séquençage fut de 29X pour la souche NRRL B-1299, et de 23X pour la souche NRRL B-742. Le génome de NRRL B-1299 est constitué d'un chromosome de 1 759 809 bp, d'un plasmide de 3396 bp et 1786 cadres ouverts de lecture (ORFs) ont pu être prédits. Le génome de NRRL B-742 contient quant à lui un chromosome de 1 718 100 bp, un plasmide de 27 566 bp et 1734 ORFs ont été identifiés.

Les gènes codant putativement pour des enzymes de la famille GH70 ont été facilement identifiés en réalisant des alignements de séquences contre une base de données de l'ensemble des gènes correspondants aux enzymes de la famille GH70 caractérisées. Les gènes codant pour les α -transglucosylases connues (*dsrA*, *dsrB* et *dsrE* pour la souche NRRL B-1299 ; *dsrB742* pour NRRL B-742) ont été retrouvés, et 4 nouveaux gènes originaux ont été identifiés: i) les gènes *dsrDP*, *dsrM* et *brsA* dans la souche NRRL B-1299, et ii) le gène *brsB* dans la souche NRRL B-742. Une comparaison des séquences de ces deux génomes avec celles des quatre autres génomes de *L. citreum* disponibles à l'époque a révélé une syntonie globale entre ces souches, les zones non conservées représentant moins de 1% du chromosome (Figure 4).

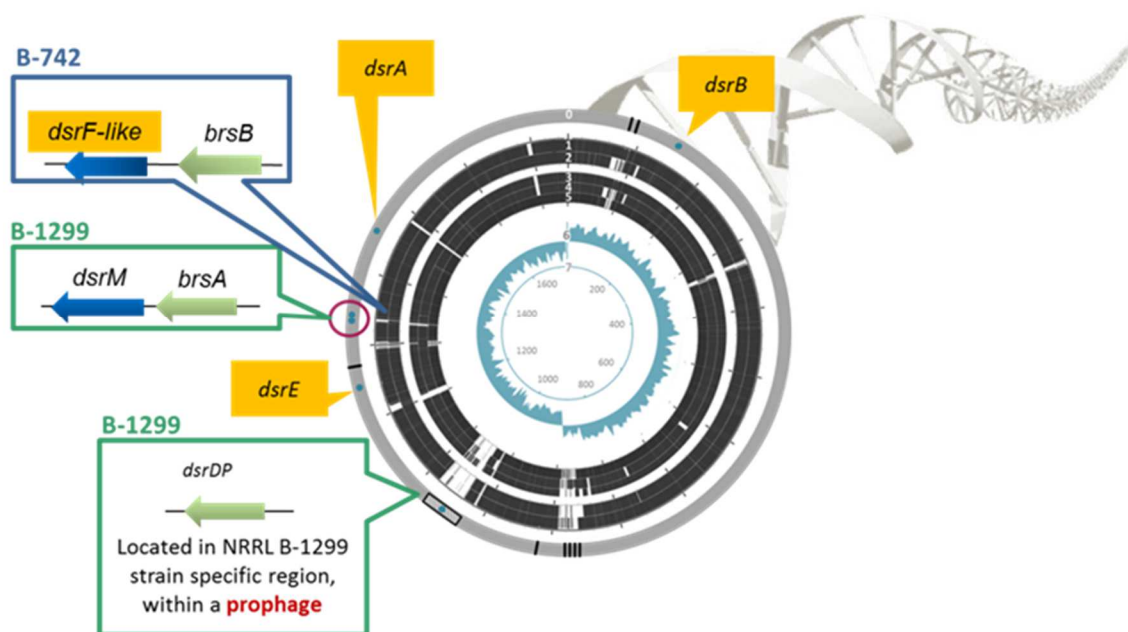


Figure 4. Cartographie des gènes putatifs codant pour des enzymes GH70 dans les chromosomes de *L. citreum* NRRL B-1299 et NRRL B-742, et représentation des éléments génétiques mobiles sur le chromosome de *L. citreum* NRRL B-1299 en comparaison avec les chromosomes des autres souches de *L. citreum* disponibles en 2014. De l'anneau extérieur vers le centre, anneau gris (0): Localisation des gènes GH70 (cercles bleus), les séquences d'insertion (lignes noires) et le prophage rectangle chez *L. citreum* B-1299. Anneaux noirs de (1) à (5): comparaison du chromosome de *L. citreum* NRRL B-1299 avec les chromosomes de (1) KM20, (2) NRRL B-742, (3) E16, (4) C10, (5) C11. L'analyse a été effectuée en utilisant le serveur CGview avec un algorithme Blastn (coupure de 60% d'identité). Les régions conservées sont indiquées en noir. Des régions spécifiques à *L. citreum* NRRL B-1299 sont en blanc. Les régions contenant *dsrM*, *brsA* et *dsrDP* (dans la séquence de prophage) sont indiquées par des boîtes vertes. La région contenant *brsB* chez *L. citreum* B-742 est indiquée par une boîte bleue. L'anneau (6) correspond au GC biais, et l'anneau (7) à l'échelle des tailles d'ADN en Kbp.

Or, les nouveaux gènes d'enzymes GH70 se retrouvent justement dans ces zones non-conservées. En effet, les 6 souches séquencées à cette époque possédaient toutes des gènes très fortement similaires à *dsrA*, *dsrB* et *dsrE* (figure 4). En revanche, *dsrDP* (identifié chez NRRL B-1299) est localisé dans un prophage, montrant pour la première fois un transfert horizontal d'un gène de la famille GH70 médié par un phage. Quant aux gènes *dsrM* et *brsA* de NRRL B-1299, ou *brsB* de NRRL B-742, ils sont également retrouvés dans une zone spécifique, en tandem avec un autre gène de la même famille. A

noter que les produits de ces gènes, à savoir les protéines putatives DSR-DP, DSR-M, BRS-A et BRS-B présentaient tous moins de 60% d'identité avec les autres séquences de GH70 répertoriées dans les bases de données au moment de l'étude.

○ Originalités des séquences identifiées

Comme cela sera détaillé au chapitre 2, le clivage de la liaison osidique du saccharose implique deux résidus catalytiques : un acide aspartique (D) nucléophile et un résidu acide-/base donneur de proton (E). Un dernier acide aspartique (D) permet de stabiliser l'état de transition et s'avère également indispensable à la catalyse. Ces trois résidus sont situés dans le cœur catalytique des protéines, où l'on retrouve des motifs conservés nommés motifs I, II, III et IV. Historiquement identifiés chez les enzymes de la famille GH13, on retrouve également ces motifs conservés dans les séquences de la famille GH70, bien que le tonneau (β/α)₈ soit permuté circulairement au niveau du feuillet 3³³.

Tableau 1. Alignement de séquences des motifs conservés I à IV de certaines enzymes GH70, DSR-DP, DSR-M, BRS-A et BRS-B. En rouge (D, E) les acides aminés catalytiques, en bleu (D) l'acide aspartique stabilisateur de l'état de transition, en vert (R, H, Q) certains des acides aminés impliqués dans l'accommodation du résidu glucosyle issu du saccharose (sous-site -1), en orange ceux qui accommodent le résidu fructosyle ou une molécule acceptrice du glucosyle lors du transfert (sous-site +1).

		Motif II		Motif III		Motif IV		Motif I*	Specificity
GTF-I [Sd]	449	SIRVDAVDNVD	486	HVSIVEAWSN	559	FARAHSEVQDLIRD	931	ADWVPDQ	
GTF-I [Ss]	443	SIRVDAVDNVD	480	HVSIVEAWSN	553	FARAHSEVQDIIRD	925	ADWVPDQ	α -(1-3)
GTF-B [Sm]	1011	SIRVDAVDNVD	1048	HLSILEAWSN	1120	FIRAHSEVQDLIAD	1488	ADWVPDQ	
GTF-A [Lr]	1020	SVRVADPNID	1056	HINILEDWNHA	1128	FVRAHDNNSQDQIQN	1508	ADWVPDQ	α -(1-4) /
GTF-O [Lr]	1020	SVRVADPNID	1056	HINILEDWNSS	1128	FIRAHDNNSQDQIQN	1508	ADWVPDQ	α -(1-6)
ASR [Lm]	631	GIRVDAVDNVD	668	HLSILEDWNGK	762	FVRAHDYDAQDPIRK	1168	ADWVPDQ	α -(1-6) / α -(1-3)
GTF-W [Lr]	748	GFRVDAADNID	785	HLVYNEGYHSG	568	FVTNHDQR-KNVINQ	1216	EDLVMNQ	
GTF-ML4 [Lr]	1012	GFRVDAADNID	1049	HLSYNEGYHSG	1121	FVTNHDQR-KNLINR	1479	EDIVMNQ	
DSR-C [Lm]	498	GIRVDAVDNVD	535	HLSILEDWSHN	608	FVRAHSEVQTVIAQ	973	ADWVPDQ	
DSR-S [Lm]	547	GIRVDAVDNVD	584	HLSILEDWSHN	657	FVRAHSEVQTVIAQ	1023	ADWVPDQ	
GTF-180 [Lr]	1021	GIRVDAVDNVD	1058	HINILEDWGWD	1131	FVRAHDSNAQDQIRQ	1503	ADWVPDQ	α -(4-6)
DSR-A [Lc]	361	GYRVDAVDNVD	399	HLSILEDWNGE	472	FIRAHSEVQTIIAD	844	NDWVPDQ	
DSR-B [Lc]	401	GIRVDAVDNVD	449	HLSILEDWSHN	512	FVRAHSEVQTVIAQ	877	ADWVPDQ	
DSR-E (CD1)	520	GYRVDAVDNVD	557	HISILEDWNN	630	FIRAHSEVQTVIAQ	1010	NDWVPDQ	
DSR-E (CD2)	2206	SIRIDAVDFIH	2243	HISLVEAGLDA	2317	IIHAHDKGVQEKVGA	2688	ADVVDNQ	α -(1-2)
DSR-DP	455	GIRVDAVDNVD	492	KISILEDWAWG	565	FIRAHDAESQDIFSN	940	ADYVPDQ	
BRS-A	668	SIRIDAVDFVS	705	HLSLVEAGLDA	779	IIHAHDKDIQDKVGA	1151	ADVVANQ	
DSR-M	673	SIRIDAVDNVD	710	HIHILEDWSPN	785	FIRAHSEVQTIIAK	1177	ADFVPDQ	
BRS-B	667	SMRIDAISFVD	704	HISIVEAPKGE	783	IVHAHDKDIQDTVIIH	1182	ADFVANQ	
		NU		A/B		TSS			

Outre les acides aminés catalytiques, ces motifs conservés englobent également les acides aminés impliqués dans l'accommodation du saccharose (sous-sites -1 et +1), ainsi que les molécules acceptrices qui seront glucosylées (sous-sites accepteurs +1, +2). Notamment, la séquence en acides aminés présente dans le motif IV en aval de l'acide aspartique stabilisateur de l'état de transition a été

³³ MacGregor EA, Jespersen HM, Svensson B. 1996. A circularly permuted α -amylase-type α/β -barrel structure in glucan-synthesizing glucosyltransferases. *FEBS Lett* 378:263-266.; Vujičić-Žagar A, Pijning T, Kralj S, López CA, Eeuwema W, Dijkhuizen L, Dijkstra BW. 2010. Crystal structure of a 117 kDa glucanucrase fragment provides insight into evolution and product specificity of GH70 enzymes. *Proc Natl Acad Sci* 107:21406-21411.

décrite dès les années 2000 comme impliquée dans la spécificité de liaison de l'enzyme considérée, et désignée à ce titre comme une des « séquences signatures » de la spécificité de liaison de ces enzymes³⁴. Ayant pu noter une **étonnante diversité au niveau de ces motifs conservés dans les séquences de DSR-M, DSR-DP, BRS-A et BRS-B** alors que l'ensemble des résidus catalytiques connus pour être indispensables à l'activité étaient présents (**Tableau 1**), cela a motivé le clonage de ces gènes pour une expression hétérologue des enzymes chez *E. coli*, et leur caractérisation.

- **Caractérisation biochimique des nouvelles enzymes identifiées**

Pour la production recombinante de ces enzymes chez *E. coli*, nous avons alors choisi d'utiliser des systèmes d'expression commerciaux qui permettent une double fusion des protéines à des étiquettes StrepTag II et 6xHis aux extrémités N et C-terminales, afin de permettre i) une double purification par affinité et n'isoler que la forme entière si besoin, et ii) la caractérisation fine des propriétés biochimiques de chacune d'entre elles (vecteurs Gateway pET-53 ou pET-55/ *E. coli* BL21 Star DE3). DSR-DP, DSR-M, BRS-A et BRS-B sont en effet de très grosses protéines, de masse molaire comprise entre 120 et 230 kDa. Comme nous le verrons au chapitre 3, les conditions d'expression ont été optimisées afin d'atteindre des niveaux tout à fait satisfaisants pour l'utilisation de ces enzymes à l'échelle industrielle (> 10 000 U/L_{culture}). Nos travaux ont montré que DSR-DP et DSR-M étaient deux dextrane-saccharases, alors que **BRS-A et BRS-B se sont avérées être les premières enzymes de branchement naturelles décrites pour des enzymes de la famille GH70.**

DSR-M & DSR-DP dédiées à la synthèse de dextranses de faible masse molaire

L'analyse de réactions réalisées à partir de 100 g.L⁻¹ de saccharose (et après consommation totale de ce dernier), a montré que DSR-M et DSR-DP sont toutes les deux d'**excellentes polymérases** incorporant plus de 80% des résidus glucosyle issus du saccharose dans le polymère. De plus, et pour la première fois, **le polymère formé n'est que de faible masse molaire** (ou en très grande majorité dans le cas de DSR-DP), *a contrario* de tous les autres polymères synthétisés par les enzymes de la famille GH70 caractérisées. Pour DSR-DP, la fraction est très polydisperse et composée à plus de 90% de liaisons α -1,6 alors que DSR-M produit un dextrane très monodisperse d'environ 27 kg.mol⁻¹ extrêmement linéaire (**Figure 5**).

Les acides aminés situés dans le motif IV de DSR-DP ne pouvaient laisser présager une spécificité de liaison majoritairement en α -1,6 (**Tableau 1**) et font donc de cette enzyme un outil intéressant pour l'étude des déterminants impliqués dans la spécificité de liaison. Cependant, la grande polydispersité des dextranses produits, comparés à ceux de DSR-M, rendait cette enzyme moins intéressante à étudier d'un point de vue applicatif. Par ailleurs, nous avons pu remarquer que DSR-DP était particulièrement active en milieu organique (40% de DMSO), contrairement à bon nombre d'enzymes de cette famille, ce qui aurait pu en faire un outil de choix pour réaliser la glycosylation spécifique de molécules très hydrophobes, comme certains flavonoïdes par exemple. Cependant, il semblerait que son site actif soit relativement contraint, au regard des autres enzymes de la même famille, car aucune des molécules ciblées à ce jour n'a pu être reconnue de manière significative (co-encadrement des travaux de thèse de Manon Molina, 2016-2019) et la caractérisation de ce catalyseur n'a pas été poursuivie.

³⁴ Kralj S, Geel-Schutten GH van, ..., Dijkhuizen L. 2004; Glucan synthesis in the genus *Lactobacillus*: isolation and characterization of glucansucrase genes, enzymes and glucan products from six different strains. *Microbiology* 150:3681–3690 ; Moulis C, Joucla G, ..., Remaud-Simeon M. 2006. Understanding the Polymerization Mechanism of Glycoside-Hydrolase Family 70 Glucansucrases. *J Biol Chem* 281:31254–31267.; Leemhuis H, Pijning T, ..., Dijkhuizen L. 2013. Glucansucrases: Three-dimensional structures, reactions, mechanism, α -glucan analysis and their implications in biotechnology and food applications. *J Biotechnol* 163:250–272.

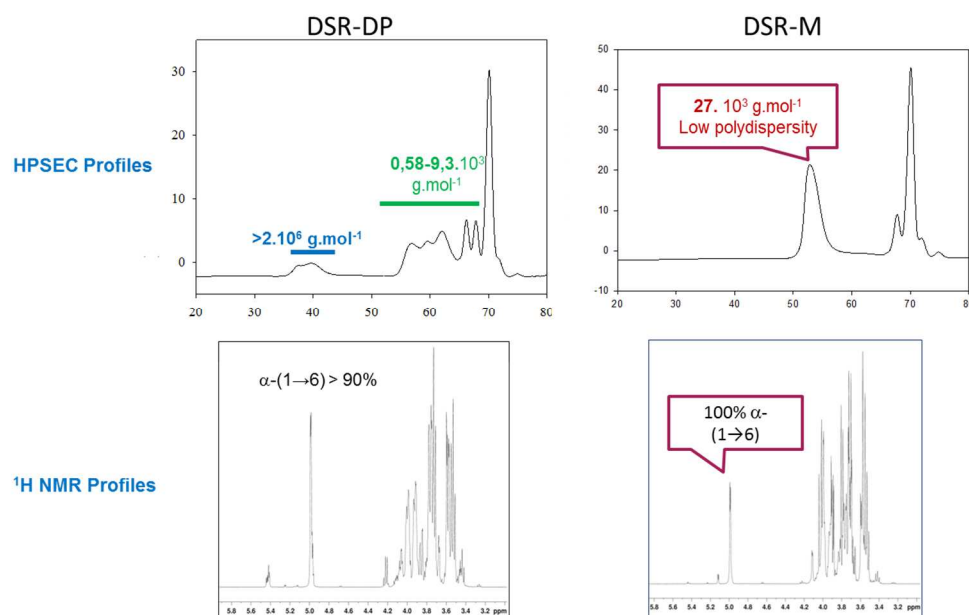


Figure 5. Analyses chromatographiques et par RMN du proton des glucanes formés par DSR-DP (colonne de gauche) et DSR-M (colonne de droite) à partir de 100 g/L de saccharose.

Nos efforts ont donc été essentiellement orientés vers la caractérisation de DSR-M. Comme nous le verrons au chapitre 2, cette enzyme fut particulièrement intéressante à étudier pour investiguer en détail son mécanisme de polymérisation, et comprendre pourquoi elle ne catalysait que la synthèse d'un dextrane de faible masse molaire (co-encadrement des travaux de thèse de Marion Claverie, 2013-2017). D'un point de vue applicatif, nous avons montré que l'enzyme est active sur une large gamme de température et de pH (>80% de l'activité maximale entre 28 et 45°C et pour des pH allant de 4.2 à 6), mais aussi et surtout qu'elle est fortement activée par ses propres produits au cours de la réaction (lors de synthèses à 1 U/ml d'enzyme en présence de 100 g/L de substrat, la réaction est totale au bout de 1h30 contre 5h selon un calcul théorique fondé sur les mesures de vitesse initiale). **De plus, il est facile de jouer sur la taille des polymères formés en modifiant simplement les conditions réactionnelles, tout en gardant des rendements de production en polymère toujours supérieurs à 80%.** Ainsi, une simple modification de la température de synthèse entre 25 et 45°C, ou de la concentration initiale en saccharose entre 100 et 500 g/L permet de faire varier linéairement la masse molaire des produits (Figure 6). Nous pouvons ainsi proposer des systèmes de production très simples -puisqu'en une seule étape- de certains des dextrans de masse molaire contrôlée utilisés en industrie, et ce avec des rendements très satisfaisants. S'il était connu que la température ou la concentration initiale en substrat pouvaient influencer la taille des dextrans produits (mais qui restaient toujours de très haute masse molaire avec les polymérases caractérisées jusque-là)³⁵, le fait que cette masse molaire puisse être si finement contrôlée fut une surprise. Dans le cadre du projet ANR Aspire (co-encadrement de Florent Grimaud), nous avons mis au point les conditions d'analyse par chromatographie d'exclusion couplée à la diffusion de lumière (HPSEC-MALLS) permettant de déterminer finement la masse molaire moyenne et la polydispersité de ces petits dextrans. Selon les

³⁵ Braswell E. & Stern, K.G. 1959. Studies on the enzymatic synthesis of dextran. *J. Polymer Sci.* 41: 467-473; Moulis C, Vaca Medina G, ..., Potocki-Veronese G. 2008. One-step synthesis of isomalto-oligosaccharide syrups and dextrans of controlled size using engineered dextranase. *Biocatal. Biotransformation*, 26(1): 141-151.

conditions mises en œuvre, ces dernières varient donc entre 5,5 et 12,7 g/mol, pour des polydispersités toujours inférieures à celles des dextranses vendus sur le marché (< à 1,1).

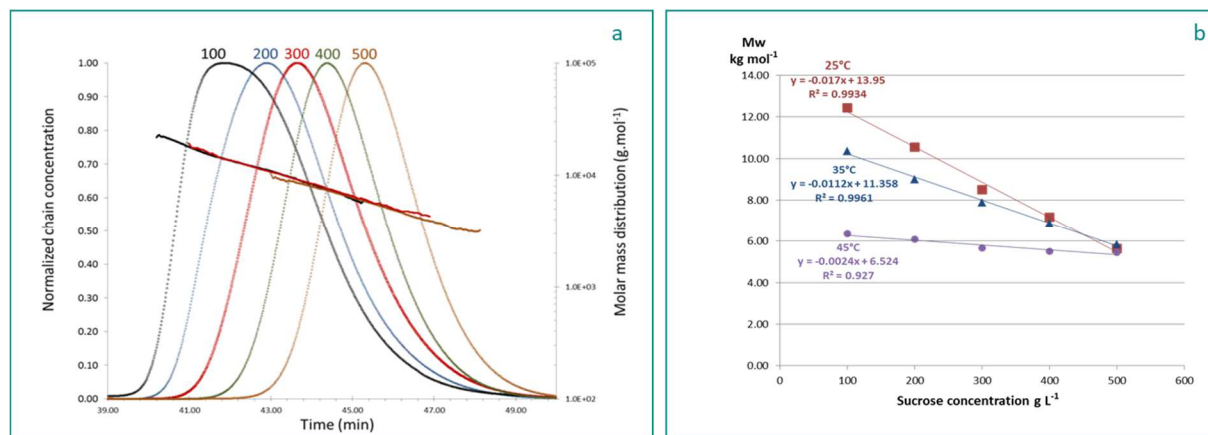


Figure 6. a - Profils déterminés par HPSEC-MALLS de la masse molaire moyenne des dextranses produits par DSR-M pour des concentrations en saccharose variant de 100 à 500 g/L lors de synthèses à 35°C ; b - Evolution linéaire de la masse molaire moyenne des dextranses pour différentes concentrations en saccharose et différentes températures de synthèse.

Ainsi, travailler à 25°C et 500 g/L de saccharose permet la production directe du dextrane de 5 kg/mol. De même, travailler à 35°C et 100 g/l de substrat permet la synthèse directe du dextrane de 10 kg/mol. Ces deux produits font partie des petits dextranses ayant un grand nombre d'applications, essentiellement dans le secteur biomédical (adjuvant pour les vaccins ; cryoprotectant pour protéines, cellules souches, échantillons biologiques; excipient pour la lyophilisation de molécules pharmaceutiques), ce qui a conduit au dépôt d'un brevet (n° WO2016016544). Aujourd'hui, ils sont vendus aux alentours de 2000 à 2500 € les 500 g par la société Pharmacosmos³⁶, leader européen du marché des dextranses.

BRS-A & BRS-B, deux enzymes de branchements en α -1,2 et α -1,3

Pour BRS-A et BRS-B, aucune formation de polymère n'a pu être observée lorsqu'elles ont été mises en présence de saccharose seul. Les unités glucosyle issues du saccharose sont transférées essentiellement sur des molécules de fructose (formation de leucrose, 55% des unités transférées), sur des molécules d'eau (réaction d'hydrolyse, 30% des unités), ou sur des petits oligosaccharides de structures inconnues identifiés lors d'analyses chromatographiques par HPAEC-PAD (DP> 5, 15% des unités glucosyle transférées). Nous avons décidé de tester la capacité de ces enzymes à reconnaître un accepteur exogène présent initialement en plus du saccharose, et notre choix s'est naturellement porté sur le dextrane, puisqu'il pouvait être produit *in vivo* par d'autres enzymes telles que DSR-A, DSR-B ou DSR-M.

Nous avons alors pu constater que BRS-A catalyse la glucosylation du dextrane par transfert des unités glucosyle issues du saccharose *via* la formation de liaison α -1,2 (Figure 7), comme cela avait déjà été

³⁶ www.dextran.net, devis de ce fournisseur en Août 2018.

montré pour l'enzyme de branchement construite par ingénierie rationnelle, GBD-CD2³⁷. Comme pour GBD-CD2, le taux de branchement peut être contrôlé entre 1 et 37% de liaisons α -1,2 en jouant sur les concentrations initiales en saccharose et dextrane accepteur, quelle que soit la masse molaire de ce dernier (10^4 g/mol ; 5.10^5 g/mol ou $> 2.10^6$ g/mol). Nous avons donc ainsi mis en évidence que la synthèse du dextrane branché contenant 27 à 35% de liaisons α -1,2, dans la souche bactérienne, **est le résultat d'une coopération (ou cascade enzymatique) entre une dextrane-saccharase (DSR-A, DSR-B, DSR-DP ou DSR-M) et BRS-A.**

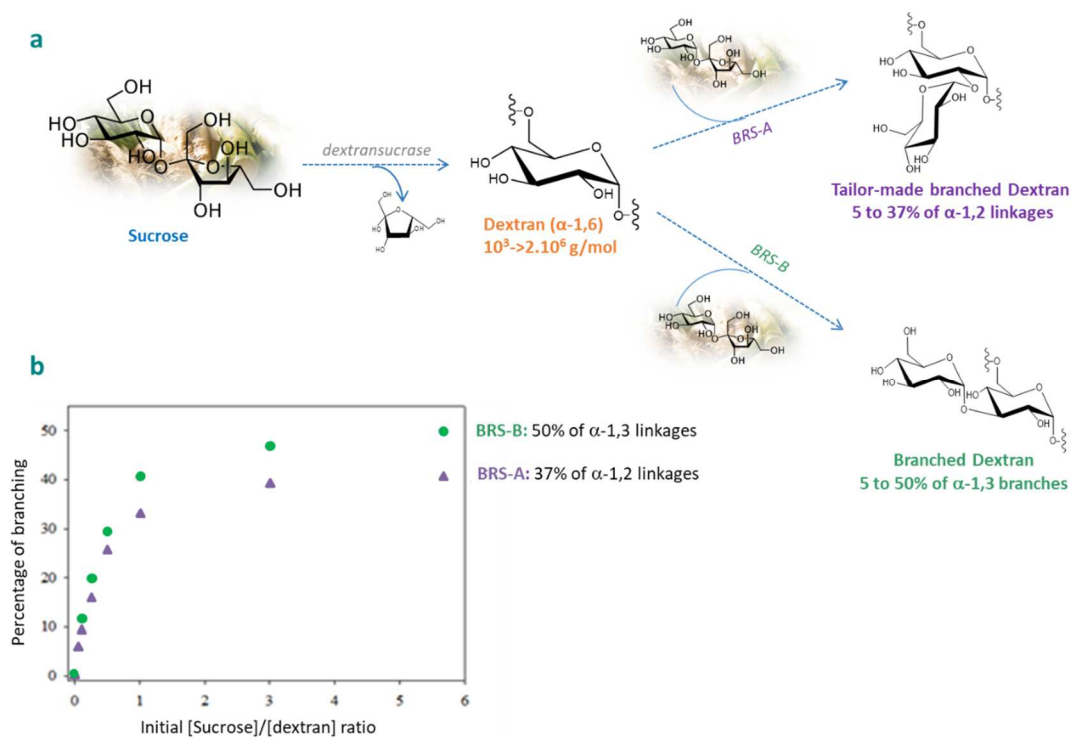


Figure 7. a- Représentation schématique de la synthèse des dextrans branchés en présence de saccharose et d'un dextrane accepteur exogène (cascades enzymatiques proposées pour la synthèse naturelle *in vivo* de dextrans hautement ramifiés lors des fermentations des souches *L. citreum* 1299 et 742 sur saccharose, et reproduites *in vitro*)
b- contrôle du taux de branchement lors de réactions d'accepteur *in vitro* en fonction du ratio Saccharose/Dextrane (accepteur de masse molaire $> 2.10^6$ g/mol)

De manière similaire, BRS-B catalyse, quant à elle, la glycosylation du dextrane exogène *via* la formation de liaisons α -1,3. Les analyses RMN (proton et carbone) ont confirmé qu'un seul résidu glucosyle est rajouté à chaque fois sur un des glucosyle de la chaîne linéaire de dextrane. Pour atteindre 50% de branchements en α -1,3, nous avons montré qu'il fallait jouer à la fois sur le ratio de concentrations en saccharose et dextrane (Figure 7), mais aussi sur la masse molaire du dextrane accepteur choisi. **Nous avons donc pu synthétiser, *in vitro*, le dextrane peigne qui nous intéressait particulièrement.** Une fois encore, la synthèse de ce dextrane branché nécessite donc, *in vivo*, la coopération d'une polymérase et de l'enzyme de branchement BRS-B.

D'un point de vue applicatif, le taux de branchement en liaisons α -1,2 ou α -1,3 peut être finement contrôlé *in vitro* en fonction des conditions réactionnelles, et ces enzymes ont une efficacité

³⁷ Fabre E, ... Remaud-Simeon M.2005. Role of the Two Catalytic Domains of DSR-E Dextranase and Their Involvement in the Formation of Highly α -1,2 Branched Dextran. *J. Bacteriol.* 187, 296–303; Brison Y, Fabre E, ..., Remaud-Siméon M. 2009. Synthesis of dextrans with controlled amounts of α -1,2 linkages using the transglucosidase GBD-CD2. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, 545–554.

catalytique surprenante, **passant d'environ 80 s⁻¹ sur saccharose seul à plus de 940 s⁻¹ en présence de dextrane accepteur**. Si la séquence de BRS-A était couverte par un brevet plus ancien et déposé par l'équipe pour la production des α -1,2-dextranes par l'enzyme GBD-CD2, nous avons breveté l'utilisation de sa « cousine BRS-B » pour la production des dextranes branchés en α -1,3 (brevet WO2014202208).

Globalement, ces travaux ont fait l'objet des publications suivantes:

- Passerini, D., Vuillemin, M., Laguerre, S., Amari, M., Loux, V., Gabriel, V., Robert, H., Morel, S., Monsan, P., Gabriel, B., Fontagné-Faucher, C., Remaud-Siméon, M., Moulis, C., 2014. Complete Genome Sequence of *Leuconostoc citreum* Strain NRRL B-742. *Genome Announc.* 2(6). pii: e01179-14.
- Passerini D., Vuillemin, M., Ufarté L., Morel S., Fontagné-Faucher C., Monsa P., Remaud-Simeon M., Moulis C. 2015. Inventory of the GH70 enzymes encoded by *Leuconostoc citreum* NRRL B-1299 – identification of three novel α -transglucosylases. *FEBS Journal* 282(11):2115-30.
- **Moulis, C., André, I., Remaud-Simeon, M., 2016.** GH13 amylosucrases and GH70 branching sucrases, atypical enzymes in their respective families. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 2661–2679
- Vuillemin, M., Claverie, M., Brison, Y., Séverac, E., Bondy, P., Morel, S., Monsan, P., Moulis, C. & Remaud-Siméon, M., 2016. Characterization of the First α -(1→3) Branching Sucrases of the GH70 Family. *J. Biol. Chem.* 291:7687–7702.
- Claverie M., Cioci G., Vuillemin M., Monties N., Roblin P., Lippens G., Remaud-Simeon M. & Moulis C. 2017. Investigations on the determinants responsible for low molar mass dextran formation by DSR-M dextran sucrose. *ACS Catal.* 7, 7106–7119.

A partir de là, une analyse régulière des séquences putatives divulguées dans les bases de données publiques nous a permis d'augmenter significativement le nombre de nouvelles polymérases ou d'enzymes de branchement d'intérêt pour notre collection. Malheureusement, notre recherche reste encore aujourd'hui très empirique. En effet, nous avons remarqué qu'il était impossible de définir des séquences conservées de taille ≥ 4 acides aminés parmi l'ensemble des enzymes GH70 caractérisées à ce jour, ce qui aurait permis de développer des sondes permettant de screener à très haut débit les séquences présentes dans les bases de données (travaux réalisés en marge du projet européen Metafluidics, dont l'objectif était de développer des sondes nucléiques pour aller « pêcher » de nouvelles séquences enzymatiques à ultra-haut débit dans des collections métagénomiques). Nous continuons donc de nous focaliser sur l'originalité des séquences présentes dans les motifs I à IV, après vérification de la présence des sous-sites -1 et +1 décrits (**Tableau 1**, p23). Notre analyse des séquences de BRS-A et BRS-B a mis en lumière plusieurs résidus se distinguant clairement des résidus très conservés chez les glucane-saccharases ou les α -glucanotransférases, notamment au niveau du sous-site accepteur +1 :

- i) Présence d'une phénylalanine à la place d'une asparagine dans le motif II (F675, numérotation BRS-B- cf Tableau 1),
- ii) Un acide aminé non aromatique à la place d'un tryptophane ou d'une tyrosine dans le motif III des polymérases (P711 chez BRS-B)
- iii) Dans le motif IV, une isoleucine à la place d'une phénylalanine (I783, BRS-B), une histidine à la place d'une arginine ou d'une thréonine (H785, BRS-B), des séquences originales en aval de l'aspartique stabilisateur de l'état de transition (KDI chez BRS-A et BRS-B, KGV chez GBD-CD2) et une valine chez les branching sucrases (V795, BRS-B) contre une isoleucine conservée chez les polymérases ou glucanotransférases.

Sur ces critères, trois autres enzymes de branchement en α -1,3 (BRS-C issue du génome de *Leuconostoc fallax* KCTC3537, BRS-E de *L. mesenteroides* KFRI-MG et BRS-G de *Lactobacillus kunkei* DSM 12361), ainsi que deux enzymes de branchement en α -1,2 (BRS-D de *L. kunkei* EFB16 et BRS-F de *Fructobacillus tropaeoli*), possédant les caractéristiques énumérées ci-dessus et partageant moins de 60% d'identité globale avec BRS-A et BRS-B ont été caractérisées. Ainsi, des analyses phylogénétiques réalisées sur l'ensemble des enzymes caractérisées ont montré que trois grands groupes monophylétiques se distinguent bien, à savoir celui des glucane-saccharases, des α -glucanotransférases et celui des enzymes de branchement (**Figure 8**), **permettant de proposer l'existence d'une troisième sous-famille dans la classification GH70.**

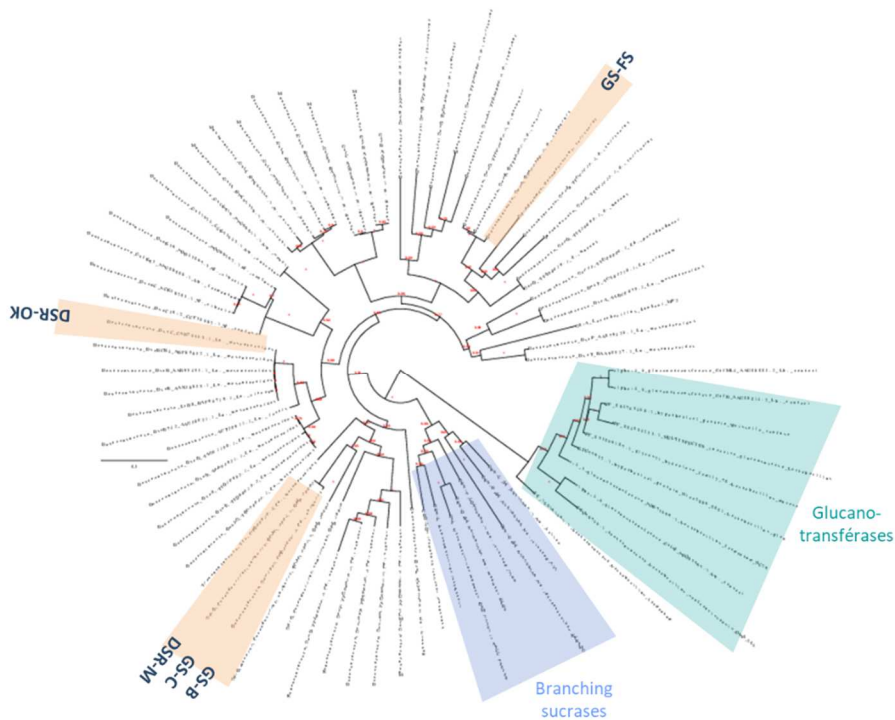


Figure 8. Arbre phylogénétique représentatif des enzymes GH70 caractérisées fin 2018, avec mise en évidence des enzymes originales identifiées dans l'équipe entre 2011 et 2018. Les glucane-saccharases constituent le groupe en blanc, les branching sucrases le groupe en violet, et les α -glucanotransférases en vert.

Ces analyses de séquences ont également permis de rechercher et caractériser 6 nouvelles α -4,6 glucanotransférases dans le cadre d'un projet industriel, ainsi que d'autres glucane-saccharases d'intérêt dont nous n'aurions pu prédire la spécificité de liaison ou de « polymérisation *versus* branching » à partir des seuls motifs signature (voir **Tableau 1**, p23). Notamment deux autres dextrane-saccharases dédiées à la synthèse de dextrane de faible masse molaire, à l'instar de DSR-M, ont été découvertes. Il s'agit des enzymes GS-B et GS-D issues de *Lactobacillus animalis* DSM 20602 produisant des polymères d'environ 50 kg/mol et contenant 100% de liaisons α -1,6. De plus, nous avons également caractérisé les premières oligo-mutansucrase, oligo-reuteransucrase et oligo-alternansucrase décrites dans la famille GH70 (GS-FS de *Streptococcus salivarius* HSISS4, GS-A de *Lactobacillus kunkei* MP2 et GS-E de *Lactobacillus capilatus* DSM 19910 respectivement, voir **Figure 8**). Comme nous le verrons rapidement au chapitre 3, ces trois dernières enzymes sont très performantes pour la synthèse directe d'oligosaccharides à partir de saccharose (notamment pour la synthèse de molécules prébiotiques), tout comme pour **le développement de procédés de production d'alkyle glucosides à longue chaîne saccharidique**. En effet, si les enzymes de branchement sont incapables de reconnaître efficacement les alkyle mono-glucosides comme substrat, des mutants tronqués de DSR-

M, tout comme ces nouvelles enzymes identifiées (GS-A ; GS-B ; GS-D ; GS-E et GS-FS) permettent toutes **des transferts d'au moins 10 et jusqu'à 50 unités glucosyle sur la molécule grasse**, selon l'enzyme et les conditions réactionnelles choisies. **Nous espérons que la découverte de ces enzymes permettra le développement de voies vertes et particulièrement efficaces pour la synthèse de nouveaux surfactants, ce qui nous a conduit à déposer une nouvelle demande de brevet très récemment, en juillet 2020** (demande de brevet français FR2007021). La caractérisation biochimique de ces enzymes se poursuit, et ces travaux sont en cours de publication.

1.3.A la recherche d' α -transglucosylases dans un nouveau genre bactérien, *Oenococcus* sp.

En parallèle du séquençage des souches *L. citreum* NRRL B-1299 et B-742, nous avons été impliqués, à la même époque, dans le projet ANR Oenopolys (2011-2014) coordonné par le Pr Marguerite Dols de l'Institut des Sciences de la Vigne et du Vin (ISVV) de Bordeaux. L'objectif principal était d'identifier les voies de biosynthèse des exopolysaccharides produits par l'espèce *Oenococcus oeni*, une bactérie lactique dont la niche écologique est spécifique aux grappes de raisin, et qui est impliquée dans la fermentation malolactique des vins. Ce microorganisme est également connu pour améliorer les propriétés organoleptiques des vins, via la production de métabolites secondaires comme des polysaccharides par exemple. Nous disposions, au début du projet, des séquences génomiques provenant de 23 souches d'*O. oeni*.

Presque toutes ces souches se sont avérées capables de produire un dextrane de manière extracellulaire lorsqu'elles étaient cultivées en présence de saccharose, et l'analyse bioinformatique de leurs génomes a confirmé la présence de deux gènes codant pour des dextrane-saccharases putatives : le gène *dsr0* dans l'ensemble des souches, ainsi que le gène *dsrV* (partageant 55% d'identité avec *dsr0*) pour 4 d'entre elles. Cependant, nous nous sommes heurtés à de grandes difficultés de caractérisation de ces enzymes, que cela soit sous forme native ou après expression recombinante chez *E. coli*. Malgré une expression suffisante dans les deux cas, qui aurait dû permettre de révéler leur activité, aucune activité glucane-saccharase ou α -glucanotransférase n'a pu être détectée. Devant cette impasse difficilement explicable, nous avons décidé d'élargir notre recherche à d'autres GH70 putatives dans le genre *Oenococcus*. Nous nous sommes alors intéressés au génome d'*O. kitaharae* DSM 17330, qui avait également été séquencé à l'ISVV. Il s'agit d'une bactérie isolée en 2006 dans des sous-produits de distillerie du sochu, une boisson fermentée japonaise. L'exploration du génome a permis d'identifier un seul gène putatif de la famille GH70, et les séquences signatures présentes en aval des acides aminés catalytiques laissaient supposer une activité dextrane-saccharase. Ce gène a été exprimé chez *E. coli* et l'enzyme résultante DSR-OK a été caractérisée.

Avec un k_{cat} de 691 s^{-1} et un temps de demie-vie de 111h à 30°C , il s'agit d'une des **dextrane-saccharase les plus efficaces et les plus stables décrites à ce jour**. Une collaboration avec le Dr Agnès Rolland-Sabaté de l'unité Biopolymères Interactions Assemblages de l'INRAE de Nantes, notamment dans le cadre du projet ANR Aspire (2015-2018), a montré que ce polymère est incroyablement gros en taille, avec une masse molaire moyenne estimée par AF4-MALLS à plus de 10^9 g/mol (**Tableau 2**). L'AF4 (Asymmetric Flow Field Flow Fractionation) fut en effet une technique alternative à la chromatographie par exclusion de taille indispensable, car aucune colonne d'HPSEC sur le marché n'était adaptée à la séparation de ce polymère. Les valeurs de coefficient hydrodynamique et de densité apparente confirment par ailleurs le faible degré de ramification, tout comme un comportement en solution de type bobine aléatoire dans un solvant.

Tableau 2. Caractéristiques de deux échantillons de dextrans produits par l'enzyme DSR-OK et déterminés par AF4-MALLS et RMN du proton. \bar{M}_w : masse molaire moyenne, \bar{R}_G : rayon de gyration moyen, d_{Gapp} : densité de particule apparente, ν_G : rayon hydrodynamique moyen

Samples	NMR Analyses		AF4-MALLS Analyses			
	% α -(1 \rightarrow 3)	% α -(1 \rightarrow 6)	\bar{M}_w (g.mol ⁻¹)	\bar{R}_G (nm)	d_{Gapp} (g.m ⁻³)	ν_G
D1	1.8	98.2	1.09x10 ⁹	380.0	1.08 x 10 ⁴	0.46
D2	1.7	98.3	1.77x10 ⁹	522.2	1.13 x 10 ⁴	0.42

Or, de par cette masse molaire gigantesque, le dextrane de DSR-OK présente des **propriétés texturantes jamais décrites pour un α -glucane bactérien**, telles qu'une viscosité en écoulement ou des propriétés gélifiantes incroyablement plus élevées que les dextrans commerciaux (facteur 10000 pour des faibles taux de cisaillement, [Figure 1Figure 9a](#)). De plus, on peut également observer un effet de seuil de 10 Pa⁻¹ ([Figure 9b](#)), comparable à celui d'une gomme guar ou d'un xanthane, par exemple. Dire qu'un polymère présente un effet de seuil signifie qu'il faut appliquer une certaine force (ou contrainte) pour que ce polymère s'écoule (exemple du dentifrice : si vous n'appliquez pas de force, le dentifrice ne sort pas de lui-même du tube). La présence d'un effet de seuil n'avait encore jamais été décrite pour un α -glucane. Toutes ces propriétés ouvrent la voie à de possibles nouvelles applications (dont certaines seront détaillées au chapitre 3) et ont fait l'objet d'un dépôt de brevet au moment de sa découverte (n° WO2015193492).

Ces travaux ont notamment conduit aux publications suivantes :

- Dimopoulou, M., [Vuillemin, M.](#), Campbell-Sills, H., Lucas, P.M., Ballestra, P., Miot-Sertier, C., Favier, M., Coulon, J., Moine, V., Doco, T., Roques, M., Williams, P., Petrel, M., Gontier, E., **Moulis, C.**, Remaud-Simeon, M., Dols-Lafargue, M., **2014**. Exopolysaccharide (EPS) synthesis by *Oenococcus oeni*: from genes to phenotypes. *PLoS One* 9, e98898.
- [Vuillemin M.](#), [Grimaud F.](#), [Claverie M.](#), Rolland-Sabaté A., Garnier C., Lucas P., Monsan P., Dols-Lafargue M., Remaud-Siméon M., and **Moulis C.**, **2018**. A dextran with unique rheological properties produced by the dextransucrase from *Oenococcus kitaharae* DSM 17330. *Carbohydr. Polym.* 179, 10-18.
- Faucard P., [Grimaud F.](#), Lourdin D., Maigret JE., **Moulis C.**, Remaud-Siméon M., Putaux JL., Potocki-Véronèse G., Rolland-Sabaté A. **2018**. Macromolecular structure and film properties of enzymatically-engineered high molar mass dextrans. *Carbohydr Polym.* 181:337-344.

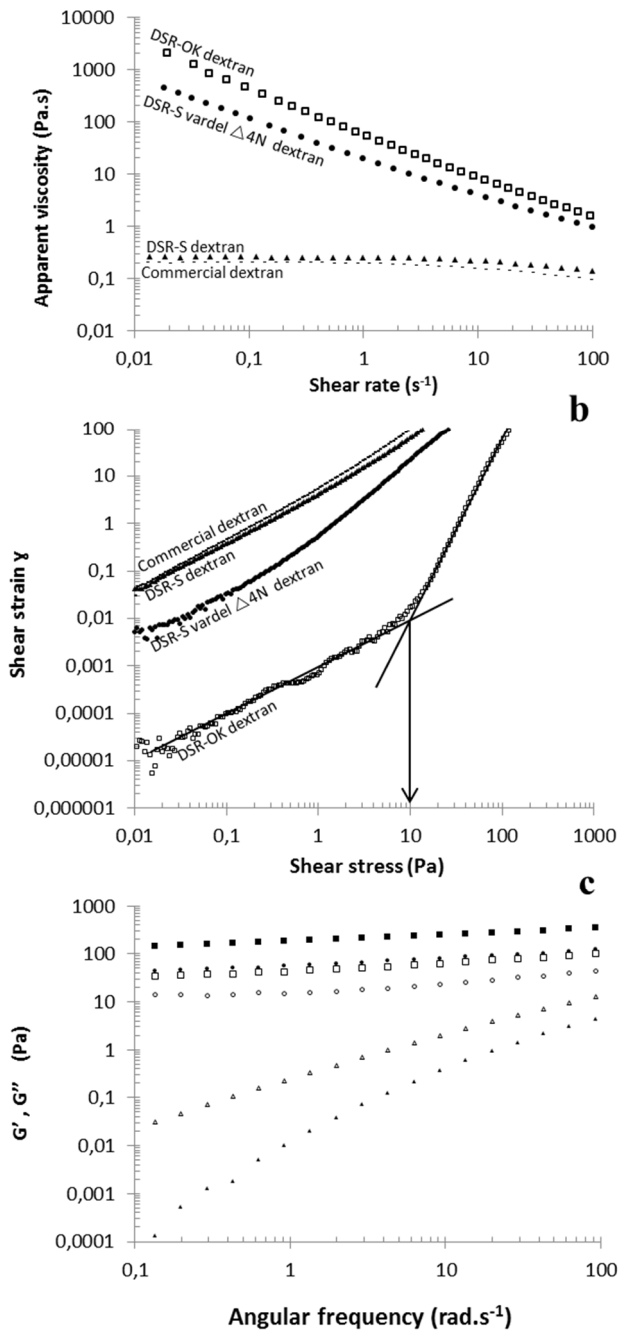


Figure 9. Analyses rhéologiques comparatives de différentes solutions de dextrans à 5% (p/v) produits par DSR-OK, l'enzyme recombinante DSR-S vardel D4N, l'enzyme DSR-S produite par la souche *L. mesenteroides* NRRL B-512F et le dextrane commercial produit par DSR-S. **a)** Viscosité apparente en fonction du taux de cisaillement, **b)** Détermination de l'effet de seuil d'écoulement et **c)** Détermination des modules G' et G'' en fonction de la fréquence.

Pour finir, la découverte des enzymes DSR-M et DSR-OK - toutes les deux singulières car produisant à la fois les dextrans les plus petits et les plus gros jamais décrits dans cette famille - en ont fait deux formidables outils pour aller investiguer plus en détail le mécanisme de polymérisation des glucane-saccharases, ainsi que les déterminants structuraux impliqués dans la taille des polymères. Il s'agissait alors de poursuivre le travail que j'avais pu initier au cours de ma thèse, et ils ont constitué la majeure partie des travaux de celle de Marion Claverie (2013-2017). D'un autre côté, la découverte des enzymes de branchement et des toutes nouvelles oligo-saccharases ouvre la voie à la

caractérisation de ces nouveaux outils catalytiques pour la glucosylation à façon de diverses molécules (saccharidiques ou non). Ces nouvelles enzymes constituent un nouveau réservoir de modèles pour l'étude des déterminants structuraux impliqués dans la spécificité de liaison, tout comme ceux gouvernant l'activité polymérase *versus* l'activité de branchement. Au cours de ce deuxième chapitre, je tenterai donc d'illustrer quelques avancées majeures auxquelles nous avons contribué ces dernières années dans ce domaine, ainsi que certains des travaux d'ingénierie qui en découlent. Enfin, et pour une meilleure mise en contexte, c'est dans cette partie que mon implication dans cette thématique au cours de mes travaux de thèse et de post-doctorat sera mentionnée.

2. Etude des relations structure-fonction et Ingénierie des α -transglucosylases

2.1. Mécanisme de polymérisation des glucane-saccharases et déterminants structuraux impliqués dans la taille des polymères.

- Travaux de thèse : Etude des relations structure-fonction et Ingénierie de la dextrane-saccharase DSR-S de *L. mesenteroides* NRRL B-512F.

Encore aujourd'hui, la bactérie *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F reste une des souches les plus utilisées pour la production industrielle des dextrans. Elle produit en effet une dextrane-saccharase appelée DSR-S qui catalyse la synthèse d'un polymère de très haute masse molaire (10^8 g/mol) composé à 95% de liaisons α -1,6, qui sera ensuite hydrolysé, fractionné et éventuellement fonctionnalisé pour les applications pharmaceutiques ou de chimie fine. Mes travaux de thèse ont été initiés fin 2002 par la société Béghin-Say, sous forme d'un contrat Cifre avec l'équipe CIMEs. La société souhaitait développer l'utilisation des dextrans avec un objectif triple : i) trouver de nouvelles voies de valorisation du saccharose surproduit dans ses raffineries, ii) trouver de nouveaux procédés de production des dextrans de masse molaire contrôlée utilisés en pharmaceutique et iii), diversifier le panel d'application des dextrans existants.

Jusqu'à la fin des années 90, les recherches menées sur DSR-S furent essentiellement focalisées sur l'optimisation des paramètres de production et de purification de l'enzyme native, tout comme la caractérisation des dextrans natifs obtenus. Une caractérisation plus fine du catalyseur, notamment au niveau moléculaire, paraissait indispensable pour mieux comprendre les relations liant structure et activité de la protéine, et tenter un remodelage du catalyseur qui permettrait de contrôler la taille des produits synthétisés. De surcroît, **le mécanisme de synthèse du polymère faisait l'objet de nombreuses controverses au début de mon étude, constituant donc un axe de recherche prioritaire sur un plan plus fondamental.** Enfin, l'obtention d'une première structure tridimensionnelle constituait un second challenge, car à cette époque, aucune structure 3D d'enzymes de la famille GH70 n'était encore connue.

Développement d'un système de production hétérologue de DSR-S, construction de variants par ingénierie rationnelle et caractérisation des dextrans obtenus

Le premier défi consista à améliorer l'expression de DSR-S par *E. coli*, les travaux publiés dans la littérature faisant état de nombreux problèmes de production et de dégradation de la protéine d'intérêt chez ce micro-organisme hôte³⁸. En jouant sur les souches d'expression, et surtout sur la température de croissance des cellules, les niveaux de production ont pu être augmentés d'un facteur 30, ce qui était largement suffisant. Cependant, les problèmes de dégradation n'en étaient pas pour autant résolus, empêchant la caractérisation rigoureuse des propriétés catalytiques de l'enzyme. En supposant que ces dégradations puissent être dues à la très grosse taille de l'enzyme (170 kDa), nous avons entrepris de réduire cette dernière par ingénierie rationnelle. A l'époque, la structure primaire des dextrane-saccharases était définie en trois domaines structuraux : une zone variable (~200 acides aminés), un domaine catalytique (~ 500 à 800 aa) renfermant les acides aminés propres à la catalyse, et un troisième domaine connu pour se fixer au dextrane, appelé en ce sens Glucan Binding Domain

³⁸Monchois, V., Remaud-Simeon, M., Russell, R. R., Monsan, P., & Willemot, R. M. 1997. Characterization of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextranase (DSRS) and identification of amino-acid residues playing a key role in enzyme activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48, 465-472; Funane, K., Ishii, T., Terasawa, K., Yamamoto, T., & Kobayashi, M. 2004. Construction of chimeric glucanases for analyzing substrate-binding regions that affect the structure of glucan products. *Biosci Biotechnol Biochem* 68, 1912-20 ;

(GBD) et constitué de nombreuses séquences d'une 20^{aine} de résidus riches en acides aminés aromatiques et hydrophobes (motifs « YG », définis dès 1994³⁹). Ce GBD était décrit pour être présent à l'extrémité C-terminale des glucane-saccharases provenant de *Streptococcus* ou *Leuconostoc* sp., et en position N-terminale chez les enzymes de *Lactobacillus* sp⁴⁰.

Nous avons construit un variant de l'enzyme pour lequel les 4 derniers motifs répétés de type N présents à l'extrémité C-terminale (riches en séquences « YG »), ainsi qu'une grande partie de la zone variable, ont été supprimés (Figure 10b, p37). La perte de ces motifs (150 acides aminés en N-ter et 77 en C-ter sur une séquence de 1527 résidus) n'a eu aucune influence sur l'activité de l'enzyme. Le variant appelé DSR-S var del Δ 4N produit toujours un dextrane de très haute masse molaire (déterminé en 2012 par AF4-MALLS à 10⁸ g/mol lors de travaux de thèse de Romain Irague) et composé à plus de 95% de liaisons α -1,6. Il est en revanche nettement moins dégradé lors de l'expression chez *E. coli*, et sa purification complète par affinité sur résine de nickel a pu être optimisée. Par rapport aux travaux antérieurs, **il s'agissait du premier procédé de purification permettant de caractériser de manière rigoureuse des préparations ne contenant qu'une seule forme active de DSR-S**. Des travaux de cristallisation ont été initiés au cours de la thèse avec une équipe de chercheurs danois (Pr M. Gahjede, Danish University of Pharmaceutical Sciences), malheureusement sans résultats. Avec un k_{cat} de 584 s⁻¹, ce variant de DSR-S est extrêmement efficace pour la synthèse de dextrane.

De plus, une caractérisation des propriétés rhéologiques du polymère, réalisée à l'époque en collaboration avec le Pr M. Rinaudo du CERMAV de Grenoble, a montré que les extraits bruts de DSR-S var del Δ 4N catalysaient la synthèse d'un dextrane présentant un **aspect filant prononcé**, et une viscosité six fois supérieure à celle du dextrane produit par l'enzyme native issue de *L. mesenteroides*. Curieusement, de faibles contraintes de cisaillement transforment aussi cette solution visqueuse en gel mou, comme nous avons pu le voir ensuite pour le dextrane produit par DSR-OK (cf. Figure 9c, p32). Ces propriétés viscosifiantes, gélifiantes et filmogènes originales n'avaient jamais été observées pour le polymère produit par l'enzyme native, et peuvent présenter un intérêt à la fois pour l'industrie alimentaire (agents de texture), ou pour des valorisations non alimentaires en tant que bio-additifs, comme nous le verrons au chapitre 3.

Etude du mécanisme de polymérisation et application à la synthèse de dextrans de taille contrôlée

D'un point de vue plus fondamental, la caractérisation fine et rigoureuse du mécanisme de polymérisation de DSR-S a pu être entreprise grâce au modèle DSR-S var del Δ 4N, purifiable à homogénéité. Au début des travaux, deux hypothèses contradictoires s'opposaient quant au mode de formation du dextrane par cette famille d'enzymes. Le caractère processif de la polymérisation était généralement admis, car aucune chaîne de polymère en cours d'élongation n'était détectée dans le milieu lors des suivis cinétiques⁴¹. Certains auteurs ont alors proposé que l'élongation se fasse par un mécanisme d'insertion des unités glucosyle à partir de l'extrémité réductrice des chaînes, *via* l'implication de deux triades catalytiques⁴². Cependant, plusieurs résultats venaient contredire cette proposition :

³⁹ Giffard, P. M., & Jacques, N. A. 1994. Definition of a fundamental repeating unit in streptococcal glucosyltransferase glucan-binding regions and related sequences. *J Dent Res* 73, 1133-41.

⁴⁰ Kralj, S., van Geel-Schutten, G. H., Dondorff, M. M., Kirsanovs, S., van der Maarel, M. J., & Dijkhuizen, L. 2004. Glucan synthesis in the genus *Lactobacillus*: isolation and characterization of glucansucrase genes, enzymes and glucan products from six different strains. *Microbiology* 150, 3681-90.

⁴¹ Koepsell, H. J., Tsuchiya, H. M., Hellman, N. N., Kazenko, A., Hoffman, C. A., Sharpe, E. S., & Jackson, R. W. 1953. Enzymatic synthesis of dextran; acceptor specificity and chain initiation. *J Biol Chem* 200, 793-801; Ebert, K. H., & Schenk, G. 1968. Mechanisms of biopolymer growth: the formation of dextran and levan. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 30, 179-221

⁴² Robyt, J. F., Kimble, B. K., & Walseth, T. F. 1974. The mechanism of dextransucrase action. Direction of dextran biosynthesis. *Arch.Biochem.Biophys.* 165, 634-40.

- Il avait été montré dès 1953 que la réaction d'accepteur sur des oligosaccharides exogènes se faisait par leur extrémité non-réductrice, en ne faisant intervenir qu'une seule triade catalytique, et ce mode d'action était admis par l'ensemble de la communauté⁴³. Comment expliquer alors un mécanisme différent pour les deux réactions ?
- Une seule triade catalytique pouvait être détectée lors des analyses de séquences primaires (les premières obtenues dès la fin des années 80), et un seul site capable de fixer le glucose de manière covalente avait été identifié expérimentalement⁴⁴.
- Au début de ma thèse, l'équipe CIMEs avait montré que l'amylosaccharase – produisant de l'amylose à partir de saccharose, mais classée dans la famille GH-13, fonctionnait selon un mécanisme non-processif correspondant à des réactions d'accepteur successives sur la chaîne d' α -glucane en cours d'élongation⁴⁵. Cependant, comment adapter ce mode d'élongation à la synthèse d'un polymère qui semblait suivre, chez les enzymes GH70, un mécanisme processif ?

Au cours de la thèse, bénéficiant d'une nouvelle technique de chromatographie d'échange d'ions couplée à une détection ampérométrique (système HPAEC-PAD), qui permet de détecter des concentrations très faibles en **oligosaccharides et petits polymères, nous avons montré que l'élongation se produit –dans cette famille- suivant un mécanisme semi-processif**. Dans les premiers temps de la réaction, l'eau et le saccharose (prépondérants dans le milieu) sont les premiers accepteurs des unités glucosyle. Très rapidement, ces molécules de glucose ou petits oligosaccharides s'accumulent dans le milieu et sont à leur tour reconnus comme accepteur par l'enzyme (**Figure 10a**), et ce de manière préférentielle au fur et à mesure que leur taille augmente. Il s'agit alors d'un mécanisme non-processif (ou distributif) puisque les molécules sont relarguées dans le milieu après chaque transfert d'unité glucosyle. Cependant, une fois que les chaînes en cours d'élongation atteignent un degré de polymérisation d'environ 7-8, elles ne sont plus distinguables par analyses HPAEC-PAD. En parallèle, les suivis cinétiques par chromatographie d'exclusion stérique montrent qu'après 30 min de réaction, un polymère de très haute masse molaire est détecté, ayant directement la taille de 10^8 g/mol. Il semblait donc que l'enzyme possède des déterminants structuraux jouant le rôle de zones d'ancrages permettant de capturer le polymère à partir d'une certaine taille, afin de favoriser son élongation avant son relargage. Nous supposons donc que **l'enzyme oscille entre un mécanisme multi-chaînes (en tout début de réaction) et simple chaîne dès que des oligosaccharides de taille suffisante sont formés**. Afin de mettre en évidence la présence de zones d'ancrage des chaînes en cours d'élongation, notre choix s'est naturellement porté vers les unités « YG » du Glucan Binding Domain, essentiellement présentes à l'extrémité C-terminale de l'enzyme. Nous avons alors entrepris la construction de différents variants de DSR-S pour lesquels les unités « YG » ont été progressivement éliminées. Or, ces variants tronqués se sont avérés spécifiques de la synthèse de dextrans de faible taille (de $10 \cdot 10^3$ g/mol ou $40 \cdot 10^3$ g/mol) au détriment du dextrane de 10^8 g/mol, confirmant le mécanisme proposé (**Figure 10b**). De plus, en travaillant sur le domaine de liaison au glucane seul, et par troncature progressive des unités répétées le constituant, nous avons identifié différents motifs ayant une affinité pour le dextrane équivalente à celle du domaine V seul, démontrant pour la première fois que ce domaine -ou des fragments de celui-ci- pouvaient se replier

⁴³ Référence Koepsell et al. n°37 ; Robyt, J. F., & Walseth, T. F. 1978. The mechanism of acceptor reactions of *Leuconostoc mesenteroides* B-512F dextranase. *Carbohydr. Res.* 61, 433-445.

⁴⁴ Mooser, G., Hefta, S. A., Paxton, R. J., Shively, J. E., & Lee, T. D. 1991. Isolation and sequence of an active-site peptide containing a catalytic aspartic acid from two *Streptococcus mutans* glucosyltransferases. *Journal of Biological Chemistry* 266, 8916-8922.

⁴⁵ Albenne, C., Skov, L. K., Mirza, O., Gajhede, M., Feller, G., D'Amico, S., Andre, G., Potocki-Veronese, G., van der Veen, B. A., Monsan, P., & Remaud-Simeon, M. 2004. Molecular basis of the amylose-like polymer formation catalyzed by *Neisseria polysaccharea* amylosucrase. *J Biol Chem* 279, 726-34

de manière autonome. Ainsi, un motif minimal de 7 kDa (constitué de 6 unités répétées) présente une **affinité de l'ordre du nanomolaire pour des chaînes de taille supérieure à 7 ou 8 unités glucosyle.**

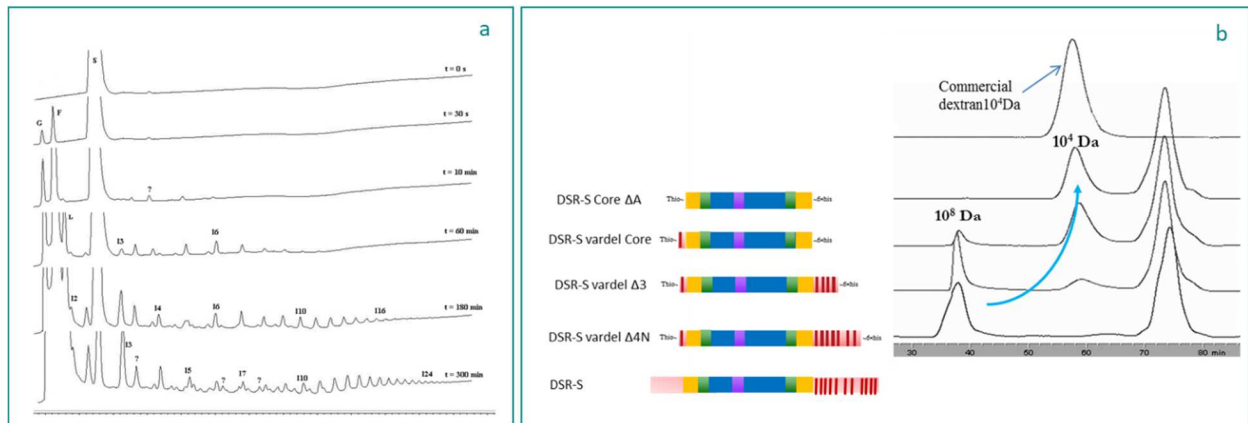


Figure 10. a- Suivi cinétique de la production d'oligosaccharides par DSR-S vardel $\Delta 4N$ au cours de la synthèse, analysés par HPAEC-PAD. G: glucose; F: fructose; S: sucrose; L: leucose; I2, I3, I4 à I18: isomaltooligosaccharides de DP2 à DP18.

b- Représentation schématique de la structure primaire de DSR-S et des variants construits au cours de l'étude.

Notamment, le domaine de liaison au glucane (GBD) est en rose pâle et les motifs répétés « YG » représentés en rouge foncé. L'effet de la délétion progressive des unités répétées du domaine C-terminal de DSR-S sur la taille des polymères formés après consommation totale du substrat est montré pour les variants DSR-S Vardel $\Delta 4N$ et les formes plus courtes.

D'un point de vue applicatif, certains des variants construits au cours de l'étude permettent la synthèse directe de dextrans d'environ $10 \cdot 10^3$ g/mol ou $40 \cdot 10^3$ g/mol avec des rendements d'environ 70%, simplement à partir de saccharose et sans étapes successives d'hydrolyse chimique. Pour leurs applications industrielles potentielles, les dextrans produits par l'ensemble des variants de DSR-S construits au cours de l'étude ont fait l'objet du brevet WO2007091178 (A2).

Ces travaux ont également donné lieu aux publications suivantes :

- **Moulis, C.,** Arcache, A., Escalier, P.-C., Rinaudo, M., Monsan, P., Remaud-Simeon, M., Potocki-Veronese, G., **2006.** High-level production and purification of a fully active recombinant dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *FEMS Microbiol. Lett.* 261, 203–210.
- **Moulis, C.,** Joucla, G., Harrison, D., Fabre, E., Potocki-Veronese, G., Monsan, P., Remaud-Simeon, M., **2006.** Understanding the polymerization mechanism of glycoside-hydrolase family 70 glucansucrases. *J. Biol. Chem.* 281, 31254–31267.
- Fabre E., Joucla G., **Moulis C.,** Emond S., Richard R., Potocki-Veronese G., Monsan P., Remaud-Simeon M. **2006.** Glucansucrases : what are the determinants of their specificity ? *Biocatalysis and Biotransformation* 24 (1-2), 137-145.
- Suwannarangsee, S., **Moulis, C.,** Potocki-Veronese, G., Monsan, P., Remaud-Simeon, M., Chulalaksananukul, W., **2007.** Search for a dextransucrase minimal motif involved in dextran binding. *FEBS Lett.* 581, 4675–4680.
- **Moulis C.,** Vaca Medina G., Suwannarangsee, S., Monsan P., Remaud-Simeon M., Potocki-Veronese G. **2008.** One-step synthesis of isomaltooligosaccharide syrups and dextrans of controlled size using engineered dextransucrase. *Biocatalysis and Biotransformation* 26 (1), 141-151
- Irague, R., Rolland-Sabaté, A., Tarquis, L., Doublier, J.L., **Moulis, C.,** Monsan, P., Remaud-Siméon, M., Potocki-Véronèse, G., Buléon, A., **2012.** Structure and property engineering of α -D-glucans synthesized by dextransucrase mutants. *Biomacromolecules* 13, 187–195.

Cependant, si le premier variant DSR-S vardel $\Delta 4N$ avait gardé une efficacité catalytique très avantageuse (95%), **les autres formes construites ont été très affectées par les troncutures réalisées,** ne gardant que moins de 1% de l'activité initiale de DSR-S. Notons que le design de ces formes

tronquées n'était basé, à l'époque, que sur une analyse des structures primaires et secondaires. Nous supposons donc que certaines des positions de troncatures choisies aient fortement impacté le repliement de la protéine, entraînant une importante chute de l'activité spécifique. **Nous attendions donc avec impatience la résolution de la première structure tridimensionnelle** d'une enzyme de cette famille afin de confirmer notre hypothèse quant au mécanisme semi-processif n'impliquant qu'une seule triade catalytique, et affiner la compréhension du mode d'action catalytique et d'élongation à l'échelle moléculaire et atomique.

o Données structurales clés acquises depuis 2010

La première structure 3D, celle de la dextrane-saccharase de GTF-180 de *Lactobacillus reuteri* (PDB :3KLL) a été résolue en 2010⁴⁶. Trois autres structures sont également sorties les deux années suivantes, à savoir la structure de i) la mutane-saccharase GTF-SI de *S. mutans* (PDB 3AIE), iii) une forme tronquée de 123 kDa de l'enzyme de branchement GBD-CD2 construite par ingénierie de la DSR-E de *L. citreum* NRRL B-1299 (Δ N123 GBD-CD2, PDB 3TTQ), et iv) la reuterane-saccharase GTF-A Δ N de *L. reuteri* 121 (PDB 4AMC)⁴⁷, montrant les efforts communs de la communauté scientifique à ce sujet. Toutes ces enzymes ont dû être tronquées soit du côté N-terminal, soit du côté C-terminal, afin de faciliter les étapes de purification et de cristallogénèse.

Le repliement protéique des enzymes GH70 est globalement très similaire et très original, car adoptant une forme de U dans lequel se distinguent 5 domaines structuraux. Or, 4 d'entre eux (domaines A, B, IV et V) résultent de l'enchevêtrement de deux segments polypeptidiques des extrémités N et C-terminales (**Figure 11**). Les domaines A, B et C s'alignent avec ceux des enzymes de la famille GH13 alors que les domaines IV et V sont spécifiques des enzymes de la famille GH70. Le domaine A correspond au domaine catalytique. Conformément aux prédictions de structures secondaires et aux analyses par dichroïsme circulaire, il se structure en tonneau (β/α)₈ et confirme une permutation circulaire à partir de l'hélice α 3 (par rapport au tonneau des enzymes GH13) précédemment identifiée par alignement de séquences⁴⁸.

Les structures d'un mutant inactif de GTF-180 Δ N en complexe avec le saccharose (PDB 3HZ3) et le maltose (PDB 3KII) ont permis de cartographier les sous-sites -1 ; +1 et +2 impliqués dans la reconnaissance et la liaison au substrat, selon la définition de Davies⁴⁹ (**Figure 12**). Ces derniers se retrouvent dans les motifs I à IV précédemment cités au chapitre 1. Ainsi, 7 résidus du sous-site -1 sont en interaction avec l'unité glucosyle du saccharose, et sont strictement conservés dans toutes les séquences d'enzymes GH70. En revanche, les 4 résidus du sous-site (ss) accepteur +1, ainsi que ceux du ss +2, se différencient selon les spécificités de liaison des polymérases, mais aussi entre polymérases et enzymes de branchement, et sont mis à profit lors de nos recherches de nouvelles α -transglucosylases par data mining (cf **Tableau 1**, p23). Cette plasticité assez surprenante est certainement à l'origine de l'aptitude de ces enzymes à reconnaître toute une batterie de molécules acceptrices.

⁴⁶ Vujičić-Žagar A, Pijning T, Kralj S, López CA, Eeuwema W, Dijkhuizen L, Dijkstra BW. 2010. Crystal structure of a 117 kDa glucansucrase fragment provides insight into evolution and product specificity of GH70 enzymes. *Proc Natl Acad Sci* 107:21406–21411.

⁴⁷ Ito K, Ito S, Shimamura T, Weyand S, Kawarasaki Y, Misaka T, Abe K, Kobayashi T, Cameron AD, Iwata S. 2011. Crystal Structure of Glucansucrase from the Dental Caries Pathogen *Streptococcus mutans*. *J Mol Biol* 408:177–186 ; Brison Y, Pijning T, Malbert Y, Fabre E, Mourey L, Morel S, Potocki-Veronese G, Monsan P, Tranier S, Remaud-Simeon M, Dijkstra BW. 2012. Functional and Structural Characterization of α -1,2 Branching Sucrase Derived from DSR-E Glucansucrase. *J Biol Chem* 287:7915–7924 ; Pijning T, Vujičić-Žagar A, Kralj S, Dijkhuizen L, Dijkstra BW. 2012. Structure of the α -1,6/ α -1,4-specific glucansucrase GTFA from *Lactobacillus reuteri* 121. *Acta Crystallograph Sect F Struct Biol Cryst Commun* 68:1448–1454.

⁴⁸ MacGregor EA, Jespersen HM, Svensson B (1996) A circularly permuted α -amylase-type α/β -barrel structure in glucan-synthesizing glucosyltransferases. *FEBS Lett* 378:263–266.

⁴⁹ Davies GJ, Wilson K, Henrissat B. 1997. Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochem J* 321:557–559

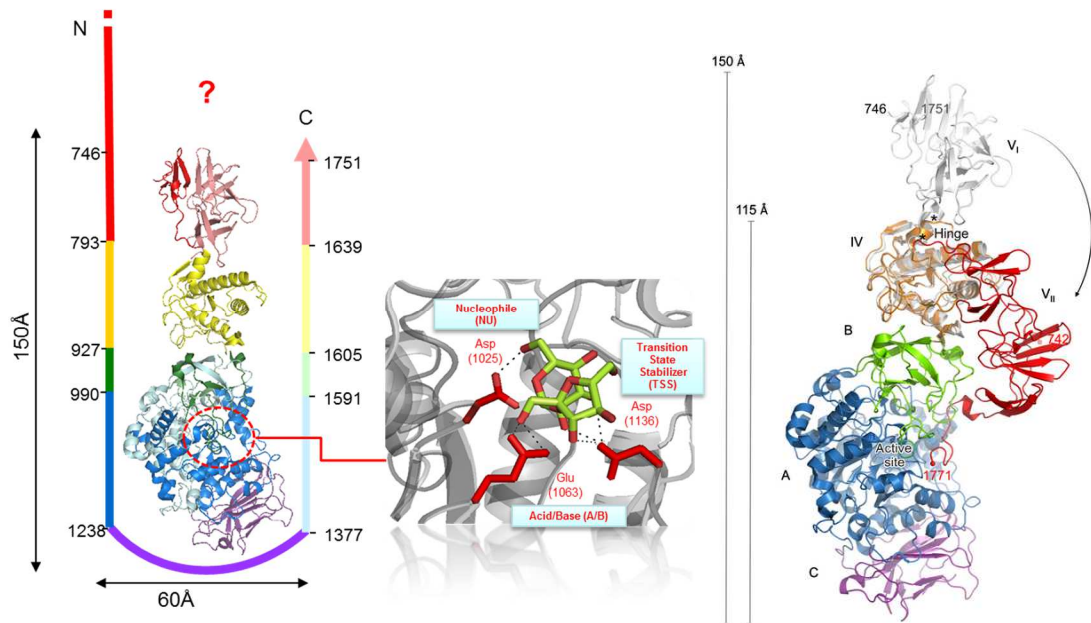


Figure 11. Structure tridimensionnelle de GTF-180 Δ N (PDB :3HZ3), montrant les 5 domaines structuraux : domaine V en rouge, domaine IV en jaune, domaine B en vert, domaine A (catalytique) en bleu, domaine C en violet. Un zoom du site actif, avec la triade catalytique en complexe avec une molécule de saccharose est également présenté, ainsi qu'une superposition des deux structures cristallographiques obtenues pour cette enzyme, montrant une rotation de 120° du domaine V sur une zone charnière présente à l'extrémité du domaine IV.

A ce jour, la plupart des travaux d'étude des relations structure-fonction ont été focalisés sur ce domaine A, notamment pour tenter d'identifier les éléments structuraux impliqués dans la spécificité de liaison. Une vingtaine de travaux, sur différentes enzymes de la famille, ont confirmé l'importance des acides aminés en aval de l'acide aspartique stabilisateur de l'état de transition (motif IV) sur la spécificité de liaison de l'enzyme. Cependant, l'élucidation de l'ensemble des facteurs qui gouvernent cette spécificité reste encore aujourd'hui un challenge. En effet, il ne suffit pas d'inverser les séquences signatures connues et retrouvées sur deux enzymes de spécificité différentes pour inverser leurs particularités, par exemple.

Quelques travaux ont montré que le domaine B, qui participe à la formation du domaine A, est également impliqué dans la spécificité de liaison (position L938 ou L940 de GTF-180⁵⁰ ou position F353 de DSR-S vardel Δ 4N, identifiée lors des travaux de thèse de Romain Irague dans notre équipe). Le domaine C, quant à lui, forme la base de la structure en « U ». Pour l'instant, sa fonction précise reste inconnue, tout comme celle du domaine IV, positionné entre le domaine B et le domaine V. Ce domaine IV ne possède aucune homologie structurale avec d'autres domaines, structures protéiques ou repliements répertoriés dans la PDB. Compte tenu de sa position, il pourrait servir de charnière entre le domaine V et le cœur catalytique de l'enzyme, et permettrait ainsi d'amener et d'écarter le domaine de liaison au glucane du site actif, afin de faciliter l'extension des chaînes de polymère. En effet, deux structures cristallographiques de GTF-180 dans lesquelles le domaine V adopte une rotation de 120°, confirmée par des analyses SAXS en solution, confirment que ce domaine est hautement flexible⁵¹. De

⁵⁰ Meng, X., Dobruchowska, J.M., Pijning, T., Lopez, C.A., Kamerling, J.P., and Dijkhuizen, L. 2014. Residue Leu940 Has a Crucial Role in the Linkage and Reaction Specificity of the Glucansucrase GTF180 of the Probiotic Bacterium *Lactobacillus reuteri* 180. *J. Biol. Chem.* 289, 32773–32782 ; Meng, X., Pijning, T., Dobruchowska, J.M., Gerwig, G.J., and Dijkhuizen, L. 2015. Characterization of the Functional Roles of Amino Acid Residues in Acceptor-binding Subsite +1 in the Active Site of the Glucansucrase GTF180 from *Lactobacillus reuteri* 180. *J. Biol. Chem.* 290, 30131–30141

⁵¹ Pijning T, Vujičić-Zagar A, Kralj S, Dijkhuizen L, Dijkstra BW. 2014. Flexibility of truncated and full-length glucansucrase GTF180 enzymes from *Lactobacillus reuteri* 180. *FEBS J* 281:2159–2171.

même, si les domaines A, B, C et IV des différentes structures se superposent très bien, les orientations des domaines V sont plus variables selon les structures. Ainsi, la structure globale de GBD-CD2 est nettement plus compacte que celle de GTF-A ou GTF-SI, par exemple. On suppose aujourd'hui que cette grande flexibilité du domaine V a fortement limité, pendant longtemps, l'obtention des structures 3D, nécessitant pour cela le recours à la construction de formes tronquées, et donc la résolution de structures partielles de ce domaine.

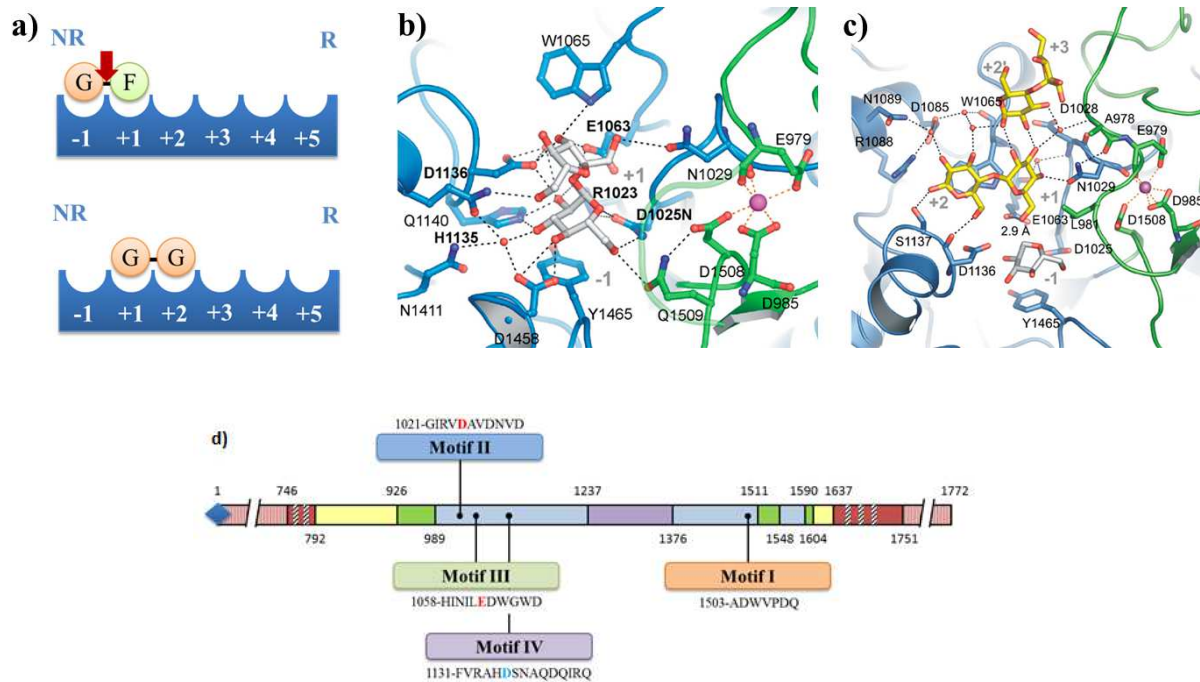


Figure 12. Identification des sous-sites de liaison au saccharose et au maltose. a) Définition des sous-sites selon Davies *et al.* L'inscription NR indique l'extrémité Non-Réductrice, R, l'extrémité Réductrice. Le schéma du haut définit les sous sites de liaison du saccharose par rapport au clivage de la liaison osidique (représentée par la flèche rouge). Le schéma du bas représente les sous-sites de liaison au maltose. b) Représentation des acides aminés constituant les sous-sites -1 et +1 de liaison au saccharose de GTF-180-ΔN D1025N en complexe avec une molécule de saccharose (bâtonnets blancs) c) Représentation des acides aminés constituant les sous-sites accepteur +1 et +2, +2' et +3' de GTF-180-ΔN en complexe avec des molécules de maltose (bâtonnets jaunes); d) Représentation schématique de la structure primaire de GTF-180 avec identification des motifs conservés I à IV des enzymes de la famille 13.

Pour finir, le domaine V correspond bien au domaine impliqué dans la liaison au glucane, formé des segments polypeptidiques provenant des extrémités N et C-terminales. Il adopte une conformation générale en β -solénoïde triangulaire car plusieurs séquences répétées YG constituent des motifs structuraux décrivant une conformation en épingle à cheveux de type β , ou une conformation à trois feuillets β antiparallèles. En 2016, Brison *et al.* ont obtenu une structure 3D de GBD-CD2ΔN123 en complexe avec des molécules d'isomaltose ou d'isomaltotriose dans le domaine V, montrant la présence de motifs appelés « poches à sucres » d'environ 80 acides aminés. Ces motifs structuraux correspondent à 2 séquences YG complètes + deux séquences partielles⁵². L'analyse du complexe a pu mettre en évidence la stabilisation des unités glucosyle de l'oligosaccharide par des interactions de stacking avec un acide aromatique présent au fond de la poche, ainsi que par la formation d'un réseau de liaisons hydrogène avec certains acides aminés chargés (D, E, K, R) ou polaires (T, S, Q, N) (voir [Figure 15](#), p43). Un retour aux analyses de séquences des domaines V d'une batterie de glucane-

⁵² Brison, Y., Malbert, Y., Czaplicki, G., Mourey, L., Remaud-Simeon, M., and Tranier, S. 2016. Structural Insights into the Carbohydrate Binding Ability of an α -(1 \rightarrow 2) Branching Sucrase from Glycoside Hydrolase Family 70. *J. Biol. Chem.* 291, 7527–7540

saccharases connues pour avoir une affinité pour le dextrane a permis d'identifier des séquences signature similaires, redéfinissant les fameuses séquences répétées du GBD. Cependant, aucune preuve expérimentale n'avait permis d'étayer l'étude structurale réalisée.

Ayant découvert entre temps les enzymes DSR-M et DSR-OK dans l'équipe, nous avons alors choisi de poursuivre cette analyse des déterminants structuraux impliqués dans la liaison au glucane à partir de ces deux modèles enzymatiques. Il s'agit des travaux de thèse de Marion Claverie, co-encadrée avec Magali Remaud-Simeon entre 2013 et 2017. Ce travail a également été mené à bien grâce à l'implication majeure de Gianluca Cioci, ingénieur de recherche en biophysique dans l'équipe et responsable du pôle cristallographie au sein de la plateforme PICT-ICEO.

- **Etude mécanistique et structurale de DSR-M et DSR-OK**

Suivis cinétiques

Tout d'abord, des formes légèrement tronquées aux extrémités N et C-terminales des protéines ont dû être construites pour permettre une optimisation des conditions de purification et de cristallogénèse. Les modèles d'études sont donc DSR-OK Δ 1 et DSR-M Δ 2, pour lesquels les propriétés catalytiques des enzymes ne sont pas affectées de manière significative (plus de 75% de l'activité initiale sur saccharose conservée, même spécificité de liaison et taille des polymères du même ordre de grandeur). Afin d'étudier le mécanisme de polymérisation de ces deux polymérases « antagonistes », nous avons tout d'abord repris les suivis cinétiques de la synthèse du dextrane par analyses chromatographiques HPAEC-PAD, sur le même principe que ce que j'avais développé au cours de ma thèse. Cette étude a montré que DSR-OK Δ 1 suit le même mode d'élongation semi-processif que DSR-S vardel Δ 4N alors que **DSR-M Δ 2 procède, quant à elle, selon un mécanisme non-processif (ou distributif) du début à la fin de la synthèse (Figure 13)**. Cela était totalement nouveau pour une enzyme de la famille GH70. DSR-M Δ 2 a aussi une propension nettement plus importante à reconnaître le saccharose comme accepteur, de manière préférentielle dans les premiers temps de la réaction.

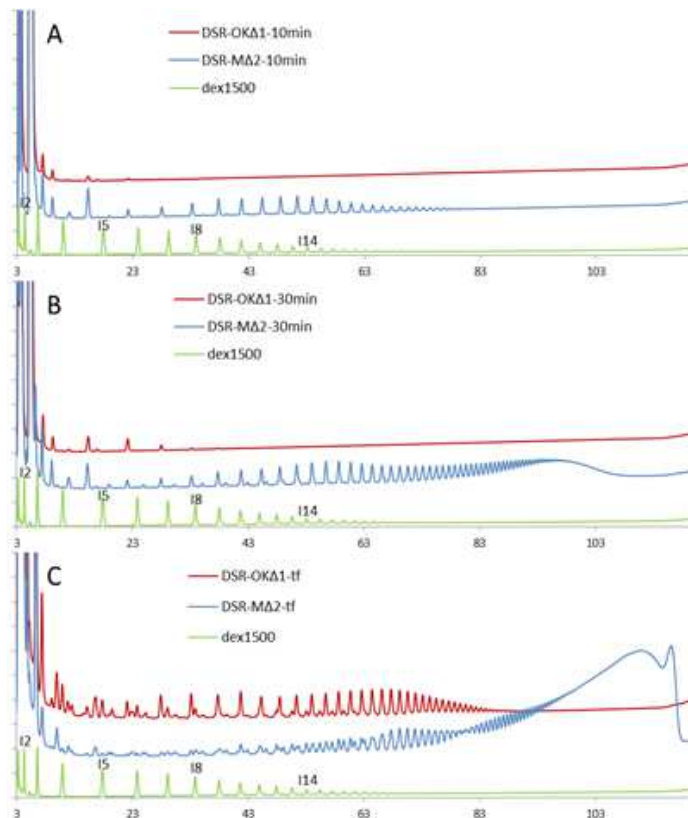


Figure 13. Comparaison des profils HPAEC-PAD des suivis cinétiques de la synthèse de dextrane par DSR-OKΔ1 (rouge) and DSR-MΔ2 (bleu) à partir de 100 g/L de saccharose. A: après 10 min; B: après 30 min; C: milieu de synthèse final. Le profil en vert correspond à un échantillon d'oligodextrane commercial de 1500 g/mol.

Données structurales

L'obtention d'une structure 3D de DSR-OKΔ1 reste encore aujourd'hui infructueuse, comme cela l'avait été pour DSR-S vardel Δ4N. Aucune structure 3D de glucane-saccharase spécialisée dans la synthèse de produits de très haute masse molaire ($> 10^8$ g/mol) n'a donc encore pu être résolue. GTF-180 est en effet une dextrane-saccharase fortement hydrolytique (plus de 25% des unités glucosyle issues du saccharose transférées sur l'eau, moins de 16,5% dédiées à la synthèse d'un dextrane de $3 \cdot 10^7$ g/mol, et la grande majorité des molécules formées incorporées dans une fraction oligosaccharidique très polydisperse⁵³).

En revanche, nous avons résolu **plusieurs structures 3D de DSR-MΔ2, autour de 3 Å** : celle de l'enzyme seule, celle d'un mutant inactif en complexe avec le saccharose dans le site actif, et celle d'un mutant inactif en complexe avec un isomaltotétraose (gluco-oligosaccharide de DP4) dans le domaine catalytique et dans une poche à sucre du domaine V (**Figure 14**). La résolution n'est pas optimale, certes, mais c'était –en 2017- la première fois que de tels complexes étaient décrits, et l'une des structures présentant le domaine V le plus long. Ce dernier adopte une orientation similaire à celui de GBD-CD2ΔN123 -ou de la forme refermée de GTF-180-, avec son extrémité pointant vers le tonneau (β/α)₈. Des analyses SAXS ont confirmé cette unique conformation de type « fer à cheval » de DSR-MΔ2 en solution.

⁵³ Meng X., Pijning T., Tietema, M., ..., Dijkhuizen L. 2017. Characterization of the glucansucrase GTF180 W1065 mutant enzymes producing polysaccharides and oligosaccharides with altered linkage composition. *Food Chemistry* 217: 81-90.

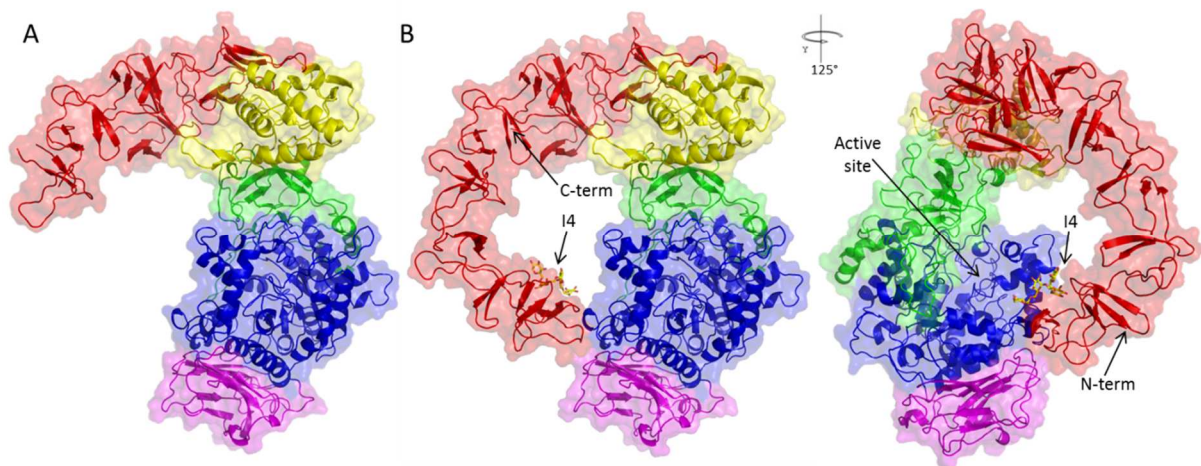


Figure 14. Structures de **DSRM-Δ2**. **A**, structure de l'enzyme libre résolue à 3.2 Å (PDB : 5LFC). **B**, structure du mutant inactif DSRM-Δ2 E715Q en complexe avec un isomaltooligosaccharide de DP4 dans le domaine V (PDB : 5NGY ; 3.8 Å). Magenta, domaine C; bleue, domain A, comprenant le tonneau (β/α); vert, domaine B; jaune, domaine IV; rouge, domaine V.

Dans le cœur catalytique, les sous-sites -1 et +1 se superposent parfaitement avec ceux des autres structures connues. En revanche, 4 boucles sont particulièrement originales, dont une beaucoup plus longue que celles présentes dans les autres structures (loop B2), sur laquelle nous reviendrons un peu plus loin. Dans le domaine V, la présence d'une molécule d'isomaltotétraose en interaction avec des acides aminés présents à l'extrémité N-terminale du domaine V a permis d'investiguer plus en détail le rôle des poches à sucre déjà identifiées chez GBD-CD2, car ces dernières adoptent des topologies similaires dans les deux structures résolues (**Figure 15**).

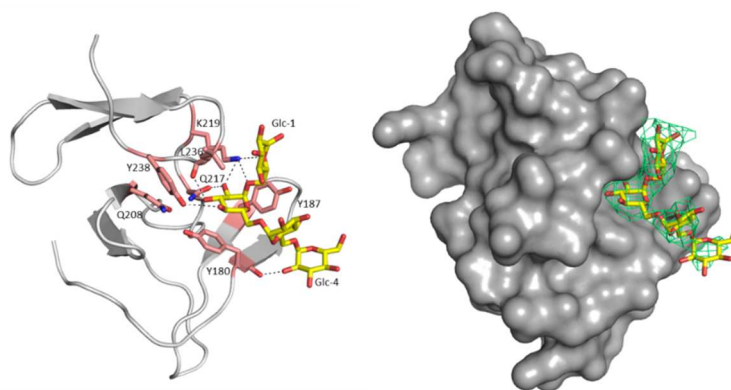


Figure 15. Poche à sucre V-A identifiée dans le GBD de DSR-MΔ2 (PDB : 5NGY). L'oligosaccharide de DP4 est représenté en jaune. A droite, les acides aminés impliqués dans la fixation de l'oligosaccharide sont représentés en orange pale, ainsi que le réseau de liaisons hydrogène formées entre le sucre et les acides aminés chargés.

Une fois encore, des interactions de stacking entre une tyrosine présente au fond de la poche V-A de DSR-M et le deuxième résidu glucosyle de l'oligosaccharide ont été mises en évidence, ainsi que des liaisons de faible énergie avec des acides aminés chargés (Gln, Leu et Lys). Dès lors, des alignements de séquences ont été réalisés entre les structures primaires des domaines V de DSR-M et de DSR-OK avec les séquences des poches à sucre de structures connues. Ainsi, 3 autres poches à sucres putatives ont été identifiées chez DSR-M, et 7 chez DSR-OK (**Figure 16**). Ces séquences se caractérisent toutes

par la présence d'au moins un acide aminé aromatique conservé dit de « stacking », ainsi qu'un motif QxK caractéristique.

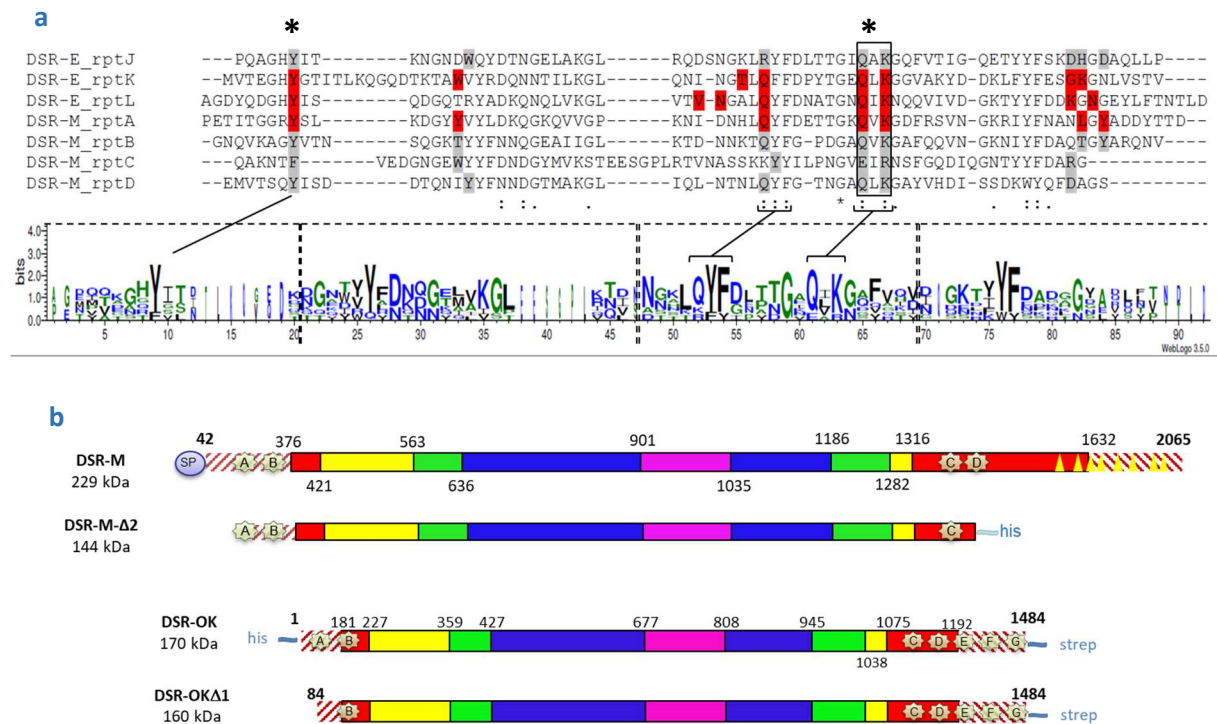


Figure 16. a- Principe de l'alignement de séquences ayant permis d'identifier trois poches à sucre dans le domaine V de DSR-M, en se basant sur celles identifiées chez $\Delta N123$ -GBD-CD2. Les acides aminés surlignés en rouge sont directement impliqués dans la fixation des oligosaccharides dans les poches K et L de $\Delta N123$ -GBD-CD2, ainsi que dans la poche A de DSR-M $\Delta 2$ (données cristallographiques). Les acides aminés surlignés en gris sont supposés jouer un rôle équivalent dans les autres poches à sucres prédites. La correspondance entre les poches à sucres et les anciennes unités répétées YG est représentée sur la séquence LOGO, où chaque unité YG correspond à un encart en pointillés.

b- Représentation schématique des structures primaires de DSR-M et DSR-OK, ainsi que des formes tronquées DSR-M $\Delta 2$ et DSR-OK $\Delta 1$, basées sur un alignement de séquences avec celle de GTF-180 ΔN et une analyse structurale. Le domaine V est symbolisé en rouge, les zones non alignées avec la structure de GTF-180 sont représentées par des hachures, et les poches à sucres putatives par des étoiles numérotées d'A à G.

Identification de déterminants structuraux clefs pour l'ancrage des chaînes en cours d'élongation

Notre première approche consista à construire, par ingénierie rationnelle, des mutants progressivement tronqués de chacune des poches à sucre identifiées. Pour DSR-OK, l'élimination des deux premières poches situées à l'extrémité C-terminale entraîna une perte drastique de 75% de l'activité spécifique (variant DSR-OK $\Delta 2$). Toutes les délétions suivantes ont eu un effet létal sur l'activité, comme cela avait déjà pu être remarqué lors des travaux antérieurs réalisés sur DSR-S vardel $\Delta 4N$. Le variant DSR-OK $\Delta 1$ produit toujours un dextrane de très haute masse molaire, même si celle-ci est légèrement impactée.

Curieusement, la délétion progressive de chacune des poches à sucre de DSR-M n'a eu –en revanche– quasiment aucune influence sur l'activité spécifique des variants. Ainsi, et **pour la première fois, nous avons pu construire une forme minimale d'enzyme GH70 dépourvue de tout domaine V et fortement active sur le saccharose**. Le variant produit alors un dextrane plus court, passant de 23 à 13 kg/mol (à l'apex des pics de chromatogrammes HPSEC). Des gels retards réalisés en présence de dextrane ont confirmé que DSR-M $\Delta 2$ présentait une faible affinité pour le polymère, le variant de cette même

enzyme dépourvue du domaine V aucune affinité, et *a contrario*, DSR-OK Δ 1 une affinité extrêmement élevée.

Pour aller plus loin, et parce que nous craignons que les troncutures aient pu influencer le repliement structural des protéines (et donc impacter leur activité), nous avons alors décidé de **muter spécifiquement les acides aminés** de la poche à sucre **directement impliqués dans la fixation des unités glucosyle**. Pour cela, notre choix s'est naturellement porté dans un premier temps sur les acides aminés de stacking (tyrosine ou phénylalanine) retrouvés au fond des poches (symbolisé par une *, **Figure 16a**). En remplaçant l'acide aminé aromatique par une alanine, nous avons obtenu plusieurs résultats majeurs :

- i) La simple mutation d'une tyrosine d'une poche à sucre peut avoir un impact majeur sur la taille des polymères formés. C'est par exemple le cas en mutant Y180 de la poche A de DSR-M, le dextrane formé passant à 12-13 kg/mol contre 23 kg/mol pour la forme parentale. De même, une simple mutation dans les poches D ou E de DSR-OK (Y1162A ou F1228A) influence de manière significative la taille des produits. L'effet est même encore plus prononcé lors de la construction du double mutant pour lequel la synthèse du dextrane natif de masse supérieure à 10⁹ g/mol est quasi abolie au profit d'un dextrane de faible masse molaire d'environ 13 kg/mol (**Figure 17a**).
- ii) **Chez DSR-OK Δ 1, la simple élimination des deux tyrosines de stacking des poches D et E élimine totalement le caractère processif de la polymérisation.** Les analyses HPAEC-PAD des suivis cinétiques montrent ainsi que le double mutant DSR-OK Δ 1 Y1162A-F1228A fonctionne de manière non-processive, tout comme DSR-M Δ 2 (**Figure 17b**). Nous avons donc ainsi prouvé ce que nous supposions depuis 2006 : les chaînes atteignent une masse molaire gigantesque grâce à des zones d'ancrage (de la chaîne en cours d'élongation) présentes dans le domaine V qui sont ces fameuses poches à sucre.

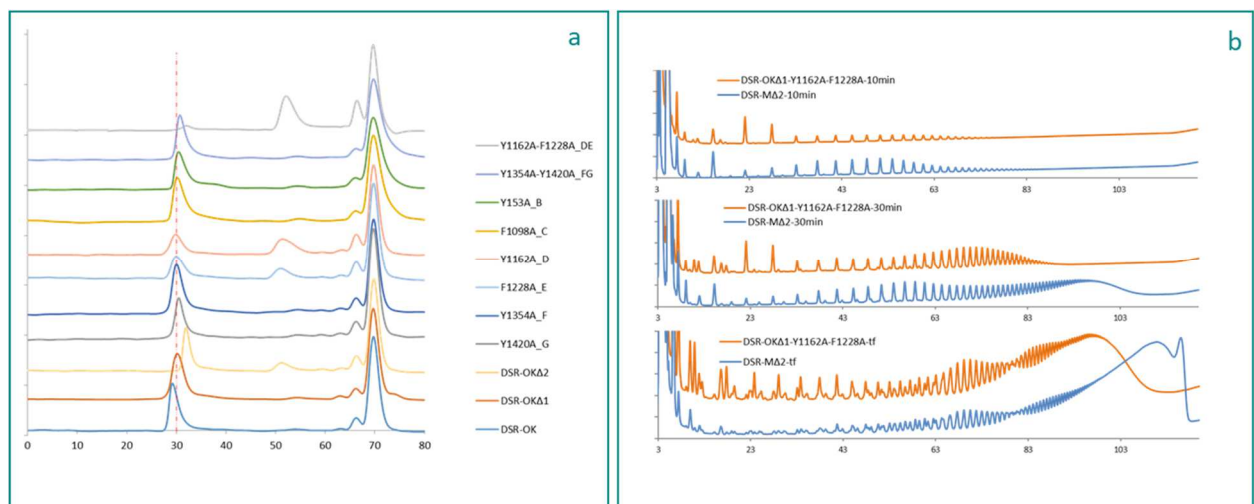


Figure 17. a. Profils HPSEC des dextranses synthétisés par les variants de DSR-OK à partir de 100 g/L de saccharose. Les simples et doubles mutants sur chacune des poches à sucres ont été réalisés à partir du variant DSR-S OK Δ 1. Notamment, le double mutant Y1162A-F1228A ne produit quasiment plus de dextrane de très haute masse molaire au profit d'un dextrane d'environ 13 kg/mol. **b.** Comparaison des profils HPAEC-PAD de suivis cinétiques réalisés lors de synthèses de dextranses par le double mutant Y1162A-F1228A de DSR-OK Δ 1 (profil orange, mutations dans les poches à sucres D et E) et de DSR-M Δ 2 (profil bleu) après 10 min, 30 min de réaction et consommation totale du substrat (292 mM de saccharose)

- iii) L'impact de ces simples mutations sur l'efficacité catalytique des variants varie nettement selon l'enzyme considérée : peu d'influence chez DSR-M Δ 2 (tous les variants conservent plus de 75% de l'activité spécifique), contre une influence majeure pour les variants de DSR-OK Δ 1 (conservation de 20% à 73% de l' A_i de l'enzyme parentale). A ce jour, et en l'absence de structure 3D d'enzymes processives comme DSR-OK ou DSR-S vardel Δ 4N, nous ne pouvons expliquer ce phénomène.
- iv) Certaines poches à sucres, possédant pourtant tous les déterminants structuraux d'une poche fonctionnelle (acides aminés aromatiques (F ou Y) + motif QxK), ne jouent aucun rôle dans la taille des produits formés. C'est le cas, par exemple, des poches F et G de DSR-OK Δ 1 ([Figure 17a](#)). Il semblerait donc que la localisation de la poche à sucre (ou sa distance par rapport au site actif) joue un rôle prépondérant, et qu'une coopération entre différentes poches puisse se produire.
- v) Tous les dextrans les plus petits produits au cours de cette étude, que cela soit par des simples ou doubles mutants de DSR-M Δ 2 ou DSR-OK Δ 1, ou la forme de DSR-M délétée de son domaine V, présentent une masse molaire moyenne d'environ 10-13 kg/mol à l'apex des pics d'analyses HPSEC. Curieusement, il s'agit de la même taille de produits que les dextrans obtenus par la forme la plus courte de DSR-S que j'avais construite au cours de ma thèse (en éliminant tous les motifs YG identifiables dans la séquence). A noter que, dans l'ensemble de ces travaux, la spécificité de liaison n'a jamais été impactée par les mutations ou troncatures effectuées.

De manière très schématique, il semblerait donc que le domaine V joue un rôle majeur dans la capacité –ou non- de la glucane-saccharase à synthétiser un polymère de taille supérieure à 10 kg/mol. On imagine que la masse molaire finale du produit dépendra du nombre de poches à sucre, mais aussi de leur localisation par rapport au site actif, qui dépend également de la forme allongée ou repliée du domaine V, et d'une potentielle dynamique de ce repliement. En effet, les analyses SAXS effectuées sur DSR-OK ne montrent qu'une forme allongée de l'enzyme (alors que GTF-180 peut adopter les deux repliements, et que seule la forme fer à cheval a été observée chez DSR-M) et cela doit affecter le positionnement spatial des poches. L'objectif sera, à l'avenir, de pouvoir jouer sur ces deux critères afin d'essayer de contrôler « à façon » la taille des polymères formés. **Cependant, il est clair que certains déterminants du site actif jouent également un rôle prépondérant.** Ainsi, il ne suffit malheureusement pas de remplacer le domaine V de DSR-M par son équivalent chez DSR-OK pour en faire une enzyme produisant des dextrans de très haute masse molaire. Nous avons tenté la construction de ce genre d'enzymes chimères à deux niveaux : soit en interchangeant les deux domaines V seulement, soit en interchangeant domaine IV et V (car il semblerait que la forme allongée ou repliée soit potentiellement due à la présence d'une hélice à l'extrémité du domaine IV), mais sans succès évident.

Il doit en effet y avoir des synergies entre les sites d'interaction avec les sucres accepteurs se situant dans la cavité du site actif (zones d'ancrage « primaires », oligosaccharides de taille > à 7 et petits dextrans) et les sites d'ancrage distants du domaine V. La première structure d'un mutant inactif de DSR-M en complexe avec un isomaltooligosaccharide dans le domaine B (DSR-M Δ 1 E715Q) a ainsi mis en évidence le rôle majeur d'un tryptophane dans une boucle propre à DSR-M, le W624, ainsi que celle d'un second tryptophane (W717) dans une moindre mesure. Ainsi, la mutation W624A empêche totalement l'enzyme de polymériser les unités glucosyle au-delà de 2,4 kg/mol (\approx DP15) ([Figure 18](#)).

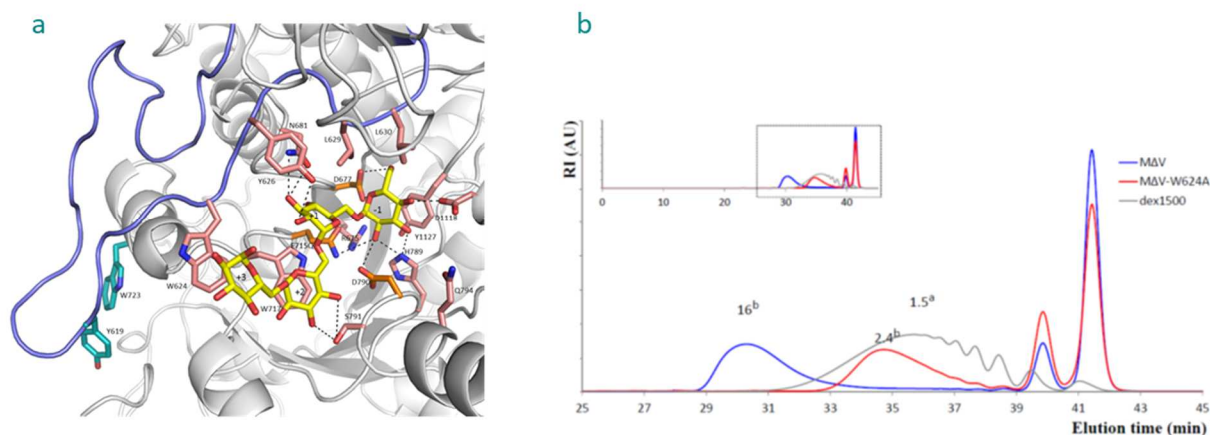


Figure 18. a-Structure cristalline de DSR-MD2-E715Q en complexe avec un isomaltotétraose dans le domaine catalytique. Les groupements indole des Trp624 et 717 forment une plateforme de stacking avec les deux premiers résidus glucosyle du sucre. Les résidus catalytiques sont représentés en orange. b- Profil HPSEC des dextrans produits par l'enzyme DSR-M Δ V (délétion du domaine V entier) et du simple mutant W624A de ce même variant. Les nombres 16 ; 2,4 et 1,5 correspondent aux masses molaires déterminées à l'apex des pics de chaque profil, et sont exprimées en kg/mol. Le dex1500 est un dextrane commercial d'environ 1,5 Kg/mol.

Cependant, cette boucle (Loop B2) n'est pas conservée dans les séquences des enzymes GH70, suggérant que les sous-sites accepteurs +n ou des zones d'ancrage des chaînes plus éloignées du site actif soient « protéine-dépendantes », comme nous le verrons dans le paragraphe suivant. A ce stade, seule l'obtention d'autres structures 3D d' α -transglucosylases en complexe avec des oligosaccharides de grande taille dans le site actif nous permettra d'avancer dans une meilleure compréhension des phénomènes observés en début de réaction, qui doivent aussi être fonction de la spécificité de liaison et/ou de la capacité de l'enzyme à plus ou moins polymériser les unités glucosyle jusqu'à former de très long polymères (polymérase *versus* branching sucrases). Néanmoins, l'identification des déterminants structuraux impliqués dans la taille des polymères produits par DSR-OK et DSR-M a donné lieu aux articles suivants :

- Claverie M., Cioci G., Vuillemin M., Monties N., Roblin P., Lippens G., Remaud-Simeon M. & Moulis C. **2017**. Investigations on the determinants responsible for low molar mass dextran formation by DSR-M dextranase. *ACS Catal.* 7, 7106–7119.
- Claverie M., Cioci G., Guillonnet M., Schörghuber J., Lichtenecker R., Moulis C., Remaud-Simeon M., Lippens G. **2019**. Futile encounter engineering of the DSR-M dextranase modifies the resulting polymer length. *Biochemistry*, 58(25): 2853-2859
- Claverie M., Cioci G., Bondy P., Vuillemin M., Remaud-Simeon M., Moulis C. **2020**. Processivity of dextranases synthesizing very high molar mass dextran is mediated by sugar-binding pockets in domain V. *J. Biol. Chem.* 295, 5602-5613

2.2. A la recherche de déterminants structuraux impliqués dans la spécificité de liaison de l'alternane-saccharase

Outre les travaux visant à identifier les déterminants structuraux gouvernant le mécanisme de polymérisation, nous souhaitons également investiguer plus en détail ceux impliqués dans la spécificité de liaison. Comme nous avons pu le voir au chapitre 1, nos découvertes de nouvelles α -

transglucosylases ainsi que l'effet de mutations ciblant le sous-site +1 décrites dans la littérature⁵⁴-laissaient bien entrevoir que la spécificité de liaison des enzymes GH70 devait reposer sur un mécanisme très subtil, et pas simplement sur la présence de quelques motifs conservés en aval des acides aminés catalytiques. Il était clair que l'analyse des structures primaires ne serait pas suffisante et que seule l'analyse de structures tridimensionnelles au cas par cas permettrait d'avancer dans la compréhension de cette sélectivité. Dans le cadre de la thèse de Manon Molina (2016-2019), nous avons choisi de nous intéresser à l'alternane-saccharase (ASR) de *Leuconostoc citreum* NRRL B-1355, **une enzyme qui a la particularité d'alterner liaisons α -1,6 et liaisons α -1,3 dans la chaîne principale du polymère**. De plus, l'ASR synthétise une population bimodale d'alternanes de haute (> 10⁶ g/mol) et de faible masse molaire (environ 10³ g/mol) alors que son domaine V est, en terme de séquence, 100% identique à celui de DSR-M. Il apparaissait donc évident que cette subtilité entre les deux enzymes reposait sur différents mode d'arrimage des chaînes dans le domaine catalytique des deux enzymes.

Afin d'obtenir des cristaux de l'ASR, nous avons adopté une stratégie équivalente à celle employée pour DSR-M, en tronquant le peptide signal et une grande partie du domaine C-terminal ne contenant pas de séquences de poches à sucres (variant ASR Δ 2, **Figure 19**). Une structure a été résolue à 2,8Å, comprenant la plus grande partie du domaine V décrite à ce jour et présentant, globalement, le même repliement caractéristique que DSR-M (forme de fer à cheval). Ensuite, **de nombreux essais de trempage des cristaux en présence d'une large variété d'oligosaccharides de diverses tailles et structures ont été réalisés afin d'essayer d'obtenir des complexes dans le site actif** (oligosaccharides de DP2 à DP12, de type oligodextranes ou oligoalternanes, et purifiés au laboratoire spécifiquement pour cette étude).

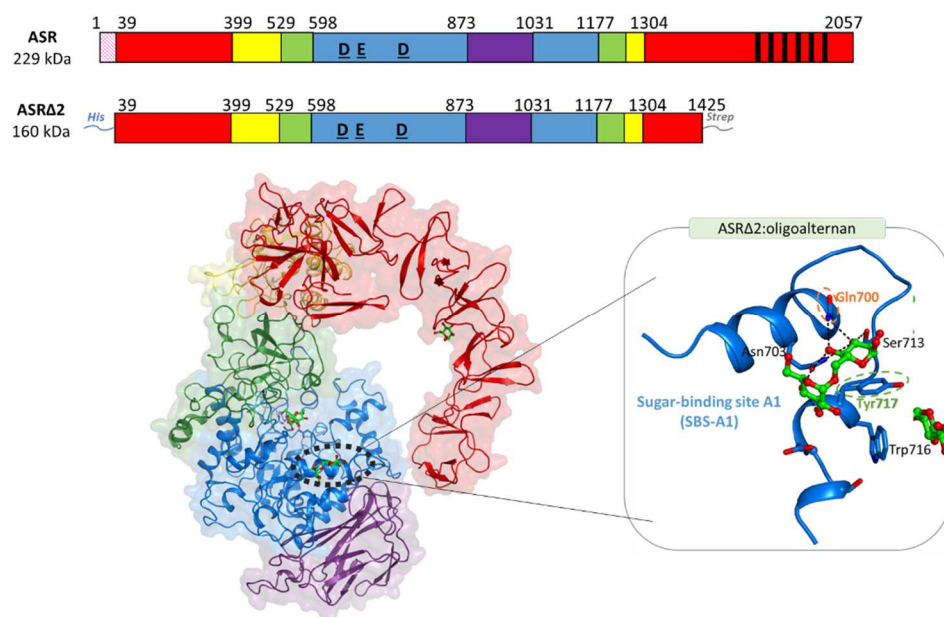


Figure 19. Représentation schématique de la forme ASR Δ 2 construite et sa structure tridimensionnelle résolue en complexe avec un oligoalternane de DP5 dans le domaine A (PDB : 6SYQ), soulignant l'importance d'une tyrosine de stacking (Y717) ainsi que d'une glutamine (Gln700) pour l'arrimage des chaînes d'alternane en cours d'élongation.

⁵⁴ Meng, X., Pijning, T., Dobruchowska, J.M., Gerwig, G.J., Dijkhuizen, L., 2015. Characterization of the functional roles of amino acid residues in acceptor binding subsite +1 in the active site of the glucansucrase GTF180 enzyme of *Lactobacillus reuteri* 180. *J. Biol. Chem.* 290, 30131–30141

Comme pour DSR-M Δ 2, des complexes ont été obtenus dans le domaine V, aussi bien avec des oligodextranes que des oligoalternanes de DP5 ou 6, confirmant ainsi le rôle des poches à sucre. Cependant, un autre complexe a révélé pour la première fois la présence d'un oligoalternane dans un site de liaison à la surface du domaine A et distant du site catalytique de l'enzyme (**Figure 19**). Dans ce site, nous avons mis en évidence l'implication de deux résidus (Tyr717 et Gln700) dans l'interaction avec la chaîne en cours d'élongation et dans la formation du polymère de haute masse molaire. Ce site de liaison aux sucres n'est absolument pas conservé chez les autres glucane-saccharases, et souligne donc bien la particularité de chaque polymérase où différents sites d'interaction situés dans les domaines A ou B pourraient jouer un rôle similaire. Pour aller plus loin, il nous faudrait disposer de complexes structuraux avec des polymères afin de pouvoir établir les éventuelles connexions.

Souhaitant pourtant investiguer en détail le mécanisme de l'alternance, une **étude de docking moléculaire** a été réalisée avec trois disaccharides accepteurs potentiels dans le site actif de l'enzyme : du maltose (Glc- α -4-Glc), de l'isomaltose (Glc- α -1,6-Glc) ou du nigérose (Glu- α -1,3-Glc) ainsi des trisaccharides tels que le panose, l'isomaltotriose ou un oligoalternane. **Couplés à des travaux de mutagenèse dirigée** (17 simples mutants et deux doubles mutants construits), cette étude a permis de **montrer l'importance majeure de deux sous-sites accepteurs différents** dans le prolongement des sous-sites -1 et +1 de l'enzyme. Le premier est défini par Trp675, un résidu du sous-site +2, qui oriente le positionnement de l'accepteur exclusivement vers la synthèse d'une liaison α -1,6. Le second site de liaison comprend Asp772 et Trp543, deux résidus définissant respectivement les sous-sites +2' et +3', qui sont critiques pour la formation d'une liaison α -1,3, et qui ne permettent pas l'accommodation d'un disaccharide déjà composé d'une liaison α -1,3 (exclusion de deux liaisons α -1,3 vicinales, ce qui a toujours été confirmé quelles que soient les analyses des produits de réaction réalisées). Ainsi, l'étude a permis d'établir les bases structurales de l'alternance, la spécificité de liaison semblant être contrôlée par le positionnement de l'accepteur dans l'un ou l'autre de ces sous-sites +2 ou +2' pour former une liaison α -1,6 ou α -1,3 respectivement (**Figure 20**).

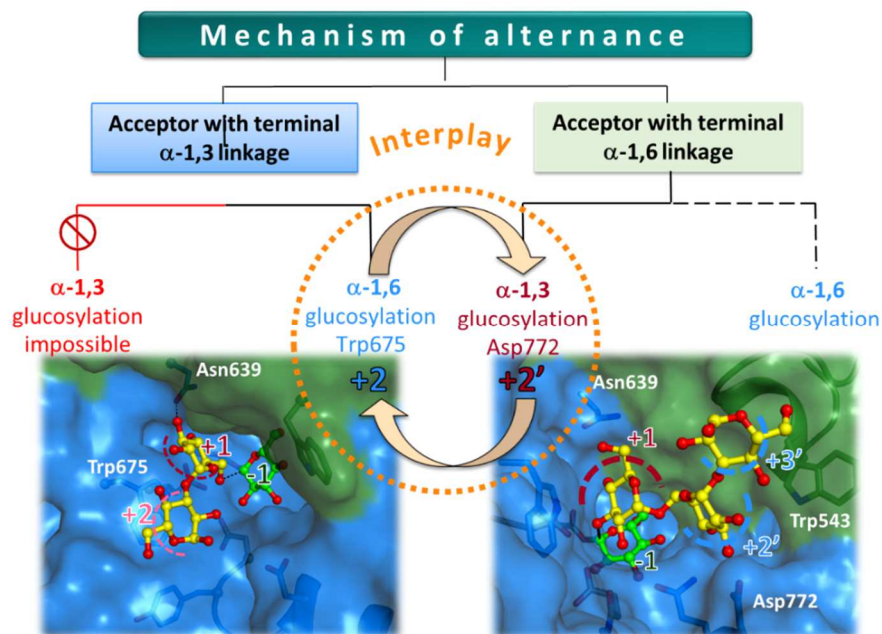


Figure 20. Illustration du mécanisme d'alternance proposé dans le cadre des travaux sur l'étude des déterminants moléculaires de l'ASR de *L. mesenteroides* NRRL B-1355 responsable de sa spécificité de liaison.

Ces travaux ont été publiés dans les articles suivants :

- **Molina M., Moulis C.,** Monties, N., Pizzut-Serin, S., Guieysse, D., Morel, S., Cioci, G., Remaud-Siméon, M. **2019.** Deciphering an Undecided Enzyme: Investigations of the Structural Determinants Involved in the Linkage Specificity of Alternansucrase. *ACS Catalysis*, 9 : 2222-2237.
- **Molina M., Moulis C.,** Monties, N., Guieysse, D., Morel, S., Cioci, G., Remaud-Siméon, M. **2020.** A specific Oligosaccharide binding site in alternansucrase catalytic domain mediates alternan elongation. *J. Biol. Chem.* 295, 9474-9489.

Pour finir, si l'acquisition de données structurales avaient pour objectif d'améliorer notre compréhension des déterminants structuraux impliqués dans la polymérisation ou la spécificité de liaison, il s'agissait aussi de pouvoir guider le modelage rationnel de ces enzymes pour leur faire acquérir des propriétés désirées, notamment pour les forcer à glucosyler des molécules non-naturelles. Deux exemples marquants seront ainsi présentés dans le chapitre suivant concernant le façonnage du site actif de certaines α -transglucosylases pour la synthèse d'oligosaccharides ou de glucoconjugués d'intérêt. Si l'évolution moléculaire dirigée -fondée sur des cycles itératifs de mutations aléatoires suivies de sélection ou de criblage des variants améliorés⁵⁵- aurait pu être une option, son succès repose toutefois sur une capacité de criblage à très haut-débit des variants générés. Comme cela sera détaillé plus loin, nous avons réussi à développer un crible sur milieu solide relativement efficace afin de ne conserver que les variants ayant gardé leur capacité à utiliser le saccharose comme substrat. Cependant, la deuxième étape nécessite toujours une détection de la glucosylation de l'accepteur cible, reposant encore jusqu'à très récemment sur une analyse des produits formés par des techniques conventionnelles par chromatographie en phase liquide, éventuellement couplée à un spectromètre de masse, donc à bas débit. Etant donné le temps relativement long de ces analyses (rarement inférieur à 10 min par analyse), nous avons très souvent privilégié les méthodes d'ingénierie semi-rationnelle qui permettent de limiter le nombre de variants à cribler.

2.3. Ingénierie des α -transglucosylases pour la glucosylation de molécules non-naturelles

- Synthèse chimio-enzymatique de glycobriques pour leur assemblage en molécules bioactives mimant le polysaccharide antigénique de *Shigella flexneri*

Ces travaux ont été réalisés ces quinze dernières années dans le cadre de différents projets ANR coordonnés par Laurence Mulard, de l'Unité de Chimie des Biomolécules de l'Institut Pasteur à Paris: le projet OptiGluc (2005-2008) auquel j'ai participé dans le cadre de mon post-doctorat, puis les projets Glucodesign (2009-2012) et CarbUnivax (2015-2019). Pour notre équipe, ils visent à créer de nouveaux outils de glucosylation qui interviendraient dans la synthèse de motifs antigéniques destinés à la formulation de vaccins contre différents serotypes de bactéries pathogènes du genre *Shigella*, extrêmement dévastatrices dans les pays du tiers monde. La shigellose -ou dysenterie bacillaire- est à l'origine d'environ un million de décès chaque année, essentiellement parmi les enfants en bas âge. La mise au point d'un vaccin contre cette maladie doit donc concilier à la fois des critères d'efficacité et de sécurité, et des critères économiques liés à son coût de développement⁵⁶.

⁵⁵ Turner NJ. 2009. Directed evolution drives the next generation of biocatalysts. *Nat Chem Biol.* 5(8): 567-573; Brustad EM; Arnold FH. 2011. Optimizing non-natural protein function with directed evolution. *Curr Opin Chem Biol.* 15(2): 201-210. Arnold F. 2018. Directed evolution: bringing new chemistry to life. *Angew. Chem. Int. Ed.* 57:4143-4148.

⁵⁶ Barel L-A, Mulard LA. 2019. Classical and novel strategies to develop a *Shigella* glycoconjugate vaccine: from concept to efficacy in human. *Hum Vaccin Immunother.* 15(6): 1338-1356.; Puzari M, Sharma M, Chetia P. 2018. Emergence of antibiotic resistant *Shigella* species: A matter of concern. *J Infect Public Health* 11: 451-454

Les vaccins « conjugués » reposent sur des oligosaccharides synthétiques mimant les déterminants antigéniques portés par les polysaccharides de surface des bactéries ou autres pathogènes. Ces derniers sont couplés à des protéines porteuses afin d'induire ou renforcer la réponse immunitaire (qui serait plus faible si la fraction sucre était injectée seule). Ils offrent aussi l'avantage d'être plus sûrs que des vaccins basés sur l'utilisation de souches atténuées, car définis chimiquement. De plus, si les rendements des voies de synthèse correspondants sont conséquents, leur coût de développement peut être significativement plus faible que des vaccins reposant sur l'extraction des fractions polysaccharidiques des LPS bactériens.

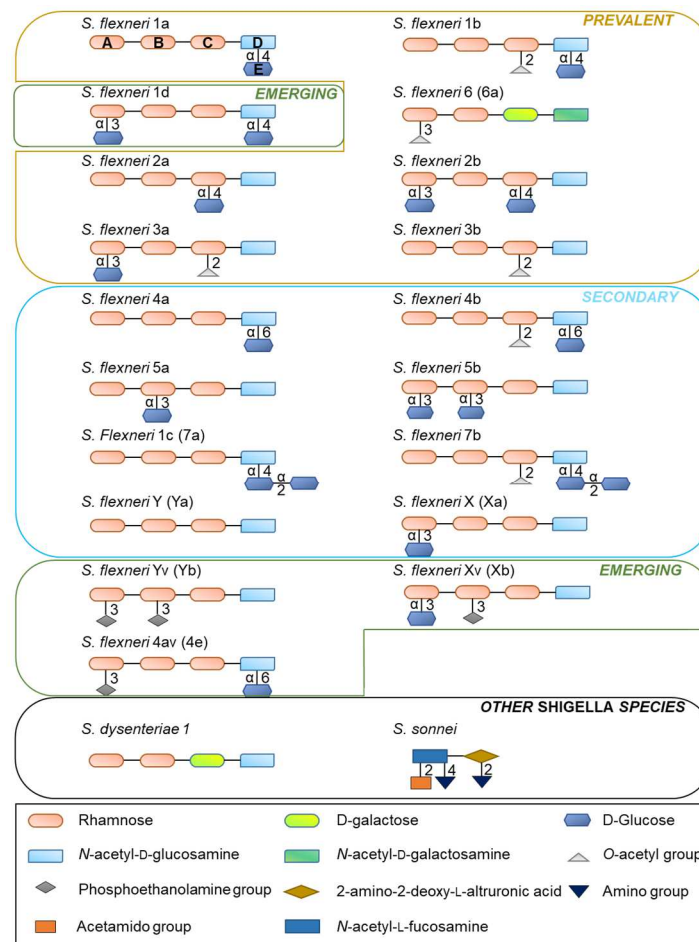


Figure 21. Illustration des structures des principales souches de *Shigella flexneri* représentant un motif antigénique lorsqu'elles sont répétées en triplet, ainsi que celles de *S. dysenteriae* 1 et *S. sonnei* à titre de comparaison.

La shigellose est en grande partie causée par l'espèce *S. flexneri*, dont le **motif antigénique minimal** correspond à un **triplet d'un motif pentasaccharidique**⁵⁷ constitué de 3 unités rhamnosyle et d'une unité N-acétylglucosamine dans la chaîne principale, ainsi que **d'une unité glucosyle dont la position varie en fonction des souches considérées** (Figure 21). Parmi cette diversité, les sérotypes 2a, 1b et 3a (SF2a, SF1b, SF3a) sont nettement prévalents, et donc ciblés en priorité.

L'un des principaux obstacles à une synthèse complète de ces pentasaccharides par voie chimique réside dans la glucosylation régiosélective 1,2-cis des résidus L-rhamnosyl ou N-acétylglucosamine.

⁵⁷ Phalipon A, Tanguy M, Grandjean C, Guerreiro C, Bélot F, Cohen D, Sansonetti PJ, Mulard LA. 2009. A synthetic carbohydrate-protein conjugate vaccine candidate against *Shigella flexneri* 2a infection. *J Immunol* 182: 2241–7.

Malgré des améliorations notables récentes⁵⁸, des inconvénients persistent tels que l'obtention de mélanges racémiques de stéréoisomères α/β ou la manipulation fastidieuse des groupements protecteurs qui nécessitent une étude au cas par cas pour chaque sérotype envisagé. Une voie entièrement chimique a toutefois été récemment développée pour la synthèse d'un pentadécasaccharide représentatif du sérotype SF2a, et un candidat vaccin est en cours d'évaluation⁵⁹. Cependant, l'OMS recommande aujourd'hui des approches multi-sérotypes pour le développement d'un vaccin contre la shigellose, afin d'assurer une couverture plus large contre les nombreuses souches responsables de la maladie. Sachant que les sérotypes de *S. flexneri* diffèrent notamment selon la position de la glucosylation, l'alternative proposée dès 2008 fut d'envisager la glucosylation *via* l'utilisation d' α -transglucosylases natives ou construites « à façon » pour développer un procédé original de synthèse chimio-enzymatique des haptènes 2a, 1b et 3a. *In vivo*, la glucosylation du LPS de *S. flexneri* est assurée par des glycosyltransférases (nommées Gtr) qui transfèrent le résidu glucosyle à partir de molécules d'undécaprényl- β -glucose présentes dans le périplasme. Malheureusement, il existerait une Gtr spécifique pour chaque type de glucosylation associée à un sérotype donné, et celles impliquées dans la glucosylation spécifique des sérotypes 1b et 3a restent inconnues⁶⁰. L'utilisation des α -transglucosylases actives sur le saccharose paraissait donc bien plus avantageuse à tester plutôt que d'aller rechercher les enzymes naturelles impliquées dans la glucosylation.

Travaux de post-doctorat (2006-2008)

Dans le cadre du projet OptiGluc, sur lequel j'avais été recrutée pour travailler en tandem avec Elise Champion (alors étudiante en thèse), l'objectif premier fut de travailler à la glucosylation spécifique de monosaccharides (N-acétylglucosamine et L-Rhamnose) protégés en position 1 par des groupements allyle ou méthyle afin de permettre leur élongation ultérieure par voie chimique. Le cahier des charges était précis : il fallait glucosyler le L-Rhamnose par une liaison α -1,3 (sérotype SF3a) ou une liaison α -1,4 (sérotype SF2a), et la N-acétylglucosamine par une liaison α -1,4 (sérotype SF1b). Aucune des enzymes natives disponibles dans notre collection de l'époque n'étant capable de reconnaître ces deux accepteurs cibles, il fallait entreprendre des travaux d'ingénierie. Le choix s'est porté sur l'amylosaccharase de *N. polysaccharea* (ASNp), enzyme de la famille GH13 et seule α -transglucosylase utilisant le saccharose dont la structure 3D était disponible à l'époque. En couplant des analyses d'arrimage moléculaire des accepteurs cibles (Méthyl-rhamnoside et N-acétyl glucosamine) dans le site actif de l'AS avec la comparaison de différentes séquences des enzymes GH13, Isabelle André, responsable du groupe de modélisation moléculaire et responsable de ces projets ANR dans notre équipe, a identifié 7 positions dans le site actif de l'ASNp directement impliquées dans la reconnaissance spécifique des accepteurs (sous-sites +1). Nous avons alors décidé de développer une stratégie d'ingénierie semi-rationnelle reposant sur : i) la construction par mutagenèse dirigée d'une banque de mono-mutants correspondant à la substitution des 7 résidus sélectionnés par les 19 autres acides aminés possibles, puis ii) une recombinaison raisonnée de ces mono-mutants en construisant pas à pas différentes banques de doubles mutants.

⁵⁸ Salamone S, Guerreiro C, Cambon E, André I, Remaud-Siméon M, Mulard LA. 2015. Programmed chemo-enzymatic synthesis of the oligosaccharide component of a carbohydrate-based antibacterial vaccine candidate. *Chem Commun* 51: 2581–2584.

⁵⁹ van der Put RMF, Kim TH, Guerreiro C, Thouron F, Hoogerhout P, Sansonetti PJ, Westdijk J, Stork M, Phalipon A, Mulard LA. 2016. A Synthetic Carbohydrate Conjugate Vaccine Candidate against Shigellosis: Improved Bioconjugation and Impact of Alum on Immunogenicity. *Bioconjug Chem* 27: 883–892 ; Cohen D, Atsmon J, Artaud C, Meron-Sudai S, Gougeon M, Bialik A, Goren S, Asato V, Ariel-Cohen O, Reizis A, et al. 2017. A phase I dose escalation study to assess the safety and immunogenicity of the SF2a-TT15 conjugate vaccine against *S. flexneri* 2a in healthy adult volunteers (Preliminary Results). In *Vaccines for Enteric Diseases*, Albufeira.

⁶⁰ Knirel YA, Sun Q, Senchenkova SN, Perepelov A V, Shashkov AS, Xu J. 2015. O-antigen modifications providing antigenic diversity of *Shigella flexneri* and underlying genetic mechanisms. *Biochemistry* 80: 901–14.

Parmi les 133 mono-mutants construits, plusieurs enzymes améliorées et de spécificité nouvelle pour la synthèse spécifique des motifs SF3a et SF1b ont été obtenues. **9 variants ont ainsi révélé une nouvelle spécificité vis-à-vis du L-Rhamnose, et 5 variants glucosylèrent la N-acétylglucosamine en α -1,4 à des taux supérieurs à 50%**. Deux candidats ont été retenus pour une production à plus grande échelle, purification et caractérisation fine de l'ensemble de leurs paramètres cinétiques. Ils ont ensuite été employés pour la synthèse de plusieurs grammes de chacun des disaccharides.

Cependant, l'efficacité catalytique des mutants vis à vis du saccharose ayant été largement altérée par l'introduction d'une simple mutation, nous avons choisi d'entreprendre une exploration plus approfondie du sous-site +1 de l'ASNp afin de rechercher des effets synergiques entre différentes mutations. Nous avons alors développé une méthode de criblage adaptée au triage de bibliothèques de grande taille qui repose sur une **méthode colorimétrique en milieu solide des mutants ayant gardé leur capacité à utiliser le saccharose comme substrat (Figure 22)**. Cette technique de criblage, basée sur une acidification du milieu lorsque le fructose libéré est consommé par les cellules d'*E. coli*, a depuis été réadaptée pour le criblage de bibliothèques de la famille GH70 car elle permet de réduire de 90% le nombre de variants à tester sur la glucosylation spécifique des molécules acceptrices (criblage HPLC).

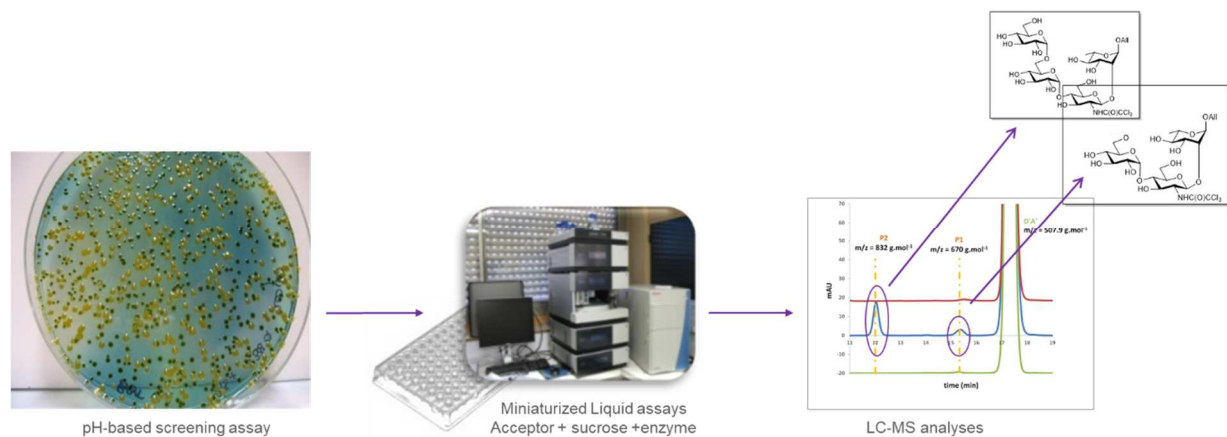


Figure 22. Méthodologie développée dans le cadre des projets ANR Optiglu et Glucodesign pour le criblage des bibliothèques de variants de l'ASNp : criblage des mutants ayant gardé la capacité de reconnaître le saccharose comme substrat par test colorimétrique sur milieu solide, puis réactions d'accepteurs en format miniaturisé et analyses par LC-MS des produits formés (présenté ici pour la glucosylation des disaccharides ciblés dans le projet Glucodesign).

Ainsi, sur les 200 000 clones générés, 30 double-mutants ont été améliorés pour la glucosylation de l' α -allyl N-acétyl-D-glucosamine. Parmi eux, 3 double-mutants ont été finement caractérisés car ils présentent une spécificité accrue à la fois pour le saccharose et l'accepteur cible : augmentation d'un facteur 8 de l'efficacité catalytique envers le saccharose comparée à l'enzyme sauvage, et **augmentation jusqu'à un facteur 400 de l'efficacité catalytique envers l'accepteur**. Ces travaux ont fait l'objet de deux dépôts de brevets (WO2009112951 (A2) et WO2009112950 (A2)) ainsi que trois publications :

- Champion E., **Moulis C.**, Morel S., Mulard L.A., Monsan P., Remaud-Siméon M., André I. 2010. A pH-based high-throughput screening of sucrose-utilizing transglucosidases for the development of enzymatic glucosylation tools. *ChemCatChem*. 2(8): 969-975.
- Champion, E., André, I., **Moulis, C.**, Boutet, J., Descroix, K., Morel, S., Monsan, P., Mulard, L.A., Remaud-Siméon, M., **2009**. Design of alpha-transglucosidases of controlled specificity for programmed chemoenzymatic synthesis of antigenic oligosaccharides. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 7379–7389.
- Champion, E., Guérin, F., **Moulis, C.**, Barbe, S., Tran, T.H., Morel, S., Descroix, K., Monsan, P., Mourey, L., Mulard, L.A., Tranier, S., Remaud-Siméon, M., André, I., **2012**. Applying pairwise combinations of amino acid

mutations for sorting out highly efficient glycosylation tools for chemo-enzymatic synthesis of bacterial oligosaccharides. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 18677–18688

Malheureusement, l'élongation par voie chimique des disaccharides produits (pour la synthèse du motif pentadecasaccharidique final) s'est avérée beaucoup plus difficile que ce qui avait été envisagé initialement. Dans les projets ANR suivants, l'objectif fut alors de s'attaquer directement à des molécules acceptrices plus grandes : i) des disaccharides dans le cadre du projet Glucodesign, puis ii) directement le tétrasaccharide mimant la totalité du squelette linéaire du motif répété dans le dernier projet.

Projets Glucodesign et CarbUnivax

Dans le cadre du projet Glucodesign, l'ingénierie de *ASNp* a été poussée jusqu'à rendre l'enzyme capable de reconnaître le disaccharide N-trichloroacétyl-Glucosamine $\beta 1 \rightarrow 2$ -L-rhamnopyranosyl allylé en position 1. Pour cela, différents outils de modélisation moléculaire et de design des protéines assisté par ordinateur (outils de « Computational Protein Design », CPD) ont été utilisés par les modélisateurs moléculaires de l'équipe. Cela permis, tout d'abord, de cibler 23 positions du site actif de l'*ASNp* afin de permettre l'arrimage du disaccharide dans le cœur catalytique, puis de proposer un nombre limité de mutations (1 à 3) sur chaque position afin de restreindre la taille de la librairie à construire à environ 27 000 variants. En effet, l'accepteur ne pouvait pas être obtenu en quantité suffisante pour se permettre de cribler des librairies de taille supérieure à quelques dizaines de milliers d'enzymes. La librairie a alors été construite par assemblage de produits PCR (les mutations à introduire étaient portées par des mix d'oligonucléotides servant d'amorces). Le criblage révéla que seuls 0,1% des variants générés avaient gardé leur capacité à utiliser le saccharose comme substrat, ce qui reste toutefois un bon score au regard du nombre de mutations introduites. Un variant (porteur de 7 mutations dans les sous-sites de liaison +1 et +2) a été détecté comme capable de glycosyler le disaccharide en position α -1,4 de la N-acétylglucosamine (**Figure 23a**). Bien que les rendements de glycosylation soient très faibles, la spécificité de liaison correspondait bien au motif ciblant le sérotype SF1b. Il aurait alors fallu poursuivre l'ingénierie de ce variant afin d'améliorer les rendements.

Cependant devant les difficultés d'ingénierie de l'AS, la collection d' α -transglycosylases de la famille GH70 disponible à l'époque a également été testée sur ce disaccharide, ainsi que sur un second disaccharide, le L-rhamnopyranosyl $\beta 1 \rightarrow 4$ N-trichloroactelyl-Glucosamine (**Figure 23b**). Curieusement, l'enzyme GBD-CD2 s'est avérée particulièrement efficace pour reconnaître ce deuxième disaccharide, glycosylant le résidu rhamnopyranosyle *via* la formation d'une liaison α -1,4 (alors qu'elle ne reconnaissait pas les monosaccharides). En jouant sur les conditions réactionnelles (ratio saccharose/accepteur et masse sèche totale), un rendement vertigineux **de 94% de glycosylation a pu être obtenu, ciblant le motif minimal du sérotype SF2a**. Plusieurs grammes de trisaccharide ont alors été fournis à l'Institut Pasteur pour poursuivre l'élongation du motif.

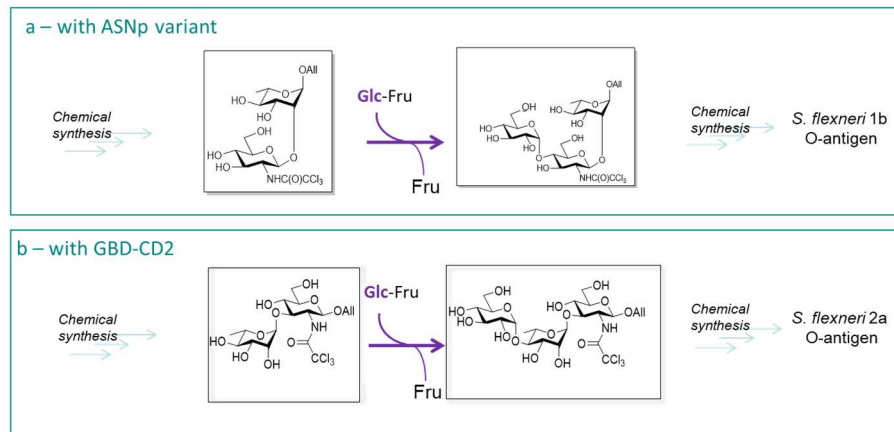


Figure 23: Représentation des deux disaccharides protégés utilisés dans le cadre du projet ANR Glucodesign et des deux trisaccharides d'intérêts produit par un variant de l'ASNp (a) ou l'enzyme GBD-CD2 sauvage (b).

Malgré tout, l'élongation du trisaccharide s'est à nouveau avérée délicate par voie chimique. Entre temps, les premières structures 3D d'enzymes de la famille GH70 avaient pu être résolues, notamment celle de GBD-CD2 Δ N123 (en 2012), permettant ainsi d'envisager son remodelage rationnel. De plus, les premières enzymes de branchement naturelles de la famille GH70 venaient d'être découvertes dans l'équipe. Nous avons alors décidé, dans le cadre du projet CarbUnivax, de tenter la glycosylation directe du tétrasaccharide composé de 3 unités rhamnosyle et d'une N-acétylglucosamine. Ces travaux constituèrent le projet de thèse de Mounir Benkoulouche, que j'ai co-cadré avec Isabelle André et Magali Remaud-Siméon entre 2016 et 2019.

Une de nos difficultés majeures, au cours de ce projet, fut la disponibilité au compte-goutte du tétrasaccharide accepteur, toujours en quantités très limitées (moins de 800 mg au total sur les 3 ans) car les voies de synthèses de ce substrat étaient développées à l'Institut Pasteur en parallèle de nos travaux. De plus, ce substrat – qui comporte un groupement allyle en position 1 et un groupement trichloroacetamide en position 2 de la N-acétylglucosamine ainsi qu'un groupement chloroacétyle en position 2 du résidu rhamnosyle adjacent (**Figure 24a**) – s'est avéré peu stable au pH optimal de fonctionnement des enzymes GH70 (pH 5,75) et très peu soluble. Nous avons donc dû dans un premier temps trouver des conditions favorables à la réaction, miniaturiser les essais sur des volumes de 10 μ L maximum, et limiter fortement la taille des bibliothèques d'enzymes à cribler.

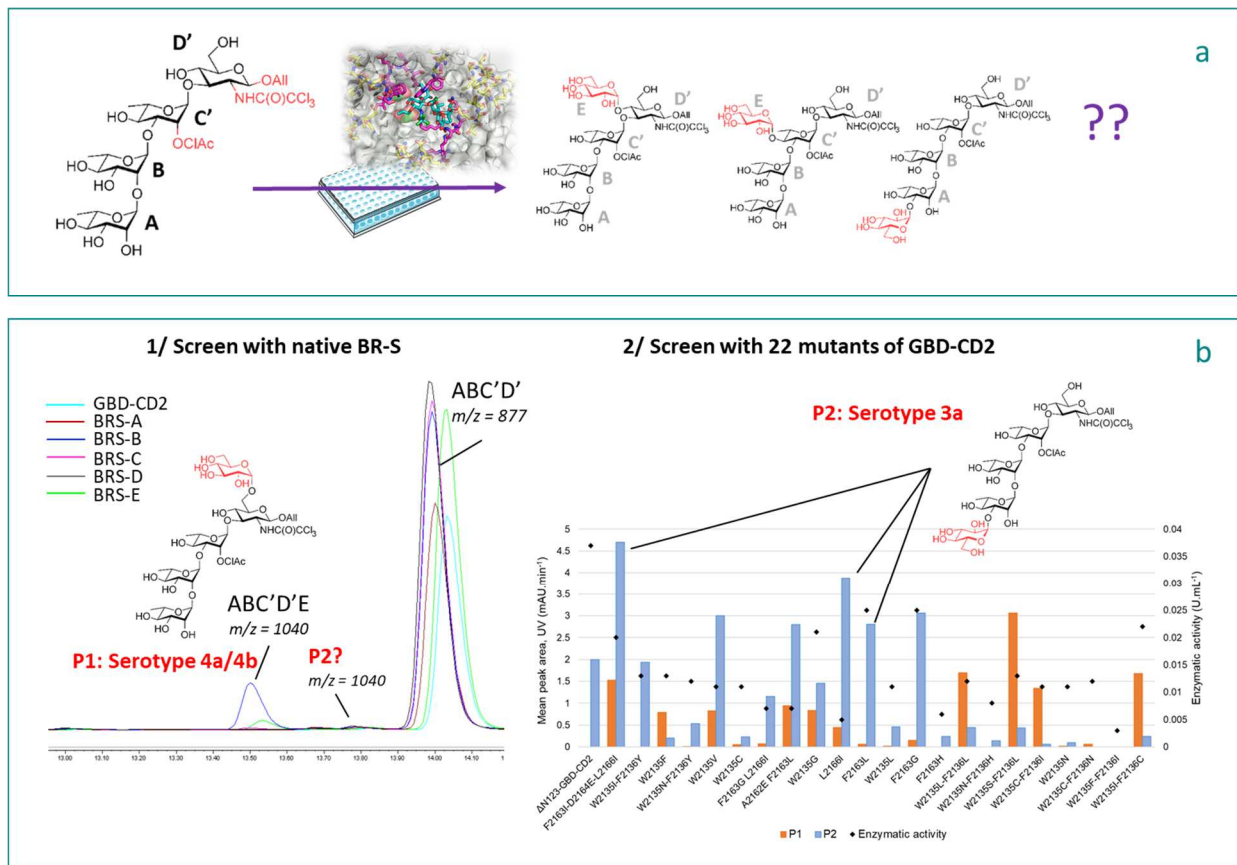


Figure 24. a- Structure du tétrasaccharide protégé utilisé dans le cadre du projet CarbUnivax ainsi que des trois pentasaccharides visés après glucosylation enzymatique, représentatif des glycoconjugués mimant les sérotypes SF1a/b, SF2a et SF3a de *S. flexneri*. b- Résultats du criblage obtenus avec les enzymes de branchement naturelles ainsi que GBD-CD2 et une librairie de 22 mutants de cette dernière. Les structures des deux principaux pentasaccharides (P1 et P2) produits au cours de l'étude, qui ont été résolues, sont représentées.

Le premier criblage reposa sur la collection d'enzymes de branchement disponibles au début des travaux, à savoir 6 enzymes issues de la diversité naturelle, l'enzyme GBD-CD2 ainsi qu'une petite librairie de 22 double mutants de cette dernière ayant été construite afin de favoriser la glucosylation de flavonoïdes. Dans cette librairie, les résidus W2135, F2136, F2163 et L2166, appartenant au domaine B de l'enzyme et impliqués dans les sous-sites accepteurs +1,+2 et +3, avaient été ciblés dans le but de gagner de l'espace pour mieux accueillir les flavonoïdes encombrants (voir paragraphe suivant). Nous avons donc émis l'hypothèse que ces mêmes mutations pourraient être favorables à l'accommodation du tétrasaccharide porteur de groupements protecteurs volumineux. Après optimisation des conditions de réaction, nous avons eu la surprise de constater que quasiment toutes ces enzymes pouvaient reconnaître au moins partiellement le tétrasaccharide. Selon les variants et les conditions réactionnelles, deux produits mono-glucosylés ont été majoritairement obtenus, mais nous avons également pu constater la présence d'au moins un autre pentasaccharide à l'état de trace tout comme certains composés porteurs d'au moins 6 unités glucosyle. **Avec un taux de conversion de 31%, l'enzyme BRS-B s'est avérée être -de loin- celle qui permettait la meilleure conversion de l'accepteur en pentasaccharide.** Malheureusement, après production, purification et détermination de la structure du produit par RMN, il s'est avéré correspondre motif minimal du sérotype 4a/4b (glucosylation en α -1,6 du résidu N-acétylglucosamine), un sérotype non prévalent. Cependant, le monomutant F2163G de l'enzyme GBD-CD2 nous a permis de produire en quantité suffisante le second pentasaccharide identifié dans la plupart des essais, qui s'est avéré correspondre au motif minimal du sérotype prévalent SF3a (glucosylation en α -1,4 sur le résidu rhamnosyle en position A, [Figure 24b](#)). De

plus, cette étude montra que les mutations introduites dans le site actif de GBD-CD2 favorisaient la glucosylation vers l'une ou l'autre des extrémités du tétrasaccharide (produits P1 et P2, [Figure 24b](#)) et des études de dynamique moléculaire ont permis d'identifier les déterminants susceptibles d'intervenir dans le contrôle de cette régiosélectivité.

Un brevet (n° US2020165285 (A1)) et deux publications sont issues de ce travail :

- [Benkoulouche M.](#), Hu Z., Barel L.A., Le Heiget G., Ben Imeddourene A., Le Guen Y., Monties N., Guerreiro C., Remaud-Siméon M., **Moulis C.**, André I., Mulard L. **2020**. A convergent chemoenzymatic strategy to deliver a diversity of *Shigella flexneri* serotype-specific O-antigen segments from a unique lightly protected tetrasaccharide core. *J. Org Chem.* DOI: 10.1021/acs.joc.0c00777
- [Benkoulouche M.](#), Ben Imeddourene A., Barel L.A., Barbier H., Mulard I., Remaud-Siméon M., **Moulis C. & André I.** **2021**. Redirecting substrate regioselectivity using engineered Δ N123-GBD-CD2 branching sucrases for the production of *S. flexneri* 3a, 4a and 4b pentasaccharide repeating units. *Sci. Reports* 11: 2474.

Dès lors, ces travaux soulignaient le potentiel de l'ingénierie des enzymes de branchement GH70 pour diversifier –à façon- la glucosylation du squelette tétrasaccharidique et contrôler la régiospécificité de la réaction. Nous avons donc décidé d'envisager le redesign du site actif de l'enzyme BRS-B par ingénierie semi-rationnelle afin d'essayer de forcer la glucosylation en position 4 de la glucosamine (unité D), en position 4 du rhamnosyle C, ou en position 3 du rhamnosyle A de l'accepteur. Notre choix s'est porté sur cette enzyme puisqu'elle permettait les meilleurs taux de conversion de l'accepteur (voir [Figure 24a](#)). La stratégie de design assisté par ordinateur (CPD) envisagée était équivalente à celle développée au cours du projet Glucodesign, mais nous ne disposions pas de la structure cristallographique de l'enzyme pour guider l'étude. Un modèle par homologie a donc été construit par les modélisateurs de l'équipe (basé sur la structure 3D de GBD-CD2, 49% identité de séquences au global, 60% au niveau du site actif). Ainsi, 23 positions situées dans les sous-sites +1 à +4 ont été retenues et les approches de design ont conduit à proposer 49 séquences comprenant de 9 à 15 mutations. Les acides aminés ciblés étant relativement distants les uns des autres dans la séquence de BRS-B, 55 fragments de gènes synthétiques ont été commandés et réintégréés à façon dans la construction plasmidique parentale (techniques de Gibson Assembly) afin de construire la librairie. Malheureusement, les mutations générées ont eu un impact majeur sur la capacité des enzymes à reconnaître le saccharose comme substrat, les 49 mutants ne conservant que moins de 1% de l'activité initiale de BRS-B sur saccharose. De plus, la majorité des protéines se retrouvèrent produites sous forme de corps d'inclusion, quels que soient le variant envisagé et les conditions d'expression testées (température, conditions d'auto-induction, co-expression de chaperones), laissant supposer un mauvais repliement des protéines. Pour autant, en utilisant des techniques ultra-sensibles nécessitant très peu de substrat, comme la chromatographie couplée à la MS-MS (collaboration David Ropartz, plateforme BIBs, INRAE Nantes), nous avons montré que **ces mutants produisaient jusqu'à six produits mono-glucosylés différents sur les huit positions possibles**, dont une glycobrique représentative du sérotype 5a de *S. flexneri*.

En parallèle de ces travaux, Mounir s'est attaché à identifier en dernière année de thèse les conditions de cristallogénèse permettant de résoudre la structure cristallographique d'une forme tronquée de l'enzyme BRS-B (BRS-B Δ 2, 180 acides aminés délétés à l'extrémité N-terminale). Or, l'obtention de cette structure a montré plusieurs divergences notables avec le modèle construit par homologie, au niveau de boucles impliquées dans le site actif de l'enzyme. Malheureusement, les boucles entourant le site actif des enzymes GH70 sont désormais connues pour être très flexibles (données acquises au fur et à mesure du nombre de structures 3D résolues), et l'idéal serait aujourd'hui de pouvoir disposer de la structure 3D de BRS-B directement en complexe avec l'accepteur d'intérêt. Cela permettrait d'envisager un nouveau travail de design des mutants les plus prometteurs à partir des outils de CPD.

Néanmoins, les mutants générés auront confirmé le potentiel indéniable de l'ingénierie de ces enzymes pour aller forcer la glycosylation « à façon » d'accepteurs non-naturels.

De plus, nous espérons que la résolution de la structure 3D de BRS-B facilitera l'identification des éléments structuraux impliqués dans l'activité de branchement au détriment de celle de polymérisation. En effet, à ce jour, tous les travaux entrepris en analysant la structure 3D de GBD-CD2 -ou en comparant les structures primaires des différentes enzymes de branchement identifiées- n'apportent pas de réponses claires⁶¹. Nous espérons que le nombre croissant de résolutions de structures 3D, auxquelles nous contribuons fortement (DSR-M, ASR, BRS-B), aidera ces études de relations Structure/Fonction et nous permettra de guider le design de catalyseurs « haute-couture » qui permettraient de contrôler, à façon, la teneur et la variété des liaisons formées entre les unités glucosyle, tout comme la reconnaissance efficace de molécules acceptrices de plus en plus complexes et éloignées des accepteurs naturels. Pour cela, il nous faudra cependant réussir à obtenir le maximum de structures en complexes avec des oligosaccharides ou des accepteurs non naturels dans le site actif, et piéger des molécules de taille plus importante, ce qui est encore malheureusement trop peu fréquent.

○ Ingénierie de GBD-CD2 pour la glycosylation de flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires des plantes qui partagent une même structure de base formée par deux cycles benzéniques et un troisième cycle pyrone. Ils forment une classe de composés polyphénoliques omniprésents dans les plantes, où ils se trouvent à la fois sous forme libre, mais aussi le plus souvent sous forme de glycosides. Ils sont notamment responsables de la couleur variée des fleurs et des fruits, mais interviennent également de manière importante dans la lutte des plantes contre différents stress (exposition aux UV ou au froid, blessures, carences nutritionnelles, défenses contre des herbivores ou des pathogènes). Ils sont une source importante d'antioxydants dans notre alimentation, mais présentent aussi bon nombre d'autres propriétés : antibactériennes, antivirales, anti-inflammatoires, anti-agrégants plaquettaires, anti-tumorales, par exemple⁶². Lorsque ces flavonoïdes sont sous forme d'hétérosides, cela augmente généralement leur solubilité, leur stabilité et par extension leur biodisponibilité, point critique pour des applications biomédicales.

Dans le cadre de la thèse de Yannick Malbert (2011-2014), nous nous sommes intéressés à la glycosylation enzymatique d'une librairie de flavonoïdes fortement insolubles en milieu aqueux. Pour cela, nous avons entrepris l'ingénierie semi-rationnelle de l'enzyme GBD-CD2 Δ N123. A cette époque, il s'agissait de la seule enzyme de branchement connue et dont la structure 3D était disponible. Dans un premier temps, Yannick a travaillé à l'optimisation de l'expression recombinante de GBD-CD2 sous forme soluble (voir détails Chapitre 3, p61), de manière à pouvoir envisager le criblage à moyen-débit des bibliothèques qui seraient générées. Ensuite, une étude de modélisation moléculaire a été entreprise afin d'identifier les acides aminés des sous-sites accepteurs +1, +2 et +3 limitant l'arrimage de la quercétine, un flavonoïde toutefois capable de rentrer dans le site actif de l'enzyme et d'être partiellement glucosylé. Deux bibliothèques de 1500 variants, ciblant les positions W2135-F2136 et F2163-L2166, ont été créées en remplaçant les acides aminés initiaux par des acides aminés polaires, chargés ou hydrophobes (mutagénèse à saturation avec codons dégénérés NDT). Les variants générés ont alors

⁶¹ Brison Y., Malbert Y., Caplicki G., Mourey L.; Remaud-Simeon M, Tranier S. 2016. Structural insights into the carbohydrate binding ability of an α -1,2 branching sucrase from GH family 70. *J. Biol Chem.* 291: 7527-7540 + Unpublished results.

⁶² Del Rio, D. et al. 2013. Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 1818–1892; Lu, M.-F., Xiao, Z.-T. & Zhang, H.-Y. 2013. Where do health benefits of flavonoids come from? Insights from flavonoid targets and their evolutionary history. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 434, 701–704.

été criblés sur milieu solide pour tester leur capacité à utiliser le saccharose seul, ou en présence de saccharose et de quercétine (en format microplaques 96 puits) afin de ne conserver que les variants glucosylant l'accepteur avec un niveau équivalent ou amélioré par rapport à l'enzyme sauvage.

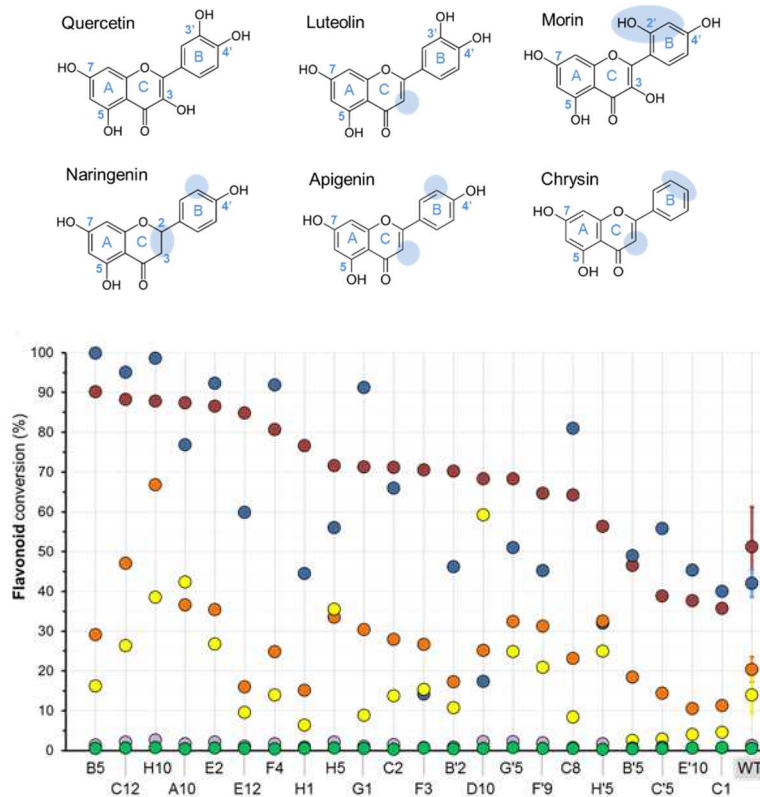


Figure 25. Structure des 6 flavonoïdes retenus (principales différences structurales avec la quercétine surlignées en bleu) et taux de conversion obtenus pour les 22 mutants lors de réactions en présence de 292 mM de saccharose et 5 mM de flavonoïde (rouge : quercétine; bleu : lutéoline; orange : morine; jaune : naringénine; violet : apigénine; vert : chrysin).

De cette banque de variants neutres, 22 mutants ont été sélectionnés afin de tester leur activité de promiscuité pour la glucosylation de 5 autres flavonoïdes de structures variées : lutéoline, morine, naringénine, apigénine et chrysin. Les 3 premiers accepteurs (lutéoline, morine et naringénine) se sont avérés très bien reconnus par les variants, avec des rendements de glucosylation allant de 30 à 90% (**Figure 25**). De multiples produits de glucosylation ont été obtenus, allant de composés mono-, di- ou tri-glucosylés selon les variants et les accepteurs utilisés, bien que nous ne soyons pas allés jusqu'à la détermination précise des structures obtenues. Seuls l'apigénine et la chrysin n'ont pu être reconnues. Cette approche originale relève l'intérêt d'aller créer des petites bibliothèques plateformes sur les sous-sites accepteurs et ne pas hésiter à les tester ensuite sur toute une batterie de molécules acceptrices exogènes, même s'il ne s'agit pas directement de la molécule ciblée lors du design moléculaire initial.

Ces travaux ont fait l'objet de la publication suivante :

- **Malbert Y., Moulis C.,** Brison Y., Morel S., André I., Remaud-Simeon M. **2018.** Engineering a branching sucrose for flavonoid glucoside diversification. *Sci Rep.* 8(1):15153.

En conclusion, une compréhension plus fine -à l'échelle moléculaire- des mécanismes catalytiques de quelques « enzymes modèles » aura permis d'affiner notre compréhension de certains facteurs structuraux impliqués dans leur spécificité, ainsi que de moduler ou optimiser leurs

performances par ingénierie. Or, les variants générés au cours de ces travaux augmentent aussi de manière significative notre collection d'outils enzymatiques disponibles au laboratoire, en complément des enzymes découvertes dans la diversité naturelle. Néanmoins, pour faciliter le transfert de technologie et l'utilisation de ces enzymes à l'échelle industrielle, d'autres aspects de recherche ont également été développés ces dernières années, que nous allons aborder au cours d'un dernier chapitre. Notamment, nous avons cherché à : i) optimiser la production hétérologue de ces enzymes à la fois chez *E. coli* et dans d'autres systèmes bactériens ; ii) évaluer les performances applicatives des dextranses de très haute masse molaire pour répondre à des demandes d'industriels ; iii) évaluer l'impact économique *et environnemental* de différents procédés envisagés pour la production des dextranses de masse molaire contrôlée avec l'enzyme DSR-M ; et enfin iv) développer des voies originales pour la synthèse de nouvelles architectures d'oligo ou polymères de glucose.

3. Approches développées pour l'utilisation des nouveaux oligo & polymères de glucose en industrie

3.1. Comment augmenter l'expression hétérologue des α -transglucosylases de la famille GH70 ?

- Tentatives d'expression dans des systèmes GRAS

Pour toutes les applications visant l'industrie agro-alimentaire (ingrédients prébiotiques ou agents de texture, par exemple), il serait préférable que nos enzymes GH70 soient produites dans des **systèmes d'expression hétérologue au statut GRAS** (Generally Recognized As Safe) délivré par la FDA américaine. Bien que nous ayons nettement amélioré les conditions de purification de ces protéines, qui permettent aujourd'hui d'éviter de travailler avec des extraits cellulaires d'*E. coli*, les procédures d'autorisation de mise sur le marché seraient nettement facilitées si la souche productrice n'était pas un coliforme. Au cours de trois projets successifs, nous avons donc tenté d'exprimer les α -transglucosylases de la famille GH70 soit i) dans la souche industrielle *L. mesenteroides* NRRL B-512F (projet ANR Engel), ii) dans *Lactococcus lactis* (projet TWB Apposa) ou iii) dans *Bacillus subtilis* (projet TWB Subtilcarbs). Notre objectif était à la fois de créer **une « souche plateforme »** dans laquelle nous pourrions exprimer facilement l'ensemble des enzymes de notre collection selon le même protocole, mais également de **les produire sous forme extracellulaire**, ce qui est inenvisageable en restant chez *E. coli*.

Le projet ANR Engel a été réalisé entre 2012 et 2014 en collaboration avec la société Cellectis, jeune société à l'époque pionnière dans le domaine de l'édition de génomes, et spécialiste de l'ingénierie des méganucléases et Talens. Les méganucléases sont des enzymes de restriction caractérisées par un site de reconnaissance de très grande taille (environ 20 pb). Les Talens, quant à elles, sont des enzymes de restriction artificielles générées par la fusion d'un domaine de liaison à l'ADN (Tale) avec un domaine de clivage issu d'une endonucléase. Au cours du projet, nous avons séquencé le génome de la souche *L. mesenteroides* NRRL B-512F afin de construire les enzymes de restriction qui permettraient –dans un premier temps– l'extinction des gènes codants pour les enzymes utilisatrices du saccharose. La souche B512F ne comporte finalement que 4 gènes à éteindre, ce qui est peu au regard d'autres souches de la même famille. Dans un deuxième temps, les ciseaux moléculaires devaient être réutilisés pour introduire à façon un gène d' α -transglucosylase ingénierée dans cette souche châssis, sur le locus initial du gène *dsrS* afin d'utiliser son système d'expression et de sécrétion. Durant le projet, nous avons mis en place les outils moléculaires nécessaires à l'ingénierie de la souche, en développant notamment des vecteurs d'expression pour les méganucléases et Talens, les marqueurs de sélection, et les conditions de transformation. Ces travaux furent longs et fastidieux, mais développés avec succès. Cependant, une fois les constructions obtenues, la mise en évidence de l'action spécifique de coupure d'un Talen ou d'une méganucléase dans le gène cible n'a pu être vérifiée. Nous obtenions à chaque fois des colonies « mosaïques », certaines cellules de la colonie présentant une inactivation du gène comme attendue (vérifiée par séquençage), mais pas toutes. Et toutes nos tentatives suivantes pour isoler les bactéries ne produisant plus de polymère des cellules non modifiées se sont avérées infructueuses, et le projet fut abandonné.

Entre 2014 et 2015, nous avons tenté d'exprimer les α -transglucosylases dans la souche *Lactococcus lactis*, dans le cadre d'un projet précompétitif TWB porté par nos collègues du TBI spécialistes de cette bactérie (Sébastien Nouaille et Mureil Cogaïn). L'objectif majeur était d'étudier l'influence de la stabilité des ARNm sur les niveaux d'expression recombinante de deux α -transglucosylases (l'AS de *N. polysacchara* (GH13) et la BRS-B de *L. citreum* NRRL B-742 (GH70)) dans deux microorganismes : *E. coli* et *L. lactis*. Nous avons construit un vecteur navette *E. coli*/*L. lactis* qui devait permettre

l'expression dans les deux souches, et la fusion des gènes d'intérêt à une dizaine d'étiquettes 5'-UTR décrites pour moduler le temps de demie-vie des messagers auxquels elles se rapportent (données de stabilome). Aucun résultat intéressant n'a été obtenu pour l'expression de BRS-B. En revanche, en fusionnant le gène de l'ASNp à une étiquette 5'-UTR de stabilité « moyenne » chez *E. coli*, des niveaux d'expression 4 fois supérieurs à ceux obtenus dans une construction commerciale équivalente ont été mesurés lors de l'expression chez le coliforme. Ces travaux, qui montrent l'importance des régions 5'-UTR dans le taux d'expression recombinante d'une protéine, actuellement peu prises en compte dans le design des vecteurs d'expression, ont été en partie publiés dans l'article :

- Nouaille S., Mondeil S., [Finoux A.L.](#), Moulis C., Girbal L., Coccagn-Bousquet M., **2017**. The stability of an mRNA is influenced by its concentration: a potential physical mechanism to regulate gene expression. *Nucleic Acids Res* 45(20), 11711-11724.

Malheureusement, après transfert de ce plasmide navette dans la souche *L. lactis*, le niveau d'expression de l'ASNp observé a été très décevant, même si détectable. Nous avons pu en conclure qu'il aurait fallu pouvoir reprendre l'étude avec des étiquettes 5'-UTR propres à la souche *L. lactis*, mais nous avons manqué de temps.

Enfin, un deuxième projet TWB a été consacré au développement d'une souche châssis de *Bacillus subtilis* str. 168 pour l'expression et la sécrétion des α -transglucosylases, en partenariat avec l'Institut Micalis de Jouy en Josas (Philippe Noireau, Etienne Dervyn, Mathieu Jules). 16 gènes codant pour des enzymes décrites pour utiliser le saccharose ou des α -glucanes comme substrat, ainsi que des gènes de sporulation, ont été éteints. Un site de clonage par recombinaison homologue (ou landing-pad) a également été inséré dans le chromosome de la bactérie. Au TBI, nous avons construit 6 plasmides contenant les gènes de DSR-M, DSR-OK et BRS-B en fusion avec leur peptide signal natif ou le peptide signal de la protéine AprE de *B. subtilis*, couramment utilisé dans les vecteurs d'expression commerciaux. Les différentes constructions ont été intégrées dans la souche, au locus souhaité, en testant deux promoteurs constitutifs (faible et fort). Cependant, les constructions générées après recombinaison se sont avérées instables génétiquement, et n'ont pu être validées par nos partenaires.

Nous avons alors décidé d'utiliser la souche châssis construite afin d'exprimer les gènes d' α -transglucosylases clonés dans des plasmides commerciaux, et de réaliser un criblage d'une banque de 173 peptides signaux (kit Takara). Malheureusement, aucune activité significative n'a pu être dosée pour DSR-M Δ 5 (plus courte forme active) ou DSR-OK Δ 1, que cela soit dans les milieux intra- ou extra-cellulaires. Pour l'AS, une activité maximale de 50 U/L_{culture} a été obtenue dans les extraits bruts, répartie équitablement entre milieu extra et intra-cellulaire. Tous nos efforts pour améliorer cette expression, en jouant sur la nature des milieux de culture, la température et la durée des cultures en fiole d'Erlenmeyer, ont été infructueux.

Nous nous sommes donc confrontés, au cours de ces 3 projets, à de cuisants échecs successifs. Pourtant, l'expression des enzymes GH70 chez *B. subtilis* est possible, puisque l'entreprise multinationale Dupont a récemment déposé plusieurs brevets relatant l'expression de diverses glucane-saccharases dans ce micro-organisme, avec des niveaux qui atteindraient les 30 000 U/L_{culture} dans le milieu extracellulaire⁶³! Néanmoins, les modifications génétiques de la souche ne sont pas dévoilées, ce qui nous empêche de nous en inspirer.

- [Surproduction chez *E. coli*](#)

⁶³ Patent n°WO2017/091533

Durant la même période (2012-2014), nous étions confrontés - dans le cadre du projet ANR Oenopolys- à de grosses difficultés de production des dextrane-saccharases putatives identifiées chez *O. oeni*. Les premiers essais montraient une production recombinante chez *E. coli* essentiellement sous la forme de corps d'inclusion. Or, ce problème d'expression hétérologue des GH70 était à l'époque assez récurrent. Un exemple majeur en était l'enzyme de branchement artificielle GBD-CD2, dont la production sous forme soluble et active nécessitait des étapes de dénaturation des corps d'inclusion à l'urée (8M) avant renaturation et utilisation. Nous avons donc choisi d'utiliser cette enzyme modèle pour développer une stratégie d'optimisation de la production des enzymes GH70 sous forme soluble chez *E. coli*. Cette approche s'est réalisée en 2 temps :

- i) un criblage de différents types de vecteurs commerciaux de type pET (promoteur T7) permettant une double fusion avec des étiquettes d'affinités aux extrémités N et C-terminales des protéines. Ces étiquettes devaient permettre d'une part de localiser, par Western-Blot, les éventuelles formes dégradées obtenues lors de la production, mais aussi une purification à homogénéité de la forme entière de la protéine par une double purification par affinité. A l'époque, nous avons focalisé notre intérêt sur des vecteurs commerciaux reposant sur un système de recombinaison Gateway, car ils nous permettaient un rapide criblage d'une librairie d'étiquettes différentes (6xhis tag, Strep-tag, thioredoxine, GST) localisées soit en position 5' ou en 3' des gènes. Finalement, les étiquettes de plus petites tailles (6xHis et Strep) se sont avérées les plus intéressantes à conserver. 5 souches d'expression connues pour favoriser la production de protéines solubles (BL21 star DE3, JM109 DE3, Rosetta DE3, C41 DE3, ArticExpress DE3) ont été testées, et les 3 meilleurs systèmes d'expression (couples vecteur: souche) ont été retenus pour la seconde étape.

- ii) en se basant sur un milieu de culture auto-inductible de type ZYM5052⁶⁴, les conditions de production ont ensuite été optimisées par méthodologie des surfaces de réponse. Un plan d'expériences à 5 facteurs incluant les concentrations en inducteur (α -lactose), en répresseur (glucose) et en glycérol, la température et la durée de la culture a ainsi été développé.

Cette méthode a permis d'augmenter d'un facteur 165 le niveau de production de l'enzyme modèle GBD-CD2, pour atteindre 12 000 U.L⁻¹ de culture dans le surnageant de sonication, contre 76 U.L⁻¹ de culture initialement. Cette stratégie est désormais appliquée à l'ensemble des enzymes de la collection, qui sont toutes produites à des niveaux dépassant les 10 à 20 000 U/L_{culture} (en fiole d'Erlenmeyer), et purifiables à homogénéité par simple ou double purification d'affinité.

Ces travaux ont fait l'objet de la publication :

- Vuillemin, M., Malbert, Y., Laguerre, S., Remaud-Siméon, M., Moulis, C., 2014. Optimizing the production of an α -(1 \rightarrow 2) branching sucrose in *Escherichia coli* using statistical design. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 5173–5184

Pour finir, la production de l'enzyme DSR-S vardel Δ 4N par *E. coli* a récemment été transposée en fermenteur, en collaboration avec nos collègues toulousains de TWB et du CRITT Bioindustries (Julien Cescut, Valérie Dumont). Or, en jouant simplement sur différents paramètres de la conduite de fermentation, et en réalisant un broyage des cellules d'*E. coli* par homogénéisateur haute pression (HHP), une production d'enzyme à **plus de 180 000 U/L_{culture}** a été atteinte, **que cela soit à l'échelle de 2L, 200L et 2 m³** (en partenariat avec un partenaire extérieur, essais réalisés en mars 2020). Aujourd'hui, **60 tonnes de dextrane filant peuvent être produites avec la quantité d'enzyme résultante d'un seul batch de 2 m³** de fermentation environ (réactions de synthèse réalisées avec 100

⁶⁴ Studier, F.W. 2005. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.* 41, 207–234.

g/L de substrat et 200 U/L d'enzyme, 8h à 30°C), déût industriel. De plus, cette productivité pourrait même être encore augmentée à l'avenir, car de récents travaux réalisés par nos collègues de TWB montrent qu'une production à plus de **340 000 U/L_{culture}** peut être atteinte en conservant la construction initiale.

3.2. Développement des synthèses d'oligosaccharides et de polysaccharides pour un usage industriel

○ Applications des dextrans de DSR-S vardel Δ4N et DSR-OK

Les dextrans font partie des polysaccharides qui peuvent être utilisés pour le traitement des eaux usées, l'extraction de pétrole et de gaz, ou l'exploitation minière, par exemple. A ce titre, le dextrane filant produit par DSR-S vardel Δ4N s'est avéré particulièrement intéressant comme agent de floculation pour la récupération assistée d'un minerai. Il sera commercialisé dès cette année pour cette application, ce qui a motivé les travaux de surproduction de l'enzyme évoqué au paragraphe précédent, mais que je ne peux détailler pour des raisons de confidentialité.

Dans le cadre d'un autre partenariat industriel, nous avons montré que les propriétés rhéologiques du dextrane produit par DSR-OK étaient quasi-équivalentes à celle d'une gomme guar commerciale à même concentration (1%). Malheureusement, la viscosité chute fortement lors des dilutions du produit à des concentrations inférieures, ce qui en limite l'intérêt applicatif utilisé tel quel. Cependant, **ce dextrane s'avère particulièrement compétitif par rapport à des gommés guar ou des xanthanes commerciaux une fois qu'il a été modifié chimiquement afin d'introduire des groupements carboxyméthyles** (CMC-dextrans, polymère anionique de par la présence de fonctions acide carboxylique). Les procédés de synthèse des CMC-dextrans, à partir de monochloroacétate de sodium et 0,5M de soude, sont en effet décrits depuis les années 70 et simples à mettre en œuvre. Un taux de substitution d'environ 15% a pu être obtenu, ce qui augmenta d'un facteur 100 la viscosité initiale, tout en conservant les propriétés rhéofluidifiantes. Ainsi, la viscosité d'un CMC-dextran de DSR-OK dilué à 0,25% s'avère nettement supérieure à celle d'une gomme guar ou d'un xanthane deux fois plus concentré, ce qui devient très avantageux d'un point de vue applicatif (**Figure 26**). Il s'agit du résultat majeur de cette étude, qui a mis en évidence de manière spectaculaire le potentiel de la fonctionnalisation des α-glucanes neutres pour diversifier ou augmenter leur panel d'applications.

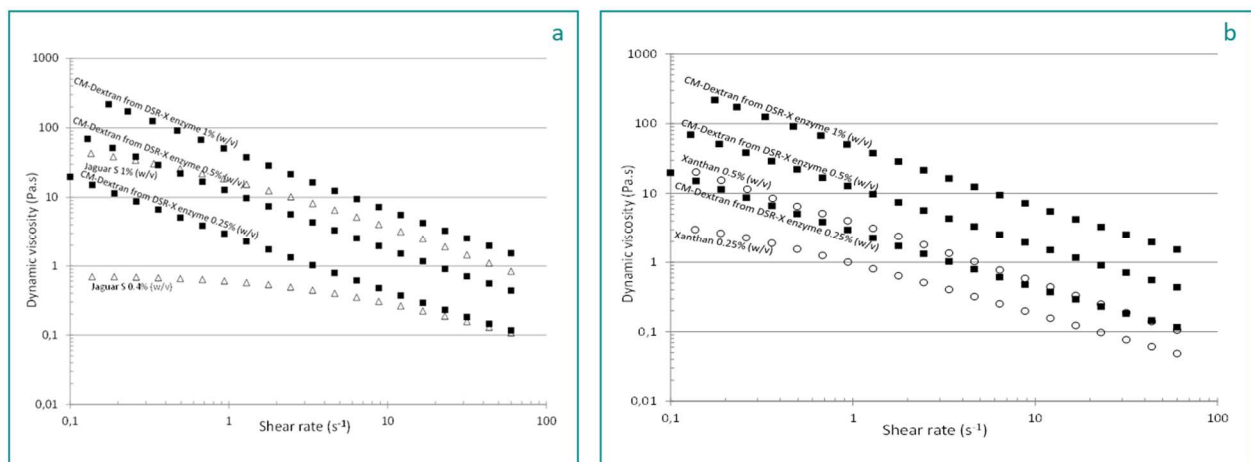


Figure 26. Viscosité apparente en fonction du taux de cisaillement du dextrane de DSR-OK carboxyméthylé à hauteur de 15% (noté ici CMC-Dextran from DSR-X enzyme) et resuspendu à 0,25 ; 0,5 et 1% (m/v) . Comparaison avec le profil rhéologique d'une préparation commerciale de gomme guar (Jaguar S) resuspendue à 0,5 ou 1% (éluogramme a) ou un xanthane resuspendu à 0,25 ou 0,5% (m/v) (éluogramme b) dans l'eau.

De plus, des performances intéressantes ont également été observées lorsque les synthèses de dextrane ont été réalisées en eau de mer, ou avec différents types de tensio-actifs, et l'ensemble des résultats obtenus ont conduit au dépôt de 3 brevets par le partenaire industriel (brevets FR3045608 (A1), FR3045668 (A1) et FR3045667 (A1)).

- o Eco-conception de la production des dextrans de masse molaire contrôlée en amont d'une phase d'industrialisation

En collaboration avec Ligia Barna et Aras Ahmadi, collègues enseignants de thermodynamique et impliqués dans l'équipe EAD10 du laboratoire, nous avons voulu étudier le principe d'une écoconception de la production des dextrans de faible masse molaire par l'enzyme DSR-M couplant modélisation des procédés et analyses ACV (projet 3BCar, 2016-2018). L'objectif était d'identifier les conditions réactionnelles les plus prometteuses pour la synthèse des dextrans de 5, 10 et 25 kg/mol et les opérations unitaires qui nécessiteraient, en priorité, des expérimentations supplémentaires pour proposer un procédé performant à la fois d'un point de vue économique, mais aussi environnemental. Dans notre équipe, seuls des essais en réacteurs fermés de petits volumes (100 mL à 1 L) avaient été réalisés, et seule l'opération unitaire de catalyse étudiée. Il s'agissait donc d'un procédé à très faible TRL (TRL2, formulation du concept de la technologie).

Dans un premier temps, nous avons développé un modèle prédictif décrivant le processus de polymérisation en fonction de concentrations initiales en saccharose variant de 50 à 400 g/L, prenant en compte le caractère non-processif de l'enzyme DSR-M et le fait qu'elle reconnaisse plusieurs molécules acceptrices (saccharose, glucose ou fructose). Le modèle prédit ainsi la distribution de taille et le degré de polymérisation moyen des chaînes en fonction du temps, ainsi que la quantité exacte des sous-produits qui devront être éliminés (Figure 27).

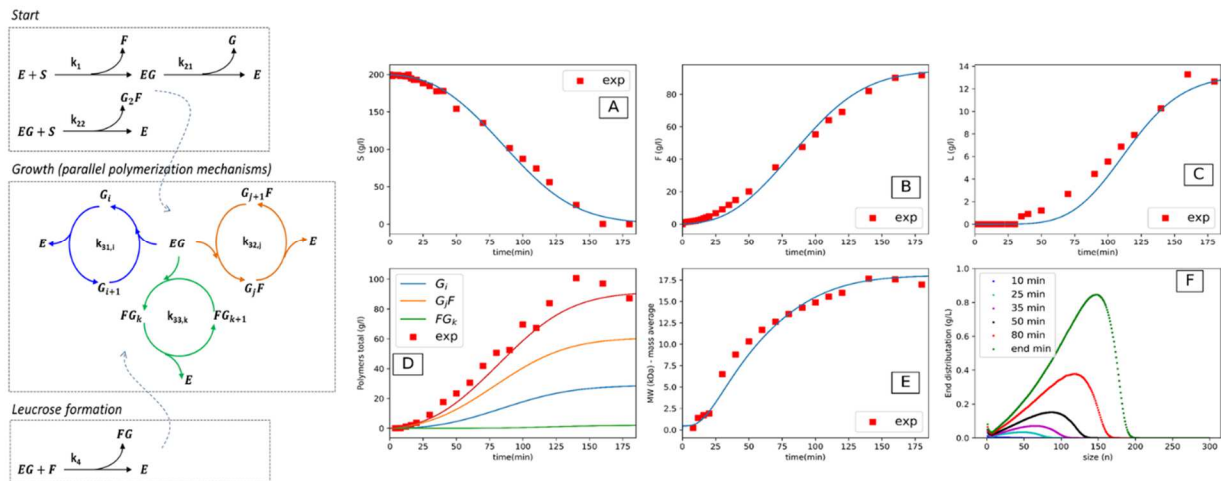


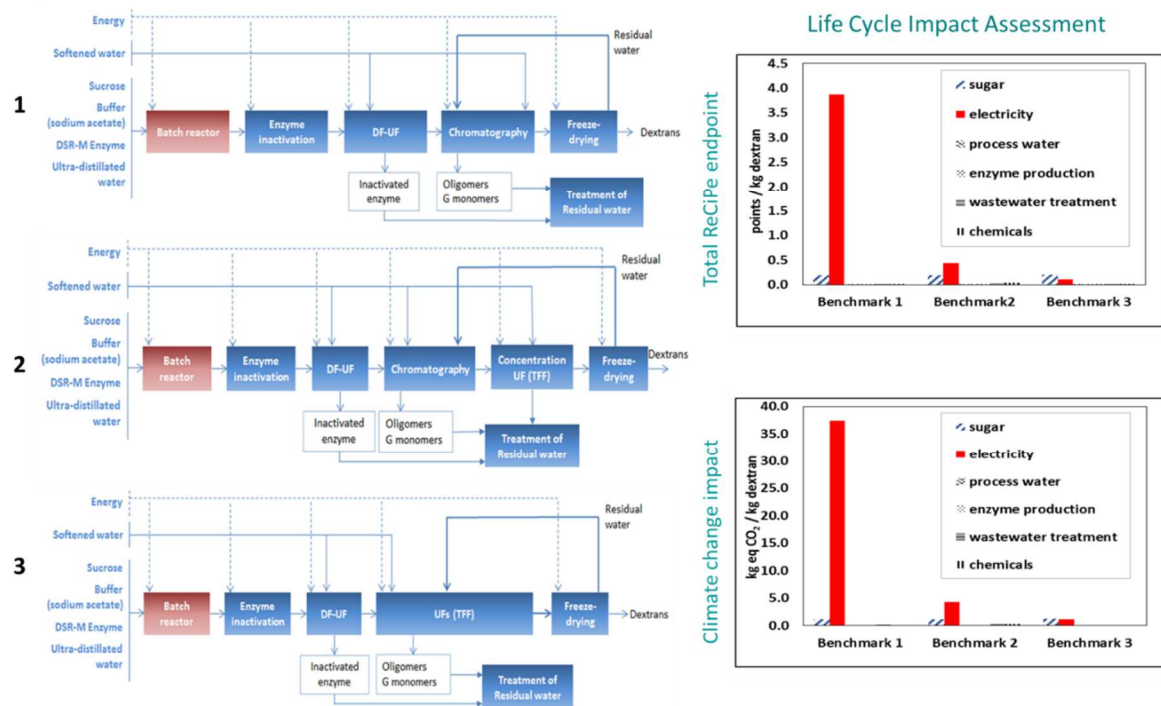
Figure 27. Modèle « PolyEnz » développé au cours du projet afin de décrire la synthèse des dextrans de faible masse molaire par DSR-M en fonction de la concentration initiale en saccharose. A Gauche ; A droite : modèle (courbes bleues) comparé aux données expérimentales (points rouges) pour une concentration initiale en saccharose de 200 g/L : A/ évolution de la concentration en saccharose au cours du temps ; B/ fructose ; C/Leucrose ; D/ Dextran ; E/ évolution de la masse molaire moyenne des chaînes de dextrane au cours du temps ; F/ distribution moyenne des chaînes pour différents temps de réaction.

A partir de là, divers facteurs de production comme i) la concentration initiale et le type de saccharose utilisé (provenant de betteraves cultivées en Europe ou de canne et donc acheminé par bateau d'Amérique ou d'Inde), ii) le type d'eau de traitement, ainsi que 3 procédés de purification basés sur

l'utilisation de la chromatographie par échange d'ions ou des stratégies de filtration sur membrane, et iii) le besoin en lyophilisation nécessaire lors de l'étape finale de séchage ont été soumis à une analyse de sensibilité avec comme critères la demande énergétique globale, les dommages environnementaux (méthode ReCiPe qui se concentre sur 3 catégories de dommages : qualité des écosystèmes, santé humaine et utilisation des ressources⁶⁵) et l'impact sur le réchauffement climatique (méthode du rapport GIEC 2013⁶⁶).

Ces travaux ont montré que la concentration initiale en substrat est un facteur déterminant car façonnant directement la taille du produit, mais aussi le rendement de production visé (globalement, l'utilisation de concentrations en saccharose de moins de 100 g/L doit être évitée, car nécessitera un nombre trop important d'étapes de purification). Mais aussi et surtout, l'utilisation de procédés membranaires pour la séparation du fructose co-produit devra être privilégiée par rapport à des procédés chromatographiques, car ils nécessitent une quantité d'eau drastiquement plus faible, ce qui entraîne également une réduction de la demande énergétique pour le séchage (réduction d'un facteur 20 de la consommation d'eau, et d'un facteur 35 de la demande énergétique nécessaire au séchage, **Figure 28**). C'est donc sur cette étape clé du procédé qu'il nous faut désormais axer nos investigations futures. A notre connaissance, il s'agit du premier exemple de développement d'un procédé de synthèse de polymère par voie enzymatique qui prend en compte l'impact environnemental à si faible niveau de maturité, et l'ensemble de ce travail initial est décrit dans la publication :

- Ahmadi, A., Severac E., Monties N., Claverie M., Remaud-Simeon M., **Moulis C.** & Tiruta-Barna L. **2019**. An eco-design approach for an innovative production process of low molar mass dextran. *Green Chemistry*, 21: 4512.



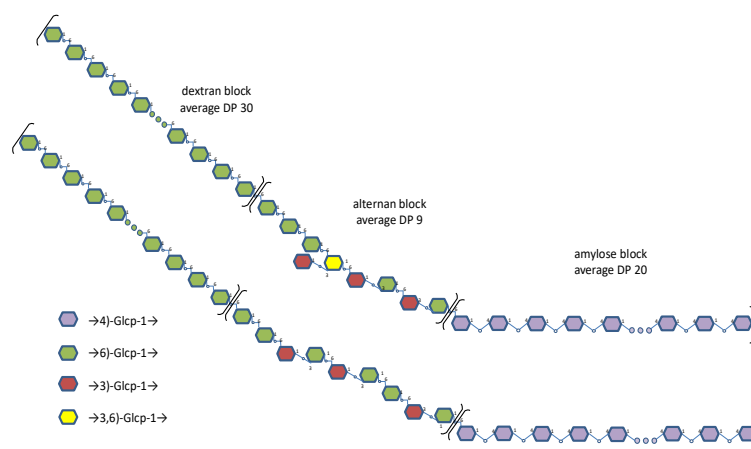
⁶⁵ M. Goedkoop, R. Heijungs, M. Huijbregts, A. De Schryver, J. Struijs and R. Van Zelm. 2009. A life cycle impact assessment method which comprises harmonised category indicators at the midpoint and the endpoint level, Hague Minist. VROM ReCiPe, 1–126

⁶⁶ T. F. Stocker, D. Qin, G.-K. Plattner, M. M. B. Tignor, S. K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex and P. M. Midgley, Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of IPCC the Intergovernmental Panel on Climate Change, Cambridge University Press, Cambridge, 2014

Figure 28. A droite : Procédé global envisageable pour la production des dextrans avec 3 alternatives : 1/ chromatographie seule, 2/ chromatographie couplée à une ultrafiltration ou 3/ Ultrafiltration seule pour la purification des produits d'intérêt. A gauche : Evaluation de l'impact du cycle de vie selon les 3 procédés envisagés et pour différents facteurs (type de substrat, électricité consommée, etc) en termes de dommages environnementaux potentiels (point finale ReCiPe) et potentiel réchauffement climatique.

o Nouveaux co-polymères à base d' α -glucanes

Dans le cadre du projet ANR Aspire (2015-2018), nous avons voulu explorer le potentiel des α -transglucosylases à synthétiser les premiers co-polymères à blocks constitués uniquement de motifs polysaccharidiques. Ce projet s'inscrivait encore une fois dans une démarche de diversification du panel d'applications des polysaccharides -notamment pour des usages non-alimentaires-, car les polysaccharides neutres présentent parfois des propriétés insuffisantes, telles qu'une rigidité ou une solubilité insuffisante, notamment pour des usages en tant que biomatériaux. Les co-polymères à blocks, présentant des propriétés physico-chimiques variées (rigidité, cristallinité, solubilité, Tg) peuvent présenter des propriétés tout à fait originales, et sont de plus en plus recherchés. A ce jour, seuls des co-polymères constitués de deux blocks synthétiques, ou d'un block synthétique + un block polysaccharidique sont souvent étudiés et décrits⁶⁷. Nous avons donc testé la capacité de nos α -transglucosylases GH70 à reconnaître des motifs oligosaccharidiques de taille élevée (DP 5 à 30) mimant des structures variées d' α - et β -glycanes comme molécules acceptrices, et les rallonger par leur α -glucane spécifique. Cette approche s'est avérée totalement infructueuse pour la reconnaissance de motifs tels que des xylane, xanthane, chitosan, β -manane, etc. Nous avons alors choisi de réorienter la stratégie pour essayer de former des co-polymères à block constitués uniquement de motifs α -glucanes, mais de structures variées. Florent Grimaud, post-doctorant recruté sur ce projet, a alors entrepris un criblage exhaustif de toutes nos combinaisons d' α -glucanes linéaires ou branchés, avec l'ensemble des polymérase disponibles dans l'équipe. Ainsi, deux GH-70 se sont distinguées dans leur capacité à reconnaître et rallonger d'autres structures d' α -glucanes que leur polymère naturel : l'alternansucrase (ASR) de *L. mesenteroides* NRRL B-1355 est capable de reconnaître et rallonger efficacement des chaînes d'amylose, et la dextrane-saccharase DSR-M Δ 1 des chaînes d'oligoalternanes. En jouant sur les conditions réactionnelles (taille des chaînes acceptrices et ratio concentration en saccharose/concentration en molécules acceptrices), nous avons pu former un polysaccharide di-block alternan-*b*-amylose, un di-block dextrane-*b*-alternane, ainsi qu'un **tri-block dextrane-*b*-alternane-*b*-amylose** (Figure 29).



⁶⁷ K. Akiyoshi, M. Kohara, K. Ito, S. Kitamura and J. Sunamoto, *Macromolecular Rapid Communications*, 1999, 20, 112-115; C. Lemarchand, P. Couvreur, M. Besnard, D. Costantini and R. Gref, *Pharmaceutical Research*, 2003, 20, 1284-1292; C. Schatz and S. Lecommandoux, *Macromolecular Rapid Communications*, 2010, 31, 1664-1684.

Figure 29. Exemple des modèles structuraux proposés pour le tri-block dextran-b-alternan-b-amylose.

En combinant analyses chromatographiques, RMN et analyses par perméthylation, nous avons montré que ces chaînes de copolymères variaient entre 29 et 170 unités glucosyle, ce qui correspond **aux plus grandes chaînes de co-polymères produits par synthèse enzymatique décrites à ce jour** (DP moyen d'environ 60, ce qui correspond à une masse molaire moyenne de 10 kg/mol). De plus, nos collègues du BIA de Nantes (Denis Lourdin, Agnès Rolland-Sabathé) ont montré par analyses SAXS que l'addition de motifs dextrane et alternane sur les chaînes d'amylose modifiait drastiquement leurs propriétés physico-chimiques, notamment en terme de flexibilité et de cristallinité. Bien qu'il ne s'agisse pour l'instant que d'une preuve de concept, ce genre de polysaccharide tri-block pourrait servir à l'encapsulation de principes actifs par exemple, le bloc amylose servant d'agent complexant tandis que les blocs alternane-b-dextrane améliorent la solubilité dans l'eau, suite à leur plus grande flexibilité. Ces travaux ont été publiés dans l'article :

- Grimaud F., Faucard P., Tarquis L., Pizzut-Serin S., Roblin P., Morel S., Le Gall S., Falourd X., Rolland-Sabathé A., Lourdin D., **Moulis C.**, Remaud-Siméon M., Potocki-Veronese G. **2018**. Enzymatic synthesis of polysaccharide-based copolymers. *Green Chemistry*. 181: 337-343.

- **Bibliothèque de gluco-oligosaccharides de structures variées à visées prébiotiques**

Enfin, nous travaillons actuellement sur un projet de pré-maturation financé par l'INRAE (projet PAGE, 2019-2020) afin de produire une dizaine de lots d'oligosaccharides de glucose à l'échelle de 50 g minimum chacun. En ce qui concerne les oligodextranes branchés en α -1,2, outre leur effet bénéfiques sur les flores cutanées déjà évoquées (produit commercial Bioecolia de Solabia), il a été montré dès les années 2000 que ces molécules pouvaient jouer un rôle dans la prévention des maladies métaboliques comme le diabète de type II⁶⁸. Plus récemment, Sarbini et al. ont également montré que ces produits permettraient i) une meilleure croissance des micro-organismes dits bénéfiques que l'inuline, longtemps considéré comme un des meilleurs prébiotiques du marché ; ii) une probable régulation du taux de cholestérol et de l'obésité lors de cultures mixtes de flores issues de fécès humains (de patients maigres et obèses), et iii) une diminution du nombre de *Faecalibacterium prausnitzii*, microorganisme décrit pour être impliqué dans la maladie de Crohn⁶⁹. A notre connaissance, l'effet prébiotique des oligodextranes branchés en α -1,3, des oligoalternanes et des oligoreuteranes ont tous été décrits *a minima in vitro* lors de cultures pures, et parfois lors de cultures mixtes, montrant tous une croissance nette de de microorganismes de l'intestin considérés comme bénéfiques (différentes souches de *Bifidobacterium* ou *Lactobacillus* sp. selon les études) contrairement à certains microorganismes pathogènes (*Salmonella* sp., *Listeria* sp., *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* par exemple)⁷⁰. Malheureusement, très peu d'exemples font état de cultures mixtes,

⁶⁸ Monsan P, Valet P., Remaud-Simeon M., Saulnier-Blache J.S., Burcelin R. Use of prebiotics for the treatment and prevention of hyperglycaemic syndromes. Patent WO20040241167 (A2).

⁶⁹ Sarbini S.R., Kolida S., Gibson G.R., Rastall R.A. 2013. In vitro fermentation of commercial α -gluco-oligosaccharides by faecal microbiota from lean and obese human subjects. *British journal of nutrition*. 109: 1980-1989 ; Sarbini SR, Kolida S, Naeye T, Einerhand A, Brison Y, Remaud-Simeon M, Monsan P, Gibson GR, Rastall RA. 2012. In Vitro Fermentation of Linear and -1,2-Branched Dextrans by the Human Fecal Microbiota. *Appl Environ Microbiol* 77:5307–5315

⁷⁰ Grimoud J, Durand H, Courtin C, Monsan P, Ouarné F, Theodorou V, Roques C. 2010. In vitro screening of probiotic lactic acid bacteria and prebiotic glucooligosaccharides to select effective synbiotics. *Anaerobe* 16:493–500; Chung C-H, Day DF. 2002. Glucooligosaccharides from *Leuconostoc mesenteroides* B-742 (ATCC 13146): A potential prebiotic. *J Ind Microbiol Biotechnol* 29:196–199 ; Lee S., Park J., Jang

ou *in vivo* plus significatives de l'environnement réel selon le microbiote visé, et l'application recherchée. Seuls Lee et al. ont montré récemment un effet immunomodulateur des oligoreuteranes (DP moyen de 11) sur des souris immunodéprimées, stimulant l'activité de la rate et la production de cytokines (IL6, IL10 et TNF- α), par exemple⁷¹. La demande sociétale étant aujourd'hui très forte dans ce domaine, l'objectif de notre projet est de pouvoir proposer de nouvelles gammes de produits en quantité suffisante pour les fournir à des partenaires industriels et/ou académiques pour évaluation fine de leurs propriétés. Nous disposons en effet aujourd'hui d'un réservoir d'enzymes pouvant créer à façon des points de branchements en α -1,2 et en α -1,3 (collection de branching sucrases) mais aussi des premières enzymes dédiées uniquement à la synthèse d'oligomutanes, d'oligoreuteranes ou d'oligoalternanes à partir de saccharose seul (découverte des enzymes GS-FS, GS-A et GS-E respectivement, décrites dans le brevet FR2007021 et **Figure 8** p29). Pour ces dernières, puisqu'il n'y a pas de synthèse concomitante de polymère de haute masse molaire et que les rendements de synthèse en oligosaccharides sont toujours supérieurs à 70 ou 80% des unités glucosyle transférées, les étapes de purification et le rendement final en produit seront favorisés par rapport aux procédés actuels (réactions d'accepteur à partir de maltose et de saccharose). Nous avons donc développé un procédé de production à grande échelle de 4 lots d'oligodextranes branchés à 10 et 30% de liaisons en α -1,2 et α -1,3 ainsi que des lots d'oligoalternanes, oligomutanes et oligoreuteranes (**Tableau 3**). Avec l'aide précieuse d'Etienne Severac, ingénieur de recherche dans l'équipe et spécialiste du développement des procédés, la purification des produits à l'échelle pré-pilote a été optimisée soit par chromatographie sur résine Ca²⁺, soit en combinant des étapes d'ultrafiltration (pour réduire le volume en fin de synthèse) suivies d'une double précipitation alcoolique avec de l'éthanol à 90%.

Tableau 3. Diversité des structures envisagées dans le cadre du projet de pré-maturation PAGE.

IMOS	100% α -1,6	DP3 to DP15	
α -1,2 branched IMOS	5 to 37% α -1,2 95 to 63% α -1,6	From DP5	
α -1,3 branched IMOS	5 to 40% α -1,3 95 to 60% α -1,6	From DP5	
oligomutan	100% α -1,3	DP3 to DP15	
oligoalternan	35% α -1,3- 65% α -1,6	DP3 to DP15	
oligoreuteran	40% α -1,4- 60% α -1,6	DP3 to DP15	
Block dextran-mutan	50% α -1,3 – 50% α -1,6 or variable	variable	
Block alternan-mutan	α -1,3 and α -1,6, enriched in α -1,3	variable	
Block α -1,2 branched dextran-mutan	α -1,2, α -1,3 and α -1,6	variable	

De plus, en poursuivant la caractérisation des nouvelles « oligo-saccharases », nous avons montré que l'oligomutansucrase GS-FS est capable de reconnaître les oligodextranes et les

J.K., Lee B-H., Park Y-S. 2019. Structural analysis of gluco-oligosaccharides produced by *Leuconostoc lactis* and their prebiotic effect. *Molecules*. 24:3998

⁷¹ Lee S., Song I.H., Park Y-S. 2019. In vivo and in vitro study of immunostimulation by *Leuconostoc lactis*-produced gluco-oligosaccharides. *Molecules*. 24: 3994.

oligoalternanes afin de les rallonger d'un motif mutane à l'extrémité non-réductrice. En développant des cascades enzymatiques sur le même principe que celles réalisées dans le cadre du projet Aspire, nous avons synthétisé des **oligosaccharides à block de type oligodextran-b-oligomutan ou oligoalternan-b-oligomutan** de différentes tailles. Enfin, nous **travaillons actuellement au transfert de cette cascade enzymatique afin de rajouter des unités glucosyle liées en α -1,2 ou en α -1,3 sur les blocks oligomutan-b-oligodextran**. L'objectif est de fournir des structures riches en liaisons α -1,2 et α -1,3 sur une même chaîne, ou des structures nouvelles très riches en α -1,3 à la fois dans la chaîne principale et au niveau des points de branchement pour atteindre au minimum 80% de résistance aux enzymes hydrolytiques lors de tests préliminaires de digestibilité *in vitro* (méthode précédente ou méthode AOAC 2017, par exemple) pour les fournir aux partenaires.

4. Perspectives de recherches

Aujourd'hui encore plus qu'hier, la raréfaction des ressources fossiles, les pollutions environnementales et leurs impacts sur le climat, la biodiversité et la santé appellent à un changement de paradigme pour trouver des alternatives durables et écoresponsables pour la production des composés, biens ou services dont nous avons besoin. Et pour répondre à cette urgence, les biotechnologies -et en particulier la biocatalyse- sont des outils de biotransformation remarquables. De même, les polysaccharides, qui sont les polymères renouvelables majoritairement présents sur Terre, représentent un potentiel énorme pour la production de matériaux fonctionnels écologiques. Ainsi, les α -transglucosylases que j'étudie depuis une quinzaine d'années peuvent participer à l'essor de cette bioéconomie puisque ces enzymes travaillent dans des conditions douces, sont dotées d'une formidable puissance catalytique et transforment une agroressource renouvelable en un large panel d'oligosaccharides, polysaccharides et glucoconjugués qui ciblent des secteurs très variés. J'espère vous avoir convaincu dans ce rapport que les travaux réalisés au fil des ans m'ont permis d'acquérir **un spectre de compétences larges et dédiées à la découverte, l'ingénierie et la mise en œuvre de ces enzymes, dans un souci constant d'équilibre entre questions de recherche fondamentales et finalisées**. Pour cela, j'ai pu bénéficier d'un contexte très favorable au sein de notre équipe, au regard de la complémentarité des domaines d'expertises, et de l'expérience inestimable de mes collègues.

Le domaine de la synthèse enzymatique d'oligo- ou polysaccharides artificiels – ou « sur mesure » - me tient réellement à cœur et mes perspectives de recherches pour les années à venir seront encore largement consacrées à cette famille de catalyseurs. **Cependant, un volet majeur concernera désormais aussi l'étude d'autres classes d'enzymes afin de développer des voies enzymatiques pour la fonctionnalisation des α -glucanes**, approche encore très peu explorée jusqu'à présent. D'un point de vue applicatif, le fil conducteur de mes travaux restera de pouvoir proposer, *in fine*, des **méthodes efficaces, rentables et respectueuses de l'environnement** pour la synthèse de nouvelles molécules prébiotiques, d'une part, mais aussi le développement de polysaccharides « haute-couture », notamment pour le secteur biomédical ou celui de la dépollution des eaux. Les polysaccharides ont en effet des propriétés supérieures à celles des polymères synthétiques dans ces deux secteurs, où les critères de biocompatibilité et de biodégradabilité sont essentiels.

Suite non accessible.

IV. PRODUCTION SCIENTIFIQUE

Articles dans revues internationales à comité de lecture

47 articles, dont 5 en premier et 8 en dernier auteur.
1215 citations, indice h21

○ Articles

1. Richard G., Fabre E., **Moulis C.**, Joucla G., Albenne C., Potocki-Veronese G., Monsan P., Remaud-Simeon M., **2005**. Glucansucrases: versatile tools for the synthesis of functional foods. *Journal of Biotechnol.* 118: S135.
2. **Moulis, C.**, Arcache, A., Escalier, P.-C., Rinaudo, M., Monsan, P., Remaud-Simeon, M., Potocki-Veronese, G., **2006**. High-level production and purification of a fully active recombinant dextran sucrose from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *FEMS Microbiol. Lett.* 261, 203–210.
3. **Moulis, C.**, Joucla, G., Harrison, D., Fabre, E., Potocki-Veronese, G., Monsan, P., Remaud-Simeon, M., **2006**. Understanding the polymerization mechanism of glycoside-hydrolase family 70 glucansucrases. *J. Biol. Chem.* 281, 31254–31267.
4. Fabre E., Joucla G., **Moulis C.**, Emond S., Richard R., Potocki-Veronese G., Monsan P., Remaud-Simeon M. **2006**. Glucansucrases : what are the determinants of their specificity ? *Biocatalysis and Biotransformation* 24 (1-2), 137-145.
5. Suwannarangsee, S., **Moulis, C.**, Potocki-Veronese, G., Monsan, P., Remaud-Simeon, M., Chulalaksananukul, W., **2007**. Search for a dextran sucrose minimal motif involved in dextran binding. *FEBS Lett.* 581, 4675–4680.
6. **Moulis C.**, Vaca Medina G., Suwannarangsee, S., Monsan P., Remaud-Simeon M., Potocki-Veronese G. **2008**. One-step synthesis of isomaltooligosaccharide syrups and dextrans of controlled size using engineered dextran sucrose. *Biocatalysis and Biotransformation* 26 (1), 141-151
7. Brison Y., **Moulis C.**, Emond S., Remaud-Simeon M., Monsan P. 2008. Les glucane-saccharases et la synthèse de biopolymères et de prébiotiques. *Biofutur* 288, 29-33.
8. Champion, E., André, I., **Moulis, C.**, Boutet, J., Descroix, K., Morel, S., Monsan, P., Mulard, L.A., Remaud-Siméon, M., **2009**. Design of alpha-transglucosidases of controlled specificity for programmed chemoenzymatic synthesis of antigenic oligosaccharides. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 7379–7389.
9. Brison, Y., Fabre, E., **Moulis, C.**, Portais, J.-C., Monsan, P., Remaud-Siméon, M., **2010**. Synthesis of dextrans with controlled amounts of alpha-1,2 linkages using the transglucosidase GBD-CD2. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, 545–554
10. Champion E., Moulis C., Morel S., Mulard L.A., Monsan P., Remaud-Siméon M., André I. 2010. A pH-based high-throughput screening of sucrose-utilizing transglucosidases for the development of enzymatic glucosylation tools. *ChemCatChem.* 2(8): 969-975.
11. Fraga Vidal R., Martínez, A., **Moulis, C.**, Escalier, P., Morel, S., Remaud-Simeon, M., Monsan, P., **2011**. A novel dextran sucrose is produced by *Leuconostoc citreum* strain B/110-1-2: an isolate used for the industrial production of dextran and dextran derivatives. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38, 1499–1506.
12. Fraga Vidal, R., **Moulis, C.**, Escalier, P., Remaud-Siméon, M., Monsan, P., **2011**. Isolation of a gene from *Leuconostoc citreum* B/110-1-2 encoding a novel dextran sucrose enzyme. *Curr. Microbiol.* 62, 1260–1266.

13. Irague, R., Massou, S., **Moulis, C.**, Saurel, O., Milon, A., Monsan, P., Remaud-Siméon, M., Portais, J.-C., Potocki-Véronèse, G., **2011**. NMR-based structural glycomics for high-throughput screening of carbohydrate-active enzyme specificity. *Anal. Chem.* 83, 1202–1206.
14. Champion, E., Guérin, F., **Moulis, C.**, Barbe, S., Tran, T.H., Morel, S., Descroix, K., Monsan, P., Mourey, L., Mulard, L.A., Tranier, S., Remaud-Siméon, M., André, I., **2012**. Applying pairwise combinations of amino acid mutations for sorting out highly efficient glucosylation tools for chemo-enzymatic synthesis of bacterial oligosaccharides. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 18677–18688.
15. Irague, R., Rolland-Sabaté, A., Tarquis, L., Doublier, J.L., **Moulis, C.**, Monsan, P., Remaud-Siméon, M., Potocki-Véronèse, G., Buléon, A., **2012**. Structure and property engineering of α -D-glucans synthesized by dextransucrase mutants. *Biomacromolecules* 13, 187–195.
16. Laguerre, S., Amari, M., Vuillemin, M., Robert, H., Loux, V., Klopp, C., Morel, S., Gabriel, B., Remaud-Siméon, M., Gabriel, V., **Moulis, C.**, Fontagné-Faucher, C., **2012**. Genome sequences of three *Leuconostoc citreum* strains, LBAE C10, LBAE C11, and LBAE E16, isolated from wheat sourdoughs. *J. Bacteriol.* 194, 1610–1611.
17. Amari, M., Laguerre, S., Vuillemin, M., Robert, H., Loux, V., Klopp, C., Morel, S., Gabriel, B., Remaud-Siméon, M., Gabriel, V., **Moulis, C.**, Fontagné-Faucher, C., **2012**. Genome sequence of *Weissella confusa* LBAE C39-2, isolated from a wheat sourdough. *J. Bacteriol.* 194, 1608–1609.
18. Amari, M., Arango, L.F.G., Gabriel, V., Robert, H., Morel, S., **Moulis, C.**, Gabriel, B., Remaud-Siméon, M., Fontagné-Faucher, C., **2013**. Characterization of a novel dextransucrase from *Weissella confusa* isolated from sourdough. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 5413–5422.
19. Irague, R., Tarquis, L., André, I., **Moulis, C.**, Morel, S., Monsan, P., Potocki-Véronèse, G., Remaud-Siméon, M., **2013**. Combinatorial engineering of dextransucrase specificity. *PLoS One* 8, e77837.
20. Maktouf, S., Kamoun, A., **Moulis, C.**, Remaud-Simeon, M., Ghribi, D., Chaabouni, S.E., **2013**. A new raw-starch-digesting α -amylase: production under solid-state fermentation on crude millet and biochemical characterization. *J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 489–498.
21. Dimopoulou, M., Vuillemin, M., Campbell-Sills, H., Lucas, P.M., Ballestra, P., Miot-Sertier, C., Favier, M., Coulon, J., Moine, V., Doco, T., Roques, M., Williams, P., Petrel, M., Gontier, E., **Moulis, C.**, Remaud-Simeon, M., Dols-Lafargue, M., **2014**. Exopolysaccharide (EPS) synthesis by *Oenococcus oeni*: from genes to phenotypes. *PLoS One* 9, e98898.
22. Passerini, D., Vuillemin, M., Laguerre, S., Amari, M., Loux, V., Gabriel, V., Robert, H., Morel, S., Monsan, P., Gabriel, B., Fontagné-Faucher, C., Remaud-Siméon, M., **Moulis, C.**, **2014**. Complete Genome Sequence of *Leuconostoc citreum* Strain NRRL B-742. *Genome Announc.* 2(6). pii: e01179-14.
23. Vuillemin, M., Malbert, Y., Laguerre, S., Remaud-Siméon, M., **Moulis, C.**, **2014**. Optimizing the production of an α -(1 \rightarrow 2) branching sucrose in *Escherichia coli* using statistical design. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 5173–5184
24. Amari, M., Valérie, G., Robert, H., Morel, S., **Moulis, C.**, Gabriel, B., Remaud-Siméon, M., Fontagné-Faucher, C., **2015**. Overview of the glucansucrase equipment of *Leuconostoc citreum* LBAE-E16 and LBAE-C11, two strains isolated from sourdough. *FEMS Microbiol. Lett.* 362, 1–8.
25. Maktouf S., **Moulis C.**, Miled N., Chaabouni S. E., Remaud-Simeon M. **2015**. A highly thermostable lichenase from *Bacillus sp.* UEB-S: biochemical and molecular characterization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 115, 8-12
26. Passerini D., Vuillemin, M., Ufarté L., Morel S., Fontagné-Faucher C., Monsa P., Remaud-Simeon M., **Moulis C.** **2015**. Inventory of the GH70 enzymes encoded by *Leuconostoc citreum*

NRRL B-1299 – identification of three novel α -transglucosylases. *FEBS Journal* 282(11):2115-30.

27. Maktouf, S., Jeddou, K.B., **Moulis, C.**, Hajji, H., Remaud-Simeon, M., Ellouz-Ghorbel, R., **2016**. Evaluation of dough rheological properties and bread texture of pearl millet-wheat flour mix. *J. Food Sci. Technol.* 53, 2061–2066
28. Vuillemin, M., Claverie, M., Brison, Y., Séverac, E., Bondy, P., Morel, S., Monsan, P., **Moulis, C.** & Remaud-Siméon, M., **2016**. Characterization of the First α -(1 \rightarrow 3) Branching Sucrases of the GH70 Family. *J. Biol. Chem.* 291:7687–7702.
29. Vergès A., Cambon E., Barbe S., **Moulis C.**, Remaud-Siméon M., André I. **2017**. Novel product specificity toward erlose and panose exhibited by multisite engineered mutants of amylosucrase. *Protein Sci.* 26(3):566-577
30. Vergès A., Barbe S., Cambon E., **Moulis C.**, Tranier S., Remaud-Siméon M., André I. **2017**. Engineering of an efficient mutant of *Neisseria polysaccharea* amylosucrase for the synthesis of controlled size maltooligosaccharides. *Carbohydr Polym.* 173,403-411
31. Nouaille S., Mondeil S., Finoux A.L., **Moulis C.**, Girbal L., Coccagn-Bousquet M., **2017**. The stability of an mRNA is influenced by its concentration: a potential physical mechanism to regulate gene expression. *Nucleic Acids Res* 45(20), 11711-11724.
32. Claverie M., Cioci G., Vuillemin M., Monties N., Roblin P., Lippens G., Remaud-Simeon M. & **Moulis C.** **2017**. Investigations on the determinants responsible for low molar mass dextran formation by DSR-M dextranase. *ACS Catal.* 7, 7106–7119.
33. Vuillemin M., Grimaud F., Claverie M., Rolland-Sabaté A., Garnier C., Lucas P., Monsan P., Dols-Lafargue M., Remaud-Siméon M., and **Moulis C.**, **2018**. A dextran with unique rheological properties produced by the dextranase from *Oenococcus oeni* DSM 17330. *Carbohydr. Polym.* 179, 10-18.
34. Faucard P., Grimaud F., Lourdin D., Maigret JE., **Moulis C.**, Remaud-Siméon M., Putaux JL., Potocki-Véronèse G., Rolland-Sabaté A. **2018**. Macromolecular structure and film properties of enzymatically-engineered high molar mass dextrans. *Carbohydr Polym.* 181:337-344.
35. Grimaud F., Faucard P., Tarquis L., Pizzut-Serin S., Roblin P., Morel S., Le Gall S., Falourd X., Rolland-Sabaté A., Lourdin D., **Moulis C.**, Remaud-Siméon M., Potocki-Veronese G. **2018**. Enzymatic synthesis of polysaccharide-based copolymers. *Green Chemistry.* 181: 337-343.
36. Malbert Y., **Moulis C.**, Brison Y., Morel S., André I., Remaud-Simeon M. **2018**. Engineering a branching sucrose for flavonoid glucoside diversification. *Sci Rep.* 8(1):15153.
37. Molina M., **Moulis C.**, Monties, N., Pizzut-Serin, S., Guieysse, D., Morel, S., Cioci, G., Remaud-Siméon, M. **2019**. Deciphering an Undecided Enzyme: Investigations of the Structural Determinants Involved in the Linkage Specificity of Alternansucrase. *ACS Catalysis*, 9 : 2222-2237.
38. Claverie M., Cioci G., Guillonnet M., Schörghuber J., Lichteneker R., **Moulis C.**, Remaud-Simeon M., Lippens G. **2019**. Futile encounter engineering of the DSR-M dextranase modifies the resulting polymer length. *Biochemistry*, 58(25): 2853-2859
39. Ahmadi, A., Severac E., Monties N., Claverie M., Remaud-Simeon M., **Moulis C.** & Tiruta-Barna L. **2019**. An eco-design approach for an innovative production process of low molar mass dextran. *Green Chemistry*, 21: 4512.
40. Claverie M., Cioci G., Bondy P., Vuillemin M., Remaud-Simeon M., **Moulis C.** **2020**. Processivity of dextranases synthesizing very high molar mass dextran is mediated by sugar-binding pockets in domain V. *J. Biol. Chem.* 295, 5602-5613.

41. **Molina M., Moulis C.,** Monties, N., Guieysse, D., Morel, S., Cioci, G., Remaud-Siméon, M. **2020**. A specific Oligosaccharide binding site in alternansucrase catalytic domain mediates alternan elongation. *J. Biol. Chem.* 295, 9474-9489.
 42. Hu Z., Benkoulouche M., Barel L.A., Le Heiget G., Ben Imeddourene A., Le Guen Y., Monties N., Guerreiro C., Remaud-Siméon M., **Moulis C.,** André I., Mulard L. **2020**. A convergent chemoenzymatic strategy to deliver a diversity of *Shigella flexneri* serotype-specific O-antigen segments from a unique lightly protected tetrasaccharide core. *J. Org Chem.* DOI: 10.1021/acs.joc.0c00777
 43. **Benkoulouche M.,** Ben Imeddourene A., Barel L.A., Pizzut S., Barbier H., Bellvert F., Bozonnet S., Mulard I., Remaud-Siméon M., **Moulis C. &** André I. **2021**. Redirecting substrate regioselectivity using engineered Δ N123-GBD-CD2 branching sucrases for the production of *S. flexneri* 3a, 4a and 4b pentasaccharide repeating units. *Sci. Reports* 11: 2474.
- o *Revues*
44. André, I., Potocki-Véronèse, G., Barbe, S., **Moulis, C.,** Remaud-Siméon, M., **2014**. CAZyme discovery and design for sweet dreams. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 19, 17–24.
 45. **Moulis, C.,** André, I., Remaud-Simeon, M., **2016**. GH13 amylosucrases and GH70 branching sucrases, atypical enzymes in their respective families. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 2661–2679.
 46. **Benkoulouche M.,** Fauré, R., Remaud-Simeon M., **Moulis C.,** André I. **2019**. Harnessing glycoenzyme engineering for synthesis of bioactive oligosaccharides. *Interface Focus.* 9 : 20180069
 47. **Moulis C.,** Guieysse D., Morel S., Severac E., Remaud-Simeon M. **2021**. Natural and engineered transglycosylases: Green tools for the enzyme-based synthesis of glycoproducts. *Curr Opin Chem Biol.* 61: 96-106.

Brevets

1. **Moulis, C.,** Potocki-Veronese, G., Remaud-Simeon, M., Monsan, P. Construction of new variants of DSR-S dextranucrase by genetic engineering. Patent n°: WO2007091178 (A2).
2. Vuillemin, M., Morel, S., Monsan, P., Remaud-Simeon, M, **Moulis, C.** Polypeptide having the ability to form connections of glucosyl units in α -1,3 on an acceptor. Patent n°: WO2014202208 (A1)
3. Vuillemin, M., Claverie, M., Grimaud, F., Sabate, A., Garnier, C., Dols-Lafargue, M., Lucas, P., Monsan, M., Remaud-Simeon, M., **Moulis C.** Very High molar mass dextrans. Patent n°: WO2015193492 (A1)
4. Vuillemin, M., Claverie, M., Severac, E., Fontagné-Faucher, C., Monsan, P., Remaud-Simeon, M., **Moulis C.** Protein with dextran activity, and uses. Patent n°: WO2016016544 (A1)
5. André, I., Grelier, S., Guieysse, D., Lafraya, A., Perruche, F., Monsan, P. Remaud-Simeon, M., Vuillemin, M., **Moulis, C.** Enzymatic production of glycosylated synthons. Patent n°: WO2016146764 (A1)
6. Champion, E., André, I., Mulard, L., **Moulis C.,** Morel, S., Monsan, P. Boutet J., Remaud-Simeon, M. Mutants of glycoside-hydrolases and uses thereof for synthesizing complex oligosaccharides and disaccharides intermediates. Patent n°: WO2009112951 (A2)

7. Champion, E., André, I., Mulard, L., **Moulis C.**, Morel, S., Monsan, P., Descroix, K., Remaud-Simeon, M. Mutants of glycoside-hydrolases and uses thereof for synthesizing complex oligosaccharides and disaccharides intermediates. Patent n°: WO2009112950 (A2)
8. Maktouf S., Ellouze-Gorbel R., Hajil H., **Moulis C.**, Remaud-Simeon M., Ellouze-Chaabouni S. Formulation d'une farine diététique millet-Blé et application dans la panification. Patent n° : TN2011000602 (A1)
9. Labeau MP., Remaud-Simeon M., Grimaud F., **Moulis C.** Dextran carboxyle. Patent n° : FR3045608 (A1)
10. Labeau MP., Gelo Pujic M., Meyrant P., Remaud-Simeon M., **Moulis C.**, Grimaud F. Procédé de production de dextrane en milieu salin. Patent n° : FR3045668 (A1)
11. Castaing JC., Gelo Pujic M., Labeau MP., Meyrant P., Remaud-Simeon M., **Moulis C.**, Grimaud F. Patent n° : FR3045667 (A1)
12. Mulard L., Le heiget G., Hu Z., Barel L-A., André I., **Moulis C.**, Remaud-Siméon M., Barbe S. Benkoulouche M., Ben Imeddourene A. Protected tetrasaccharides, their process of preparation and their use in the synthesis of bacterial oligosaccharides. Patent n°: US2020165285 (A1).
13. Cathala B., Talantikite M., Moreau C., Moya-Leclerc E., **Moulis C.**, Veronese G., Duquesne S., Bozonnet S., Pizzut-Serin S. Methods and system for detecting catalytic activity of at least one compound of interest. Patent n° : WO2020128366 (A1)
14. Severac E., Guieysse D., Morel S., Moulis C., Remaud-Simeon M. Procédé de préparation de polyglucosides d'alkyle et polyglucosides d'alkyles obtenus selon le procédé. Demande de Brevet français déposée le 2 juillet 2020 sous le n°FR2007021.

Conférences orales en congrès

1. Potocki-Veronese G., Monsan, P. Remaud-Simeon M., **Moulis C. 2006.** Rational engineering of the *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextranucrase for the synthesis of dextrans of controlled size. Congrès CBSO, Ax les thermes, France.
2. Potocki-Veronese G., Monsan, P. Remaud-Simeon M., **Moulis C. 2007.** How to control dextran polymerization? Enzyme engineering XIX. Vancouver, Canada.
3. Vuillemin M., Malbert Y., Monsan P., Remaud-Simeon M., **Moulis C. 2013.** Search for new α -transglucosylases in lactic acid bacteria diversity dedicated to the synthesis of tailor-made glucans. Congrès ALAMY 5, Smolenice, Slovaquie
4. Passerini D., Vuillemin M., Remaud-Siméon M., **Moulis C. 2013.** Glucansucrase diversity in *Leuconostoc citreum*. Congrès du Club des bactéries lactiques, Bordeaux, France.
5. Malbert Y., Remaud-Simeon M., **Moulis C.**, Morel S. 2013. Semi-rational engineering of an α -1,2 branching sucrase. Congrès SFBBM, Paris France.
6. Vuillemin M., Passerini D., Morel S., Monsan P., Remaud-Simeon M., **Moulis C., 2014.** New α -transglucosylases from lactic acid bacteria for the synthesis of tailor-made α -glucans. Congrès CBSO, Carry le Rouet, France
7. **Moulis C. 2015.** Discovery of original branching sucraes in *Leuconostoc citreum* NRRLB-1299 and NRRL B-742. Congrès Polymerix, Rennes, France
8. Claverie M., Vuillemin M., Remaud-Simeon M., **Moulis C., 2016.** Discovery of original α -transglucosylases from *Leuconostoc citreum* NRRLB-1299 and NRRL B-742 for the synthesis of tailor-made α -glucans. CBM11, Helsinki, Finlande.

9. Claverie M., Vuillemin M., Monsan P., Cioci G., Remaud-Siméon M., **Moulis C.** 2016. Biochemical and Structural characterization of a new GH-70 enzyme from *Leuconostoc citreum* NRRL B-1299. Congrès ALAMY 5, Smolenice, Slovaquie
10. Grimaud F., **Moulis C.**, Remaud-Simeon M., Potocki-Veronese V. 2016. Assessing structure property relationships of engineered dextrans. Congrès TrapCat, Toulouse, France.
11. **Moulis Claire.** 2016. Sucrose Bioconversion in linear and branched dextrans by new α -transglucosylases from GH-70 Family. GDR Symbiose, Paris, France.
12. **Moulis C.**, Claverie M., Molina M, Grimaud F., Benkoulouche M., Severac E., Cioci G., Remaud-Simeon M. 2019. Sucrose bioconversion in linear and branched α -glucans by discovery and engineering of bacterial α -transglucosylases. International Symposium in Green Chemistry., La Rochelle, France.
13. **Moulis C.**, Claverie M., Molina M., Grimaud F., Severac E., Barna L., Ahmadi A., Veronese G., Lippens G., Cioci G., Remaud-Simeon M. 2019. Enlarging the toolbox of GH70 sucrose-active enzymes by mixing discovery and rational engineering. CBM13, Toulouse, France.

Articles choisis (présents en fin de manuscrit)

1. Moulis, C., Joucla, G., Harrison, D., Fabre, E., Potocki-Veronese, G., Monsan, P., Remaud-Simeon, M., 2006. **Understanding the polymerization mechanism of glycoside-hydrolase family 70 glucansucrases.** *J. Biol. Chem.* 281, 31254–31267.
2. Champion, E., Guérin, F., Moulis, C., Barbe, S., Tran, T.H., Morel, S., Descroix, K., Monsan, P., Mourey, L., Mulard, L.A., Tranier, S., Remaud-Siméon, M., André, I., 2012. **Applying pairwise combinations of amino acid mutations for sorting out highly efficient glucosylation tools for chemo-enzymatic synthesis of bacterial oligosaccharides.** *J. Am. Chem. Soc.* 134, 18677–18688.
3. Vuillemin, M., Claverie, M., Brison, Y., Séverac, E., Bondy, P., Morel, S., Monsan, P., Moulis, C., Remaud-Siméon, M., 2016. **Characterization of the First α -(1→3) Branching Sucrases of the GH70 Family.** *J. Biol. Chem.* 291:7687–7702.
4. Vuillemin M., Grimaud F., Claverie M., Rolland-Sabaté A., Garnier C., Lucas P., Monsan P., Dols-Lafargue M., Remaud-Siméon M., and Moulis C., 2018. **A dextran with unique rheological properties produced by the dextransucrase from *Oenococcus kitaharae* DSM 17330.** *Carbohydr. Polym.* 179, 10-18.
5. Claverie M., Cioci G., Vuillemin M., Monties N., Roblin P., Lippens G., Remaud-Simeon M. and Moulis C. 2017. **Investigations on the determinants responsible for low molar mass dextran formation by DSR-M dextransucrase.** *ACS Catalysis.* 7, 7106–7119.
6. Ahmadi, A., Severac E., Monties N., Claverie M., Remaud-Simeon M., Moulis C. & Tiruta-Barna L. 2019. **An eco-design approach for an innovative production process of low molar mass dextran.** *Green Chemistry*, 21: 4512
7. Claverie M., Cioci G., Bondy P., Vuillemin M., Remaud-Simeon M., Moulis C. 2020. **Processivity of dextransucrases synthesizing very high molar mass dextran is mediated by sugar-binding pockets in domain V.** *J. Biol. Chem.* 295, 5602-5613

V. LISTE DES (CO)-ENCADREMENTS

Doctorants

- **Sameh Maktouf** (2010-2013) « Activités amylase et lichenase d'une nouvelle souche de *Bacillus*. Production sur milieu solide et caractérisation ». **30%** de participation effective à la direction de la recherche avec Magali Remaud-Simeon et Samia Ellouz-Ghorbel . Co-signature de **3 articles**.
- **Myriam Amari** (2010-2012) : « Caractérisation d'enzymes productrices de glucanes de bactéries lactiques de levains de panification ». Participation à l'encadrement de thèse (direction Sandrine Morel et Catherine Fontagnié-Faucher). Co-signature de **4 articles**.
- **Marlène Vuillemin** (2011-2014) : « Approche génomique pour l'identification de nouvelles α -transglucosylases de la famille 70 des Glycoside Hydrolases ». Co-direction de la thèse à **50%** avec Magali Remaud-Simeon. Co-signature de **10 articles**. Co-invention de **4 brevets**.
- **Yannick Malbert** (2011-2014): « Engineering of sucrose-active enzymes for flavonoids glucodiversification”. **33%** de participation effective à la direction de la recherche avec Magali Remaud-Simeon et Sandrine Morel. Co-signature de **2 articles**.
- **Marion Claverie** (2013-2017) : “GH70 dextransucrases : insights on the molecular determinants of dextran molar mass control”. **50%** de participation effective à la direction de la recherche avec M. Remaud-Simeon. Co-signature de **5 articles**. Co-invention de **2 brevets**.
- **Mounir Benkoulouche** (2016-2019): “Tailored enzymes for programmed chemo-enzymatic synthesis of antigenic oligosaccharides”. **50%** de participation effective à la direction de la recherche avec Isabelle André. Co-invention d'**1 brevet**, co-signature de **3 articles**, **1 en cours** de soumission.
- **Manon Molina** (2016-2019) : “Exploration of the molecular determinants involved in alternasucrase specificity and stability”. **30%** de participation effective à la direction de la recherche avec M. Remaud-Simeon et S. Morel. Co-signature de **2 articles**, **1 en cours de rédaction**.
- **Thibaud Laffargue** (oct 2019-oct 2022) : “Sustainable and eco-friendly routes to biopolymer functionalization”. **50%** de participation effective à la direction de la recherche avec M. Remaud-Simeon. **1 revue** en cours de rédaction.
- **Elodie Bascans** (déc 2020- déc 2023) : “Generation of new biopolymer assemblies & glycosylation of marine compounds following a biomimicry approach”- **50%** de participation effective à la direction de la recherche avec le Dr Susana Fernandes du laboratoire IPREM- Université de Pau.

Post-doctorants

- **Emmanuelle Cambon**, projet ANR Glucodesign (2009-2011): « Ingénierie à façon de glycoenzymes par des outils de criblage virtuel innovants pour le design de vaccins entériques ». Co-signature de **2 articles**.
- **Delphine Passerini**, projet ANR Engel (2012-2014) : « Ingénierie d'une Plateforme Microbienne pour la Production de Biopolymères et Glycoconjugués ». Co-signature de **2 articles**.
- **Anne-Laure Finoux**, projet précompétitif TWB Apposa, (2013-2014) : « Amélioration de la Production de Protéines d'intérêt par Optimisation à façon de la Stabilité de leurs Transcrits ». Co-signature d'**1 article**.
- **Florent Grimaud**, projet ANR Aspire, (2015-2018) : « Exploration des relations structure-propriétés de copolymères biosourcés ». Co-signature de **3 articles**.

- **Manon Molina**, projet précomptétif TWB Biface (2019-2020): “Bioinspired Functionalization of α -Glucans with enzymes”. **1 article** en cours de rédaction.

Ingénieurs d'études ou de recherche

- **Sophie Guenot**, Ingénieur de recherche sur projet industriel Tate&Lyle, (2009-2010)
- **Martial Kone**, Ingénieur de recherche sur projet FUI Codex, Tate&Lyle (2010-2013), licence de 2 brevets de l'équipe
- **Yannick Malbert**, Ingénieur de recherche sur projet FUI Codex (2010-2013)
- **Florent Grimaud**, Ingénieur de recherche sur projet industriel TWB-compétitif Glucanscreen, (2013-2015)- Co-invention de **3 brevets** ; Projet SNF (2017-2018), licence d'un brevet de l'équipe ; projet industriel Roquette (2018-2019).
- **Romain Irague**, Ingénieur de recherche sur projet Industriel Roquette (2016)
- **Maeva Guelerin**, Ingénieur d'étude sur projet précompétitif TWB Subtilcarbs (2015-2016)
- **Pauline Bondy**, Assistante ingénieur sur projet industriel Olygose (2016)
- **Laure Guillotin**, Ingénieur de recherche sur projet industriel York, Tate&Lyle (2016)
- **Elisabeth Moya-Leclerc**, Ingénieur d'étude, projet précompétitif TWB Droopy (2018-2019), 1 brevet déposé.
- **Maxant Vivier**, Ingénieur de recherche, projet de maturation financé par l'INRAE pour la synthèse d'oligosaccharides prébiotiques à l'échelle de 100 g (2019-2020).

Masters M2 Recherche

- **Lisa Ufarte** (Etudiante INSA-M2, 2012) : « Production et caractérisation biochimique de quatre nouvelles glucane-saccharases issues de bactéries *Leuconostoc* ou *Oenococcus* sp. »
- **Marion Claverie** (Etudiante INSA-M2, 2013) : « Etude des relations structure-fonction de deux glucane-saccharases de la famille GH70 particulièrement originales ».
- **Thibault Craviari** (Etudiant Université Paul Sabatié, Toulouse-M2, 2016) : « Etude biochimique et structurale de la dextranase DSR-M de *L. citreum* NRRL B-1299 ».
- **Dorian Lefebvre** (Etudiant Université de Nancy, Lorraine-M2, 2018) : “Biochemical and structural characterization of computationally designed carbohydrate-active enzymes”. Co-encadrement avec Isabelle André.
- **Thibaud Laffargue** (Etudiant INSA-M2, 2019) : « Green routes for enzymatic phosphorylation of α -glucans ». Co-encadrement avec Etienne Severac.
- **Elodie Bascans** (Etudiante INSA-M2, 2020) : « Caractérisation biochimique des motifs structuraux de la dextrane-saccharase DSRS de *L. mesenteroides* NRRL B-512F responsables de son affinité pour le dextrane ». Co-encadrement avec Etienne Severac.

Stagiaires IUT ou de cycle ingénieur

- **Imane Benamar Abrouche** (étudiante INSA- L3 ICBE, été 2014) : « Développement d'un procédé de synthèse continue de LMM dextrane en une seule étape à partir de saccharose ».

- **Marion Urvoy** (étudiante INSA- M1, été 2016) : « Développement d'une cascade enzymatique pour la synthèse directe d'isomaltotriose à partir de saccharose »
- **Carlos Alvarez Quipse** (étudiant IUT, printemps 2017) : « Etude de la glucosylation à façon de divers arômes à l'aide d' α -transglucosylases de la famille GH70».
- **Elodie Bascans** (étudiante INSA –L3 ICBE, été 2018) : « Production, purification et caractérisation d' α -transglucosylases pour la production d'oligosaccharides synthétiques mimant un motif antigénique ».

