



HAL
open science

Étude cristallographique et fonctionnelle des isoenzymes de l' α -amylase d'orge : leurs structures 3D en action révèlent des modes distincts de reconnaissance des polysaccharides et de nouvelles molécules inhibitrices

Xavier Robert

► To cite this version:

Xavier Robert. Étude cristallographique et fonctionnelle des isoenzymes de l' α -amylase d'orge : leurs structures 3D en action révèlent des modes distincts de reconnaissance des polysaccharides et de nouvelles molécules inhibitrices. Biologie structurale [q-bio.BM]. Université Claude Bernard Lyon 1, 2002. Français. NNT : 2002LYO10059 . tel-04914984

HAL Id: tel-04914984

<https://hal.science/tel-04914984v1>

Submitted on 27 Jan 2025

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

THESE

présentée

devant l'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD – LYON 1
UFR de Chimie - Biochimie

pour l'obtention

du DIPLOME DE DOCTORAT
(arrêté du 30 mars 1992)

présentée et soutenue publiquement le 7 juin 2002

par

Monsieur Xavier ROBERT

ETUDE CRISTALLOGRAPHIQUE ET FONCTIONNELLE
DES ISOENZYMES DE L' α -AMYLASE D'ORGE :
LEURS STRUCTURES 3D EN ACTION REVELENT DES
MODES DISTINCTS DE RECONNAISSANCE DES
POLYSACCHARIDES ET DE NOUVELLES MOLECULES
INHIBITRICES.

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur R. HASER

JURY : Monsieur le Professeur A. J. COZZONE, Président
 Monsieur le Professeur B. DIJKSTRA, Rapporteur
 Monsieur le Docteur H. DRIGUEZ, Rapporteur
 Monsieur le Docteur M. J. O'DONOHUE
 Madame le Docteur B. SVENSSON
 Madame le Docteur N. AGHAJARI
 Monsieur le Docteur R. HASER

Remerciements

Ce travail a été réalisé à l'Institut de Biologie et Chimie des Protéines de Lyon (CNRS – Université Claude Bernard Lyon 1, UMR5086), dans le Laboratoire de BioCristallographie.

Je voudrais exprimer ma profonde gratitude au Pr. Alain Jean Cozzone pour m'avoir accueilli au sein de l'IBCP et témoigné, à plusieurs reprises, sa confiance.

Je suis infiniment reconnaissant au Dr. Richard Haser de m'avoir donné l'opportunité d'intégrer son laboratoire, de me former à la discipline de la cristallographie biologique et d'avoir dirigé ces travaux avec tout son enthousiasme et ses qualités humaines.

Mes plus sincères remerciements vont aussi au Dr. Nushin Aghajari qui a assuré mon encadrement scientifique tout au long de cette étude. Je voudrais lui témoigner ma reconnaissance pour son écoute dans les moments difficiles, pour ses conseils et sa rigueur dont j'espère encore pouvoir bénéficier.

J'adresse aussi ma gratitude aux Pr. Bauke Dijkstra et Dr. Hugues Driguez pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, ainsi qu'aux Pr. Alain Jean Cozzone, Dr. Birte Svensson et Dr Michael O'Donohue de m'avoir fait l'honneur de bien vouloir juger mes travaux.

J'envoie mes plus chaleureux remerciements à toutes les personnes qui ont collaboré à l'accomplissement de cette étude et plus particulièrement aux participants du programme Européen « AGADE » : Birte Svensson, Haruhide Mori, Morten Tovborg Jensen, Kristian Sass Bak-Jensen et Tine Gottschalk du *Département de Chimie du Carlsberg Laboratory* à Copenhague ; Hugues Driguez, Lionel Greffe et Sylvain Cottaz du *Laboratoire de Glycochimie et Enzymologie Moléculaire du CERMAV* à Grenoble. Qu'ils soient tous remerciés pour leur passion et les échanges stimulants que nous avons pu avoir au cours de ces années.

Je souhaiterais aussi remercier Gilles Mithieux et Carine Zitoun (*Laboratoire de physiologie moléculaire de la production endogène de glucose – INSERM U449, Faculté de Médecine Laënnec, Lyon*) ainsi que Bertrand Carboni, Alain Hercouet et Françoise Possemee-Ottaz (*SESO – CNRS, Université de Rennes, UMR6510*) pour leur collaboration dans le projet CNRS/INSERM « Molécules et Cibles Thérapeutiques ».

Je n'oublierais évidemment pas les membres du Laboratoire de BioCristallographie : Michel, Patrice, Fabrice, le « petit » Sébastien et les « petites » Marine et Stéphanie, à qui je vais pouvoir enfin consacrer plus de temps (pour témoins, quelques phrases prises au hasard : « J'ai tout planté... », « Alors, ce réseau ? », « Alors ce serveur ? », « On veut l'interface graphique », « j'comprends paaaas... », « Nous n'avions pas acheté une SGI, il y a 6 mois ? », « Y a plus de café » et ainsi *ad lib.*). Toutes mes pensées vont aussi vers ceux qui ne sont plus parmi nous et qui nous manquent : David (☹️🙏!), Goetz (P.....g!) et tous les stagiaires que nous avons accueillis.

Merci à tous mes collègues et amis de l'IBCP, pour les bons moments passés et, je l'espère, futurs. Je cite à la volée : David, Jean, Bernard, Pascal, Denise, Sophie, Claudine, Jane, Sylvie, Jean-Michel, Marie-Ange, Mounir, Christophe#1, Christophe#2, Christophe#3 (ils se reconnaîtront !), Gilbert, Martin, Roland, François, Tony, Stéphanie, André, Lotfi,...

Petite pensée aux anciens Lyonnais Laure & Olivier, et pour le « à nouveau » Lyonnais Damien (loooollll !) pour les années estudiantines et tous les autres précieux moments passés ensemble.

Et selon l'expression consacrée, pour les derniers, mais non les moindres : merci infiniment à mes parents pour leur soutien, leur patience et, quoi qu'ils en aient pensé,... pour l'Oric (!), à ma petite mais si proche famille, dont deux personnes nous manquent énormément aujourd'hui. Enfin, ma dernière pensée ira à Charlotte, pour sa patience, ses attentions et sa présence.

Personne ne nous impose de savoir.
Il le faut, un point c'est tout, fût-ce au prix de mal comprendre.

UMBERTO ECO – « *Le Nom de la Rose* », 1982

*À mon grand-père Arthur,
qui m'a montré, sans le savoir, un chemin que j'ai emprunté ;*

*À mes parents et grand-mères,
qui m'y ont accompagné ;*

*À mon grand-père Julien,
qui aurait tant aimé en voir la fin ;*

*À Charlotte,
pour tous les autres chemins qui restent à découvrir.*

Xavier

Résumé

Le grain d'orge contient deux isoenzymes de la famille des α -amylases (AMY1 et AMY2) qui sont impliqués dans la dégradation de l'amidon nécessaire à la croissance de l'embryon de plante. La structure tridimensionnelle de AMY2 (résolue par cristallographie et diffraction des rayons X) est connue dans son état natif, mais aussi en complexe, d'une part avec l'acarbose (un pseudo-tétrasaccharide inhibiteur) et d'autre part avec l'inhibiteur protéique bifonctionnel endogène BASI. Malgré leur très grande similitude de séquence, AMY1 et AMY2 se distinguent à plusieurs niveaux : point isoélectrique, stabilité à pH acide ou à haute température, affinité pour les ions calcium et pour les substrats solubles, efficacité différente pour l'hydrolyse des granules d'amidon. Enfin, seul AMY2 est inhibé par BASI.

Cette étude présente la structure native de AMY1, résolue par cristallographie, et l'analyse comparée des deux isoenzymes, en vue d'expliquer leurs remarquables différences de propriétés. La résolution des structures des complexes avec l'acarbose et des analogues de substrat fournit également des informations sur les mécanismes d'hydrolyse et d'inhibition de AMY1. De plus, la structure d'un complexe entre AMY1 et un substrat naturel (maltoheptaose) nous a permis d'étudier en détail les différents sous-sites de fixation du substrat à l'enzyme et d'identifier un nouveau site de surface pouvant lier des polysaccharides. Ce site, présent uniquement chez AMY1, révèle pour la première fois, le rôle du domaine C d'une α -amylase. Enfin, la découverte d'une nouvelle classe potentielle d'inhibiteurs de glycosidases de type polyamine est présentée. Un complexe AMY1/spermidine a montré que la polyamine se fixait préférentiellement dans le site actif, même en présence d'acarbose. Cette propriété semble pouvoir s'étendre à d'autres α -amylases (notamment humaine) et servir de base à la conception de nouveaux inhibiteurs à visées thérapeutiques.

Summary

Barley grains contain two isozymes from the α -amylase family (namely AMY1 and AMY2) which are implicated in the degradation of starch, necessary for plant embryo growth. The three dimensional structure of AMY2 (solved by X-Ray crystallography) is known in its native state, in complex with acarbose (a pseudo-tetrasaccharide inhibitor) and also with the proteinaceous bifunctional endogenous inhibitor BASI. Despite their high sequence similarities, AMY1 and AMY2 can be distinguished in several aspects: isoelectric point, stability at acidic pH or elevated temperature, affinity for calcium ions or soluble substrates, distinct efficiency in starch granule hydrolysis. Finally, only AMY2 is inhibited by BASI.

This study presents the native structure of AMY1, solved by X-Ray crystallography, and the comparative analysis of the two isozymes, in order to explain their remarkable differences in properties. Solved structures of complexes with acarbose and substrates analogues give also insight in AMY1 hydrolysis and inhibition mechanisms. Moreover, the structural complex between AMY1 and a natural substrate (maltoheptaose) has led us to analyse the different substrate binding subsites and to identify a new surface site with the ability to bind polysaccharides. This site, only present in AMY1, reveals for the first time, the role of an α -amylase domain C. Finally, the discovery of a new potential class of glycosidase inhibitors from the polyamine chemical family is presented. An AMY1/spermidine complex has shown that the polyamine binds preferentially in the active site, even in presence of acarbose. This property could be extended to others α -amylases (notably human) and provides the basis for the design of new inhibitors of potential interest for therapeutic applications.

Table des matières

Table des matières	9
Abréviations et unités utilisées	13
Introduction Bibliographique	15
I - Les α-amylases, caractéristiques générales	17
A/ Les α -amylases, membres de la famille des glycosyle hydrolases	17
B/ La famille 13 des glycosyle hydrolases	17
C/ Les mécanismes d'action des glycosyle hydrolases	18
1. Mécanisme d'hydrolyse avec rétention de configuration du carbone anomérique	18
2. Mécanisme d'hydrolyse avec inversion de configuration du carbone anomérique	19
3. Site actif et sous-sites de fixation du substrat	20
D/ Les structures connues des α -amylases	20
II - Les substrats des α-amylases	23
A/ L'amidon	23
1. Composition chimique de l'amidon	23
2. Stockage de l'amidon par les plantes	23
B/ L'amylose	24
1. Structure de l'amylose	24
2. Biosynthèse de l'amylose	25
C/ L'amylopectine	25
1. Structure de l'amylopectine	25
2. L'amylopectine explique la structure cristalline de l'amidon	26
D/ Dégradation et modification enzymatiques de l'amidon	27
1. Dépolymérisation de l'amidon	27
1.a) Hydrolyse des liaisons α -(1,4)	28
1.b) Hydrolyse des liaisons α -(1,6)	28
1.c) Activité mixte : hydrolyse des liaisons α -(1,4) et α -(1,6)	28
2. Réactions de cyclisation	28
2.a) Mécanismes d'action des CGTases	29
2.b) Relations structure / fonction chez la CGTase	29
III - Les inhibiteurs des α-amylases	31
A/ Les inhibiteurs de type pseudo-polysaccharidique	31
1. Les oligostatines	31
2. Les trestatines	32
3. La famille des amylostatines et l'un de ses membres : l'acarbose	32
4. Inhibiteurs de type thiooligosaccharidique	34
B/ Les inhibiteurs de nature protéique	35
1. Inhibiteurs d'origine microbienne	35
2. Inhibiteurs d'origine végétale	34
3. Tris comme inhibiteur de plusieurs glycosidases	36
IV - Applications industrielles des α-amylases	35
A/ Industrie alimentaire	35
B/ Industrie des détergents	35
C/ Industrie textile	35
D/ Industrie du papier	36
V - Les α-amylases comme cibles thérapeutiques : implications en diabétologie	37
A/ Le rôle des α -amylases dans la digestion	37
B/ Le diabète, une maladie d'envergure mondiale	37
C/ Définition générale du diabète	38
1. Classification	39
2. Fréquence des maladies diabétiques	39
3. Epidémiologie du diabète de type 1 (DID)	39
4. Epidémiologie du diabète de type 2 (DNID)	40
D/ Causes physiologiques des diabètes de type 1 et de type 2	40

E/ Diagnostic des diabètes de type 1 et de type 2	40
1. Clinique	40
2. Biologique	40
F/ Complications métaboliques aiguës des diabètes de type 1 et de type 2	41
G/ Traitement	41
1. Traitement du diabète de type 1	41
2. Traitement du diabète de type 2	41
2.a) Les sulfamides hypoglycémiants	41
2.a.1) Mécanismes d'action	43
2.a.2) Efficacité des sulfamides hypoglycémiants	43
2.a.3) Effets secondaires des sulfamides hypoglycémiants	43
2.b) Les Biguanides	43
2.b.1) Mécanismes d'action	43
2.b.2) Effets secondaires des Biguanides	43
2.c) Les inhibiteurs des α -glycosidases et des α -amylases	43
2.c.1) Miglitol	44
2.c.2) Acarbose	44
VI - Les deux isoenzymes de l'α-amylase d'orge : AMY1 et AMY2	47
A/ Préambule	47
B/ Connaissances antérieures sur AMY2	47
1. Structure 3D de AMY2 : les différents domaines	47
1.a) Le domaine A	48
1.b) Le domaine B et ses sites de fixation d'ions calcium	49
1.c) Le domaine C	49
2. Les sites de fixation du substrat chez AMY2	49
2.a) Site de surface	49
2.b) Site actif	50
3. Mécanisme d'action proposé pour AMY2	53
4. Mode d'inhibition de AMY2 par BASI	53
C/ Connaissances antérieures sur AMY1 et comparaison AMY1 / AMY2	54
1. Comparaison des séquences de AMY1 et AMY2	54
2. Comparaison des propriétés physico-chimiques et enzymatiques de AMY1 et AMY2	54
2.a) Des propriétés et caractéristiques remarquablement différentes	54
2.b) Les zones et résidus déterminant les spécificités propres de AMY1 et AMY2	56
D/ Ingénierie protéique rationnelle de AMY1	57
E/ Action in vivo de AMY1 et AMY2	58
Matériels et méthodes	59
Préambule	61
A/ Cristallogenèse et techniques associées	61
1. Principe général	61
2. Les facteurs influençant la cristallisation	62
3. La diffusion en phase vapeur – technique de la goutte suspendue	62
4. Croissance des cristaux	63
5. Trempage des cristaux (« crystal soaking »)	64
B/ Obtention et enregistrement des données de diffraction	64
1. Le générateur de rayons X à anode tournante	64
2. Le rayonnement synchrotron	65
3. Le détecteur de type « Image Plate »	67
4. Les expériences en conditions cryogéniques	67
C/ Du traitement des données jusqu'aux cartes de densité électronique	68
1. La diffraction	68
2. Intégration, réduction et mise à l'échelle des données	69
3. Le problème des phases	70
3.a) la méthode MIR (« Multiple Isomorphous Replacement »)	70
3.b) La méthode MAD (« Multiple Anomalous Diffraction »)	71
3.c) Le remplacement moléculaire	71

D/ Affinement du modèle : vers la structure finale	73
1. L'affinement en corps rigide (« rigid body refinement »)	73
2. L'affinement par gradient conjugué de Powell	74
3. L'affinement par recuit simulé	74
4. Agitation thermique	75
E/ Autres logiciels utilisés	75
Résultats et Discussion	77
Cristallisation de AMY1	79
A/ <u>Publication n°1</u> : <i>Expression, purification and preliminary crystallographic studies of α-amylase isozyme 1 from barley seeds</i>	80
B/ Détermination des conditions de cryo-protection des cristaux de AMY1 Δ 9 :	85
Structure native de AMY1 et premiers éléments de comparaison avec AMY2	87
<u>Publication n°2</u> : <i>Comparison of crystal structures of barley α-amylase 1 and 2: implications for isozyme differences in stability and activity</i>	88
Abstract	89
Introduction	90
Materials and methods	90
Crystallization of full-length and truncated AMY1	90
Data collection, structure solution, refinement	90
Sequence and structure alignment	91
Results	91
Overall structure	91
Calcium binding sites	92
Active Site	93
The starch granule-binding surface site	93
The interface of the protein-protein complex AMY2-BASI and its counterpart in AMY1	94
Discussion	95
References	96
La structure de AMY1 en complexe avec un analogue de substrat révèle un second site de surface et donne une fonction au domaine C	105
A/ <u>Article n°3</u> : <i>The structure of barley α-amylase isozyme 1 reveals a novel role of domain C in substrate recognition and binding: "a pair of sugar tongs"</i>	106
Introduction	107
Results and Discussion	108
Overall structure	108
Analysis of the catalytic sites reveals a fourth Ca ²⁺ ion in AMY1/thio-DP4	109
The starch granule-binding surface site	109
AMY1-specific surface binding site in domain C: the "sugar tongs"	110
Structural comparison of C domains from AMY1, AMY2 and 11 α -amylases from different species	111
Biological implications	112
Materials and methods	113
Crystallization, data collection and processing, structure refinement	113
Alignment and figure rendering	114
Accession number	114
References	125
B/ Déterminants structuraux de la géométrie du site de surface de fixation des granules d'amidon	129
C/ Le site actif de AMY1 comme quatrième site de fixation d'un ion calcium ?	131
Modalités de reconnaissance et d'interaction d'un substrat naturel au niveau des sites de surface et caractérisation structurale des sous-sites de fixation chez AMY1	133
A/ Matériels et méthodes	134
1. Cristallisation, procédures de trempage et de cryoprotection	134
2. Enregistrement des données de diffraction	135
3. Détermination de la structure et affinement du modèle	135
B/ Résultats et discussion	136
1. Complexe entre le mutant inactif AMY1 Δ 9 _{D180A} et le substrat maltoheptaose	136
1.a) Examen du site actif et de la crevasse catalytique	137

1.b) Site de surface de fixation des granules d'amidon	143
1.c) Site de surface du domaine C en « pince à sucre »	144
2. Complexe entre le mutant inactif <i>AMY1Δ9_{D180A}</i> et l'acarbose	144
2.a) Site actif	144
2.b) Site de surface de fixation des granules d'amidon	145
2.c) Site de surface du domaine C en « pince à sucre »	145
3. Complexe entre <i>AMY1Δ9</i> et l'acarbose	145
3.a) Les sites de surface	145
3.b) Comparaison des sites actifs dans les complexes <i>AMY1Δ 9/ acarbose</i> et <i>AMY2 / acarbose</i>	147
4. Synthèse des résultats et description structurale des sous-sites -7 à +2 chez <i>AMY1</i>	147
5. Hypothèses de mécanisme d'action de <i>AMY1</i>	149
5.a) Rôle des sites de surface	149
5.b) Mécanisme d'hydrolyse	149
6. Similitudes structurale entre <i>AMY1</i> et la CGTase de <i>Bacillus circulans</i>	150
Vers une nouvelle classe d'inhibiteurs de glycosidases : Polyamines d'intérêt potentiel en pharmacologie et diabétologie	153
A/ Description et résumé de l'invention	154
B/ Etat de l'art	155
C/ Contexte de l'invention et importance de l'innovation	155
D/ Objectif de l'étude	155
E/ Avantages techniques et économiques de l'invention	156
F/ Antériorité	156
G/ Matériels et méthodes	157
1. Conditions de cristallisation	157
2. Enregistrement des données de diffraction	157
3. Détermination de la structure 3D du complexe <i>AMY1 / spermidine</i>	157
H/ Résultats et discussion	158
I/ Etudes d'interactions spermidine / α -amylases de diverses origines par modélisation moléculaire	163
1. α -Amylases utilisées dans l'étude	163
2. Matériels et méthodes	163
3. Résultats	164
4. Discussion	166
J/ Complexes entre des polyamines dérivées de la spermidine et l' α -amylase d'orge <i>AMY1</i> : étude par cristallographie aux rayons X	168
1. Conditions de trempage avec les polyamines	168
2. Collecte et traitement des données de diffraction	168
3. Détermination des structures 3D des différents complexes	169
4. Résultats	169
5. Discussion	171
K/ Conclusions et extensions : arguments structuraux pour la conception de molécules de type glycopolyamine comme inhibiteurs d' α -amylases	172
1. Modes d'inhibition comparés de la spermidine et de l'acarbose	172
2. Molécules de type glycopolyamine	172
3. Synthèses des conjugués spermidine / malto-oligosaccharides	173
Conclusions et Perspectives	175
Annexes	179
Annexe 1 – Quelques cristaux obtenus et utilisés dans le cadre de l'étude	181
Annexe 2 – Publications personnelles présentées dans l'étude	182
Annexe 3 – Collaborations scientifiques	183
Références Bibliographiques	185

Abréviations et unités utilisées :

Å	:	Angström (1 Å ↔ 10 ⁻¹⁰ mètres)
ACID	:	α-Amylase de <i>Aspergillus niger</i>
ADP	:	Adénosine diphosphate
A	:	Ampère (A, mA)
AFM	:	<i>Atomic force microscopy</i> (microscopie de force atomique)
AHA	:	α-Amylase de <i>Alteromonas haloplanctis</i>
ALFEDIAM	:	Association de Langue Française pour l'Etude du Diabète et des Maladies Métaboliques
AMY1	:	Isoenzyme 1 de l'α-amylase d'orge
AMY1Δ9	:	Isoenzyme 1 de l'α-amylase d'orge tronqué de 9 résidus C-terminaux
AMY2	:	Isoenzyme 2 de l'α-amylase d'orge
ARN	:	Acide ribonucléique
ATP	:	Adénosine triphosphate
BASI	:	<i>Barley α-amylase / subtilisin inhibitor</i>
BIAM	:	Banque de Données Automatisée sur les Médicaments
BLA	:	α-Amylase de <i>Bacillus licheniformis</i>
BMCD	:	Banque « <i>Biological Macromolecule Crystallization Database</i> »
BSA	:	<i>Bovine serum albumin</i>
C (°C)	:	Degré Celsius
C-	:	Carboxy-
CCD	:	<i>Charge Coupled Device</i>
CCP4	:	<i>Collaborative Computational Project number 4</i>
CGTase	:	<i>Cyclodextrin glycosyl transferase</i>
CI-PNPG7	:	2-chloro-4-nitrophényl β-D-maltoheptaoside
CNRS	:	Centre National de la Recherche Scientifique
CNS	:	Logiciel « <i>Crystallographic & NMR systems</i> » (Brünger <i>et al.</i> , 1998)
Da	:	dalton (kDa, Da)
DID	:	Diabète insulino-dépendant
DNID	:	Diabète non insulino-dépendant
DO	:	Densité optique
DP(n)	:	Degré de polymérisation (n)
<i>E. coli</i>	:	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	:	Acide diamine-éthylène-tétraacétique
ESRF	:	Synchrotron « <i>European Synchrotron Radiation Facility</i> »
eV	:	Electron-volt (eV, GeV)
FIP (ligne)	:	<i>French beamline for Investigation of Proteins</i> (ESRF)
g	:	Gramme (kg, g, mg, µg, ng)
GBSSI	:	<i>Granule-bound starch synthase I</i>
HCl	:	Acide chlorhydrique
HEPES	:	Acide [(hydroxy-2-éthyl)-4-pipérazinyl-1]-2-éthane sulfonique
HPA	:	<i>Human pancreatic α-amylase</i> (α-amylase pancréatique humaine)
HSA	:	<i>Human salivary α-amylase</i> (α-amylase salivaire humaine)
IEF	:	<i>Iso-electrofocusing</i>
INSERM	:	Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
l	:	Litre (l, ml, µl, nl)
LASER	:	<i>Light Amplification Stimulated Energy Ray</i>
LURE	:	Laboratoire pour l'Utilisation du Rayonnement Electromagnétique
m	:	Mètre (m, mm, µm, nm)
M	:	Molaire (M, mM, µM, nM)
MAD	:	Méthode dite « <i>Multiple Anomalous Diffraction</i> »

MAR180	:	Détecteur MARresearch « <i>Image Plate</i> » de 180 mm de diamètre
MAR345	:	Détecteur MARresearch « <i>Image Plate</i> » de 345 mm de diamètre
MES	:	Acide 2-(N-morpholino)-ethane sulfonique
MIR	:	Méthode dite « <i>Multiple Isomorphous Replacement</i> »
MM	:	Masse moléculaire
MPD	:	2-methyl-2,4-pentanediol
MW	:	<i>Molecular weight</i> (masse moléculaire)
N-	:	Amino-
K	:	Degré Kelvin
K_d	:	Constante de dissociation
PCR	:	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (réaction de polymérisation en chaîne)
PEG	:	Polyéthylène glycol
PDB	:	Banque de structure « <i>Protein Data Bank</i> »
PM	:	Poids moléculaire
PNPG7	:	<i>p</i> -nitrophényl α -D-maltoheptaoside
PPA	:	<i>Pancreatic porcine α-amylase</i> (amylase de pancréas de porc)
RAM	:	<i>Random Access Memory</i>
RASI	:	<i>Rice α-amylase / subtilisin inhibitor</i>
RCSB	:	<i>Research Collaboratory for Structural Bioinformatics</i>
R_{libre} (R_{free})	:	Facteur d'accord R libre
RMN	:	Résonance Magnétique Nucléaire
r.m.s.d	:	<i>Root mean square deviation</i>
s	:	seconde (s, ms)
SGI	:	Compagnie « <i>Silicon Graphics Industries</i> »
TAKA	:	α -Amylase de <i>Aspergillus oryzae</i>
TMA	:	α -Amylase de <i>Tenebrio molitor</i>
Tris	:	2-amino-2-(hydroxyméthyl)-1,3 propanediol
TVAII	:	α -Amylase de <i>Thermoactinomyces vulgaris</i>
U	:	Unité
u.a	:	Unité asymétrique
UI	:	Unité Internationale
V	:	Volt (kV, V)
W	:	Watt (kW, W)
WASI	:	<i>Wheat α-amylase / subtilisin inhibitor</i>

Abbréviations des acides aminés					
Code à trois lettres	Code à une lettre	Nom complet	Code à trois lettres	Code à une lettre	Nom complet
Ala	A	Alanine	Met	M	Méthionine
Cys	C	Cystéine	Asn	N	Asparagine
Asp	D	Aspartate	Pro	P	Proline
Glu	E	Glutamate	Gln	Q	Glutamine
Phe	F	Phénylalanine	Arg	R	Arginine
Gly	G	Glycine	Ser	S	Sérine
His	H	Histidine	Thr	T	Thréonine
Ile	I	Isoleucine	Val	V	Valine
Lys	K	Lysine	Trp	W	Tryptophane
Leu	L	Leucine	Tyr	Y	Tyrosine

Partie 1

Introduction Bibliographique

Chapitre 1

Les α -amylases, caractéristiques générales

On désigne par α -amylases (E.C.3.2.1.1) les enzymes ayant une activité 1,4- α -D-glucane glucanohydrolasique. Ce sont des enzymes majeurs, présents chez un grand nombre d'espèces vivantes. On les retrouve dans une large variété de plantes, bactéries, champignons, insectes et animaux supérieurs (Huang *et al.*, 1992; Janecek, 1994). Leur rôle biochimique est de dégrader l'amidon, le glycogène et les poly- et oligosaccharides apparentés. Ils hydrolysent les liaisons α -1,4-glucosidiques selon un mécanisme de type « endo » avec rétention de la configuration du carbone anomérique. De ce fait, les produits de réaction sont des oligosaccharides de tailles variées possédant une unité glucose en configuration α à leur extrémité réductrice.

A/ Les α -amylases, membres de la famille des glycosyle hydrolases :

En terme de classification enzymatique, les α -amylases sont des glycosyle hydrolases (E.C.3.2.1.x, selon la nomenclature IUB-IUPAC (JCBN, 1984)). Les enzymes, au sein de cette nomenclature, sont classés selon les réactions qu'ils catalysent. Les trois premiers chiffres indiquent l'hydrolyse des liaisons O-glycosidiques, tandis que le dernier définit la nature du substrat et parfois le type de mécanisme réactionnel. Ainsi, les enzymes ayant des spécificités multiples peuvent être affectés à différentes sous-classes enzymatiques.

Avec l'avancée des études biochimiques, enzymatiques et structurales des glycosyle hydrolases, ce classement a vite montré des limitations. Par exemple, il ne rend pas compte des caractéristiques structurales des enzymes, de leur type d'évolution, ou du fait que certains sont spécifiques de plusieurs substrats.

Ainsi, une nouvelle classification a été établie (Henrissat & Bairoch, 1993; Henrissat & Bairoch, 1996; Coutinho & Henrissat, 1999). Elle s'appuie désormais sur les similarités de séquences d'acides aminés. Elle a permis de définir différentes familles de glycosyle hydrolases, familles qui peuvent elles mêmes être regroupées en clans. De cette manière, la classification devient plus fine : chaque famille possède un repliement ainsi qu'un mécanisme propre, et ce, même si ses membres agissent sur différents substrats ou proviennent, en terme d'évolution, d'organismes très éloignés.

Du fait du dynamisme des recherches qui entourent les glycosyle hydrolases, ce classement est très régulièrement réactualisé. A ce jour, 87 familles de glycosyle hydrolases ont été décrites. La liste des séquences de leurs membres est consultable en ligne sur la banque de données SWISSPROT (Bairoch & Apweiler, 2000) à l'adresse <http://www.expasy.ch/cgi-bin/lists?glycosid.txt>. Par ailleurs, la banque de données CAZy (Coutinho & Henrissat, 1999) rassemble et classe les informations sur les membres des familles des glycosyle hydrolases. Elle propose, de plus, des liens croisés vers des banques externes de séquences (protéiques et nucléiques) ou de structures.

B/ La famille 13 des glycosyle hydrolases :

Les enzymes impliqués dans la transformation de l'amidon sont répartis dans 6 familles différentes. Les enzymes y sont distribués en tenant compte :

- du mode d'attaque de l'enzyme sur l'amidon, c'est à dire : endo- ou exo-enzyme ;
- de l'anomérisation du produit de réaction, avec la notion de rétention ou d'inversion de configuration du carbone anomérique (Koshland, 1953) ;
- de la nature de la liaison glycosidique attaquée : α -(1,4), α -(1,6) ou les deux ;
- de la réaction catalysée (hydrolyse ou transglycosylation).

Les α -amylases ont été classées dans la **famille 13**. Cette famille compte aussi comme membres des : pullulanases (E.C.3.2.1.41), cyclomaltodextrine glucanotransférases (E.C.2.4.1.19), cyclomaltodextrinases (E.C.3.2.1.54), tréhalose-6-phosphate hydrolases (E.C.3.2.1.93), oligo- α -glucosidases (E.C.3.2.1.10), amylases maltogéniques E.C.3.2.1.133), néopullulanases (E.C.3.2.1.135), α -glucosidases (E.C.3.2.1.20), « *maltotetraose-forming* » α -amylases (E.C.3.2.1.60), isoamylases (E.C.3.2.1.68), glucodextranases (E.C.3.2.1.70), « *maltohexaose-forming* » α -amylases (E.C.3.2.1.98), « *branching enzymes* » (E.C.2.4.1.18), tréhalose synthétases (E.C.5.4.99.16), 4- α -glucanotransférases (E.C.2.4.1.25), « *malto pentaose forming* » α -amylases (E.C.3.2.1.-), amylosucrases (E.C.2.4.1.4) et sucrose phosphorylases (EC 2.4.1.7).

Il est important de noter que quelques α -amylases de séquences connues ont été classées en dehors de la famille 13. Elles sont d'origine procaryote et ont en commun des propriétés thermophiles. Elles ont été affectées à la famille 57.

A la date du 1^{er} mars 2002, la banque de données CAZy recense 879 membres dans la famille 13 avec 112 structures déposées dans la *Protein Data Bank* (Berman *et al.*, 2000) (ceci tenant compte des structures des enzymes natifs, des mutants et des complexes).

C/ Les mécanismes d'action des glycosyle hydrolases :

Les membres de la famille 13 des glycosyle hydrolases agissent selon un mécanisme de rétention de configuration du carbone anomérique et ont en commun le même processus moléculaire d'hydrolyse. A l'opposé, et à titre d'exemple, les β -amylases et les glucoamylases (familles 14 et 15), les α -glucosidases, les glucoamylases et les maltases / isomaltases (famille 31) agissent par rétention de configuration.

Bien que donnant des produits d'hydrolyse différents, ces deux mécanismes mettent en jeu deux résidus formant un couple donneur de proton (catalyseur acide/base) - nucléophile (base). Le substrat subit une déformation le faisant passer d'une conformation « chaise » à celle dite en « demi-chaise » (Strynadka & James, 1991; Kuroki *et al.*, 1993). En outre, la protonation de la liaison osidique (voir ci-après) déterminerait, de manière transitoire, un allongement de cette dernière (Tanaka *et al.*, 1994).

1. Mécanisme d'hydrolyse avec rétention de configuration du carbone anomérique :

La caractéristique majeure de ce mécanisme est de comporter deux étapes distinctes. La première détermine la formation transitoire d'un intermédiaire glycosyle-enzyme covalent, et la seconde correspond à la rupture de cette liaison covalente, correspondant à la phase de « déglycosylation » de l'enzyme.

La **Figure 1**, ci-après, présente de manière schématique ce mécanisme. Dans un premier temps, l'atome d'oxygène de la liaison osidique qui va subir l'hydrolyse est protoné par le résidu catalytique acide (-A-H sur la figure). Simultanément, le résidu noté -B⁻ agit comme nucléophile/base. Cette attaque concertée (de type SN1) détermine la libération du produit du

coté aglycone de la liaison (noté R-OH sur la figure), ainsi que la création du glycosyle-enzyme par liaison covalente.

Lors de la deuxième étape, une nouvelle substitution nucléophile intervient : l'intermédiaire covalent est hydrolysé par une molécule d'eau jouant le rôle de nucléophile. Ceci cause la reprotonation du donneur de proton ainsi que la formation d'un produit de même conformation que le substrat initial (Koshland, 1953; Sinnott, 1990; McCarter & Withers, 1994; Davies & Henrissat, 1995; Yamamoto, 1995).

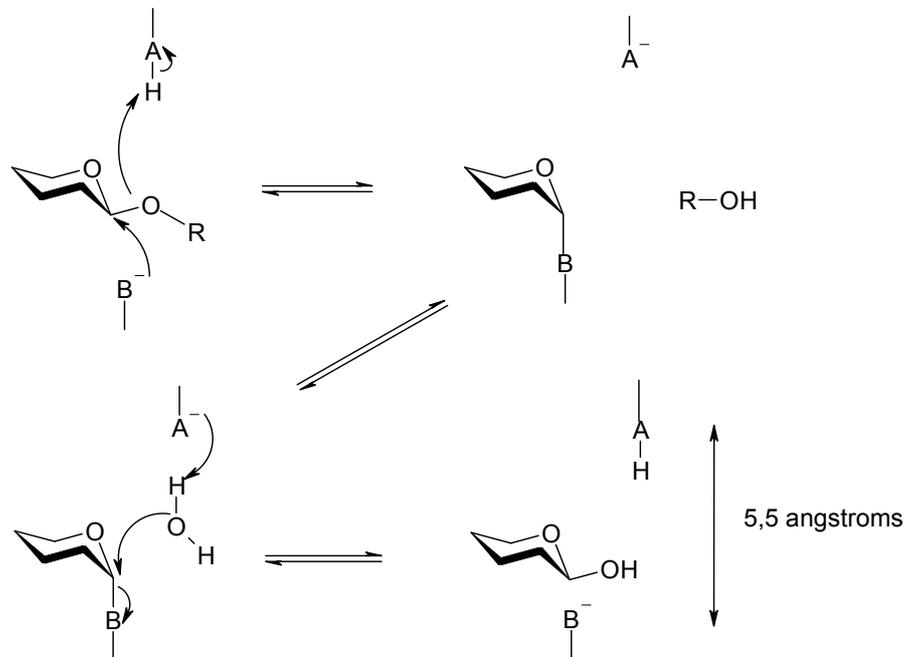


Figure 1 : Représentation schématique de l'hydrolyse d'une liaison glycosidique (ici en configuration β) selon un mécanisme de rétroaction de configuration du carbone anomérique (reproduit de Davies & Henrissat, 1995).

Au sein de la famille 13, un acide aspartique ainsi qu'un acide glutamique sont engagés dans ce mécanisme : le premier joue le rôle de base/nucléophile et le second celui de donneur de proton. Compte tenu du mécanisme décrit, ces deux résidus sont proches dans l'espace. En effet, le résidu catalytique base/nucléophile doit être à proximité du carbone anomérique qui va être attaqué. Ainsi, pour les enzymes possédant un mécanisme d'hydrolyse avec rétroaction de configuration, on estime que la distance moyenne entre les fonctions carboxyliques de ces deux résidus catalytiques est de l'ordre de 5,5 Å (McCarter & Withers, 1994).

2. Mécanisme d'hydrolyse avec inversion de configuration du carbone anomérique :

Contrairement au mécanisme précédent, l'hydrolyse avec inversion de configuration du carbone anomérique se fait en une seule étape (voir **Figure 2**, page suivante) : la protonation de l'oxygène glycosidique, l'attaque d'une molécule d'eau déprotonée par le résidu $-B^-$ (base/nucléophile) et le départ de l'aglycone se produisent de manière synchrone et concertée. Pour cela, il est nécessaire qu'une molécule d'eau se positionne entre la base et la liaison osidique à hydrolyser. En conséquence, la distance entre les deux résidus catalytiques est supérieure à celle observée pour les enzymes agissant selon un mécanisme de rétroaction de configuration. Une valeur moyenne d'environ 10 Å est proposée (McCarter & Withers, 1994).

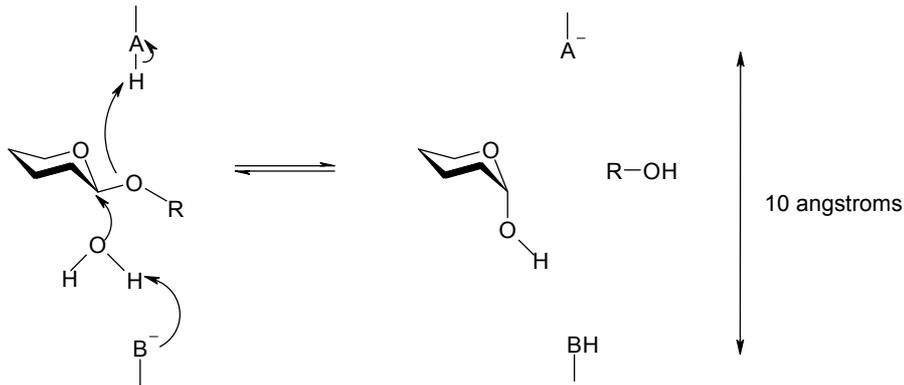


Figure 2 : Représentation schématique de l'hydrolyse d'une liaison glycosidique selon un mécanisme d'inversion de configuration du carbone anomérique (reproduit de Davies & Henrissat, 1995).

3. Site actif et sous-sites de fixation du substrat :

L'amidon, substrat des glycosyle hydrolases, est un polymère de glucose. De ce fait, les sites actifs de ces enzymes comportent des sous-sites de fixation dans lesquels se fixe une seule unité glucose (voir **Figure 3**). Par définition, la liaison hydrolysée se situe entre les unités glucose liées aux sous-sites -1 et +1 (Davies *et al.*, 1997). Les extrémités réductrices et non réductrices du substrat sont positionnées du côté des sous-sites positifs et négatifs, respectivement. Les glycosyle hydrolases possèdent un nombre varié de sous-sites, tant du côté positif que du côté négatif.

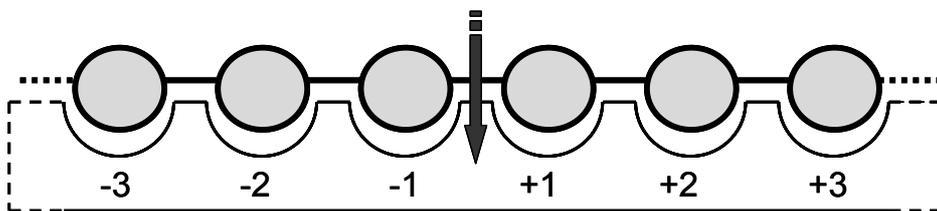


Figure 3 : Représentation schématique des sous-sites de fixation (selon Davies *et al.*, 1997) : l'extrémité réductrice du substrat est positionnée du côté des sous-sites positifs. Les sous-sites du côté non réducteur sont numérotés de -1 à -3 et les sous-sites du côté réducteur, de +1 et +3 dans cet exemple. L'hydrolyse (symbolisée par la flèche rouge) de la liaison glycosidique se déroule, par définition, entre les sous-sites -1 et +1.

D/ Les structures connues des α -amylases :

Les α -amylases sont des protéines multidomaines. Elles ont toutes en commun un domaine catalytique formé par un tonneau $(\beta/\alpha)_8$ (ou « *TIM barrel* ») (Banner *et al.*, 1975). Ce repliement a été minutieusement analysé (Pujadas & Palau, 1999), de même que les résidus clés impliqués dans sa stabilisation chez les α -amylases (Pujadas & Palau, 2001).

A ce jour, 49 structures d' α -amylases sont déposées dans la PDB, toutes résolues par cristallographie et diffraction des rayons X. Ce nombre correspond aux structures natives, aux mutants et aux complexes enzyme/substrat ou enzyme/inhibiteur. On dénombre 12 entrées dans la PDB correspondant à des structures natives d' α -amylases, appartenant à 12 espèces différentes (une de plante, cinq de microorganismes, trois de mammifères (dont 2 humaines), une de larve d'insecte et deux de champignons) – voir **Tableau 1**, ci-après.

Code PDB :	Nom commun :	Source :	Nombre de résidus :	Résolution (Å) :	Auteurs :
1AMY	α -Amylase d'orge isoenzyme AMY2	<i>Hordeum vulgare</i>	403	2,8	Kadziola <i>et al.</i> , 1994
1AQH	α -Amylase psychrophile AHA	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	453	2,0	Aghajari <i>et al.</i> , 1998b
1BAG	-	<i>Bacillus subtilis</i>	425	2,5	Fujimoto <i>et al.</i> , 1998
1BLI	α -Amylase BLA	<i>Bacillus licheniformis</i>	483	1,9	Machius <i>et al.</i> , 1998
1BVZ	α -Amylase TVAII	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	585	2,6	Kamitori <i>et al.</i> , 1999
1HNY	α -Amylase pancréatique humaine (HPA)	<i>Homo sapiens</i>	496	1,8	Brayer <i>et al.</i> , 1995
1HVX	-	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	515	2,0	Suvd <i>et al.</i> , 2001
1JAE	α -Amylase TMA	<i>Tenebrio molitor</i>	471	1,65	Strobl <i>et al.</i> , 1998
1PIF	α -Amylase de pancréas de porc (PPA)	<i>Sus scrofa</i>	496	2,3	Machius <i>et al.</i> , 1996
1SMD	α -Amylase salivaire humaine (HSA)	<i>Homo sapiens</i>	496	1,6	Ramasubbu <i>et al.</i> , 1996
2AAA	α -Amylase ACID	<i>Aspergillus niger</i>	484	2,1	Boel <i>et al.</i> , 1990
6TAA	α -Amylase TAKA	<i>Aspergillus oryzae</i>	478	2,1	Swift <i>et al.</i> , 1991

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des 12 structures natives connues d' α -amylases, déposées dans la banque de structure PDB, au 1^{er} mars 2002.

Chapitre 2

Les substrats des α -amylases

A/ L'amidon :

L'amidon est produit par les plantes supérieures lors de processus de biosynthèse complexes utilisant des ressources chimiques simples telles que l'eau et le dioxyde de carbone. L'énergie solaire joue également un rôle considérable, en apportant aux plantes l'énergie nécessaire à cette biosynthèse.

L'amidon constitue une réserve d'énergie chimique importante, qui est principalement mobilisée lors des phases de développement de la plante (germination et maturation). En effet, à ces stades, la graine ou la jeune plante ne possèdent pas d'activité photosynthétique propre ou suffisamment développée capable de faire face aux besoins en énergie. L'amidon est généralement stocké dans les organes enterrés des plantes (tels que les racines), dans les tubercules, mais aussi dans les graines et fruits.

1. Composition chimique de l'amidon :

L'amidon est composé d'une fraction glucidique et d'une fraction non glucidique. Cette dernière (1 à 2% de la masse) contient des lipides (essentiellement des lipophospholipides et des acides gras), des sels minéraux et une petite fraction azotée constituée de protéines et d'acides nucléiques.

La fraction glucidique, largement majoritaire (représentant 98 à 99% de la masse) comprend deux polyholosides majoritaires : l'**amylose** qui représente en moyenne 20 à 30 % de l'ensemble et l'**amylopectine** (70 à 80%).

De fait, ces valeurs connaissent une grande variabilité, directement reliée à la nature de la plante ainsi qu'à ses conditions de culture (Banks & Greenwood, 1975). En outre, l'amidon de certains tubercules (en particulier celui de la pomme de terre) contient une grande quantité de phosphates, ce qui n'est pas le cas de l'amidon des céréales (Bay-Smidt *et al.*, 1994; Nielsen *et al.*, 1994; Blennow *et al.*, 1998; Blennow *et al.*, 2000; Blennow *et al.*, 2001).

2. Stockage de l'amidon par les plantes :

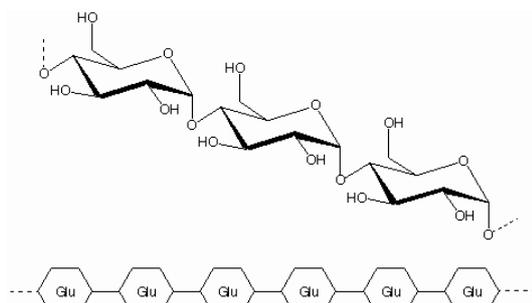
Les plantes stockent l'amidon sous forme de granules. Ces derniers ont des tailles et des formes très différentes et sont caractéristiques d'une plante (Smith, 2001), comme le montre le tableau ci-dessous.

Source d'amidon	% d'amylose	Echelle de taille des granules (μm)	Taille moyenne des granules (μm)
Riz	0	2 – 15	6
Pomme de terre douce	18	4 – 40	19
Pomme de terre	20	10 – 100	36
Orge	24	2 – 18	12
Blé	26	3 – 35	7 ou 20
Maïs	28	5 – 25	14
Maïs riche en amylose	70	4 – 20	10

Les propriétés physicochimiques et la structure microscopique des granules d'amidon du grain d'orge ont été examinées (Tang *et al.*, 2001). On constate que le pourcentage des gros granules diminue des couches superficielles du grain vers son centre, tandis que les quantités de granules de petite et moyenne tailles augmentent. La cristallinité de l'amidon, dans ces grains, varie de 22 à 27%. Le degré de polymérisation de l'amylose est d'environ 1600 et cette valeur est très reproductible selon les grains et les variétés. La quantité d'amylose varie de 22 à 26%. En outre, l'amylopectine montre une répartition plus hétérogène en terme de degré de polymérisation (entre 5700 et 7900).

La complexité de l'organisation structurale du granule d'amidon est vraisemblablement due à la coexistence de plusieurs isoformes d'enzymes impliqués dans la synthèse des polymères d'amylose et d'amylopectine (« *starch synthase* », « *starch branching enzyme* », isoamylase) (Smith, 2001). Malgré de nombreuses spéculations, aucun modèle acceptable n'explique à ce jour les interactions entre ces différents enzymes (Smith, 2001).

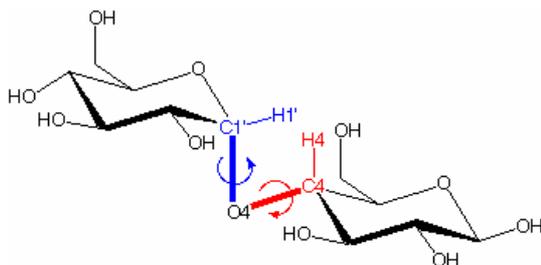
B/ L'amylose :



L'amylose est un polyholoside qui est majoritairement linéaire (résidus glucosyl avec liaisons interglycosidiques α -(1,4), voir schéma ci-contre) et ne contient qu'une infime proportion de ramification (branchement initié par des liaisons α -(1,6)) (Banks & Greenwood, 1975). L'amylose a une taille moins importante que l'amylopectine et peut compter entre 250 et 6000 résidus glucosyl (Banks & Greenwood, 1975; Colonna & Mercier, 1984). L'amylose est activement étudiée sur de nombreux plans (chimie, biochimie, régulation de la synthèse, etc.) (Preiss & Sivak, 1998).

1. Structure de l'amylose :

La nature de la liaison α -glycosidique des chaînes linéaires de glucose impose des contraintes à la structure tridimensionnelle du polymère.



Pour chaque liaison α -(1,4)-glycosidique, deux angles dièdres Φ et Ψ peuvent être définis (voir schéma ci-contre). La conformation préférée de la liaison glycosidique est celle où les angles Φ (en bleu) et Ψ (en rouge) sont voisins de 0° . Ainsi, puisque le polymère est formé uniquement d'anomères α , l'amylose peut adopter une conformation hélicoïdale. L'hélice est formée alors de 6 résidus glucosyl par tour. Elle expose à l'extérieur les groupements hydrophiles de la chaîne polysaccharidique tandis que les groupements hydrophobes sont enfouis en son sein.

Cette organisation spatiale permet à l'amylose de fixer des molécules hydrophobes diverses (tels que des lipides) mais aussi des molécules comportant des fonctions alcools ou des agents tensioactifs. Par exemple, l'iode peut être piégée à l'intérieur de l'hélice (Rundle & Balwin, 1943; Rundle & French, 1943a; Rundle & French, 1943b). De la même manière, le n-butanol, le n-pentanol ou le glycérol sont piégés par l'amylose (Helbert & Chanzy, 1994; Hulleman *et al.*, 1996). Ces complexes ont des propriétés cristallines et, lorsqu'ils sont soumis aux rayons X, produisent un motif de diffraction appelé « *V-pattern* » (Rundle & Edward, 1943; Bear, 1944; Buléon *et al.*, 1990; Brisson *et al.*, 1991). Des études en microscopie électronique et diffraction d'électrons ont indiqué que cette structure hélicoïdale avait, en outre, un arrangement lamellaire (Manley, 1964; Yamashita, 1965; Yamashita & Hirai, 1966; Yamashita & Monobe, 1971; Jane & Robyt, 1984) – voir **Figure 4**, ci-après.

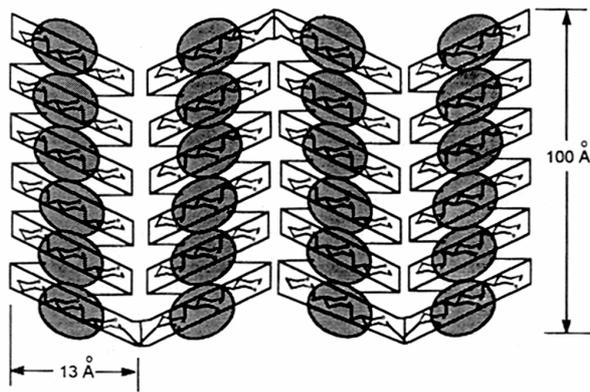


Figure 4 : Schéma de la structure hélicoïdale et lamellaire d'un complexe molécules organiques / amylose. La chaîne hélicoïdale forme un coude tous les 100 Å environ, déterminant une structure antiparallèle dans laquelle les hélices ont un diamètre de 13 Å. Des molécules organiques (montrées par les ovales grisés) peuvent se fixer au centre de l'hélice, qui comporte généralement 6 unités glucose par tour.

2. Biosynthèse de l'amylose :

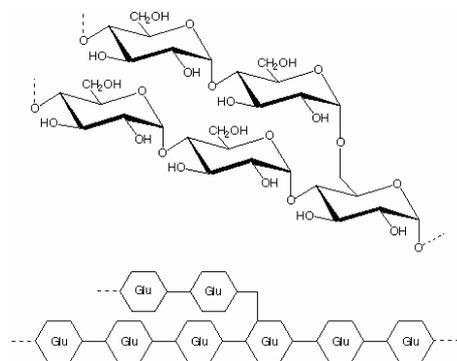
La biosynthèse de l'amylose se déroule par transfert d'une unité glucose (à partir d'un ADP-Glc) vers l'extrémité non réductrice de la chaîne en extension. Ceci entraîne son élongation d'une unité supplémentaire et le relargage simultané d'une molécule d'ADP (Leloir *et al.*, 1961; Recondo & Leloir, 1961).

L'enzyme responsable de cette élongation par transfert est associé aux granules d'amidon et a été nommé « *granule-bound starch synthase I* » (ou GBSSI) (Nelson & Rines, 1962). Des mutations inactivant la GBSSI ont été réalisées chez un grand nombre de plantes. L'emploi de mutants inactifs de GBSSI a montré que le stockage d'amidon sous forme de granule s'opérait de manière tout à fait normale (Buléon *et al.*, 1997). Ce résultat permet d'établir que l'amylose n'est pas requise dans la biosynthèse des granules d'amidon.

D'autres travaux montrent que la GBSSI incorpore *in vitro* des unités glucose sur l'amylose, mais aussi sur l'amylopectine (Leloir *et al.*, 1961; Ponstein *et al.*, 1991; Denyer *et al.*, 1996). En outre, son implication dans la synthèse *in vivo* de l'amylopectine a été prouvée (Maddelein *et al.*, 1994). Étonnamment, il a été démontré que l'amylopectine pouvait servir de « *primer* » (selon l'expression des auteurs) à la synthèse de l'amylose (van de Wal *et al.*, 1998) : l'amylose est, dans ce cas, obtenue par des processus d'extension / coupure de l'amylopectine. Plus encore, une étude par diffusion de rayons X a montré la synthèse d'amylose à partir d'amylopectine cristalline (van de Wal *et al.*, 1998).

C/ L'amylopectine :

1. Structure de l'amylopectine :



L'amylopectine est un polyholoside ramifié de grande taille pouvant atteindre des poids moléculaires impressionnants de l'ordre de 10^8 kDa (Banks & Greenwood, 1975) pour des degrés de polymérisation de 10.000 à 100.000. Les parties linéaires de l'amylopectine sont constituées de résidus glucosyl liés entre eux par des liaisons α -(1,4) alors que les ramifications (ou branches) sont initiées par des liaisons α -(1,6) (voir schéma ci-contre).

Les ramifications sont hiérarchisées suivant une organisation en « grappes » où des chaînes courtes (degré de polymérisation de 10 à 20) sont fixées sur des chaînes longues (comportant 40 à 50 unités glucose). Les chaînes courtes d'amylopectine peuvent également former des doubles hélices de 2×6 résidus glucosyl par tour (Imberty *et al.*, 1988), ce qui augmente la compacité des grappes. Enfin, ces dernières sont à leur tour regroupées en grappes sur des chaînes porteuses comportant au minimum 60 résidus glucosyl (Kainuma & French, 1972; Robin *et al.*, 1975; Hizukuri, 1986) – voir **Figure 5**, page suivante.

Une étude de distribution de longueur des chaînes issues d'amylopectine dégradée par une isoamylase débranchante a donné de plus amples renseignements sur son organisation (Hizukuri, 1986) – voir **Figure 5**. Enfin, une étude récente (Battle *et al.*, 2000) a déterminé les paramètres cinétiques de dépolymérisation de l'amylose, de l'amylopectine et de l'amidon soluble en utilisant une α -amylase d'*Aspergillus oryzae*. Ces travaux ont permis de confirmer la validité de l'organisation en grappe et de montrer, de plus, que l'amidon soluble correspond à une structure originelle en grappe ayant subi une intense dégradation.

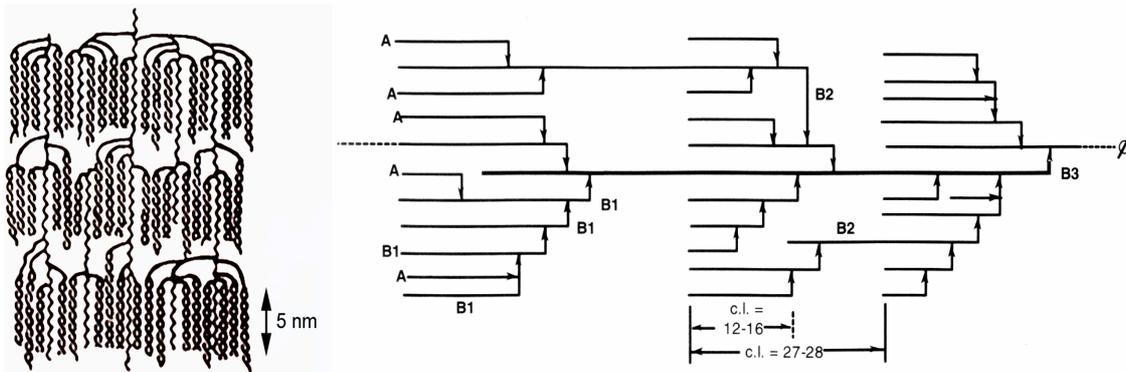


Figure 5 : *A gauche* : Modèle schématisé de l'amylopectine (d'après Imberty & Perez, 1989). *A droite* : Les quatre types de chaînes présentes dans l'amylopectine : les chaînes B1 ont une ou plusieurs chaînes attachées à elles par des liaisons branchées. Les chaînes B2, relativement longues, joignent les grappes individuelles entre elles. Les chaînes B3, les plus rares et les plus longues, peuvent être considérées comme les chaînes porteuses sur lesquelles les grappes individuelles viennent s'ancrer. Enfin, les chaînes A sont des branches avec aucune autre chaîne liée à elles. Une indication du degré de polymérisation est présentée sur la figure (c.l. pour « chain length ») – Figure adaptée de Hizukuri, 1986.

2. L'amylopectine explique la structure cristalline de l'amidon :

L'utilisation de plusieurs approches telles que la modélisation moléculaire (Imberty *et al.*, 1988; Imberty & Perez, 1988), la cristallographie de diffraction des électrons (Perez & Revol, 1993) a permis de préciser la structure cristalline des granules d'amidon. Cette dernière s'explique par la présence d'amylopectine dans son organisation en grappes (Imberty & Perez, 1989) – voir **Figure 5**, qui s'assemble de manière à former une structure lamellaire alternant des zones d'organisation cristalline et des zones amorphes. Les zones de l'amylopectine possédant une organisation compacte et où les chaînes sont structurées en double hélice définissent les zones lamellaires cristallines (Imberty & Perez, 1989). En revanche, les zones des grappes possédant une organisation moins compacte (au niveau des points de jonction des grappes) déterminent les zones lamellaires amorphes. L'alternance de ces deux organisations est à l'origine des striations des granules d'amidon, visibles en microscopie (voir **Figure 6**, ci-après).

L'épaisseur d'une lamelle cristalline couplée à une lamelle amorphe est d'environ 9 nm. Les anneaux ont une épaisseur comprise entre 120 et 400 nm, et sont définis par le super-empilement de lamelles cristallines et amorphes. À l'intérieur, les doubles hélices des grappes sont toutes orientées dans le même sens, perpendiculairement aux anneaux de croissance.

Les zones cristallines contiennent en fait deux types de réseaux (polymorphes A et B). Le premier est caractéristique des amidons de céréales. Chaque double hélice est voisine de six autres. L'ensemble est très compact et faiblement hydraté (Imberty *et al.*, 1988). Le polymorphe B, quant à lui, est caractéristique des amidons de tubercules, de céréales riches en amylose et des amidons rétrogradés. Chaque double hélice a ici trois voisines, ceci générant un canal occupé par 36 molécules d'eau, d'après le modèle proposé (Imberty & Perez, 1989).

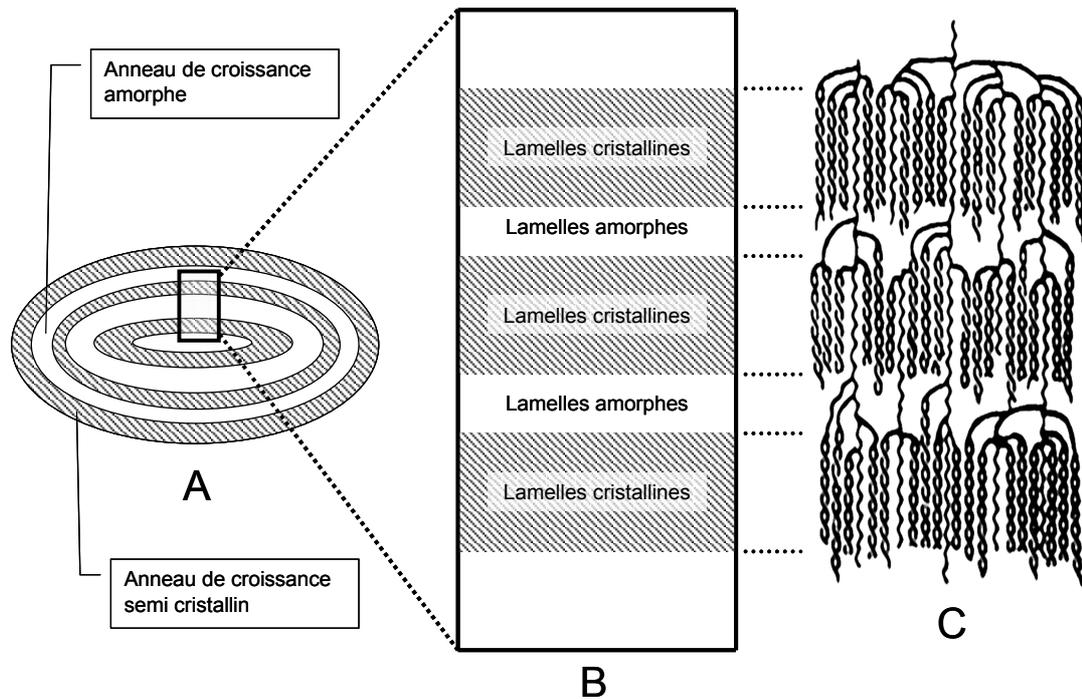


Figure 6 : Schéma de la structure d'un granule d'amidon : **(A)** Vue simplifiée d'un granule d'amidon avec ses anneaux de croissance concentriques alternant des zones dites amorphes et d'autres dites semi-cristallines. **(B)** Agrandissement d'une zone de la structure interne du granule où l'on distingue un empilement régulier de lamelles cristallines et amorphes. Le rapport quantitatif relatif de ces deux types de lamelles définit un anneau plutôt amorphe ou plutôt semi-cristallin. **(C)** Organisation en grappe de l'amylopectine montrant la correspondance entre l'ultrastructure des grappes et l'organisation lamellaire – Schéma adapté de Jenkins & Donald, 1995.

Il existe, enfin, un troisième polymorphe plus rare (l'amylose V), où la chaîne polysaccharidique est enroulée en hélice gauche simple avec 6 résidus glucose par tour. Un canal d'eau central contient des molécules d'eau désordonnées. Des travaux ont permis de résoudre la structure de ce polymorphe à 1,1 Å de résolution à partir d'un cyclomaltohexaicosose (DP26). C'est, à ce jour, le plus long oligosaccharide dont la structure a été résolue par cristallographie et diffraction des rayons X (Gessler *et al.*, 1999).

Les granules d'amidon ne contiennent pas uniquement de l'amylopectine. Ainsi, le rôle de l'amylose au sein de ces granules a longtemps été discuté. L'amylose induit une rupture dans l'organisation cristalline de l'amylopectine (Jenkins & Donald, 1995). En effet, l'amylopectine, en absence d'amylose, forme des lamelles cristallines de petite taille. A l'inverse, en présence d'amylose, leurs tailles augmentent et la régularité de leur organisation est nettement diminuée. Des travaux récents ont confirmé ces observations (Fulton *et al.*, 2002) et expliquent ainsi les fissures très souvent observables dans les granules d'amidon (Marshall *et al.*, 1996).

D/ Dégradation et modification enzymatiques de l'amidon :

1. Dépolymérisation de l'amidon :

Comme nous l'avons vu précédemment, l'amidon constitue une réserve d'énergie essentielle pour la plante. Il en va de même pour les animaux et les micro-organismes. Cependant, tous ces organismes ne peuvent utiliser l'amidon tel quel. Il doit subir des étapes de dégradation dans le but de libérer des molécules de glucose qui, elles seules, peuvent entrer dans les voies métaboliques de production d'énergie. L'hydrolyse enzymatique de l'amidon met en jeu plusieurs enzymes aux spécificités d'action et de substrat différentes.

1.a) Hydrolyse des liaisons α -(1,4) :

Les α -amylases sont les endo-enzymes responsables de la dépolymérisation de l'amidon par coupure des liaisons α -(1,4) suivant un mécanisme de rétention de configuration du carbone anomérique. Les produits de réaction sont des oligosaccharides (maltose ou maltotriose) et des α -dextrines limitées (contenant des liaisons α -(1,6) que ne peuvent hydrolyser les α -amylases) – voir **Figure 7**.

Les β -amylases (E.C.3.2.1.2) sont des exo-enzymes qui hydrolysent de manière récurrente les chaînes linéaires d'amidon à partir de leurs extrémités non réductrices. Ces enzymes procèdent par inversion de configuration et libèrent ainsi du β -maltose uniquement.

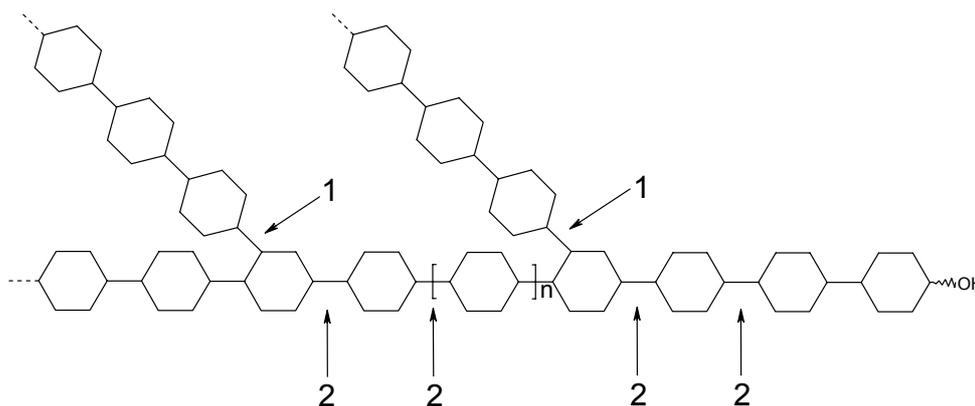


Figure 7 : Schéma présentant les sites d'hydrolyse d'un substrat branché en α -(1,6) de type amylopectine par une α -amylase : les flèches indiquent les liaisons qui ne peuvent être hydrolysées par les α -amylases : (1) les liaisons α -(1,6) ; (2) l'hydrolyse des deux liaisons α -(1,4) d'un glucose précédant, du côté réducteur, une branche α -(1,6) est impossible (Yamamoto, 1988).

1.b) Hydrolyse des liaisons α -(1,6) :

Les enzymes de cette classe sont appelées enzymes « déramifiants » ou « débranchants ». Ils proviennent de micro-organismes et sont représentés par l'isoamylase (E.C.3.2.1.68) et la pullulanase (E.C.3.2.1.41).

1.c) Activité mixte : hydrolyse des liaisons α -(1,4) et α -(1,6) :

A mi-chemin entre les deux précédentes classes, des enzymes possèdent à la fois la capacité d'hydrolyse des liaisons α -(1,4) (libérant du β -D-glucose par hydrolyse récurrente des liaisons glycosidiques à partir des extrémités non réductrices) et des liaisons α -(1,6). Ces enzymes sont représentés par les amyloglucosidases (E.C.3.2.1.3). Leur activité sur les liaisons α -(1,4) est cependant très supérieure à celle sur les liaisons α -(1,6).

2. Réactions de cyclisation :

Les cyclomaltodextrine-glucano-transférases (CGTases, E.C.2.4.1.19) sont des enzymes d'origine bactérienne. Elles catalysent la cyclisation d'oligosaccharides à partir de l'amidon. Ces réactions donnent lieu à la formation de cyclodextrines qui sont classées en trois catégories (α , β ou γ) en fonction du nombre d'unités α -D-glucopyranose qu'elles contiennent (6, 7 ou 8, respectivement). Tous les glucoses sont liés par des liaisons α -(1,4) et les cyclodextrines ont la particularité de posséder une face interne hydrophobe tandis que la face externe est hydrophile. Les CGTases sont utilisées dans la production industrielle de cyclodextrines qui permettent la stabilisation de nombreuses molécules au sein de préparations pharmaceutiques, parapharmaceutiques, cosmétiques, chimiques ou agrochimiques.

2.a) Mécanismes d'action des CGTases :

Les CGTases (PM \approx 75 kDa) font partie de la famille des α -amylases (voir par exemple Svensson, 1994). Leur rôle catalytique est double. Premièrement, elles possèdent une activité de coupure des liaisons α -(1,4) selon un mécanisme de rétention, propriété qu'elles partagent avec les α -amylases. Deuxièmement, les CGTases possèdent une activité de cyclisation et de formation des cyclodextrines.

Plus précisément, le cycle catalytique de la CGTase commence avec la coupure d'une liaison α -(1,4) glycosidique d'un substrat de type amylose, conduisant à la formation d'un intermédiaire covalent glycosyle-enzyme et d'un sucre libre (Uitdehaag *et al.*, 1999b). Enfin, une nouvelle liaison α -(1,4) glycosidique est créée entre l'intermédiaire covalent alors relâché et une nouvelle molécule (l'accepteur).

La CGTase peut choisir différents accepteurs conduisant à plusieurs produits de réaction. Si c'est une molécule d'eau qui est utilisée, la réaction est une hydrolyse alors que si c'est un sucre libre, la réaction est une transglycosylation qui s'opère selon un mécanisme « ping-pong » (Nakamura *et al.*, 1994). Ces deux activités sont en fait très peu importantes. La réaction majeure catalysée par la CGTase est la cyclisation : si le groupe 4-OH libre de l'intermédiaire covalent est utilisé lui-même comme accepteur, il s'ensuit la formation d'une cyclodextrine.

2.b) Relations structure / fonction chez la CGTase :

Les CGTases sont composées de 5 domaines (notés A à E) (Hofmann *et al.*, 1989; Kubota *et al.*, 1990; Klein & Schulz, 1991; Lawson *et al.*, 1994). Les domaines A et B constituent le domaine catalytique tandis que les domaines C et E sont spécialisés dans la fixation des granules d'amidon. Le domaine D ne possède pas de fonction connue à ce jour.

Le site actif de la CGTase de *Bacillus circulans* (souche 251) contient au moins neuf sous-sites de fixation, numérotés de -7 à +2 (Strokopytov *et al.*, 1995). Comme pour les α -amylases, l'hydrolyse de la liaison se déroule entre les sous-sites -1 et +1. Lors de la réaction de cyclisation, l'unité glucose du côté non réducteur se déplace du sous-site -7 vers le sous-site -1 (Uitdehaag *et al.*, 1999b).

La structure d'un complexe entre un mutant E257Q/D229N de la CGTase de *Bacillus circulans* (souche 251) et une γ -cyclodextrine montre les résidus impliqués dans la fixation de ladite cyclodextrine au niveau du site actif (Uitdehaag *et al.*, 1999a). Au niveau des sous-sites -2, -1 et +1, la cyclodextrine se lie avec une conformation « twist », causant une déformation de la structure circulaire de la molécule. Cette déformation faciliterait la coupure de la liaison entre les sous-sites -1 et +1. En outre, les sous-sites -3, +2 et -6 confèrent à l'enzyme ses propriétés de cyclisation. Ces conclusions ont été tirées de la comparaison du complexe évoqué avec un complexe CGTase / maltonaose (Uitdehaag *et al.*, 1999b).

Un résidu essentiel dans ce processus de repliement de la cyclodextrine est la tyrosine 195. Il est suggéré que le cycle aromatique de cet acide aminé permettrait de stabiliser une étape intermédiaire de réaction et faciliterait le glissement du substrat dans le site actif (Uitdehaag *et al.*, 1999a). Sur le plan structural, le noyau aromatique de cette tyrosine est proche du centre de la γ -cyclodextrine et détermine avec elle des liaisons hydrogène, mais pas d'interactions hydrophobes. Enfin, des changements de conformation importants (de l'ordre de 2,6 Å), induits par la fixation de la cyclodextrine, ont été observés pour cette tyrosine (Uitdehaag *et al.*, 1999a). Le rôle crucial de ce résidu a été confirmé par une étude récente utilisant une méthode de modélisation de chemin réactionnel et de dynamique moléculaire à l'échelle de la milliseconde (Uitdehaag *et al.*, 2001) : les conformations multiples du résidu permettent l'ouverture et la fermeture de la crevasse catalytique.

Autre particularité de la CGTase de *Bacillus circulans*, des molécules d' α -cyclodextrines peuvent se fixer sur deux sites de surface au niveau du domaine E (Knegtel *et al.*, 1995). La fixation de β -cyclodextrines a également été démontrée (Villette *et al.*, 1992). Les deux α -cyclodextrines interagissent avec l'enzyme par les faces apolaires des résidus glucose empilés sur des acides aminés aromatiques. De telles interactions sont retrouvées chez des

protéines liant les maltodextrines, dans un complexe entre l' α -amylase de pancréas de porc et un analogue de substrat (Qian *et al.*, 1997), chez une β -amylase (Mikami *et al.*, 1993) ou chez AMY2, au niveau du site de fixation des granules d'amidon (Kadziola *et al.*, 1998).

Dans le domaine E, le premier site de fixation détermine l'empilement hydrophobe de deux unités glucosyl avec deux tryptophanes adjacents (Trp616 et Trp662). Le deuxième site fixe l' α -cyclodextrine grâce à des interactions hydrophobes avec la tyrosine 663. De plus, la chaîne latérale hydrophobe de la leucine 600 s'insère dans l'anneau de la cyclodextrine et s'approche de sa surface interne apolaire à une distance d'environ 4 à 4,5 Å (Knegtel *et al.*, 1995).

Chapitre 3

Les inhibiteurs des α -amylases

Les inhibiteurs des α -amylases sont très nombreux et l'effort de recherche dans ce domaine est très important (Truscheit *et al.*, 1981). En effet, sur le plan fondamental, ils permettent d'expliquer les mécanismes d'inhibition de ces enzymes et, sur le plan des applications, les α -amylases sont des cibles thérapeutiques dans le traitement du diabète, de l'obésité ou de troubles métaboliques apparentés. La conception d'inhibiteurs ouvre la voie à de nouveaux traitements (voir chapitre «*Les α -amylases comme cibles thérapeutiques : implications en diabétologie*», page 37 et suivantes). Les inhibiteurs des α -amylases sont essentiellement de deux natures : inhibiteurs pseudo-polysaccharidiques ou protéiques.

A/ Les inhibiteurs de type pseudo-polysaccharidique :

Des pseudo-oligosaccharides appartenant à la classe des alcaloïdes sont connus pour leurs propriétés d'inhibition des α -amylases : piperidines polyhydroxylées, pyrrolidines, indolizidines, pyrrolizidines et nortropanes sont des molécules très répandues chez les plantes et les microorganismes.

Les pseudo-polysaccharides inhibiteurs d' α -amylases contiennent très souvent un même cœur appelé **acarviosine** (voir **Figure 8a**) sur lequel se greffe un nombre variable de résidus glucosyl. Une caractéristique essentielle de l'acarviosine est de posséder un atome d'azote dans la liaison entre les deux unités la composant, ainsi qu'une unité cyclitol.

Leur propriété inhibitrice est en partie définie par leur capacité à mimer la forme et la charge d'un substrat naturel dans l'état de transition lors de son hydrolyse (Stutz, 1999). Cette théorie a ouvert la voie à de nombreuses tentatives de synthèse d'analogues de substrat contenant des atomes d'azote, dont certains ont démontré des propriétés d'inhibition (Stutz, 1999). On sait cependant aujourd'hui, que cette famille d'inhibiteurs est efficace moins par le fait qu'ils miment l'état de transition, mais plus parce qu'ils définissent de nombreuses interactions électrostatiques dans les sites actifs des enzymes qu'ils inhibent (Stutz, 1999). Les inhibiteurs pseudo-polysaccharidiques azotés contenant un noyau acarviosine sont tous synthétisés par des microorganismes de la famille des *Streptomyces* et sont divisés en trois classes.

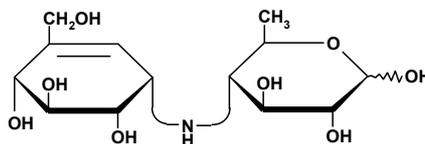


Figure 8a : Structure chimique de l'acarviosine.

1. Les oligostatines :

Ces molécules sont composées d'un pseudo-disaccharide (nommé oligobiamine) et d'un nombre variable d'unités α -D-glucopyranose liées entre elles par une liaison α -(1,4). Le cœur oligobioamine peut être situé à l'extrémité non réductrice (oligostatine C) ou encadré par des unités glucose (oligostatines D et E) (voir **Figure 8b**, page suivante).

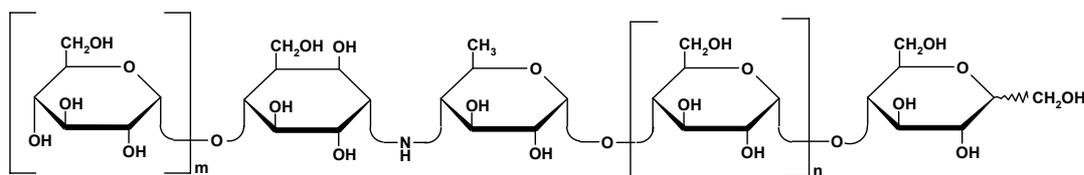


Figure 8b : Structure des oligostatines : $m=0$ et $n=2$: oligostatine C / $m=0$ et $n=3$: oligostatine D / $m=1$ et $n=3$: oligostatine E.

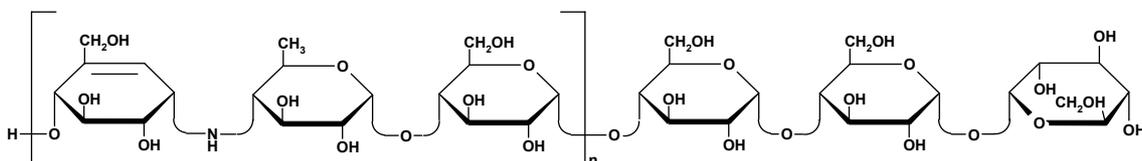


Figure 8c : Structure des trestatines : $n=2$: trestatine de type A / $n=1$: trestatine de type B / $n=3$: trestatine de type C.

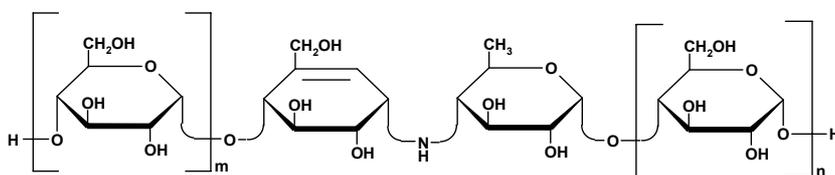


Figure 8d : Formule générale des composés de la famille des amylostatines. L'acarviosine correspond à $m=0$ et $n=0$, l'acarbose à $m=0$ et $n=2$.

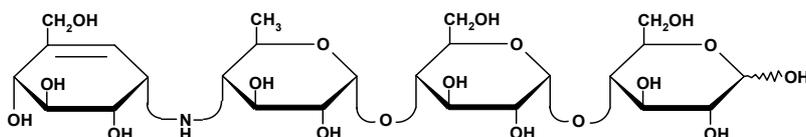


Figure 8e : Structure chimique de l'acarbose.

2. Les trestatines :

Elles sont constituées d'un ou plusieurs motifs formés par l'enchaînement d'une unité cyclitol et d'un aminosucre (le 4-amino-4,6-deoxy-D-glucopyranose), en liaison α -(1,4) avec un résidu glucose. Ces molécules n'ont pas d'extrémité réductrice, l'oxygène O1 du dernier résidu glucopyranose étant engagé dans une liaison O-glycosidique (**Figure 8c**, ci-dessus).

3. La famille des amylostatines et l'un de ses membres : l'acarbose :

Ces molécules contiennent un cœur acarviosine composé d'une unité cyclitol et d'un aminosucre reliés par un atome d'azote. Ce cœur est lui-même lié à un nombre variable d'unités glucose et peut être placé soit au milieu du pseudo-polysaccharide, soit à son extrémité non réductrice (voir **Figure 8d**, ci-dessus). De nombreux représentants de cette famille ont été isolés, dont l'un des plus connus est le pseudo-tétrасaccharide dénommé **acarbose** (Truscheit *et al.*, 1981).

L'acarbose est composé d'un noyau acarviosine lié en α -(1,4) à un groupement maltose (voir **Figure 8e**, ci-dessus). Il est synthétisé par une souche d'actinomycètes en présence d'un milieu riche en amidon, maltose et glucose. De toutes les molécules précédemment citées, l'acarbose est l'inhibiteur le plus efficace. Ses cibles sont non seulement les α -amylases, mais aussi d'autres glycosidases comme les glucoamylases et les saccharases (Truscheit *et al.*, 1981). La théorie montre que la double liaison du cycle cyclohexène de l'acarviosine maintient ce dernier dans une conformation demi-chaise qui pourrait être celle de l'état de transition de la

réaction d'hydrolyse (Schmidt *et al.*, 1977; Schmidt *et al.*, 1981; Kuriki *et al.*, 1991; Strynadka & James, 1991). En outre, la liaison N-glycosidique de l'acarviosine se place préférentiellement au niveau du site de coupure et confère à l'acarbose ses propriétés d'inhibition.

L'acarbose peut subir plusieurs types de dégradations ou de modifications enzymatiques (Müller *et al.*, 1981). Les β -amylases hydrolysent la liaison entre l'acarviosine et le maltose. L'acarviosine se réarrange alors pour former un nouveau composé (dit « composant 1 ») possédant une très faible propriété d'inhibition. Les α -amylases hydrolysent la liaison entre les deux unités glucose formant le maltose (voir **Figure 9**). Il en découle la libération d'une unité glucose et d'un trisaccharide (nommé « composant 2 ») qui, contrairement au composant 1, conserve un fort pouvoir d'inhibition.

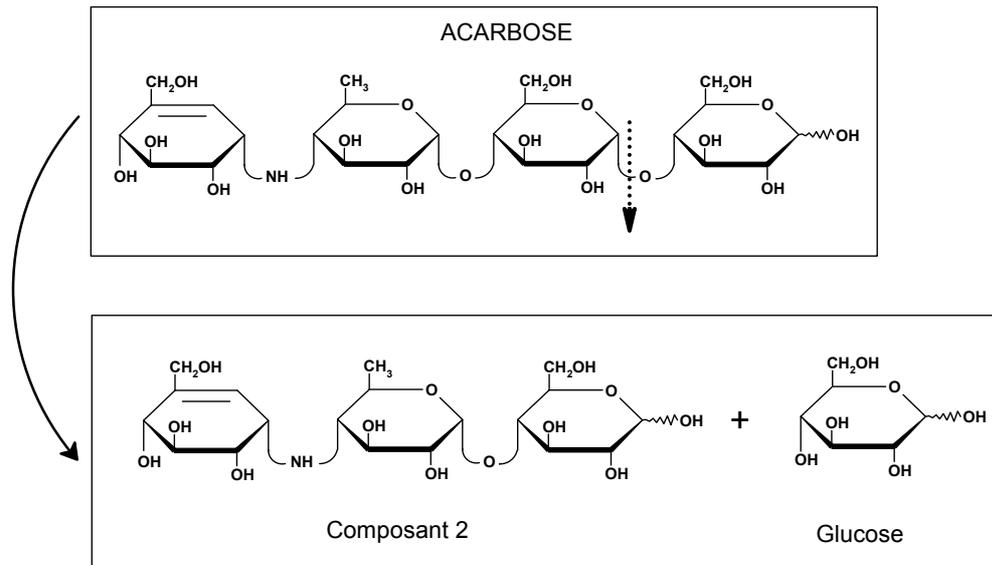
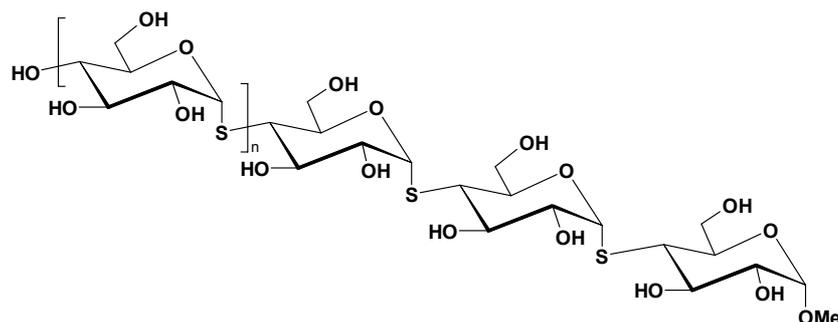


Figure 9 : Dégradation de l'acarbose par les α -amylases et produits de réaction résultants.

L'acarbose est un principe actif utilisé dans le traitement du diabète et commercialisé en France par la société BAYER sous le nom galénique de « Glucor[®] ». Nous reviendrons ultérieurement sur son utilisation médicale, dans le chapitre « *Les α -amylases comme cibles thérapeutiques : implications en diabétologie* », page 37 et suivantes.

4. Inhibiteurs de type thiooligosaccharidique :

Cette nouvelle classe chimique d'inhibiteurs occupe une place de choix pour l'étude structurale des glycosyle-hydrolases (Driguez, 2001). Les inhibiteurs de type thiooligosaccharidique sont obtenus uniquement par synthèse chimique. Dans ces derniers, un ou plusieurs atomes d'oxygène interglycosidiques sont remplacés par des atomes de soufre. Des synthèses chimiques ont abouti à l'obtention de méthyl-thiomaltotétraosides et pentaosides (voir figure ci-dessous avec, respectivement, $n=1$ et $n=2$) avec un excellent rendement (Driguez, 2001).



B/ Les inhibiteurs de nature protéique :

La plupart des inhibiteurs d' α -amylases, de nature protéique, ont pour origine des plantes ou des microorganismes (Whitaker, 1988).

1. Inhibiteurs d'origine microbienne :

Les structures tridimensionnelles des inhibiteurs Tendamistat et Haim (« *Human α -amylase inhibitor from microbes* ») ont été résolues par cristallographie aux rayons X ou RMN (Pflugrath *et al.*, 1986; Kline *et al.*, 1988; Billeter *et al.*, 1989; Billeter *et al.*, 1990; Yoshida *et al.*, 1990). Ces inhibiteurs ont des séquences très homologues et contiennent 4 cystéines conservées. Elles déterminent deux pont dissulfures dont l'un stabilise deux brins β antiparallèles unis par une boucle. Un complexe PPA / Tendamistat a été résolu à 2,5 Å de résolution (Wiegand *et al.*, 1995).

2. Inhibiteurs d'origine végétale :

Les inhibiteurs d'origine végétale peuvent inhiber les α -amylases endogènes ou exogènes. Dans le premier cas, ils jouent le rôle de régulateurs dans les cycles métaboliques de la plante conduisant à l'hydrolyse de l'amidon. Dans le deuxième cas, ils participent à la défense de la plante contre des attaques de parasites extérieurs en inhibant leurs α -amylases digestives. Un complexe entre l'isoenzyme II de PPA et l'inhibiteur α -AII (de la classe des lectines) provenant du grain de haricot a été résolu (Bompard-Gilles *et al.*, 1996).

Remarquablement, certains de ces inhibiteurs sont bifonctionnels, inhibant à la fois l' α -amylase de la plante (blé, orge ou millet plus précisément) et la protéase subtilisine (Whitaker, 1988). BASI (pour « *Barley α -Amylase / Subtilisin Inhibitor* ») est le représentant de cette famille d'inhibiteur pour l'orge. La structure du complexe entre l'isoenzyme 2 de l' α -amylase d'orge (AMY2) et BASI est connue et révèle le détail des interactions entre ces deux protéines. Nous décrirons plus précisément ces deux partenaires ainsi que leurs interactions ultérieurement.

3. Tris comme inhibiteur de plusieurs glycosidases :

Les inhibiteurs présentés précédemment possèdent des structures chimiques complexes : c'est bien évidemment le cas des protéines et, dans une moindre mesure, des inhibiteurs polysaccharidiques. Ces derniers diffèrent relativement peu de substrats naturels et la présence de quelques modifications chimiques leur confère leurs propriétés d'inhibition.

Tris (2-amino-2-(hydroxyméthyl)-1,3 propanediol) est un exemple remarquable d'inhibiteur chimiquement très simple et de nature radicalement différente de ceux mentionnés précédemment. En effet, cette petite molécule inhibe de manière compétitive plusieurs glycosidases (comme la glucoamylase) et, par exemple, l' α -amylase de *Bacillus licheniformis* (Brzozowski *et al.*, 2000), une α -amylase chimère de bactérie (Brzozowski *et al.*, 2000), mais également l' α -amylase psychrophile de *Pseudoalteromonas haloplanktis* (AHA) avec un K_i de 10^{-3} M (Aghajari *et al.*, 1998a). La structure de ce dernier enzyme a révélé la présence d'une molécule de Tris dans le site actif (Aghajari *et al.*, 1998a). Deux groupements hydroxyles prennent la place de molécules d'eau observées dans la structure native de l'enzyme (Aghajari *et al.*, 1998b). Deux résidus catalytiques (Glu200 et Asp174) déterminent des liaisons hydrogène avec deux groupements hydroxyle appartenant au Tris.

De plus, les groupements hydroxyl et amino miment respectivement les positions des fonctions hydroxyles de l'acarbose et de l'azote de sa liaison N-glycosidique. Cette observation suggère que Tris agit en tant qu'analogue de substrat comme inhibiteur compétitif. Enfin, la présence de Tris dans le site actif n'induit aucune réorientation de chaînes latérales, que ce soit celles des acides aminés catalytiques ou des résidus avoisinants.

Pour conclure, la conception d'inhibiteur de glycosyle hydrolases est majoritairement focalisée sur l'utilisation de polysaccharides modifiés. L'exemple de Tris montre que des petites molécules pourraient définir des propriétés d'inhibition inattendues au regard de leurs structures chimiques, de leurs tailles ou bien de leurs usages « conventionnels ».

Chapitre 4

Applications industrielles des α -amylases

L'activité de fermentation des microorganismes, découverte au 18^{ème} siècle, a clairement été prouvée par Louis Pasteur. Les scientifiques, en 1833, ont ensuite montré l'existence des enzymes en observant qu'un précipité alcoolique d'un extrait de malt contenait une substance thermolabile capable de convertir l'amidon en glucose. Elle fut, à l'époque, nommée « *diastase* », pour changer d'appellation par la suite et être finalement connue sous le nom d' α -amylase !

L'utilisation en masse d'enzymes d'origine bactérienne a commencé dans les années 1960 dans l'industrie de l'amidon. Ainsi, la traditionnelle hydrolyse acide a été complètement remplacée par des α -amylases et des glucoamylases qui peuvent convertir l'amidon en glucose avec des rendements proches de 95%. L'industrie de l'amidon est devenue la seconde utilisatrice d'enzymes après l'industrie du détergent (Flickinger & Drew, 1999).

La recherche sur les amylases est très active de nos jours par le biais de l'ingénierie protéique. En effet, les enzymes ne possèdent pas toujours les propriétés désirées ou optimales en vue d'une application industrielle. Plusieurs enzymes ont déjà fait l'objet de travaux d'ingénierie dans le but de modifier leurs propriétés, ceci incluant les protéases, les lipases, les cellulases, les glucoamylases et les α -amylases (Flickinger & Drew, 1999). Ces dernières sont utilisées dans un grand nombre de secteurs industriels (Godfrey & West, 1996) :

A/ Industrie alimentaire :

La propriété unique des granules d'amidon de former des gélatines, lorsqu'ils sont mis en présence d'eau et chauffés, est utilisée sous de nombreuses formes pour produire du pain, des pâtes et d'autres aliments apparentés. L'amidon est souvent utilisé comme additif alimentaire, en tant qu'agent épaississant. Les α -amylases sont utilisées dans tous les processus nécessitant la conversion de l'amidon en glucose ou maltose, ou dans des digestions ménagées pour obtenir des polysaccharides de plus petite taille. Les α -amylases sont également largement étudiées pour leurs implications dans les processus de fermentation ; le but, ici, est d'améliorer leur rendement, leur spécificité ou leur thermostabilité. Outre la panification, la fabrication de la bière est un domaine privilégié d'utilisation d' α -amylases modifiées, cette boisson étant obtenue par fermentation alcoolique du sucre de l'orge germée sous l'action de différentes souches de levure.

B/ Industrie des détergents :

Les α -amylases sont utilisées comme détergent pour enlever les taches à base d'amidon. On les utilise pour hydrolyser l'amidon gélatinisé qui a tendance à se coller aux fibres textiles et se lier à des composants colorés ou tachants (Flickinger & Drew, 1999).

C/ Industrie textile :

L'utilisation, jusqu'alors réduite, des α -amylases dans ce domaine connaît un développement très important (Godfrey & West, 1996). L'amidon a toujours été employé comme agent protecteur des fibres textiles. Les α -amylases permettent d'éliminer le surplus d'amidon lors de processus d'amidonage. Leur avantage majeur est de ne pas abîmer les fibres textiles.

D/ Industrie du papier :

L'implication des cellulases dans ce domaine est bien évidemment prépondérante. Cependant, les α -amylases sont également employées dans la modification de l'amidon en vue de préparer des additifs pour la fabrication de la pâte à papier (Godfrey & West, 1996). Ces additifs servent à augmenter la résistance et la souplesse du produit fini. La suspension d'amidon doit avoir une viscosité particulière, viscosité qui est contrôlée par l'ajout d' α -amylases.

Chapitre 5

Les α -amylases comme cibles thérapeutiques : implications en diabétologie

A/ Le rôle des α -amylases dans la digestion :

Au cours de la digestion, les aliments complexes sont ramenés à leurs éléments constitutifs simples. Ils deviennent ainsi des nutriments qui peuvent franchir la paroi du tube digestif, et sont directement utilisables par l'organisme.

La digestion débute dans la cavité orale. Les aliments y sont mélangés à la salive. Cette dernière renferme une α -amylase (ptyaline) qui commence la digestion des glucides. Son action continue dans l'estomac pendant plusieurs heures. Elle peut ainsi digérer jusqu'à 40% de l'amidon si les conditions d'acidité gastrique et de solubilité des aliments le permettent. En outre, la paroi de l'estomac est recouverte d'une muqueuse sécrétant le suc gastrique qui contient de l'acide chlorhydrique. Ce dernier contribue, dans une faible mesure, à l'hydrolyse acide de l'amidon et vient donc en appui des α -amylases.

Plus avant dans le tractus digestif, le pancréas sécrète le suc pancréatique dans la lumière duodénale. Ce dernier contient principalement quatre enzymes : la trypsine et la chymotrypsine (agissant sur la digestion des protéines), des lipases (digestion des graisses) et enfin, l' α -amylase pancréatique. A ce niveau, cette dernière et d'autres glycosidases terminent d'hydrolyser le maltose en glucose, qui est alors absorbé au travers de la paroi du petit intestin. L'absorption jéjunale des sucres, graisses et protéines est facilitée grâce à l'existence de microvillosités qui augmentent les surfaces d'échange. Le glucose, par voie sanguine, est alors dirigé vers le foie où il est stocké sous forme de glycogène, polysaccharide de réserve des animaux.

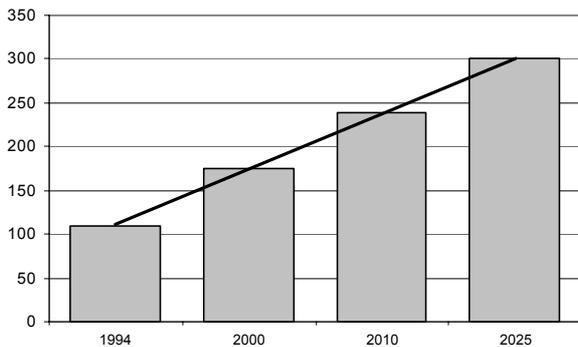
Du fait de leur implication majeure dans les processus de digestion de l'amidon et des polysaccharides apparentés, les dysfonctionnements des glycosidases et plus particulièrement des α -amylases, peuvent être à l'origine de plusieurs troubles métaboliques, comme le diabète et l'obésité. Les traitements de ces deux pathologies ont pour objet de ralentir les activités enzymatiques qui assurent la digestion de l'amidon et des polysaccharides apparentés afin d'amortir l'effet hyperglycémiant des sucres issus de la digestion.

Les α -amylases apparaissent donc comme des cibles thérapeutiques privilégiées dans le traitement de ces maladies.

B/ Le diabète, une maladie d'envergure mondiale :

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le monde comptera 300 millions de diabétiques en 2025, soit un quasi-doublement en vingt-cinq ans. Le phénomène est universel et touche les continents africain et asiatique, qui rattrapent progressivement les Etats-Unis et l'Europe.

Le nombre de diabétiques dans le monde est en pleine expansion (voir graphique ci après – source Institut International du Diabète, centre collaborateur de l'Organisation Mondiale de la Santé - 2000) et les modèles de prédiction montrent une constante augmentation du nombre de cas pour les vingt prochaines années.



Légende : Evolution et prévision du nombre de cas de diabète dans le monde (exprimé en millions de sujets atteints) entre 1994 et 2025 (source Institut International du Diabète, centre collaborateur de l'Organisation Mondiale de la Santé – 2000).

Environ 90% des cas sont des diabètes de type 2 (classiquement appelé « non insulino-dépendant »), et sont, à la différence du diabète de type 1 (ou « insulino-dépendant »), très liés à des facteurs environnementaux et génétiques.

En France métropolitaine, le type 2 représente 92% des cas selon des données récentes de l'INSERM (ALFEDIAM, 2001). La maladie a été reconnue comme une priorité de santé publique à partir de 1999 par la Conférence Nationale de Santé (ALFEDIAM, 2001). En effet, le diabète engendre un coût humain et économique important (MELITIS, 2001) : l'atteinte rétinienne liée au diabète touche 75% des diabétiques en France après vingt ans d'évolution de la maladie. Un diabétique sur 5 sera atteint par une complication neurologique et 8% des dialysés sont diabétiques. Chaque année, en France, les complications diabétiques sont responsables de 5000 amputations et de 15% des angioplasties et pontages. La prise en charge du diabète représente 8% du budget de santé de la France alors que l'on dénombre entre 2 et 2,5% de diabétiques en métropole.

C/ Définition générale du diabète :

Selon une définition simple, le diabète englobe tous les états d'hyperglycémie chronique. De manière générale, l'hyperglycémie est avérée pour une concentration sanguine de glucose supérieure ou égale à 1,27 g/l (soit 7 mM) à jeun et/ou supérieure à 2 g/l (soit 11 mM) en période post-prandiale (généralement mesurée 120 minutes après la prise alimentaire) (Diabétologie, 1990).

Le diabète concerne des sujets d'âges différents (du nouveau né au vieillard), des tableaux cliniques variés (sujets obèses, de poids normal ou maigres). Ils ont tous en commun les effets de l'hyperglycémie, qu'ils soient immédiats, chroniques ou à long terme :

- Effets immédiats, regroupés sous le terme « syndrome polyuro-polydipsique ».
- Effets chroniques et à long terme : ils comprennent des complications dégénératives apparaissant chez presque tous les sujets diabétiques après un temps d'évolution variable et qui font la réelle gravité de cette maladie.

Le dosage de la glycémie à jeun et l'hyperglycémie provoquée permettent de définir trois groupes de sujets : normaux, intolérants au glucose ou diabétiques (voir tableau ci-dessous) :

	Normaux	Intolérants	Diabétiques
Glycémie mesurée à jeun	< 7,8 mM	< 7,8 mM	> 7,8 mM
Glycémie mesurée 30, 60 et 90 min. après ingestion de glucose	< 11 mM (pour les 3 temps)	> 11 mM (pour 1 des 3 temps)	> 11 mM (pour 1 des 3 temps)
Glycémie mesurée 120 min. après ingestion de glucose	< 7,8 mM	Entre 7,8 et 11 mM	> 11 mM

(Conditions de mesure : sujet à jeun depuis 10 à 16 heures – hyperglycémie provoquée chez un sujet à jeun par absorption orale de 75g de glucose. Dans les deux cas, le sujet est en dehors d'une période de stress et est maintenu en position assise ou couchée).

1. Classification :

On distingue des diabètes dits primitifs et des diabètes dits secondaires (Diabétologie, 1990) :

- **Diabètes primitifs :**

- Diabète de type 1 : dénommé DID (diabète insulino-dépendant) ou diabète juvénile ou encore diabète maigre.
- Diabète de type 2 : dénommé DNID (diabète non insulino-dépendant) ou diabète de la maturité ou encore diabète gras. Son traitement ne fait pas appel à l'insuline mais peut y recourir à titre transitoire ou définitif chez nombre de patients, ce qui relativise le terme de « diabète non insulino-dépendant ».
- Diabète atteignant certaines ethnies ou populations (Afrique, Jamaïque, etc.) lié vraisemblablement à des particularités nutritionnelles et/ou génétiques débouchant sur une altération quantitative de la sécrétion d'insuline.
- Diabète s'inscrivant dans le cadre de syndromes rares : diabète lipoatrophique, syndrome d'insulino-résistance extrême et insulinopathie, diabète associé à la mucoviscidose, syndrome de Wolfram, maladie de Friedreich.

- **Diabètes secondaires :**

- Diabète dont la cause est la destruction du pancréas. C'est le cas des pancréatites aiguës ou chroniques.
- Diabète provoqué par un excès d'hormones employées lors de certains traitements médicamenteux (cortisol, catécholamine, glucagon).

2. Fréquence des maladies diabétiques :

L'ensemble des diabètes concerne 2 à 5 % de la population en France, en Europe, aux USA, au Moyen Orient et dans le pourtour méditerranéen. En outre, 8 à 16% des personnes âgées de plus de 50 ans sont touchées par cette pathologie (ALFEDIAM, 2001).

En France, on dénombre près de 150 000 diabétiques traités par l'insuline. Les trois-quarts sont des diabète de type 1 (DID), le reste étant des diabètes de type 2 néanmoins traités par l'insuline. Enfin, les diabétiques de type 2, au sens strict, représentent une population d'environ 2 millions de personnes (ALFEDIAM, 2001).

3. Epidémiologie du diabète de type 1 (DID) :

On note une incidence très variable d'un pays à l'autre :

Pays	Finlande	Autres pays scandinaves	Allemagne Angleterre	Italie	France
Incidence pour 100000 habitants et par an	40	25	15	8	7

Environ deux tiers des diabètes de type 1 s'observent chez des sujets jeunes (de moins de 25 ans) avec un pic maximum de fréquence pour les enfants et adolescents âgés de 10 à 15 ans. Un second pic de fréquence apparaît pour des sujets âgés d'environ 35 ans avec une prédominance féminine, et ce, avec une forte association à d'autres pathologies auto-immunes surtout thyroïdiennes.

Environ 15 % des diabètes de type 1 touchent des apparentés du premier degré d'un diabétique du même type (frère, soeur ou enfant) alors que 85 % apparaissent dans des familles où aucun autre cas n'était connu antérieurement.

4. **Epidémiologie du diabète de type 2 (DNID) :**

Le diabète de type 2 est une maladie ayant une forte transmission par l'hérédité (nombreux cas familiaux, jumeaux monozygotes, groupes ethniques hautement prédisposés). En effet, il touche plus de 2% de la population mondiale, 16% des sujets de plus de 40 ans (pour l'Europe, les USA et le pourtour méditerranéen). De plus, de 2 à 8% des femmes enceintes développent un diabète de type 2, nommé « diabète gestationnel ». Enfin, on recense un nombre très élevé de sujets intolérants au glucose chez les adultes des 2 sexes, même si tous ne deviendront pas diabétiques de type 2. Cependant, ces derniers sont largement prédisposés aux maladies cardio-vasculaires, à l'hypertension artérielle, etc.

D/ **Causes physiologiques des diabètes de type 1 et de type 2 :**

Une des causes majeures du diabète de type 1 est l'atteinte des cellules β des îlots de Langerhans sécrétant l'insuline (Diabétologie, 1990). L'insuline est une hormone qui accroît l'utilisation du glucose, réduit sa production hépatique, favorise la lipogenèse et réduit la lipolyse. La carence profonde de sécrétion d'insuline par l'organisme est précédée d'une phase de latence durant plusieurs années (de 3 à 10 ou plus encore).

Le diabète de type 2 apparaît comme une maladie multifactorielle. Outre le facteur héréditaire qui semble être un déterminant majeur, des facteurs environnementaux interviennent aussi pour une large part. Parmi ceux-ci, on peut citer le surpoids et l'obésité, des attitudes alimentaires (régime trop riche en sucre, pauvre en légumes et fruits et faible diversité de l'alimentation) et plus généralement une hygiène de vie insatisfaisante. L'exercice physique régulier diminue l'incidence de diabète de type 2, surtout chez les personnes à risque, de même qu'une alimentation équilibrée et le maintien d'un poids « normal ».

A l'opposé du diabète de type 1, le diabète de type 2 se caractérise par une absence d'atteinte des cellules β des îlots de Langerhans (Diabétologie, 1990).

On note pourtant deux troubles ayant trait à l'insuline : des anomalies de la sécrétion d'insuline, mais aussi des anomalies qualitatives de cette dernière. Ces anomalies correspondent à la première phase de la maladie. La seconde phase détermine une « résistance » de l'organisme à l'insuline, qui peut être considérée comme une véritable désensibilisation à ses effets. Cette insulino-résistance peut être mise en évidence chez des sujets ayant des hyper, normo ou hyposécrétion d'insuline. Les conséquences de cette résistance sont plus particulièrement visibles au niveau du foie (excès de production de glucose hépatique induisant une hyperglycémie à jeun) et des muscles (faible captation, stockage et utilisation du glucose déterminant une hyperglycémie post prandiale). Sur le long terme, l'organisme réagit face à cette hyperglycémie constante et un phénomène dit de « gluco-toxicité » apparaît.

E/ **Diagnostic des diabètes de type 1 et de type 2 :**

1. **Clinique :**

Le diabète est le plus souvent révélé chez des sujets âgés de plus de 40 ans dont 80% sont en surpoids ou obèses. La découverte est le plus souvent fortuite, par exemple lors d'un bilan systématique. Plus préoccupant, 20% des sujets ont un poids normal et, dans ce cas, le diabète est souvent difficile à détecter, ce qui renforce le caractère insidieux de la maladie. Dans un même ordre d'idée, la perte de poids lente en général et la détérioration de l'équilibre glycémique sont d'autres signes cliniques pouvant dénoter la pathologie.

2. **Biologique :**

Des analyses sanguines et urinaires simples permettent de mettre définitivement en évidence la maladie, qui se caractérise par une hyperglycémie et une glycosurie prononcée. En outre, on note souvent l'existence d'une triglycéridémie importante et d'une concentration sanguine en acides gras libres élevée.

F/ Complications métaboliques aiguës des diabètes de type 1 et de type 2 (Diabétologie, 1990) :

Les deux complications métaboliques majeures induites par les diabètes de type 1 et 2 sont l'acidose lactique et le coma hyperosmolaire :

- Acidose lactique : c'est une complication majeure au pronostic gravissime (50% de mortalité), qui nécessite des traitements lourds.
- Coma hyperosmolaire : avant d'entrer dans la phase de coma, le sujet (souvent âgé) est atteint de fièvre, de diarrhées. S'en suivent des troubles de conscience et des périodes d'agitation conduisant au coma. Une déshydratation globale est à l'origine de ce type de coma, où l'on constate une hyperglycémie majeure (6 à 15 voire 20 g/l). Les pronostics vitaux, même en cas de traitement (réhydratation d'urgence et stabilisation lente de la glycémie), sont très défavorables (40 à 70% de mortalité).

G/ Traitement :

Le but du traitement est de contrôler la glycémie et les autres facteurs de risque de maladies cardio-vasculaires. Il est également de détecter, prévenir et traiter les complications à long terme comme : hypertension artérielle, pathologies rénales diverses, atteintes de la rétine, atteintes nerveuses, insuffisance vasculaire, ulcération, mycose et gangrène.

1. Traitement du diabète de type 1 (Diabétologie, 1990) :

Le traitement « unique » du diabète de type 1 repose sur l'insulinothérapie, à savoir l'injection d'insuline pour palier au déficit qu'engendre la maladie. Toute la difficulté de ce traitement lourd est de mimer la sécrétion physiologique d'insuline, qui comprend une sécrétion de base (entre les repas et durant la nuit), à laquelle s'ajoutent des pics de sécrétions aux moments des repas. Les besoins quotidiens d'un diabétique de type 1 sont de 0,6 à 0,8 UI par kilogramme de poids corporel, répartis également pour les besoins de base et les besoins relatifs à l'alimentation.

Les autres objectifs du traitement sont le contrôle du poids, l'arrêt du tabagisme s'il y a lieu, le contrôle de la pression artérielle, le contrôle des lipides sanguins, la prévention des infections en particulier urinaires et cutanées et, chez la femme, une programmation des grossesses.

2. Traitement du diabète de type 2 (Diabétologie, 1990) :

En premier lieu, les traitements sont précédés par des démarches visant à faire diminuer le poids, arrêter la consommation de tabac s'il y a lieu, reprendre une activité physique et retrouver une hygiène alimentaire et de vie satisfaisante.

La majorité des traitements du diabète de type 2 consiste en une médication par voie orale. S'il y a échec des agents oraux, on cesse d'utiliser ces derniers et on débute l'insulinothérapie comme dans le diabète de type 1, ou bien on peut utiliser une thérapie combinant insuline et hypoglycémisants oraux. Le **Tableau 2**, page suivante, récapitule les composés actifs (sous leur nom générique) et les produits commerciaux (ayant obtenu une Autorisation de Mise sur le Marché et actuellement commercialisés en France) utilisés dans le traitement du diabète de type 2 par voie orale.

Dans les paragraphes suivants, nous nous proposons de décrire brièvement les principales classes de molécules utilisées par voie orale pour le traitement des diabètes de type 2.

2.a) Les sulfamides hypoglycémisants (BIAM, 2001) :

Les sulfamides hypoglycémisants ont des structures chimiques apparentées aux sulfonyleurées. Leur absorption par la muqueuse digestive est totale et rapide, peu modifiée par l'alimentation. Tous sont métabolisés par le foie en métabolites inactifs pour l'essentiel. Ils sont éliminés par le rein ou par voie biliaire.

Composés actifs (noms génériques)	Produits commerciaux (noms galéniques) / présentations
ACARBOSE	AMAREL 1 mg comprimé
CHLORPROPAMIDE	AMAREL 2 mg comprimé
COLESTYRAMINE	AMAREL 3 mg comprimé
DIAZOXIDE	AMAREL 4 mg comprimé
GLIBENCLAMIDE	DAONIL 5 mg comprimés sécables
GLIBORNURIDE	DIAMICRON 80 mg comprimés sécables
GLICLAZIDE	DIASTABOL 100 mg comprimés
GLIMEPIRIDE	DIASTABOL 50 mg comprimés
GLIPIZIDE	DOLIPOL (arrêt de commercialisation)
GLYBUTAMIDE	EDDIA 850 mg comprimés pelliculés
GLYBUZOLE	EUGLUCAN 5 mg comprimés sécables
GLYCYCLAMIDE	GLIBENESE 5 mg comprimés sécables
GLYCIDINE SODIQUE	GLICLAZIDE BAYER 80 mg comprimés sécables
HYDROXYCHLOROQUINE SULFATE	GLICLAZIDE BIOGARAN 80 mg comprimés sécables
METAHEXAMIDE	GLICLAZIDE EG 80 mg comprimés sécables
METFORMINE CHLORHYDRATE	GLICLAZIDE G GAM 80 mg comprimés sécables
METFORMINE	GLICLAZIDE GNR 80 mg comprimés sécables
METFORMINE EMBONATE	GLICLAZIDE MERCK 80 mg comprimés sécables
MIGLITOL	GLICLAZIDE MSD 80 mg comprimés sécables
ORLISTAT	GLICLAZIDE RATIOPHARM 80 mg comprimés sécables
PHENBUTAMIDE	GLICLAZIDE RPG 80 mg comprimés sécables
REPAGLINIDE	GLIPIZIDE MERCK 5 mg comprimés sécables
TROGLITAZONE	GLUCIDORAL 500 mg comprimés sécables
	GLUCOPHAGE 500 mg comprimés pelliculés
	GLUCOPHAGE 850 mg comprimés pelliculés
	GLUCOR 100 mg comprimés
	GLUCOR 50 mg comprimés
	GLUTRIL 25 mg comprimés sécables
	GLYCEMIREX 80 mg comprimés sécables
	GLYMAX 500 mg comprimés pelliculés
	GLYMAX 850 mg comprimés pelliculés
	HEMIDAONIL 2.5 mg comprimés sécables
	METFIREX 850 mg comprimés enrobés
	METFORMINE BAYER 500 mg comprimés pelliculés
	METFORMINE BAYER 850 mg comprimés pelliculés
	METFORMINE BIOGARAN 850 mg comprimés pelliculés
	METFORMINE EG 500 mg comprimés pelliculés
	METFORMINE EG 850 mg comprimés pelliculés
	METFORMINE G GAM 850 mg comprimés pelliculés
	METFORMINE GNR 500 mg comprimés pelliculés
	METFORMINE GNR 850 mg comprimés pelliculés
	METFORMINE MERCK 500 mg comprimés pelliculés
	METFORMINE MERCK 850 mg comprimés pelliculés
	METFORMINE RATIOPHARM 500 mg comprimés pelliculés
	METFORMINE RATIOPHARM 850 mg comprimés pelliculés
	METFORMINE RPG 500 mg comprimés pelliculés
	METFORMINE RPG 850 mg comprimés pelliculés
	MIGLUCAN 2.5 mg comprimés sécables
	MINIDIAB 5 mg comprimés sécables
	NOVONORM 0,5 mg comprimés
	NOVONORM 1 mg comprimés
	NOVONORM 2 mg comprimés
	OZIDIA 10 mg comprimés à libération modifiée
	OZIDIA 5 mg comprimés à libération modifiée

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des composés actifs (sous leur nom générique) et des produits commerciaux (noms galéniques – produits ayant obtenu une Autorisation de Mise sur le Marché et actuellement commercialisés en France) utilisés dans le traitement du diabète de type 2 (par voie orale) (BIAM, 2001).

2.a.1) Mécanismes d'action :

Cette famille de molécules possède une action hypoglycémiante liée à des effets au niveau du pancréas et, dans une moindre mesure, à des effets extrapancréatiques :

- **Effets pancréatiques - Stimulation de l'insulinosécrétion** : On note une dégranulation des cellules β sans effet sur la synthèse de l'insuline. Les sulfamides hypoglycémiants agissent sur un récepteur membranaire des cellules β , récepteurs étroitement liés au canal potassique sensible à l'ATP. Sous l'effet des sulfamides hypoglycémiants, comme du glucose, le canal potassique se ferme, modifiant le potentiel de membrane de ces cellules et induisant l'influx calcique qui aboutit à la sécrétion d'insuline.
- **Effets extrapancréatiques** : Ces effets extrapancréatiques contribuent pour partie à l'action hypoglycémiante à long terme de ces molécules. Ils s'exercent sur les récepteurs et les étapes post-récepteurs de l'insuline, au niveau des tissus cibles (foie, muscle) corrigeant certains défauts métaboliques qui caractérisent les DNID.

2.a.2) Efficacité des sulfamides hypoglycémiants :

Les sulfamides hypoglycémiants sont efficaces chez les DNID possédant une sécrétion d'insuline résiduelle suffisante. Cependant, parmi les sujets répondant bien au traitement, environ 5 %, par la suite, y deviennent résistants chaque année.

2.a.3) Effets secondaires des sulfamides hypoglycémiants

L'effet secondaire majeur d'un traitement utilisant des sulfamides hypoglycémiants est l'hypoglycémie : hypoglycémie peu sévère (très fréquente) et l'hypoglycémie sévère (plus rare, touchant des patients âgés et/ou sous traitement médicamenteux multiple).

2.b) Les Biguanides (BIAM, 2001) :

Aujourd'hui, de cette famille de molécules, seule la Metformine reste utilisée dans la plupart des pays dont la France. Nous ne citerons donc que les données la concernant. Après une prise orale, de fortes concentrations sont atteintes dans la muqueuse duodénale et intestinale. La Metformine n'est pas métabolisée chez l'homme. Elle est rapidement éliminée sous forme active par le rein (65%) et dans les selles (20%).

2.b.1) Mécanismes d'action :

Le mécanisme d'action de la Metformine reste assez méconnu. Elle réduit l'absorption intestinale du glucose (ainsi que de la vitamine B12 et du calcium). Elle potentialise également l'action de l'insuline sur le muscle de 20 à 30% dans le DNID, et de 18% dans le DID. Un effet plus modéré sur le foie est admis par une réduction de la production de glucose. Enfin, une action favorable sur les lipides et les triglycérides est fréquemment retrouvée. Cela rend cette molécule particulièrement intéressante dans le traitement des DNID en surpoids, mais aussi des sujets intolérants au glucose présentant une triglycéridémie élevée.

2.b.2) Effets secondaires des Biguanides :

Des troubles digestifs sont fréquemment observés (5 à 20 % des personnes traitées) : douleurs abdominales, diarrhées, vomissements, altération du goût. L'acidose lactique représente une complication gravissime (50 % ou plus de mortalité) mais exceptionnelle.

2.c) Les inhibiteurs des α -glycosidases et des α -amylases :

Ils visent à ralentir les activités enzymatiques, qui assurent la digestion de l'amidon et des polysaccharides apparentés, afin d'amortir l'effet hyperglycémiant des sucres simples issus de la digestion. Actuellement, deux molécules majeures (l'acarbose et le miglitol) sont

commercialisées et utilisées dans le traitement du diabète de type 2 en appui d'autres traitements (voir précédemment) et de la régulation de l'hygiène de vie du sujet traité. Leurs effets, certes favorables sont néanmoins modestes et s'accompagnent d'effets digestifs fréquents et désagréables. Les propriétés thérapeutiques et pharmacologiques, les effets secondaires et les contre-indications de ces deux principes actifs sont décrits ci-après.

2.c.1) *Miglitol* :

- **Propriétés thérapeutiques** : le miglitol est un inhibiteur réversible des α -glycosidases intestinales (Mooradian & Thurman, 1999; Scott & Spencer, 2000; BIAM, 2001). Il est indiqué dans le traitement du diabète non insulino-dépendant (DNID) chez des patients insuffisamment équilibrés par un régime seul ou par un régime associé à un sulfamide. Sous l'influence du miglitol, la digestion des sucres en monosaccharides ou disaccharides absorbables au niveau de l'intestin est retardée d'une façon dose-dépendante. L'administration de miglitol réduit l'hyperglycémie postprandiale et les fluctuations glycémiques (Mooradian & Thurman, 1999; Scott & Spencer, 2000). L'absorption orale de glucose n'est pas inhibée par le miglitol. Contrairement aux sulfamides, le miglitol ne stimule pas la sécrétion d'insuline par le pancréas.
- **Propriétés pharmacocinétiques** : l'activité pharmacodynamique du miglitol est locale au niveau du tractus gastro-intestinal. Après administration orale de faibles doses (12,5 à 25 mg), le miglitol est presque totalement absorbé. Pour les doses recommandées de 50 mg et 100 mg, le taux d'absorption est respectivement de 90% et 60%. L'absorption du miglitol suit la cinétique de Michaelis-Menten avec une fenêtre d'absorption de 6 à 10 heures suivant l'administration (Mooradian & Thurman, 1999; Scott & Spencer, 2000). Le médicament n'est pas métabolisé dans l'intestin, mais est éliminé sous forme inchangée, presque exclusivement par voie rénale.
- **Effets secondaires** : compte tenu de son mode d'action, le miglitol peut entraîner chez certains patients une augmentation de la quantité de polysaccharides non digérés dans le côlon. Ces derniers peuvent aussi être utilisés par la flore intestinale, entraînant alors une augmentation de la production de gaz intestinaux, à l'origine de flatulences ou de météorisme. D'autres effets secondaires ont été mis en évidence : diarrhées, douleurs abdominales, borborygmes, sensations de ballonnement, nausées, constipations, dyspepsies, hypoglycémies.
- **Contre-indications** : les contre-indications du miglitol sont nombreuses : hypersensibilité à ce produit, enfants de moins de 18 ans, colopathies organiques inflammatoires, ulcère intestinal, occlusion intestinale, troubles digestifs, insuffisance rénale sévère, grossesse et allaitement.

2.c.2) *Acarbose* :

- **Propriétés thérapeutiques** : l'acarbose (Truscheit *et al.*, 1981; Jacob, 1995; Holman *et al.*, 1999; BIAM, 2001) est un pseudo-tétrasaccharide, d'origine microbienne (voir chapitre « *Les inhibiteurs d' α -amylase de type pseudo-polysaccharidique* », page 31 et suivantes). Au niveau de la bordure en brosse de l'intestin, l'acarbose agit par inhibition compétitive des α -glycosidases et plus particulièrement des α -amylases. Il diminue ainsi la dégradation des sucres complexes en monosaccharides absorbables. L'acarbose diminue donc l'hyperglycémie postprandiale, sans entraîner d'hyperinsulinémie ni de modification de poids (Balfour & McTavish, 1993). L'acarbose est toujours prescrit en complément du régime alimentaire, soit seul, soit associé à d'autres traitements (Mooradian & Thurman, 1999).
- **Propriétés pharmacocinétiques** : après administration orale, l'acarbose est dégradé dans la lumière intestinale par des enzymes bactériennes et de la muqueuse digestive. L'acarbose et son métabolite pharmacologiquement actif (composant 2, voir page 33)

sont peu absorbés par la muqueuse digestive. Les métabolites inactifs formés au niveau intestinal sont excrétés par voie urinaire (35 % de la dose administrée) ou dans les selles (51 % de la dose administrée) (Mooradian & Thurman, 1999).

- **Effets secondaires** : les effets secondaires de l'acarbose (Mackay *et al.*, 1997) sont comparables à ceux du miglitol (cf. ci-dessus), du fait de leurs cibles et modalités d'action similaires : flatulence, météorisme, diarrhée, douleur abdominale, et de très rares occlusions intestinales, augmentations des transaminases, ictères ou hépatites.
- **Contre-indications** : les contre-indications de l'acarbose sont nombreuses : hypersensibilité à ce produit, enfants de moins de 15 ans, troubles gastro-intestinaux, maladie inflammatoire du colon, hernie intestinale, syndrome subocclusif, insuffisance rénale sévère, allaitement.

Chapitre 6

Les deux isoenzymes de l' α -amylase d'orge : AMY1 et AMY2

A/ Préambule :

De multiples gènes codant des isoenzymes d' α -amylase sont présents dans les plantes. Ainsi, il semblerait qu'au moins 7 gènes codant des α -amylases existent chez l'orge (Khursheed & Rogers, 1988; Huang *et al.*, 1992) et que ces gènes paraissent provenir d'un ancêtre commun (Huang *et al.*, 1992; Janecek, 1994). Deux classes majeures de gènes (nommées A et B) ont été mises en évidence pour les α -amylases de plantes. Toutes les céréales possèdent un nombre équivalent de gènes des deux classes alors que l'orge compte nettement plus de gènes de classe A (Huang *et al.*, 1992). Plus précisément, la classe A est elle-même divisée en deux sous-classes contenant les gènes codant les deux isoenzymes d' α -amylase présents chez l'orge. Ces deux isoenzymes peuvent notamment être distingués par leur pI.

Ainsi, l' α -amylase d'orge de bas pI (compris entre 4,7 et 5,1) est reconnue sous le nom d' α -amylase isoenzyme 1 (ou AMY1), et celle de haut pI (entre 5,7 et 6,2) sous le nom d' α -amylase isoenzyme 2 (ou AMY2) (Jacobsen & Higgins, 1982; Bertoft *et al.*, 1984; Ajandouz *et al.*, 1992). AMY1 contient 414 résidus (PM = 45.342 Da), tandis que AMY2 en comporte 403 pour un PM de 45.005 Da (Rogers & Milliman, 1983; Rogers, 1985b). La synthèse de ces deux isoenzymes par la plante, et plus généralement celle d'un ensemble d'hydrolases, est contrôlée par une cascade complexe d'événements mettant en jeu des phytohormones (acides gibbérelliques). Elle est déclenchée par des paramètres externes tels que la température ou l'humidité (Jones & Jacobsen, 1991). Malgré leur très grande similitude de séquence (environ 80% d'identité), AMY1 et AMY2 se distinguent remarquablement à plusieurs niveaux : point isoélectrique, stabilité à pH acide ou à haute température, affinité pour les ions calcium et pour les substrats solubles, efficacité différente pour l'hydrolyse des granules d'amidon. Enfin, seul AMY2 est inhibé par l'inhibiteur protéique endogène bifonctionnel BASI.

Dans les paragraphes suivants, nous rappellerons successivement les connaissances antérieures concernant AMY2 et AMY1 et nous décrirons en détail leurs points communs, mais surtout leurs dissemblances.

B/ Connaissances antérieures sur AMY2 :

La première structure tridimensionnelle d'une α -amylase de plante fut celle de AMY2. Elle a été déterminée par diffraction de rayons X à une résolution de 2,8 Å (Kadziola, 1993; Kadziola *et al.*, 1994). Depuis lors, deux structures décrivant AMY2 en complexe avec des inhibiteurs ont été déterminées. La première est celle du complexe AMY2 / acarbose, résolue par diffraction de rayons X à 2,8 Å (Kadziola *et al.*, 1998). La seconde est celle d'un complexe avec BASI à 1,9 Å de résolution (Vallée *et al.*, 1994; Vallée *et al.*, 1998).

1. Structure 3D de AMY2 : les différents domaines :

La structure globale de AMY2 peut être divisée en trois domaines (voir *Figure 10*, page suivante) (Kadziola *et al.*, 1994).

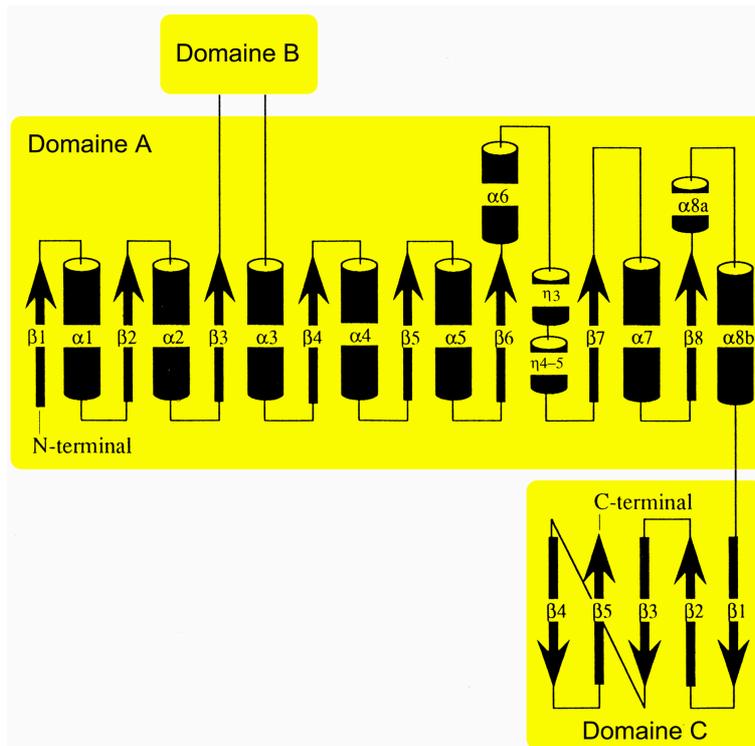


Figure 10 : Représentation schématique des structures secondaires de AMY2 et de son organisation en trois domaines (adapté de Kadziola *et al.*, 1994).

1.a) Le domaine A :

Le domaine central (dit « domaine A ») est un tonneau $(\beta/\alpha)_8$ dans lequel sont alternés des hélices α et des brins β (repliement en « TIM-barrel » (Banner *et al.*, 1975)). Les brins β déterminent un feuillet de brins β parallèles qui constitue la surface interne du tonneau. Les hélices α , entourant ce feuillet, constituent la paroi extérieure du tonneau (Kadziola *et al.*, 1994). On peut constater une grande régularité dans le positionnement des brins β alors que l'organisation des hélices apparaît moins régulière. De plus, les hélices α_6 et α_8 du domaine A sont discontinues et divisées en plusieurs sous parties : α_6 est constituée de l'ensemble ($\alpha_6 + \eta_3 + \eta_4 + \eta_5$) et α_8 par les deux sous-hélices ($\alpha_{8a} + \alpha_{8b}$) (Kadziola *et al.*, 1994) (voir **Figures 10 et 11a**) – note : η indique les hélices de type 3_{10} .

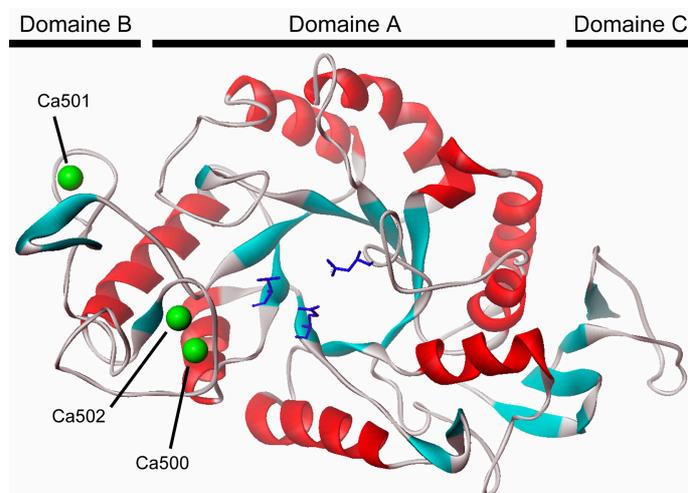


Figure 11a : Vue globale de la structure de AMY2 (Kadziola *et al.*, 1994) : l'enzyme est vue selon l'axe du tonneau $(\beta/\alpha)_8$ central (domaine A). Les ions calcium (Ca500, 501 et 502) sont représentés par des boules vertes et les trois résidus catalytiques sont colorés en bleu.

1.b) Le domaine B et ses sites de fixation d'ions calcium :

Emergeant du tonneau (β/α)₈ central, une longue boucle de 65 acides aminés relie le brin β 3 et l'hélice α 3 du domaine A et constitue le domaine B (voir **Figures 10 et 11a**). Bien que ce domaine soit peu structuré, les facteurs d'agitation thermique des atomes le composant ont des valeurs faibles, ce qui suggère que le domaine B a un repliement tout à fait stable (Kadziola *et al.*, 1994). Ceci peut notamment s'expliquer par la présence d'un feuillet β antiparallèle courbé, formé par la mise en commun de résidus du domaine B et de 26 acides aminés de la zone α 2- β 2 du domaine A (Kadziola *et al.*, 1994). Trois ions calcium sont piégés dans le domaine B et déterminent un nombre important d'interactions avec la protéine (Kadziola *et al.*, 1994). Ils sont essentiels à l'intégrité structurale du domaine, au bon repliement de la chaîne principale aux abords du site actif et au positionnement de résidus de ce dernier (Kadziola *et al.*, 1998). Un de ces ions (Ca500) est commun à toutes les α -amylases, mais les deux autres sont spécifiques de AMY2 (Ca501 et Ca502). Ca502 est présent dans la même boucle que Ca500, alors que Ca501 est situé à l'opposé du domaine B dans une boucle très accessible au solvant à environ 20 Å des deux autres. Chacun de ces ions détermine 7 ou 8 liaisons avec des atomes d'oxygène appartenant aux fonctions carboxyliques de résidus ou à une liaison peptidique, ou bien encore à des molécules d'eau.

1.c) Le domaine C :

Le domaine C-terminal, composé de 61 résidus, est organisé selon un feuillet β antiparallèle à 5 brins (voir **Figures 10 et 11a**). Les domaines A et C sont étroitement liés car ils mettent en contact leurs surfaces hydrophobes respectives. Aucun rôle apparent n'a pu être identifié pour le domaine C de AMY2 (Jespersen *et al.*, 1991). Ce domaine, cependant, semble impliqué dans la thermostabilité d'autres α -amylases (Aghajari *et al.*, 1998b; Machius *et al.*, 1998). La structure d'un complexe PPA / maltopentaose, montrant la présence d'un maltose au niveau de ce domaine (Qian *et al.*, 1995), n'a donné aucun élément de réponse supplémentaire.

2. Les sites de fixation du substrat chez AMY2 :

Des travaux de biochimie et des études structurales ont caractérisé le site actif de AMY2 et ont montré l'existence d'un site de fixation du substrat à la surface de l'enzyme.

2.a) Site de surface :

L'existence d'un deuxième site de fixation de substrats (en addition du site actif) sur les α -amylases d'orge a été mise en évidence (MacGregor & MacGregor, 1985). Il a la propriété de lier les β -cyclodextrines en compétition avec les granules d'amidon (Weselake & Hill, 1983; Gibson & Svensson, 1987). Les résidus définissant ce site (Trp276 et Trp277) ont été révélés par des techniques de marquages différentiels des tryptophanes (Gibson & Svensson, 1987). La comparaison des séquences de AMY2 et de l'amylase TAKA (de structure 3D déterminée par Matsuura *et al.*, 1984) avait permis de conclure que ce site se situait à la surface de l'enzyme (Gibson & Svensson, 1987) et qu'il était complètement indépendant du site actif. Il a été nommé « *starch granule binding surface site* » (site de fixation des granules d'amidon) à cause de son implication dans l'interaction avec ces derniers (Weselake & Hill, 1983). Enfin, il a montré une faible affinité pour l'acarbose (K_d de 5 mM) (Gibson & Svensson, 1987).

La mutation Trp279-Ala sur AMY1 (correspondant à Trp277 chez AMY2) a diminué l'affinité pour les granules d'amidon d'un facteur 10, comparativement à l'enzyme sauvage (Søgaard *et al.*, 1993). L'implication de Trp278 chez AMY1 (Trp276 pour AMY2) n'a pas été évaluée, ce dernier mutant n'ayant pu être produit. En outre, ce tryptophane est conservé, ou remplacé par un autre résidu aromatique, chez toutes les amylases de céréale.

Aucun équivalent structural de ce site n'a été retrouvé chez les α -amylases de microorganismes ou de mammifères (Huang *et al.*, 1991; Søgaard *et al.*, 1993), à l'exception de l' α -amylase de pancréas de porc où il a été montré l'existence d'un site ressemblant (Qian *et al.*, 1995).

La structure de AMY2 a confirmé la présence de ce site, révélé sa topologie détaillée et sa localisation à une distance d'environ 20 Å du site actif (Kadziola *et al.*, 1994) (voir **Figure 11b**). Les deux résidus tryptophane sont à l'extrémité C-terminale de l'hélice α_6 , juste en amont du brin β_7 . Dans le complexe AMY2 / acarbose (Kadziola *et al.*, 1998), une molécule d'acarviosine a été identifiée au niveau de ce site. Il a été suggéré que la partie maltose manquante avait pu être coupée, ou bien qu'elle était désordonnée car peu stabilisée, ceci conduisant à l'absence de densité électronique. L'unité acarviosine est liée à l'enzyme par deux interactions hydrophobes impliquant les deux résidus aromatiques Trp276 et Trp277. Ce type d'empilement est caractéristique des interactions protéine / sucre (Quioco, 1989; Vyas, 1991). En outre, 5 liaisons hydrogène et contacts de van der Waals contribuent à la liaison de l'acarviosine au site. Ces liaisons impliquent les résidus Gln226, Val229 et Asp233.

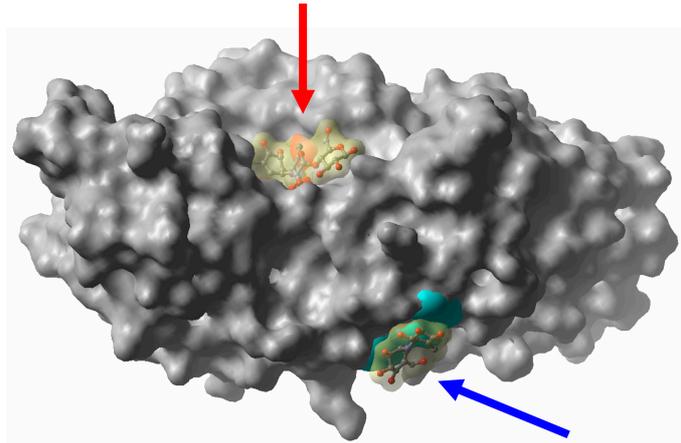


Figure 11b : Représentation de la surface d'accessibilité au solvant et mise en évidence des sites de fixation de l'acarbose dans le complexe AMY2 / acarbose (Kadziola *et al.*, 1998) : le site catalytique est indiqué par la flèche rouge, tandis que le site de surface (« starch granule binding surface site »), coloré en bleu, est montré par la flèche bleue. Les molécules de composant 2 et d'acarviosine fixées respectivement au niveau de ces deux sites sont représentées par les surfaces jaunes.

2.b) Site actif :

Le site actif de AMY2 est constitué d'un grand nombre de résidus impliqués dans la fixation spécifique de polysaccharides, mais aussi dans la réaction d'hydrolyse. Il a été démontré, par des études enzymologiques de profils d'action, qu'il existait 10 sous-sites chez AMY2. Cependant, deux distributions ont été proposées : -6 à -1 et +1 à +4 (Ajandouz *et al.*, 1992), ou -7 à -1 et +1 à +3 (MacGregor *et al.*, 1994).

Des résultats de modélisation moléculaire (André *et al.*, 1999) ont suggéré que la première répartition était la plus vraisemblable. Ces travaux ont simulé la fixation d'un maltodécaose (DP10) sur la base de la structure expérimentale du complexe AMY2 / acarbose (Kadziola *et al.*, 1998) (voir **Figure 11c**, ci-après). Chaque sous-site a été ainsi défini d'après ce modèle qui montre, par ailleurs, que deux résidus aromatiques (Y104 et Y211) sont situés aux deux extrémités de la crevasse (respectivement du côté des sous-sites négatifs et positifs, voir **Figure 11c**).

Enfin, la chaîne polysaccharidique pourrait, selon la même étude, entrer dans l'enzyme par deux voies différentes du côté des sous-sites négatifs, bien que cette hypothèse semble moins vraisemblable que celle d'un point d'accès unique (André *et al.*, 1999).

Le complexe AMY2 / acarbose a donné une définition plus précise du site actif. Il a la forme d'une crevasse largement ouverte et est situé à l'extrémité C-terminale du tonneau du domaine A, comme c'est le cas pour la totalité des enzymes possédant un *TIM-barrel* (Pujadas & Palau, 1999). Les trois résidus catalytiques essentiels (Asp179, Glu204 et Asp289) sont disposés au fond de la crevasse catalytique.

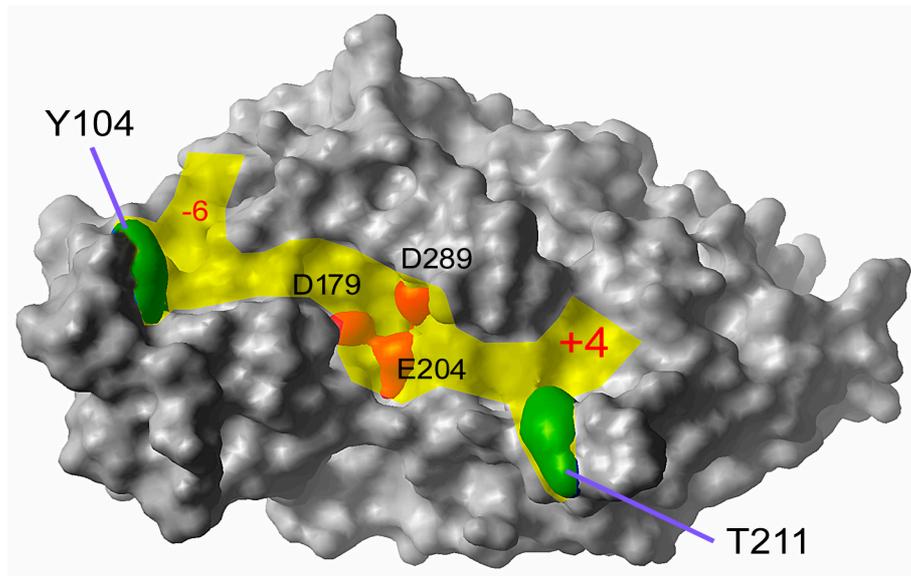


Figure 11c : Topologie proposée pour le site actif de AMY2 d'après des travaux de modélisation moléculaire (André *et al.*, 1999) : l'enzyme est vu selon la même orientation que la Figure 11a. Les résidus catalytiques sont représentés par les surfaces rouges. Le parcours de la crevasse est montré en jaune. Les résidus Y104 et T211 (en vert) marquent les extrémités de la crevasse, respectivement du côté des sous-sites -6 et +4.

Les sous-sites -1, +1 et +2 ont été décrits structurellement. Ils sont occupés par une molécule d'acarbose tronquée (composant 2), résultant certainement de l'action de l'enzyme sur l'inhibiteur. La reconnaissance de l'acarbose au niveau du site actif implique plusieurs chaînes latérales polaires, non polaires ou chargées. Les résidus impliqués sont : Trp9, Tyr51, His92, Phe143, Arg177, Asp179, Phe180, Lys182, Glu204, Trp206, Thr207, Ser208, His288, Asp289 et Met296 (voir **Figures 12 et 13**, page suivante). Il en résulte un total de 15 interactions sucre / enzyme par liaisons hydrogène. De plus, Tyr51 et Trp206 déterminent des interactions hydrophobes par empilement avec deux unités sucre de la molécule d'acarbose tronquée (voir **Figure 12**). Chacun des résidus mentionnés précédemment a une grande importance. En effet, ils sont impliqués dans la fixation du substrat, dans la réaction d'hydrolyse ou dans des processus de stabilisation ou d'induction de charges locales nécessaires au mécanisme de catalyse. Le sous-site -1 montre un nombre élevé d'interactions avec l'unité de sucre l'occupant, contribuant à la stabilisation de cette dernière et à la restriction de ses possibilités de mouvement. De plus, elle pourrait adopter une conformation de plus haute énergie qui diminuerait ainsi l'énergie d'activation de la réaction d'hydrolyse en stabilisant la conformation de l'état de transition (Kadziola *et al.*, 1998).

La même étude a révélé la présence d'une poche contenant 5 molécules d'eau, localisée à proximité des résidus catalytiques (l'une d'elles est située entre les résidus Glu204 et Asp289 et interagit avec eux). La présence de cette cavité d'eau a été confirmée avec la structure du complexe AMY2 / BASI (Vallée *et al.*, 1998). Ces 5 molécules d'eau sont virtuellement superposables avec celles contenues dans la structure de l'amylase TAKA d'*Aspergillus niger* (Boel *et al.*, 1990; Brady *et al.*, 1991), tandis que seulement 3 (dont la molécule liant les deux résidus catalytiques) sont retrouvées chez PPA (Qian *et al.*, 1994; Machius *et al.*, 1996). Enfin, 4 de ces molécules d'eau sont aussi présentes chez la CGTase, membre de la famille des α -amylases (Klein & Schulz, 1991; Lawson *et al.*, 1994; Strokopytov *et al.*, 1995; Uitdehaag *et al.*, 2000).

Malgré la richesse des informations structurales concernant le site actif de AMY2, les sous-sites -6 à -2, +3 et +4 ont été uniquement définis par modélisation moléculaire (André *et al.*, 1999). Aucune structure n'a pu, à ce jour, détailler expérimentalement ces derniers sous-sites chez AMY2.

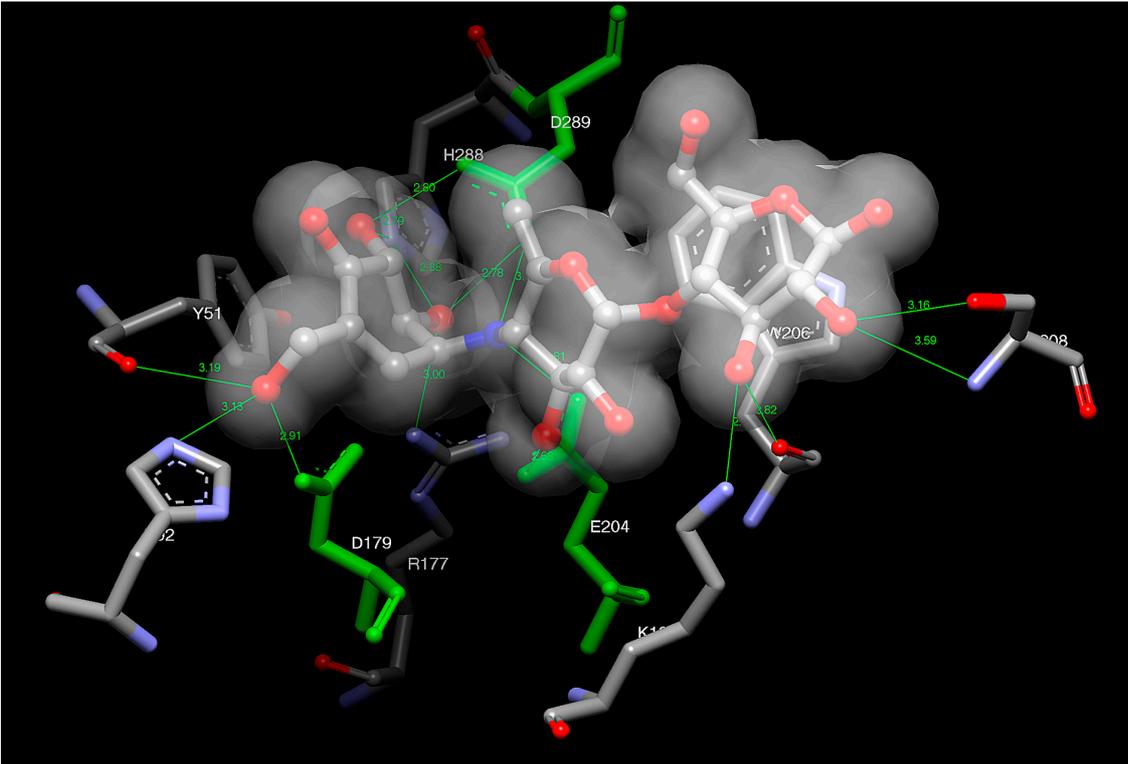


Figure 12 : *Vue du site actif du complexe AMY2 / acarbose (Kadziola et al., 1998) : les résidus catalytiques sont colorés en vert. Les molécules d'eau ne sont pas représentées et seuls les résidus interagissant avec l'acarbose sont dessinés. Les trois cycles de l'inhibiteur avec leur surface de van der Waals sont en gris. Les liaisons hydrogène sont représentées par les traits pleins verts.*

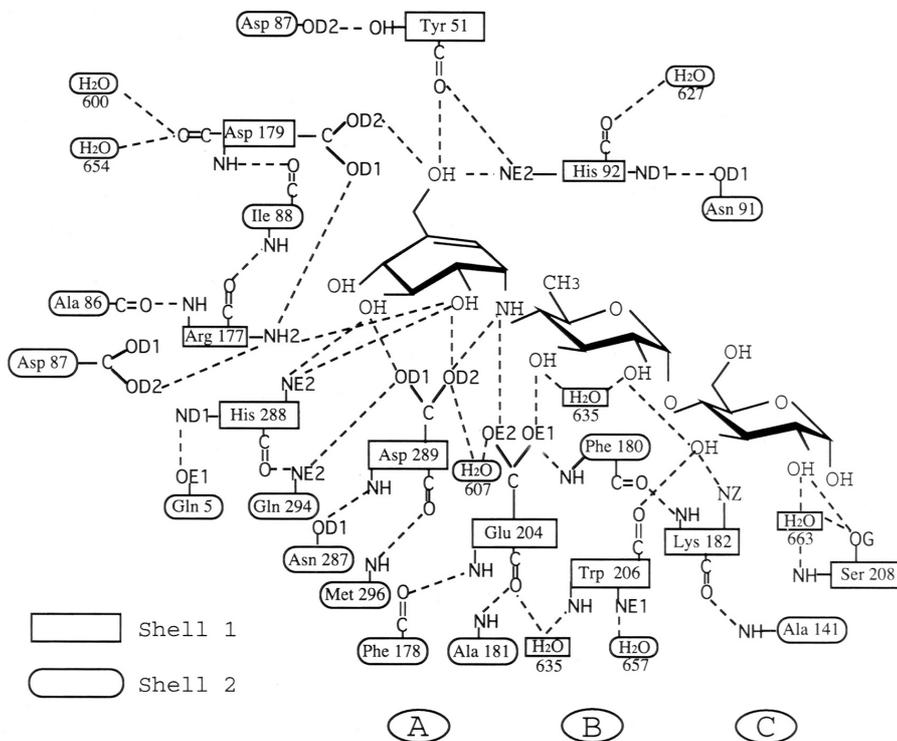


Figure 13 : *Diagramme schématique du réseau de liaisons hydrogène entre l'acarbose et le site actif de AMY2 (reproduit de Kadziola et al., 1998). A, B et C correspondent respectivement aux sous-sites -I, +1 et +2.*

3. Mécanisme d'action proposé pour AMY2 :

Sur la base du complexe entre AMY2 et l'acarbose (Kadziola *et al.*, 1998) et de résultats de mutagenèse dirigée (Søgaard *et al.*, 1993), le mécanisme d'hydrolyse suivant a été proposé : une fois le substrat fixé dans la crevasse catalytique, le cycle occupant le sous-site -1 adopte une conformation tendue, de haute énergie, induite par les nombreuses interactions avec les résidus dudit sous-site. Glu204 et Asp179 agissent en tant que couple acide/base et nucléophile, respectivement. La distance entre les extrémités des chaînes latérales de ces deux résidus est de 5,2 Å, ce qui est en accord avec la distance d'un mécanisme avec rétention de configuration (Davies & Henrissat, 1995). La fonction probable de Asp289 est d'augmenter localement le pK_a de Glu204 et de contribuer à la protonation du substrat.

La rupture de la liaison entre les atomes C1 et O4 du substrat conduirait à la formation d'un ion oxocarbonium (comme état intermédiaire) et à l'hybridation sp^2 de la liaison C1-O5. Les trois résidus stabiliseraient alors la charge positive acquise par cette dernière. L'ion oxocarbonium pourrait alors évoluer vers deux états : soit il resterait tel qu'il est (adoptant une conformation demi-chaise), soit il y aurait création d'un intermédiaire covalent entre son atome C1 et l'atome Asp179-Oδ1. Puis, l'atome d'oxygène de la molécule d'eau présente entre Glu204 et Asp289 approcherait le carbone C1 de l'ion oxocarbonium (voir **Figure 14**). Glu204 recouvrerait alors son état natif en arrachant un proton à la molécule d'eau et l'ion OH^- ainsi formé réaliserait l'attaque nucléophile de l'atome C1. Ceci conduirait à la transformation de l'ion oxocarbonium en sucre « normal » avec un groupement hydroxyle réducteur et un carbone anomérique en configuration α .

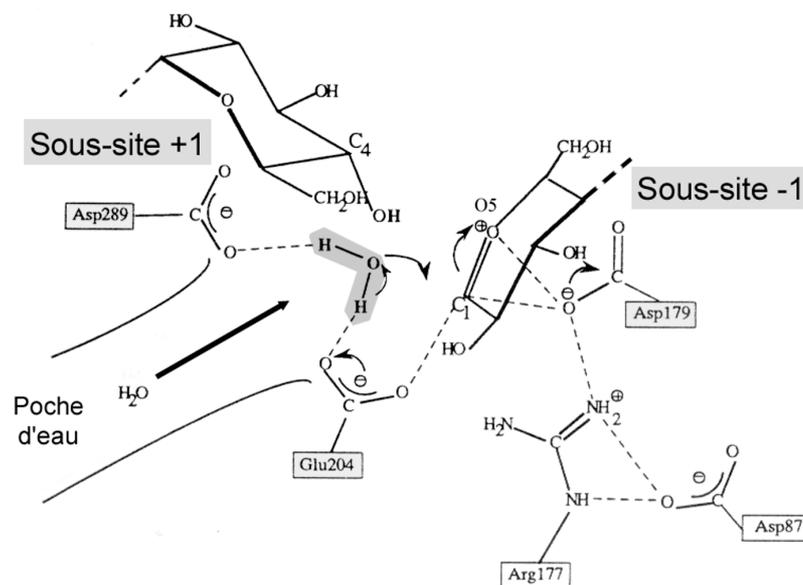


Figure 14 : Schéma de la dernière étape du mécanisme d'hydrolyse proposé pour AMY2 : la molécule d'eau catalytique activée par Glu204 va permettre à ce dernier de retrouver son état natif. L'ion OH^- formé va, à son tour, transformer l'ion oxocarbonium (état intermédiaire) en sucre possédant un groupe hydroxyle réducteur sur le carbone C1 en configuration anomérique α (reproduit et adapté de Kadziola, 1993).

4. Mode d'inhibition de AMY2 par BASI :

BASI est une protéine de 19,6 kDa, formée par un tonneau β à 12 brins, qui inhibe AMY2 en masquant sa crevasse catalytique, bloquant ainsi totalement l'accessibilité du site actif au substrat (Vallée *et al.*, 1998). La surface de contact entre les deux protéines est très importante (2355 Å²) et comprend trois régions d'interaction situées à proximité des résidus catalytiques de AMY2. Cependant, BASI n'interagit pas directement avec ces derniers. Une

large cavité est créée à l'interface AMY2-BASI. Un ion calcium solvato y est piégé et est stabilisé par 6 molécules d'eau disposées selon une géométrie trigonale biprismatique. Cinq de ces molécules d'eau déterminent des liaisons hydrogène avec les résidus catalytiques et les acides aminés Glu168 et Tyr170 de BASI.

Six des huit résidus de AMY2 engagés dans l'interaction avec BASI ne sont pas conservés chez AMY1. Leur rôle a été confirmé par ingénierie protéique (Rodenburg *et al.*, 2000). Au moins trois résidus de AMY2 sont cruciaux : Arg128 qui détermine une interaction de charge avec Ser77_{BASI} ; Asp142 qui forme un pont salin avec Lys140_{BASI} ; et la cis-Pro129 qui oriente favorablement Arg128.

Un hybride (AMY1-(1-90)/AMY2-(90-403)) a été créé et est inhibé par BASI (K_i de 0,33 nM comparé à 0,22 nM pour AMY2) (Rodenburg *et al.*, 1994; Juge *et al.*, 1995).

D'autre part, Arg128_{AMY2} a été introduit dans AMY1 en plus de la mutation K130P (qui introduit l'équivalent de Pro129_{AMY2} dans AMY1). De plus, l'hybride (AMY1-(1-161)/AMY2-(161-403), non inhibé par BASI, a été utilisé (Rodenburg *et al.*, 1994; Juge *et al.*, 1995) et la double mutation T129R-K130P lui a conféré une sensibilité à BASI avec un K_i de 7 μ M (Rodenburg *et al.*, 2000).

C/ Connaissances antérieures sur AMY1 et comparaison AMY1 / AMY2 :

Nous allons examiner, dans les paragraphes suivants, les caractéristiques connues de AMY1 et les comparer à celle de AMY2. Nous présenterons, enfin, quelques résultats majeurs issus de travaux d'ingénierie protéique sur AMY1.

1. Comparaison des séquences de AMY1 et AMY2 :

La comparaison d'une cinquantaine de séquences connues d' α -amylases a permis de montrer l'existence d'au moins quatre régions d'identité d'une dizaine de résidus chacune (Friedberg, 1983; Svensson, 1991; Janecek, 1992). Ainsi, les résidus suivants sont retrouvés dans toutes les α -amylases (numérotation de AMY1) : G25, P41, Y52, Y58, G66, H93, D149, V157, D180, E205, D291 et G318. Certains résidus, moins conservés, sont tout de même retrouvés chez plusieurs amylases : D88, V90, N92, D133, R178 et I366. Ces derniers sont très souvent impliqués dans la fixation d'ions calcium ou chlore. Plus récemment, la présence de 8 segments conservés (chacun ayant trois résidus) a été mise en évidence dans la famille des α -amylases (Pujadas & Palau, 2001).

La comparaison des séquences de AMY1 et de AMY2 montre une forte homologie (environ 80%) entre les deux isoenzymes (voir **Figure 15**, page suivante), mais une très faible similarité avec les α -amylases animales ou de microorganismes (Rogers & Milliman, 1983; Rogers, 1985a).

2. Comparaison des propriétés physico-chimiques et enzymatiques de AMY1 et AMY2 :

2.a) Des propriétés et caractéristiques remarquablement différentes :

Malgré cette importante homologie de séquence, les deux isoenzymes démontrent des différences remarquables quant à leurs propriétés enzymatiques et physico-chimiques.

La première concerne leur point isoélectrique. Ainsi, AMY1 est l' α -amylase d'orge de bas pI (compris entre 4,7 et 5,1), tandis que AMY2 est celle de haut pI (entre 5,7 et 6,2) (Jacobsen & Higgins, 1982; Bertoft *et al.*, 1984; Ajandouz *et al.*, 1992).

Autre différence, AMY1 lie plus fortement les ions calcium que AMY2 (Bertoft *et al.*, 1984; Bush *et al.*, 1989; Rodenburg *et al.*, 1994). AMY1 est aussi considérablement plus stable à pH acide (Rodenburg *et al.*, 1994), mais moins stable à haute température (Bertoft *et al.*, 1984).

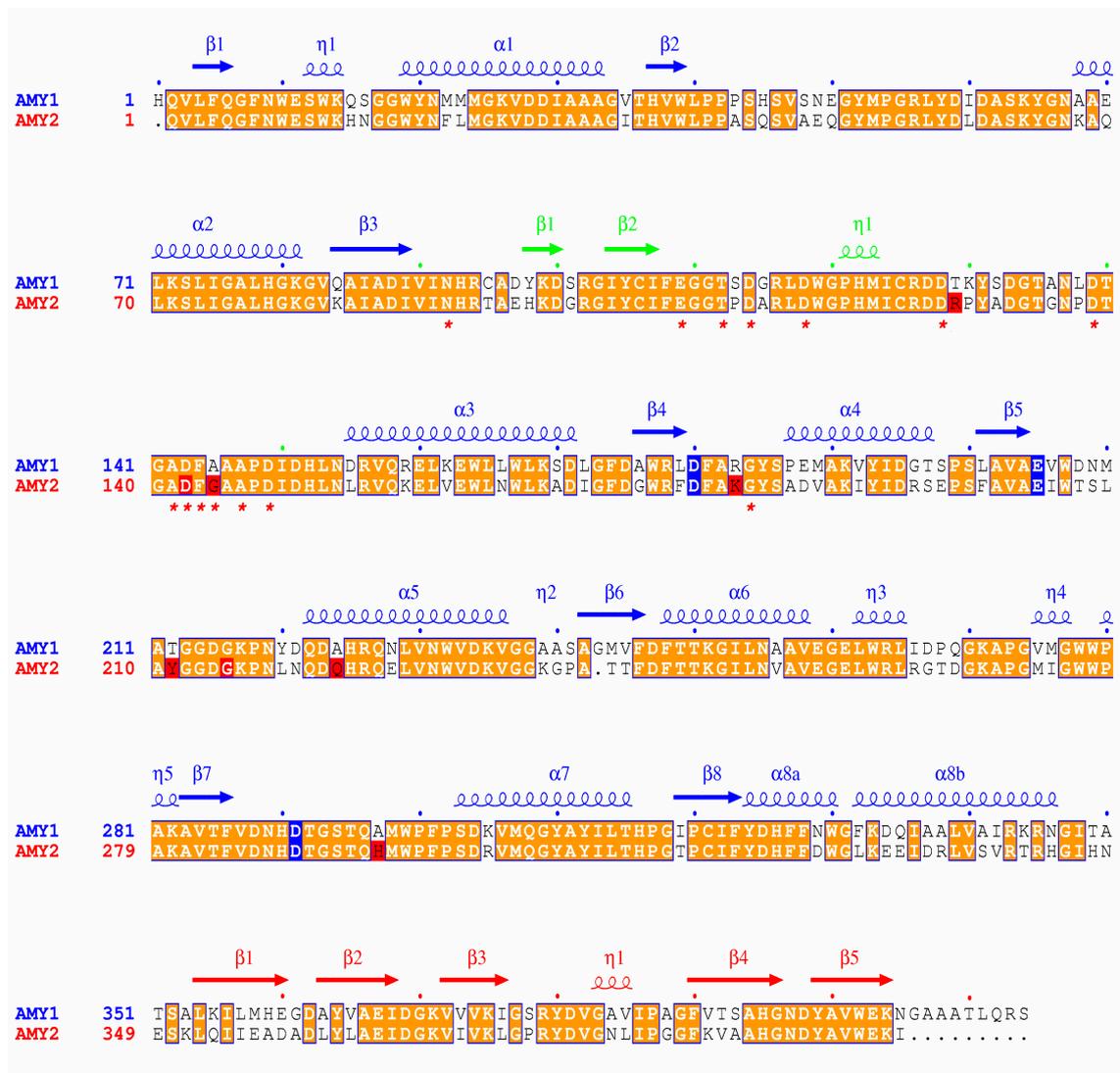


Figure 15 : Alignement des séquences des α -amylases : isoenzymes 1 et 2 (AMY1 et AMY2) de l'orge. Les résidus identiques sont encadrés en orange. La structure secondaire de AMY2 (déduite de la structure cristallographique) est présentée au dessus de l'alignement (η indique les hélices 3_{10}). Ces structures secondaires sont colorées suivant leur appartenance à un domaine (domaines A, B et C colorés en bleu, vert et rouge respectivement). Les résidus catalytiques sont encadrés en bleu, tandis que les résidus de AMY2 impliqués dans les interactions avec BASI sont encadrés en rouge. Enfin, les astérisques présentent les résidus de AMY2 liant les trois ions calcium présents dans la structure.

L'activité de AMY2 sur un substrat insoluble d'amidon bleu augmente pour des concentrations croissantes en ion calcium, et atteint son maximum pour 5 - 10 mM de CaCl_2 . L'activité de AMY1 sur le même substrat montre peu de variation dans une échelle de concentration en CaCl_2 comprise entre 10 μM et 10 mM (Rodenburg *et al.*, 1994).

Si l'on incube les deux isoenzymes à pH 3,5 - 37°C, AMY1 perd 50% de son activité après 30 minutes, tandis que AMY2 subit la même perte d'activité en seulement 1 minute. Dans ces conditions, l'ajout de CaCl_2 (5 mM ou 50 mM) permet de stabiliser les deux isoenzymes, ceci conduisant à un abaissement du taux d'inactivation d'un facteur 3 à 5 (Rodenburg *et al.*, 1994).

La stabilité des isoenzymes a été mesurée après chélation des ions calcium dans des conditions optimales de pH et de température (pH 5,4 - 30°C). Ainsi, en absence de calcium, AMY1 conserve 78% de son activité, contre 98% pour AMY2.

Enfin, si l'on incube les deux isoenzymes à 60°C pendant 10 minutes, AMY1 perd 95% de son activité optimale mesurée à 30°C, tandis que la perte pour AMY2 n'est que de 20%.

Comparé à AMY2, AMY1 dégrade mieux les granules d'amidon et démontre une affinité supérieure pour les substrats en général. Cependant, AMY2 est plus actif sur les substrats d'amylose (MacGregor & Ballance, 1980; Bertoft *et al.*, 1984; MacGregor & Morgan, 1986; Søgaaard & Svensson, 1990; Ajandouz *et al.*, 1992; MacGregor *et al.*, 1994).

Les paramètres cinétiques des deux isoenzymes ont été déterminés avec deux substrats solubles (*p*-nitrophényl- α -D-maltoheptaoside (PNPG7) et amylose DP17) et l'inhibiteur acarbose. Ils sont résumés dans le tableau ci-dessous (Rodenburg *et al.*, 1994) :

Isoenzyme	Paramètres cinétiques des α -amylases avec leur substrat						
	PNPG7			Amylose DP17			Acarbose
	K_m mM	k_{cat} s ⁻¹	k_{cat}/K_m mM ⁻¹ .s ⁻¹	K_m mg.ml ⁻¹	k_{cat} s ⁻¹	k_{cat}/K_m mg ⁻¹ .ml.s ⁻¹	$K_{i, app}$ μ M
AMY1	0,5 ± 0,1	660 ± 13	1320	0,4 ± 0,1	1,9 ± 0,2	4,8	2,2 ± 1,0
AMY2	2,5 ± 0,3	405 ± 11	160	1,2 ± 0,2	5,5 ± 0,2	5,0	6,8 ± 2,7

Enfin, seul AMY2 est inhibé par BASI (Abe *et al.*, 1993; Sidenius *et al.*, 1995) (voir précédemment). Il est important de noter que cette remarquable différence est la seule à être totalement expliquée, tous ses déterminants biochimiques et structuraux étant aujourd'hui connus (voir précédemment, paragraphe « *Mode d'inhibition de AMY2 par BASI* », page 53).

2.b) Les zones et résidus déterminant les spécificités propres de AMY1 et AMY2 :

Les résidus catalytiques présumés essentiels D180, E205 et D291 chez AMY1 (respectivement D179, E204 et D289 chez AMY2) ont été successivement mutés (Søgaaard *et al.*, 1993) avec pour conséquence une perte d'activité presque totale pour chacune des mutations. De plus, ces mutants, contrairement à l'enzyme sauvage, n'ont pas montré d'affinité lors de leur passage sur une colonne Acarbose-Sepharose. Il apparaît ainsi que la fixation de l'acarbose et, par extension, de substrats naturels nécessite la présence conjointe de ces trois résidus.

D'autres mutants ont été étudiés, et plus particulièrement les mutations H93N et H290N chez AMY1 (Søgaaard *et al.*, 1993). Ces dernières ont déterminé respectivement des k_{cat}/K_m pour le *p*-nitrophénylmaltoheptaoside (substrat soluble de type amylose) de 0,3 et 1,2% de la valeur déterminée pour l'enzyme sauvage. Bien que ces résidus ne soient pas directement impliqués dans la réaction d'hydrolyse, leur rôle dans la fixation du substrat au niveau du site de coupure ou dans la stabilisation de l'état intermédiaire a été proposée (Søgaaard *et al.*, 1993).

Le domaine B est responsable de plusieurs dissemblances (stabilité, activité et liaison à BASI) observées entre AMY1 et AMY2 (Rodenburg *et al.*, 1994; Juge *et al.*, 1995; Vallée *et al.*, 1998). Des hybrides AMY1-AMY2 ont été produits afin d'identifier plus précisément l'implication de ce domaine dans les propriétés enzymatiques et physico-chimiques des deux isoenzymes (Rodenburg *et al.*, 1994). Ainsi, l'hybride AMY1-(1-90)-AMY2-(90-403) a montré des caractéristiques similaires à AMY2 en ce qui concerne sa sensibilité à l'inhibiteur BASI et à sa faible affinité pour l'amylose et l'acarbose. Seuls l'hybride AMY1-(1-161)-AMY2-(161-403) et AMY1 (qui partagent tous deux le même domaine B) sont stables à faible pH. Enfin seuls AMY2 et les deux hybrides mentionnés, mais pas AMY1, montrent une activité maximale sur l'amidon insoluble (Rodenburg *et al.*, 1994).

En outre, trois autres hybrides AMY1-AMY2 obtenus par recombinaison homologue ont été construits (Juge *et al.*, 1995). Ils ont démontré que les régions Val90 – Thr112 et Ala145 – Leu161 conféraient à AMY1 une haute affinité pour le *p*-nitrophényl- α -D-maltoheptaoside et l'amylose respectivement. Les régions Leu117 – Phe144 et, dans une moindre mesure, Ala145 – Leu161 sont critiques pour la stabilité à faible pH et pour la sensibilité à l'inhibiteur BASI.

Un double mutant de AMY1 (Phe181→Ala/Gly184→His) a permis d'obtenir une activité calcium-dépendante, comparable à celle de AMY2 (Bak-Jensen, 1999). Par contre, les

deux simples mutants étaient comparables à l'enzyme sauvage. Il existe une complémentarité stérique (montrée chez AMY2) entre Phe181 et Gly184, ce dernier résidu liant le calcium 500 par le groupe carbonyl de sa liaison peptidique (Kadziola *et al.*, 1994). Cette expérience prouve que les ligands de Ca500 sont critiques pour l'affinité aux ions calcium et l'activité enzymatique.

D/ Ingénierie protéique rationnelle de AMY1 :

La combinaison de travaux de mutagenèse dirigée, d'alignement de séquences, d'analyse structurale et de conception d'analogues de substrat a permis d'aller plus avant dans la compréhension des mécanismes enzymatiques de AMY1.

Ainsi, plusieurs travaux d'ingénierie protéique rationnelle ont modifié notablement les propriétés de stabilité, de spécificité de substrat et d'action de cet isoenzyme (Svensson *et al.*, 1999; Svensson *et al.*, 2000). Les résultats marquants sont présentés ci-après.

- L'affinité pour les substrats peut être déplacée par des mutations spécifiques dans les boucles 4 et 7 reliant chacune un brin β à une hélice α au niveau du domaine A. Certains mutants de la boucle 4 ont montré une activité élevée, à la fois sur un substrat d'amylose DP17 et sur un substrat court ne pouvant couvrir que 8 sous-sites sur 10 (Matsui & Svensson, 1997). En revanche, si les mutations de la boucle 7 permettaient d'augmenter l'activité sur de petits oligosaccharides, elles diminuaient considérablement l'activité sur l'amylose DP17 (Svensson *et al.*, 1999).
- La mutation Met298→Ala (sous-sites +1/+2) combinée à la mutation Cys95→Ala (sous-sites -5/-6) a modifié la préférence pour les substrats (Matsui & Svensson, 1997; Mori *et al.*, 2001). Le simple mutant Cys95→Ala montre une activité de 176% sur l'amidon bleu insoluble comparativement à l'enzyme sauvage, avec des k_{cat} respectivement de 142% et 211% envers l'amylose DP17 et le 2-chloro-4-nitrophényl β -D-maltoheptaoside (Cl-PNPG7), mais des K_m supérieurs d'un facteur 5 à 20. Les mutants Cys95→Ala/Met298→Ala,Asn,Ser montrent une activité entre 100 et 180% envers l'amidon et un k_{cat}/K_m respectivement de 15-30% et 0,4-1,1% envers l'amylose et le Cl-PNPG7 (Mori *et al.*, 2001) – voir tableau de synthèse page suivante. Enfin, les mutations de Cys95 et Met298 diminuent la fixation des oligosaccharides près des sous-sites -5 et +2, respectivement.
- Tyr105 est un résidu conservé chez toutes les α -amylases de structures connues. Tyr105 et Thr212 sont les deux résidus positionnés aux extrémités de la crevasse catalytique (sous-sites -6 et +4, respectivement). Les mutants Tyr105→Ala,Trp ont une activité comparable à celle de l'enzyme sauvage sur l'amidon bleu insoluble. Le mutant Tyr105→Ala a vu son affinité pour l'amylose DP17 réduite d'un facteur 5 tandis que l'activité et l'affinité ont été encore plus réduites pour le Cl-PNPG7. A l'opposé, Tyr105→Trp augmente légèrement l'activité envers des substrats solubles (Svensson *et al.*, 2000) (voir tableau de synthèse, page suivante).
- La spécificité et le mode de fixation du substrat sur AMY1 ont également été transformés en modifiant le tripeptide F²⁸⁶VD qui connecte le brin β 7 du tonneau (β/α)₈ à l'hélice α 7 (Gottschalk *et al.*, 2001). Ce tripeptide est localisé à proximité des résidus His290 et Asp291 impliqués dans la stabilisation de l'état de transition.
- Quatre ponts salins présents chez AMY2 devraient être absents chez AMY1 à cause de substitutions de résidus. Afin de mesurer l'impact de ces interactions électrostatiques internes sur la stabilité de la protéine, des travaux ont tenté d'introduire chez AMY1 les 4 ponts salins spécifiques de AMY2. Les mutations suivantes ont été réalisées : Ala68→Lys, Asp97→Glu, Gln269→Asp et Asn346→His (Jensen, 1998). Chacun de ces mutants a montré un faible changement d'activité envers le PNPG7 et l'amidon insoluble, ainsi que de modestes variations de la stabilité.

Isoenzyme	Paramètres cinétiques des α -amylases avec leur substrat				
	CI-PNPG7		Amylose DP17		Amidon bleu
	K_m mM	k_{cat} s ⁻¹	K_m mg.ml ⁻¹	k_{cat} s ⁻¹	Activité* U/mg
AMY1 _{recombinant} (<i>P. pastoris</i>)**	1,1	122	0,52	248	2900
AMY2	2,6	126	1,2	684	3100
Cys95→Ala	20,1	258	2,5	351	5100
Met298→Ala	3,0	34,2	0,66	348	3200
Cys95→Ala/Met298→Ala	n.d.	n.d.	2,9	373	5200
Cys95→Ala/Met298→Asn	n.d.	n.d.	2,1	166	2900
Cys95→Ala/Met298→Ser	n.d.	n.d.	2,8	177	3300
Tyr105→Ala	> 5	<10	2,6	146	3400
Tyr105→Trp	1,2	117	0,48	200	2200
Thr212→Trp	0,6	61	0,29	154	1400
Tyr105→Ala/Thr212→Ala	3,1	24	n.d.	n.d.	2500

(* Activité à 6,25 mg/ml d'amidon bleu, ** (Juge et al., 1996) - n.d., non déterminé)

E/ Action *in vivo* de AMY1 et AMY2 :

La dégradation de l'amidon *in vivo* se déroule en phase hétérogène. En effet, dans ces conditions, le substrat des α -amylases est complètement insoluble, la plupart du temps sous forme cristalline ou hautement condensée. La catalyse hétérogène sous-entend trois étapes successives intimement liées : diffusion de l'enzyme vers ou dans le substrat, adsorption à sa surface et catalyse enzymatique.

L'attaque d'une α -amylase de *Bacillus subtilis* sur de petits granules cristallins monodisperses d'amidon a été suivie (Colonna et al., 1988). Le processus commence par l'apparition de petits puits qui s'agrandissent progressivement jusqu'à la déstructuration totale du granule. Des travaux ont produit très récemment, et pour la première fois, des images de dégradation de l'amylose par microscopie de force atomique (AFM) (Gunning et al., 2000). Il a été en effet possible d'obtenir des images AFM d'amylose (linéaire ou ramifiée) de grande qualité qui ont été utilisées, dans un premier temps, pour suivre le « travail » de la glucoamylase d'*Aspergillus niger* (Giardina et al., 2001).

Pour les α -amylases, il apparaît que cette dégradation se produit selon un mécanisme processif plutôt qu'un mécanisme d'hydrolyse aléatoire. Les résultats de ces expériences, non encore publiés, permettront de donner de plus amples informations concernant le mode d'attaque de substrats de type amylose par les α -amylases.

A ce jour, malgré les expériences qui nous renseignent au niveau microscopique sur l'interaction amylase / amidon, nous ne possédons pas d'explications claires quant aux mécanismes moléculaires de reconnaissance et d'attaque de ce substrat. Des travaux de simulation ont proposé des modèles qui restent non vérifiés (Nakatani, 1996). Une des questions majeures est de comprendre comment les amylases peuvent interagir avec les structures cristallines de l'amidon. Dans un même ordre d'idée, comment le substrat, naturellement enroulé sous forme de simple ou double hélice, peut-il se placer favorablement dans le site catalytique d'une α -amylase, même si ce dernier est structuré en crevasse largement accessible.

Nous avons vu précédemment que AMY1 dégrade mieux les granules d'amidon que AMY2, alors que ce dernier est plus actif sur l'amylose. Des travaux de mutagenèse dirigée permettent d'identifier progressivement les déterminants de ces différences. Cependant, ces découvertes ne s'appliquent, dans leur grande majorité, qu'à des substrats solubles, ce qui n'est pas totalement représentatif des conditions qui existent chez la plante. A ce jour, les modes de reconnaissance et d'attaque des substrats *in vivo* pour AMY1 et AMY2 demeurent inconnus.

Partie 2

Matériels et méthodes

Préambule :

Sous certaines conditions, des substances biologiques (dont les protéines) peuvent se « solidifier » pour former un cristal. En adoptant un état cristallin à partir d'une solution, les molécules individuelles désordonnées de cette substance s'organisent pour former un réseau. Le cristal résultant est un empilement ordonné de ces molécules, maintenu par des interactions non covalentes. Il peut alors être décrit de manière simplifiée par la maille, qui est le plus petit et le plus simple élément de volume représentatif du cristal entier. Ce dernier sera formé par la répétition de cette maille dans les trois dimensions de l'espace. La méthode cristallographique permet d'obtenir une image de la densité électronique des atomes de la substance étudiée incluse dans la maille du cristal.

Au cours de ce chapitre seront abordés les différents aspects techniques et méthodologiques de la méthode cristallographique. Nous examinerons successivement les phases de cristallisation, d'enregistrement puis de traitement des données pour terminer sur les méthodes d'affinement des modèles de structures. Pour chacune de ces parties, les principes théoriques de base ainsi que l'appareillage utilisé seront brièvement décrits.

A/ Cristallogenèse et techniques associées :

1. Principe général :

Lors de la formation d'un cristal de protéine, les molécules passent d'un état soluble à un état solide ordonné, ces deux états étant en équilibre. La cristallisation consiste à amener la protéine dans une zone métastable, qui peut se définir comme un état de sursaturation nécessaire à la formation des germes cristallins (voir *Figure 1*). Une augmentation progressive de la concentration en protéine (par exemple en diminuant sa solubilité) permet d'atteindre cet objectif. La solubilité d'une protéine est assurée par sa gangue d'hydratation, une enveloppe de molécules d'eau entourant toute sa surface et interagissant avec les acides aminés exposés au solvant. La diminution de solubilité d'une protéine a pour conséquence de réduire ces interactions tout en augmentant les interactions protéine / protéine.

Cependant, une augmentation des interactions non spécifiques peut déterminer la formation d'une phase solide amorphe (précipité), au contraire des interactions spécifiques qui conduisent à la formation des cristaux.

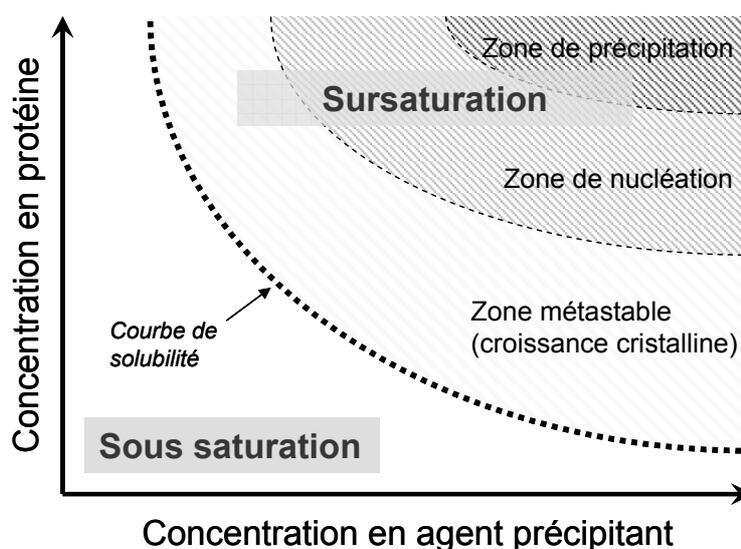


Figure 1 : Diagramme de solubilité suivant la concentration en protéine et la concentration en agent précipitant. La courbe de solubilité sépare la zone où la protéine est en solution (zone de sous saturation) des zones de sursaturation (zones métastable, de nucléation ou de précipitation).

Le processus de cristallisation fait également intervenir un agent précipitant (voir *Figure 1*) dont la nature et la concentration influencent la solubilité de la protéine. Ces agents peuvent être divisés en trois classes chimiques majeures :

- Les polymères organiques : ils contribuent à diminuer la quantité d'eau « visible » par la protéine. En effet, la solvataion de ces polymères entre en compétition avec celle de la protéine. Les polyéthylènes glycol, avec leur large étendue de poids moléculaires, sont très couramment utilisés.
- Les sels : ils modifient la force ionique. Le chlorure de sodium et le sulfate d'ammonium sont les deux sels les plus couramment utilisés.
- Les solvants organiques : ils se lient à l'eau et diminuent la constante diélectrique du milieu. Il s'ensuit une diminution de l'effet électrostatique dû à l'eau, mais aussi une augmentation de l'association des ions par paire.

La recherche des conditions de cristallisation est la première étape nécessaire à l'étude cristallographique, étape qui peut se révéler laborieuse et souvent, malheureusement, limitante (Blundell & Johnson, 1976; MacPherson, 1982; MacRee, 1993). Elles sont propres à chaque protéine, puisqu'elles agissent sur la solubilité (voire la stabilité) de cette dernière.

2. Les facteurs influençant la cristallisation :

Un certain nombre de facteurs chimiques, biochimiques et physicochimiques intervient dans le processus de cristallisation (Boistelle & Astier, 1988; Mikol *et al.*, 1990; Sibille *et al.*, 1991). Parmi les plus importants, on peut citer :

- La pureté de la protéine, c'est-à-dire l'absence de contaminants quels qu'ils soient, mais aussi l'homogénéité de séquence et de conformation de la protéine étudiée (Giegé *et al.*, 1986).
- La présence ou non de ligands (co-facteurs, substrats ou inhibiteurs).
- La nature et la concentration de l'agent précipitant utilisé.
- Les additifs de cristallisation (ions, molécules chargées, détergents, etc.).
- Le pH qui détermine la charge nette de la protéine.
- La température à laquelle s'effectue l'expérience de cristallisation.

3. La diffusion en phase vapeur – technique de la goutte suspendue :

Une protéine, pour cristalliser, doit passer d'un état en solution à un état de sursaturation, comme nous l'avons vu précédemment. La méthode de diffusion en phase vapeur (Wlodaver & Hodgson, 1975) permet de réaliser cette transition. En pratique, la technique de la goutte suspendue met en œuvre ce principe et a été utilisée tout au long de notre étude.

On considère un système clos composé d'une goutte contenant la protéine en solution, un agent précipitant de concentration initiale C et, éventuellement, un additif de cristallisation et/ou un ligand (voir précédemment). Le second composant du système est un réservoir contenant le même agent précipitant que la goutte, à la même concentration C (voir *Figure 2*, ci-après). Dans un cas idéal et souhaité, la diffusion de vapeur à l'intérieur du système clos provoque un transfert net d'eau de la goutte (moins concentrée en agent précipitant) vers le réservoir (plus concentré), et ce jusqu'à ce que la concentration en précipitant soit la même dans les deux compartiments. Ceci a pour conséquence l'augmentation lente de la concentration de la protéine dans la goutte et la sortie progressive de la zone de solubilité (*Figure 1*).

Les avantages de cette méthode résident essentiellement dans la faible quantité de matériel protéique nécessaire (de 0,5 à 4 μ l de protéine par essai à une concentration usuelle pouvant aller de 5 à 20 mg/ml – parfois plus ou parfois moins).

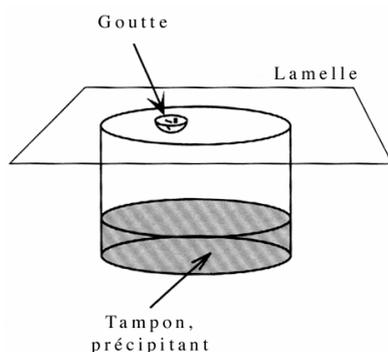


Figure 2 : Croissance cristalline par la méthode de la goutte suspendue / diffusion en phase vapeur : la goutte (contenant la protéine, un précipitant, et éventuellement des additifs, ligands, etc.) est suspendue sous une lamelle siliconée fermant hermétiquement, avec un joint de graisse, un puit contenant le même agent précipitant que la goutte, à la même concentration.

Le but de l'étape de cristallisation est donc de cribler un grand nombre de conditions et si l'une ou plusieurs de ces conditions semblent donner un résultat, continuer d'affiner les paramètres retenus jusqu'à l'obtention de monocristaux de qualité et de taille satisfaisantes. Pour ce faire, on peut agir sur un grand nombre de variables (Ducruix & Giegé, 1992) : la nature et la concentration de l'agent précipitant, la concentration de la protéine, le pH, la température, la force ionique, présence d'additifs et/ou de ligands.

Il est impossible de connaître *a priori* les conditions de cristallisation d'une protéine. Ainsi, les données de cristallisation de protéines homologues représentent une piste intéressante pour l'expérimentateur, bien que cela ne soit pas une garantie de succès. Des banques de données recensent et classent, par famille de protéines, les conditions ayant permis d'obtenir des cristaux (BMCD - Gilliland *et al.*, 1994) ou guident l'expérimentateur dans sa recherche de conditions de cristallisation (Roussel *et al.*, 1990). Il existe également des méthodes permettant de déterminer un espace multifactoriel de paramètres expérimentaux et de tester un maximum de conditions en un minimum d'expériences. Des logiciels, comme SAmBA (Audic *et al.*, 1997), utilisent cette méthode dite de « plan d'analyse factoriel incomplet » (Carter & Carter, 1979). En outre, les 50 conditions de cristallisation les plus utilisées ont été compilées et testées sur un grand nombre de protéines (Jancarik & Kim, 1991). Une autre étude (Cudney *et al.*, 1994) a testé 48 autres conditions sur 20 protéines différentes dans le même but. Il a ainsi été montré que ces deux ensembles de conditions déterminaient la cristallisation de la plupart des protéines tests dans au moins une condition. De ce fait, les deux ensembles de conditions sont aujourd'hui disponibles commercialement sous forme de kits de criblage (*Hampton Research*) et permettent, sinon d'obtenir des cristaux, de tester le comportement des protéines face aux agents précipitants.

4. Croissance des cristaux :

La formation d'un noyau cristallin (nucléation) est un événement statistique dont la probabilité augmente avec le degré de sursaturation. Lorsque le noyau est formé, le degré de sursaturation diminue ainsi que la probabilité d'apparition d'autres noyaux. C'est la phase de croissance cristalline. Cependant, le processus de nucléation est en compétition avec d'autres événements irréversibles qui abaissent la sursaturation : formation d'agrégats, de précipité, de « peau », etc. ceci diminuant la probabilité de formation d'un noyau.

Ainsi, on peut être dans une situation où les conditions sont propices à la croissance mais où il n'y a pas de noyaux cristallins. Dans ce cas, l'ensemencement est souvent une solution efficace : rajouter un germe cristallin préalablement formé à une solution de protéine demande moins d'énergie que de créer *de novo* un noyau cristallin.

En pratique, l'ensemencement est mis en oeuvre lorsque la nucléation est trop forte, mal contrôlée, ou lorsque l'on veut obtenir des cristaux de plus grande taille. On distingue deux types d'ensemencement : le macro-ensemencement (« *macro-seeding* ») et le micro-ensemencement (« *micro-seeding* »). Le macro-ensemencement consiste à prélever un cristal, le laver pour nettoyer ses surfaces, puis à l'implanter dans une solution pré-équilibrée, en condition de sursaturation, mais n'ayant pas encore nucléée. Le micro-ensemencement consiste, lui, à prélever des microcristaux (précipité cristallin ou cristaux broyés) et à les réimplanter dans des gouttes pré-équilibrées.

5. Trempage des cristaux (« *crystal soaking* ») :

Dans le but d'introduire des substrats, analogues de substrat, ligands ou des dérivés lourds dans le cristal de protéine, on a recours à la méthode de trempage. Cette dernière permet de faire diffuser au sein de l'édifice cristallin des substances d'intérêt afin de suivre leur fixation ou leur utilisation (au sens large) par la protéine cristallisée. Dans le cas d'un enzyme, si l'empilement cristallin permet au site actif d'être accessible par le substrat, des réactions enzymatiques sont possibles au sein même du cristal. Il est ainsi possible d'observer, au niveau atomique, des structures de complexes enzyme / ligand (à condition que ces derniers soient judicieusement choisis) ou encore la présence de produits de réaction.

La méthode de trempage consiste à immerger un cristal de protéine dans une solution contenant le ligand choisi. La concentration de cette substance et le temps de contact avec le cristal sont déterminés expérimentalement. Le risque majeur de ce type d'expérience est que le cristal se fendille ou, pire, se casse sous l'effet de la diffusion dans l'édifice cristallin de la substance utilisée. Dans ce cas, une diminution du temps de contact ou de la concentration de ladite substance permet souvent d'éviter ce problème.

B/ Obtention et enregistrement des données de diffraction :

La technologie associée à la production et à l'enregistrement des données de diffraction des rayons X a connu de formidables progrès, ceci permettant d'obtenir des données expérimentales de qualité croissante et dans un temps de plus en plus bref (Pflugrath, 1992). Certaines données (préliminaires ou finales) exploitées dans cette thèse ont été collectées au laboratoire sur un détecteur bidimensionnel de type « *Image Plate* » (Mar345 de *MARresearch*) couplé à un générateur de rayons X à anode tournante (FR581 de *Nonius*) associé à un monochromateur en graphite ou des miroirs confocaux *Osmic*. Dans certains cas, le recours au rayonnement synchrotron a du être envisagé en raison de la morphologie ou de la faible taille des cristaux, ou bien pour obtenir des données à haute résolution.

1. Le générateur de rayons X à anode tournante :

L'anode tournante produit des rayons X en accélérant des électrons dans le vide à un très haut potentiel (entre 40 et 50 kV) sur une cible en métal (anticathode). Sous une tension donnée, cette dernière émet une suite continue de longueurs d'onde X. Cette émission est appelée spectre continu (voir *Figure 3*, ci-après). Lorsque l'on augmente suffisamment la tension entre la cathode et l'anticathode, on voit se superposer au spectre continu un spectre de raies.

Ces raies observées sont des raies d'émission des atomes de l'anticathode. Elles correspondent à des transitions électroniques au niveau des couches profondes. L'éjection d'un électron de la couche K d'un atome de l'anticathode par un électron projectile détermine l'apparition de deux radiations : K_{α} et K_{β} . La première correspond à un doublet $K_{\alpha 1} / K_{\alpha 2}$ (transitions $L_{III} \rightarrow K$ et $L_{II} \rightarrow K$), la seconde a deux doublets $K_{\beta 3} / K_{\beta 1}$ (respectivement transitions $M_{II} \rightarrow K$ et $M_{III} \rightarrow K$) et $K_{\gamma 1} / K_{\gamma 2}$ (respectivement transitions $N_{III} \rightarrow K$ et $N_{II} \rightarrow K$). On ne s'occupe généralement pas de cette structure fine des raies et on parle seulement des raies K_{α} et K_{β} .

Le choix du métal de l'anticathode détermine la longueur d'onde caractéristique à laquelle les rayons X sont émis. L'anode tournante du laboratoire étant équipée d'une cible en cuivre, la longueur d'onde émise est de 1,5418 Å (CuK_{α}). La monochromie du faisceau est produite grâce à un cristal de graphite placé à la sortie du générateur ou par des systèmes optiques de miroirs confocaux. Cette longueur d'onde représente un bon compromis entre la résolution maximale possible et l'absorption : les rayons X émanant du cuivre sont des rayons X mous et leur absorption par l'air répond à la loi de Beer-Lambert. Ainsi, il est nécessaire de minimiser le chemin parcouru par les rayons en diminuant au maximum la distance entre la sortie du générateur, le cristal et la surface du détecteur.

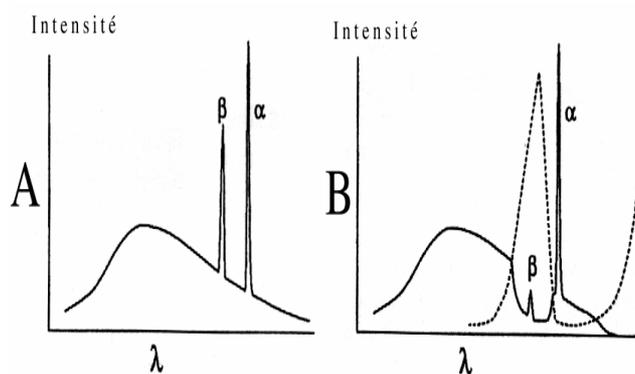


Figure 3 : Production de rayons X : mise en évidence des raies K_α et K_β superposées au spectre continu (A). La ligne en pointillée (B) représente le spectre d'absorption du filtre utilisé pour rendre l'émission la plus monochromatique possible.

2. Le rayonnement synchrotron :

Lorsque la trajectoire d'électrons de haute énergie est infléchiée par un champ magnétique intense, ils émettent des ondes électromagnétiques : c'est le rayonnement synchrotron. Couvrant toute la gamme du spectre, des micro-ondes jusqu'aux rayons X durs, la lumière issue de ce rayonnement prend la forme d'un faisceau ultrafin et très intense, comparable en beaucoup de points au faisceau LASER (« *Light Amplification Stimulated Energy Ray* »).

L'ESRF (« *European Synchrotron Radiation Facility* », Grenoble – France) a été le premier synchrotron de troisième génération produisant des rayons X durs à être mis en fonction dans le monde. Les faisceaux de rayons X produits à l'ESRF sont approximativement 10^{12} fois plus brillants que ceux conventionnellement utilisés en laboratoire ou dans les services de radiographie. Les données techniques, présentées ci-après, sont accessibles sur le site Internet de l'ESRF (<http://www.esrf.fr>).

Sur le plan de son fonctionnement, l'ESRF se divise en trois parties. Le *Linac* est un accélérateur linéaire de 16 mètres, qui porte les électrons à une énergie de 200 MeV. Le « *booster* » est un anneau de 300 mètres de circonférence qui accélère les paquets d'électrons émis à la sortie du *Linac*. Lorsque le faisceau d'électrons a atteint une énergie de 6 GeV, il est injecté dans l'anneau de stockage (« *storage ring* ») de 844 mètres de circonférence. Dans ce dernier, l'énergie des électrons est maintenue à 6 GeV.

L'anneau de stockage est en fait un polygone sur lequel sont placés des aimants de courbure (« *bending magnets* ») aux coins de ce dernier (voir **Figure 4**, page suivante). Leurs champs magnétiques infléchissent le faisceau d'électrons, donnant lieu à une émission tangentielle de radiations synchrotrons. L'anneau de stockage de l'ESRF possède 64 aimants développant un champ de force de 0,8 Tesla, chacun de ces aimants infléchissant le faisceau d'électrons de $5,625^\circ$.

Les IDs (« *Insertion Devices* ») sont à l'origine de la haute brillance des sources de rayonnement synchrotron de troisième génération (voir **Figure 4**). Placés dans les sections droites de l'anneau de stockage (entre deux aimants de courbure), ils contiennent une succession de petits aimants de force et polarité bien définies. Grâce à eux, les caractéristiques des rayons X peuvent être ajustées suivant les besoins des expériences.

La haute brillance du faisceau est aussi le résultat d'une faible divergence angulaire du faisceau au niveau de l'anneau de stockage. Ceci est rendu possible par la présence d'aimants de focalisation (« *focusing magnets* ») placés en amont et en aval des aimants de courbure et des IDs. Ils définissent la position et la taille du faisceau en focalisant les électrons (voir **Figure 4**). Enfin, l'élément dit « *front-end* » joue le rôle de volet (« *shutter* »). Si le volet est ouvert, le faisceau de rayons X pénètre dans la salle d'expérimentation ; s'il est fermé, les rayons X n'y pénètrent pas (voir **Figure 4**).

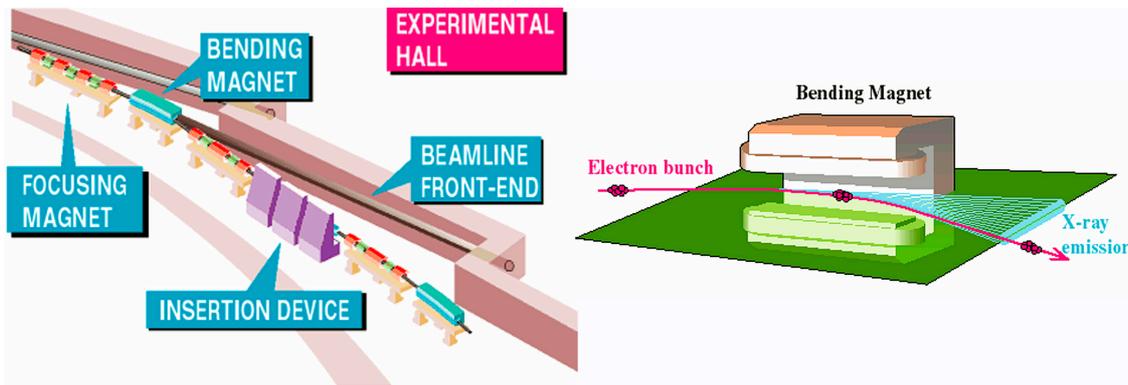


Figure 4 : *A gauche* : Vue en coupe de l'anneau de stockage et de ses composants : aimants de focalisation (« focusing magnets »), aimants de courbure (« bending magnets »), IDs (« insertion device »), et volet (« front-end »), le tout situé près de la salle d'expérimentation (« experimental hall »). *A droite* : Coupe d'un aimant de courbure : mise en évidence de l'inflexion du faisceau d'électrons avec production du rayonnement synchrotron tangentiel (Schémas extraits du site Internet de l'ESRF).

La salle d'expérimentation est divisée en trois parties : le compartiment optique (ou « optic hatch ») où le faisceau de rayons X est conditionné, la cabine expérimentale (« experimental hatch ») contenant les échantillons et les détecteurs et, enfin, la cabine de contrôle qui permet aux expérimentateurs de contrôler leurs mesures.

Au niveau du compartiment optique, des dispositifs optiques déterminent la focalisation du faisceau. Il est ainsi possible d'atteindre des diamètres de faisceaux proches du micromètre. Enfin, de manière générale, les rayons X provenant d'une source synchrotron sont polychromatiques. Le rôle des monochromateurs est de rendre ce faisceau monochromatique à la longueur d'onde souhaitée. Les miroirs servent aussi de filtres passe-bas, rejetant les rayons X de haute énergie qui sont indésirables dans certaines expériences.

Au cours de cette étude, nous avons eu recours à plusieurs reprises au rayonnement synchrotron. Nous avons obtenu des temps d'expériences sur les lignes FIP BM30A et ID14-EH1 de l'ESRF qui sont brièvement présentées ci-dessous :

- **Ligne FIP BM30A** : La ligne FIP (« French beamline for Investigation of Proteins ») est située sur une section d'aimant de courbure (BM30A). Elle est spécialement dédiée à la cristallographie des macromolécules biologiques. Elle peut être utilisée pour des expériences de diffraction à longueurs d'ondes fixes ou multiples (dispersion anormale, MAD). L'optique de la ligne délivre un faisceau avec un large éventail d'énergie accessible (de 7 à 21 keV). La ligne possédait un détecteur de type « Image Plate » Mar345 et a récemment fait l'acquisition d'un détecteur MarCCD de 165 mm de diamètre. Elle possède un diffractomètre avec un goniomètre 5 cercles et un équipement cryogénique complet (*Oxford system 600 Series Cryostream Cooler*).
- **Ligne ID14** : La ligne ID14 est dédiée à la cristallographie macromoléculaire. Elle utilise trois onduleurs et possède une brillance moyenne de 13,3 keV avec des énergies réglables allant de 7 keV à 17,5 keV. Cette ligne possède 4 sous-stations indépendantes. Chaque station est équipée d'un détecteur CCD (*ADSC Q4R CCD*), et ID14-3 possède en plus une caméra *Weissenberg* (plaques de 80×80 cm). Chaque ligne est équipée d'un goniomètre à axe ϕ simple. La longueur d'onde est fixe : 0,934 Å (soit 13270 eV), ce qui permet d'obtenir des résolutions maximales de 0,97 Å dans la configuration des lignes. Enfin, un système cryogénique complet est également installé.

3. Le détecteur de type « *Image Plate* » :

Dans le cadre de cette étude, ce type de détecteur a été utilisé au laboratoire ainsi que sur la ligne FIP BM30A du synchrotron ESRF. Le détecteur « *Image Plate* » est constitué d'une plaque photostimulable de 345 mm de diamètre qui enregistre les intensités diffractées. Brièvement, les photons X frappant la surface du détecteur entraînent, par le biais d'une chambre d'ionisation, l'excitation d'un revêtement d'atomes de phosphore. L'excitation de ce revêtement est proportionnelle à l'énergie reçue. Le phosphore tend alors à retrouver son niveau énergétique basal par émission de luminescence. Un faisceau LASER balaye la surface du revêtement et mesure l'intensité de fluorescence émise. Ces intensités sont collectées, amplifiées, numérisées et sauvegardées par un système informatique (PC Pentium® II 220 Mhz – 256 Mo RAM sous LINUX *Mandrake 8.0*). L'image de diffraction est enfin visualisée par le logiciel adéquat (MARVIEW de la suite MARhkl de *MAR research*).

La puissance de ce type de détecteur réside dans sa simplicité d'utilisation et sa performance. La sensibilité et la résolution obtenues grâce au système « *Image Plate* » sont très supérieures à celles des détecteurs à film ou à chambre à fils. Le défaut de ces détecteurs provient, malgré d'impressionnantes améliorations sur les modèles les plus récents, de la lenteur de lecture de la plaque, ce qui aujourd'hui rend les systèmes CCD (*Charged Coupled Device*) très concurrentiels.

4. Les expériences en conditions cryogéniques :

Une fois le cristal exposé au faisceau de rayons X, une série de réactions chimiques peuvent se produire au sein de ce dernier. Ainsi, la formation de radicaux libres et les phénomènes d'ionisation découlant de cette exposition concourent à endommager le cristal. Les dégradations causées par le rayonnement sont un des paramètres importants à prendre en compte au niveau de la collecte de données (Garman, 1999). Ceci est d'autant plus notable si l'on utilise des sources de rayonnement synchrotron. On doit alors faire un compromis entre la quantité d'informations recueillies et le temps d'exposition minimum évitant la dégradation prématurée du cristal.

Une solution très efficace pour résoudre ce problème est l'utilisation de conditions cryogéniques : le cristal est préparé et instantanément gelé (étape de « *flash cooling* ») afin de prévenir la formation de glace dans le milieu aqueux. Plutôt que de la glace, une forme vitreuse solide enveloppe et contient le cristal sans dommage aucun. Le cristal est alors maintenu à une température de 100 K (sous un flux d'azote gazeux) durant toute la phase de collecte des données (système *Oxford CryoSystems*). Les manipulations du cristal, de la goutte jusqu'à son positionnement dans le faisceau de rayons X, en vue d'une expérience en conditions cryogéniques nécessite des outils et des gestes appropriés (Garman & Schneider, 1997; Rodgers, 1997) qui ne seront pas décrits ici. Cette méthode a été utilisée pour la majorité des collectes de données présentées dans cette étude, données aussi bien issues d'expérimentations au synchrotron qu'au laboratoire.

Cette technique offre un grand nombre d'avantages (Garman & Schneider, 1997; Garman, 1999) : minimisation des dommages sur le cristal causés par la diffusion de radicaux libres produits par le rayonnement X, réduction de l'agitation thermique dans le cristal, parfois augmentation des limites de résolution et, enfin, possibilité de récupération et/ou de stockage à long terme dans l'azote ou l'hélium liquide en vue de la réutilisation des cristaux ainsi préparés.

La préparation et les manipulations du cristal pour les expériences sous conditions cryogéniques sont très strictes (Rodgers, 1997). En effet, au cours de la congélation (ou « *flash cooling* »), l'eau présente en grande quantité dans les cristaux (Matthews, 1968), a tendance à former de la glace qui, en se dilatant, augmente le volume du cristal. Ceci peut perturber voire détruire l'empilement cristallin et conduire à une mosaïcité importante du cristal et/ou à une dégradation de son pouvoir de diffraction. En outre, l'eau située à la surface du cristal peut former de la glace cristalline déterminant des taches de diffraction parasites sur le spectre enregistré. Pour éviter cela, le cristal doit être « cryo-protégé » préalablement à l'expérience de

diffraction. La cryoprotection consiste à remplacer l'eau par un mélange eau + cryo-protégeant et ce, soit durant l'étape même de croissance cristalline, soit à posteriori, en trempant le cristal dans une ou des solutions adaptées.

Les cryo-protégeants couramment utilisés sont l'éthylène glycol, le PEG (polyéthylène glycol), le MPD (2-méthyl-2,4-pentanediol), le glycérol, certaines huiles à base de silicone ou encore des sucres simples (glucose, par exemple) ou des alcools. Toutes ces molécules forment des liaisons hydrogènes avec l'eau, détruisant ainsi le réseau de ces mêmes liaisons entre les molécules d'eau en phase liquide ou solide et augmentant également la viscosité de la solution (Petsko, 1975; Hope *et al.*, 1989; Eto & Rubinsky, 1993; Gamblin & Rodgers, 1993). Pendant l'étape de « *flash cooling* », l'eau est ainsi piégée sous forme de glace vitreuse.

La mise au point des conditions optimales de cryo-protection est, après la cristallisation elle-même, une étape cruciale qui peut nécessiter de nombreux essais et cristaux. Heureusement, sur la même base que les kits de cristallisation, il existe aujourd'hui des kits commerciaux de criblage de conditions contenant des cryo-protégeants.

C/ Du traitement des données jusqu'aux cartes de densité électronique :

1. La diffraction :

Sous un faisceau de rayons X, les phénomènes d'interférences dus à la périodicité du cristal déterminent les directions des ondes diffractées. Quand il y a plusieurs types d'atomes dans la maille, l'amplitude diffusée par ces atomes va dépendre des facteurs de diffusion de chaque type d'atome et des déphasages de ces amplitudes de diffusion atomique dus aux différentes positions atomiques dans la maille. On montre que le facteur de structure $F(hkl)$ s'écrit :

$$F(\vec{H}) = F(hkl) = \sum_{j=1}^N f_j e^{2\pi i(\vec{H} \cdot \vec{r}_j)}$$

avec f_j , facteur de diffusion de l'atome j (le système comportant n atomes), \vec{H} , vecteur de diffusion et $2\pi\vec{H} \cdot \vec{r}_j$ qui traduit de déphasage par rapport à l'origine de la maille.

On montre que quel que soit le système, en tenant compte des règles d'orthogonalité entre le réseau direct et le réseau réciproque, on a :

$$\vec{H} \cdot \vec{r}_j = h \cdot x_j + k \cdot y_j + l \cdot z_j$$

avec x_j , y_j et z_j , les coordonnées de l'atome j et h , k et l , les indices de Miller.

Le facteur de structure $F(hkl)$ s'écrit donc (pour n atomes dans la maille) et N mailles (dans la pratique, on prend $N=1$) :

$$F(hkl) = N \sum_{j=1}^n f_j e^{2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)}$$

Enfin : $f_j e^{2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)} = f_j e^{i\phi_j}$, ce qui nous permet d'écrire en généralisant :

$$F(hkl) = |F(hkl)| e^{i\phi_{hkl}}$$

avec $|F(hkl)|$, amplitude (ou module) de l'onde diffractée et ϕ_{hkl} , phase de l'onde diffractée.

Dans la maille cristalline, chaque atome a une position bien définie par rapport aux vecteurs $\vec{a}, \vec{b}, \vec{c}$ générateurs de la maille. La maille $(0, \vec{a}, \vec{b}, \vec{c})$ sert de référentiel pour ces atomes. Soit un atome j dans la maille, le vecteur \vec{r}_j donne la position de son noyau (ou du barycentre du nuage électronique de cet atome). La densité électronique ρ pour cet atome s'écrit :

$$\rho(\vec{r}_j) = \rho(x_j, y_j, z_j)$$

et, par extension :

$$\rho(x, y, z)_{\text{totale}} = \sum_{j=1}^n \rho(\vec{r}_j) = \sum_{j=1}^n \rho(x_j, y_j, z_j)$$

avec n , le nombre total d'atomes dans la maille.

Le facteur de structure $F(hkl)$ peut s'exprimer en fonction de la densité électronique dans la maille par la relation :

$$F(hkl) = V \int_0^1 \int_0^1 \int_0^1 \rho(x, y, z) \cdot e^{2\pi i(hx+ky+lz)} \cdot dx \cdot dy \cdot dz \quad \text{avec } V, \text{ le volume de la maille.}$$

Ainsi, la densité électronique de la maille est la transformée de Fourier inverse des facteurs de structures. Finalement, on peut écrire :

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_{h=-\infty}^{+\infty} \sum_{k=-\infty}^{+\infty} \sum_{l=-\infty}^{+\infty} F(hkl) \cdot e^{-2\pi i(hx+ky+lz)}$$

avec $F(hkl) = |F(hkl)| \cdot e^{i\varphi_{hkl}}$

Expérimentalement, nous enregistrons les intensités $I(hkl)$ des ondes diffractées égales au produit scalaire du facteur de structure \vec{F}_{hkl} et de son conjugué \vec{F}_{hkl}^* :

$$I(hkl) \cong \vec{F}_{hkl} \cdot \vec{F}_{hkl}^* \cong |F(hkl)|^2$$

Seuls les modules des facteurs de structure sont connus après enregistrement. La mesure obtenue est donc partielle puisque l'information sur les phases est perdue. Nous verrons plus loin que les phases doivent donc être déterminées par des méthodes indirectes. Ce faisant, la connaissance des modules $F(hkl)$ et des phases φ_{hkl} permet le calcul de la densité électronique en tout point (x, y, z) de l'espace réel du cristal, par la transformée de Fourier :

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_{h=-\infty}^{+\infty} \sum_{k=-\infty}^{+\infty} \sum_{l=-\infty}^{+\infty} F(hkl) \cdot e^{i\varphi_{hkl}} \cdot e^{-2\pi i(hx+ky+lz)}$$

avec hkl , indices de Miller ou coordonnées dans l'espace réciproque et V , le volume de la maille.

2. Intégration, réduction et mise à l'échelle des données :

La détermination des paramètres de la maille cristalline et l'intégration des jeux de données collectés au laboratoire ont été réalisées avec la suite MARhkl (Claudio Klein, *MARresearch*) qui contient, entre autre, une interface GUI (« *Graphic User Interface* ») du logiciel DENZO (Otwinowski & Minor, 1997). Le logiciel MOSFLM (Leslie, 1991) de la suite

logicielle CCP4 (CCP4 Collaborative Computational Project, 1994) a également été utilisé. Le logiciel SCALA (CCP4 Collaborative Computational Project, 1994), enfin, a permis la mise à l'échelle de chaque image et un affinement global des paramètres. Le logiciel donne, en outre, plusieurs paramètres statistiques importants permettant de juger de la qualité des données : nombre de réflexions totales et uniques, facteur d'échelle par image, réflexions rejetées et R_{sym} , complétude, $I/\sigma(I)$, redondance (chacun de ces quatre derniers paramètres pouvant être calculés par image et coquille de résolution). On rappelle :

$$R_{sym} (\%) = \frac{\sum_{hkl} \sum_{N_h} (I_{hkl} - \langle I_{hkl} \rangle)}{(\sum_{hkl} \sum_N \langle I_{hkl} \rangle)}$$

avec N_h , le nombre de réflexions reliées par symétrie et N le nombre total de réflexions.

3. Le problème des phases :

Comme nous l'avons vu précédemment, les données de diffraction donnent directement accès à l'intensité $I(hkl)$ et par conséquent à l'amplitude du facteur de structure $F(hkl)$. Cependant, l'information concernant les phases est perdue, d'où l'impossibilité de calculer la fonction de densité électronique. Trois méthodes principales (MIR, MAD et remplacement moléculaire) sont utilisées en cristallographie biologique pour résoudre le problème des phases :

3.a) la méthode MIR (« *Multiple Isomorphous Replacement* ») :

La méthode MIR consiste à fixer de manière spécifique dans l'édifice protéique, des atomes ayant un grand nombre d'électrons (atomes lourds) et localisables dans le cristal (Harker, 1956; Perutz, 1956). La contribution des atomes lourds, beaucoup plus riches en électrons que les atomes de carbone, azote ou oxygène, détermine un pouvoir de diffraction plus important. La difficulté majeure de cette technique est d'obtenir des cristaux dérivés isomorphes des cristaux natifs ; l'isomorphisme implique que les paramètres de maille ainsi que la position des macromolécules n'ont pas subi de variations significatives. Ainsi, la densité électronique du dérivé PH est égale à la densité électronique de la protéine P plus celle de l'atome lourd H. On peut écrire :

$$F_{PH} = F_P + F_H$$

Dans cette équation, seuls les modules F_P et F_{PH} sont connus expérimentalement, après enregistrement à partir de cristaux natifs et contenant un dérivé. Cependant, F_H , φ_{PH} , φ_H et φ_P sont inconnus. La phase φ_P prend alors deux valeurs possibles, telles que :

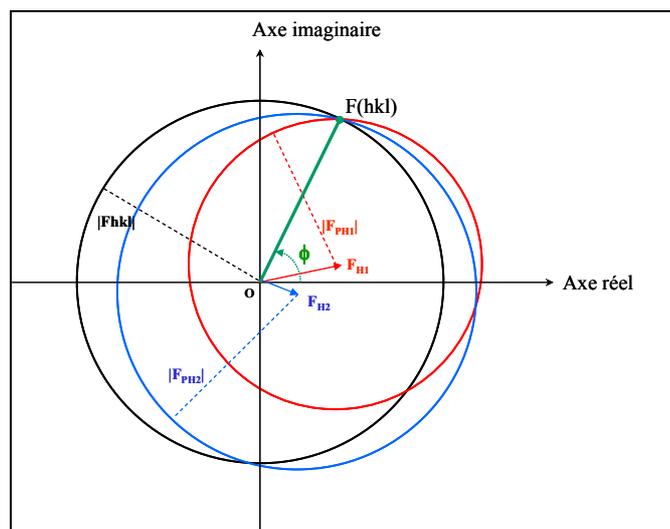
$$\varphi_P = \varphi_H \pm \cos^{-1} \frac{(F_{PH}^2 - F_P^2 - F_H^2)}{2F_P F_H} \quad (1)$$

La fonction de Patterson permet de remonter à la position (x,y,z) des atomes lourds dans la maille et donc de déterminer leur contribution en module F_H et en phase φ_H . Elle est notée :

$$P(u, v, w) = \frac{2}{V} \sum_{h=-\infty}^{+\infty} \sum_{k=-\infty}^{+\infty} \sum_{l=-\infty}^{+\infty} (F_{PH} - F_P)^2 \cdot \cos 2\pi(hu + kv + lw)$$

Cette fonction est une fonction réelle qui est la transformée de Fourier inverse des carrés des facteurs de structures. Elle est donc directement accessible à partir des mesures d'intensités diffractées et est indépendante des phases. Cette fonction représente les vecteurs différence, ramenés à l'origine, entre les atomes présents dans la maille. La position de l'atome lourd peut alors être déterminé en déconvoluant cette fonction. Le calcul de F_H et φ_H est alors possible et par conséquent celui des phases pour la protéine entière également.

Il existe cependant une ambiguïté puisque l'équation (1) admet deux solutions. L'utilisation d'un deuxième dérivé lourd, n'ayant pas le même site de fixation, permet de lever cette ambiguïté. La construction de Harker illustre ce problème :



$|F_{hkl}|$ est le module du facteur de structure de la réflexion d'indice hkl pour la protéine native.

$[F_{PH1}]$ est le facteur correspondant pour le dérivé d'atome lourd 1.

$[F_{PH2}]$ est le facteur correspondant pour le dérivé d'atome lourd 2.

F_{H1} est le facteur de structure (en module et en phase) de l'atome lourd 1 uniquement.

F_{H2} est le facteur de structure (en module et en phase) de l'atome lourd 2 uniquement.

Φ est la phase déduite et $F(hkl)$ le facteur de structure déduit.

La construction de Harker présente, pour chaque dérivé d'atome lourd, un cercle dont le centre est l'origine à laquelle on retranche la contribution de l'atome lourd considéré. Cette construction suppose que l'on connaisse le module et la phase de la contribution (due à l'atome lourd) au facteur de structure.

Du fait des nombreuses possibilités d'erreurs sur les mesures, on détermine une valeur probable de phase pour chaque réflexion. Ainsi, pour chaque dérivé, est déterminée la phase la plus probable à partir de la synthèse de toutes les informations pondérées par un facteur m (figure de mérite). Ce facteur est appliqué à chaque réflexion et est représentatif de la qualité de la phase calculée pour la réflexion donnée.

L'utilisation du signal anormal permet théoriquement de s'affranchir d'un deuxième dérivé lourd. Le signal anormal provient de l'excitation des électrons des couches internes des atomes. Si la longueur d'onde utilisée est proche de la longueur d'onde d'excitation de ces électrons, alors ceux-ci entrent en résonance et il apparaît un changement dans les rayons X diffusés : c'est la diffusion anormale. Ces changements, négligeables pour des atomes légers, peuvent être mesurés pour des atomes lourds. Les facteurs de diffusion des atomes anormaux sont alors décrits par un nombre complexe qui tient compte de la composante de résonance. Cela a pour conséquence la rupture de la loi de Friedel.

3.b) La méthode MAD (« *Multiple Anomalous Diffraction* ») :

Si la protéine contient un diffuseur anormal, la différence d'intensité entre les paires de Bijvoet $|F_h(+)|^2$ et $|F_h(-)|^2$ peut être utilisée pour résoudre le problème des phases. Le principe physique de cette méthode (Hendrickson, 1985; Hendrickson, 1991), dépassant le cadre de cette étude, ne sera pas expliqué ici. En pratique, on utilise la diffusion anormale d'un atome lourd lié à la protéine pour obtenir les phases par la mesure des facteurs de structure à au moins trois longueurs d'onde différentes entourant la longueur d'onde d'absorption de l'atome anormal. Ceci implique l'utilisation du rayonnement synchrotron qui peut faire varier la longueur d'onde du faisceau de rayons X.

3.c) Le remplacement moléculaire :

Il est possible de déterminer les phases en utilisant le remplacement moléculaire. Cette méthode utilise une structure connue, la plus homologue possible à celle de la macromolécule étudiée. Ainsi, cette structure homologue (appelée modèle-guide) est placée dans la maille de la

structure à déterminer et les phases de la macromolécule étudiée sont estimées à partir des facteurs de structure calculés à partir du modèle-guide. Une recherche sur six dimensions est nécessaire afin de trouver le meilleur placement du modèle-guide, à savoir une matrice de rotation et un vecteur de translation. En fait, il est possible de diviser cette recherche en deux étapes à trois dimensions : une recherche de rotation suivie par une recherche de translation.

La première étape du remplacement moléculaire est le calcul des facteurs de structure du modèle-guide placé dans une maille P1 artificielle. La maille est plus grande que le modèle-guide dans les trois directions de l'espace, de façon à ce qu'il n'y ait pas de vecteurs intermoléculaires dans le rayon de Patterson utilisé pour la recherche de la fonction de rotation. Cette fonction est une fonction de corrélation qui rend compte de la superposition des deux jeux de vecteurs obtenus à partir des F_{obs} et F_{calc} . La fonction de rotation (Rossmann & Blow, 1962) est calculée sur un volume d'intégration sphérique dont le rayon est choisi suffisamment petit pour exclure la majorité des vecteurs intermoléculaires. Cette fonction de rotation calculée dans l'espace de Patterson s'écrit :

$$R = \int_u P1(x1)P2(x2)d_{x1}$$

avec P1 et P2, les cartes de Patterson calculées respectivement à partir des F_{obs} et des F_{calc} , et $x1, x2$, les vecteurs interatomiques de l'espace de Patterson.

Une fois la solution de rotation déterminée, il faut chercher la solution de translation représentée par un vecteur de translation T.

La première méthode consiste à rechercher les corrélations optimales entre les fonctions de Patterson. Les vecteurs interatomiques de la fonction de Patterson permettent de définir la position des molécules par rapport à l'origine de la maille (Rossmann & Blow, 1962). La fonction de translation la plus simple est similaire à une fonction de corrélation. Dans l'optique de supprimer les vecteurs intramoléculaires indésirables, on peut transformer légèrement cette fonction (la formule suivante ne prenant en compte que l'indice de Miller h, pour la simplifier) :

$$T(x2 - x1) = \sum_h (I_0 - k(F_{M1}^2 + F_{M2}^2)) F_{M1} F_{M2}^* \exp[-2\pi i h(x2 - x1)]$$

Cette équation est en fait une sommation de Fourier : F_{M1} et F_{M2} étant les transformés de la molécule 1 et 2, la fonction donne le vecteur de translation entre ces deux molécules.

Les données de plus basse résolution (en dessous de 10-25 Å) ne sont pas prises en compte dans le calcul du fait de l'importante influence du solvant. De manière similaire, la limite du côté des hautes résolutions est généralement prise entre 4 et 6 Å. En effet, le modèle-guide est uniquement une approximation qui présente en général de nombreuses différences de conformation par rapport à la structure étudiée. Cette coupure permet d'éliminer notamment les variations dues aux différences de chaînes latérales des acides aminés mais aussi aux positions variables de ces dernières.

La seconde méthode consiste à suivre et minimiser le facteur R (voir définition dans le paragraphe D-3, page 74) :

$$R = \frac{\sum_h \|F_{\text{obs}}(h) - k|F_{\text{calc}}(h)\|}{\sum_h |F_{\text{obs}}(h)|} \quad \text{avec } k, \text{ facteur d'échelle.}$$

La méthode de remplacement moléculaire est de plus en plus utilisée, vu le nombre grandissant de structures connues (Rossmann, 1990). Elle a été mise en oeuvre pour la résolution de la structure native de AMY1, du fait de la connaissance antérieure de la structure native de AMY2 (code d'accèsion *Protein Data Bank* : **1AMY** - Kadziola, 1993; Kadziola *et al.*, 1994). Elle a été conduite grâce au programme AMoRe (Navaza, 2001).

D/ Affinement du modèle : vers la structure finale :

Le modèle de la protéine étudiée (F_{calc}) doit expliquer au maximum les données expérimentales (F_{obs}). Pour obtenir le meilleur accord entre les données expérimentales et calculées, il est nécessaire, pour chaque atome, de modifier sa position spatiale (x,y,z), son facteur d'agitation thermique B et son occupation. Pour affiner tous ces paramètres, le nombre d'observations doit être supérieur au nombre de paramètres à affiner d'au moins un facteur 3 à 4, du fait des erreurs sur les mesures. L'affinement peut utiliser, en outre, des contraintes stéréochimiques et des contraintes cristallographiques (symétrie non cristallographique). La phase d'affinement des données permet de minimiser l'énergie totale du système définie par :

$$E_{totale} = E_{cristallographique} + [E_{bond} + E_{angl} + E_{impr} + E_{elec} + E_{vdw} + E_{pelec} + E_{pvdw}]$$

ou de manière simplifiée :

$$E_{totale} = E_{cristallographique} + E_{empirique}$$

Le terme $E_{empirique}$ représente les termes d'énergie liés aux contraintes stéréochimiques. Elle est égale à la somme des énergies liées aux interactions covalentes (longueur E_{bond} , angles de liaison E_{angl} , angles impropres E_{impr}) et non covalentes (potentiels électrostatiques E_{elec} et interactions de Van der Waals E_{vdw}). Pour les atomes reliés par symétrie cristalline, ces interactions non covalentes sont représentées par les termes E_{pelec} et E_{pvdw} . L'énergie empirique est évaluée en considérant la différence entre la valeur actuelle et la valeur idéale. Ainsi, si les atomes dévient de la géométrie idéale, la quantité d'énergie augmente.

Le terme $E_{cristallographique}$ est la différence pondérée existant entre les facteurs de structure observés et calculés. Il s'écrit :

$$E_{cristallographique} = \frac{W_a}{N_a} \sum_{hkl} W_{hkl} [|F_{obs}(hkl)| - k \cdot |F_{calc}(hkl)|]$$

Le facteur W_a est un facteur de pondération appliqué à toutes les réflexions de manière à ce que le gradient de l'énergie soit égal au gradient de l'énergie empirique. Il est déterminé par une étape de dynamique moléculaire. Le facteur N_a est un facteur de normalisation, W_{hkl} le poids associé à une réflexion donnée, et k est le facteur de mise à l'échelle entre les facteurs de structure observés et calculés.

L'affinement va donc devoir, par de subtiles variations de coordonnées atomiques, faire évoluer le système vers une conformation plus stable et donc de moindre énergie. Il existe, pour ce faire, trois protocoles principaux de minimisation d'énergie. Ces derniers ont été utilisés au cours de notre étude, tels qu'ils sont implémentés dans le logiciel CNS version 1.0 (Brünger *et al.*, 1998).

1. L'affinement en corps rigide (« *rigid body refinement* ») :

Dans cette méthode d'affinement, le nombre de degrés de liberté de la protéine à affiner est réduit au maximum. Le rapport entre le nombre de paramètres à affiner et le nombre de paramètres observés est donc diminué.

Dans la pratique, le modèle est divisé en une ou plusieurs parties, appelées « corps » qui correspondent aux différentes sous-unités ou portions de structure. Pour chacun de ces corps, il est possible d'affiner jusqu'à six paramètres (trois degrés de rotation et trois degrés de translation). Les changements de positions des corps sont calculés en combinant les changements de tous les atomes les composant. Cette méthode est très utile lorsque, entre deux structures homologues, les positions des domaines varient les uns par rapport aux autres.

2. L'affinement par gradient conjugué de Powell :

Cette méthode (Powell, 1977) consiste à affiner les coordonnées de chaque atome par minimisation de l'énergie locale du système en se déplaçant en sens inverse du gradient de cette fonction. Cette minimisation est limitée par son faible rayon de convergence et conduit à des minima locaux. Cependant, elle permet d'affiner les facteurs de température individuels (facteurs B) de chaque atome.

3. L'affinement par recuit simulé (Brünger *et al.*, 1987) :

Les champs de force définissent une surface multidimensionnelle, nommée surface de potentiel d'énergie ou, plus couramment, espace conformationnel. Ce dernier possède une topologie complexe où deux types de points ont un intérêt particulier : les minima et les maxima énergétiques locaux, qui correspondent respectivement à des structures stables et à des points de transition dans l'espace conformationnel.

Pour une protéine, la surface d'énergie est extrêmement accidentée. Il existe un grand nombre de minima accessibles, chacun d'eux ayant approximativement la même énergie, mais pouvant correspondre à des structures « différentes ». Ceci est la manifestation de problèmes des minima multiples (Parisi, 1993; Frauenfelder & Wolynes, 1994).

L'affinement par recuit simulé permet d'explorer un très large espace conformationnel. Des vitesses aléatoires sont attribuées aux atomes du système, qui est porté à une température élevée (typiquement jusqu'à 3000 K), puis refroidi progressivement généralement par pas de 20 K. Entre chacun de ces pas, les trajectoires des atomes sont calculées. L'énergie cinétique ainsi fournie par augmentation de température permet de franchir des maxima énergétiques locaux. Le refroidissement qui s'ensuit a pour objectif de figer le système dans son état de plus basse énergie (donc, de plus grande stabilité). Cette méthode présente l'avantage d'un grand rayon de convergence mais, avec comme inconvénient, des temps de calculs très importants.

L'affinement des structures a été grandement amélioré par l'utilisation des méthodes de « vraisemblance maximum » (« *maximum likelihood* » et « *cross-validated maximum likelihood* ») (Pannu & Read, 1996; Adams *et al.*, 1997) qui sont incluses dans le programme CNS (Brünger *et al.*, 1998). Leur but est de déterminer la vraisemblance du modèle à partir de l'estimation des erreurs de ce dernier et des intensités mesurées. Cette méthode combinée à une validation croisée avec le facteur R_{libre} (Brünger, 1992), permet de réduire les risques de sur-affinement des données. L'estimation du solvant (« *bulk solvent* ») a également été incluse dans la procédure de recuit simulé (Brünger *et al.*, 1987; Brünger *et al.*, 1990; Jiang & Brünger, 1994). Cela consiste à calculer une enveloppe moléculaire séparant la protéine du solvant, puis à appliquer cette enveloppe à la densité électronique de manière à augmenter le rapport signal sur bruit (Leslie, 1987). Ainsi, par itération, l'amélioration des phases contribue à l'amélioration des cartes de densité électronique.

Quand la résolution ainsi que la qualité des données affinées l'ont rendu possible, un affinement individuel des facteurs de température (facteurs B) a été réalisé (voir paragraphe suivant). Enfin les cartes de densité électroniques $2F_o-F_c$ et F_o-F_c ont classiquement été calculées (Kleywegt & Brünger, 1996; Read, 1986).

Le suivi qualitatif de la phase d'affinement a été conduit grâce au calcul des facteurs R ; à savoir le facteur R et le facteur R_{libre} (R_{free}). Ces facteurs représentent l'accord entre les amplitudes observées et calculées. D'après les équations, si l'accord augmente, le facteur diminue, ce qui représente un guide nécessaire (mais non suffisant) lors du processus d'affinement des structures. Les facteurs R et R_{libre} sont définis comme suit :

$$R = \frac{\sum_h \|F_{\text{obs}}(h) - k|F_{\text{calc}}(h)\|}{\sum_h |F_{\text{obs}}(h)|} \quad \text{et} \quad R_{\text{libre}} = \frac{\sum_{h \in T} \|F_{\text{obs}}(h) - k|F_{\text{calc}}(h)\|}{\sum_{h \in T} |F_{\text{obs}}(h)|}$$

où k est un facteur d'échelle et T, un jeu de réflexions qui comprend, dans cette étude, une sélection aléatoire de 10% de toutes les réflexions observées (Brünger, 1992).

L'ensemble des calculs ont été conduits sur un serveur de calcul *Silicon Graphic Industries* (SGI) Origin 2000 quadriprocesseur R10000 à 195 MHz avec 256 Mo RAM par processeur, sous IRIX 6.5.

4. Agitation thermique :

Les atomes du cristal subissent, du fait de la température, une vibration permanente dans les trois dimensions de l'espace autour de leur position d'équilibre : c'est l'agitation thermique. Dans le cas général et en raison de l'anisotropie cristalline, chaque atome se déplace en fonction de son environnement et des liaisons auxquelles il participe, de façon à ce que sa densité électronique se trouve répartie dans un ellipsoïde. L'orientation et les caractéristiques géométriques de cet ellipsoïde dépendent de l'atome et du réseau.

L'effet de l'agitation thermique équivaut à répartir les électrons de l'atome sur un volume supérieur à celui de l'atome au repos. L'examen des facteurs d'agitation thermique B permet de détecter des erreurs probables dans la structure. Ainsi, des facteurs B très bas peuvent soit montrer que les atomes considérés sont très peu mobiles, soit qu'il peut y avoir un problème de sur-affinement des données. A l'opposé, des facteurs B trop élevés peuvent montrer que les atomes ne sont pas à leurs bonnes positions ou bien que leurs occupations sont faibles.

E/ Autres logiciels utilisés :

La visualisation et la manipulation des modèles ont été conduites avec le logiciel TURBO-FRODO (Roussel & Cambillau, 1989) sur des stations *Silicon Graphics Industries* (SGI) O₂ R10000 ou R12000 monoprocésseur (195, 225, 250 ou 275 MHz), 1 Go de RAM avec carte 3D OpenGL[®] / Z-buffer, sous IRIX 6.5.

La qualité des structures tridimensionnelles des protéines étudiées a été contrôlée à l'aide des logiciels PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) et WHATCHECK (Vriend, 1990) permettant de calculer, notamment, un diagramme de Ramachandran (Ramakrishnan & Ramachandran, 1965).

Les alignements de séquences présentés dans ce travail ont été réalisés en utilisant le programme CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994). Les structures secondaires obtenues à partir des fichiers de coordonnées atomiques PDB ont été déduites par l'algorithme DSSP (Kabsch & Sander, 1983). Les alignements de séquences incluant les superpositions de structures secondaires déduites des fichiers de coordonnées atomiques ont été réalisés avec le serveur ESPript (<http://genopole.toulouse.inra.fr/ESPrpt> - Gouet *et al.*, 1999).

Les figures illustrant ce travail ont été réalisées avec les logiciels TURBO-FRODO (Roussel & Cambillau, 1989), MOLSCRIPT (Kraulis, 1991), BOBSCRIPT (Esnouf, 1999), RASTER3D (Bacon & Anderson, 1988; Merritt & Bacon, 1997), GRASP (Nicholls *et al.*, 1991), VIEWERLITE[®] (Accelrys, 2001), LIGPLOT (Wallace *et al.*, 1995) et ISIS/Draw (MDL, 1990-2001).

Partie 3

Résultats et Discussion

Chapitre 1

Cristallisation de AMY1

Comme dans toute étude structurale par cristallographie et diffraction des rayons X, la production de cristaux est l'étape nécessaire, mais aussi souvent limitante.

Plusieurs années furent nécessaires à l'obtention de cristaux de AMY1 adéquats aux manipulations de diffraction. Tous ceux obtenus à partir de la forme entière de la protéine conduirent, du fait de données de diffraction de qualité insuffisante, à des régions mal ou non définies de densité électronique, avec pour conséquence l'impossibilité de déterminer la structure de plusieurs zones de la protéine. La conception rationnelle d'une forme tronquée de AMY1 (comportant une délétion de 9 résidus C-terminaux), suivie de nombreux essais de cristallisation et d'optimisation des conditions, donna lieu à des cristaux de meilleure qualité. La démarche expérimentale utilisée, ainsi que les conditions de cristallogénèse, ont fait l'objet d'une publication, présentée ci-après.

A/ Publication n°1 :

Expression, purification and preliminary crystallographic studies of α -amylase isozyme 1 from barley seeds

Xavier ROBERT^a, Tine E. GOTTSCHALK^{b, †}, Richard HASER^{a, ¶}, Birte SVENSSON^b
& Nushin AGHAJARI^a

^a *Laboratoire de BioCristallographie, Institut de Biologie et Chimie des Protéines, UMR 5086-CNRS/UCBL, 7 Passage du Vercors, F-69367 Lyon cedex 07, France*

tel.: ++33 4 72 72 26 08, fax: ++33 4 72 72 26 16, e-mail: r.haser@ibcp.fr

^b *Department of Chemistry, Carlsberg Laboratory, Gamle Carlsberg Vej 10, DK-2500 Copenhagen Valby, Denmark.*

[†] *Current address: Pharmexa A/S, DK-2970 Hørsholm, Denmark*

[¶] **Correspondance e-mail: r.haser@ibcp.fr**

Référence :

Xavier ROBERT, Tine E. GOTTSCHALK, Richard HASER, Birte SVENSSON & Nushin AGHAJARI (2002). Expression, purification and preliminary crystallographic studies of α -amylase isozyme 1 from barley seeds. *Acta Cryst.* **D52**, 683-686.

Acta Crystallographica Section D
**Biological
 Crystallography**
 ISSN 0907-4449

Xavier Robert,^a Tine E.
 Gottschalk,^{b†} Richard Haser,^{a*}
 Birte Svensson^b and Nushin
 Aghajari^a

^aInstitut de Biologie et Chimie des Protéines,
 Laboratoire de Bio-Cristallographie CNRS-UMR
 5086, 69367 Lyon CEDEX 07, France, and
^bDepartment of Chemistry, Carlsberg
 Laboratory, DK-2500 Valby, Denmark

† Current address: Pharmexa A/S, DK-2970
 Hørsholm, Denmark.

Correspondence e-mail: r.haser@ibcp.fr

Expression, purification and preliminary crystallographic studies of α -amylase isozyme 1 from barley seeds

Received 26 November 2001
 Accepted 25 January 2002

The germinating barley seed contains two major α -amylase isozyme families, AMY1 and AMY2, involved in starch degradation to provide energy used by the plant embryo for growth. Many years of difficulty in growing three-dimensional crystals of natural AMY1 have now been overcome by a nonapeptide truncation of the enzyme C-terminus. The truncated enzyme was overexpressed in *Pichia pastoris*, purified and crystallized by the hanging-drop vapour-diffusion method using polyethylene glycol 8000 as precipitant and 2-propanol as an additive. Crystals belong to the orthorhombic space group $P2_12_12_1$, with unit-cell parameters $a = 88.36$, $b = 72.82$, $c = 61.74$ Å and one molecule per asymmetric unit.

1. Introduction

α -Amylases (1,4- α -D-glucan glucohydrolases; EC 3.2.1.1) are monomeric enzymes widely occurring among animals, higher plants, fungi and micro-organisms. They catalyse the hydrolysis of internal α -D-1,4-glycosidic linkages in starch (amylose and amylopectin), glycogen and related oligosaccharides.

In barley, the physiological role of α -amylases is to secure the energy supply to the plantlet for growth. Two isozymes are distinguished in germinating seeds and are encoded by two multigene families. These isozymes, known as α -amylase 1 (AMY1) and α -amylase 2 (AMY2), contain 414 residues (MW = 45 342 Da) and 403 amino-acids (MW = 45 005 Da) (Rogers & Milliman, 1983; Rogers, 1985a), respectively, and share about 80% sequence identity, but show low overall sequence similarity to α -amylases from micro-organisms and animals (Rogers, 1985b).

AMY1 and AMY2 have different isoelectric points and are referred to as the low-pI and the high-pI isozyme, respectively (Jacobsen & Higgins, 1982). They differ significantly in their affinity for calcium ions (Bertoft *et al.*, 1984; Bush *et al.*, 1989; Rodenburg *et al.*, 1994) and in their stability at acidic pH (Rodenburg *et al.*, 1994) as well as at elevated temperature (Bertoft *et al.*, 1984). Moreover, large dissimilarities are found in their activity towards starch granules (MacGregor & Ballance, 1980; MacGregor & Morgan, 1986) and in their affinity for soluble substrates (Bertoft *et al.*, 1984; Sogaard & Svensson, 1990; Ajandouz *et al.*, 1992; MacGregor *et al.*, 1994).

Finally, an outstanding behaviour distinguishes AMY1 and AMY2: their sensitivity to the endogenous bifunctional inhibitor BASI

(barley α -amylase/subtilisin inhibitor; Mundy *et al.*, 1983; Svendsen *et al.*, 1986; Leah & Mundy, 1989). While BASI is an excellent inhibitor for AMY2, with a K_i of 2.2×10^{-10} M at pH 8 and 310 K (Abe *et al.*, 1993; Sidenius *et al.*, 1995), it does not interact with AMY1. Both structural and biochemical studies have explained these differences (Vallée *et al.*, 1998; Rodenburg *et al.*, 2000).

Determination of the three-dimensional structure of AMY1 represents enormous progress in gaining insight into the major as well as the subtle differences between the two isozymes; AMY1 and AMY2 are thus the most well described α -amylase isozymes to date. In addition, studies of mosaic chimeras of AMY1 and AMY2 enable correlation of specific structural differences with specific enzymic and stability properties (Juge *et al.*, 1993, 1995; Rodenburg *et al.*, 1994, 2000). The crystal structure of AMY2 has previously been solved to 2.8 Å resolution (Kadziola *et al.*, 1994). Owing to large difficulties over more than a decade in growing AMY1 crystals suitable for X-ray diffraction, the gene encoding a truncated protein was constructed and expressed in a *P. pastoris* system established for the full-length AMY1 (Juge *et al.*, 1996). The recombinant AMY1 was subsequently crystallized and these crystals diffracted X-rays to 1.5 Å resolution.

2. Materials and methods

2.1. Construction of expression plasmid, recombinant production and purification

2.1.1. Strains and plasmids. *Escherichia coli* DH5 α was used to propagate pBAL7 Δ SI,II, which contains the wild-type insert encoding

crystallization papers

AMY1 corresponding to that used previously (Matsui & Svensson, 1997). The silent mutations of the AMY1 gene removed *SacII* and *SacI* sites at positions 471 and 646 (Matsui & Svensson, 1997), making the remaining unique *SacI* and *SacII* sites useful for subcloning. *P. pastoris* GS115 (Invitrogen, The Netherlands) was used for expression of both the truncated AMY1 gene (see below) and the full-length gene inserted in pHIL-D2 (Invitrogen) as described previously (Juge *et al.*, 1996). Standard media were used for growth of *P. pastoris* transformants (Juge *et al.*, 1996).

2.1.2. Truncation of the AMY1 gene. Standard cloning techniques were used throughout this study (Gough & Murray, 1983; Sambrook *et al.*, 1989). Truncation of the AMY1 encoding sequence present in pBAL7ΔSI,II was performed by PCR using a downstream primer (17676), resulting in a new C-terminal residue that aligns to the C-terminus of the slightly shorter AMY2 [primer 17676: 5'-GCC GTC TGG GAG AAG AAC TGA GAA TTC GGA TCC GCG GCC GC, corresponding to AVWEKN followed by *EcoRI* (italic), *BamHI* (underlined) and *SacII* (bold) sites].

The upstream primer (5479) corresponds to the N-terminal sequence encoding the AMY1 signal sequence [primer 5479: 5'-TTT TTT GAA TTC ATG GGG AAG AAC GGC AGC CTG TGC, corresponding to *EcoRI* (italic) followed by MGKNGSLC].

The PCR product (~1500 bp) encoded the C-terminally truncated AMY1 (Fig. 1). For amplification, Vent DNA polymerase (a high-fidelity thermophilic DNA polymerase, New England Biolabs, Beverly, USA) was used according to the manufacturer's instructions. The standard PCR consisted of 30 cycles at 367 (1 min), 328 (1 min) and 345 K (2 min). The PCR product was purified (Ultrafree MC, Pharmacia), subcloned in pHIL-D2 at the *EcoRI* site to yield pHIL-AMY1Δ9 and used for *E. coli* transformation. Single *E. coli* transformant colonies from agar plates were grown overnight in 5 ml LB/Amp (50 μg ml⁻¹), plasmids were purified (Plasmid Kit, Qiagen, Hilden, Germany) and the mutation was verified by DNA sequencing (Applied Biosystems 373A DNA Sequencer; Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit, Perkin-Elmer).

2.1.3. Transformation of *P. pastoris*. The yeast *P. pastoris* GS115 was transformed by electroporation according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Groningen, The Netherlands) with the expression plasmid pHIL-AMY1Δ9 which encodes the truncated AMY1, as inserted into pHIL-D2

at the unique *EcoRI* site between the AOX promoter and terminator (Juge *et al.*, 1996). His⁺, Mut⁻ (methanol-utilization deficient) transformants were selected on His⁺ plates followed by plates with methanol as the sole carbon source to identify

Mut⁺ colonies that indicated integration at the genomic AOX site. These transformants were tested for secretion of active enzyme on plates containing both starch and methanol (Gottschalk *et al.*, 2001).

2.1.4. Enzyme production. Fermentation of *P. pastoris* and production of the C-terminally truncated AMY1Δ9 were essentially performed as described by Juge *et al.* (1996). To monitor the secretion of active α-amylase variants, culture aliquots were removed during growth and assayed for activity toward Blue Starch (6.25 mg ml⁻¹) as described in Juge *et al.* (1995). AMY1Δ9 was purified from the concentrated culture supernatant by affinity chromatography on β-cyclodextrin Sepharose (Søgaard & Svensson, 1990; Juge *et al.*, 1996; Matsui & Svensson, 1997). The obtained AMY1Δ9 was analyzed (40–360 ng) using IEF (PhastGel, pI 4–6.5; Phast-System, Pharmacia), essentially as described in Søgaard *et al.* (1991) and Matsui & Svensson (1997). The enzyme was visualized by silver-staining and by a zymogram procedure involving soaking with a starch solution followed by addition of a KI₂ solution (Søgaard *et al.*, 1991) as well as by SDS-PAGE (PhastGel, 10–15%) and Western blotting (ProtoBlot Western Blot AP System, Promega, Madison, WI, USA) using 750-fold diluted anti-AMY2 immune serum (Matsui & Svensson, 1997). Enzyme concentrations were calculated from the amino-acid contents of protein (100 ng) hydrolysates (Alpha Plus amino-acid analyser, OPA-detection, Pharmacia) and secretion levels were assessed from the amounts of purified enzymes. The protein samples were concentrated (Centricon) and typically stored in 20 mM MES pH 6.7, 100 mM CaCl₂.

2.2. Activity assays

2.2.1. Insoluble Blue Starch. One 'Phadebas Amylase Test 100' tablet (Pharmacia) in 20 mM sodium acetate, 1 mM CaCl₂ pH 5.5 (4 ml) was added to AMY1 to a final concentration of approximately 2 nM and incubated for 15 min at 310 K. The reaction was stopped with 0.5 M NaOH (1 ml), 1 ml aliquots were centrifuged and the supernatants (300 μl) were transferred

AMY1 No.	397		↓	414
AMY1 seq.		N D Y A V W E K N G A A A T L Q R S		
AMY2 seq.		N D Y A V W E K I		
AMY2 No.	395		403	

Figure 1

Comparison of the C-terminal sequences of barley α-amylase 1 and α-amylase 2. The arrow indicates the new C-terminal (Asn) of the truncated α-amylase 1.

to a microtitre plate for A₆₂₀ reading (Ceres UV900 HDI microplate reader, Biotek Instruments Inc.). Alternatively, 6.25 mg ml⁻¹ insoluble Blue Starch (custom preparation, Pharmacia) was used in the above buffer containing 0.05% BSA (Matsui & Svensson, 1997). One unit of activity corresponds to the amount of enzyme giving ΔA₆₂₀ = 0.001 in 15 min in the final volume (5 ml).

2.2.2. Rationale for truncating the sequence. AMY1 and AMY2 have approximately 80% sequence identity (Rogers & Milliman, 1983; Rogers, 1985a). Despite this high identity, it has only been possible to obtain crystals of AMY2 that are suitable for X-ray studies (Svensson *et al.*, 1987; Kadziola *et al.*, 1994). Sequence comparison of the two proteins revealed a major difference between the polypeptide chains in the length of the C-terminal segment. AMY1 has a C-terminal extension nine amino-acid residues longer than AMY2. Furthermore, this C-terminal extension has been shown to be post-translationally modified in both barley and yeast (Søgaard *et al.*, 1991, 1993). Post-translational modifications such as proteolytic removal of C-terminal Arg-Ser by Kex1p, O-glycosylation and removal of additional C-terminal residues resulted in a heterogeneous mixture (Søgaard *et al.*, 1991, 1993) of AMY1 forms, which may be responsible for the failure to obtain good AMY1 crystals.

2.2.3. Production of AMY1Δ9. As *P. pastoris* secretes 20–50 mg l⁻¹ wild-type AMY1 (Juge *et al.*, 1996), forming large haloes on starch agar plates after 12–15 h, this host was chosen for production of the AMY1Δ9 mutant. Indeed, transformants harbouring the plasmid which encodes this truncated gene also gave rise to large haloes on starch plates around colonies after 2 d. *P. pastoris* thus also secreted the AMY1Δ9 mutant in high amounts. AMY1Δ9 retained activity over longer periods of storage at 277 K.

2.2.4. Enzymatic properties of the AMY1Δ9 mutant. The specific activity towards insoluble Blue Starch was essentially the same for AMY1Δ9 and the corresponding full-length recombinant AMY1.

2.3. Crystallization

2.3.1. Crystallization of recombinant full-length and truncated AMY1 forms. AMY1 (full-length) was first crystallized at 292 K employing the hanging-drop vapour-diffusion method using 21% PEG 8000 as precipitant in 0.1 M Tris pH 8.0 with a final protein concentration of 2 mg ml⁻¹ in the drop. The protein stock solution consisted of 20 mM MES pH 6.7 and 100 mM CaCl₂. As in earlier crystallization trials on this enzyme (Svensson *et al.*, 1987), only two-dimensional crystals were obtained. The size reached after one month was 1 × 0.6 × 0.01 mm. Owing to their morphology, these crystals were mechanically unstable and thus very difficult to handle. It was speculated that the failure to obtain three-dimensional crystals of AMY1 was a consequence of their having a flexible C-terminus compared with the nine-residue shorter C-terminal segment of AMY2. In an attempt to obtain three-dimensional crystals, C-terminally truncated recombinant AMY1 was produced as described above and used for crystallization. Crystals suitable for X-ray diffraction studies were obtained after approximately one month in 20% PEG 8000 using 3% 2-methyl-2,4-pentanediol (MPD) as additive employing Additive Screen 1 (Hampton Research). The initial protein concentration was 5.1 mg ml⁻¹ and the protein solution to mother liquor ratio was 2:3. Crystals were

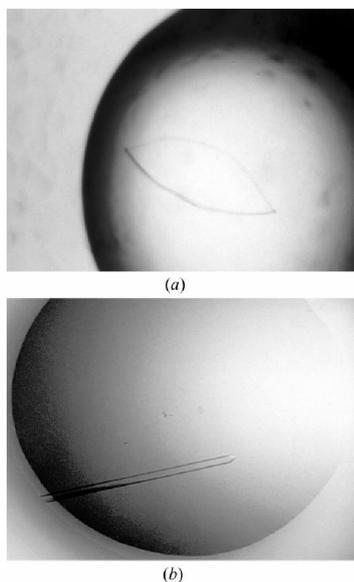


Figure 2
Typical crystals of (a) full-length AMY1 and (b) C-terminal truncated AMY1Δ9.

grown at 292 K by the hanging-drop vapour-diffusion technique.

Finally, another set of conditions for the C-terminally truncated AMY1Δ9 was found which led to crystals with higher diffraction power and better scaling statistics. The hanging-drop vapour-diffusion method was again used and the drop was prepared by mixing 2 μl of protein solution (5.1 mg ml⁻¹) with 0.5 μl 3%(v/v) 2-propanol and 2.5 μl well solution containing 500 μl of 20%(w/v) polyethylene glycol 8000, again resulting from Additive Screen 1. Crystals grew to a typical size of 0.5 × 0.05 × 0.05 mm after three weeks at 290 K.

2.4. X-ray diffraction and data processing

Diffraction data on crystals of both full-length and truncated AMY1 (first crystallization conditions) were collected on a MAR180 image-plate detector connected to a Rigaku RU-200 rotating-anode generator (Cu Kα radiation) with a graphite monochromator. Crystals of full-length and truncated AMY1 diffracted to 2.5 and 2.1 Å, respectively. The integration of the diffracted intensities was achieved with the program *DENZO* (Otwinowski & Minor, 1997) and the data were scaled with the program *SCALA* from the *CCP4* suite (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994).

Crystals of full-length (Fig. 2) as well as truncated AMY1 (Fig. 2) belong to the orthorhombic space group *P2₁2₁2*, with unit-cell parameters $a = 93.1$, $b = 74.0$, $c = 64.5$ Å for the truncated form and $a = 89.5$, $b = 73.1$, $c = 68.1$ Å for the full-length form. The space group of the full-length form was only determined/confirmed once the space group of the truncated form was known, since the morphology of full-length AMY1 crystals (Fig. 2) gave rise to a dead zone around one of the twofold axes in the diffraction pattern. The solvent contents of the two crystal forms were 51 and 50%, respectively, with volume-to-mass ratios (Matthews, 1968) of 2.49 and 2.45 Å³ Da⁻¹. The 1.5 Å resolution diffraction data set was collected under cryo-conditions at 100 K with crystals of type 2 (Fig. 2). Data collection was carried out at the FIP BM30A beamline at the ESRF (European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble, France) at a wavelength of 0.9761 Å. The detector used was a MAR345 image-plate system. The crystal was cryo-protected prior to the experiment by rapid soaking in three successive steps in mother liquor containing an increasing concentration of 5, 10 and 15%(v/v) ethylene glycol cryoprotectant. Integration and reduction of

Table 1

X-ray diffraction data for C-terminally truncated AMY1 (AMY1Δ9).

Values in parentheses are for the highest resolution shell.	
No. of observed reflections	271695
No. of unique reflections	63366
Redundancy	4.3 (3.5)
Resolution range (Å)	41.6–1.5 (1.54–1.50)
$I/\sigma(I)$	13.6 (6.2)
Completeness (%)	98.7 (97.3)
R_{sym}^{\dagger} (%)	4.5 (11.9)

$$\dagger R_{\text{sym}}(I) = \sum |I_n - \langle I \rangle| / \sum I_n$$

the diffraction data were performed with the same programs as for the two other sets of data. These crystals also belong to the orthorhombic space group *P2₁2₁2*, with unit-cell parameters $a = 88.36$, $b = 72.82$, $c = 61.74$ Å. Assuming a molecular weight of 44 592 Da (corresponding to truncated AMY1) and one molecule in the asymmetric unit gives a solvent content of 45% and a volume-to-mass ratio, V_M , of 2.23 Å³ Da⁻¹. Data-collection statistics for the high-resolution data are reported in Table 1.

2.4.1. Molecular replacement. The molecular-replacement method using the *AMoRe* program (Navaza, 2001), as implemented in the *CCP4* suite (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994), was employed to solve the phase problem. The three-dimensional structure of AMY2 (Kadzioła *et al.*, 1994) without the bound calcium ions and water molecules was used as a search model. In a first step, diffraction data from the first crystals of truncated AMY1 in the resolution range 10–4 Å were used in the molecular-replacement search and a unique solution was obtained with a correlation coefficient of 62.1% and an *R* factor of 35.4%. Once this solution was found, exactly the same procedure was performed with the data from full-length AMY1 and in this case a correlation coefficient of 64.1 and an *R* factor of 32.3% were found. Nevertheless, the poor-quality data of full-length AMY1 revealed several badly defined regions and in the future the crystal structure of the truncated form will be used as the reference structure for AMY1.

During the refinement of the initially collected data of truncated AMY1, a set of data diffracting to 1.5 Å resolution was collected. Because of the large gain in resolution and badly defined regions in the 2.1 Å resolution structure of truncated AMY1, we decided to continue with the new high-resolution data. These data were used in a molecular-replacement search employing the refined coordinates of the C-terminal truncated data (without calcium ions and water molecules) as a search model,

crystallization papers

again using the program *AMoRe* (Navaza, 2001). Diffraction data in the resolution range 15–4 Å were used and a unique solution was obtained with a correlation factor of 62.5 and an *R* factor of 37.8%. With these high-quality synchrotron data from AMY1 it will finally be possible to gain insight into the subtle differences between AMY1 and AMY2.

We thank Annette Gajhede for expert technical assistance; Michel Roth and Jean-Luc Ferrer at the FIP BM30A beamline at the ESRF synchrotron (Grenoble, France) are acknowledged for precious help and advice during data collection. This work was financially supported by the European Union Third and Fourth Framework programmes on Biotechnology NEWAMASE (CT94-3008) and AGADE 'Alpha-Glucan Active Designer Enzymes' (CT98-0022). Travel support from Institut Français, the scientific service at the French embassy in Denmark and support from the CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique) is also gratefully acknowledged.

References

- Abe, J., Sidenius, U. & Svensson, B. (1993). *Biochem. J.* **293**, 151–155.
- Ajandouz, E. H., Abe, J., Svensson, B. & Marchis-Mouren, G. (1992). *Biochim. Biophys. Acta*, **1159**, 193–202.
- Bertoft, E., Andtfolk, C. & Kulp, S. E. (1984). *J. Inst. Brew.* **90**, 298–302.
- Bush, D. S., Sticher, L., van Huystee, R., Wagner, D. & Jones, R. L. (1989). *J. Biol. Chem.* **264**, 19392–19398.
- Collaborative Computational Project, Number 4 (1994). *Acta Cryst.* **D50**, 760–763.
- Gottschalk, T. E., Tull, D., Aghajari, N., Haser, R. & Svensson, B. (2001). *Biochemistry*, **40**, 12844–12854.
- Gough, J. A. & Murray, N. E. (1983). *J. Mol. Biol.* **166**, 1–19.
- Jacobsen, J. V. & Higgins, T. J. V. (1982). *Plant Physiol.* **70**, 1647–1653.
- Juge, N., Andersen, J. S., Tull, D., Roepstorff, P. & Svensson, B. (1996). *Protein Expr. Purif.* **8**, 204–214.
- Juge, N., Rodenburg, K. W., Guo, X. J., Chaix, J. C. & Svensson, B. (1995). *FEBS Lett.* **363**, 299–303.
- Juge, N., Sogaard, M., Chaix, J. C., Martin-Eauclaire, M. F., Svensson, B., Marchis-Mouren, G. & Guo, X. J. (1993). *Gene*, **130**, 159–166.
- Kadziola, A., Abe, J., Svensson, B. & Haser, R. (1994). *J. Mol. Biol.* **239**, 104–121.
- Leah, R. & Mundy, J. (1989). *Plant Mol. Biol.* **12**, 673–682.
- MacGregor, A. W. & Ballance, D. L. (1980). *Cereal Chem.* **57**, 397–402.
- MacGregor, A. W. & Morgan, J. E. (1986). *Cereal Foods World*, **31**, 688–693.
- MacGregor, E. A., MacGregor, A. W., Macri, L. J. & Morgan, J. E. (1994). *Carbohydr. Res.* **257**, 249–268.
- Matsui, I. & Svensson, B. (1997). *J. Biol. Chem.* **272**, 22456–22463.
- Matthews, B. W. (1968). *J. Mol. Biol.* **33**, 491–497.
- Mundy, J., Svendsen, I. & Hejgaard, J. (1983). *Carlsberg Res. Commun.* **48**, 81–90.
- Navaza, J. (2001). *Acta Cryst.* **D57**, 1367–1372.
- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). *Methods Enzymol.* **276**, 307–326.
- Rodenburg, K. W., Juge, N., Guo, X. J., Sogaard, M., Chaix, J. C. & Svensson, B. (1994). *Eur. J. Biochem.* **221**, 277–284.
- Rodenburg, K. W., Vallée, F., Juge, N., Aghajari, N., Guo, X., Haser, R. & Svensson, B. (2000). *Eur. J. Biochem.* **267**, 1019–1029.
- Rogers, J. C. (1985a). *J. Biol. Chem.* **260**, 3731–3738.
- Rogers, J. C. (1985b). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **128**, 470–476.
- Rogers, J. C. & Milliman, C. (1983). *J. Biol. Chem.* **258**, 8169–8174.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sidenius, U., Olsen, K., Svensson, B. & Christensen, U. (1995). *FEBS Lett.* **361**, 250–254.
- Sogaard, M., Andersen, J. S., Roepstorff, P. & Svensson, B. (1993). *Biotechnology*, **11**, 1162–1165.
- Sogaard, M., Olsen, F. L. & Svensson, B. (1991). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **88**, 8140–8144.
- Sogaard, M. & Svensson, B. (1990). *Gene*, **94**, 173–179.
- Svendsen, I., Hejgaard, J. & Mundy, J. (1986). *Carlsberg Res. Commun.* **51**, 43–50.
- Svensson, B., Gibson, R. M., Haser, R. & Astier, J. P. (1987). *J. Biol. Chem.* **262**, 13682–13684.
- Vallée, F., Kadziola, A., Bourne, Y., Juy, M., Rodenburg, K. W., Svensson, B. & Haser, R. (1998). *Structure*, **6**, 649–659.

B/ Détermination des conditions de cryo-protection des cristaux de AMY1Δ9 :

Les cristaux de AMY1Δ9, ainsi obtenus, ont permis de collecter des données de diffraction de bonne qualité. Cependant, nous avons pu constater que ces cristaux étaient relativement fragiles à la manipulation, ce qui était un problème pour leur montage en capillaire ou pour leur transport lors de sessions expérimentales au synchrotron. De plus, leur pouvoir de diffraction diminuait fortement pendant l'expérience de diffraction, ceci attestant d'une dégradation causée par leur exposition au rayonnement X. En conséquence, l'utilisation de la méthode cryogénique s'est vite avérée nécessaire.

Nous avons constaté que les conditions de cristallisation décrites (voir article) ne permettaient pas l'utilisation directe des cristaux en vue d'une collecte sous conditions cryogéniques. En effet, après l'étape de « *flash-cooling* », les images de diffraction montraient d'importants anneaux de solvant ainsi que des taches étalées, indiquant une haute mosaïcité du cristal ; ce qui n'avait pas été le cas des cristaux utilisés dans les expériences à température ambiante. Au vu des difficultés d'obtention des cristaux de AMY1Δ9, nous nous sommes orientés vers la recherche d'un protocole de cryo-protection qui puisse être appliqué à des cristaux déjà formés.

Nous avons donc envisagé les cryo-protégeants usuels, connus pour leur efficacité et décrits dans de nombreuses expériences (Garman & Schneider, 1997) : trempage du cristal dans du glycérol à concentration variable, dans du PEG à haute concentration, ajout d'alcool à la goutte contenant le cristal, etc.

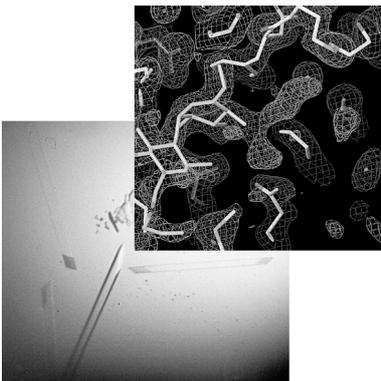
Toutes ces tentatives furent infructueuses : lorsque le cristal ne fondait ou ne craquait pas, les clichés de diffraction enregistrés ne montraient pas d'amélioration majeure.

L'utilisation du glucose (Garman & Schneider, 1997) fut aussi rejetée, car il pouvait interférer lors des expériences de trempage/co-cristallisation avec des substrats ou analogues de substrat de AMY1.

Des tentatives avec des huiles à base de silicone furent également un échec, du fait des contraintes mécaniques que subissait le cristal lors de sa manipulation. En effet, l'importante viscosité de l'huile combinée à la forme allongée du cristal ne permettait pas d'extraire ce dernier plongé dans l'huile sans le briser.

Après de nombreux essais et phases d'optimisation, nous avons déterminé les bonnes conditions de cryo-protection qui furent, ensuite, utilisées tout au long de cette étude. Elles consistent à tremper le cristal, en 4 bains successifs brefs (environ 30 secondes), dans des solutions contenant de la liqueur mère (500 µl de PEG 8000 à 22% (w/v) + 0,5 µl de MPD 3% (v/v)) et une concentration croissante d'éthylène-glycol (5%, 10, 15 et 20% (v/v)). Le cristal est alors instantanément gelé sous flux d'azote gazeux à 100 K. Il peut ainsi résister à une exposition prolongée aux rayons X et, de plus, être stocké (dans l'azote liquide) afin d'être réutilisé lors d'expériences ultérieures.

Dans ces conditions, nous avons pu constater une légère amélioration du pouvoir de diffraction des cristaux ainsi protégés (entre 0,1 et 0,3 Å). Cependant, cette étape de cryo-protection a aussi pour conséquence une augmentation significative de leur mosaïcité (typiquement de 0,2 à 0,4°). Nous avons aussi remarqué que les paramètres de maille (a, b, c) subissaient des variations sensibles, phénomène connu et décrit (Garman & Schneider, 1997). Étonnamment, cette variation constatée à chaque expérience n'est pas reproductible : nous avons mesuré des fluctuations pouvant aller jusqu'à ± 5% sur le plus grand axe, comparativement au cristal à température ambiante. En outre, nous avons pu vérifier que cette variation ne semblait pas induire de changements dans les statistiques d'enregistrement de données de diffractions, ni de modifications visibles dans la structure.



L'obtention des cristaux de AMY1 ainsi que la connaissance de leurs conditions de cryo-protection a conduit à la détermination de la structure native de l'enzyme, puis à celle de complexes. Les études détaillées de ces structures, leurs comparaisons avec celles de AMY2 ou d'autres α -amylases et la discussion des résultats obtenus durant ces travaux, seront présentées dans les chapitres suivants.

Chapitre 2

**Structure native de AMY1
et premiers éléments de
comparaison avec AMY2**

Publication n°2 :

**Comparison of crystal structures of barley α -amylase 1 and 2:
implications for isozyme differences in stability and activity**

Xavier ROBERT¹, Richard HASER^{1*}, Birte SVENSSON² & Nushin AGHAJARI¹

¹ *Laboratoire de BioCristallographie, Institut de Biologie et Chimie des Protéines,
UMR 5086-CNRS/UCBL, 7 Passage du Vercors, F-69367 Lyon cedex 07, France
tel.: ++33 4 72 72 26 08, fax: ++33 4 72 72 26 16, e-mail: r.haser@ibcp.fr*

² *Department of Chemistry, Carlsberg Laboratory, Gamle Carlsberg Vej 10,
DK-2500 Copenhagen Valby, Denmark.*

* Corresponding author.

Publication sous presse - Référence :

ROBERT, X., HASER, R., SVENSSON, B. & AGHAJARI, N. (2002) Comparison of crystal structures of barley α -amylase 1 and 2: implications for isozyme differences in stability and activity. *Biologia, Bratislava*, **57/Suppl. 11**: 55-66; ISSN 0006-3088 (*Biologia*).
ISSN 1335-6399 (*Biologia. Section Cellular and Molecular Biology*).

Abstract

The germinating barley seed contains two major α -amylase isozyme families AMY1 and AMY2 involved in starch degradation to provide energy used by the plant embryo for growth. The three-dimensional structure of AMY2 has been solved previously, both in the native state and in complex with acarbose, a pseudo-tetrasaccharide acting as a powerful inhibitor for several glycosidases. Furthermore, the endogenous bifunctional barley α -amylase/subtilisin inhibitor (BASI) present in the mature seeds inhibits both proteases from the subtilisin family and AMY2, but not AMY1. The crystal structure of the AMY2-BASI complex has earlier been solved at 1.9 Å resolution. In addition to this difference, the isozymes AMY1 and AMY2 show several distinctly different properties, despite their high sequence identity. AMY1 and AMY2 thus differ in isoelectric point, in affinity for calcium ions, and in stability at acidic pH and elevated temperature. With regard to the enzymatic properties, large variation is found in the activity towards starch granules and in the affinity for soluble substrates. The crystal structure of AMY1 has recently been established at 1.5 Å resolution, which allows a direct comparison of the two isozymes on the basis of the 3D structures. Detailed analysis shows that the structural organization of the isozymes is virtually identical, and that local changes are very small. AMY1 and AMY2 thus constitute a remarkable case of enzymes displaying very similar structures, but important differences in physico-chemical and enzymatic properties. Here, the recently solved crystal structure of AMY1 is compared to that of AMY2, with focus on isozyme differences at areas of interest, i.e. the active site, the starch granule binding surface site, the area where BASI is recognized by AMY2, and the three calcium binding sites.

Keywords

α -amylase, barley, isozymes, X-ray crystallography, structure comparison

Introduction

α -Amylases (1,4- α -D-glucan glucanohydrolase; EC 3.2.1.1) are monomeric enzymes widely occurring in animals, higher plants, and micro-organisms. Their enzymatic function is to catalyse hydrolysis of internal α -D-(1,4) glucosidic linkages in starch (amylose and amylopectin), and related oligo- and polysaccharides. The resulting malto-oligosaccharides and glucose are released with retained α -anomeric configuration.

In barley seeds, the physiological role of α -amylases is to provide energy to the growing plantlet. The *de novo* synthesis of the α -amylases, and more generally of an array of hydrolases, is controlled by a complex pathway involving phytohormones and launched by external parameters such as the temperature and humidity. Two different α -amylase isozymes encoded by two multigene families can be distinguished in the germinating seeds. These isozymes known as α -amylase 1 (AMY1) and α -amylase 2 (AMY2) contain 414 (MW = 45,342 Da) and 403 residues (MW = 45,005 Da), respectively (ROGERS & MILLIMAN, 1983; ROGERS, 1985a). They show 80% sequence identity, but possess low sequence similarity with α -amylases from micro-organisms and animals (ROGERS, 1985b).

AMY1 and AMY2 differ in isoelectric points, and are also known as the low pI and high pI isozyme, respectively (JACOBSEN & HIGGINS, 1982). They show significantly different affinity for calcium ions (BERTOFT et al., 1984; BUSH et al., 1989; RODENBURG et al., 1994), stability at acidic pH (RODENBURG et al., 1994), and stability at elevated temperature. From an enzymatic point of view, large variation is found in activity and affinity towards starch granules (MACGREGOR & BALLANCE, 1980; MACGREGOR & MORGAN, 1986) and soluble substrates (SØGAARD & SVENSSON, 1990; AJANDOUZ et al., 1992). Finally, only AMY2 has the capacity of binding the endogenous bifunctional inhibitor BASI (barley α -amylase/subtilisin inhibitor) (MUNDY et al., 1983; SVENDSEN et al., 1986; LEAH & MUNDY, 1989). The high affinity of AMY2 for BASI is indicated by a K_i of 2.2×10^{-10} M as determined at pH 8 and 37°C (ABE et al., 1993; SIDENIUS et al., 1995), whereas no interaction has been identified between BASI and AMY1. Both structural and biochemical data explain these differences (VALLÉE et al., 1998; RODENBURG et al., 2000).

Recently, the three dimensional structure of AMY1 has been determined to 1.5 Å resolution (this manuscript and details in ROBERT, X., HASER, R., GOTTSCHALK, T.E., DRIGUEZ, H., SVENSSON, B. AND AGHAJARI, N., to be submitted). The structure of AMY2 has previously been solved to 2.8 Å resolution (KADZIOLA et al., 1994). Here, the native AMY1 structure is briefly described and compared with that of AMY2.

Materials and methods

Crystallization of full-length and truncated AMY1.

AMY1 (full-length) was first crystallized as previously described (ROBERT et al., 2002) and only two dimensional, ultra thin plate formed crystals were obtained. These were mechanically unstable due to their morphology and thus very difficult to handle. Since the failure in obtaining three dimensional crystals of AMY1 is thought to be due to a flexible C-terminus as compared to AMY2, a C-terminal truncated form of AMY1, henceforward referred to as AMY1 Δ 9 (ROBERT et al., 2002) was used afterwards. Crystals suitable for X-ray diffraction studies were obtained after approximately one month in PEG 8000 with 2-methyl-2,4-pentanediol (MPD) as additive and 3 weeks using 2-propanol as additive, as previously described (ROBERT et al., 2002). Crystals leading to the high resolution structure of AMY1 Δ 9 were obtained under the later conditions.

Data collection, structure solution, refinement.

Crystals of full-length AMY1 as well as AMY1 Δ 9 belong to the orthorhombic space group P2₁2₁2. As earlier described (ROBERT et al., 2002) the molecular replacement method using the AMoRe software (NAVAZA, 2001), as implemented in the CCP4 suite (CCP4

COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT, 1994), was used to solve the phase problem of the full length as well as the AMY1 Δ 9 form. The 3D structure of AMY2 (KADZIOLA et al., 1994) without the bound calcium ions and water molecules, was used as a search model. Refinement of the models, alternating with manual building, were done using the simulated annealing routine as implemented in the software CNS (BRÜNGER et al., 1998). The final R factor for the high resolution AMY1 Δ 9 structure was 13.6% with an R_{free} of 16.3%.

Sequence and structure alignment.

The sequence alignment showing the superimposition of secondary structures and domains between AMY1 and AMY2 was rendered using the program ESPript (GOUET et al., 1999). Structural superimposition of AMY1 and AMY2 C_{α} backbones was performed with the "rigid body fit" option in TURBO-FRODO (ROUSSEL & CABBILLAU, 1989). Figures showing overall and detailed structures were generated with the programs TURBO-FRODO (ROUSSEL & CABBILLAU, 1989), GRASP (NICHOLLS et al., 1991), and VIEWERLITE™ (freeware from Accelrys Inc., San Diego, USA – <http://www.accelrys.com>).

Accession number. *The coordinates and structure factors of the AMY1 Δ 9 crystal structure solved to 1.5 Å resolution have been deposited at the RCSB (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics) Protein Data Bank (PDB – <http://www.rcsb.org>) under the entry code 1HT6. The coordinates of the native AMY2 structure used in this comparative study are present in the PDB under the accession number 1AMY.*

Results

Overall structure.

The three-dimensional structure of AMY1 Δ 9 consists of 404 amino acid residues, and all side-chains are clearly identified in the electron density map. It turned out that a quite large number of amino acid residues (16) throughout the entire polypeptide display double conformations (ROBERT, X., HASER, R., GOTTSCHALK, T.E., DRIGUEZ, H., SVENSSON, B. AND AGHAJARI, N., to be submitted). The structure confirms the sequence correction to AMY1 (as deposited in SWISS-PROT, with entry name AMY1_HORVU and primary accession number P00693): Ala 308 in AMY1_HORVU is in fact a valine (residue 284 in the mature AMY1 numbering) as found by cDNA sequencing and protein mass-spectrometry (SØGAARD et al., 1993a; ANDERSEN et al., 1994). Nine residues (406 to 414) were removed from AMY1 to obtain a C-terminal end identical to that of AMY2 (ROBERT et al., 2002). Moreover, in the high resolution AMY1 Δ 9 structure, electron density was also lacking for Asn405 (ROBERT, X., HASER, R., GOTTSCHALK, T.E., DRIGUEZ, H., SVENSSON, B. AND AGHAJARI, N., to be submitted). In the crystal structure of full length AMY1, residues 404 to 414 are not visible in the electron density either, and residues 402 and 403 are not well defined. These facts support the idea of the C-terminal part of AMY1 being very flexible or highly disordered, and are consistent with the improvement of crystal growth with the C-terminally truncated AMY1 Δ 9 form. The structures (full length and AMY1 Δ 9) obtained contain three calcium ions and in the 1.5 Å AMY1 Δ 9 resolution structure a large number of water molecules as well as some molecules of ethylene-glycol (used as cryo-protectant) were found.

Superimposing the structure of AMY1 on AMY2 (Fig. 1) shows their very high similarity. As observed in almost all α -amylases, AMY1 consists of three domains, including a major central domain (domain A) having a parallel $(\beta/\alpha)_8$ -barrel super-secondary structure. Like in AMY2 (KADZIOLA et al., 1994), domain A of AMY1 differs from a classical TIM-barrel eight-fold symmetry (BANNER et al., 1975) due to the presence of three additional α -helices in domain A: A- α_{6a} , A- α_{7a} and A- α_{8a} (Fig. 2), as well as of an irregular loop comprising 65 residues (domain B) which protrudes from domain A and connects strand β_3 to helix α_3 . As it was described for AMY2 (KADZIOLA et al., 1994), domain B forms an anti-parallel twisted β -

sheet together with the 26 residues long protruding loop, A- $\beta_2\alpha_2$, belonging to domain A. The C-terminal domain (domain C) is constituted of 61 residues and is organized as a five-stranded anti-parallel β -sheet.

The main backbone differences between AMY1 and AMY2 are observed within some of the barrel loops. Firstly, the loop joining the short α -helices η_3 et η_4 (helices having less than five residues according to the notation used in the sequence alignment as presented in Fig. 2 - residues 265 to 274, AMY1 numbering) has a turn induced by Pro268 (Thr266 in AMY2). The 2.4 Å deviation between the summit of these loops can be explained by an important sequence difference at the beginning of this loop (sequence **IDPQ** in AMY1, **RGTD** in AMY2), with a proline (Pro268) being present only in AMY1. Due to its rigid nature, this residue can promote a slightly different local backbone folding in AMY1 compared to AMY2. Secondly, a significant deviation in the backbone was observed in the region located between Val206 and Pro218 (AMY1 numbering), which forms a large loop between β_5 and α_5 , and protrudes from the barrel. The maximum deviation between C α 's of AMY1 and AMY2 for this loop is 3.4 Å and is located at the level of the Gly214_{AMY1} residue (Gly213_{AMY2}). This shift can be explained by the fact that the neighbouring region of this residue in AMY2 is involved in crystal contacts (residue 209 to 214 in AMY2 numbering) as well as in AMY1 (residue 212 to 216) – see sequence alignment Fig. 2. Nevertheless, due to different crystal packings, symmetry-related molecules involved in inter-molecular contacts differ in AMY1 and AMY2, in terms of number and strength of interactions. In AMY2, inter-molecular interactions are Tyr211-N/Asp113-O δ 1#2 (2.9 Å) and Gly213-N/Asp360-O δ 1#4 (3.1 Å) (KADZIOLA et al., 1994) where #2 and #4 are symmetry related molecules in AMY2. In AMY1, inter-molecular interactions are: Thr212-O γ 1/Arg156-N η 1#4 (3.3 Å), Gly214-O/Asp118-O#4 (3.3 Å), Asp215-N/Asp118-O#4 (3.3 Å) and Gly216-N/Arg156N ϵ #4 (4 Å) where #4 is a symmetry related molecule in AMY1.

Thirdly, a deviation occurs in the vicinity of Gly243 (β_6), one of the two residues inserted in AMY1 compared to AMY2 (Fig. 2). Interestingly, this insertion does not cause major structural changes in β_4 , and from Val245 the backbones of both isozymes are perfectly superimposable. Also, the secondary structures are perfectly conserved around Gly243.

Calcium binding sites.

Both AMY1 and AMY2 (KADZIOLA et al., 1994) structures contain three Ca²⁺, two of which have ligands only from domain B (Ca501 and Ca502). The third so-called conserved calcium ion as found in all other α -amylase 3D structures (Ca500), which has one ligand from domain A and the remaining ones from domain B (MATSUURA et al., 1984; BOEL et al., 1990; QIAN et al., 1993; BRAYER et al., 1995; RAMASUBBU et al., 1996; STROBL et al., 1997; AGHAJARI et al., 1998b; MACHIUS et al., 1998; DAUTER et al., 1999). Calcium ions appear to be essential for proper folding, conformational stability and therefore for activity (BERTOFT et al., 1984; JONES & JACOBSEN, 1991).

Superimposition of the structure of AMY1 on AMY2, demonstrates both the perfect spatial identity of the three calcium ions and of all the amino acid and water ligands. These three calcium ion binding sites of AMY1 are presented in Figs 3a & 3b. The only structural difference seen between the isozymes when comparing the calcium binding sites is the presence of an extra water molecule (Wat788) as a ligand in AMY1 for Ca502, but it should be mentioned that a water molecule with low occupancy was seen in the F_o-F_c electron density map of AMY2, but not included in the refinement (KADZIOLA et al., 1994). In AMY1, Ca500 performs 7 interactions with its ligands, one of these being a water molecule (Wat630). This hepta-coordination forms a distorted pentagonal bipyramid and is thus similar but not identical to the homologous site in other α -amylases, which all are octa-coordinated. Ca501 has 8 ligands including 2 water molecules (Wat604 and Wat656) and finally, Ca502 is hepta-coordinated including 1 water molecule (Wat788) as ligand, determining a pentagonal bipyramid geometry. Interactions between calcium ions and their ligands, both in AMY1 and AMY2, are summarized in Table 1. Two of the calcium ions (Ca500 and Ca502) are very close to each other, and share a ligand (Asp 149). The third calcium ion (Ca501) is located about 20 Å from the two others. All

amino acid residues interacting with these calcium ions belong to domain B, except Gly184 which is located in loop $\beta_4\alpha_4$ of domain A.

Active Site.

The active site of AMY2, identified in the crystal structure of a complex between the enzyme and acarbose (a pseudotetrasaccharide resembling a transition-state analogue) (KADZIOLA et al., 1998), appears to be a large V-shaped depression on one side of the enzyme, formed by parts of domain A and domain B. Only two AMY2 residues involved in substrate binding and catalysis differ in AMY1: Lys182/Arg183 and Ser208/Asn209 (AMY2/AMY1 numbering), see Table 2. The C_α 's of these residues are very well superimposed. As concerns the side chains of Lys182_{AMY1} and Arg183_{AMY2}, respectively, they are oriented in opposite directions. In fact, in AMY2, the presence of Glu227 (Asn228 in AMY1) does not leave enough space for Lys182 to fill the same position as Arg183 in AMY1, while in AMY1 Asn228 leaves enough room for Arg183.

Lys182 N ζ (AMY2) provides a hydrogen bond to aca1-O3C at subsite +2 (KADZIOLA et al., 1998) (see Fig. 6). When examining the structures, it seems that the AMY1 Arg183, despite its difference in orientation at this position, does not represent a drastic difference since the residues are of approximately the same length and possess nitrogen atoms capable of forming a hydrogen bond with an oxygen in acarbose or a sugar substrate. A similar conclusion can be drawn for the couple Ser208/Asn209 (AMY2/AMY1 numbering). In the AMY2/acarbose complex, one of the hydrogen bonds between Ser208 and aca1-O2C at subsite +1 (KADZIOLA et al., 1998) involves the nitrogen of the peptide bond (see Fig. 6). AMY1 has this atom at the same location, due to the almost perfect overlay of the backbone in this region. A second hydrogen bond is formed by Ser208 O γ . Due to the comparable lengths of Ser and Asn and to the presence of an oxygen atom in both side chains, it seems possible to establish the equivalent hydrogen bond in AMY1 substrate and/or substrate analogue complexes.

In the AMY2/acarbose complex (KADZIOLA et al., 1998), a chain of five water molecules was observed running from the active site cleft, towards the interior of the protein. The first water molecule in this chain, Wat607, bridges the carboxylate groups of Glu204 and Asp289, two of the three catalytic residues. This water has been proposed earlier as candidate for participation in the enzymatic process as the first catalytic water molecule in hydrolysis of substrates (KADZIOLA et al., 1994; AGHAJARI et al., 1998b). The presence of these five water molecules, defining a water pocket, is not correlated with binding of a substrate, a substrate analogue like acarbose or of the bifunctional α -amylase/subtilisin inhibitor (BASI). Indeed, these water molecules were found in the native AMY2 structure (KADZIOLA et al., 1994) and in the structure at 1.9 Å resolution of the AMY2/BASI complex (VALLÉE et al., 1998), whereas a similar chain of buried water molecules linked to a chloride effector ion was observed in the psychrophilic α -amylase, AHA (AGHAJARI et al., 1998a). The 3D structure of AMY1 has a water pocket similar to the one found in AMY2.

The starch granule-binding surface site.

In AMY2, two contiguous tryptophan residues, Trp276 and 277 (Trp278 and 279 in AMY1) constitute the so-called starch granule binding site (GIBSON & SVENSSON, 1987) on the surface of the enzyme (KADZIOLA et al., 1994). This site (Fig.4a & 4b), which is independent from the active site, was previously confirmed by UV difference spectroscopy (GIBSON & SVENSSON, 1987; SØGAARD et al., 1993b). Its low binding affinity for acarbose and β -cyclodextrin, which competes with starch granules (WESELAKE & HILL, 1983; SØGAARD et al., 1993b), suggests a role in binding of the enzyme to starch *in vivo*. This site has been proven also by X-ray crystallography in the AMY2/acarbose complex, solved to 2.8 Å resolution (KADZIOLA et al., 1998) in which a disaccharide unit was stacking to the indole rings of the two tryptophans.

Trp278 and Trp279 in AMY1 superimpose remarkably well with the AMY2 counterparts. Each aromatic side-chain defines a plane and the angle between the two planes was determined to be

about 135°. This angle is preserved in AMY1 and AMY2 in the native state and in the AMY2 complex with acarbose. The conservation of the spatial position and orientation of the two residues can be explained in that tryptophans are large bulky residues, and that these particular tryptophans are locked by the neighbouring residues: Trp278 in AMY1 is situated next to Arg226 (Arg225 in AMY2) and Trp279 next to Lys282 (Lys280 in AMY2). These basic residues which are held in a fixed position by several hydrogen bonds and have little space for moving, lock the position of the tryptophans and thus this local structure is perfectly conserved between AMY1 and AMY2.

The interface of the protein-protein complex AMY2-BASI and its counterpart in AMY1.

BASI belongs to the soybean trypsin inhibitor family and inhibits AMY2, but not AMY1. The crystal structure of AMY2 - BASI was determined at 1.9 Å resolution (VALLÉE et al., 1998), in which BASI contains a 12-stranded β -barrel structure and inhibits AMY2 by sterically occluding access of substrate to the active site. The total buried surface area in AMY2-BASI is 2355 Å² and comprises three interacting regions situated in the neighborhood of the catalytic site of AMY2. BASI however does not directly interact with the three catalytic residues, Asp179_{AMY2}, Glu204_{AMY2} and Asp289_{AMY2} (VALLÉE et al., 1998).

Remarkably, a large cavity, in which a solvated calcium ion is trapped, is created at the AMY2-BASI binding interface and stabilized by six water molecules in a trigonal bipyramidal geometry. Five water molecules make hydrogen bonds to the three catalytic residues (Asp179, Glu204 and Asp289) and to two oxygen atoms of Glu168 and Tyr170 from BASI (Table 3). Six of eight residues interacting with BASI by direct hydrogen bonds are changed in AMY1. The critical role of some of these residues has been confirmed by protein engineering (RODENBURG et al., 2000). It should be mentioned that significant sensitivity for BASI could be introduced by mutagenesis in an insensitive barley α -amylase hybrid isozyme. At least three residues of AMY2 are crucial in the AMY2/BASI interaction (Table 3): Arg128_{AMY2} which makes a charge interaction with Ser77_{BASI}, Asp142_{AMY2} forming a salt bridge to Lys140_{BASI}, and the cis-Pro129_{AMY2} residue presumably ensuring an appropriate geometry of Arg128_{AMY2}. In the above mentioned study, Arg128_{AMY2} and Asp142_{AMY2} were mutated to glutamine and asparagine, respectively. A BASI-sensitive isozyme hybrid (AMY1-(1-90)/AMY2-(90-403)) was created with K_i of 0.33 nM, compared to 0.22 mM in the case of AMY2. Moreover, Arg128_{AMY2} was introduced in AMY1 in addition to the K130P mutation (in order to introduce the equivalent in AMY1 of Pro129_{AMY2}). This time, an inhibitor-insensitive hybrid (AMY1-(1-161)/AMY2-(161-403)) was used and the T129R-K130P mutation conferred sensitivity to BASI corresponding to $K_i = 7 \mu\text{M}$ (RODENBURG et al., 2000). Despite these remarkable mutational alterations of the sensitivity towards BASI, it was concluded that the optimal recognition of BASI depended on several individual enzyme/inhibitor contacts.

Examination of the surfaces of AMY1 and AMY2 (Fig. 5) colored as a function of charge shows that the BASI recognition area in AMY2 is mainly negatively charged, and that the corresponding region in AMY1 displays a notably wider negatively charged area. The structural superimposition of the two native isozymes and the examination of residues involved in direct contacts with BASI in AMY2 show that these residues and their counterparts in AMY1 can be classified in two categories (Table 3):

1) Residues not necessarily conserved between AMY1 and AMY2, but which are capable of making the same interactions in case a complex between AMY1 and BASI could be established. These residues include: Asp143_{AMY1} which is perfectly superimposed onto Asp142_{AMY2}; the peptide bond nitrogen atom of Ala145-N_{AMY1}, superimposable with Gly144-N_{AMY2}; Thr121-N_{AMY1} and Tyr211-N_{AMY2}, same argument; Gly216-O_{AMY1} and Gly215-O_{AMY2} where the position of the peptide bond oxygen atom is conserved and finally, Ala297-O_{AMY1} and His295-O_{AMY2} with the same kind of conservation.

2) Residues which display drastic differences between the two isozymes: Thr129_{AMY1} not only has a shorter side chain compared to its counterpart in AMY2 (Arg128_{AMY2}) but also have different charge properties; Ala224_{AMY1} compared to Gln223-Oε1_{AMY2} is a hydrophobic, uncharged residue which is unable to interact with Asn26-Nδ2_{BASI}. Finally Arg183_{AMY1}/Lys182-

$N\zeta_{AMY2}$ can be considered as having comparable charges and side chain lengths. One can therefore not conclude that this mutation is a severe hindering for creating an interaction with Glu168-O ϵ 1_{BASI} as observed in the AMY2/BASI complex.

A part of the AMY2/BASI complex formation is certainly the solvated calcium ion found at the interface between the two proteins. This calcium only has water molecules as ligands, five of which are interacting with the three catalytic residues of AMY2. The fact that this calcium ion was not found in the native structure of AMY1 is far from being understood in that the catalytic residues as well as its environments in both isozymes superimpose perfectly. Furthermore, it is presently difficult to conclude on the exact role of this calcium in the non inhibition of AMY1 by BASI.

Discussion

The three dimensional structure of barley AMY1 is the second structure of a plant α -amylase solved to date, the first being that of AMY2 (KADZIOLA et al., 1994). These two isozymes display conspicuous biochemical, biophysical and enzymatic differences. The crystal structure of AMY1 described here represents the first step in a study aiming an improved understanding of these dissimilarities. It seems, however, difficult to explain any of these differences based on the two native structures. Indeed, the three dimensional structures of AMY1 and AMY2 are virtually the same, with the three domains A, B and C of the two structures perfectly superimposable (Fig. 1), with a few variations occurring in specific loops. However, the spatial location of these loops makes it unlikely that the observed structural deviations are responsible for such differences in biochemical properties. For example, the AMY1 and AMY2 contain three calcium ions with exactly the same environment in both isozymes; however they display significantly different calcium affinities.

As concerns the differences in stability at acidic pH and at elevated temperature, they might be related to subtle structural particularities as is generally the case for proteins of different thermostability. Thus a thorough structure comparison including surface electrostatic potential and dynamic studies are required to address such questions.

As described above the active sites of AMY1 and AMY2 display some differences, but the catalytic machinery seems to be identical. However, based on the native structure of AMY1 and AMY2, it remains difficult to understand the large differences in activity and affinity for starch granules (MACGREGOR & BALLANCE, 1980; MACGREGOR & MORGAN, 1986) and affinity for soluble substrates (SØGAARD & SVENSSON, 1990; AJANDOUZ et al., 1992). The affinity for these substrates is dictated by the availability, the number and the structure of the subsites. The AMY2/acarbose complex (KADZIOLA et al., 1998) (Fig. 6) shows occupancy in the three subsites -1, +1 and +2 (nomenclature according to (DAVIES et al., 1997)). Moreover, it has been found by enzymatic subsite mapping (AJANDOUZ et al., 1992) and predicted by computer aided modelling (ANDRÉ et al., 1999), that both AMY2 and AMY1 possess 10 subsites, namely -6 through -1 towards the non-reducing end from the site of cleavage and subsites +1 through +4 towards the reducing end of the substrate.

A detailed structural comparison of all subsites in AMY1 and AMY2 appears to be an essential approach for understanding the differences in enzymatic properties. This, however, requires three dimensional structures at high resolution of various enzyme/oligo-saccharide complexes. Such studies are underway.

The study of barley α -amylase isozymes AMY1 and AMY2, represents a very interesting case of the collaborative work between structural determination/analysis, biochemistry and molecular biology. This couple is still a unique example of enzymes with very close primary and tertiary structure and with such different biochemical and biophysical properties. The explanation for these differences implies an important work based on structural analyses combined with rational protein engineering experiments in order to understand the activity and the specificity of both isozymes. Finally, AMY1 and AMY2 are two major candidates in bio-engineering with focus on industrial and bio-technological applications using genetically modified and improved barley α -amylases.

Acknowledgements

We warmly thank Annette GAJHEDE, Tine E. GOTTSCHALK and Nathalie JUGE for the preparations of recombinant AMY1. We furthermore want to acknowledge Michel ROTH and Jean-Luc FERRER at the FIP BM30A beamline at the ESRF synchrotron (Grenoble, France) for precious help and advices during data collection. This work was financially supported by the European Union Biotech Programme (Framework IV programme Biotech II) AGADE “Alpha-Glucan Active Designer Enzymes” (BIO4-980022). Support from the CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique) is also gratefully acknowledged.

References

- ABE, J., SIDENIUS, U. & SVENSSON, B. 1993. Arginine is essential for the α -amylase inhibitory activity of the α -amylase/subtilisin inhibitor (BASI) from barley seeds. *Biochem. J.* **293**: 151–155.
- AGHAJARI, N., FELLER, G., GERDAY, C. & HASER, R. 1998a. Crystal structures of the psychrophilic α -amylase from *Alteromonas haloplanctis* in its native form and complexed with an inhibitor [published erratum appears in *Protein Sci.* 1998. **7**: 1481]. *Protein Sci.* **7**: 564–572.
- AGHAJARI, N., FELLER, G., GERDAY, C. & HASER, R. 1998b. Structures of the psychrophilic *Alteromonas haloplanctis* α -amylase give insights into cold adaptation at a molecular level. *Structure* **6**: 1503–1516.
- AJANDOUZ, E. H., ABE, J., SVENSSON, B. & MARCHIS-MOUREN, G. 1992. Barley malt α -amylase. Purification, action pattern, and subsite mapping of isozyme 1 and two members of the isozyme 2 subfamily using p-nitrophenylated maltooligosaccharide substrates. *Biochim. Biophys. Acta* **1159**: 193–202.
- ANDERSEN, J. S., SØGAARD, M., SVENSSON, B. & ROEPSTORFF, P. 1994. Localization of an *O*-glycosylated site in the recombinant barley α -amylase 1 produced in yeast and correction of the amino acid sequence using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of peptide mixtures. *Biol. Mass Spectrom.* **23**: 547–554.
- ANDRÉ, G., BULÉON, A., HASER, R. & TRAN, V. 1999. Amylose chain behavior in an interacting context. III. Complete occupancy of the AMY2 barley α -amylase cleft and comparison with biochemical data. *Biopolymers* **50**: 751–762.
- BANNER, D. W., BLOOMER, A. C., PETSKO, G. A., PHILLIPS, D. C., POGSON, C. I., WILSON, I. A., CORPRAN, P. H., FURTH, A. J., MILMAN, J. D., OFFORD, R. E., PRIDDLE, J. D. & WALEY, S. G. 1975. Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 angstrom resolution using amino acid sequence data. *Nature* **255**: 609–614.
- BERTOFT, E., ANDTFOLK, C. & KULP, S. E. 1984. Effect of pH, temperature, and calcium-ions on barley malt α -amylase isoenzymes. *J. Inst. Brew.* **90**: 298–302.
- BOEL, E., BRADY, L., BRZOWSKI, A. M., DEREWENDA, Z., DODSON, G. G., JENSEN, V. J., PETERSEN, S. B., SWIFT, H., THIM, L. & WOLDIKE, H. F. 1990. Calcium binding in α -amylases: an X-ray diffraction study at 2.1 Å resolution of two enzymes from *Aspergillus*. *Biochemistry* **29**: 6244–6249.
- BRAYER, G. D., LUO, Y. & WITHERS, S. G. 1995. The structure of human pancreatic α -amylase at 1.8 Å resolution and comparisons with related enzymes. *Protein Sci.* **4**: 1730–1742.
- BRÜNGER, A. T., ADAMS, P. D., CLORE, G. M., DELANO, W. L., GROS, P., GROSSE-KUNSTLEVE, R. W., JIANG, J. S., KUSZEWSKI, J., NILGES, M., PANNU, N. S., READ, R. J., RICE, L. M., SIMONSON, T. & WARREN, G. L. 1998. Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr. D* **54**: 905–921.

- BUSH, D. S., STICHER, L., VAN HUYSTEE, R., WAGNER, D. & JONES, R. L. 1989. The calcium requirement for stability and enzymatic activity of two isoforms of barley aleurone α -amylase. *J. Biol. Chem.* **264**: 19392–19398.
- CCP4 COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT, NUMBER 4. 1994. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. D* **50**: 760–763.
- DAUTER, Z., DAUTER, M., BRZOWSKI, A. M., CHRISTENSEN, S., BORCHERT, T. V., BEIER, L., WILSON, K. S. & DAVIES, G. J. 1999. X-ray structure of Novamyl, the five-domain "maltogenic" α -amylase from *Bacillus stearothermophilus*: maltose and acarbose complexes at 1.7 Å resolution. *Biochemistry* **38**: 8385–8392.
- DAVIES, G. J., WILSON, K. S. & HENRISSAT, B. 1997. Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* **321**: 557–559.
- GIBSON, R. M. & SVENSSON, B. 1987. Identification of tryptophanyl residues involved in binding of carbohydrate ligands to barley α -amylase 2. *Carlsberg Res. Commun.* **52**: 373–379.
- GOUET, P., COURCELLE, E., STUART, D. I. & METOZ, F. 1999. ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* **15**: 305–308.
- JACOBSEN, J. V. & HIGGINS, T. J. V. 1982. Characterization of the α -amylases synthesized by aleurone layers of Himalaya barley in response to gibberellic-acid. *Plant Physiol.* **70**: 1647–1653.
- JONES, R. L. & JACOBSEN, J. V. 1991. Regulation of synthesis and transport of secreted proteins in cereal aleurone. *Int. Rev. Cytol.* **126**: 49–88.
- KADZIOLA, A., ABE, J., SVENSSON, B. & HASER, R. 1994. Crystal and molecular structure of barley α -amylase. *J. Mol. Biol.* **239**: 104–121.
- KADZIOLA, A., SØGAARD, M., SVENSSON, B. & HASER, R. 1998. Molecular structure of a barley α -amylase-inhibitor complex: implications for starch binding and catalysis. *J. Mol. Biol.* **278**: 205–217.
- LEAH, R. & MUNDY, J. 1989. The bifunctional α -amylase/subtilisin inhibitor of barley: nucleotide sequence and patterns of seed specific expression. *Plant Mol. Biol.* **12**: 673–682.
- MACGREGOR, A. W. & BALLANCE, D. L. 1980. Hydrolysis of large and small starch granules from normal and waxy barley cultivars by α -amylases from barley malt. *Cereal Chem.* **57**: 397–402.
- MACGREGOR, A. W. & MORGAN, J. E. 1986. Hydrolysis of barley starch granules by α -amylases from barley malt. *Cereal Foods World* **31**: 688–693.
- MACHIUS, M., DECLERCK, N., HUBER, R. & WIEGAND, G. 1998. Activation of *Bacillus licheniformis* α -amylase through a disorder \rightarrow order transition of the substrate-binding site mediated by a calcium-sodium-calcium metal triad. *Structure* **6**: 281–292.
- MATSUURA, Y., KUSUNOKI, M., HARADA, W. & KAKUDO, M. 1984. Structure and possible catalytic residues of Taka-amylase A. *J Biochem (Tokyo)* **95**: 697–702.
- MUNDY, J., SVENDSEN, I. & HEJGAARD, J. 1983. Barley α -amylase/subtilisin inhibitor. Isolation and characterization. *Carlsberg Res. Commun.* **48**: 81–90.
- NAVAZA, J. 2001. Implementation of molecular replacement in AMoRe. *Acta Crystallogr. D* **57**: 1367–1372.
- NICHOLLS, A., SHARP, K. A. & HONIG, B. 1991. Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins* **11**: 281–296.
- QIAN, M., HASER, R. & PAYAN, F. 1993. Structure and molecular model refinement of pig pancreatic α -amylase at 2.1 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **231**: 785–799.

- RAMASUBBU, N., PALOTH, V., LUO, Y. G., BRAYER, G. D. & LEVINE, M. J. 1996. Structure of human salivary α -amylase at 1.6 angstrom resolution: Implications for its role in the oral cavity. *Acta Crystallogr. D* **52**: 435–446.
- ROBERT, X., GOTTSCHALK, T.E., HASER, R., SVENSSON, B. & AGHAJARI, N. 2002. Expression, purification and preliminary crystallographic studies of α -amylase isozyme 1 from barley seeds. *Acta Crystallogr. D* **58**: 683–686.
- RODENBURG, K. W., JUGE, N., GUO, X. J., SØGAARD, M., CHAIX, J. C. & SVENSSON, B. 1994. Domain B protruding at the third β strand of the α/β barrel in barley α -amylase confers distinct isozyme-specific properties. *Eur J Biochem* **221**: 277–284.
- RODENBURG, K. W., VALLÉE, F., JUGE, N., AGHAJARI, N., GUO, X., HASER, R. & SVENSSON, B. 2000. Specific inhibition of barley α -amylase 2 by barley α -amylase/subtilisin inhibitor depends on charge interactions and can be conferred to isozyme 1 by mutation. *Eur. J. Biochem.* **267**: 1019–1029.
- ROGERS, J. C. 1985a. Two barley α -amylase gene families are regulated differently in aleurone cells. *J. Biol. Chem.* **260**: 3731–3738.
- ROGERS, J. C. 1985b. Conserved amino acid sequence domains in α -amylases from plants, mammals, and bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **128**: 470–476.
- ROGERS, J. C. & MILLIMAN, C. 1983. Isolation and sequence analysis of a barley α -amylase cDNA clone. *J. Biol. Chem.* **258**: 8169–8174.
- ROUSSEL, A. & CABBILLAU, C. 1989. TURBO-FRODO, pp. 77-78. In: *Silicon Graphics Geometry Partners Directory* (eds) Silicon Graphics, Silicon Graphics Mountain View, CA.
- SIDENIUS, U., OLSEN, K., SVENSSON, B. & CHRISTENSEN, U. 1995. Stopped-flow kinetic studies of the reaction of barley α -amylase/subtilisin inhibitor and the high pI barley α -amylase. *FEBS Lett.* **361**: 250–254.
- SØGAARD, M., ANDERSEN, J. S., ROEPSTORFF, P. & SVENSSON, B. 1993a. Electrospray mass spectrometry characterization of post-translational modifications of barley α -amylase 1 produced in yeast. *Bio/technology* **11**: 1162–1165.
- SØGAARD, M., KADZIOLA, A., HASER, R. & SVENSSON, B. 1993b. Site-directed mutagenesis of histidine 93, aspartic acid 180, glutamic acid 205, histidine 290, and aspartic acid 291 at the active site and tryptophan 279 at the raw starch binding site in barley α -amylase 1. *J. Biol. Chem.* **268**: 22480–22484.
- SØGAARD, M. & SVENSSON, B. 1990. Expression of cDNAs encoding barley α -amylase 1 and 2 in yeast and characterization of the secreted proteins. *Gene* **94**: 173–179.
- STROBL, S., GOMIS-RÜTH, F. X., MASKOS, K., FRANCK, G., HUBER, R. & GLOCKSHUBER, R. 1997. The α -amylase from the yellow meal worm: complete primary structure, crystallization and preliminary X-ray analysis. *FEBS Lett.* **409**: 109–114.
- SVENDSEN, I., HEJGAARD, J. & MUNDY, J. 1986. Complete amino acid sequence of the α -amylase/subtilisin inhibitor from barley. *Carlsberg Res. Commun.* **51**: 43–50.
- THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G. & GIBSON, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673–4680.
- VALLÉE, F., KADZIOLA, A., BOURNE, Y., JUY, M., RODENBURG, K. W., SVENSSON, B. & HASER, R. 1998. Barley α -amylase bound to its endogenous protein inhibitor BASI: crystal structure of the complex at 1.9 Å resolution. *Structure* **6**: 649–659.
- WESELAKE, R. J. & HILL, R. D. 1983. Inhibition of α -amylase-catalyzed starch granule hydrolysis by cycloheptaamylose. *Cereal Chem.* **60**: 98–101.

Calcium ions	Ligands in AMY1	Distances in AMY1 (Å)	Ligands in AMY2	Distances in AMY2 (Å)
Ca 500	Asn92 Oδ1	2.37	Asn91 Oδ1	2.1
	Asp139 Oδ1	2.49	Asp138 Oδ1	2.3
	Asp139 Oδ2	2.37	Asp138 Oδ2	2.7
	Ala142 O	2.34	Ala141 O	2.1
	Asp149 Oδ2	2.35	Asp148 Oδ2	2.6
	Gly184 O	2.31	Gly183 O	2.1
	Wat630	2.41	Wat630	2.1
Ca 501	Glu109 Oε1	2.88	Glu108 Oε1	2.9
	Glu109 Oε2	2.41	Glu108 Oε2	2.6
	Thr112 O	2.46	Thr111 O	2.4
	Asp114 O	2.42	Asp113 O	2.2
	Asp118 Oδ1	2.61	Asp117 Oδ1	2.6
	Asp118 Oδ2	2.35	Asp117 Oδ2	2.4
	Wat604	2.38	Wat604	2.2
Wat656	2.30	Wat656	2.1	
Ca 502	Asp128 Oδ1	3.58	Asp127 Oδ1	2.6
	Asp128 Oδ2	2.36	Asp127 Oδ2	2.4
	Asp143 Oδ1	2.42	Asp142 Oδ1	2.8
	Asp143 Oδ2	3.32	Asp142 Oδ2	3.4
	Phe144 O	2.32	Phe143 O	2.2
	Ala147 O	2.34	Ala146 O	2.2
	Asp149 Oδ1	2.34	Asp148 Oδ1	2.5
	Wat788	2.30	(*)	(*)

Table 1: Calcium ion binding sites in AMY1 and AMY2. (*) An electron density which could correspond to a water molecule with low occupancy was reported (KADZIOLA et al., 1994).

Residues of AMY2 involved in the active site	Corresponding residues on AMY1
Tyr51 O	Tyr52 O
His92 Nε1	His93 Nε1
Arg177 Nη1	Arg178 Nη1
Asp179 Oδ2	Asp180 Oδ2
<u>Lys182 Nζ</u>	<u>Arg183</u>
Glu204 Oε2	Glu205 Oε2
Glu204 Oε1	Glu205 Oε1
Trp206 O	Trp207 O
<u>Ser208 N</u>	<u>Asn209</u>
<u>Ser208 Oy</u>	<u>Asn209</u>
His288 Nε2	His290 Nε2
Asp289 Oδ1	Asp291 Oδ1
Asp289 Oδ2	Asp291 Oδ2

Table 2: Active site residues in AMY2 and its corresponding residues in AMY1. The trio of catalytic residues is presented in bold. Non conserved residues between AMY1 and AMY2 are underlined.

Direct hydrogen bonds between AMY2 and BASI residues		Corresponding residues in AMY1
AMY2 residues	BASI residues	
Arg128 Nε	Ser77 Oγ	Thr129
Asp142	Tyr131 O	Asp143
Asp142 O	Lys140 Nζ	Asp143
Asp142 Oδ2	Lys140 Nζ	Asp143
Gly144 N	Asp150 Oδ1	Ala145 N
Lys182 Nζ	Glu168 Oε1	Arg183 Nη1
Tyr211 N	Ala28 O	Thr212 N
Gly215 O	Trp162 Nε1	Gly216 O
Gln223 Oε1	Asn26 Nδ2	Ala224
His295 O	Arg106 Nε	Ala297 O
His295 O	Arg106 Nη1	Ala297 O

Table 3: Residues involved in direct hydrogen bonds in the AMY2/BASI complex and homologues in AMY1. Non conserved residues between AMY1 and AMY2 are presented in bold.

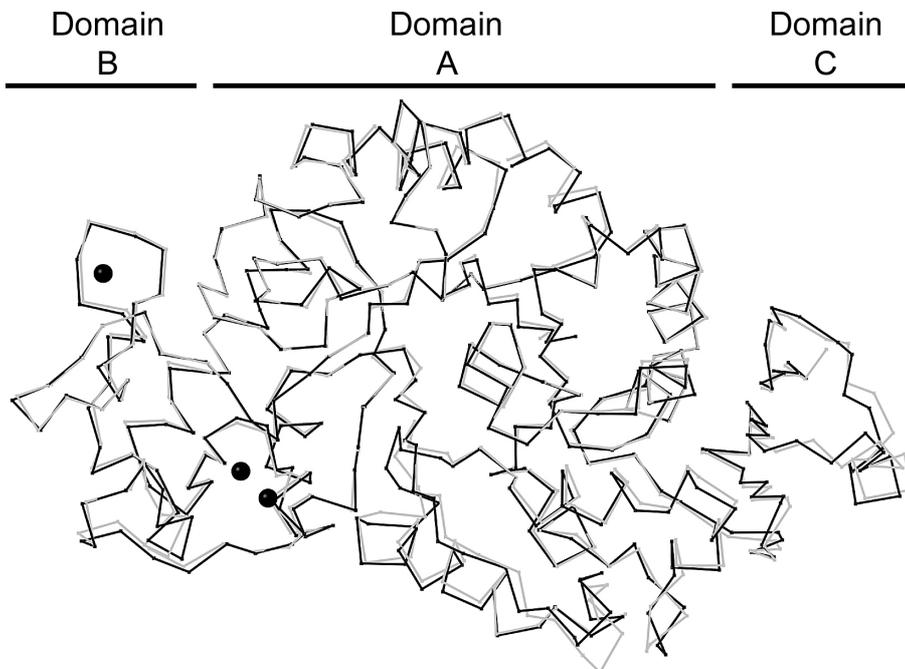


Figure 1: Superimposition of AMY1 on AMY2. AMY1 and AMY2 in ribbon presentations are shown in black and grey, respectively. The three calcium ions (presented by black spheres) are perfectly superimposable in the two structures.

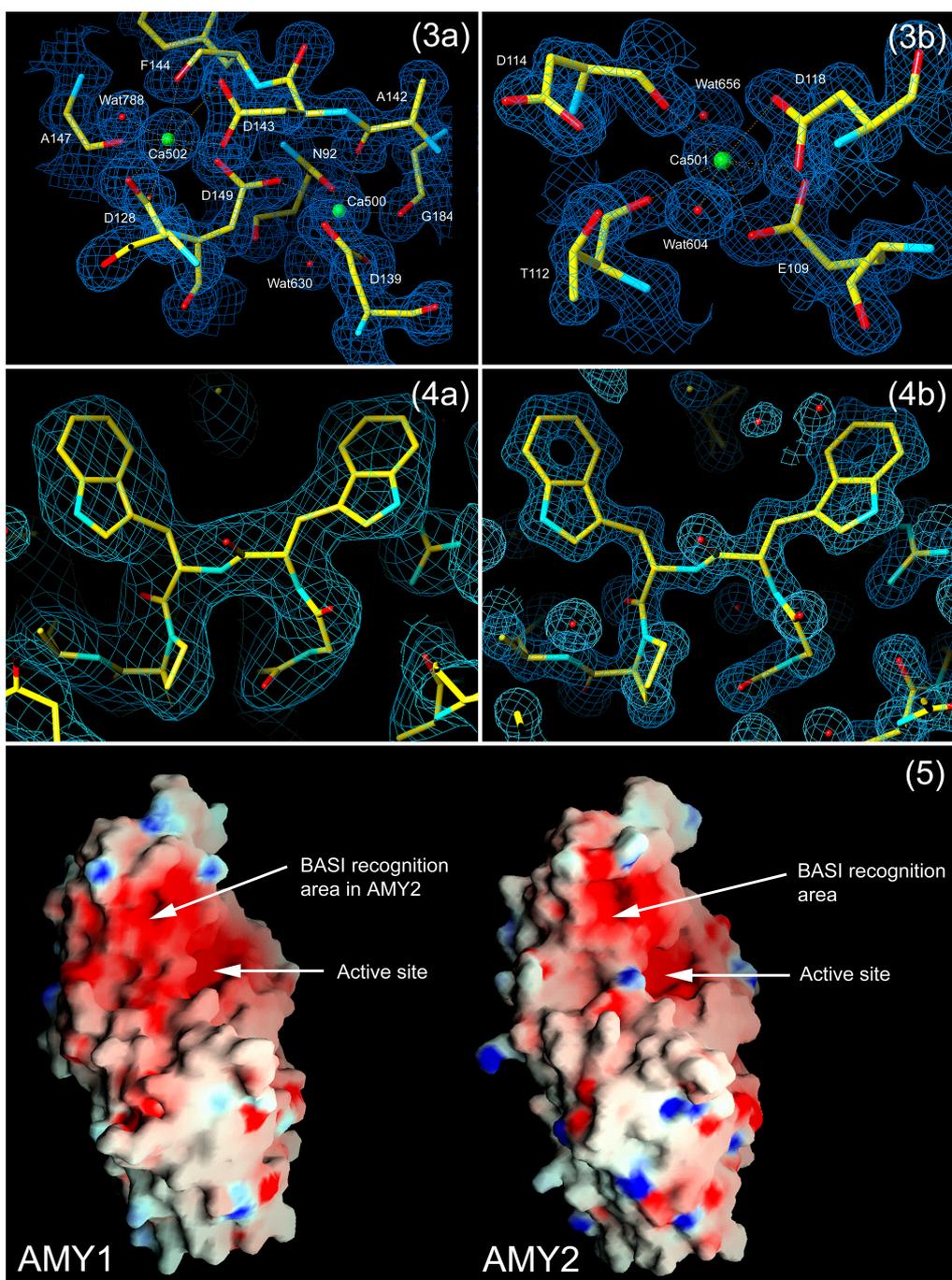


Figure 3: Calcium binding sites in AMY1. Ca^{2+} ligand interactions are indicated as dot-and-dash lines. (3a) is an overall view of the Ca500 & Ca502 binding sites for which Asp149 is ligand in both cases. (3b) is a view of the Ca501 binding site.

Figure 4: Close up on the starch granule binding surface site in AMY2 (4a) and AMY1 (4b) showing the two adjacent tryptophan residues. The electron density $2F_o - F_c$ map contoured at 1σ is shown in both cases for which the resolutions are 2.8 Å and 1.5 Å, respectively.

Figure 5: Overall view of AMY1 and AMY2 surfaces coloured as a function of charges where positive and negative charges are presented in blue and red, respectively. The active site and the BASI recognition area of AMY2 and its corresponding area in AMY1, is highlighted in this figure where domain B presents the upper part of the molecule, and domain C, the lower part. Representations for AMY1 as well as AMY2 are generated on the same scale with the program GRASP (NICHOLLS et al., 1991).

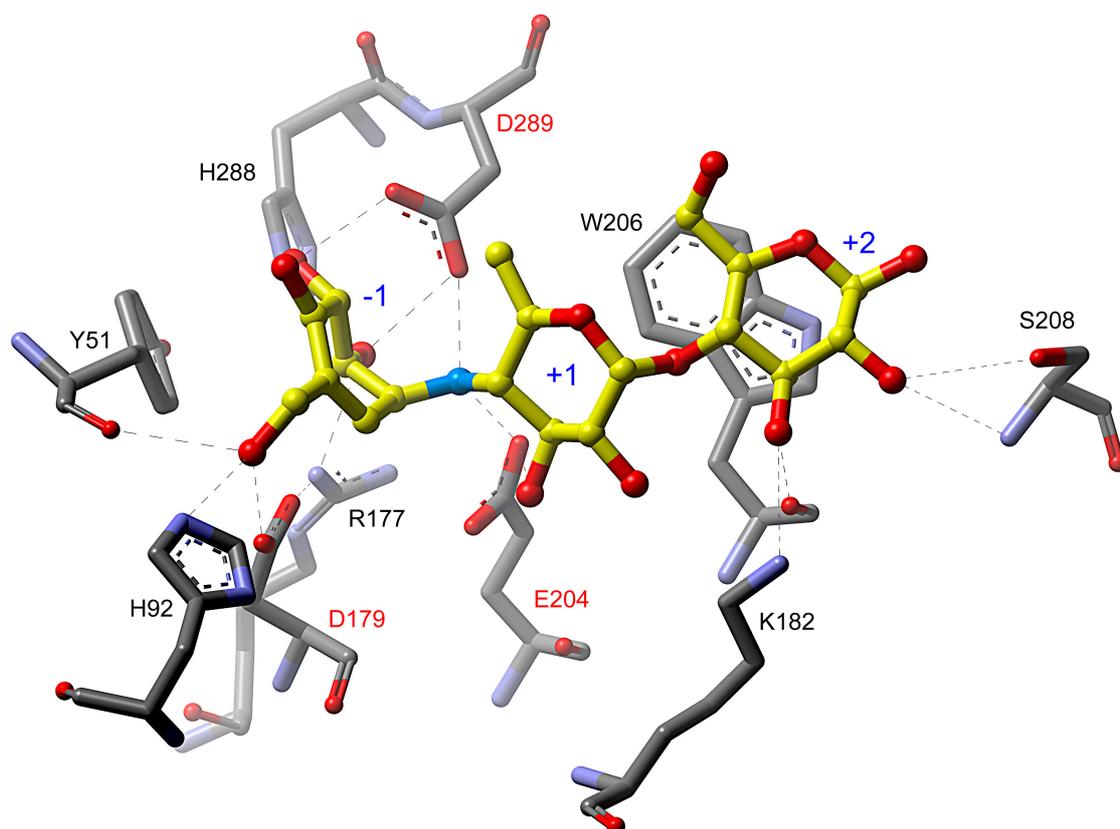


Figure 6: Close-up of the active site of AMY2 in complex with the acarbose inhibitor (KADZIOLA et al., 1998) showing catalytic residues (labeled in red) along with the remaining substrate-binding residues. Direct hydrogen bond interactions are shown by dot-and-dash lines. The three sugar rings of acarbose seen in the structure (coloured in yellow) are located in subsites -1, +1 and +2.

Chapitre 3

**La structure de AMY1
en complexe avec un analogue
de substrat révèle un second
site de surface et donne une
fonction au domaine C**

A/ Article n°3 :

**The structure of barley α -amylase isozyme 1 reveals a novel
role of domain C in substrate recognition and binding:
“a pair of sugar tongs”**

**Xavier ROBERT¹, Richard HASER^{1,4}, Tine E. GOTTSCHALK², Hugues DRIGUEZ³,
Birte SVENSSON² & Nushin AGHAJARI¹**

¹ *Laboratoire de BioCristallographie, Institut de Biologie et Chimie des Protéines,
UMR 5086-CNRS/UCBL, 7 Passage du Vercors, F-69367 Lyon cedex 07, France
tel.: ++33 4 72 72 26 08, fax: ++33 4 72 72 26 16, e-mail: r.haser@ibcp.fr*

² *Department of Chemistry, Carlsberg Laboratory, Gamle Carlsberg Vej 10, DK-2500
Copenhagen Valby, Denmark.*

³ *Centre de Recherche sur les Macromolécules Végétales, CNRS (affiliated with
Université Joseph Fourier), BP 53, F-38041 Grenoble, France*

⁴ *Corresponding author*

Article à soumettre

Introduction

α -amylases (1,4- α -D-glucan glucanohydrolase; EC 3.2.1.1) are monomeric enzymes widely occurring in animals, plants, and micro-organisms. They catalyse the hydrolysis of internal α -D-(1,4)-glucosidic linkages in starch (amylose and amylopectin), glycogen, and related oligo- and polysaccharides into maltodextrins, malto-oligosaccharides, and glucose. In seeds, germination is triggered by an increase in temperature and humidity. The embryo generates the phytohormone gibberellic acid that induces de novo synthesis of α -amylase amongst other hydrolases [1]. Progressive release of sugars provides energy to the embryo for growth.

In germinating barley seeds, two different isozymes which are encoded by two multigene families can be distinguished. These are referred to as α -amylase 1 (AMY1) and α -amylase 2 (AMY2) [1]. The complete amino acid sequences are known and AMY1 contains 414 residues (MW = 45,342 Da) while AMY2 contains 403 amino acid residues (MW = 45,005 Da) [2, 3]. The two isozymes display 80% sequence identity, but show a very distant sequence relationship to α -amylases from micro-organisms and animals [4]. Indeed, alignment and comparison of α -amylases from different sources show only 9 identical residues [5]. Despite the high sequence identity, AMY1 and AMY2 are readily distinguishable in their biochemical and physico-chemical behaviour. AMY1 is known as the low pI (pI ~ 4.9) and AMY2 the high pI (pI ~ 5.9) isozyme [1], and significant differences are found in affinity for calcium ions [6-8], stability at acidic pH [8] and at elevated temperature [6], respectively. Moreover, large differences have been observed in their affinity and activity towards starch granules [9-11] and in affinity for soluble substrates [12-14], AMY1 having the highest affinity, but not the highest turn-over rate. Finally, a most remarkable difference between the two isozymes is the unique capacity of AMY2 in binding the endogenous bifunctional inhibitor BASI (barley α -amylase/subtilisin inhibitor) [15-19], which lacks in AMY1.

In the present work, the 1.5 Å resolution X-ray structure of AMY1 is reported and compared to that of AMY2 previously solved to 2.8 Å resolution [20]. We also report the three-dimensional structure at 2.0 Å resolution of AMY1 in complex with a substrate analogue, thio-maltotetraose, referred to as thio-DP4 (Figure 1). The latter structure is compared to the structure of AMY2 in complex with acarbose [21], a well known pseudo-tetrasaccharide acting as a transition-state analogue on α -amylases and several other α -glucoside hydrolases. The description of the AMY1 structure and the comparison to that of AMY2 focuses on selected facets, such as substrate binding. The structures contribute to explain physico-chemical differences between AMY1 and AMY2 as well as biochemical properties. AMY2 contains a separate surface binding area as indicated by UV difference spectroscopy, differential labelling, and site-directed mutagenesis [11, 22]. This site which constitutes two contiguous tryptophans, Trp278 and 279 (Trp276 and 277, AMY2 numbering) [22], has low-affinity for acarbose (K_d = 5 mM), and binds β -cyclodextrin in competition with starch granules [11]. The mutant Trp279Ala in AMY1 has ten and three-fold reduced affinity towards starch granules and β -cyclodextrin, respectively, as compared to wild type AMY1 [11]. Trp278 is invariant in cereal α -amylases, but it was not possible to obtain the Trp278Ala mutant [11]. This starch granule binding surface site seems unique to higher plant enzymes and has not been found in microbial or mammalian α -amylases [23, 24].

The 3D structures of AMY1 and AMY2 are very similar, but they behave differently in contact with substrate analogues. AMY1 thus most remarkably possesses a second surface site recognising malto-oligosaccharides, in addition to the starch granule surface binding site also observed in AMY2 [20]. The newly discovered surface site which has not been reported for other α -amylases, but AMY1, is possibly related to the different activity of AMY1 and AMY2 towards starch granules.

The new site is located on domain C, in the C-terminal part of the enzyme and highlights a putative role for the C-terminal domain. In order to further elucidate possible roles of domain C in α -amylases in general, thorough comparative studies of C domains from AMY1,

AMY2, and ten other α -amylase three-dimensional structures, was performed. Focus was put on the ability of the AMY1 domain C to bind starch related compounds, in order to investigate whether this property could be conferred to other α -amylases. The possible biological significance of this unique property provides a basis for studies on the role of this domain, using a rational protein engineering approach.

Results and Discussion

Overall structure

The overall shape of barley α -amylase 1 is an ellipsoid with dimensions around $68 \text{ \AA} \times 53 \text{ \AA} \times 36 \text{ \AA}$. This structure which is very similar to AMY2 [20] (r.m.s.d for main-chain atoms is 0.63 \AA) consists of 404 amino acid residues, with all side-chains clearly defined. A few loops slightly differ in spatial localization. Due to the high resolution data, sixteen residues display double conformations, namely: Gln2, Met22, Met53, Lys64, Ser73, Gln84, Ile107, Glu160, Asp171, Arg183, Met210, Val230, Lys235, Met298, Pro317, and Arg345. The crystal structure moreover confirms a correction to the sequence of AMY1 as deposited in the SWISS-PROT databank (access code P00693): Ala308 in AMY1_HORVU is in fact a valine (residue 284 in the mature AMY1 numbering) as found by peptide map electrospray mass-spectrometry and nucleotide sequencing [25, 26]. In the crystal structure of AMY1, a decapeptide is lacking in the C-terminal region (residues 405-414). Nine of these (406-414) were eliminated in the recombinant AMY1 Δ 9 form which was used for structure determination [27], to obtain a C-terminus matching that of AMY2. This truncation was motivated by the severe difficulties in crystallizing both natural [28] and recombinant full-length AMY1 [27], and indeed improved the crystal quality thus suggesting that the C-terminal segment in AMY1 is very flexible or highly disordered. The C-terminal Asn405 in the truncated AMY1 Δ 9 was not included in the structure due to the lack of clear 2Fo-Fc and Fo-Fc electron density, which is in agreement with a flexible and/or highly disordered C-terminal region. In the refined high resolution structure (1.5 \AA), nine molecules of ethylene-glycol (used as cryo-protectant) as well as a large number (809) of water molecules are present. The crystal structure of full-length AMY1 has been solved as well, but 1) the resolution being 2.5 \AA , 2) rather bad quality data probably due to the crystal morphology [27], and 3) the collection of the 1.5 \AA resolution data resulted in an “abandon” of refining this structure. It should be mentioned that the overall structure of full-length AMY1 is exactly the same as AMY1 Δ 9 with the exception of a few residues which are not defined in the electron density map of full-length AMY1. Henceforward, we only deal with the recombinant truncated form which will be referred to as AMY1.

As the majority of known α -amylase structures, AMY1 contains three domains, including a major central domain with a parallel $(\beta/\alpha)_8$ -barrel super-secondary structure (domain A). As in AMY2 [20], this domain differs from classical TIM-barrel eight-fold symmetry [29], by having three additional α -helices: A- α_{6a} , A- α_{7a} and A- α_{8a} , extending from β -strands A- β_6 , A- β_7 and A- β_8 , respectively (Figure 2). A 65 residues irregular loop (domain B) protrudes from the $(\beta/\alpha)_8$ -barrel between β_3 and α_3 , and forms an anti-parallel twisted β -sheet with the protruding domain A loop, A- $\beta_2\alpha_2$, which may be considered as an integral part of domain B. Despite the lower affinity of AMY2 for calcium ions [7], domain B in both structures binds three Ca^{2+} ions (labelled 500, 501 and 502) which have been proposed to be critical for folding and conformational stability, and hence for the enzyme activity [6, 7]. Finally, the C-terminal domain (domain C) constituted of 63 residues is organized as a five-stranded anti-parallel β -sheet. The connection between β -strands C- β_3 and C- β_4 is ensured by a long transverse loop protruding from the plane of β -sheets like in AMY2 [20]. This results in a topology with the β -strands C- β_1 , C- β_3 and C- β_4 being parallel and running anti-parallel to C- β_2 and C- β_5 . The overall 3D structure of the complex AMY1/thio-DP4 is highly similar to that of the free enzyme.

Analysis of the catalytic sites reveals a fourth Ca²⁺ ion in AMY1/thio-DP4

The main and side-chains of the three catalytic residues in AMY1, Asp180, Glu205 and Asp291 are perfectly superimposable with their counterparts in AMY2. Analysis of the active site was focused on residues corresponding to the ones involved in the binding of acarbose in AMY2 [21] which include: Tyr51, His92, Arg177, Asp179 (catalytic), Lys182, Glu204 (catalytic), Trp206, Ser208, His288 and Asp289 (catalytic). All of these residues are conserved in AMY1 with the exception of Lys182_{AMY2} and Ser208_{AMY2}, which are replaced by Arg183_{AMY1} and Asn209_{AMY1}, respectively. The side-chains of Arg183_{AMY1} and Asn209_{AMY1} are oriented in the same direction, while the side chains of Lys182_{AMY2} and Ser208_{AMY2} are oppositely oriented. A total of 15 hydrogen bond contacts was made to the inhibitor in the active site of AMY2/acarbose, whereas only water molecules are present in the catalytic site in native AMY1. Examination of the electron density in the AMY1/thio-DP4 complex, surprisingly revealed a calcium ion (Ca503) located exactly at the same place as the fully hydrated interface Ca²⁺ described for AMY2/BASI [30] and no trace of the thio-DP4 sugar as one could expect. The Ca²⁺ in AMY1/thio-DP4 was confirmed by an anomalous difference Patterson which clearly showed peaks for Ca500, Ca501 and Ca502 providing a good internal reference. One remarkable difference between this calcium ion and the one found in the AMY2/BASI complex is the spatial organization of the surrounding water molecules. In AMY1/thio-DP4, five water molecules and the calcium ion (Ca 503) are in the same plane, the water molecules being organized as a regular pentagon with the calcium approximately located at the barycentre (Figure 3). The sixth water molecule is located “above” Ca 503, the ensemble defining a pyramid with a pentagonal base. This difference in the organization of water molecules can probably be explained by the absence of BASI, thus forcing the water molecules to adopt another arrangement in order to fill the space around Ca 503 and maximize contact with the neighbouring amino acid side chains. Surprisingly, when looking at the native AMY1 structure, no electron density corresponding to a Ca²⁺ was identified and the water molecules were organized in a very different way compared to the AMY1/thio-DP4 complex. At present, Ca503 in this complex cannot be explained by a local structural re-arrangement compared to the native AMY1 structure, nor by a difference in crystallisation conditions. Indeed it is noteworthy that the AMY1 stock solution contains 100 mM of CaCl₂ leading to a concentration of 40 mM in the drop which was superior to the CaCl₂ concentration in the thio-DP4 soaking experiment.

Native AMY1 and AMY1/thio-DP4 have three Ca²⁺ in common with AMY2, all bound to domain B. Overlay of the isozyme structures shows that the only difference between these Ca²⁺ binding sites is the presence of an additional water molecule (Wat788) as a ligand for Ca502 in AMY1. This may, however, very well be explained by the lower resolution at which AMY2 has been established, since a water molecule with low occupancy was reported but not included in the 3D structure of AMY2 [20].

In AMY2/acarbose [21], a chain of five water molecules running from the active site towards the interior of the protein was observed. Wat607 which bridges the carboxylate groups of two catalytic residues, Glu204 and Asp289, has been proposed as a good candidate for participating in the enzymatic process as a so-called “catalytic” water molecule [21, 31]. In AMY2 these five water molecules, define a water-filled pocket adjacent to the active site [32], which is present in the acarbose [21] and the barley α -amylase/subtilisin inhibitor (BASI) [30] complexes with AMY2. A similar pocket was observed in *Ps. haloplanctis* α -amylase [31]. The water-filled pocket in the AMY1 structure contains Wat603, Wat605, Wat625, Wat755, Wat626 and Wat607, and includes an additional water molecule (Wat 755) located between Wat625 and Wat626, compared to AMY2.

The starch granule-binding surface site

In the structure of AMY1/thio-DP4, two rings of the thio-DP4 oligo-saccharide are stacking to a pair of consecutive tryptophans, Trp278 and Trp279 (Figure 4), also known as the starch granule binding surface site [11, 20]. Substitution of the inter-glycosidic oxygen atoms by

sulphur atoms in thio-DP4 renders this sugar non-cleavable by α -amylases. The electron density corresponding to only two rings at this site is therefore explained by a highly disordered arrangement of the two remaining sugar rings. Indeed, this surface site is highly exposed to the solvent and no symmetry related molecule is present to stabilize the bound thio-DP4 molecule. However, there is no doubt about the position of the inter-glycosidic sulphur atom. The two observed rings of thio-DP4 perform hydrophobic stacking to the indole rings of Trp278 and Trp279, as well as six hydrogen bonds to neighbouring residues (Gln227, Asp234 and Trp278 in AMY1 numbering). In the structure of AMY2/acarbose [21], a disaccharide is stacking to these tryptophans (Trp276 and Trp277, AMY2) as well, and makes 5 hydrogen bond interactions. The differences of electron density qualities for these two ligand molecules may be explained by the varying geometries of substrate analogues and real substrates, and in particular the angle formed by the glycosidic bond between two successive sugar rings. The angle defined by C1 of ring A of acarviosine (see Figure 1), the interglycosidic nitrogen atom between units A and B, and C4 of ring B is 125° . The corresponding angle in thio-DP4 bound at the starch granule binding surface site in AMY1 is close to 100° due to the interglycosidic sulphur.

When considering Trp278 and Trp279, each aromatic side-chain defines a plane, with an angle of around 135° between these planes, which is remarkably constant between AMY1 and AMY2 in the native and complexed forms, respectively. The angle between the two sugar moieties in AMY2/acarbose therefore seems better adapted to this kind of interaction than thio-DP4 for which an angle of 100° is too small to allow proper accommodation. Thus, the closer the planes determined by the Trp aromatic group and the plane of the sugar ring (in chair form) are to being ideally parallel, the stronger the forces in the hydrophobic stacking. It seems that the ideal angle of the glycosidic bond is between 120° and 135° .

We conclude that this surface binding site possesses a substrate selection ability, which seems to be governed by the surrounding environment of this site and by the locked conformation of the tryptophans acting as a “geometric filter” favouring the binding of spatially complementary molecules. This is in accordance with the experimental evidence that this surface site binds β -cyclodextrin, containing 7 glucose units [22, 33]. It is thus proposed that this site serves as a “geometric filter” and interacts with starch granules containing areas with a characteristic compact structure and periodic packing. This may also be a reason for which no trace of the thio-DP4 is observed in the catalytic site. A distinct physiological role of this surface site in AMY1 and AMY2, however, remains to be identified.

AMY1-specific surface binding site in domain C: the “sugar tongs”

Electron density corresponding to an entire molecule of thio-DP4 was observed in the vicinity of Tyr380 (domain C) in AMY1/thio-DP4. In contrast to the surface binding site described above, the electron density at this second surface site was very well defined and continuous, leaving no doubt about the orientation of this tetrasaccharide or the nature of its atoms. The glucose unit at the non-reducing end extends into the solvent and has no direct contact with the protein. This explains the relatively high B-factors observed for this ring (57.9 \AA^2) compared to the three other rings (32 \AA^2 , 14.4 \AA^2 and 24.6 \AA^2) which are stabilized through interactions with protein side chains. Figure 5 shows a schematic representation of the interactions between thio-DP4 and AMY1 in which nine direct hydrogen bonds are found between sugar rings and AMY1 residues: Lys375, Tyr380, Asp381, Val382, His395 and Asp398. Val382 and Asp398 interact with oxygen atoms of the thio-DP4 *via* their peptide nitrogen. Moreover the peptide bond carbonyl oxygen in Tyr380 makes two direct hydrogen bonds to two hydroxyl groups from the sugar (see Figure 5). The remaining hydrogen bond interactions involve side chain atoms. In addition to these interactions, several hydrophobic contacts to Thr392, Tyr399 and Trp402 are observed. Most interestingly, Tyr380 *via* four carbon atoms of its hydrophobic ring, forms five hydrophobic contacts (Figure 5) involving the two sulphur atoms of the tri-saccharide unit at the reducing end.

Remarkably, these amino acid residues which are implicated both in hydrogen bonds and hydrophobic contacts exist in AMY2 with the exception of those implicating Thr392_{AMY1} which is a valine in AMY2. This substitution, however, can not explain why only AMY1 binds malto-oligosaccharides in domain C. Tyr380 clearly has a key role in this binding, since from a total of

17 contacts, this residue makes 8 to the thio-DP4, of which five are hydrophobic contacts and three hydrogen bonds. A particular role of Tyr380_{AMY1} is emphasized by the superimposition of native AMY1 on AMY1/thio-DP4 showing a movement of Tyr380 in the complex, when fixing the sugar (Figure 6). Indeed, the comparison of the two structures shows that the C_α of Tyr380_{AMY1} and the hydroxyl oxygen from its side chain shift 1.2 and 3.1 Å respectively. The small loop composed of residues located around Tyr380 is flexible in AMY1, whereas it seems more restrained in AMY2 with Pro376 (Ser378 in AMY1) only two positions from Tyr378. The residue at this position (Ser378_{AMY1}/Pro376_{AMY2}) is thus proposed to be the major determinant of an isozyme-specific difference in flexibility of this loop, which controls malto-oligosaccharide binding to domain C.

Clear differences can be observed in domain C between the two isozymes. One of the most remarkable is a large negative surface area in AMY1 close to Tyr380, which stems from Asp381. In AMY2 the side chain of the corresponding residue, Asp379_{AMY2}, is orientated in the opposite direction of Tyr378_{AMY2} while in AMY1, the orientation is the same as that of Tyr380_{AMY1}. Subtle differences in the backbone conformation and particularly in the peptide bond seem to cause these differences in orientation, not the interactions with neighbouring residues. It is important to notice that in AMY1/thio-DP4 this acidic residue is hydrogen bonded to thio-DP4. Remarkably, in both isozymes, two charged groups in the vicinity of Tyr380 are found, namely Lys375_{AMY1}/Lys373_{AMY2} and Asp398_{AMY1}/Asp396_{AMY2}. As previously mentioned, these residues are involved in the binding of thio-DP4 in complex with AMY1.

Structural comparison of C domains from AMY1, AMY2 and 11 α -amylases from different species

To further analyse the implication of domain C in malto-oligosaccharide binding, the structure of the AMY1 C domain was compared to those of AMY2 and 11 other α -amylases from different species. Among these, Tyr380_{AMY1} is only conserved in AMY2 (Tyr378) (Figure 7), and is a tryptophan in mammalian α -amylases. Domain C which in α -amylase structures solved to date is mostly composed by anti-parallel β -strands is smallest in AMY1 and AMY2 amongst the set of compared structures. AMY1 and AMY2, contain five β -strands, whereas α -amylases from *B. licheniformis* and *B. stearothermophilus* have 7, those from *A. niger*, *A. oryzae*, *Ps. haloplanctis* and *B. subtilis* have 8, and mammalian and insect α -amylases 10 β -strands (Figure 7). The fact that the barley isozymes have the simplest C domain in terms of structural organization seems to be one of the major determinants of the ability of domain C in AMY1 to bind sugar molecules.

Between AMY1 and AMY2, β 1 to β 5 are perfectly superimposable. When comparing their topology to those of the structures included in the alignment (Figure 7), the β -strands corresponding to β 1 (the first structural element of domain C) in AMY1 are perfectly conserved and superimposes for all α -amylase structures. α -Amylases from *B. licheniformis* and *B. stearothermophilus*, however, display very different spatial organization despite their apparent secondary structure conservation in the alignment. Thus, although these two proteins superimpose very well with each other, with the exception of β 1 (described above and shown in red in Figure 7), it is impossible to superimpose the succeeding secondary structure elements with the 10 other α -amylases, as indicated by the β -strands highlighted in black (Figure 7). For these 10 remaining structures, β 2 (in light green) and β 3 (in dark blue) superimpose very well (Figure 7). In AMY1 and AMY2, β 1 and β 2 are connected by a turn, which also is present in some of the other structures, though most have a longer loop. Between β 2 and β 3 in all α -amylases, a less structured region constituting a short flexible loop is found. Immediately following Tyr380_{AMY1} (Tyr378_{AMY2}), both isozymes have a short α -helix, η 1, which in the remaining 8 enzymes is replaced by a β -strand (in yellow). Despite this structural dissimilarity, the backbone of the α -amylases overall superimposes very well in this region, which is considered as the “top” of the C domain oriented towards the exterior, and opposite the central (β/α)₈ barrel. The “base” of domain C that flanks the (β/α)₈ barrel, forms an anti-parallel β -sheet constituted of β 1, β 2, β 3, β 5 and a part of β 4 in AMY1 and AMY2 and equivalent β -strands in other α -amylases. β 4 of AMY1 and AMY2 is not perfectly superimposed with β -strands in the

other enzymes, but the first part can be superimposed with β -strands from species shown in pink and its C-terminal part with β -strands shown in purple (Figure 7). Finally, β 5 (in grey) is impressively well conserved as the terminal β -strand in the 10 α -amylases, *B. licheniformis* and *B. stearothermophilus* still being excepted. In the barley isozymes, β 4 and β 5 are connected by a turn.

Careful examination of the topologies shows that the 8 α -amylases comparable with AMY1 and AMY2 contain two or three additional β -strands inserted between β 4 and β 5. These eight enzymes all have two rather nicely superimposed β -strands (purple and dark green, Figure 7), and this motif is thus representative for the category of α -amylases with 8 β -strands in domain C. α -Amylases from human saliva, human and porcine pancreas and *T. molitor* in addition display two small β -strands (light blue, Figure 7) which are inter-connected by a turn and define an antiparallel β -sheet inserted between the β -strands depicted in pink and purple (Figure 7).

This comparative study suggests structural features that enable binding of malto-oligosaccharides to domain C in AMY1. In AMY1, this “pair of sugar tongs” with Tyr380 situated at the top, is located between β 3 and β 4, just preceding the small helix η 1 in a region displaying no particular secondary structure. The tyrosine undergoes a significant positional shift in order to bind the malto-oligosaccharide (Figure 6). The basis of the “pair of sugar tongs” is constituted by the part of the C domain that comprises the motif β 4/turn/ β 5 (antiparallel β -sheet). The loop containing Tyr380 is perpendicular to this antiparallel β -sheet and together they define a small cavity where sugars can bind and wind around Tyr380 (Figure 6). An important thing to notice is that residues in the turn located between α -helix η 1 and β 4 form a barrier which forces the malto-oligo saccharide to adopt this curvature.

In conclusion, the presence of Tyr380 in a flexible region seems to be mandatory, but not sufficient for creating a sugar binding site in the C domain in AMY1, which also requires a flexible loop region (here Ser378-Pro387, and an antiparallel β -sheet (β 4 and β 5). It appears that β 4 is very specific to AMY1 and AMY2 by being absent in α -amylases from other species but it can also be structurally aligned with two distinct β -strands in some other α -amylases (pink and purple, Figure 7). The present structural alignment of domain C shows that the β -strand, presented in dark green in Figure 7, is inserted in α -amylases different from AMY1 and AMY2, preceding the terminal β -strand (β 5 in AMY1, presented in grey, Figure 7) found in all species. This inserted strand preventing the formation of a binding site equivalent to the “pair of sugar tongs” in AMY1 (see Figures 8a and 8b). Indeed, this β -strand and to a minor extent the preceding one depicted in purple (Figure 7) short cut the C domain binding site in AMY1 and thus leaves no room for sugars to bind by sterically hindering access to the “sugar tongs”. So far AMY1 appears to be a unique example amongst α -amylases by its capacity of binding malto-oligodextrines and most likely polysaccharide substrates in domain C. Though domain C of AMY2 is highly similar, this binding site does not exist in AMY2. We believe that in AMY2 Pro376_{AMY2} (Ser378_{AMY1}) impedes the loop mobility, necessary for accommodation of the sugar and mutational analysis of structural requirements for sugar binding in the Tyr380 region has been initiated. The structure of AMY1 thus unveils a possible biological role of domain C, characteristic for the AMY1 type of plant α -amylases which also possess the higher affinity for starch granules.

Biological implications

Despite 80% sequence identity, the two isozymes AMY1 and AMY2 show major differences in enzymatic and biophysical behaviour as e.g. an enhanced activity of AMY1 on starch granules. The three-dimensional structure of AMY1 solved to high resolution by X-ray crystallography in the native state as well as in complex with a thio-maltotetraose contributes to the understanding of the isozyme differences. The present study revealed the presence of an additional surface binding site in domain C of AMY1, and for the first time suggests a biological role for this domain in the α -amylase family in substrate binding.

This non-catalytic site may play a role in the disentanglement of the α -glucan chains, in agreement with the higher enzymatic activity of AMY1 on starch granules. Domain C may be involved in substrate recognition and binding, and we believe that this as well as the earlier identified surface site act as first as “geometric filter” and then as “guides” to orient the substrate for hydrolysis or for allowing proper spatial positioning of the enzyme to accept the compact starch substrate.

This newly identified substrate binding site in AMY1 is probably related to the increased activity on starch granules compared to AMY2.

Indeed, α -amylases from cereals are mainly involved in the production of beer, other beverages and in the baking industry. The design of modified enzymes and their production in transgenic plants may lead to enzymes with improved specificity, activity or synergy with enzyme partners in the agro-alimentary, bio-industrial and bio-technological domains.

An important perspective is to investigate whether this domain C surface binding site can be conferred to AMY2, and other plant α -amylases, to improve their catalytic power on very compact starch or related substrates.

The present studies suggest that only plant α -amylases, and more particularly the AMY1 isozyme, display this property. Concerning industrial and biotechnological applications, domain C of AMY1 is therefore a good candidate for producing chimeric enzymes. Combining the catalytic properties of e.g. psychrophilic α -amylases which hydrolyse polysaccharides at very low temperature and the AMY1 capacity of enhanced starch binding could result in a chimeric α -amylase with high efficiency on starch at low temperature.

Materials and methods

Crystallization, data collection and processing, structure refinement

Full-length AMY1 and AMY1 Δ 9 were produced by heterologous expression in *Pichia pastoris* [34] and crystallized as described earlier [27]. The AMY1 Δ 9/thio-DP4 complex was obtained by soaking a crystal in 20% polyethylene glycol 8000 containing 10 mM of thio-DP4 for 24 hours.

Data on full-length AMY1 and AMY1 Δ 9 were collected as described elsewhere (Robert *et al.*, in press), whereas data on AMY1 Δ 9/thio-DP4 structure were collected in-house on a MAR345 image-plate detector, using CuK α radiation generated from a Nonius rotating anode operated at 4.4 kW and coupled to Osmic mirrors. The crystal, cryo-protected as native AMY1 Δ 9 (Robert *et al.*, in press), was maintained at 100 K under a nitrogen stream during the entire data collection. Integration of the diffracted intensities was performed by the program DENZO [35] and scaling was carried out using the program SCALA from the CCP4 software suite [36]. Table 1 gives a summary of the data collection statistics.

The soaking experiment did not modify the space group, but compared to the native crystal, small variations (less than 1 Å) in the unit cell dimensions on the b and c axis were observed. Moreover, an important increase in the a axis of 5.07 Å occurred, due to slight modifications of the crystal structure caused by diffusion and binding of thio-DP4.

Native full length and AMY1 Δ 9 was solved by the molecular replacement method using the AMoRe software as implemented in the CCP4 suite [36] and described previously (Robert *et al.*, in press). As concerns AMY1 Δ 9/thio-DP4, the refined structure of native AMY1 Δ 9 at 1.5 Å resolution was used as a search model in AMoRe, and a unique solution obtained with a correlation coefficient of 75.5% and an R factor of 30.4%, withdrawing diffraction data in a resolution range of 15-4 Å. Model building and/or manual re-fitting of the amino acid residues, insertion of calcium ions, water, ligand and sugar molecules were performed with the TURBO-FRODO software program [37]. The refinement of the model was done using the simulated annealing protocol as implemented in the software package CNS version 1.0 [38], alternating with manual rebuilding. In order to avoid over-refinement the crystallographic R- and R_{free}

factor [39] were monitored. The later was calculated from a test set constituted by 10% (6406) of the reflections randomly selected from the native AMY1 Δ 9 data and 2744 reflections for the complex.

Water molecules were inserted manually if electron densities of at least 3σ in the difference Fo-Fc map and 1σ in the 2Fo-Fc map were located, and omitted if the B factor was superior of 60 \AA^2 after refinement. The mean B-factor for all solvent molecules is 26.5 \AA^2 (native AMY1 Δ 9) and 28.4 \AA^2 (AMY1 Δ 9/thio-DP4) and to remain consistent, water molecules present at positions similar to those in AMY2 structure have the same numbering. For amino acid residues displaying double conformations, the occupancy was refined. Unexplained electron densities in the 2Fo-Fc map contoured at 1σ as well as the Fo-Fc map contoured at 3σ , were examined and could be clearly described as ordered ethylene glycol molecules, a model of which was found in the HICUP database [40]. Electron density at the extremity of the Cys95 side chain in native AMY1 Δ 9 and AMY1 Δ 9/thio-DP4 could not be interpreted, but seems to correspond to a single atom. The distance between this density and S_{γ} of Cys95 is around 2.1 \AA , which is not compatible with a water molecule. This density which is remarkably strong and observed the Fo-Fc map up to 4σ , may be a consequence of radiation damage. Several cysteine modifications were searched for, but unsuccessfully. In the final structures deposited in the Protein Data Bank (AMY1 Δ 9 and AMY1 Δ 9/thio-DP4) this electron density was left empty.

The final R factor for the native structure was 13.6% with an R_{free} of 16.3% for all data within the 41.6-1.5 \AA resolution range. Table 1 gives a summary of the refinement statistics. The quality of both three dimensional structures, in terms of geometry and coordinate errors, have been examined with the program WHATCHECK [41].

The final R factor for the complex was 17.1% with an R_{free} of 21.8% for all data within the 46.6 – 2.0 \AA resolution range (Table 1).

Alignment and figure rendering

As concerns the comparative studies of C domains only experimental native structures have been considered. A search in the Protein Data Bank [42] resulted in the selection of 12 structures: barley α -amylase 1 - AMY1 reported in this study (PDB entry code 1HT6), barley α -amylase 2 – AMY2 (entry code 1AMY) [20], α -amylases from *Aspergillus niger* (2AAA) [43], *Aspergillus oryzae* – TAKA (6TAA) [44], human salivary (1SMD) [45], human pancreas (1HNY) [46], porcine pancreas – PPA (1PIF) [47], *Tenebrio molitor* (1JAE) [48], a psychrophilic α -amylase from *Pseudoalteromonas haloplanctis* (1AQH) [49], *Bacillus subtilis* (1BAG) [50], *Bacillus licheniformis* (1BLI) [51] and *Bacillus stearothermophilus* (1HVX) [52]. The sequences of these 12 α -amylases were derived from the PDB coordinate files and the parts corresponding to domain C were cut out and subsequently aligned using the program CLUSTALW [53]. Secondary structures as obtained from the atomic coordinate files, using the same algorithm for each sequence (DSSP) [54] to obtain comparable results are indicated. In addition to the primary/secondary structure alignment, a tertiary structure alignment was performed with the aim of superimposing all 12 enzymes. The sequence alignment is grouped according to the species so as to emphasize sequence similarities, and as a consequence of the choice of species, shows very weak overall sequence similarity. The sequence alignment including superimposition of secondary structure and domains of AMY1 and AMY2 was rendered using the program ESPript [55]. Comparative studies of the 12 α -amylase 3D structures were performed with TURBO-FRODO [37] which prior to this analysis were structurally aligned using the DiCE structural alignment program (available at the web site <http://www-cryst.bioc.cam.ac.uk/~robert/cpgs/COMPARER/comparer.html>). Drawings were generated with the programs TURBO-FRODO [37], GRASP [56], ViewerLite (from Accelrys Inc., San Diego), Molscript/Bobscript/Raster3D [57-59] and Ligplot [60].

Accession number

The coordinates and structure factors of the crystal structure of AMY1 have been deposited in the Protein Data Bank at Rutgers (PDB) under the entry code 1HT6, and coordinates and structure factors of AMY1/thio-DP4 can be accessed under the entry code XXXX (to be deposited).

Acknowledgements

Annette Gajhede is gratefully acknowledged for the preparations of AMY1 and AMY1 Δ 9. We also want to thank Morten Tovborg, Haruhide Mori and Kristian Sass Bak-Jensen for many stimulating discussions. Michel Roth and Jean-Luc Ferrer from the FIP BM30A beamline at the ESRF synchrotron (Grenoble, France) are acknowledged for their technical advices during data collection.

This work was supported by the European Union Framework IV programme “AGADE” (Alpha-Glucan Active Designer Enzymes) BIO4-980022. Support from CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique) and travel support from Institut Français, Copenhagen are also gratefully acknowledged.

Table 1: Data collection and refinement statistics for native AMY1Δ9 and AMY1Δ9 in complex with thio-DP4

	Native AMY1Δ9	AMY1Δ9/thio-DP4
Wavelength (Å)	0.9761	1.5418
Temperature (K)	100	100
Cell dimensions (Å)	a= 88.36 b= 72.82 c= 61.74	a= 93.4 b= 72.1 c= 60.9
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2	P2 ₁ 2 ₁ 2
Resolution range (Å)	41.6-1.5	46.6-2.0
Completeness of data (%)	98.7	96.7
Completeness of data in outermost shell (%)	97.3	96.7
Multiplicity of data in outermost shell (%)	3.5	3.0
Outermost shell (Å)	1.54-1.50	2.11-2.00
Total number of reflections	271695	83778
No. of unique reflections	63366	27556
Redundancy	4.3	3.0
R _{sym} (%)	4.5	12.4
R _{sym} in outermost shell (%)	11.9	47.6
Overall I/σ(I)	13.3	5.7
I/σ(I) in outermost shell	6.2	1.6
R _{factor} (%)	13.6	17.1
R _{free} (%)	16.3	21.8
Rms deviation from ideal geometry		
Bonds lengths (Å)	0.017	0.012
Bond angles (°)	1.70	1.34

$$* R_{sym} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I(hkl)_i - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I(hkl)}$$

$$** R = \frac{\sum_h ||F_{obs}(h) - k|F_{calc}(h)||}{\sum_h |F_{obs}(h)|}$$

with k, a scaling factor.

$$*** R_{free} = \frac{\sum_h ||F_{obs}(h) - k|F_{calc}(h)||}{\sum_h |F_{obs}(h)|}$$

with k, a scaling factor. Calculated from a test set constituted by 10% of the total number of reflections randomly selected.

Legends to figures

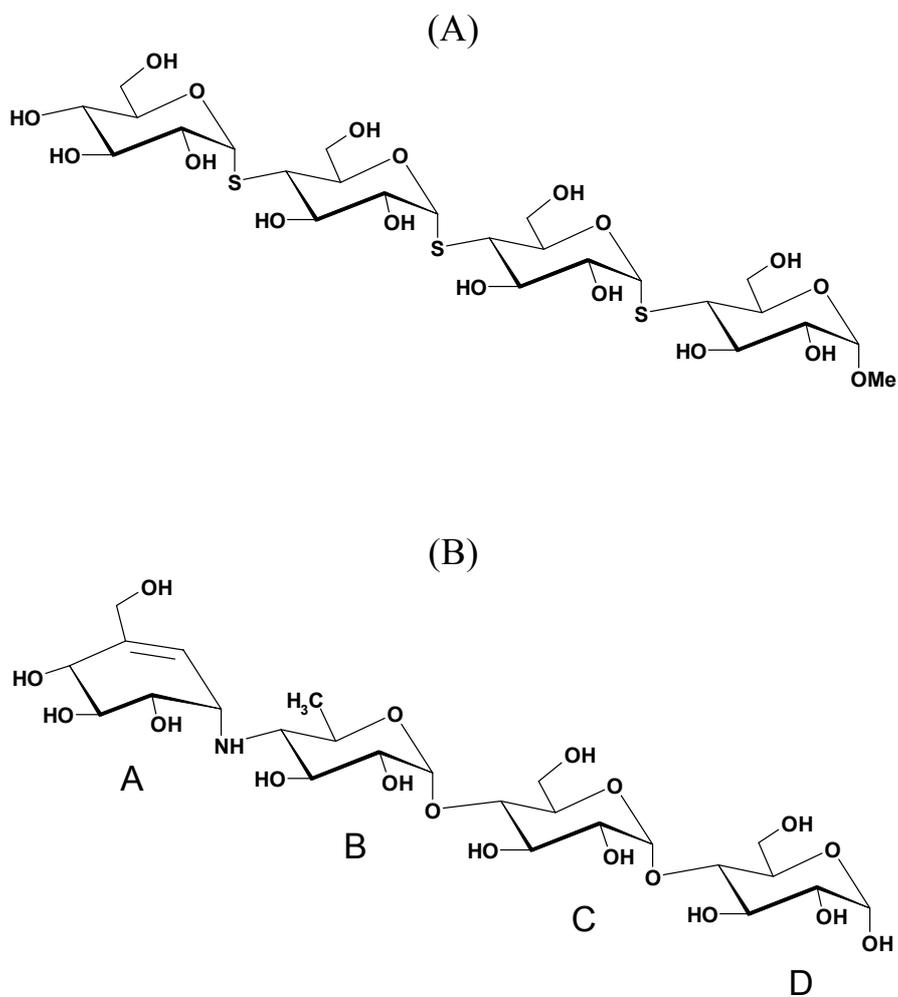


Figure 1: (A) Chemical structure of the thio-DP4 substrate analogue used for the soaking experiment with the AMY1 isoenzyme. (B) Structure of acarbose. Rings are labelled as referred to in the text. Rings A and B constitute the acarviosine unit which is α -1,4 linked to a maltose unit (rings C and D).

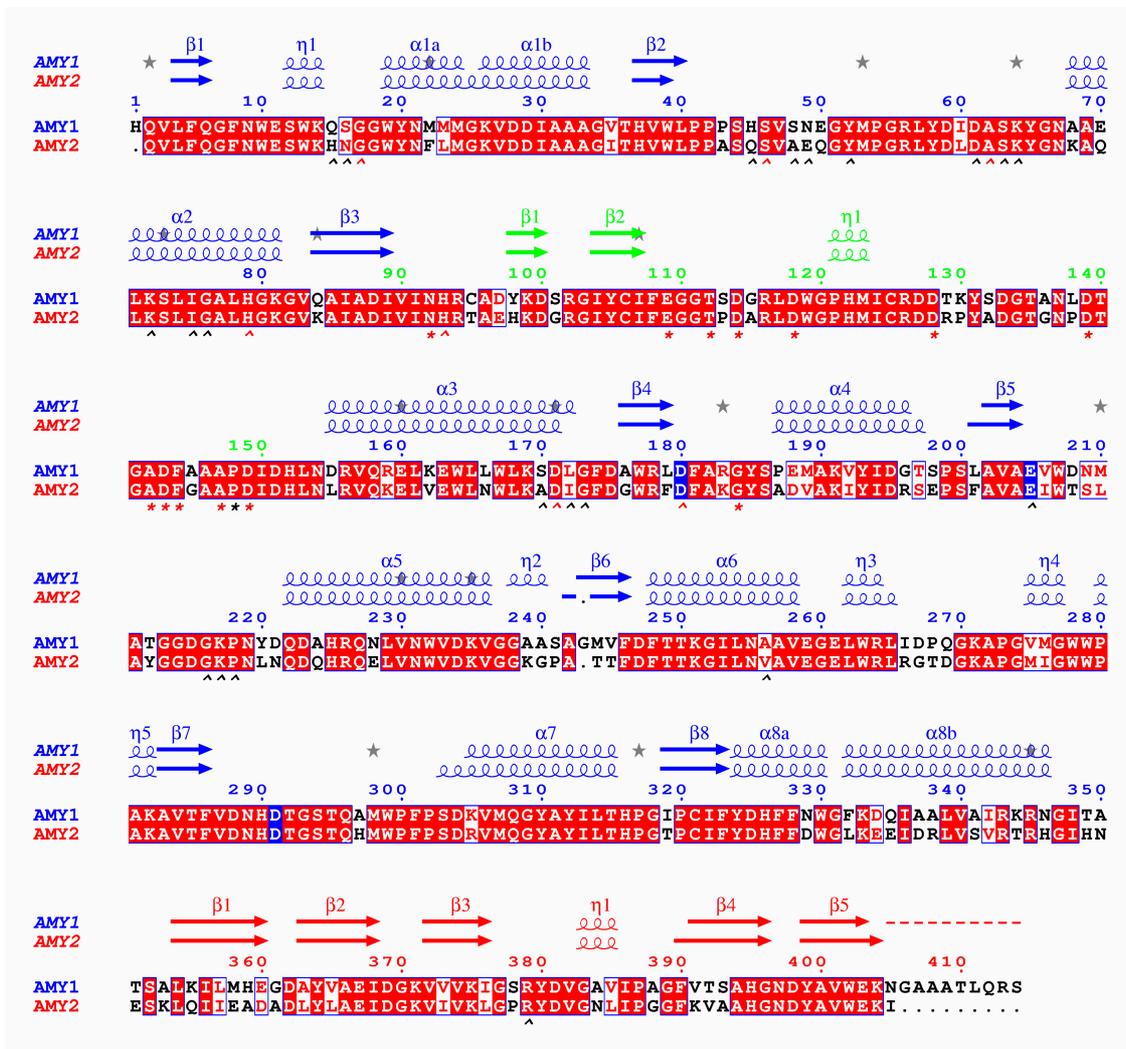


Figure 2: Sequence alignment of AMY1 and AMY2. Secondary structures of the two isozyms are presented above the alignment and colored as a function of domains: domain A in blue, domain B in green and domain C in red. β -strands are indicated by arrows, helices present α -helices and the letter T symbolizes a turn. Catalytic residues are highlighted in blue. Residues in double conformation in the 3D structure of AMY1 are indicated by a gray star. Below the sequence, ligands to calcium ions are indicated by an asterisk, whereas ligands to ethylene glycol molecules in the AMY1 structure are indicated with the ^ symbol. For both type of ligands, distances lower than 3.2 Å are indicated in red and black presents distances between 3.2 and 4.0 Å.

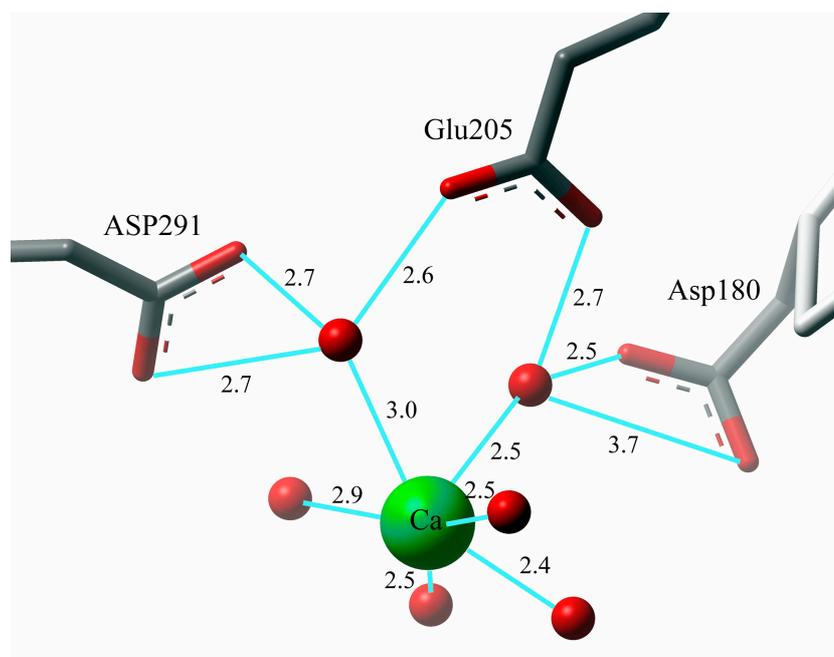


Figure 3: Interaction between Ca503 and the three catalytic residues in AMY1 active site. The calcium ion is presented by the green sphere, water molecules by red ones and hydrogen bonds as cyan lines. Distances are in Å.

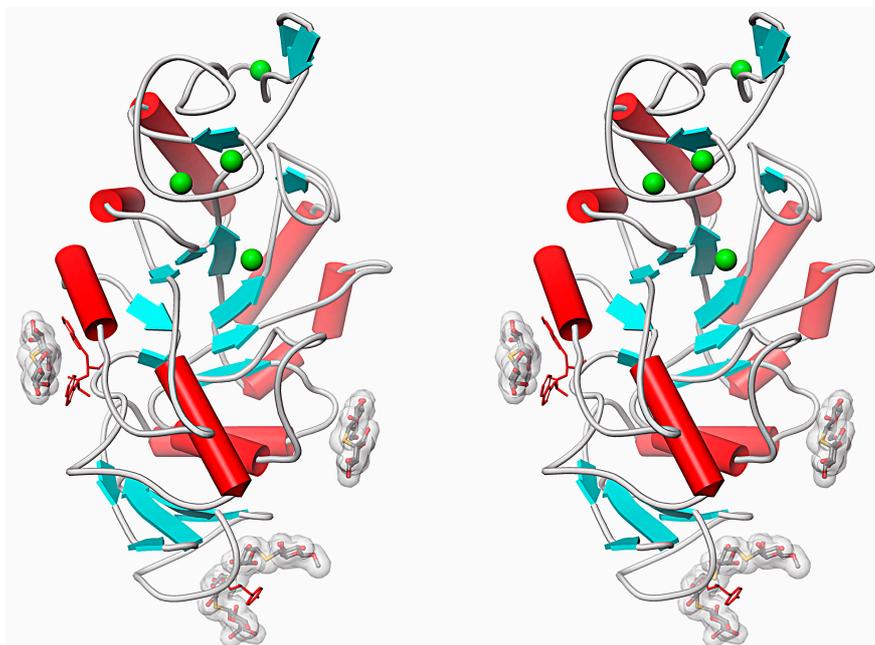


Figure 4: Stereo drawing of the overall structure of barley α -amylase isozyme 1 (AMY1) in complex with the thio-DP4 substrate analogue. Calcium ions are indicated as green spheres. The three upper calcium ions are those found both in AMY1 and AMY2 isozymes (numbered 500, 501 and 502). The fourth, located close to the centre of the $(\beta/\alpha)_8$ barrel is the calcium occupying the active site. Surfaces are showing rings from the thio-DP4 substrate analogue. To the left side, the starch granule binding surface site is shown with the two tryptophan residues (Trp278 and Trp279) highlighted in red. In domain C (bottom part of the figure), a full molecule of the thio-DP4 substrate is shown at the level of the “sugar tongs”, curved around Tyr380. Finally, the third surface presents two rings of the substrate analogue involved in an inter-molecular contact with symmetry related protein.

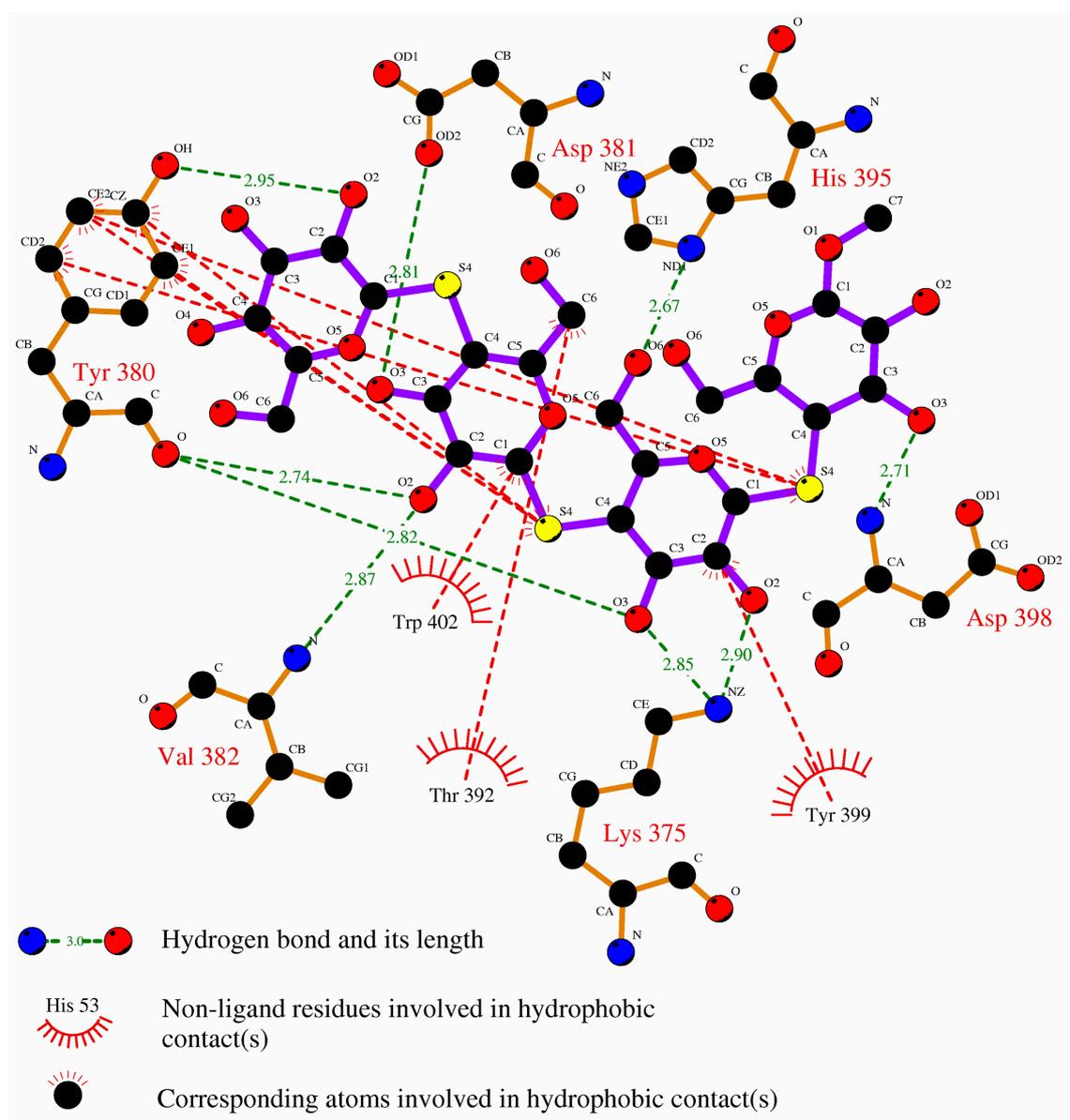


Figure 5: Schematic representation of interactions between AMY1 and the thio-DP4 substrate analogue in domain C (the so-called “sugar tongs” site). The substrate analogue is shown in a “ball and stick” representation, colored in purple, whereas AMY1 ligand side chains are presented in orange. Carbon atoms are shown in black, oxygen in red, nitrogen in blue and sulfur in yellow. Direct hydrogen bonds between the protein and the substrate analogue are indicated by green dash-and-dot lines (with length in Å), while hydrophobic contacts are indicated as red dash-and-dot lines. This figure was generated by using the program Ligplot [60].

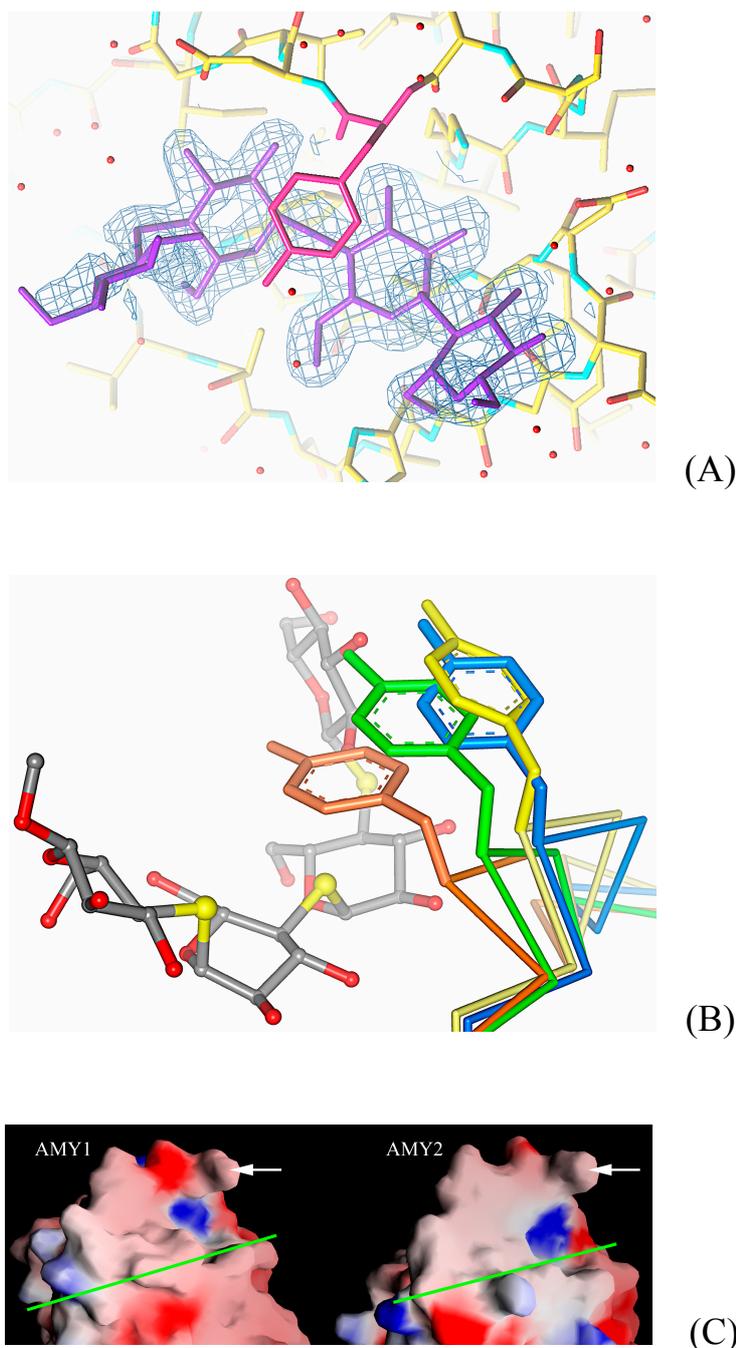


Figure 6: (A) Close up on the “sugar tongs” in AMY1. The electron density ($2F_o-F_c$ map contoured at 1σ) is only shown for the thio-DP4 substrate analogue (in purple). The methylated hydroxyl group located at the reducing end is on the bottom-right corner of the figure. All four sugar rings of the substrate analogue are present in electron density. Tyr380 which interacts with the substrate analogue is coloured in pink.

(B) Close up on “sugar tongs” and Tyr380_{AMY1} / Tyr378_{AMY2} side chain positions in native states or in complex with substrate analogues. Yellow Tyr corresponds to the native AMY2 structure; blue, AMY2 in complex with acarbose; green, native AMY1; and finally orange, AMY1 in complex with the thio-DP4 substrate analogue which is shown in “ball and stick” representation in standard colour code.

(C) Comparison of the surface of native AMY1 and AMY2 coloured as a function of charges focalized on domain C. The arrow indicates Tyr380_{AMY1} and Tyr378_{AMY2} and the green line shows the plane defined by the five anti-parallel β -strands. Red presents negative charges and blue negative charges. These representations, which are prepared with the program GRASP [56], have been generated on the same scale.

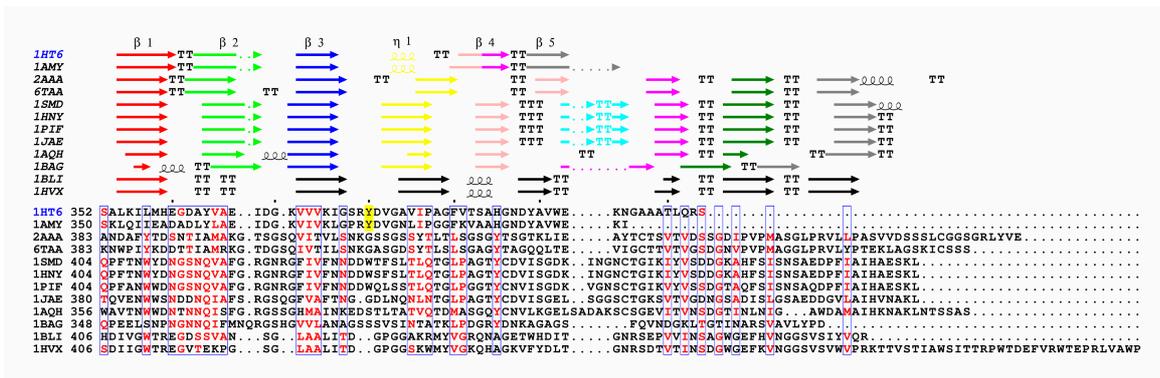


Figure 7: Sequence alignment of 12 α -amylase C-domains from different species. Each sequence is labelled by the PDB entry code from which it has been extracted. Secondary structures are presented above the alignment and coloured as a function of their spatial superimposability: structures superimposed or located in close vicinity are shown in the same colour. Arrows represent β -strands, helices present α -helices and the letter T symbolizes a turn. Labels $\beta 1$ to $\beta 5$ and $\eta 1$ (η being 3_{10} helices) are attributed to AMY1 (PDB entry code 1HT6). Gaps inserted in the sequence alignment are indicated by dots. Tyr380 in AMY1 numbering and its counterpart in AMY2 are highlighted in yellow in the sequence alignment.

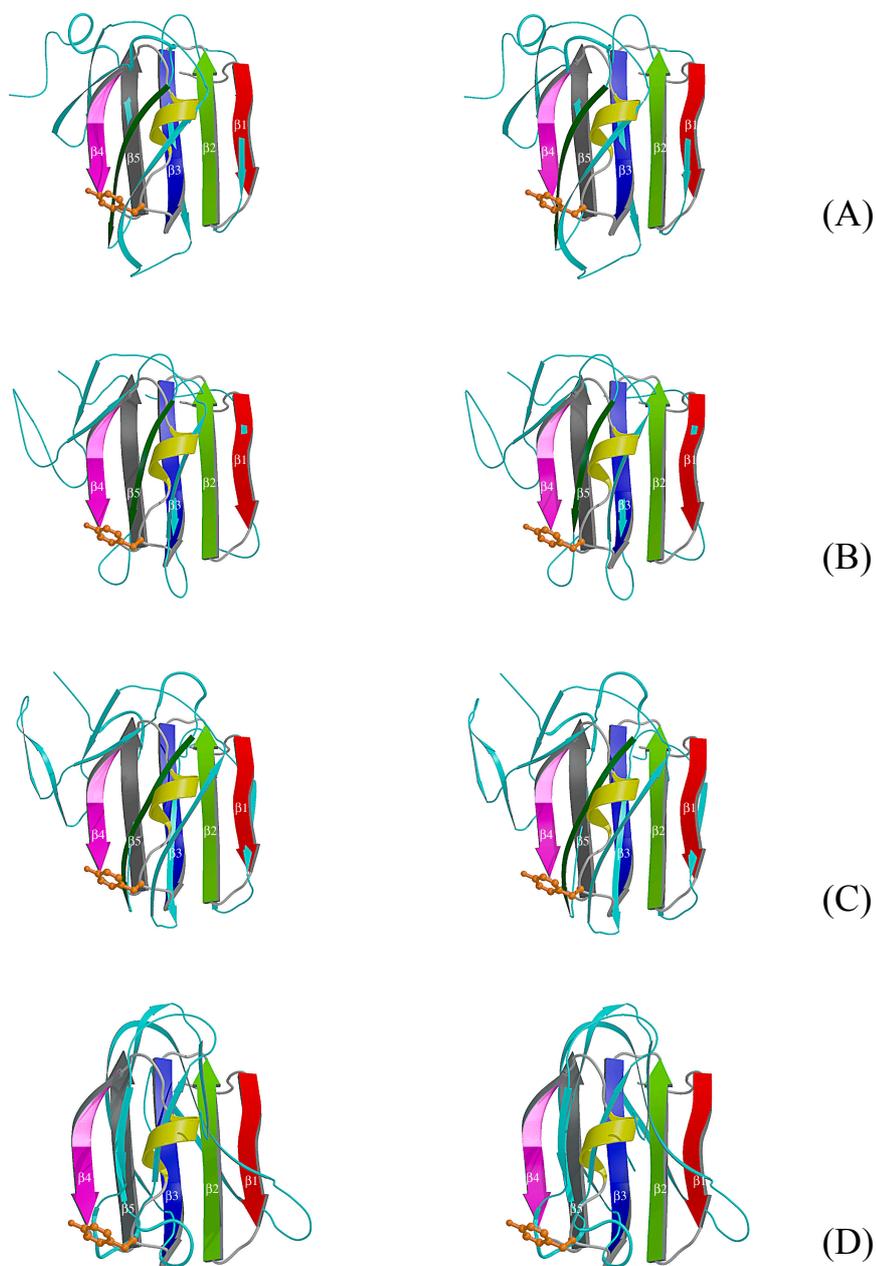


Figure 8a: Stereo drawing focused on the domain C, showing the superimposition of AMY1 with four other α -amylases: (A) TAKA amylase (6TAA); (B) human salivary α -amylase (1SMD); (C) α -amylase from *Pseudoalteromonas haloplanctis* (1AQH) and (D) α -amylase from *Bacillus licheniformis* (1BLI). The 5 β -strands of AMY1 are presented using the same color code as the sequence alignment of figure 7. The main chains of the four α -amylases are colored in cyan, while the inserted β -strand preventing the formation of a binding site equivalent to the “pair of sugar tongues” in AMY1 is indicated in dark green. Tyr380_{AMY1} is shown in ball-and-stick representation.

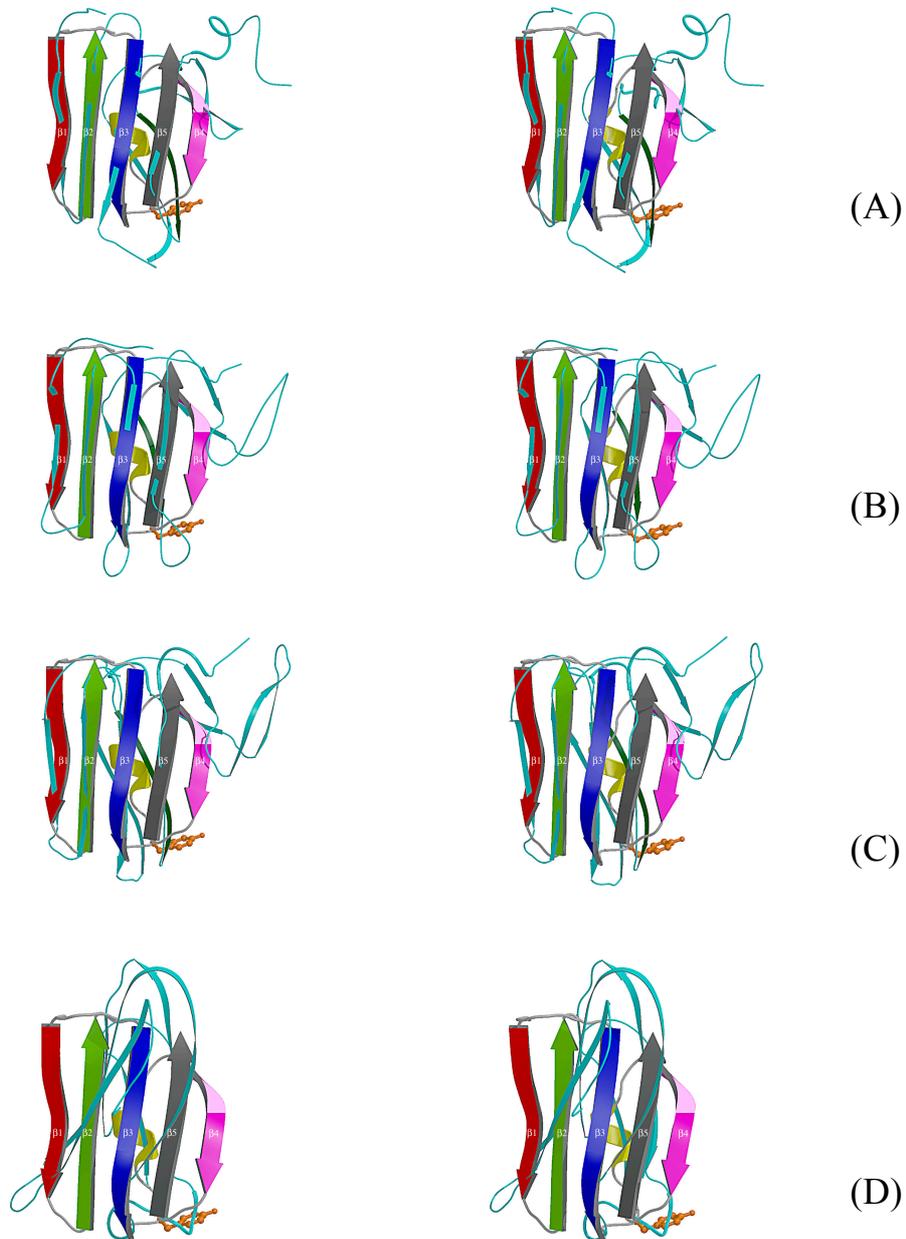


Figure 8b: The structures have been rotated 180° compared to figure 8a, in order to show the other side of the antiparallel β -sheets. The coloring code is the same than that of figure 8. **(A)** TAKA amylase (6TAA); **(B)** human salivary α -amylase (1SMD); **(C)** α -amylase from *Pseudoalteromonas haloplanctis* (1AQH) and **(D)** α -amylase from *Bacillus licheniformis* (1BLI).

References

1. Jones, R.L. & Jacobsen, J.V. (1991). Regulation of synthesis and transport of secreted proteins in cereal aleurone. *Int Rev Cytol* **126**, pp. 49-88.
2. Rogers, J.C. & Milliman, C. (1983). Isolation and sequence analysis of a barley α -amylase cDNA clone. *J Biol Chem* **258**, pp. 8169-8174.
3. Rogers, J.C. (1985). Two barley α -amylase gene families are regulated differently in aleurone cells. *J Biol Chem* **260**, pp. 3731-3738.
4. Rogers, J.C. (1985). Conserved amino acid sequence domains in α -amylases from plants, mammals, and bacteria. *Biochem Biophys Res Commun* **128**, pp. 470-476.
5. MacGregor, E.A., Janecek, S. & Svensson, B. (2001). Relationship of sequence and structure to specificity in the α -amylase family of enzymes. *Biochim Biophys Acta* **1546**, pp. 1-20.
6. Bertoft, E., Andtfolk, C. & Kulp, S.E. (1984). Effect of pH, Temperature, and Calcium-Ions on Barley Malt α -Amylase Isoenzymes. *Journal of the Institute of Brewing* **90**, pp. 298-302.
7. Bush, D.S., Sticher, L., van Huystee, R., Wagner, D. & Jones, R.L. (1989). The calcium requirement for stability and enzymatic activity of two isoforms of barley aleurone α -amylase. *J Biol Chem* **264**, pp. 19392-19398.
8. Rodenburg, K.W., Juge, N., Guo, X.J., Sogaard, M., Chaix, J.C. & Svensson, B. (1994). Domain B protruding at the third β strand of the α/β barrel in barley α -amylase confers distinct isozyme-specific properties. *Eur J Biochem* **221**, pp. 277-284.
9. Macgregor, A.W. & Ballance, D.L. (1980). Hydrolysis of Large and Small Starch Granules from Normal and Waxy Barley Cultivars by α -Amylases from Barley Malt. *Cereal Chemistry* **57**, pp. 397-402.
10. Macgregor, A.W. & Morgan, J.E. (1986). Hydrolysis of Barley Starch Granules by α -Amylases from Barley Malt. *Cereal Foods World* **31**, pp. 688-693.
11. Sogaard, M., Kadziola, A., Haser, R. & Svensson, B. (1993). Site-directed mutagenesis of histidine 93, aspartic acid 180, glutamic acid 205, histidine 290, and aspartic acid 291 at the active site and tryptophan 279 at the raw starch binding site in barley α -amylase 1. *J Biol Chem* **268**, pp. 22480-22484.
12. Sogaard, M. & Svensson, B. (1990). Expression of cDNAs encoding barley α -amylase 1 and 2 in yeast and characterization of the secreted proteins. *Gene* **94**, pp. 173-179.
13. Ajandouz, E.H., Abe, J., Svensson, B. & Marchis-Mouren, G. (1992). Barley malt- α -amylase. Purification, action pattern, and subsite mapping of isozyme 1 and two members of the isozyme 2 subfamily using *p*-nitrophenylated maltooligosaccharide substrates. *Biochim Biophys Acta* **1159**, pp. 193-202.
14. MacGregor, E.A., MacGregor, A.W., Macri, L.J. & Morgan, J.E. (1994). Models for the action of barley α -amylase isozymes on linear substrates. *Carbohydr Res* **257**, pp. 249-268.
15. Mundy, J., Svendsen, I. & Hejgaard, J. (1983). Barley α -amylase/subtilisin inhibitor. Isolation and characterization. *Carlsberg Res Commun* **48**, pp. 81-90.
16. Svendsen, I., Hejgaard, J. & Mundy, J. (1986). Complete amino acid sequence of the α -amylase/subtilisin inhibitor from barley. *Carlsberg Res Commun* **51**, pp. 43-50.
17. Leah, R. & Mundy, J. (1989). The bifunctional α -amylase/subtilisin inhibitor of barley: nucleotide sequence and patterns of seed specific expression. *Plant Mol Biol*, pp. 673-682.

18. Abe, J., Sidenius, U. & Svensson, B. (1993). Arginine is essential for the α -amylase inhibitory activity of the α -amylase/subtilisin inhibitor (BASI) from barley seeds. *Biochem J* **293**, pp. 151-155.
19. Sidenius, U., Olsen, K., Svensson, B. & Christensen, U. (1995). Stopped-flow kinetic studies of the reaction of barley α -amylase/subtilisin inhibitor and the high pI barley α -amylase. *FEBS Lett* **361**, pp. 250-254.
20. Kadziola, A., Abe, J., Svensson, B. & Haser, R. (1994). Crystal and molecular structure of barley α -amylase. *J Mol Biol* **239**, pp. 104-121.
21. Kadziola, A., Sogaard, M., Svensson, B. & Haser, R. (1998). Molecular structure of a barley α -amylase-inhibitor complex: implications for starch binding and catalysis. *J Mol Biol* **278**, pp. 205-217.
22. Gibson, R.M. & Svensson, B. (1987). Identification of Tryptophanyl Residues Involved in Binding of Carbohydrate Ligands to Barley α -Amylase 2. *Carlsberg Research Communications* **52**, pp. 373-379.
23. Qian, M., Haser, R. & Payan, F. (1995). Carbohydrate binding sites in a pancreatic α -amylase-substrate complex, derived from X-ray structure analysis at 2.1 Å resolution. *Protein Sci* **4**, pp. 747-755.
24. Larson, S.B., Greenwood, A., Cascio, D., Day, J. & McPherson, A. (1994). Refined molecular structure of pig pancreatic α -amylase at 2.1 Å resolution. *J Mol Biol* **235**, pp. 1560-1584.
25. Sogaard, M., Andersen, J.S., Roepstorff, P. & Svensson, B. (1993). Electrospray mass spectrometry characterization of post-translational modifications of barley α -amylase 1 produced in yeast. *Biotechnology (NY)* **11**, pp. 1162-1165.
26. Andersen, J.S., Sogaard, M., Svensson, B. & Roepstorff, P. (1994). Localization of an O-glycosylated site in the recombinant barley α -amylase 1 produced in yeast and correction of the amino acid sequence using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of peptide mixtures. *Biol Mass Spectrom* **23**, pp. 547-554.
27. Robert, X., Gottschalk, T.E., Haser, R., Svensson, B. & Aghajari, N. (2002). Expression, purification and preliminary crystallographic studies of α -amylase isozyme 1 from barley seeds. *Acta Cryst D* **58**, pp. 683-686.
28. Svensson, B., Gibson, R.M., Haser, R. & Astier, J.P. (1987). Crystallization of barley malt α -amylases and preliminary X-ray diffraction studies of the high pI isozyme, α -amylase 2. *J Biol Chem* **262**, pp. 13682-13684.
29. Banner, D.W., Bloomer, A.C., Petsko, G.A., Phillips, D.C., Pogson, C.I., Wilson, I.A., Corran, P.H., Furth, A.J., Milman, J.D., Offord, R.E., Priddle, J.D. & Waley, S.G. (1975). Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 Å resolution using amino acid sequence data. *Nature* **255**, pp. 609-614.
30. Vallée, F., Kadziola, A., Bourne, Y., Juy, M., Rodenburg, K.W., Svensson, B. & Haser, R. (1998). Barley α -amylase bound to its endogenous protein inhibitor BASI: crystal structure of the complex at 1.9 Å resolution. *Structure* **6**, pp. 649-659.
31. Aghajari, N., Feller, G., Gerday, C. & Haser, R. (1998). Structures of the psychrophilic *Alteromonas haloplanctis* α -amylase give insights into cold adaptation at a molecular level. *Structure* **6**, pp. 1503-1516.
32. Kadziola, A. (1993). PhD Thesis: *An α -amylase from barley and its complex with a substrate analogue inhibitor studied by X-ray Crystallography*. Department of Chemistry, CNRS Marseille and University of Copenhagen.
33. Weselake, R.J. & Hill, R.D. (1983). Inhibition of α -Amylase-Catalyzed Starch Granule Hydrolysis by Cycloheptaamylose. *Cereal Chemistry* **60**, pp. 98-101.

34. Juge, N., Andersen, J.S., Tull, D., Roepstorff, P. & Svensson, B. (1996). Overexpression, purification, and characterization of recombinant barley α -amylases 1 and 2 secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* **8**, pp. 204-214.
35. Otwinoswki, Z. & Minor, W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. In *Methods in Enzymology* (C.W. Carter, J. & Sweet, R.M., eds.), vol. 276: Macromolecular Crystallography, part A. pp. 307-326, Academic Press.
36. CCP4 Collaborative Computational Project, N. (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Cryst D* **50**, pp. 760-763.
37. Roussel, A. & Cambillau, C. (1989). *TURBO-FRODO*. Silicon Graphics Mountain View, CA.
38. Brünger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T. & Warren, G.L. (1998). Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Cryst D* **54**, pp. 905-921.
39. Brünger, A.T. (1992). Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* **355**, pp. 472-475.
40. Kleywegt, G.J. & Jones, T.A. (1998). Databases in protein crystallography. *Acta Cryst D* **54**, pp. 1119-1131.
41. Hooft, R.W., Vriend, G., Sander, C. & Abola, E.E. (1996). Errors in protein structures. *Nature* **381**, p. 272.
42. Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N. & Bourne, P.E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* **28**, pp. 235-242.
43. Boel, E., Brady, L., Brzozowski, A.M., Derewenda, Z., Dodson, G.G., Jensen, V.J., Petersen, S.B., Swift, H., Thim, L. & Woldike, H.F. (1990). Calcium binding in α -amylases: an X-ray diffraction study at 2.1 Å resolution of two enzymes from *Aspergillus*. *Biochemistry* **29**, pp. 6244-6249.
44. Swift, H.J., Brady, L., Derewenda, Z.S., Dodson, E.J., Dodson, G.G., Turkenburg, J.P. & Wilkinson, A.J. (1991). Structure and molecular model refinement of *Aspergillus oryzae* (TAKA) α -amylase: an application of the simulated-annealing method. *Acta Cryst B* **47**, pp. 535-544.
45. Ramasubbu, N., Paloth, V., Luo, Y.G., Brayer, G.D. & Levine, M.J. (1996). Structure of human salivary α -amylase at 1.6 Å resolution: Implications for its role in the oral cavity. *Acta Cryst D* **52**, p. 435.
46. Brayer, G.D., Luo, Y. & Withers, S.G. (1995). The structure of human pancreatic α -amylase at 1.8 Å resolution and comparisons with related enzymes. *Protein Sci* **4**, pp. 1730-1742.
47. Machius, M., Vertesy, L., Huber, R. & Wiegand, G. (1996). Carbohydrate and protein-based inhibitors of porcine pancreatic α -amylase: structure analysis and comparison of their binding characteristics. *J Mol Biol* **260**, pp. 409-421.
48. Strobl, S., Maskos, K., Betz, M., Wiegand, G., Huber, R., Gomis-Ruth, F.X. & Glockshuber, R. (1998). Crystal structure of yellow meal worm α -amylase at 1.64 Å resolution. *J Mol Biol* **278**, pp. 617-628.
49. Aghajari, N., Feller, G., Gerday, C. & Haser, R. (1998). Crystal structures of the psychrophilic α -amylase from *Alteromonas haloplanctis* in its native form and complexed with an inhibitor. *Protein Sci* **7**, pp. 564-572.
50. Fujimoto, Z., Takase, K., Doui, N., Momma, M., Matsumoto, T. & Mizuno, H. (1998). Crystal structure of a catalytic-site mutant α -amylase from *Bacillus subtilis* complexed with maltopentaose. *J Mol Biol* **277**, pp. 393-407.

51. Machius, M., Declerck, N., Huber, R. & Wiegand, G. (1998). Activation of *Bacillus licheniformis* α -amylase through a disorder \rightarrow order transition of the substrate-binding site mediated by a calcium-sodium-calcium metal triad. *Structure* **6**, pp. 281-292.
52. Suvd, D., Fujimoto, Z., Takase, K., Matsumura, M. & Mizuno, H. (2001). Crystal structure of *Bacillus stearothermophilus* α -amylase: possible factors determining the thermostability. *J Biochem (Tokyo)* **129**, pp. 461-468.
53. Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, pp. 4673-4680.
54. Kabsch, W. & Sander, C. (1983). Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* **22**, pp. 2577-2637.
55. Gouet, P., Courcelle, E., Stuart, D.I. & Metz, F. (1999). ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* **15**, pp. 305-308.
56. Nicholls, A., Sharp, K.A. & Honig, B. (1991). Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins* **11**, pp. 281-296.
57. Kraulis, P.J. (1991). MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* **24**, pp. 946-950.
58. Esnouf, R. (1999). BobScript Software, version 2.5. University of Oxford (Ed.), U.K.: Oxford.
59. Merritt, E.A. & Bacon, D.J. (1997). Raster3D: Photorealistic Molecular Graphics. *Methods Enzymol* **277**, pp. 505-524.
60. Wallace, A.C., Laskowski, R.A. & Thornton, J.M. (1995). LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng* **8**, pp. 127-134.

B/ Déterminants structuraux de la géométrie du site de surface de fixation des granules d'amidon :

La comparaison, entre AMY1 et AMY2, du site de surface de fixation des granules d'amidon (« *starch granule surface binding site* ») révèle une remarquable conservation de sa géométrie. Ainsi, si l'on superpose les structures de AMY2, du complexe AMY2 / acarbose, de AMY1 et du complexe AMY1 / thio-DP4, on constate que les positions et l'orientation des deux résidus Trp278 et Trp279 adjacents sont invariables. Ceci nous a conduits à définir précédemment ce site de surface comme un « filtre géométrique » ne pouvant interagir qu'avec un substrat de géométrie adaptée et « complémentaire ». Ainsi, l'angle constant de 135° entre les plans aromatiques des tryptophanes permettrait la fixation de deux cycles glucosyl dont les plans formeraient un angle similaire. L'interaction serait moins favorable pour des substrats ne satisfaisant pas cette condition.

Cette théorie est en accord avec le fait que ce site peut fixer les β -cyclodextrines, mais pas les α - ou les γ -cyclodextrines (Weslake & Hill, 1983 ; Gibson & Svensson, 1987). En effet, si l'on considère ces molécules cycliques, le nombre d'unités glucose qu'elles renferment détermine la géométrie des liaisons interglycosidiques. Ainsi, une α -cyclodextrine (composée de 6 résidus glucosyl) ou une γ -cyclodextrine (8 résidus glucosyl) pourraient avoir des affinités moindres pour le site du fait d'un angle « défavorable » entre lesdits résidus. La β -cyclodextrine (7 unités), quant à elle, aurait un angle optimal car complémentaire de celui du site, et posséderait une affinité supérieure comparativement aux cyclodextrines α ou γ .

La remarquable invariance de la géométrie du site, quel que soit l'isoenzyme et quel que soit son état d'occupation et la molécule qui interagit avec lui, peut être expliquée par l'environnement des résidus tryptophane 278 et 279. En effet, si l'on calcule et trace les surfaces de van der Waals des résidus du site de surface (voir **Figure 1**), on constate que les chaînes latérales des deux tryptophanes n'ont aucun degré de liberté. De fait, leur conformation est bloquée et dictée par les résidus avoisinants : « en dessous » de Trp278 et Trp279, on trouve respectivement Arg226 et Lys282. Ces derniers sont eux-mêmes stabilisés par d'autres résidus proches. De plus, les deux tryptophanes déterminent des interactions hydrophobes avec Lys 282 et Arg 226, d'où la rigidité de l'ensemble. Située entre Trp278 et Trp279, Val230 contribue également à bloquer toute possibilité de mouvement des résidus aromatiques (voir **Figure 1**).

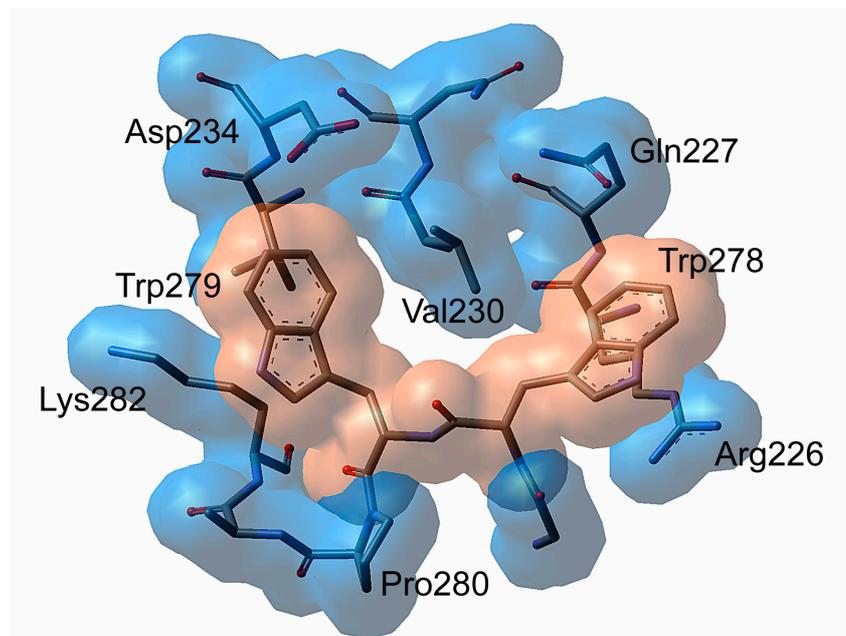


Figure 1 : Vue du site de surface de fixation des granules d'amidon. Seuls les résidus entourant Trp278 et Trp279 sont dessinés. Les surfaces calculées sont les rayons de van der Waals des résidus et sont colorées en rose pour Trp278 et Trp279, en bleu pour les résidus avoisinants.

En cas de reconnaissance d'un substrat, des interactions hydrophobes apparaissent sur deux niveaux (voir **Figure 2a**) : le premier entre les cycles du sucre et les tryptophanes, le second entre ces derniers et les résidus Arg226 et Lys282 sous-jacents. Enfin, nous avons montré que Gln227 et Asp234 déterminaient des interactions par liaisons hydrogène avec l'analogue de substrat, stabilisant ce dernier au niveau du site. De plus, ces deux résidus, de par leur encombrement stérique (**Figure 2b**), empêchent les chaînes latérales de Trp278 et Trp279, respectivement, de pouvoir se déplacer vers « l'arrière » (suivant l'orientation de la **Figure 2a**).

L'ensemble de ces éléments représente les déterminants structuraux de l'invariance de géométrie du site de fixation des granules d'amidon : on constate le rôle majeur de Arg226 et Lys282, résidus jouxtant Trp278 et 279, mais aussi de Gln227 et Asp234 qui, en plus d'être impliqués dans l'interaction avec le substrat, verrouillent les positions des deux tryptophanes.

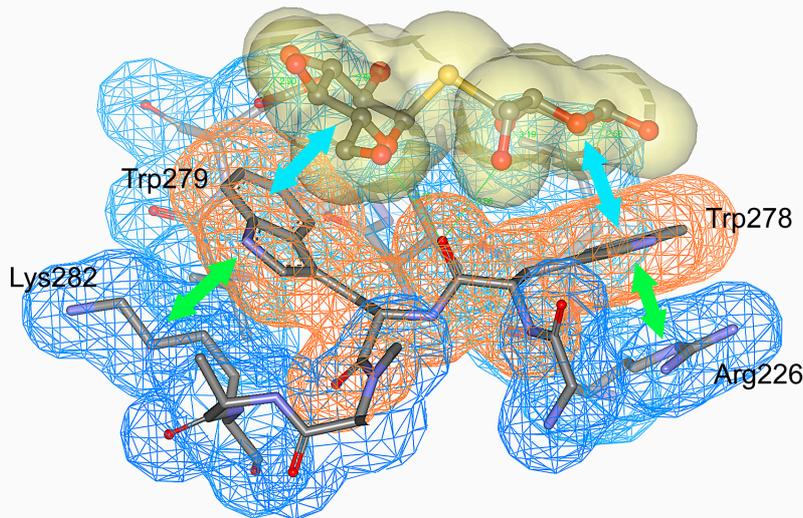


Figure 2a : *Vue rapprochée du site de surface de fixation des granules d'amidon dans le complexe AMY1 / thio-DP4. Les contours en « fil de fer » représentent les surfaces de van der Waals des résidus qui sont colorées, en rose pour Trp278 et Trp279, en bleu pour les résidus avoisinants. La surface transparente jaune est celle des deux unités du thio-DP4 identifiées au niveau du site. Les flèches bleues montrent les interactions hydrophobes entre les résidus tryptophane et les cycles glucosyl de l'analogue de substrat ; les flèches vertes, celles entre les résidus tryptophane et les résidus sous-jacents bloquant les deux résidus aromatiques.*

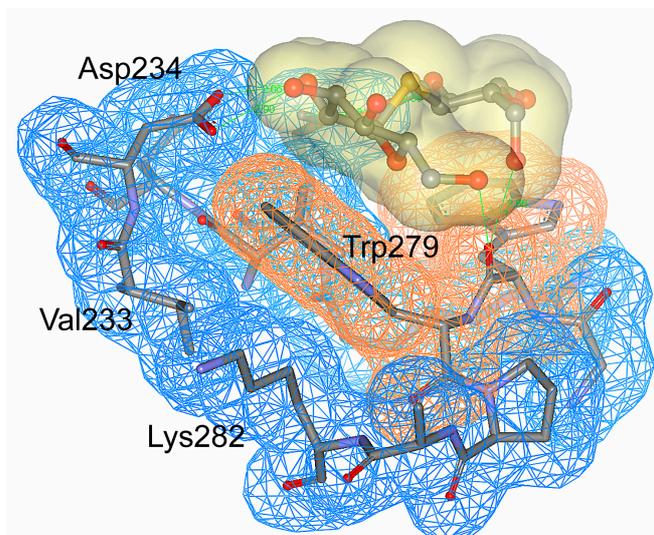


Figure 2b : *Vue rapprochée du site de surface de fixation des granules d'amidon dans le complexe AMY1 / thio-DP4. Vue de profil mettant en évidence les trois niveaux d'empilement (sucre / Trp279 / Lys282) et le double rôle de Asp234 (blocage de Trp279, interaction avec le substrat).*

C/ Le site actif de AMY1 comme quatrième site de fixation d'un ion calcium ?

Le complexe AMY2/BASI a mis en évidence la présence d'un ion calcium, à l'interface des deux protéines, qui avait la particularité d'être entièrement solvaté (Vallée *et al.*, 1998). Ainsi, la première sphère de coordination de cet ion est uniquement composée de molécules d'eau, elles-mêmes définissant des interactions par liaisons hydrogène avec les résidus catalytiques de AMY2 ou des résidus de BASI. Bien que de nombreuses structures contenant des ions métalliques aient été résolues, le complexe AMY2/BASI fut le premier à montrer un tel mode d'interaction via un calcium interfacial.

La présence dans le complexe AMY1 / thio-DP4 d'un ion calcium localisé exactement à la même position montre la reproductibilité de ce type d'interaction. Comme nous l'avons montré, l'absence de BASI dans ce complexe détermine un réarrangement des molécules d'eau autour de l'ion, de manière à former une géométrie de coordination pyramidale à base pentagonale, l'ion calcium étant situé sur le barycentre de cette base. On rappelle que pour le complexe AMY2/BASI, la coordination suivait une géométrie de type bipyramatique trigonale (Vallée *et al.*, 1998 - voir **Figure 3**).

Jusqu'alors, on pensait que la présence de l'ion à l'interface AMY2/BASI était induite par la fixation de l'inhibiteur à l' α -amylase. Notre complexe prouve, au contraire, que l'ion peut se fixer dans le site actif de AMY1, sans l'aide d'une autre espèce.

La présence d'ions calcium entièrement solvatés a également été décrite dans une étude récente montrant la contribution d'ions métalliques à la stabilité conformationnelle de la ribonucléase T₁ d'*Aspergillus oryzae* (Deswarte *et al.*, 2001). Cette protéine, dans son état cristallin, contient 6 ions calcium. Cinq d'entre eux définissent des interactions avec des résidus de la protéine ainsi que des molécules d'eau. Ainsi, sur 7 ou 8 interactions, de 2 à 3 sont des liaisons directes avec un acide aminé, et les liaisons restantes impliquent des molécules d'eau. La géométrie de coordination est dans tous les cas de type bipyramidale pentagonale. Cependant, un sixième atome de calcium ne présente, comme dans les complexes AMY1/thio-DP4 et AMY2/BASI, que des molécules d'eau dans sa première sphère de coordination, définissant un total de 6 interactions (comme pour le calcium du site actif de AMY1). Cependant, à l'inverse de nos observations, les molécules d'eau liées à l'ion calcium solvaté de la ribonucléase T₁ n'adoptent pas de géométrie particulière.

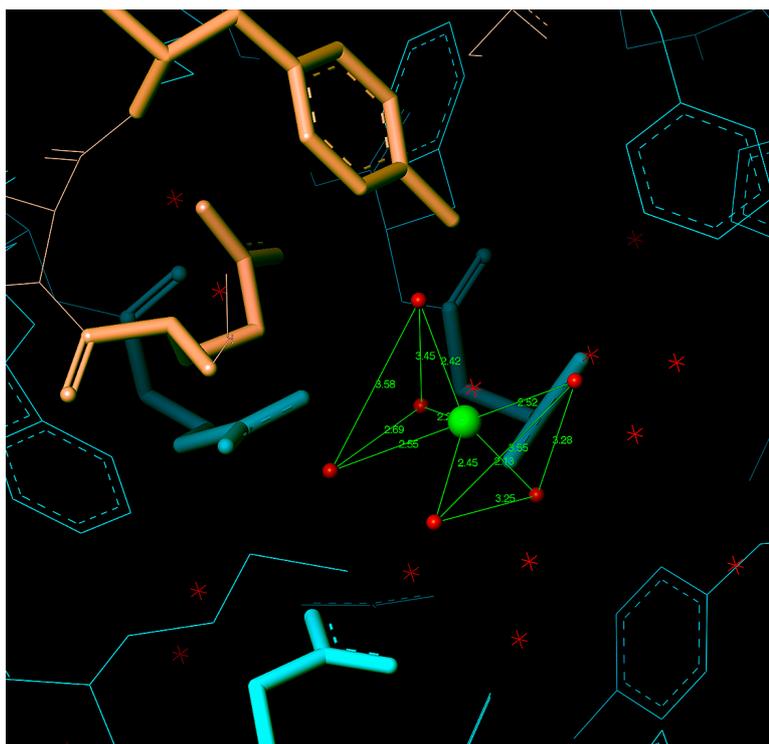


Figure 3 : Vue de l'ion calcium interfacial dans le complexe AMY2/BASI. L'ion calcium est représenté par une sphère verte et les molécules d'eau par des sphères rouges. Les résidus de BASI sont montrés en orange, ceux de AMY2, en cyan. Les interactions entre le calcium et les molécules d'eau de la première sphère d'interaction sont montrées par les lignes vertes.

L'observation dans le complexe AMY1 / thio-DP4 d'un ion calcium entièrement solvato au niveau du site actif soulève par ailleurs plusieurs questions :

Si dans le complexe AMY2/BASI, cet ion était impliqué dans l'interaction protéine/protéine, quel est son rôle chez AMY1 ? On pourrait penser qu'il agit comme un inhibiteur. Une preuve pourrait être l'absence de fixation du thio-DP4 dans le site actif, à moins que la géométrie de cet analogue et/ou sa nature chimique en soient la cause. En outre, cet ion n'a pas été observé dans la structure native de AMY1 où la concentration en CaCl_2 était pourtant plus élevée. Une hypothèse vraisemblable est l'influence du pH qui déterminerait des charges locales favorisant la fixation d'un tel ion. On sait qu'il existe d'importantes variations de pH dans le grain d'orge durant sa phase de germination. Ainsi, si l'on reprend notre hypothèse, l'activité de AMY1 pourrait être modulée *in vivo* par les ions calcium, sous dépendance du pH ; ceci nous amène à considérer le site actif comme un quatrième site de fixation du calcium.

Ce résultat, enfin, pourrait expliquer l'affinité supérieure de AMY1 pour les ions calcium comparativement à AMY2, mais aussi le fait que l'addition de ces ions, dans des conditions de pH acide, stabilise les deux isoenzymes (Rodenburg *et al.*, 1994). On peut aussi ajouter que la fixation d'un tel ion permettrait d'augmenter la cohésion locale des résidus et plus particulièrement le maintien de la structure du cœur du site actif.

Par contre, du fait de la remarquable similarité structurale des sites actifs de AMY1 et AMY2, il semble difficile, *a priori*, de ne pas envisager la possibilité de fixation d'un ion calcium dans le site actif de AMY2 même en l'absence de BASI. Si cela était le cas, la différence d'affinité pour les ions calcium devrait alors trouver une autre explication.

Chapitre 4

**Modalités de reconnaissance
et d'interaction d'un substrat
naturel au niveau des sites de
surface et caractérisation
structurale des sous-sites de
fixation chez AMY1**

Avec les complexes :

Mutant inactif AMY1 Δ 9_{D180A} / substrat maltoheptaose
Mutant inactif AMY1 Δ 9_{D180A} / inhibiteur acarbose
Enzyme sauvage AMY1 Δ 9 / inhibiteur acarbose

Le complexe, précédemment décrit, entre AMY1 Δ 9 et l'analogue de substrat thio-DP4 nous a permis de caractériser les interactions enzyme / ligand au niveau du site de surface de fixation des granules d'amidon et de montrer l'existence d'un site de surface additionnel au niveau du domaine C (site dit « en pince à sucre »), non observé chez AMY2 ou d'autres α -amylases. Cependant, la nature du composé thio-DP4 implique que la présence d'atomes de soufre assurant les liaisons glycosidique, modifie subtilement la géométrie du polysaccharide, comparativement à celle d'un substrat naturel avec des liaisons O-glycosidiques. Nous avons discuté des conséquences de ce changement, et plus particulièrement celles qui concernent l'affinité de l'analogue pour le site de fixation des granules d'amidon. De plus, le thio-DP4 ne s'est pas fixé dans le site actif, soit à cause d'une faible affinité de l'analogue pour ce site induite par la géométrie de la molécule, soit à cause de la présence d'un ion calcium jouant le rôle d'inhibiteur dans les conditions de l'expérience. En outre, les analogues de substrat de type thio-DPx ont une solubilité restreinte, ce qui limite fortement leur utilisation (notamment pour des degrés de polymérisation supérieurs à 4).

En outre, la cartographie enzymatique des sous-sites (Ajandouz *et al.*, 1992) et des études par modélisation moléculaire (André *et al.*, 1999) ont montré que AMY1, comme AMY2, devraient posséder 10 sous-sites (numérotés de -6 à -1 et +1 à +4). Aucune structure expérimentale n'a pu détailler les sous-sites -6 à -2, +3 et +4 chez AMY2 comme chez AMY1. A ce jour, seuls les sous-sites -1, +1 et +2 ont été définis grâce à la structure du complexe AMY2/acarbose (Kadziola *et al.*, 1998).

Dans le but d'obtenir de plus amples renseignements sur les modalités d'interaction AMY1 / substrat et de caractériser les sous-sites de fixation, nous avons préparé trois nouveaux complexes, dont les structures ont été déterminées à une résolution de 2,0 Å. Le premier utilise l'acarbose, inhibiteur pseudo-tétracosaccharidique d'origine bactérienne (voir *Introduction Bibliographique*, page 32). Ce complexe nous a permis une comparaison directe avec le complexe AMY2 / acarbose (Kadziola *et al.*, 1998), et ainsi, d'aller plus avant dans la compréhension de la reconnaissance des substrats par AMY1 et de son mécanisme d'action.

Les deux autres complexes utilisent un mutant inactif de la forme recombinante de AMY1. Ce mutant D180→A au résidu catalytique nucléophile, réalisé par le Dr. Haruhide Mori de l'équipe du Dr. Svensson du *Carlsberg Laboratory* de Copenhague (Danemark), ne présente aucune activité catalytique décelable (Robert *et al.*, *publication en préparation*). Ce mutant, nommé AMY1 Δ 9_{D180A}, a été utilisé afin d'obtenir un complexe avec l'acarbose, ainsi qu'un complexe avec un substrat naturel, à savoir un maltoheptaose. L'examen de la structure de ce dernier complexe nous a conduits à définir les sous-sites de fixation des différentes unités glucoses et les résidus impliqués dans leur reconnaissance. En outre, l'utilisation de ce substrat long (par rapport à l'acarbose ou au thio-DP4) permet de décrire les conformations qu'il adopte au niveau du site actif et des sites de surface. L'analyse détaillée et comparée de ces structures nous a permis d'avancer des hypothèses quant au comportement *in vivo* de l'enzyme en présence de substrats naturels de types amylose ou amylopectine.

A/ Matériels et méthodes :

1. Cristallisation, procédures de trempage et de cryoprotection :

Le complexe entre AMY1 Δ 9 et l'inhibiteur acarbose a été obtenu par co-cristallisation à partir des conditions précédemment décrites (Robert *et al.*, 2002). L'acarbose a été ajouté au milieu de cristallisation (dans les gouttes suspendues) pour obtenir une concentration finale de 10 mM. Les cristaux ont atteint leur taille finale de $0,35 \times 0,1 \times 0,05 \text{ mm}^3$, en environ trois semaines. Le mutant inactif AMY1 Δ 9_{D180A} a été cristallisé par la technique de la goutte suspendue selon le principe de diffusion de vapeur à partir d'une solution stock de protéine concentrée à 2,94 mg/ml dans un tampon 10 mM MES (pH 6.7), contenant 5 mM CaCl₂ et 0,02% d'azide de sodium. Les gouttes ont été préparées en mélangeant 2 μ l de cette solution de protéine avec 0,5 μ l d'isopropanol 3% (v/v) et 2,5 μ l de la solution du puits contenant du PEG 8000 à 20% (w/v). Des cristaux fins (d'une taille typique de $0,8 \times 0,1 \times 0,03 \text{ mm}^3$) ont été obtenus à 19°C, après 6 mois environ.

En vue d'obtenir le complexe AMY1Δ9_{D180A} / maltoheptaose, une étape de trempage a été réalisée en ajoutant directement à la goutte une solution de maltoheptaose (*Boehringer*) à une concentration finale de 10 mM, pendant 24 heures. Le complexe entre AMY1Δ9_{D180A} et l'acarbose a été obtenu par trempage selon les mêmes modalités.

Tous les cristaux ont été ensuite cryoprotégés préalablement à l'expérience de diffraction. Cette étape a été décrite dans le premier chapitre « *Cristallisation de AMY1* », page 79 et suivantes.

2. Enregistrement des données de diffraction :

Les données de diffraction associées à la structure du complexe AMY1Δ9 / acarbose ont été collectées au laboratoire en conditions cryogéniques (100 K) sur un détecteur MAR345, couplé à un générateur de rayons X à anode tournante (longueur d'onde CuK_α) opérant à 44 kV et 100 mA, et équipé de miroirs confocaux *Osmic*. Un seul cristal a été utilisé avec un pas d'oscillation de 1° et un temps d'exposition de 15 minutes par image. 95 clichés de diffraction ont été ainsi enregistrés. Le traitement de ces données a été conduit grâce aux logiciels DENZO (Otwinowski & Minor, 1997) et SCALA (CCP4 Collaborative Computational Project, 1994).

Les données conduisant à la structure de AMY1Δ9_{D180A} en complexe avec le maltoheptaose ont été enregistrées sur la ligne ID14-EH1 du synchrotron ESRF (Grenoble, France) sous conditions cryogéniques (100 K) à une longueur d'onde de 0,934 Å sur un détecteur MarCCD. Un pas d'oscillation de 1° et un temps d'exposition de 20 secondes ont été utilisés et 180 images ont été ainsi enregistrées.

Enfin, les données de diffraction conduisant à la structure du complexe AMY1Δ9_{D180A} / acarbose ont été enregistrées sur la ligne FIP-BM30A du synchrotron ESRF, toujours dans des conditions cryogéniques, à une longueur d'onde de 0,950 Å sur un détecteur MarCCD. Un pas d'oscillation de 1° et un temps d'exposition de 30 secondes ont permis d'enregistrer un jeu de données de 100 clichés à partir d'un seul cristal.

Les intensités de diffraction de ces deux derniers jeux de données ont été intégrées avec le logiciel MOSFLM (Leslie, 1991) de la suite CCP4 (CCP4 Collaborative Computational Project, 1994) et mises à l'échelle avec SCALA. Chaque cristal appartient au groupe d'espace orthorhombique P2₁2₁2 et une molécule est présente dans l'unité asymétrique. Les statistiques d'enregistrement et de traitement des données sont résumées dans le **Tableau 1**, page suivante.

3. Détermination de la structure et affinement du modèle :

Du fait de l'isomorphisme des cristaux, la structure native de AMY1Δ9 a été utilisée comme modèle de départ. Après que les molécules d'eau et de ligands et les ions calcium aient été enlevés, une étape d'affinement de corps rigides a été conduite en utilisant les données jusqu'à 4 Å. Classiquement, les cycles d'affinement suivants ont utilisé le protocole de recuit simulé implémenté dans le logiciel CNS (Brünger *et al.*, 1998) en incluant toutes les données jusqu'à 2 Å. Les facteurs R et R_{libre} ont été calculés et suivis, à chacun des cycles, afin d'éviter tout sur-affinement du modèle. En alternance avec ces étapes, l'examen visuel des cartes de densité électronique 2Fo-Fc et Fo-Fc (tracées à 1 et 3σ, respectivement) a permis la construction et la modification manuelle du modèle, ainsi que l'incorporation en densité des ions, des molécules d'eau, d'acarbose et des résidus glucosyl. Du fait de la résolution et de la bonne qualité des cartes de densité électronique, le positionnement et l'orientation de chacun des cycles du maltoheptaose ou de l'acarbose ont pu être déterminés avec confiance. Les modèles atomiques des molécules d'acarbose et de glucose incluses dans le processus d'affinement proviennent de la banque de données de topologies et de paramètres HIC-Up (Kleywegt & Jones, 1998). Enfin, la géométrie des structures finales a été examinée avec les programmes PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) et WHATCHECK (Hooft *et al.*, 1996). Les statistiques d'affinement sont résumées dans le **Tableau 1**, page suivante.

	Complexe AMY1Δ9 Acarbose	Complexe AMY1Δ9_{D180A} Acarbose	Complexe AMY1Δ9_{D180A} Maltoheptaose
Longueur d'onde (Å)	1,5418	0,9500	0,9340
Température d'enregistrement (K)	100	100	100
Paramètres de maille - a, b, c (Å)	93,4; 72,9; 61,4	93,7; 73,5; 61,1	93,0; 72,5; 62,2
Groupe d'espace	P2 ₁ 2 ₁ 2	P2 ₁ 2 ₁ 2	P2 ₁ 2 ₁ 2
Echelle de résolution (Å)	17,3 – 2,0	39,5 – 2,0	39,1 – 2,0
Nombre total de réflexions	96013	114564	211756
Nombre de réflexions uniques	27344	25774	29146
Complétude moyenne des données (%)	94,7	88,9	100,0
Complétude des données dans la dernière coquille de résolution (%)	94,9	89,8	100,0
Redondance moyenne	3,5	4,4	7,3
Redondance dans la dernière coquille de résolution	3,1	4,4	7,0
Dernière coquille de résolution (Å)	2,05 – 2,00	2,05 – 2,00	2,05 – 2,00
R _{sym} * (%)	18,3	8,3	9,5
R _{sym} dans la dernière coquille de résolution (%)	38,7	31,5	31,3
I/σ(I) moyen	4,2	7,5	7,5
R _{factor} ** (%)	17,6	16,6	17,0
R _{free} *** (%)	23,0	22,6	22,0
Déviations (r.m.s.) de la géométrie idéale :			
Longueur des liaisons (Å)	0,010	0,013	0,010
Angles des liaisons (°)	1,53	1,6	1,43

$$* R_{sym} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I(hkl)_i - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I(hkl)}$$

$$** R = \frac{\sum_h \left| |F_{obs}(h)| - k |F_{calc}(h)| \right|}{\sum_h |F_{obs}(h)|} \quad \text{avec } k, \text{ facteur de mise à l'échelle.}$$

$$*** R_{free} = \frac{\sum_h \left| |F_{obs}(h)| - k |F_{calc}(h)| \right|}{\sum_h |F_{obs}(h)|} \quad \text{avec } k, \text{ facteur de mise à l'échelle. Facteur calculé à partir d'un ensemble-test constitué de 10\% des réflexions choisies aléatoirement.}$$

Tableau 1 : Statistiques d'enregistrement, de traitement des données, et d'affinement pour les complexes AMY1Δ9/acarbose, AMY1Δ9_{D180A}/acarbose et AMY1Δ9_{D180A}/maltoheptaose.

B/ Résultats et discussion :

1. Complexe entre le mutant inactif AMY1Δ9_{D180A} et le substrat maltoheptaose :

La structure de ce complexe montre la fixation du substrat au niveau des trois sites distincts présentés précédemment : le site actif (qui contient une molécule entière de maltoheptaose), le site de surface de fixation des granules d'amidon (montrant 5 cycles glucosyl sur 7) et le second site de surface en « pince à sucre » (« *sugar tongs* ») qui contient, lui aussi, 5 résidus glucosyl.

1.a) Examen du site actif et de la crevasse catalytique :

Dans cette région, les cartes de densité électronique nous ont permis de modéliser une molécule complète de maltoheptaose et de déterminer précisément l'orientation des 7 cycles glucosyl du substrat (voir **Figures 1 & 2**, pages suivantes). Ce dernier adopte une conformation spatiale ayant grossièrement la forme d'un S. Tous les résidus glucosyl sont en conformation chaise et le substrat occupe les sous-sites -1 (du côté réducteur) à -6 (coté non réducteur de la molécule), selon la nomenclature de Davies *et al.*, 1997. Le septième résidu glucosyl est situé au niveau d'un sous-site que nous nommerons -7 (voir **Figure 2**).

Par la suite, les résidus glucosyl seront nommés glc2000 à glc2006 de l'extrémité non réductrice du substrat vers son extrémité réductrice. Les groupements hydroxyle portés par les carbones C6 de glc2000, 2001, 2002 et 2003 pointent vers l'extérieur de la crevasse catalytique en direction du solvant, tandis que ces mêmes groupements sont orientés vers l'intérieur de la protéine pour glc2004, 2005 et 2006.

La fixation du maltoheptaose dans la crevasse catalytique fait intervenir trois types d'interactions : interactions directes par liaisons hydrogène entre des atomes du substrat et des acides aminés ; liaisons hydrogène indirectes par l'intermédiaire de molécules d'eau ; ou contacts et/ou empilements hydrophobes avec des acides aminés aromatiques. La liste des interactions directes est présentée dans le **Tableau 2-A**, plus loin. On peut constater que 15 liaisons hydrogène directes existent entre la molécule entière de maltoheptaose et l'enzyme. Huit de ces liaisons sont localisées au niveau de l'extrémité réductrice du substrat (glc2006). Deux liaisons hydrogène sont créées avec glc2000 et glc2002, et une avec glc2001, 2003 et 2005. Enfin, glc2004 ne définit aucune interaction directe avec l'enzyme.

En plus de ces interactions, on peut montrer l'existence de contacts hydrophobes impliquant Trp10 et glc2005. Des interactions indirectes par l'intermédiaire de molécules d'eau doivent être ajoutées à ce nombre relativement faible de contacts directs (pour comparaison, dans le complexe AMY2/acarbose, 15 liaisons hydrogène avaient été décrites entre la protéine et les trois cycles de la molécule d'acarbose tronquée). Une représentation schématique de ces interactions est présentée dans la **Figure 3**, plus loin.

Pour être complet, il existe 8 liaisons hydrogène intramoléculaires au sein du maltoheptaose fixé dans la crevasse catalytique (voir **Tableau 2-D**). Leur distribution est régulière, chaque couple de résidus glucosyl adjacent définissant une interaction intramoléculaire, à l'exception des couples glc2001/glc2002 et glc2004/glc2005 qui en possèdent deux.

La comparaison de la structure de ce complexe avec celle de AMY1Δ9 natif ne montre aucun mouvement de la chaîne principale ni de changements drastiques de position des chaînes latérales dans la région. Ainsi, tous les résidus impliqués dans l'interaction avec le maltoheptaose sont parfaitement superposés, à l'exception de Arg183. En effet, dans la structure native, ce résidu a été décrit en double conformation, sa chaîne latérale pouvant être orientée dans deux directions opposées. Dans le complexe avec le maltoheptaose, ce résidu n'adopte qu'une seule conformation et pointe en direction de glc2006. Arg183 n'interagit pas directement avec le substrat, mais sa stabilisation dans une conformation unique peut être expliquée par le fait qu'il contribue à la création d'un réseau de molécules d'eau impliquées dans des interactions indirectes entre glc2006 et des acides aminés voisins. Dans un même ordre d'idée, la chaîne latérale de Lys130 est réorientée par rapport à sa position dans la structure native de AMY1Δ9, de manière à interagir avec Wat1311 qui détermine une liaison hydrogène avec glc2003. Il apparaît donc que l'enzyme est capable de fixer le substrat sans modification de sa conformation globale ni réorientations majeures des chaînes latérales des acides aminés impliqués dans l'interaction enzyme / substrat.

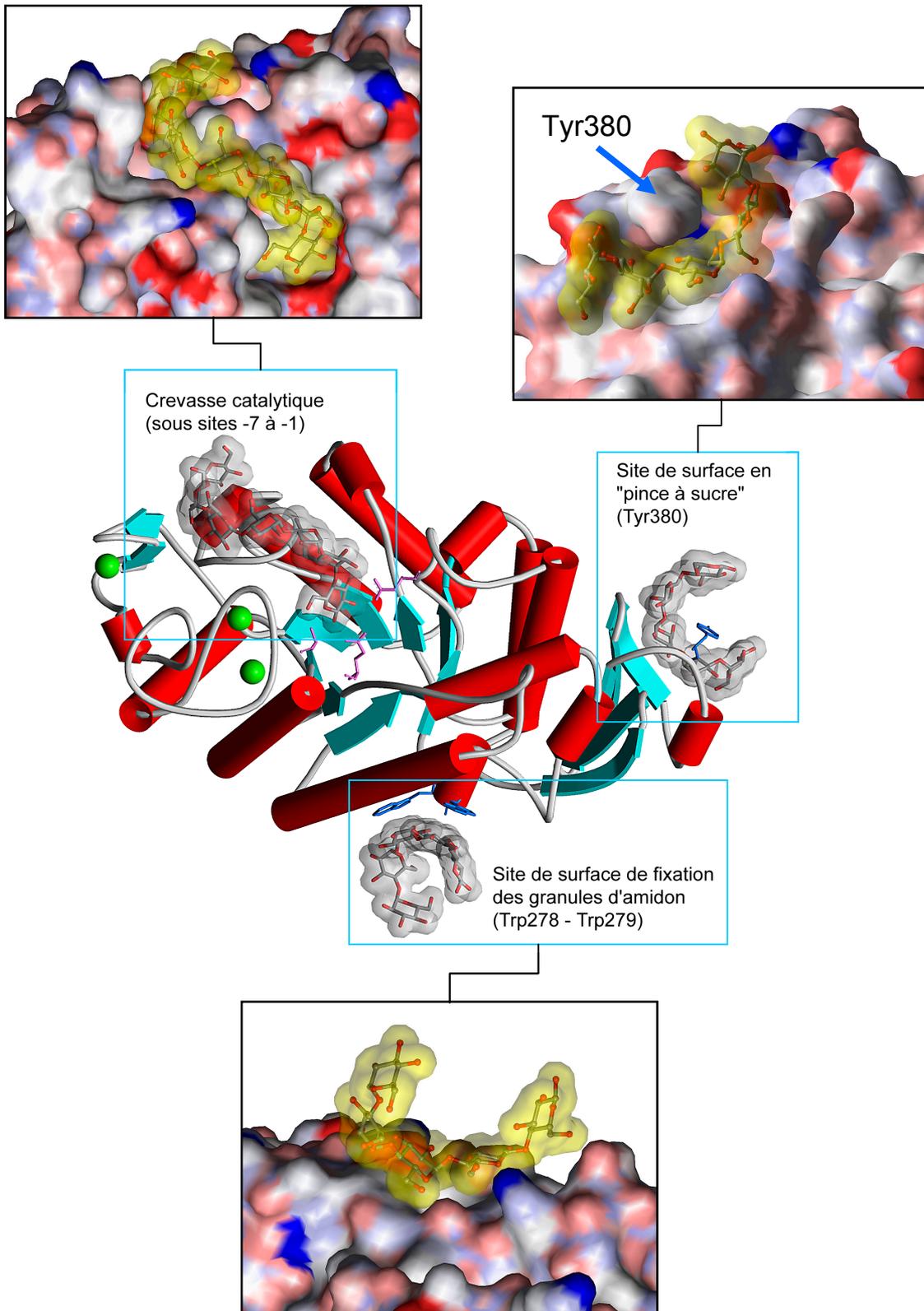


Figure 1 : Vues du complexe entre le mutant inactif $AMY1\Delta 9_{D180A}$ et le maltoheptaose. Les surfaces de van der Waals sont colorées en fonction des charges des résidus (bleu pour les charges positives, rouge pour les négatives). Sur la vue centrale, les résidus catalytiques sont colorés en violet, et les résidus impliqués dans les interactions avec le substrat au niveau des sites de surface, en bleu. Enfin, les 3 ions calcium sont montrés par les boules vertes.

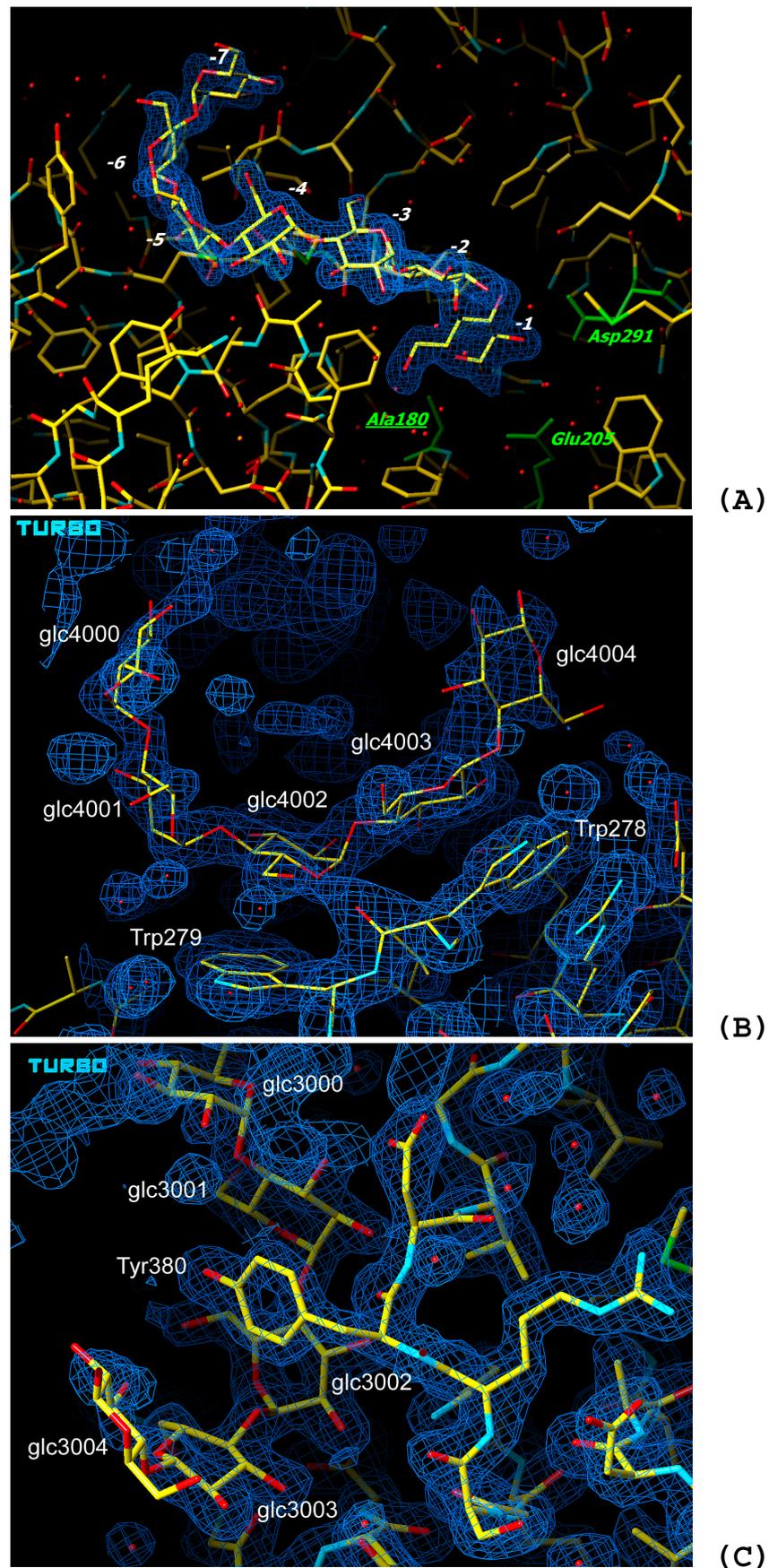
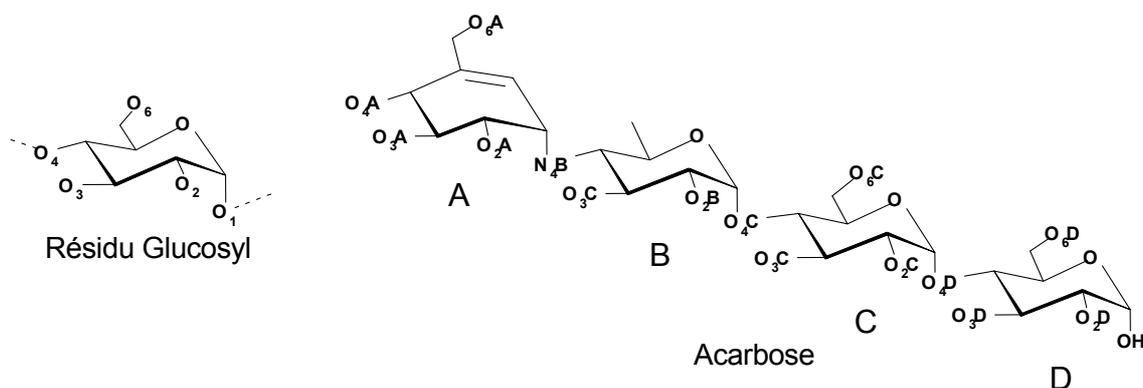


Figure 2 : Aspect de la carte de densité électronique $2F_o-F_c$ à 2 Å de résolution (tracée à 1σ) de la structure du complexe $AMY1\Delta 9_{D180A}$ / maltoheptaose. (A) vue de la crevasse catalytique et du site actif occupés par une molécule entière de maltoheptaose; (B) vue du site de surface de fixation des granules d'amidon contenant un maltopentaose; (C) vue du site de surface en « pince à sucre » avec une molécule de maltopentaose.

Résidus de AMY1A9 _{D180A}	Atomes du maltoheptaose	Distances (Å)	Résidus de AMY1A9 _{D180A}	Atomes de l'acarbose	Distances (Å)
A. Site actif					
His45-NE2	glc2000-O3	3,0	-	-	-
Val47-O	glc2000-O4	3,3	-	-	-
Cys95-SG	glc2002-O2	3,1	-	-	-
Ala96-O	glc2001-O2	2,6	-	-	-
Ala146-O	glc2002-O2	2,9	Ala146-O	aca-O3A	3,0
Ala146-O	glc2003-O4	2,8	Ala146-O	aca-O4A	3,3
Arg178-NH1	glc2006-O2	3,0	Arg178-NH1	aca-O1D	3,0
Arg178-NH2	glc2006-O1	3,0	Arg178-NH2	aca-O2D	3,0
Phe181-N (*)	glc2006-O1	3,4	Phe181-N	aca-O1D	3,3
Glu205-OE1	glc2006-O1	2,6	Glu205-OE1	aca-O1D	2,4
His290-NE2	glc2006-O2	3,0	His290-NE2	aca-O2D	2,8
His290-NE2	glc2006-O3	3,2	His290-NE2	aca-O3D	3,0
Asp291-OD1	glc2006-O3	2,8	Asp291-OD1	aca-O3D	2,7
Asp291-OD2	glc2006-O2	2,6	Asp291-OD2	aca-O2D	2,5
Gln296-OE1	glc2005-O2	2,9	Gln296-OE1	aca-O2C	2,8
B. Site de surface de fixation des granules d'amidon					
Gln227-NE2	glc3003-O2	2,5	Gln227-NE2	aca-O3C	3,0
Gln227-OE1	glc3003-O3	2,8	Gln227-OE1	aca-O2C	2,6
Asp234-OD1	glc3002-O2	2,7	Asp234-OD1	aca-O3B	2,7
Asp234-OD2	glc3002-O3	2,7	Asp234-OD2	aca-O2B	2,6
-	-	-	Lys271-NZ	aca-O2D	3,2
Trp278-O	glc3002-O6	2,6	-	-	-
C. Site de surface du domaine C en « pince à sucre »					
Lys375-NZ	glc4002-O2	3,0	Lys375-NZ	aca-O2B	2,9
Lys375-NZ	glc4002-O3	3,3	Lys375-NZ	aca-O3B	3,1
Tyr380-O	glc4001-O2	2,8	Tyr380-O	aca-O2A	2,8
Tyr380-O	glc4001-O3	2,8	Tyr380-O	aca-O3B	2,6
Asp381-OD2	glc4001-O3	2,7	Asp381-OD1	aca-O3A	2,6
Val382-N	glc4001-O2	3,1	Val382-N	aca-O2A	2,9
Thr392-OG1	glc4001-O6	2,9	-	-	-
His395-ND1	glc4003-O6	2,7	His395-ND1	aca-O6A	2,7
Gly396-O	glc4003-O6	3,2	-	-	-
Asp398-N	glc4003-O3	2,8	Asp398-N	aca-O3C	2,9
Asp398-OD1	glc4003-O3	3,2	Asp398-OD1	aca-O3C	3,3
-	-	-	Trp402-NE1	aca-O6A	3,0
D. Liaisons hydrogène intramoléculaires					
<i>Maltoheptaose au niveau du site actif</i>			<i>Fragment d'acarbose au niveau du site actif</i>		
glc2000-O2	glc2001-O3	2,7	-	-	-
glc2001-O2	glc2002-O3	2,7	-	-	-
glc2001-O5	glc2002-O6	3,3	-	-	-
glc2002-O2	glc2003-O4	2,7	aca-O2B	aca-O4C	2,7
-	-	-	aca-O2A	aca-O3B	2,9
glc2003-O2	glc2004-O3	2,5	-	-	-
glc2004-O2	glc2005-O4	2,7	-	-	-
glc2004-O6	glc2005-O6	3,0	-	-	-
glc2005-O2	glc2006-O4	2,7	aca-O2C	aca-O4D	2,7
<i>Fragment de maltoheptaose au niveau du site de surface de fixation des granules d'amidon</i>			<i>Acarbose au niveau du site de surface de fixation des granules d'amidon</i>		
glc3000-O2	glc3001-O3	3,1	-	-	-
glc3000-O2	glc3001-O4	2,8	-	-	-
glc3001-O2	glc3002-O3	3,0	aca-O2A	aca-O3B	3,5

glc3002-O2	glc3003-O3	2,9	aca-O2B	aca-O3C	3,1
glc3002-O2	glc3003-O4	2,7	aca-O2B	aca-O4C	2,8
glc3002-O2	glc3003-O4	2,8	aca-O2C	aca-O4D	2,7
Fragment de maltoheptaose au niveau du site de surface en « pince à sucre »			Acarbose au niveau du site de surface en « pince à sucre »		
glc4000-O2	glc4001-O4	2,8	-	-	-
glc4001-O2	glc4002-O4	2,8	-	-	-
glc4002-O2	glc4003-O3	3,2	aca-O2A	aca-O3B	3,7
-	-	-	aca-O2B	aca-O3C	3,1
glc4002-O2	glc4003-O4	2,7	aca-O2B	aca-O4C	2,8
glc4003-O2	glc4004-O4	2,7	aca-O2C	aca-O4D	2,7
-	-	-	aca-O2C	aca-O6D	3,6
-	-	-	aca-O3D	aca-O6C	2,9

Tableau 2 : Interactions directes par liaison hydrogène dans les complexes *AMY1Δ^{9D180A}/maltoheptaose* et *AMY1Δ^{9D180A}/acarbose*. (*) Interaction non représentée dans la **Figure 1**, car la distance est supérieure à 3,3 Å (distance seuil utilisée par le logiciel LIGPLOT de Wallace et al., 1995). On rappelle, par le schéma ci-dessous, la nomenclature utilisée pour l'identification des atomes de l'acarbose et des résidus glucosyl du maltoheptaose :



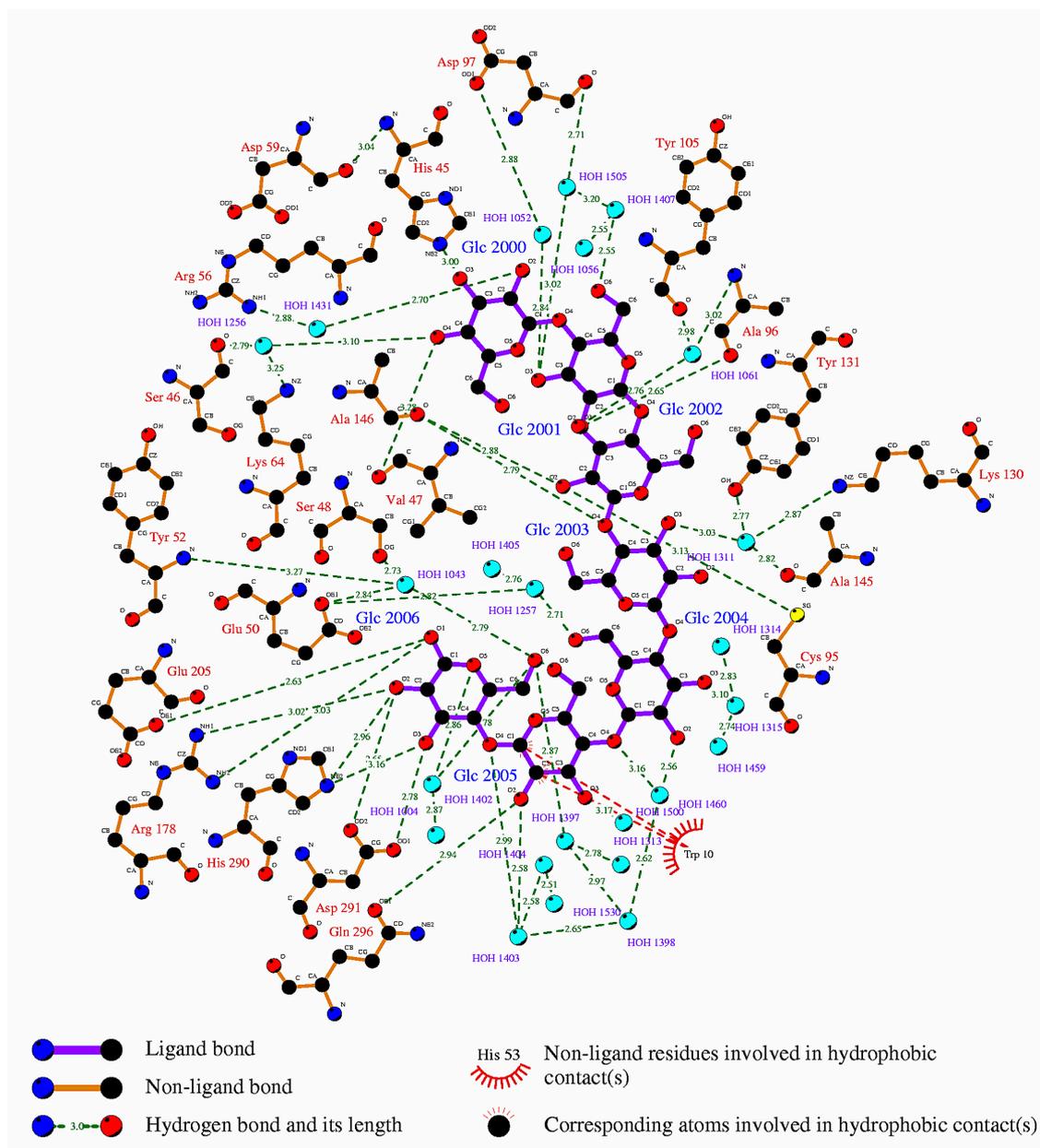


Figure 3 : Diagramme schématique du réseau de liaisons hydrogène dans la crevasse catalytique et le site actif du complexe AMY1 Δ 9_{D180A} / maltoheptaose.

Le complexe AMY1 Δ 9_{D180A} / maltoheptaose permet, pour la première fois, de définir par une structure expérimentale tous les sous-sites négatifs chez AMY1 et de montrer les résidus impliqués dans la fixation et la reconnaissance des substrats (voir **Figure 3**).

- Le sous-site -1 (contenant glc2006) est défini par les résidus Arg178, Phe181, Glu205, His290 et Asp291. Glu205 et Asp291 sont deux résidus catalytiques. Dans l'enzyme native, nous devons ajouter Asp180, muté en Ala dans le présent complexe. De plus, Tyr52 détermine un empilement hydrophobe par son groupement aromatique avec le plan de glc2006, selon une distance moyenne d'environ 4,4 Å. Enfin, Glu50 définit une interaction indirecte par l'intermédiaire de la molécule d'eau Wat1043.
- Le sous-site -2 (glc2005) contient Gln296. Trp10, qui détermine deux contacts hydrophobes avec glc2005, est cependant trop éloigné pour réaliser un empilement hydrophobe. De plus, l'orientation des plans des deux molécules ne le permet pas.

- Le sous-site -3 (glc2004) n'est pas défini par un résidu particulier. En effet, il n'existe aucun contact direct entre glc2004 et un acide aminé avoisinant. Une interaction indirecte avec Glu50 existe cependant par l'intermédiaire de Wat1257.
- Le sous-site -4 (glc2003) contient le résidu Ala146 interagissant avec l'atome d'oxygène de la liaison O-glycosidique. En outre, 3 interactions indirectes existent, toutes par l'intermédiaire de Wat1311, et mettent en jeu dans la seconde sphère d'interaction, les résidus Lys130, Tyr131 et Ala145.
- Le sous-site -5 (glc2002) est défini par les résidus Ala146 et Cys95. Une interaction indirecte est réalisée par le biais de Wat1061 avec Ala96 et Tyr105. Il est intéressant de noter qu'une densité électronique inexplicée, observée à l'extrémité de la chaîne latérale de Cys95 dans la structure native de AMY1Δ9, est à nouveau présente. Cependant, elle ne semble pas du tout interférer avec la fixation du substrat.
- Le sous-site -6 (glc2001) est constitué de Ala96 et d'une interaction indirecte avec Asp97 par l'intermédiaire des molécules d'eau Wat1052 et Wat1505. De manière fort intéressante, glc2001 est situé entre Val47 et Tyr105, mais aucun contact hydrophobe n'existe entre le substrat et l'un de ces deux résidus. L'espace entre eux peut ainsi être considéré comme « l'entrée » de la crevasse catalytique. En outre, le plan de glc2001 n'est pas parfaitement parallèle au plan aromatique de Tyr105, ce qui détermine un empilement hydrophobe imparfait. Cette interaction pourrait être meilleure en l'absence d'un résidu glucosyl additionnel à l'extrémité non réductrice de glc2001. En effet, il semble que glc2000 force glc2001 à s'éloigner de Tyr105.
- Un point important révélé par la structure de ce complexe, est la présence d'un dernier sous-site négatif que nous avons précédemment défini comme étant le -7. Ce dernier contient le résidu glucosyl glc2000 qui représente l'extrémité non réductrice du maltoheptaose. Il interagit avec la protéine au niveau des résidus His45 et Val47. Deux interactions indirectes par l'intermédiaire des molécules d'eau Wat1431 et Wat1256 existent avec Arg56 et Lys64.

En terme d'organisation spatiale, glc2000, 2001, 2002 et 2003 forment un demi cercle dont l'atome Val47-CG1 est approximativement le centre. Au niveau structural, la définition du sous-site -7 est renforcée par le fait que la densité électronique décrivant glc2000 est parfaitement définie bien que la moyenne des facteurs d'agitation thermique de ses atomes ($42,9 \text{ \AA}^2$) soit assez élevée.

1.b) Site de surface de fixation des granules d'amidon :

Au niveau de ce site, le complexe AMY1Δ9_{D180A} / maltoheptaose montre la présence de 5 résidus glucosyl, nommés glc3000 à glc3004, de l'extrémité non réductrice à l'extrémité réductrice de la molécule (voir **Figures 1 & 2**). Aucune densité électronique n'a été observée pour les deux cycles manquants à cause de leur localisation dans le solvant et de l'absence de stabilisation par des contacts avec la protéine. Les interactions directes par liaisons hydrogène du pentaose avec l'enzyme sont résumées dans le **Tableau 2-B**, de même que les interactions intramoléculaires stabilisant la conformation de la molécule de sucre (**Tableau 2-D**).

Comme dans le cas du complexe entre AMY1Δ9 et l'analogue de substrat thio-DP4, trois résidus sont impliqués dans la fixation du substrat : Gln227, Asp234 et l'atome Trp278-O. Deux remarquables empilements hydrophobes sont aussi conservés et impliquent les couples Trp278 / glc3003 et Trp279 / glc3002. Enfin, un réseau de molécules d'eau organisées détermine plusieurs interactions indirectes entre l'enzyme et le pentaose.

La superposition de la structure native de AMY1Δ9 avec celles du présent complexe et avec le thio-DP4, confirme la remarquable conservation des positions spatiales des résidus de la région. Ceci renforce notre hypothèse concernant l'importance de la géométrie de ce site dans le

processus de fixation des substrats. Nous avons mentionné que la densité électronique pour les cycles du thio-DP4 au niveau de ce site était discontinue, ce qui semblait montrer que l'analogie de substrat ne s'accommodait pas parfaitement à sa surface.

Au contraire, dans le cas du maltoheptaose, la densité électronique pour les cycles visibles est parfaitement continue (voir **Figure 2**), ce qui prouve que l'occupation de ladite molécule est supérieure à celle du thio-DP4 ; on précise que cette interprétation est possible car les deux structures ont la même résolution et possèdent des statistiques cristallographiques et d'affinement qui permettent la comparaison.

1.c) Site de surface du domaine C en « pince à sucre » :

Comme pour le site précédent, 5 résidus glucosyl sur 7 sont observés au niveau du site du domaine C dit « en pince à sucre » (voir **Figures 1 & 2**). Ces résidus sont numérotés de glc4000 à glc4004, de l'extrémité non réductrice à l'extrémité réductrice de la molécule. Ce pentaose, dans sa conformation globale, forme un demi-cercle, dont le centre approximatif est l'atome Tyr380-OH. Comme précédemment, l'absence de densité électronique pour deux cycles glucosyl est expliquée par le fait que ces derniers sont dans le solvant et ne peuvent être stabilisés par des contacts avec la protéine. Les **Tableaux 2-C** et **2-D** présentent respectivement les liaisons hydrogène directes entre le substrat et l'enzyme et les interactions intramoléculaires stabilisant le pentaose.

Comme nous l'avons prouvé pour le complexe avec le thio-DP4, la fixation d'un substrat au niveau de ce site entraîne un mouvement de la chaîne principale autour de Tyr380 et la réorientation de ce résidu. Ainsi, les déplacements mesurés dans le cas de la fixation du maltoheptaose, sont respectivement de 0,8 et 3 Å pour le C α et la fonction hydroxyle de la chaîne latérale de Tyr380. On rappelle que ces valeurs étaient de 1,1 et 3,1 Å dans le complexe AMY1 Δ 9 / thio-DP4.

2. Complexe entre le mutant inactif AMY1 Δ 9_{D180A} et l'acarbose :

En complément du complexe précédemment décrit, la structure de l'association entre AMY1 Δ 9_{D180A} et l'acarbose a été déterminée à 2 Å de résolution. Le site actif et les deux sites de surface sont tous occupés par une molécule complète d'inhibiteur. La qualité des cartes de densité électronique nous a permis de positionner précisément tous les atomes de l'inhibiteur.

2.a) Site actif :

L'inhibiteur couvre les sous-sites -1 (extrémité réductrice de l'acarbose) à -4 (extrémité non réductrice). Un ensemble de 11 interactions directes par liaisons hydrogène existe entre AMY1 et l'acarbose, dont 8 au niveau du sous-site -1 (cycle D), une pour le sous-site -2 (cycle C), et enfin 2 pour le sous-site -4 (cycle A).

La comparaison de ce complexe avec celui de AMY1 Δ 9_{D180A} / maltoheptaose montre que tous les atomes des cycles C et D de l'acarbose (formant l'unité maltose) sont parfaitement superposés avec ceux du maltoheptaose avec, pour conséquence, la conservation des interactions décrites plus haut (voir **Tableau 2-A**).

Il est intéressant de noter que la chaîne latérale de Arg183 est orientée dans une direction opposée à celle observée dans le complexe mutant inactif / maltoheptaose. On constate que ces deux orientations correspondent en fait à la double conformation identifiée pour ce résidu dans la structure native de AMY1 Δ 9.

Le cycle B de l'acarbose ne détermine aucun contact direct avec l'enzyme et, enfin, le cycle A, situé dans le sous-site -4, montre une subtile réorientation comparativement à glc2003, son « homologue » dans le complexe avec le maltoheptaose. Ceci conduit à l'apparition d'une liaison supplémentaire, non observée auparavant, avec Ala146-O. Ce déplacement peut être expliqué par la géométrie de la liaison N-glycosidique de l'unité acarviosine. De plus, dans le cas du maltoheptaose, la présence d'un sucre supplémentaire dans le sous-site -5 forçait le

substrat à s'enrouler autour de Val47. Ceci est en accord avec une observation précédente qui mentionnait que Val47 et Tyr105 définissaient l'entrée de la crevasse catalytique, ces deux résidus pouvant servir de guide pour le substrat en lui conférant une conformation optimale lors de son approche du site de coupure.

2.b) Site de surface de fixation des granules d'amidon :

Les cycles B et C de l'acarbose définissent un empilement hydrophobe respectivement avec Trp279 et Trp278, et sont parfaitement superposables avec glc3002 et glc3003 du complexe avec le maltoheptaose. Les interactions enzyme / acarbose au niveau de ce site sont très comparables à celles existantes dans ce dernier complexe (voir **Tableau 2-B**). A l'inverse, les positions des cycles A et D diffèrent notablement. En effet, l'inhibiteur est moins circularisé et sa structure globale est plus plane. Il en résulte l'apparition d'une nouvelle liaison hydrogène avec l'acide aminé Lys271 (voir **Tableau 2-B**).

2.c) Site de surface du domaine C en « pince à sucre » :

Les cycles A, B, C et D de l'acarbose sont globalement bien superposés aux unités glucosyl glc4001, 4002, 4003 et 4004 du fragment de maltoheptaose, ce qui conduit à la conservation de la majorité des interactions précédemment décrites (voir **Tableau 2-C**).

On peut constater que le cycle D de l'acarbose est tourné de 180° par rapport à glc4004, son groupe hydroxyle porté par le C6 pointant ainsi dans la direction opposée. La chaîne principale, comme les chaînes latérales, ne présentent pas de mouvement ou de réorientation notables comparativement au complexe avec le maltoheptaose. Enfin, l'amplitude de basculement de Tyr380 est très comparable aux valeurs relevées dans les complexes précédents : respectivement 1,2 et 3,4 Å pour Tyr380-C_α et Tyr380-OH.

3. Complexe entre AMY1Δ9 et l'acarbose :

Le dernier complexe dont nous avons résolu la structure à 2,0 Å est celui de l'enzyme sauvage AMY1Δ9 avec l'inhibiteur acarbose. L'obtention de ce complexe nous a permis de le comparer avec le complexe AMY2 / acarbose de structure connue (Kadziola *et al.*, 1998).

Comme précédemment, les trois sites de fixation de AMY1Δ9 sont occupés (site actif, site de surface de fixation des granules d'amidon et site de surface en « pince à sucre »). Ainsi, le site de surface de fixation des granules d'amidon contient une molécule d'acarbose tronquée (composant 2) tandis que le site de surface en « pince à sucre » est occupé par une molécule complète de l'inhibiteur.

Le **Tableau 3**, page suivante, répertorie les interactions existantes au niveau de ces trois sites et les compare à celles existantes dans le complexe AMY2/acarbose.

3.a) Les sites de surface :

Le complexe AMY1Δ9_{D180A} / maltoheptaose montrait un pentaose au niveau du site de fixation des granules d'amidon ; or nous n'observons ici qu'une molécule tronquée d'acarbose (le trisaccharide composant 2). Cette distinction permet de penser que la molécule d'acarbose a subi une hydrolyse et que composant 2 ainsi obtenu est allé ensuite se fixer sur ledit site de surface. Par contre, le site en « pince à sucre » contient une molécule complète d'acarbose. Il semblerait ainsi que ce site possède une meilleure affinité pour l'acarbose que pour le composant 2, à l'inverse du site de fixation des granules d'amidon.

On pourrait étendre cette conclusion à des substrats naturels et émettre l'hypothèse que le site en « pince à sucre » a plus d'affinité pour les substrats longs que pour les petits oligosaccharides.

Résidus de AMY1A9	Atomes de l'acarbose	Distances (Å)	Résidus de AMY2	Atomes de l'acarbose	Distances (Å)
A. Site actif					
Tyr52-O	aca-O6A	3,6	Tyr51-O	aca-O6A	3,2
His93-NE2	aca-O6A	3,0	His92-NE2	aca-O6A	3,2
Arg178-NH2	aca-O2A	3,0	Arg177-NH1	aca-O2A	3,0
Asp180-OD2	aca-O6A	2,8	Asp179-OD2	aca-O6A	2,9
<u>Arg183-NH1</u>	aca-O2C	2,8	<u>Lys182-NZ</u>	aca-O3C	3,0
Glu205-OE1	aca-O3B	2,7	Glu204-OE1	aca-N4B	2,8
Glu205-OE2	aca-N4B	2,8	Glu204-OE2	aca-O3B	2,6
Trp207-O	aca-O3C	2,7	Trp206-O	aca-O3C	2,8
-	-	-	<u>Ser208-N</u>	aca-O2C	3,5
-	-	-	<u>Ser208-OG</u>	aca-O2C	3,2
His290-NE2	aca-O2A	2,8	His288-NE2	aca-O2A	2,9
His290-NE2	aca-O3A	2,9	His288-NE2	aca-O3A	2,8
Asp291-OD1	aca-O3B	2,6	Asp289-OD1	aca-O3A	2,8
Asp291-OD2	aca-N4B	3,1	Asp289-OD2	aca-N4B	3,2
Asp291-OD2	aca-O2A	2,5	Asp289-OD2	aca-O2A	2,7
B. Site de surface de fixation des granules d'amidon					
Gln227-OE1	aca-O3B	3,0	Gln226-OE1	aca-O3B	2,8
Gln227-NE2	aca-O2B	2,7	Gln226-NE2	aca-O2B	2,9
Asp234-OD1	aca-O3A	2,7	Asp233-OD1*	aca-O2A	2,9
Asp234-OD2	aca-O2A	2,5	Asp233-OD2*	aca-O3A	3,1
-	-	-	Trp276-O	aca-O6A	3,0
C. Site de surface du domaine C en « pince à sucre »					
Lys375-NZ	aca-O2B	2,9	-	-	-
Lys375-NZ	aca-O3B	3,2	-	-	-
Tyr380-O	aca-O2A	2,8	-	-	-
Tyr380-O	aca-O3B	2,5	-	-	-
Asp381-OD2	aca-O3A	3,0	-	-	-
Val382-N	aca-O2A	2,8	-	-	-
Thr392-OG1	aca-O6A	3,0	-	-	-
Asp398-N	aca-O3C	2,9	-	-	-
His395-ND1	aca-O6C	2,9	-	-	-

Tableau 3 : Tableau comparatif des interactions directes par liaisons hydrogène entre les complexes AMY1A9/acarbose et AMY2/acarbose au niveau des trois sites de fixation. Les résidus non conservés entre AMY1 et AMY2 sont soulignés. * la différence de nomenclature des atomes des acides aminés explique l'inversion des liaisons [Asp233-OD1, Asp233-OD2] / [aca-O3A, aca-O6A] entre AMY1 et AMY2.

Cette distinction peut s'expliquer par la structuration des deux sites : en effet, le site de fixation des granules d'amidon est un site ouvert et largement exposé au solvant. De longs substrats, par définition flexibles et mobiles, n'y sont stabilisés que par un petit nombre d'interactions. Un substrat court, possédant moins de degrés de liberté et une agitation moindre, y sera plus facilement soutenu. A l'inverse, le site en « pince à sucre » est défini par une gorge dans laquelle vient s'enchaîner le substrat et où Tyr380 l'y positionne et stabilise.

Le nombre d'interactions y est plus important que dans le site de fixation des granules d'amidon, ce qui laisse à penser qu'un substrat long plus flexible, y sera certainement mieux stabilisé.

3.b) Comparaison des sites actifs dans les complexes AMY1 Δ 9/acarbose et AMY2/acarbose :

Le **Tableau 3** répertorie les interactions enzyme / acarbose existantes au niveau du site actif et les compare à celles existantes dans le complexe AMY2/acarbose. La **Figure 4**, ci-dessous, présente la superposition spatiale des deux complexes focalisée au niveau du site actif. La comparaison des deux structures montre leur remarquable superposabilité. En effet, on ne trouve que deux résidus non conservés entre AMY1 et AMY2. Ainsi, Arg183_{AMY1} est remplacé par Lys182 chez AMY2. Cette substitution n'entraîne cependant pas de modification notable dans l'interaction enzyme / acarbose, car les deux résidus déterminent une liaison hydrogène avec l'inhibiteur. La deuxième différence est l'absence de Ser208_{AMY2} chez AMY1 (remplacée par Asn209). Cette substitution provoque la disparition de deux liaisons hydrogène avec le cycle C de l'acarbose, au niveau du sous-site +2.

La conséquence de cette substitution doit être relativisée, car les deux liaisons hydrogène définies par Ser208_{AMY2} ont des longueurs de 3,2 et 3,5 Å, valeurs qui sont supérieures ou égales aux autres distances d'interactions. Enfin, la moyenne de toutes ces distances pour AMY1 et AMY2, respectivement, est de 2,9 Å et 3 Å, ce qui n'est pas significatif vu la différence de résolution des deux structures (2 et 2,8 Å, respectivement).

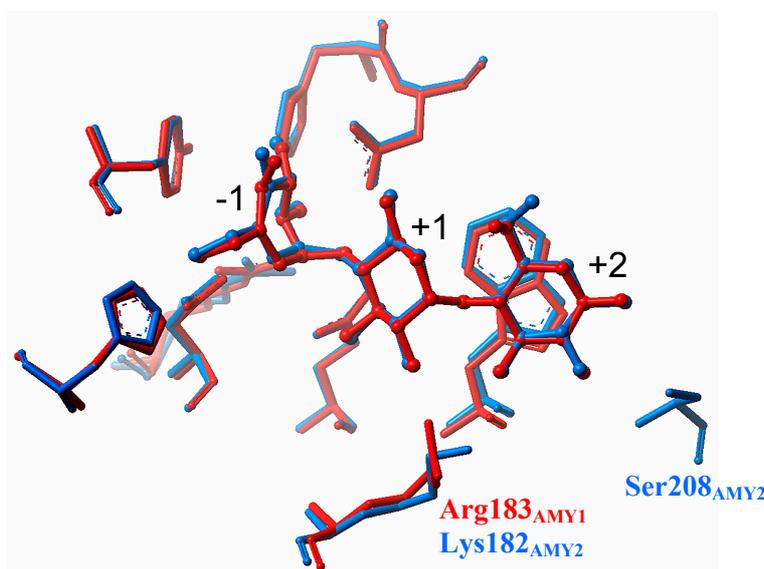


Figure 4 : Superposition des résidus impliqués dans la fixation de l'acarbose aux sites actifs de AMY1 Δ 9 et AMY2. Seuls les résidus définissant une interaction directe par liaison hydrogène sont représentés. AMY1 est coloré en rouge, AMY2 en bleu.

4. Synthèse des résultats et description structurale des sous-sites -7 à +2 chez AMY1 :

La combinaison des interactions mises en évidence dans le complexe AMY1 Δ 9_{D180A} / maltoheptaose avec celles montrées dans le complexe AMY1 Δ 9 / acarbose nous permet de définir structurellement les sous-sites -7 à +2 et les acides aminés qui y sont rattachés (voir **Tableau 4** et **Figure 5**, page suivante).

Ces résultats confirment l'existence d'un sous-site -7, non identifié par les études de modélisation moléculaire (André *et al.*, 1999), et hypothétique d'après des travaux de cartographie enzymatique (MacGregor *et al.*, 1994). Ainsi, seuls les sous-sites +3 et +4 ne sont pas encore définis structurellement, bien que l'on puisse accorder une bonne confiance aux travaux de modélisation moléculaire. En effet, nos résultats sont en accord avec les conclusions issues de la simulation d'interaction d'un maltodécaose dans la crevasse catalytique de AMY2 (André *et al.*, 1999), du moins pour les sous-sites -6 à +2. Nous montrons, ainsi, l'implication des mêmes résidus chez AMY1 et AMY2 à l'exception, bien évidemment, des quelques substitutions existantes entre les deux isoenzymes.

Sous-sites de AMY1	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	+1	+2
Interactions directes par liaison hydrogène	His45 Val47	Ala96	Ala146 Cys95	Ala146	-	Gln296	His93 Arg178 Asp180 Phe181 Glu205 His290 Asp291	Glu205 Asp291	Arg183 Trp207
Interactions indirectes par l'intermédiaire de molécules d'eau	Arg56 Lys64	Asp97	Ala96 Tyr105	Lys130 Tyr131 Ala145	Glu50	-	Glu50 Gln296	Glu205 Trp207	-
Résidus impliqués dans des empilements hydrophobes	-	Tyr105	-	-	-	-	Tyr52	-	Trp207

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des acides aminés définissant les sous-sites de AMY1 sur la base des études structurales des complexes AMY1 Δ _{9D180A}/maltoheptaose et AMY1 Δ ₉/acarbose. Les résidus catalytiques sont colorés en bleu.

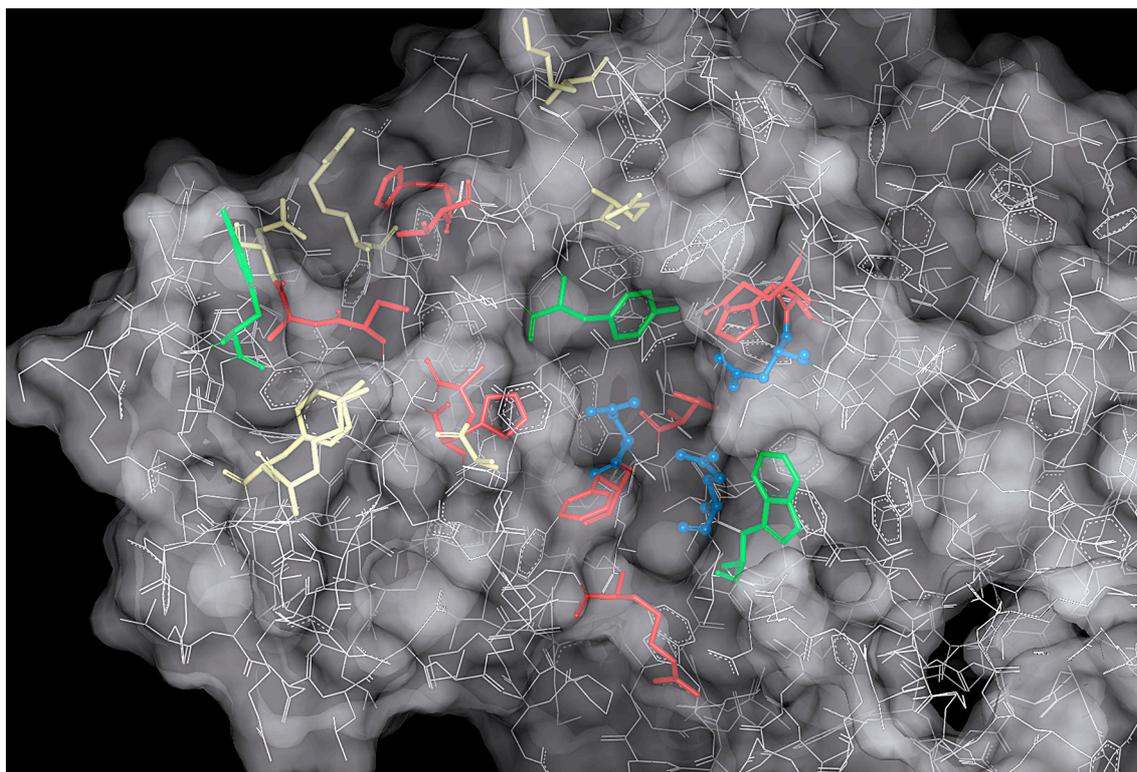


Figure 5 : Représentation de surface de la zone de la crevasse catalytique de AMY1 Δ ₉ avec mise en évidence des acides aminés définissant les sous-sites -7 à +2. Les trois résidus catalytiques sont indiqués en bleu ; les résidus impliqués dans des interactions directes par liaisons hydrogène avec le substrat sont colorés en rouge ; les résidus déterminant des liaisons indirectes par le biais de molécules d'eau, en jaune ; enfin, les résidus formant des empilements hydrophobes avec des cycles glucosyl sont colorés en vert.

5. Hypothèses de mécanisme d'action de AMY1 :

5.a) Rôle des sites de surface :

Comparé à AMY2, AMY1 dégrade plus efficacement les granules d'amidon et démontre une affinité supérieure pour les substrats en général (voir *Introduction Bibliographique*, page 56). L'analyse des sous-sites des deux isoenzymes ne montre pas de différences majeures, et des études plus poussées (en cours), notamment avec des mutants ciblés, permettront certainement de mettre en évidence des variations subtiles qui distinguent les deux isoenzymes au niveau de leurs propriétés enzymatiques. Par contre, la présence du site en « pince à sucre » chez AMY1, non observé chez AMY2, est une différence structurale évidente et déterminante. Même si les deux sites de surface de AMY1 ne sont pas directement impliqués dans l'activité catalytique de l'enzyme, ils contribuent, sans aucun doute, à la fixation du substrat en solution et à l'augmentation d'affinité observée.

L'étude du positionnement des molécules de maltoheptaose au niveau des sites de surface et de la crevasse catalytique de AMY1 montre que ceux-ci semblent indépendants. En effet, outre la distance importante qui les sépare, il semble difficile d'imaginer qu'une chaîne polysaccharidique puisse les relier. Le complexe avec le maltoheptaose révèle qu'un même polysaccharide ne pourrait joindre les deux sites de surface. En effet, les extrémités réductrices des chaînes présentes dans les deux sites se « font face » si l'on essaie de les relier. La même conclusion peut être tirée pour une molécule joignant la crevasse catalytique et l'un des sites de surface. Ainsi, pour qu'une même chaîne polysaccharidique puisse joindre la crevasse et l'un ou l'autre des sites de surface, elle devrait s'enrouler autour l'enzyme sur une longue distance, ce qui semble très improbable. Dans cette hypothèse, AMY1 pourrait interagir simultanément avec trois chaînes polysaccharidiques distinctes, contre seulement deux pour AMY2.

Quel rôle peut-on donner aux deux sites de surface de AMY1 dans des conditions *in vivo* ? Les résultats de notre étude sont très loin de pouvoir donner une réponse à cette interrogation. Nous proposons, comme première hypothèse, que les deux sites permettraient l'interaction de l'enzyme à la surface des substrats d'amylose et d'amylopectine. En effet, nous avons montré que la chaîne du maltoheptaose, au niveau de ces sites, avait une forte tendance à se circulariser. De manière fort intéressante, si l'on complète ce début de cycle, on pourrait obtenir une molécule d' α -cyclodextrine (6 résidus glucosyl) ou de β -cyclodextrine (7 résidus). Les travaux de Weselake & Hill (1983) et de Gibson & Svensson (1987) ont d'ailleurs montré que AMY2 pouvait fixer des β -cyclodextrines au niveau du site de fixation des granules d'amidon. L'amylose possède une organisation hélicoïdale où chaque tour d'hélice contient 6 résidus glucosyl (voir *Introduction Bibliographique*, page 24). Il apparaît, ainsi, que les deux sites de surface de AMY1 (ou le site de fixation des granules d'amidon de AMY2) pourraient naturellement interagir avec la chaîne d'amylose dans son repliement naturel.

Nous proposons, en conclusion, que les sites de surface de AMY1 autorisent l'enzyme à se fixer à l'amylose et/ou à s'adsorber à la surface de l'amylopectine. Compte tenu de la spécificité des deux sites de surface, on peut imaginer qu'ils permettent aussi de positionner et/ou d'orienter l'enzyme en vue de faciliter l'accès d'autres chaînes polysaccharidiques au site actif. Enfin, selon une troisième hypothèse, le site de surface en « pince à sucre » pourrait contribuer à la déstructuration de la structure hélicoïdale de l'amylose, Tyr380 jouant le rôle de « tenaille moléculaire » par son insertion dans les structures hélicoïdales et/ou lamellaires de l'amylose.

5.b) Mécanisme d'hydrolyse :

Nous avons pu constater, grâce à la comparaison structurale des complexes AMY1 / acarbose et AMY2 / acarbose, la remarquable similarité des sous-sites -1, +1 et +2 des deux isoenzymes. Tous les résidus impliqués dans l'interaction avec l'inhibiteur sont parfaitement superposables, de même que les trois acides aminés catalytiques. On retrouve également, chez AMY1, la poche d'eau mise en évidence chez AMY2. Enfin, la molécule d'eau localisée entre Glu204 et Asp289 (numérotation de AMY2) et proposée comme étant la molécule d'eau catalytique, est parfaitement conservée chez AMY1.

Face à ce nombre impressionnant de points communs, nous ne pouvons pas montrer de particularités propres à l'un des deux isoenzymes. Ainsi, nous pensons que le mécanisme d'hydrolyse présumé, décrit pour AMY2 (Kadziola *et al.*, 1998 et voir *Introduction Bibliographique*, page 53), est en tout point transposable à AMY1, et notre étude n'apporte pas d'élément additionnel à cette proposition de mécanisme.

6. Similitudes structurales entre AMY1 et la CGTase de *Bacillus circulans* :

Les CGTases font partie de la famille des α -amylases et possèdent la double activité de coupure des liaisons α -(1,4) (selon un mécanisme de rétion) et de formation des cyclodextrines (voir *Introduction Bibliographique*, page 28 et suivantes). Les CGTases proviennent de microorganismes et n'existent pas chez les animaux ou les plantes. Il a été montré que la CGTase de *Bacillus circulans* (souche 251), pouvait fixer des molécules d' α - ou de γ -cyclodextrines sur deux sites de surface au niveau de son domaine E (Knegtel *et al.*, 1995). Enfin, la fixation de β -cyclodextrines a également été démontrée (Villette *et al.*, 1992).

Une étude structurale récente a montré que sur l'un des sites de surface (nommé site de fixation 1 du maltose), une γ -cyclodextrine interagit par les faces apolaires des résidus glucosyl avec les acides aminés aromatiques Trp616 et Trp662. (Uitdehaag *et al.*, 1999a). Dans le site actif, Tyr195 est un résidu essentiel pour le processus de cyclisation. Le noyau aromatique de cet acide aminé est proche du centre de la γ -cyclodextrine formée dans le site actif. Des changements de conformation importants (de l'ordre de 2,6 Å), induits par la fixation de la cyclodextrine, ont été observés pour cette tyrosine (Uitdehaag *et al.*, 1999a).

A titre de curiosité, nous avons comparé la structure de ces deux régions de la CGTase de *Bacillus circulans* (entrée PDB 1D3C - Uitdehaag *et al.*, 1999a) avec les sites de surfaces de AMY1 (dans le complexe AM1 Δ 9_{D180A} / maltoheptaose), voir **Figures 6A, 6B, 6C & 6D**, page suivante.

Ainsi, nous avons constaté une similarité remarquable entre le site du domaine E de la CGTase (site de fixation 1 du maltose) et le site de fixation des granules d'amidon de AMY1. Ils ont en commun la présence de deux tryptophanes adjacents qui fixent, donc, une γ -cyclodextrine pour la CGTase et un pentaose se circularisant pour AM1 Δ 9_{D180A} (voir **Figures 6A & 6B**, respectivement). La comparaison s'arrête cependant là, car les deux résidus Trp616 et Trp662 de la CGTase n'ont pas du tout le même environnement que Trp278 et Trp279 chez AMY1. Ainsi, les premiers sont moins stabilisés et il semble que leurs chaînes latérales puissent bouger afin d'accommoder à leur surface des α -, β - ou γ -cyclodextrines, contrairement à Trp278 et Trp279 dont nous avons montré la parfaite immobilisation.

Nous avons ensuite comparé la région du site actif de la CGTase (autour de Tyr195) avec le site en « pince à sucre » (dans le complexe AM1 Δ 9_{D180A} / maltoheptaose) – voir **Figures 6C & 6D**. On remarque, une fois encore, plusieurs similitudes. Ainsi, les deux structures considérées présentent le repliement d'une chaîne oligosaccharidique autour d'une tyrosine (une γ -cyclodextrine pour la CGTase et un pentaose pour AM1 Δ 9_{D180A}). On constate que le noyau aromatique de Tyr195 est proche du centre de la γ -cyclodextrine et détermine des liaisons hydrogène avec elle mais, contrairement à AMY1, pas d'interactions hydrophobes. On remarquera enfin, que la tyrosine de la CGTase pénètre moins dans la molécule cyclisée que ne le fait Tyr380 chez AMY1.

En conclusion, les CGTases n'existant ni chez les animaux, ni chez les plantes, comment alors expliquer les points communs entre ces enzymes et AMY1 ? Comme élément de réponse, on peut rappeler les travaux de Del-Rio *et al.* (1997) qui montrent que les CGTases ont évolué à partir des α -amylases. Ainsi, les CGTases sont apparues dans des organismes possédant déjà des α -amylases, conservant certaines caractéristiques fonctionnelles et structurales de ces dernières et les complétant par l'activité de cyclisation et l'ajout de nouveaux domaines structuraux.

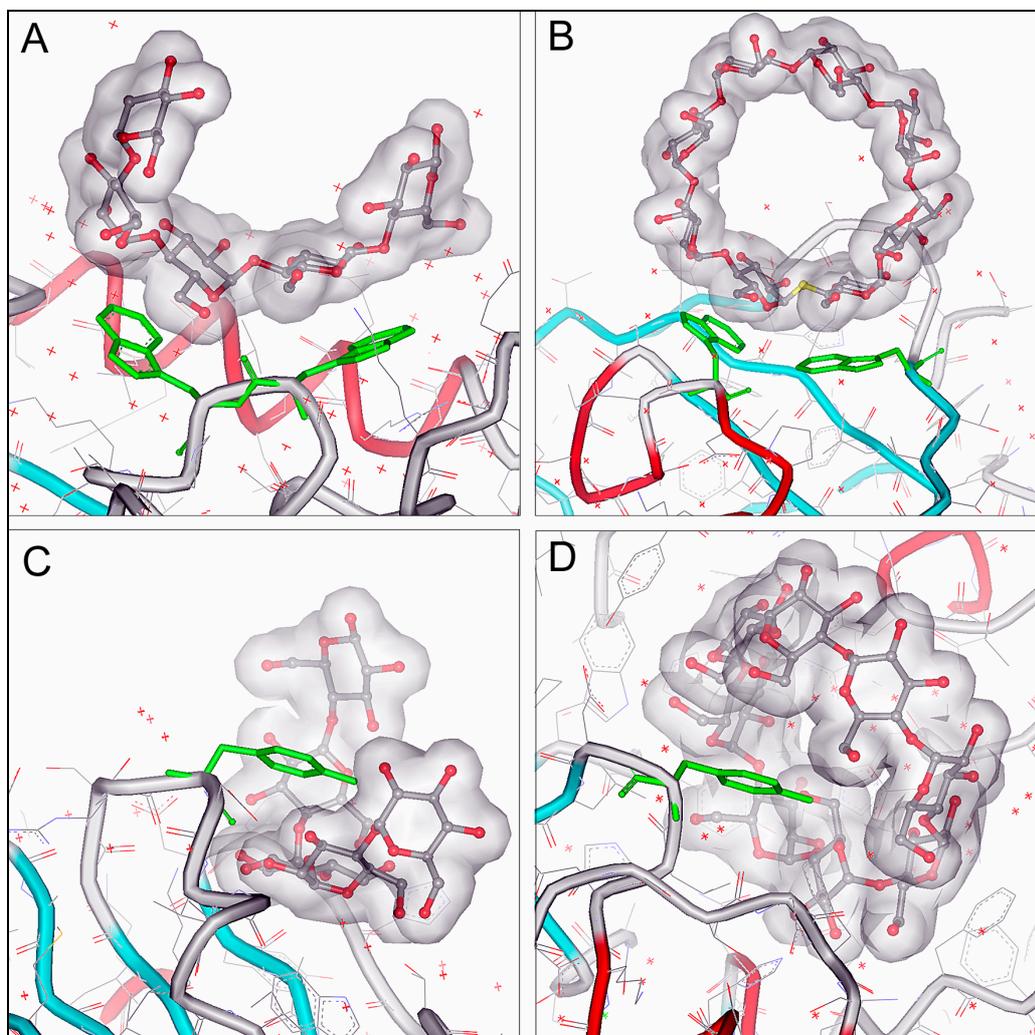


Figure 6 : Comparaison AMY1 / CGTase de *Bacillus circulans* (souche 251). (A) site de fixation des granules d'amidon de AMY1 ; (B) Site de fixation 1 du maltose de la CGTase ; (C) site en « pince à sucre » de AMY1 ; (D) Site actif de la CGTase. Les surfaces de van der Waals des sucres sont colorées en gris ; W278, W279, Y380 (AMY1) et Y195, W616, W662 (CGTase) en vert.

Chapitre 5

**Vers une nouvelle classe
d'inhibiteurs de glycosidases :
Polyamines d'intérêt potentiel en
pharmacologie et diabétologie.**

Brevet CNRS / INPI n° 99-16409 (23/12/1999)

« Nouveaux inhibiteurs de glycosidases et leurs applications
pharmacologiques, notamment pour traiter le diabète ».

Co-inventeurs : Nushin AGHAJARI, Xavier ROBERT & Richard HASER.

et

Brevet international n° WO 01/47528 (05/07/2001)

« Novel glycosidase inhibitors and their pharmacological uses,
in particular for treating diabetes ».

Co-inventeurs : Nushin AGHAJARI, Xavier ROBERT & Richard HASER.

A/ Description et résumé de l'invention :

L'invention se situe dans le cadre des recherches sur les glycosyle hydrolases, et plus particulièrement sur celles responsables de la dégradation des sucres par hydrolyse des liaisons α -1,4 interglycosidiques. Certaines de ces enzymes, comme les α -amylases, sont très importantes au plan biotechnologique (bio-industries des détergents, des dérivés et des transformations de l'amidon...), mais aussi comme cibles de molécules d'intérêt pharmacologique, par exemple pour le traitement du diabète. Dans ce contexte, nous avons mis en évidence une nouvelle classe potentielle d'inhibiteurs, des polyamines, capables de bloquer l'action des α -amylases et très probablement d'autres glycosidases.

En effet, nous avons récemment déterminé par cristallographie aux rayons X à haute résolution les structures tridimensionnelles d'une de ces glycosyle hydrolases, l'isoenzyme 1 de l' α -amylase d'orge (AMY1), dans sa forme native (Robert *et al.*, 2002b), mais aussi en complexe avec une polyamine marquant spécifiquement le site actif de l'enzyme.

Ces études font suite à la résolution des structures 3D de l'isoenzyme 2 (AMY2) des grains d'orge (Kadziola *et al.*, 1994; Kadziola *et al.*, 1998). La fonction de ces isoenzymes est de catalyser la transformation de polysaccharides (amidon, sucres divers...) à divers stades de la germination, en vue de la production de sucres assimilables par la plante pour ses besoins physiologiques et énergétiques. Nos recherches ont permis d'établir l'architecture détaillée de ces protéines, ainsi que la topologie précise des sites actifs où se déroulent les réactions catalysées par ces enzymes. Une des conclusions de nos recherches (et de celles d'autres auteurs) sur les α -amylases est la très grande similitude des sites actifs, en terme d'organisation spatiale et du degré élevé de conservation des acides aminés constituant les régions actives de ces enzymes, et cela quelque soit l'origine de l'amylase. Sur ces bases, les conclusions des études effectuées sur des enzymes cibles d'origine végétale sont très probablement transposables aux systèmes homologues d'origine animale.

La structure d'une forme tronquée de AMY1 a été déterminée en localisant tous les atomes (sauf les atomes d'hydrogène) des 404 acides aminés disposés le long d'une seule chaîne polypeptidique, de 809 molécules d'eau fortement liées à l'enzyme et de trois ions calcium. De plus, à chacun de ces atomes ou ions est associé un facteur d'agitation thermique qui décrit la mobilité de cet atome autour de sa position d'équilibre.

La structure de AMY1 complexée à une molécule marquant spécifiquement le site actif a également pu être résolue avec la même précision, conduisant à des observations pour la compréhension des mécanismes d'inhibition de l'enzyme.

Il s'agit d'une polyamine, précisément la spermidine ($\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-NH-(CH}_2\text{)}_4\text{-NH}_2$), pour laquelle les propriétés d'inhibition pour des glycosidases n'ont jamais été reportées.

Etant donné que, chez les mammifères, les inhibiteurs de glycosidases peuvent contribuer à réduire (pour réguler) l'absorption intestinale de glucose, l'importance potentielle des polyamines de type spermidine est évidente pour le traitement du diabète et d'autres désordres métaboliques (comme l'obésité) liés à une absorption trop grande ou non contrôlée de sucres.

Les fichiers de coordonnées atomiques des deux structures cristallines (AMY1 native et AMY1 en complexe avec la spermidine), ainsi que les fichiers correspondants des données de diffraction, font parties du support fondamental de l'invention.

Pour l'instant, le fichier de coordonnées correspondant à la structure native de AMY1 a été déposé dans la Protein Data Bank sous le code d'accèsion 1HT6. En revanche, le fichier de coordonnées correspondant au complexe AMY1 / spermidine n'a pas encore été déposé.

B/ Etat de l'art :

Le domaine des inhibiteurs de glycosidases reste activement exploré pour deux raisons :

- au plan fondamental, il s'agit d'élucider en détail les mécanismes d'action, d'activation et d'inhibition de ces enzymes, une approche qui passe par la recherche d'inhibiteurs et d'analogues de substrat appropriés.
- au plan des applications, les inhibiteurs de type acarbose (de nature polysaccharidique) ont fait leur preuve, notamment dans le traitement du diabète non-insulino dépendant, et sont disponibles sur le marché, désormais dans beaucoup de pays.

En ce qui concerne les polyamines de type spermidine (polyamine linéaire de formule $\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-NH-(CH}_2\text{)}_4\text{-NH}_2$), nous avons révélé pour la première fois leurs propriétés d'inhibition de l' α -amylase d'orge AMY1, et par extension, d'autres α -amylases comme celles d'origines pancréatique et salivaire.

C/ Contexte de l'invention et importance de l'innovation :

Etant donné les prévisions alarmistes quant à l'accroissement du nombre de personnes touchées par le diabète de type 2, la mise au point de nouveaux inhibiteurs pour bloquer l'action de glycosidases constitue une approche thérapeutique du problème.

Le but des inhibiteurs des α -amylases dans le traitement du diabète de type 2 est de ralentir les activités enzymatiques qui assurent la digestion de l'amidon et des polysaccharides apparentés afin d'amortir l'effet hyperglycémiant des sucres simples issus de la digestion.

Deux molécules importantes de cette classe de médicament sont l'acarbose et le miglitol. Elles sont très rarement utilisées seules, mais le plus souvent en association avec d'autres médicaments. Le miglitol a un spectre d'action assez large, puisqu'il inhibe plusieurs glycosidases intestinales. L'acarbose est relativement plus ciblé, ses cibles principales étant les α -amylases salivaires, mais surtout pancréatiques et celles de la bordure en brosse de l'intestin.

Du fait de leurs cibles, le miglitol et l'acarbose présentent une efficacité comparable, mais aussi des effets secondaires fréquents et gênants pour le sujet traité. En effet, la présence dans l'intestin, suite à l'inhibition des glycosidases du tractus digestif, de polysaccharides non digérés entraîne une augmentation de production de gaz intestinaux par la flore intestinale. Il en résulte, pour ces deux principes actifs, l'apparition de nombreux troubles intestinaux dès le début du traitement, troubles qui se poursuivent tout au long de la prise du médicament : flatulences, météorisme et des effets secondaires reliés (diarrhées, douleurs abdominales, borborygmes, sensations de ballonnement).

Pour conclure sur les aspects négatifs entourant ces deux molécules, il faut noter que la liste des contre-indications est assez longue et, dans beaucoup de cas, décourage le sujet diabétique d'avoir recours à ce type de traitement. Ceci peut sérieusement compliquer la prise en charge de la maladie chez les personnes présentant une des caractéristiques suivantes : enfants de moins de 18 ans, ulcère intestinal, maladie inflammatoire du colon, occlusion intestinale, troubles digestifs, insuffisance rénale sévère, grossesse et allaitement.

D/ Objectif de l'étude :

Malgré l'efficacité reconnue de ces deux molécules, il apparaît important de développer de nouveaux inhibiteurs de glycosidases ayant des effets secondaires moindres (afin d'améliorer la qualité de vie du sujet traité) tout en recherchant une efficacité équivalente, sinon meilleure.

Nous avons d'ores et déjà observé qu'en présence des deux types d'inhibiteurs (spermidine et acarbose), l'inhibiteur de type polyamine est reconnu de manière préférentielle par la cible enzymatique (et ce en bloquant le site actif), démontrant qu'il possède une affinité significativement supérieure pour l'enzyme par rapport aux inhibiteurs de type acarbose. L'utilisation de polyamines, comme médicaments potentiels pour inhiber de façon compétitive les α -glycosidases en ralentissant l'absorption des sucres, apparaît comme un nouveau concept thérapeutique.

L' α -amylase utilisée (AMY1) pour mettre en évidence les propriétés d'inhibition de la spermidine est un modèle d'étude insuffisant qui nécessite d'être étendu. La propriété d'inhibition de la polyamine doit en effet être confirmée pour des α -amylases humaines, et plus particulièrement les α -amylases salivaires et pancréatiques. Pour cette raison, un travail de modélisation moléculaire a été effectué afin de déterminer si la polyamine pouvait se fixer de manière similaire (et donc déterminer des propriétés d'inhibition potentielles équivalentes) sur trois α -amylases de mammifères de structure connue.

E/ Avantages techniques et économiques de l'invention :

Le nouveau type d'inhibiteur potentiel représente une classe de molécules dont le coût de production est sans aucun doute inférieur à celui requis pour préparer les inhibiteurs actuels, de type acarbose. La synthèse chimique de ces derniers demeure une opération coûteuse. La spermidine est commercialement disponible et, à titre indicatif, le prix public de 5 g est d'environ 46 €. A notre connaissance, les polyamines de type spermidine ne présentent pas de toxicité majeure répertoriée sauf, bien évidemment, à des doses élevées.

F/ Antériorité :

Le rôle connu de la spermidine (et d'autres polyamines voisines) est son activité essentielle dans la prolifération, la croissance et la différenciation cellulaire. Il est également bien établi que les polyamines interagissent avec les acides nucléiques et l'ADN en particulier. Certaines protéines, comme le récepteur de l'insuline, la protéine-kinase CK2 (Chantalat *et al.*, 1999), le récepteur N-méthyl-D-aspartate, possèdent un site spécifique de reconnaissance de polyamine ayant probablement une fonction de régulation.

A ce jour, aucune indication n'a été apportée sur l'interaction spécifique d'une polyamine de type spermidine avec une glycosidase. Le complexe AMY1 / polyamine est le premier exemple connu manifestant une telle interaction.

Hors du domaine des glycosidases, il n'existe que trois exemples de complexes protéine / spermidine pour lesquels les structures 3D ont été déterminées et les coordonnées atomiques déposées :

- une Aminoglycoside 3-N-Acetyltransferase de *Serratia marcescens* – structure résolue par diffraction de rayons X (déposée dans la *Protein Data Bank* sous le code 1BO4) (Wolf *et al.*, 1998).
- une Spermidine / Putrescine-Binding Protein de *Escherichia coli* – structure résolue par diffraction de rayons X (déposée dans la *Protein Data Bank* sous les codes 1POT et 1POY) (Sugiyama *et al.*, 1996a; Sugiyama *et al.*, 1996b).
- une oxidoréductase (Trypanothione Reductase) de *Crithidia fasciculata* – structure résolue par diffraction de rayons X (déposée dans la *Protein Data Bank* sous le code 1TYP) (Bailey *et al.*, 1993).

G/ Matériels et méthodes :

1. Conditions de cristallisation :

L'isoenzyme 1 recombinant tronqué de l' α -amylase d'orge (AMY1 Δ 9) a été préparé selon les méthodes décrites dans Robert *et al.*, 2002a. Les cristaux ont été obtenus par cocristallisation grâce au principe de diffusion de vapeur en utilisant la technique de la goutte suspendue. Pour ce faire, à 2 μ l de la solution de protéine ont été ajoutés 2,5 μ l de polyéthylène glycol 8000 à 21% comme précipitant et 0,5 μ l d'une solution de spermidine à 0,1 M comme additif de cristallisation.

Cette goutte a été équilibrée à 19°C contre un réservoir contenant 500 μ l de polyéthylène glycol 8000 à 21%. Après obtention des cristaux (de taille 0,5 \times 0,1 \times 0,05 mm³, après environ 1 mois), ces derniers ont été trempés pendant 20 heures dans une solution de polyéthylène glycol 8000 à 21% contenant 10 mM d'acarbose.

2. Enregistrement des données de diffraction :

La collecte des données de diffraction a été conduite grâce à un générateur de rayons X (radiation CuK α - longueur d'onde 1,5418 Å) à anode tournante (*Nonius 581*) opérant à 40 kV et 90 mA (soit 3,6 kW) avec un monochromateur en graphite couplé à un détecteur bidimensionnel de type Image Plate (*MarResearch 345*) de 34,5 cm de diamètre.

Un jeu de 180 clichés de diffraction (chacun correspondant à 1° d'oscillation du cristal) a été enregistré à 15°C, le cristal étant monté en capillaire et positionné à 120 mm du détecteur, avec un temps d'exposition du cristal aux rayons X de 500 secondes par cliché. La résolution la plus haute de ce jeu de données est de 2,44 Å.

L'intégration de ce jeu de données par le logiciel DENZO de l'ensemble logiciel marHKL (Otwinowski & Minor, 1997) nous a permis de déterminer les caractéristiques cristallographiques de base : paramètres cristallins (a=42,6 Å, b=80,6 Å, c=137,0 Å, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$), système cristallin (orthorhombique). Nous avons ensuite déterminé le groupe d'espace comme étant P2₁2₁2₁. L'unité asymétrique est composée d'une molécule du complexe AMY1 / spermidine, ce qui correspond à un volume de solvant dans la maille de 53%.

3. Détermination de la structure 3D du complexe AMY1 / spermidine :

Les traitements ultérieurs des données ont été réalisés en utilisant les programmes de la suite CCP4 (CCP4 Collaborative Computational Project, 1994). Ainsi, le logiciel Scala nous a permis de montrer que 67572 réflexions ont été enregistrées, ceci correspondant à 16425 réflexions uniques avec un R_{sym} global de 13,6%, et une complétude de 90,8%.

La méthode du remplacement moléculaire a été utilisée (logiciel AMoRe - Navaza, 2001) avec comme modèle-guide la structure de l'isoenzyme 2 de l' α -amylase d'orge (AMY2 – code d'accèsion PDB : 1AMY) (Kadziola *et al.*, 1994; Kadziola *et al.*, 1998) du fait de l'importante homologie de séquence (80%) entre ce modèle initial et notre protéine d'intérêt (AMY1).

Des phases d'affinement par les techniques de dynamique moléculaire (recuit simulé) (Brünger *et al.*, 1990) ont été réalisées avec le logiciel CNS (Brünger *et al.*, 1998) en alternance avec des manipulations du modèle. Ces dernières, comprenant l'insertion des molécules d'eau, de spermidine, de « composant 2 » et les atomes de calcium ainsi que l'affinement manuel des positions des chaînes latérales dans la densité électronique, ont été réalisées avec le logiciel TURBO-FRODO (Roussel & Cambillau, 1989). Pour ce faire, des cartes de densité électronique 2F_o-F_c et F_o-F_c ont été calculées et interprétées.

Nous avons ainsi obtenu la structure du complexe AMY1 / spermidine final affinée contenant 3120 atomes non-hydrogène appartenant à la protéine (soit 404 acides aminés) et 153 molécules d'eau, 3 atomes de calcium, le trisaccharide dit « composant 2 » (produit de dégradation de l'acarbose) et une molécule de spermidine.

Le modèle affiné correspond à un facteur R de 18,3% et un facteur R_{libre} de 23,7% (ce dernier étant basé sur 10% de données de diffraction sélectionnées aléatoirement) (Brünger, 1992). Les statistiques concernant cette structure sont présentées dans le **Tableau 1**.

La stéréochimie du modèle final a été examinée avec le logiciel PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) et 85,6% des résidus (non glycine ou proline) sont localisés dans les régions les plus favorables. Enfin, aucun résidu n'a été localisé dans les régions non autorisées.

Statistiques de collecte de données et d'affinement pour le complexe AMY1 / spermidine	
Résolution (Å)	2,44
Complétude des données (%)	91,8
Complétude des données dans la coquille de résolution la plus élevée (%)	90,8
Coquille de résolution la plus élevée (Å)	2,44 – 2,50
Nombre total de réflexions	67572
Nombre de réflexions uniques	16425
Facteur R_{sym} global (%) (*)	13,6
Redondance	4,1
Coefficient de corrélation AMoRe (%)	70,4
Facteur R AMoRe (%)	35,0
Facteur R (%) (**)	18,3
Facteur R_{libre} (%)	23,7
Nombre total d'atomes (non hydrogène)	3414
Nombre de molécules d'eau	153

$$(*) R_{\text{sym}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I(hkl)_i - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I(hkl)} \quad \text{et} \quad (***) R = \frac{\sum_h \|F_{\text{obs}}(h) - k|F_{\text{calc}}(h)\|}{\sum_h |F_{\text{obs}}(h)|} \quad \text{avec } k, \text{ un facteur d'échelle.}$$

Tableau 1 : Statistiques d'enregistrement des données et d'affinement pour le complexe entre l' α -amylase d'orge isoenzyme 1 (AMY1) et la spermidine.

H/ Résultats et discussion :

L'analyse comparée de la structure du complexe AMY1 / spermidine et de la structure native de AMY1, n'a révélé aucun changement majeur. Les chaînes principales des deux structures sont presque parfaitement superposables, aux légères variations près. Le rmsd calculé entre ces deux structures pour les carbones α est de 0,35 Å.

L'examen des cartes de densité électronique au niveau des sites d'intérêts (sites de surface et site actif) a permis de dresser plusieurs observations.

Au niveau du site de surface du domaine A (ou « site de surface de fixation des granules d'amidon », voir précédemment), un trisaccharide a pu être inséré en densité. Ce dernier semble correspondre à une molécule de composant 2, produit de dégradation de l'acarbose déterminé par la coupure d'une unité glucose du côté réducteur. Il est cependant difficile de conclure quant à l'origine de ce trisaccharide. En effet, deux hypothèses peuvent être émises : la première est qu'il existe en fait une molécule d'acarbose entière au niveau de ce site. Mais du fait de l'importante exposition au solvant de ce site de surface, le cycle glucosyl du côté réducteur pourrait ne pas être stabilisé par des interactions avec la protéine. Ceci expliquerait qu'aucune densité électronique le décrivant ne soit observée. L'autre hypothèse est que nous soyons véritablement en présence d'une molécule de composant 2, produit par la dégradation de l'acarbose par AMY1. Bien qu'il soit difficile de trancher entre ces deux hypothèses, la comparaison de ce site de surface, d'une part dans le complexe AMY1 / acarbose, et d'autre part dans le complexe AMY1 / spermidine, montre une parfaite superposition des cycles d'acarbose

et de composant 2, respectivement. En outre, les résidus impliqués dans la reconnaissance de l'inhibiteur (notamment Trp278 et Trp279, voir **Figure 1**) sont parfaitement comparables entre les deux complexes qui, par ailleurs, ne présentent aucune variation notable de structure au niveau de ce site de surface.

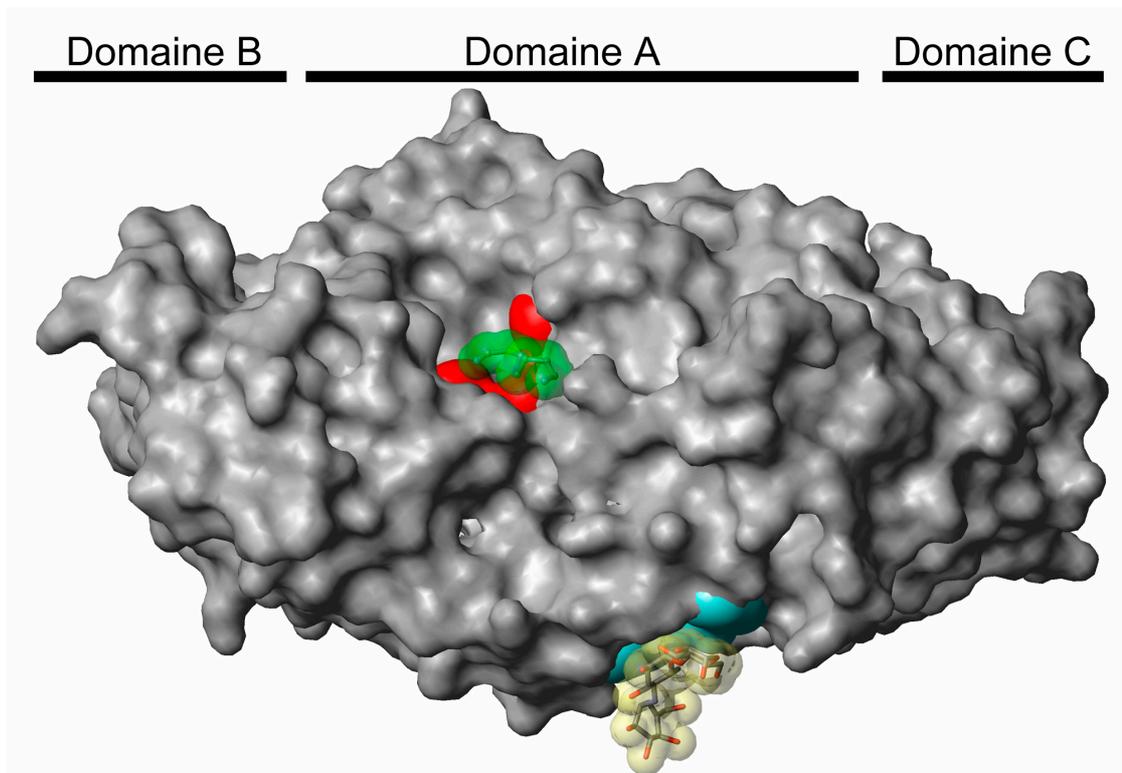


Figure 1 : Représentation de surface de la structure du complexe AMY1 / spermidine. La surface de la protéine est représentée en surface d'accessibilité au solvant (surface grisée). La molécule de spermidine fixée au niveau du site actif est représentée par la surface verte transparente. Les résidus catalytiques (Glu205, Asp180 et Asp291) sont matérialisés par les portions de surface rouge. La molécule tronquée d'acarbose (cycles A, B et C correspondant au composant 2), fixée au niveau du site de surface de fixation des granules d'amidon (« starch granule binding surface site ») (Kadziola et al., 1998) est représentée par une surface jaune transparente. Enfin, les résidus W278 et W279 de ce même site sont matérialisés par la surface colorée en bleu.

Après examen du site de surface du domaine C (en « pince à sucre », voir précédemment), aucune densité n'a pu être observée, ceci montrant l'absence de fixation d'une molécule d'acarbose au niveau de ce dernier. Ce résultat paradoxal, comparativement à ceux précédemment exposés, peut être expliqué par le fait que le complexe AMY1 / spermidine d'une part, et les complexes entre AMY1 et l'acarbose, le thio-DP4 et le maltoheptaose d'autre part, ont été obtenus avec des protéines ayant cristallisées dans deux groupes d'espace différents : P₂₁₂₁₂₁ pour AMY1 / spermidine et P₂₁₂₁₂ pour les autres complexes mentionnés. Du fait de ce changement de groupe d'espace, et donc de l'empilement des protéines dans le cristal, il apparaît que le site de surface du domaine C a une accessibilité restreinte, ne permettant pas à l'acarbose de diffuser jusqu'à lui lors de l'étape de trempage.

Enfin, l'observation des cartes de densité électronique au niveau du reste de la surface de la protéine n'a mis en évidence aucun autre zone de fixation d'un ligand quelconque.

L'examen du site actif a montré l'existence d'une densité électronique allongée et très nette, pouvant accommoder une molécule de spermidine (voir **Figures 2 et 3**, pages suivantes). Après modélisation et affinement, on montre que cette molécule détermine 5 interactions directes par liaisons hydrogène avec des résidus de l'enzyme. Ces derniers sont Trp207 et

Asn209, ainsi que deux des résidus catalytiques, à savoir Asp180 et Glu205. Les atomes de la spermidine impliqués dans ces interactions sont les azotes situés aux extrémités de la molécule (notés N1 et N10) et l'azote N6 (voir **Figure 4**, ci-après). En outre, la molécule de spermidine détermine 4 liaisons hydrogène avec des molécules d'eau présentes dans son environnement (Wat1087, Wat1102, Wat1250 et Wat1259) (voir **Figure 3**, ci-après). Chacune de ces molécules d'eau est elle-même liée à d'autres molécules d'eau ou résidus de l'enzyme. Il en résulte la présence d'un réseau organisé de molécules d'eau contribuant de manière importante à l'interaction de la polyamine au sein du site actif. L'ensemble de ces interactions sont répertoriées dans le **Tableau 2**, et schématisées par la **Figure 4**.

La comparaison du site actif du complexe AMY1 / spermidine à celui de l'enzyme natif montre très peu de changements structuraux. Les trois résidus catalytiques (Glu205, Asp180 et Asp291) sont parfaitement superposables, malgré les interactions de deux d'entre eux avec la spermidine. On peut relever que la chaîne latérale de Asn209, interagissant avec la spermidine, subit un déplacement de 0,9 Å pour favoriser son interaction avec l'azote N1 de la polyamine. Arg183, qui apparaît en double conformation dans la structure native, existe dans une seule conformation au sein du complexe. La conformation choisie est celle qui « rapproche » la chaîne latérale du site actif (et plus particulièrement de Phe181), sans pour autant interagir avec la polyamine. Enfin, le carbone α de Asp208, se déplace de 0,7 Å du fait de sa proximité avec Trp207 impliqué dans l'interaction enzyme / ligand.

La modification la plus notable est sans conteste la réorganisation des molécules entre la forme native et le complexe déterminant le réseau organisé de molécules d'eau précédemment décrit autour de la polyamine (voir **Figures 3 et 4**).

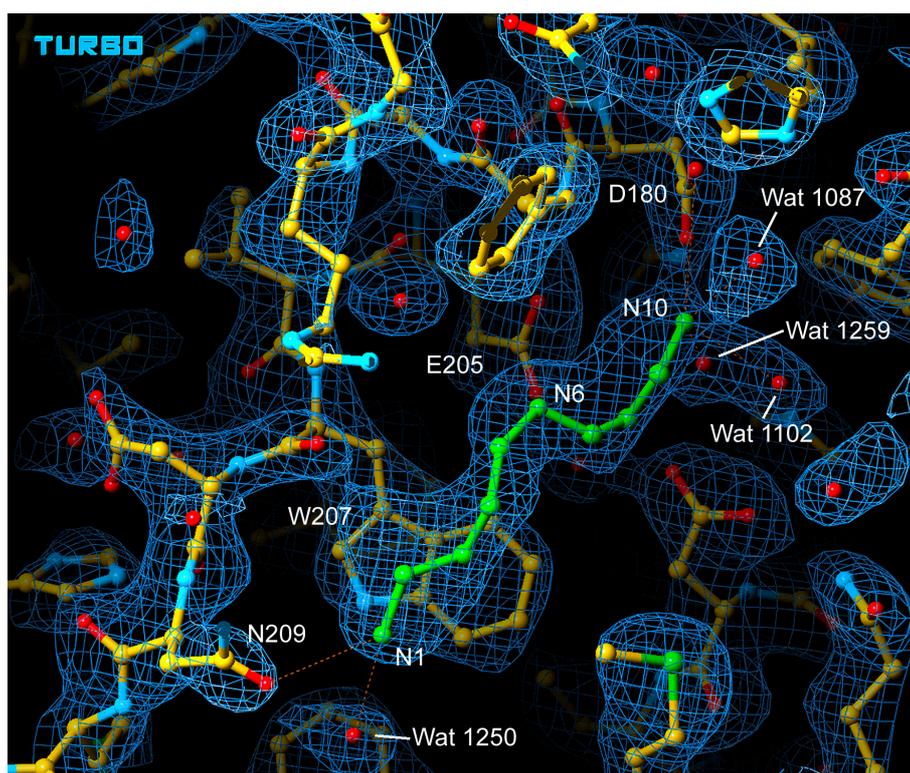


Figure 2 : Représentation de la densité électronique (déterminée à une résolution de 2,44 Å) du cristal du complexe AMY1 / spermidine dans la région du site actif. Le volume central de densité électronique correspond à la molécule de spermidine (représentée en vert). Les résidus de AMY1 interagissant par liaisons hydrogène directes avec la polyamine sont : Asp180, Glu205, Trp207 et Asn209.

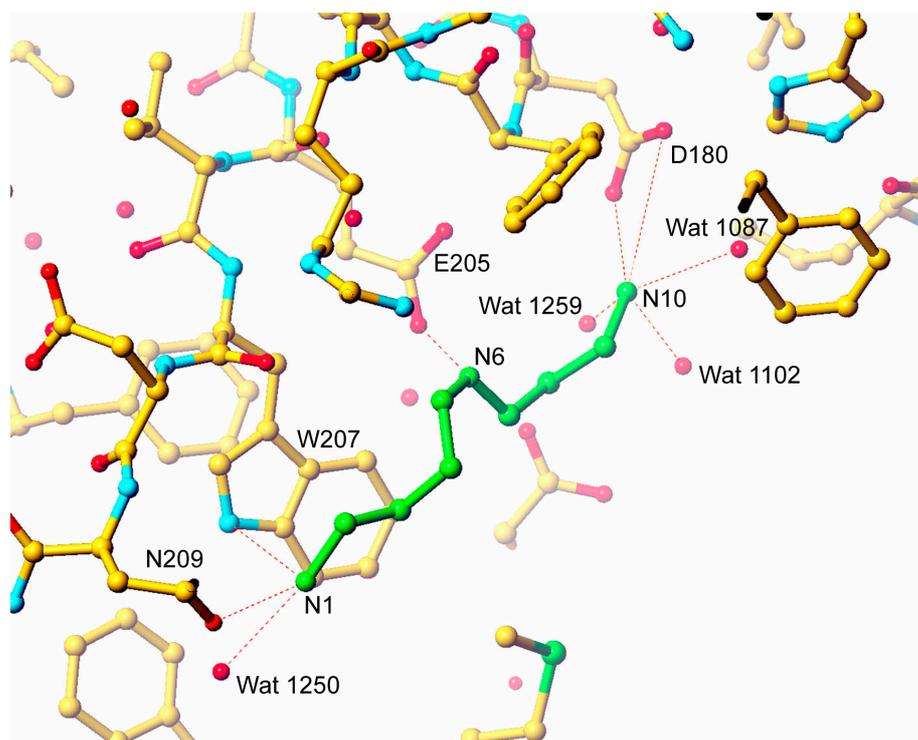


Figure 3 : Interactions de la molécule de spermidine (représentée en vert) avec le site actif de AMY1. La fixation de la polyamine est largement due aux interactions par liaisons hydrogène (en pointillés oranges) entre trois résidus de AMY1 (Asp180, Glu205, Trp207 et Asn209), les trois atomes d'azote de la polyamine (noté N1, N6 et N10) et un réseau organisé de molécules d'eau (représenté par les boules rouges).

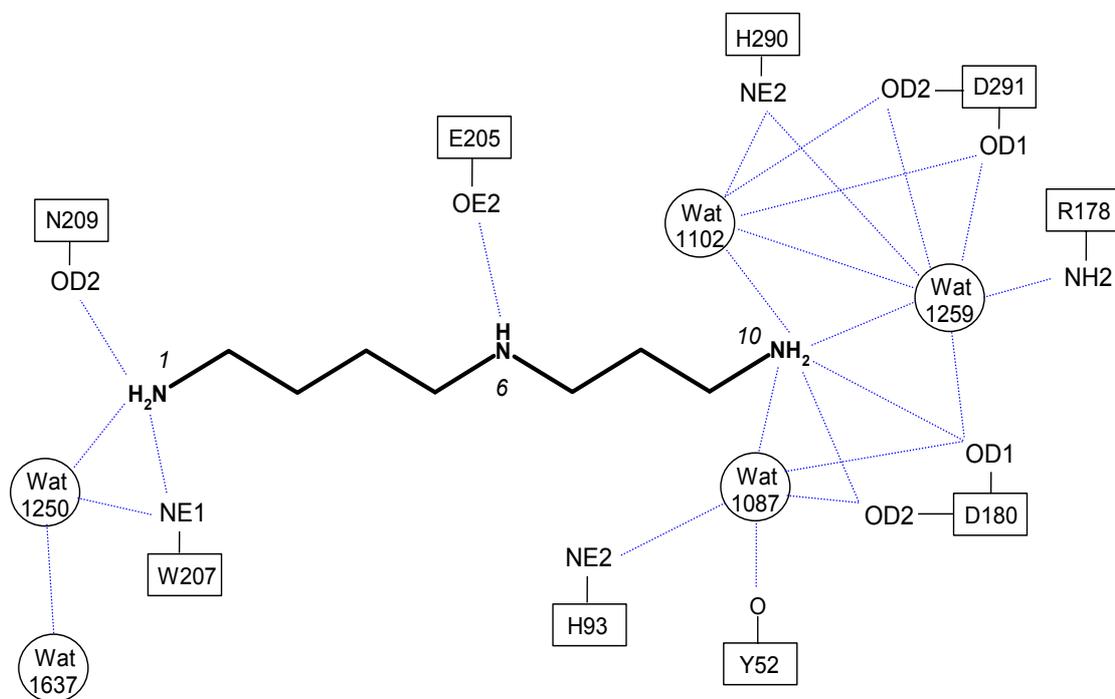


Figure 4 : Schéma des interactions entre les résidus de AMY1, les molécules d'eau et la molécule de spermidine dans le complexe AMY1 / spermidine. Les résidus sont représentés par des rectangles et les molécules d'eau par des cercles. Les interactions par liaisons hydrogène sont représentées par les pointillés bleus.

Atomes de la Spermidine :	Résidus de AMY1 ou eau	Distance (Å)
N1	W207 Nε1	3,7
N1	N209 Oδ1	3,4
N1	Wat 1250	3,1
N6	E205 Oε2	3,7
N10	D180 Oδ1	2,7
N10	D180 Oδ2	3,7
N10	Wat 1087	2,8
N10	Wat 1102	2,9
N10	Wat 1259	2,8

Interactions supplémentaires (2 ^{ème} sphère)	Distances (Å)
Wat 1250 ↔ W207 Nε1	3,6
Wat 1250 ↔ Wat 1637	3,2
Wat 1087 ↔ D180 Oδ1	3,8
Wat 1087 ↔ D180 Oδ2	3,3
Wat 1087 ↔ Y52 O	3,7
Wat 1087 ↔ H93 Nε2	3,7
Wat 1102 ↔ D291 Oδ1	3,5
Wat 1102 ↔ D291 Oδ2	3,8
Wat 1102 ↔ H290 Nε2	3,5
Wat 1102 ↔ Wat 1259	2,4
Wat 1259 ↔ D180 Oδ1	3,2
Wat 1259 ↔ D291 Oδ1	3,8
Wat 1259 ↔ D291 Oδ2	2,8
Wat 1259 ↔ H290 Nε2	3,1
Wat 1259 ↔ R178 Nη2	3,3

Numérotation des atomes de la spermidine :

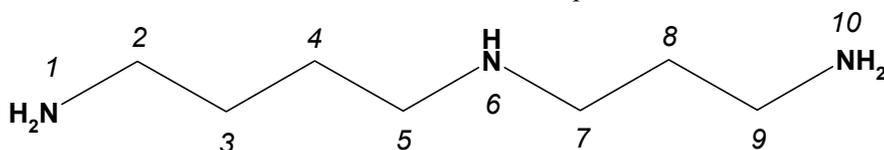


Tableau 2 : Tableau récapitulatif des interactions protéine / ligand dans le complexe entre l' α -amylase d'orge isoenzyme 1 (AMY1) et la spermidine. Le premier tableau (en haut) correspond aux interactions directes entre la spermidine et un résidu de AMY1 ou une molécule d'eau. Le second tableau (en bas) correspond aux interactions de la deuxième sphère mettant en évidence le réseau de molécules d'eau stabilisant le complexe protéine / ligand.

Tous ces points montrent que AMY1, dans son état natif, est capable d'interagir avec une molécule de spermidine au niveau de son site actif, et ceci sans changements conformationnels ou adaptations locales de positions de résidus.

En conclusion, il apparaît qu'en présence des deux inhibiteurs (acarbose et spermidine), AMY1, du moins dans nos conditions expérimentales, montre pour la polyamine une affinité plus forte et une spécificité plus grande (1 seul site d'interaction avec l'enzyme, par rapport à 3 pour l'acarbose).

Il reste tout de même en suspens la question concernant l'observation de composant 2 au niveau du site de surface du domaine A. A la vue des présentes données, il n'est pas improbable qu'il existe, en fait, une compétition entre les molécules d'acarbose et de spermidine pour leur fixation dans le site actif. Les temps de cristallisation étant infiniment plus longs que ceux des réactions catalysées par l'enzyme, on peut penser qu'il y a eu compétition dans la goutte, et ce bien avant les phénomènes de nucléation puis de cristallisation. Ce faisant, l'acarbose a pu être dégradé, provoquant la formation du composant 2. Au final, pendant la formation du cristal, la spermidine, non dégradée par l'enzyme, a conservé toutes ses propriétés d'interaction avec l'enzyme et a donc pu occuper préférentiellement le site actif, tandis que le présumé composant 2 se fixait sur le site de surface du domaine A.

I/ Etudes d'interactions spermidine / α -amylases de diverses origines par modélisation moléculaire :

L'invention décrite est fondée sur l' α -amylase d'orge comme cible pour la spermidine, mais aussi sur les observations issues de modélisations avec d'autres α -amylases. En effet, disposant des structures 3D d' α -amylases d'origines diverses et des coordonnées atomiques correspondantes, il était opportun d'étendre notre analyse, notamment aux enzymes homologues de mammifères (homme, porc), compte tenu des implications potentielles thérapeutiques et pharmacologiques.

1. α -Amylases utilisées dans l'étude :

Dans le but d'explorer les propriétés d'inhibition potentielles de la spermidine envers d'autres membres de la famille des α -amylases, nous avons réalisé des études de simulation d'interaction entre la spermidine et des α -amylases de mammifère par la méthode de modélisation moléculaire assistée par ordinateur. Ainsi, nous avons utilisé trois structures d' α -amylases à haute résolution connues et résolues par la méthode de cristallographie de diffraction aux rayons X :

- α -amylase de pancréas de porc, résolue à 2,2 Å en complexe avec l'acarbose – Structure déposée dans la *Protein Data Bank* sous le code d'accèsion 1PPI (Qian *et al.*, 1994).
- α -amylase salivaire humaine, résolue à 1,6 Å – Structure déposée dans la *Protein Data Bank* sous le code d'accèsion 1SMD (Ramasubbu *et al.*, 1996).
- α -amylase pancréatique humaine, résolue à 1,8 Å – Structure déposée dans la *Protein Data Bank* sous le code d'accèsion 1HNY (Brayer *et al.*, 1995).

2. Matériels et méthodes :

Nous avons, dans un premier temps, superposé les 3 structures avec celle du complexe AMY1 / spermidine. Cette superposition a été réalisée en faisant coïncider dans l'espace les carbones α des 3 résidus catalytiques (et seulement ces 3 atomes) de chacune de ces structures, de façon à faire concorder au mieux les sites actifs de ces 4 structures (voir tableau ci-après).

Nom	PDB	Auteurs	Résolution (Å)	Résidus catalytiques		
Amylase d'orge isoenzyme 1 / spermidine	-	non publié	2,44	180	205	291
Amylase de pancréas humain	1HNY	Brayer et al., 1995	1,8	197	233	300
Amylase salivaire humaine	1SMD	Ramasubbu et al., 1996	1,6	197	233	300
Amylase de pancréas de porc / acarbose	1PPI	Qian et al., 1994	2,2	197	233	300
				Nucleophile	Acide/base	Acide/base

L'acarbose de la structure de l'amylase de pancréas de porc, occupant le site actif, a été enlevée. Puis, la spermidine présente dans le site actif de l'amylase d'orge (AMY1) a été ajoutée (dans sa conformation originelle) aux sites actifs des trois autres α -amylases. De même, les molécules d'eau des structures de départ ont été conservées, mêmes si elles déterminaient des mauvais contacts avec la molécule de spermidine nouvellement insérée. Le but de cette dernière manipulation était de voir comment les molécules d'eau pouvaient évoluer en présence de la spermidine lors des étapes de dynamique moléculaire. L'ensemble des manipulations des structures (superposition et insertion de la spermidine dans le site actif) a été réalisé avec le logiciel TURBO-FRODO (Roussel & Cambillau, 1989).

Pour chacune des trois structures dans lesquelles avait été insérée la spermidine, plusieurs cycles de minimisation d'énergie ont été réalisés. Cette minimisation d'énergie basée sur la méthode de gradient conjugué de Powell (Powell, 1977) a été conduite grâce au logiciel CNS (Brünger *et al.*, 1998). Cette étape a eu pour but, premièrement, de minimiser l'énergie du système, en déplaçant les atomes qui pouvaient établir de mauvais contacts entre eux (notamment les molécules d'eau qui n'avaient pas été déplacées lors de l'insertion de la spermidine dans le site actif). Deuxièmement, cette minimisation d'énergie a permis de positionner les atomes de façon à maximaliser les interactions par liaison hydrogène et donc d'aller vers un modèle de structure plus stable énergétiquement et par conséquent plus vraisemblable. Enfin, l'examen des modèles de structure obtenus a été réalisé avec le logiciel TURBO-FRODO (Roussel & Cambillau, 1989).

3. Résultats :

Aucun des modèles enzyme / spermidine ainsi générés ne révèle de mauvais contacts après fixation d'une molécule de spermidine dans les sites actifs respectifs. De fait, chaque acide aminé, chaque molécule d'eau, mais aussi la spermidine insérée se sont accommodés au mieux au sein du site actif lors du processus de minimisation d'énergie. On peut constater que les réarrangements des résidus au niveau des sites actifs des 3 modèles mettent en jeu des mouvements de faible amplitude de l'ordre de 0,1 à 0,5 Å (résultats non présentés).

De plus, on peut constater pour les trois modèles la formation d'un important réseau de liaisons hydrogène permettant de lier et stabiliser la spermidine dans le site actif des trois α -amylases étudiées. Les interactions directes pour ces trois modèles sont résumées dans le **Tableau 3** ci-après. Chaque molécule d'eau impliquée dans une interaction directe avec la spermidine présente au moins deux liaisons hydrogène la stabilisant et aucune molécule d'eau citée n'est isolée.

Ce résultat met en évidence la création d'un réseau de molécules d'eau, au niveau des sites actifs des trois α -amylases considérées, induit par la spermidine. Ce réseau, montré pour le complexe AMY1 / spermidine, concourt à augmenter le nombre d'interactions avec le ligand polyamine.

Les **Figures 5a, 5b & 5c**, ci-après, présentent la superposition de la structure expérimentale du complexe AMY1 / spermidine avec, respectivement, les complexes modélisés α -amylase de pancréas de porc / spermidine, α -amylase salivaire humaine / spermidine et α -amylase pancréatique humaine / spermidine. Ces figures montrent la grande superposabilité des résidus impliqués dans les interactions avec la spermidine, mais aussi que la polyamine adopte, dans les trois modèles, une conformation très similaire à celle qu'elle a dans le complexe expérimental AMY1 / spermidine.

Tableau des interactions entre la spermidine et l' α -amylase de pancréas de porc		
Atomes de la spermidine :	Résidus ou eau :	Distance (Å) :
N1	Lys 200 N ζ	3,4
N1	Tyr 151 OH	3,7
N6	Glu 233 O ϵ 2	3,5
N6	Wat 610	3,7
N10	Asp 197 O δ 1	2,8
N10	Asp 197 O δ 2	3,6
Tableau des interactions entre la spermidine et l' α -amylase salivaire humaine		
Atomes de la spermidine :	Résidus ou eau :	Distance (Å) :
N1	Lys 200 N ζ	2,8
N1	Wat 667	3,8
N6	Wat 646	2,5
N6	Wat 586	3,7
N10	Asp 197 O δ 1	3,6
N10	Asp 197 O δ 2	3,7
N10	Glu 233 O ϵ 1	3,8
N10	Wat 563	2,4
N10	Wat 578	2,3
N10	Wat 586	3,7
N10	Wat 604	2,7
Tableau des interactions entre la spermidine et l' α -amylase pancréatique humaine		
Atomes de la spermidine :	Résidus ou eau :	Distance (Å) :
N1	Lys 200 N ζ	3,5
N1	Wat 827	2,7
N6	Glu 233 O ϵ 2	3,7
N6	Wat 738	2,4
N10	Asp 197 O δ 1	2,9
N10	Asp 197 O δ 2	3,6
N10	Glu 233 O ϵ 1	3,1
N10	Wat 509	2,4
N10	Wat 594	3,8
N10	Wat 730	2,8
N10	Wat 738	2,9

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des interactions protéine / spermidine déterminées par modélisation moléculaire avec trois α -amylases de mammifères. Ce tableau présente respectivement les interactions directes protéine / spermidine dans les complexes modélisés avec l' α -amylase de pancréas de porc, l' α -amylase salivaire humaine et l' α -amylase pancréatique humaine. Seules les interactions directes protéine / spermidine sont indiquées.

4. Discussion :

Comme nous l'avons vu précédemment, aucun des modèles ne révèle de mauvais contacts avec la molécule de spermidine modélisée dans leurs sites actifs. Ainsi, dans la région active de l'enzyme et dans le processus de minimisation d'énergie, chaque résidu d'acide aminé, chaque molécule d'eau mais aussi la spermidine insérée se positionnent en respectant les contraintes chimiques usuelles.

Le nombre de liaisons hydrogène directes entre la spermidine et un résidu ou une molécule d'eau est donné dans le tableau suivant pour le complexe expérimental AMY1 / spermidine et pour les 3 modèles calculés (α -amylase de pancréas de porc / spermidine, α -amylase salivaire humaine / spermidine, α -amylase pancréatique humaine / spermidine).

Liaisons hydrogène directes avec :	un résidu	une molécule d'eau
AMY1 / spermidine	5	4
α -amylase pancréas de porc / spermidine	5	1
α -amylase salivaire humaine / spermidine	4	7
α -amylase pancréas humaine / spermidine	5	6

On constate que le complexe α -amylase de pancréas de porc / spermidine est stabilisé par un total de 6 liaisons H contre 11 pour les modèles α -amylase salivaire humaine / spermidine et α -amylase de pancréas humain / spermidine ou 9 pour la structure expérimentale AMY1 / spermidine.

En conclusion, nos modèles montrent une adéquation potentielle entre la spermidine et les sites actifs de plusieurs α -amylases. Il est important de noter que les deux modèles les plus favorables en terme d'interactions directes site actif / spermidine par liaisons hydrogène sont ceux des α -amylases humaines de salive et de pancréas.

Ces observations confortent le fait que la spermidine ou ses dérivés semblent apparaître comme des molécules d'intérêt dans la conception d'inhibiteurs à visée thérapeutique humaine.

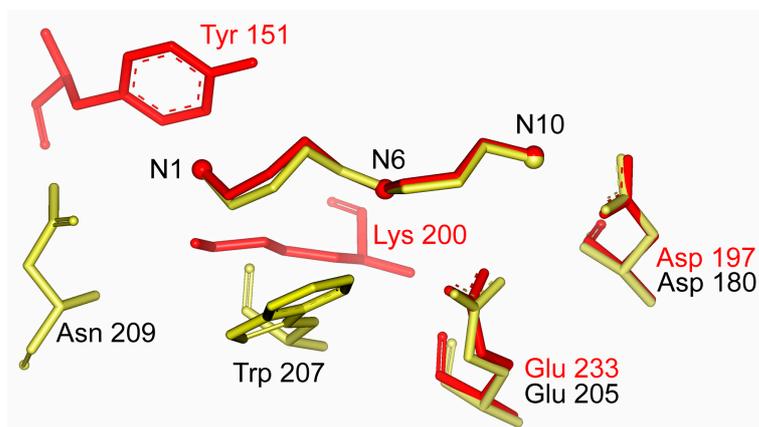


Figure 5a : Superposition du complexe expérimental AMY1 / spermidine (en jaune) et du modèle α -amylase de pancréas de porc / spermidine calculé (en rouge).

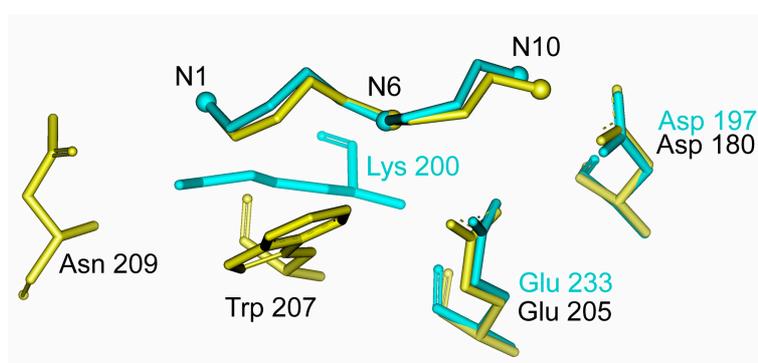


Figure 5b : Superposition du complexe expérimental AMY1 / spermidine (en jaune) et du modèle α -amylase salivaire humaine / spermidine calculé (en cyan).

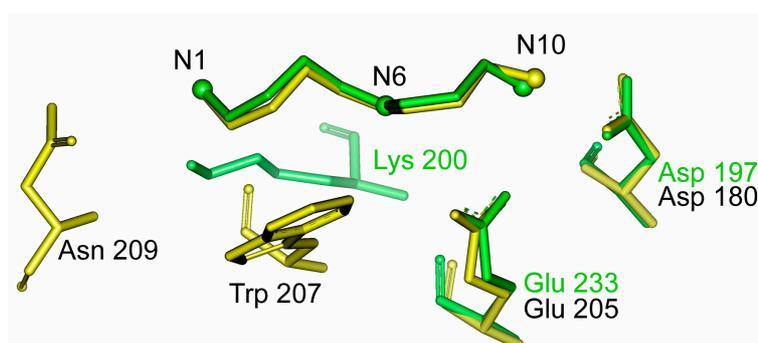


Figure 5c : Superposition du complexe expérimental AMY1 / spermidine (en jaune) et du modèle α -amylase de pancréas humain / spermidine calculé (en vert).

On précise que pour chacune de ces représentations, les molécules d'eau ne sont pas montrées et seuls les résidus interagissant avec la spermidine sont représentés. Les azotes de la spermidine (N1, N6 et N10) sont représentés par des boules. Enfin, la numérotation des résidus correspondant à AMY1 est présentée en noir et, respectivement en rouge, cyan et vert pour les amylases de pancréas de porc, salivaire humaine et pancréatique humaine.

J/ Complexes entre des polyamines dérivées de la spermidine et l' α -amylase d'orge AMY1 : étude par cristallographie aux rayons X :

Des expériences d'obtention de complexes entre des polyamines dérivées de la spermidine - fournies par l'équipe du Dr. Bertrand Carboni (*Laboratoire « Synthèse et électrosynthèse organiques » (SESO), CNRS - Université de Rennes UMR 6510*) - et AMY1 ont été entreprises en utilisant les méthodes de la cristallographie de diffraction des rayons X. Le but de cette étude était d'améliorer les connaissances des modalités d'interaction de cette classe chimique de molécule avec notre protéine modèle AMY1.

1. Conditions de trempage avec les polyamines :

Les cristaux de AMY1 ont été obtenus selon la méthode décrite précédemment (Robert *et al.*, 2002a). Les cristaux ont ensuite été trempés pendant 20 heures dans une solution contenant 10 mM d'une des polyamines considérées (voir **Figure 6**).

2. Collecte et traitement des données de diffraction :

Les collectes des données de diffraction des cristaux trempés avec les molécules de polyamine 1, 2, 3 ont été effectuées avec un générateur de rayons X (radiation CuK_α - longueur d'onde 1,5418 Å) à anode tournante opérant à 44 kV et 99 mA avec un monochromateur en graphite couplé à un détecteur bidimensionnel de type Image Plate (*MarResearch 345*). Les cristaux ont été au préalable cryo-protégés en les trempant successivement dans des solutions contenant du PEG 8000 20% (w/v), 10 mM de la polyamine testée et des concentrations croissantes d'éthylène-glycol (0, 5, 10 et enfin 15% (v/v)). Les jeux de données ont été collectés avec des cristaux maintenus sous un flux d'azote gazeux à 100 K pendant toute la durée des expériences de diffraction.

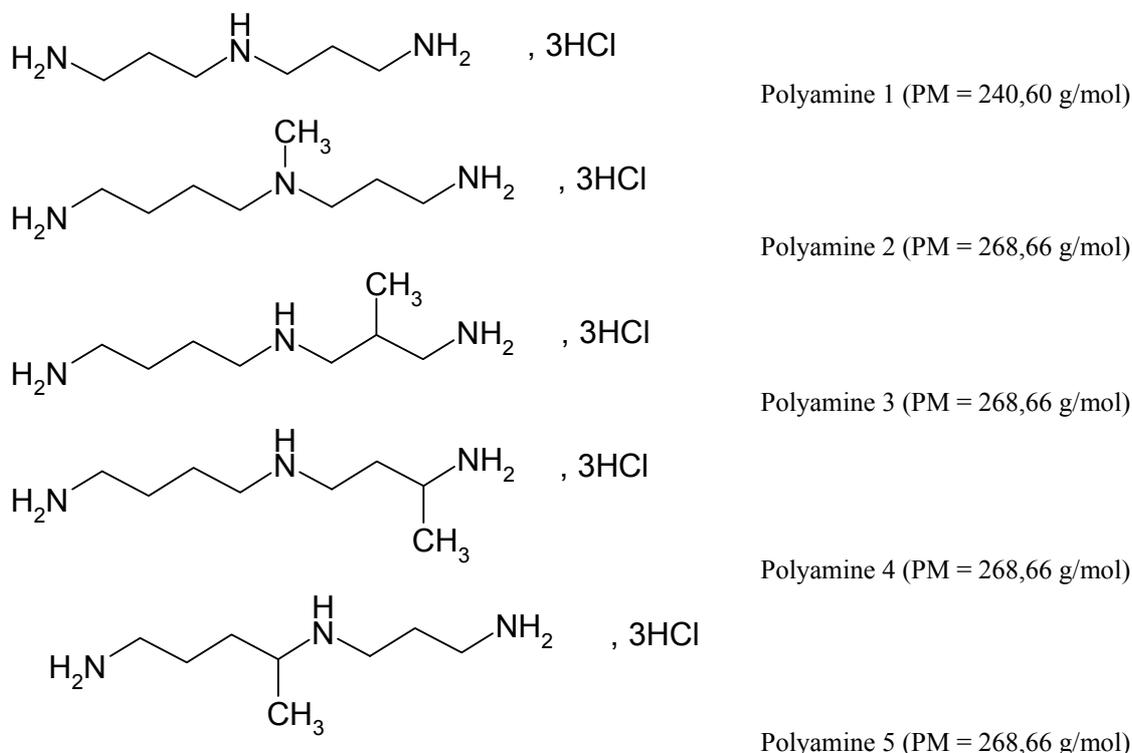


Figure 6 : Formules planes des 5 polyamines dérivées de la spermidine, utilisées pour les tests d'interaction avec AMY1 (molécules fournies par le Dr. Bertrand Carboni (*Synthèse et ElectroSynthèse Organiques (SESO), CNRS - Université de Rennes, UMR 6510*)).

La collecte des données correspondant au cristal trempé dans la polyamine 4 n'a pu être effectuée. En effet, le cristal s'est fortement craquelé lors de l'étape de trempage et n'a pas résisté à l'étape de cryo-protection. La réduction de concentration de la polyamine lors du trempage n'a pas permis d'éviter la fragilisation du cristal. Enfin, des tentatives d'expériences de diffraction sans cryo-protection préalable ont échoué, des anneaux de solvant très marqués et une forte mosaïcité ayant été détectés.

La collecte de données correspondant à la molécule de polyamine 5 a été conduite sur la ligne de lumière FIP BM30A du synchrotron ESRF (Grenoble, FRANCE) en utilisant également un détecteur bidimensionnel de type Image Plate (*MarResearch 345*), à une longueur d'onde de 0,9761 Å. Comme précédemment, le cristal a été maintenu à 100 K durant l'expérience.

L'intégration des jeux de données de diffraction des différents cristaux par le logiciel DENZO, intégré dans l'ensemble *marHKL* (Otwinowski & Minor, 1997), nous a permis de déterminer les paramètres cristallins de base. Nous avons ensuite déterminé le groupe d'espace comme étant, dans tous les cas, $P2_12_12$. L'unité asymétrique de la maille cristalline est composée d'une seule molécule d'enzyme AMY1. Les données statistiques concernant les collectes de données pour les différentes polyamines testées sont présentées dans le **Tableau 4**, page suivante.

3. Détermination des structures 3D des différents complexes :

Les traitements ultérieurs des données ont été réalisés en utilisant les programmes de la suite CCP4 (CCP4 Collaborative Computational Project, 1994) avec notamment *Scala* pour les étapes de mise à l'échelle. Le problème des phases a été résolu par la méthode de « *Rigid Body Refinement* », en utilisant le logiciel *CNS* (Brünger *et al.*, 1998).

Les affinements ont été réalisés par les techniques de dynamique moléculaire (recuit simulé) (Brünger *et al.*, 1990) à l'aide du logiciel *CNS* (Brünger *et al.*, 1998) en alternance avec des contrôles visuels des modèles réalisés : l'insertion des molécules d'eau et de calcium et les étapes d'affinement manuel des positions des chaînes latérales dans la densité électronique ont été réalisées avec le logiciel *TURBO-FRODO* (Roussel & Cambillau, 1989). Pour chaque détermination de structure, l'affinement a été conduit en examinant les facteurs R et R_{libre} cristallographiques (Brünger, 1992). Ce dernier a été calculé en constituant un « ensemble-test » contenant 10% du nombre total des réflexions, sélectionnées aléatoirement.

4. Résultats :

L'examen des cartes de densité électronique $2F_o - F_c$ et $F_o - F_c$ des structures affinées, dans la région du site actif de AMY1, mais aussi dans la structure entière ne nous a pas permis de mettre en évidence la fixation d'une des polyamines testées. En effet, aucune densité électronique décrivant une des molécules présentées ci-dessus n'a été identifiée.

Polyamine utilisée (cf. formules, page 168)	1	2	3	4	5
Longueur d'onde (Å)	1,54179	1,54179	1,54179	-	0,97610
Température d'enregistrement (K)	100	100	100	-	100
Dimensions de la maille (Å)	a= 83,97	a= 85,00	a= 84,04	-	a= 88,35
	b= 71,21	b= 72,66	b= 71,32	-	b= 72,82
	c= 62,90	c= 61,38	c= 62,94	-	c= 61,74
Angles de la maille (°)	$\alpha = \beta = \gamma$	$\alpha = \beta = \gamma$	$\alpha = \beta = \gamma$	-	$\alpha = \beta = \gamma$
	= 90	= 90	= 90	-	= 90
Groupe d'espace	P2 ₁ 2 ₁ 2	P2 ₁ 2 ₁ 2	P2 ₁ 2 ₁ 2	-	P2 ₁ 2 ₁ 2
Résolution (Å)	22 – 2,6	21,8 – 2,6	21,5 – 2,7	-	41,6 – 1,5
Dernière coquille de résolution (Å)	2,67 –	2,67 –	2,77 –	-	1,54 –
	2,60	2,60	2,70	-	1,50
Complétude moyenne des données (%)	93,1	87,5	95,8	-	98,7
Nombre total de réflexions	44411	40251	33425	-	271695
Nombre de réflexions uniques	11137	10430	10357	-	63366
Multiplicité	4,0	3,9	3,2	-	4,3
R _{sym} moyen (%)	18,3	18,1	15,5	-	4,0
R _{sym} dans la dernière coquille de résolution (%)	45,5	49,1	44,8	-	11,9
I/σ(I) moyen	4,1	4,1	4,7	-	13,3
I/σ(I) dans la dernière coquille de résolution	1,7	1,6	1,7	-	6,2

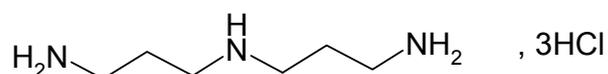
On précise :
$$R_{sym} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I(hkl)_i - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I(hkl)}$$

Tableau 4 : Statistiques d'enregistrement des données pour les tentatives de complexe entre l' α -amylase d'orge isoenzyme 1 (AMY1) et cinq molécules de polyamines (notées de 1 à 5) dérivées de la spermidine.

5. Discussion :

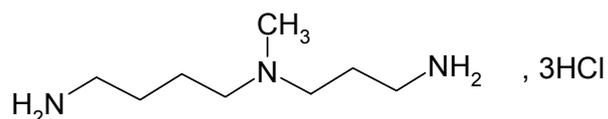
Sur la base des connaissances du complexe AMY1 / spermidine précédemment décrit, nous avons tenté d'expliquer l'absence de fixation, dans le site actif de l'enzyme, des polyamines testées.

Polyamine 1 :



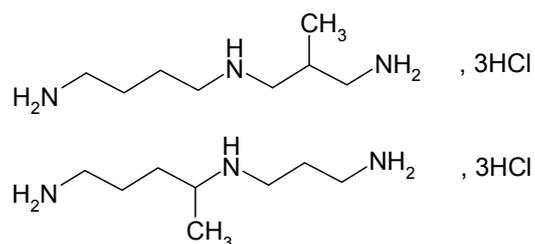
L'absence de fixation dans le site de AMY1 peut s'expliquer par le fait que la polyamine 1 est plus courte que la spermidine. En effet, la chaîne principale de la polyamine 1 comporte 9 atomes (carbones et azotes) au lieu de 10 pour la spermidine. Si l'on observe les interactions entre AMY1 et la spermidine (voir **Tableau 2**, page 162), on peut constater l'importance de la longueur de la chaîne principale. En effet, la polyamine 1 peut être considérée comme une spermidine dont on aurait enlevé l'atome de carbone 2. De ce fait, l'interaction entre l'azote 1 et son environnement semble être compromis (notamment en ce qui concerne l'interaction avec Trp207).

Polyamine 2 :



Dans le cas de la polyamine 2, la longueur de la chaîne correspond à celle d'une molécule de spermidine. L'unique différence réside dans la présence d'un groupement méthyle greffé sur l'azote 6. Ainsi, la présence de ce groupement empêche la formation d'une liaison hydrogène avec le résidu catalytique Glu205. Une fois encore, la perte d'une liaison hydrogène aurait pour conséquence de déstabiliser le complexe potentiel et ainsi d'aboutir à la non formation de ce dernier.

Polyamines 3 et 5 :



La longueur de la chaîne des polyamines 3 et 5 correspond à celle d'une molécule de spermidine. L'unique différence réside dans la présence d'un groupement méthyle greffé sur les carbones 8 ou 5 pour les polyamines 3 et 5 respectivement. La non formation d'un complexe pour ces deux dernières peut ici probablement s'expliquer par un encombrement stérique dû au positionnement du groupement méthyle. En effet, il semble que ce groupement oblige la chaîne principale de la polyamine à adopter une conformation spatiale différente de celle observée pour la spermidine, vu la relative étroitesse du site actif de l'enzyme. Il est proposé que les conformations adoptées par les polyamines 3 et 5 ne permettent pas la formation d'interactions par liaisons hydrogène suffisantes et/ou fortes conduisant à un complexe stable entre lesdites polyamines et l'enzyme.

K/ Conclusions et extensions : arguments structuraux pour la conception de molécules de type glycopolyamine comme inhibiteurs d' α -amylases :

Compte tenu de l'examen, premièrement, du complexe formé entre la spermidine et l' α -amylase d'orge isoenzyme 1 (AMY1) et, deuxièmement, des tentatives de formation de complexe entre le même enzyme et les différentes polyamines considérées, certaines conclusions peuvent être dressées :

- L'interaction entre AMY1 et une polyamine est possible et semble être hautement spécifique dans le cas de la spermidine. Cette polyamine a la particularité de se fixer dans le site actif de AMY1 et uniquement à ce niveau.
- La très grande similitude, aux plans de la géométrie et de la nature des résidus des sites actifs des différentes α -amylases (quelle que soit leur origine : plantes, mammifères, bactéries, champignons), donne un grand poids à l'hypothèse que la fixation de la spermidine, dans un environnement donné (concentration, pH), s'exerce sur les α -amylases et éventuellement sur d'autres glycosidases.
- Les autres polyamines testées pour l'instant n'ont pas montré cette même capacité d'interaction au niveau du site actif de l'enzyme cible.

Il découle de ces observations que le mode d'interaction entre une polyamine et le site actif de l' α -amylase d'orge isoenzyme 1, semble être régi par un processus très fin de reconnaissance entre l'enzyme et le ligand. Ceci suggère que toute modification de la chaîne polyamine peut moduler les propriétés de reconnaissance de l'enzyme pour la molécule considérée.

1. Modes d'inhibition comparés de la spermidine et de l'acarbose :

La superposition des structures 3D du complexe entre l'isoenzyme 2 de l' α -amylase d'orge / acarbose et du complexe isoenzyme 1 de l' α -amylase d'orge / spermidine au niveau du site actif nous a permis de montrer une remarquable superposition de 3 cycles du pseudo-tétrасaccharide inhibiteur acarbose et de la spermidine (voir **Figure 7**, page suivante). Cette même superposabilité est retrouvée par la structure du complexe isoenzyme 1 de l' α -amylase d'orge / acarbose (voir **Figure 8**, plus loin). Ce mimétisme structural est assuré par des molécules radicalement différentes en terme de nature, composition chimique et propriétés générales. Ces constatations définissent une nouvelle voie d'étude dans le but de concevoir des dérivés glycopolyaminiques pour la mise au point d'inhibiteurs à visées thérapeutiques et pharmacologiques : il semble, en effet, vraisemblable de pouvoir utiliser comme inhibiteurs des glycosidases, d'une part, les polysaccharides de type acarbose, d'autre part, des polyamines de type spermidine afin d'obtenir de nouveaux inhibiteurs.

2. Molécules de type glycopolyamine :

Dans le but d'augmenter la spécificité des polyamines vis à vis des seules enzymes cibles, les α -amylases, il semble intéressant de concevoir des molécules hybrides difonctionnelles. Elles pourraient être constituées d'une partie spermidine (ou polyamine apparentée) permettant des interactions ioniques fortes avec les acides aminés catalytiques et d'une partie malto-oligosaccharide nécessaire pour établir des interactions hydrophobes ou des liaisons hydrogène avec les différents acides aminés constituant les sous-sites de la crevasse du centre actif. En particulier, il s'agirait de « profiter » de l'existence d'acides aminés aromatiques dans le site actif des glycosidases pour concevoir une polyamine avec des greffes d'unités glucosyl afin d'augmenter le pouvoir d'interaction de la molécule dérivée, notamment par interaction entre les cycles sucre et le noyau aromatique de certains acides aminés présents dans le site actif. Par conséquent, les molécules qui sont à concevoir doivent présenter un éventail large de possibilités d'interaction, en particulier grâce aux charges positives (groupements amine) du squelette de la polyamine, mais aussi aux interactions entre les sucres greffés avec des chaînes latérales aromatiques du site actif.

3. Synthèses des conjugués spermidine / malto-oligosaccharides :

En collaboration avec les équipes du Dr. Hugues Driguez (Laboratoire « Glycochimie et enzymologie moléculaire » du CERMAV, CNRS UPR5301, Grenoble) et du Dr. Bertrand Carboni (Laboratoire « Synthèse et électrosynthèse organiques », CNRS UMR6510 Université de Rennes), une synthèse de deux molécules de conjugués spermidine / maltooligosaccharide a été proposée par S. Catalan, S. Cottaz, B. Carboni et H. Driguez. Les expériences d'obtention de complexe par co-cristallisation ou trempage sont en cours, dans un premier temps avec les isoenzymes AMY1 et AMY2, puis, dans un second temps avec des α -amylases de mammifères (plus particulièrement l' α -amylase de pancréas de porc).

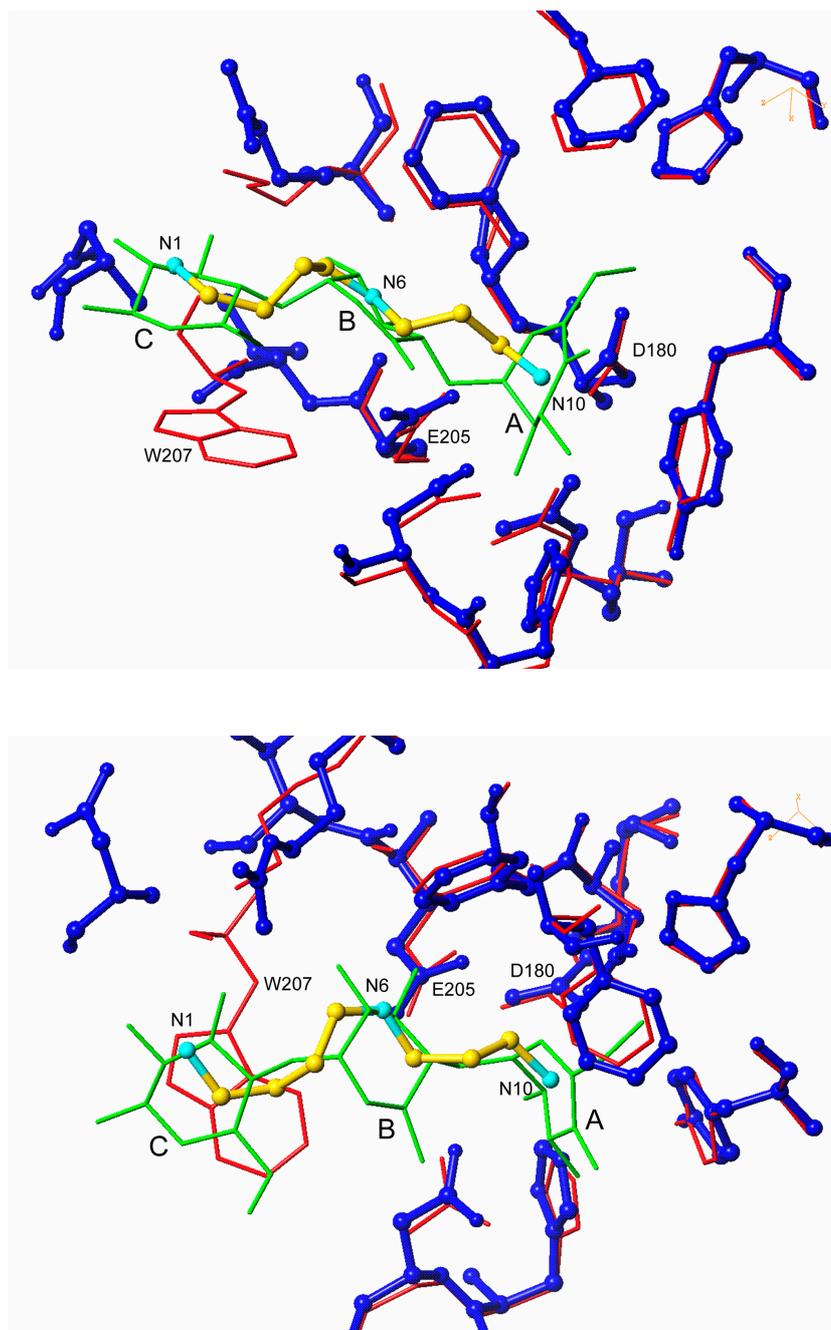


Figure 7 : *Superposition, au niveau du site actif, du complexe AMY2 / acarbose (protéine en bleu et acarbose en vert) avec le complexe AMY1 / spermidine (protéine en rouge et spermidine en jaune et bleu). Les deux figures présentent la même superposition, vue sous des angles différents. La numérotation des résidus correspond à celle de AMY1.*

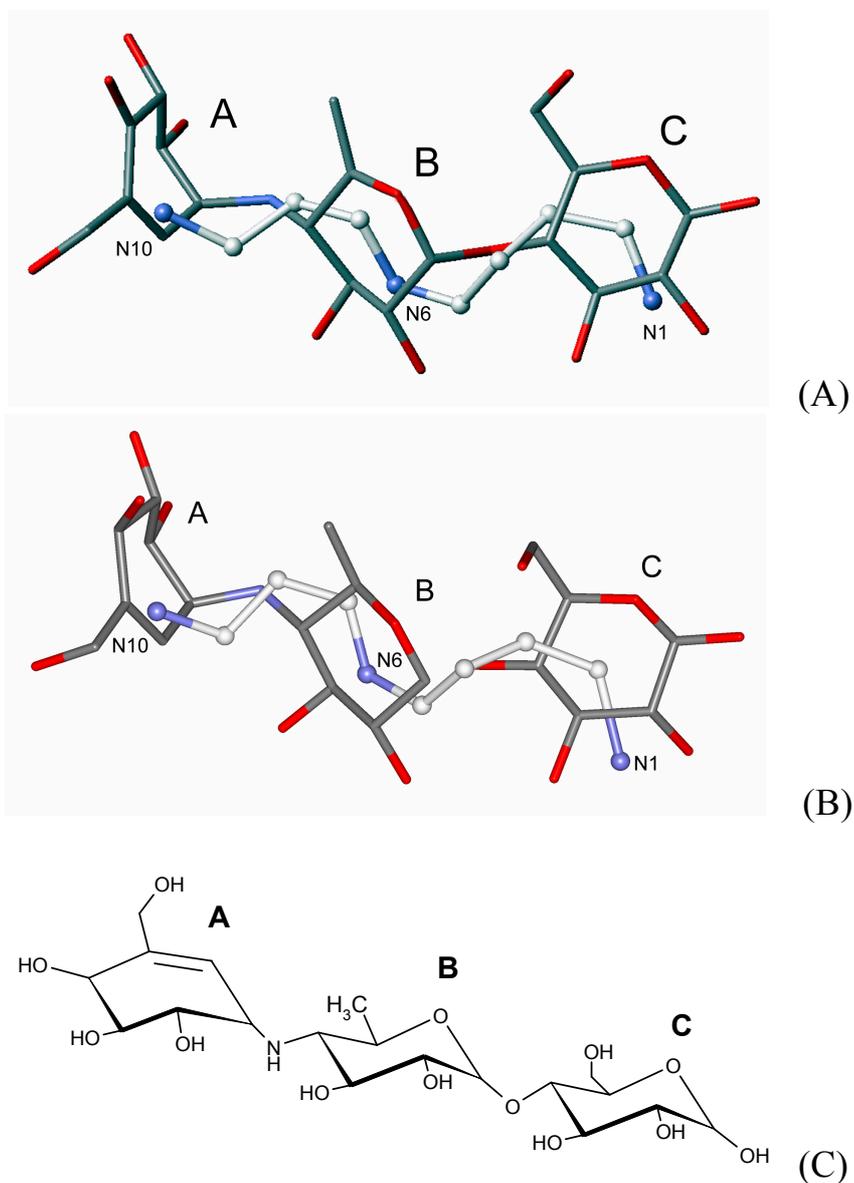


Figure 8 : Superposition de la molécule de spermidine dans sa conformation au niveau du site actif de AMY1 et de 3 des 4 cycles de l'acarbose dans leurs configurations respectives au sein du site actif de AMY2 (A) ou de AMY1 (B). Une formule plane des 3 cycles suscités (A, B, C) de l'acarbose est présentée (C).

Partie 4

Conclusions et Perspectives

Dans l'objectif d'expliquer les remarquables différences qui existent entre les deux isoenzymes de l' α -amylase d'orge, nous avons mené une étude structurale par cristallographie et diffraction des rayons X sur l'isoenzyme AMY1 en vue de le comparer avec AMY2, dont la structure est connue dans sa forme native et en complexe avec l'acarbose ou l'inhibiteur protéique BASI.

La cristallisation d'une forme recombinante tronquée de AMY1 nous a conduits à l'obtention de la structure de l'enzyme à une résolution de 1,5 Å. La comparaison des structures natives de AMY1 et AMY2 n'a pu mettre en évidence que de subtiles différences n'expliquant pas, de prime abord, les dissemblances des deux enzymes, que ce soit sur le plan de leurs propriétés physico-chimiques ou enzymatiques.

La structure native de AMY1 nous a tout de même permis de valider les expériences d'ingénierie protéique qui avaient identifié les déterminants de la non inhibition de cet isoenzyme par BASI. En effet, la substitution de quelques acides aminés entre AMY1 et AMY2 est responsable de cette distinction majeure.

Afin d'aller plus avant dans la compréhension de la reconnaissance des substrats par AMY1 et de ses mécanismes d'action, les structures de plusieurs complexes ont été résolues, à savoir : un complexe avec l'acarbose, et avec un analogue de substrat ainsi que deux autres complexes entre un mutant inactif de AMY1 et l'acarbose ou un substrat naturel maltoheptaose.

L'étude détaillée et comparée de ces complexes nous a permis de définir structurellement les sous-sites de fixation -6 à +2 et de montrer l'existence d'un sous-site -7. Nous avons confirmé que le site de surface de fixation des granules d'amidon du domaine A, observé chez AMY2, est conservé chez AMY1. De manière inattendue, nous avons constaté que le site actif de AMY1 pouvait fixer un ion calcium entièrement solvaté, comparable à l'ion calcium interfacial trouvé dans le complexe AMY2/BASI. D'où l'hypothèse que le site actif de AMY1 pourrait être considéré comme un quatrième site de fixation d'ion calcium et que cette caractéristique serait à l'origine de la différence d'affinité des deux isoenzymes pour ces ions.

En outre, un des résultats qui nous paraît essentiel est la mise en évidence chez AMY1 d'un second site de surface non observé chez AMY2. Ce site a la capacité de fixer des substrats naturels au niveau du domaine C grâce au changement conformationnel important d'une boucle et à l'intervention de la tyrosine 380. Ce site, en forme de pince, peut se refermer sur la chaîne polysaccharidique afin de la capturer à la surface de la protéine ; d'où l'appellation que nous lui avons conféré de site de surface en « pince à sucre ». Cette observation donne, pour la première fois, une fonction de reconnaissance et de liaison de polysaccharides au domaine C d'une α -amylase. Elle explique certainement les différences d'affinité pour les substrats et les granules d'amidon observées entre AMY1 et AMY2. Des hypothèses quant aux rôles des deux sites de surface dans des conditions *in vivo* ont enfin été émises.

Une autre conclusion de notre étude est que les mécanismes catalytiques de AMY1 et AMY2 sont très vraisemblablement identiques de par la remarquable conservation de la structure du site actif. De fait, les différences d'activité ou d'affinité entre les deux isoenzymes doivent s'expliquer, en plus de l'implication des sites de surface, par de subtiles variations au niveau des sous-sites de fixation.

Enfin, nous avons montré la possibilité d'inhibition de AMY1 par une molécule de polyamine de type spermidine, propriété qui n'avait jamais été observée chez aucune autre glycosyle hydrolase. Un complexe AMY1 / spermidine a montré que la polyamine se fixait préférentiellement dans le site actif, même en présence d'acarbose. Une étude par modélisation moléculaire a conclu que cette propriété pouvait être transposée à des α -amylases de mammifères. L'importance potentielle des polyamines de type spermidine est évidente pour la conception de nouveaux inhibiteurs à visées thérapeutiques.

Malgré ces nouveaux apports dans la connaissance des relations structure / fonction de AMY1, plusieurs questions n'ont pas trouvé de réponse claire et devront faire l'objet d'études ultérieures.

Ainsi, les causes des différences de stabilité à pH acide ou à température élevée entre AMY1 et AMY2 demeurent encore obscures. Des études de dynamique moléculaire et de champs de force locaux couplées à l'examen de la répartition des charges permettront certainement de définir l'origine de ces dissemblances. Nous envisageons, également, de tester l'influence du pH sur la fixation de substrats, d'analogues de substrats ou d'inhibiteurs. Ces expériences pourraient aussi vérifier notre hypothèse concernant la dépendance au pH de la fixation du calcium dans le site actif, mais également celle de molécules de type polyamine ou d'analogues de substrats, d'inhibiteurs oligosaccharidiques, etc.

De plus, afin de préciser le mécanisme catalytique des ces deux α -amylases, nous avons envisagé une étude par cristallographie en temps résolu, de manière à suivre et décrire toutes les étapes de la réaction. Pour y parvenir, ces expériences nécessitent la mise au point d'un substrat modifié photoactivable. Dans ce contexte, Lionel Greffe (du groupe de Hugues Driguez, CERMAV - Grenoble) a proposé, durant sa thèse, la synthèse d'un tel composé que nous avons testé lors d'expériences préliminaires. Il apparaît que ce substrat modifié n'est pas optimal et devra être amélioré.

En outre, d'importants travaux d'ingénierie protéique rationnelle, conduits en partenariat avec l'équipe de Birte Svensson (*Carlsberg Laboratory*, Copenhague), ont permis de modifier les propriétés d'affinité et d'hydrolyse de la forme recombinante de AMY1. Ainsi, plusieurs mutants ont pu être clonés, surexprimés et purifiés (nommément : V47D, V47C, M53E, C95T, D97E, T212W, T212W/Y105A, M298A). Les modifications introduites couvrent tous les sous-sites et la résolution des structures des mutants appropriés apportera de précieux renseignements additionnels sur les modalités d'interaction des substrats et les affinités relatives de ces sous-sites. Les expériences de cristallogénèse de ces mutants sont en cours et nous avons déjà obtenus plusieurs conditions produisant des cristaux utilisables pour les expériences de diffraction, travaux conduits en collaboration avec David Mandelman de notre laboratoire. Trois structures de mutants sont en cours d'affinement.

Sur un autre plan, nous sommes sur le point de réaliser plusieurs complexes entre AMY1 et des inhibiteurs de type pseudo-polysaccharidique. D'autres complexes avec des substrats branchés sont également en cours de préparation. Enfin, des complexes entre le mutant inactif de AMY1 et des cyclodextrines sont envisagés, de manière à vérifier nos théories concernant l'interaction de substrats circularisés au niveau des sites de surface.

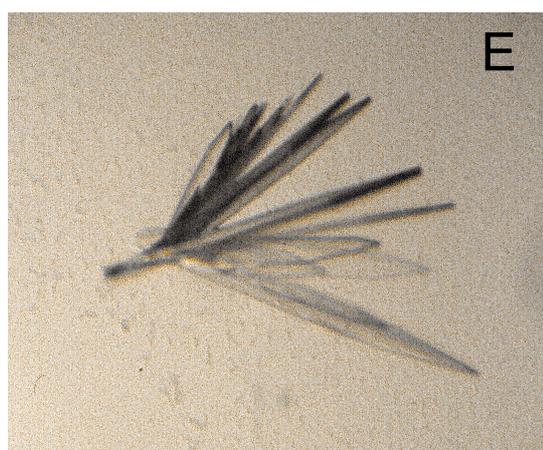
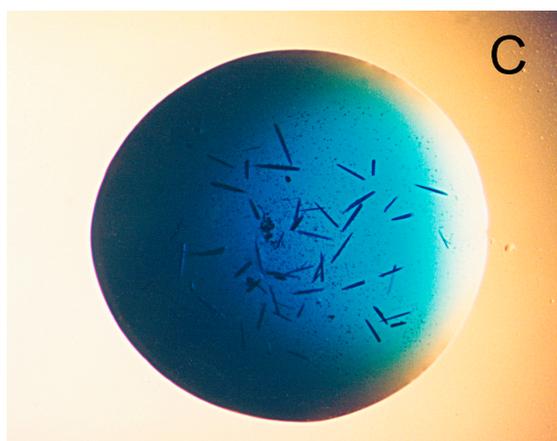
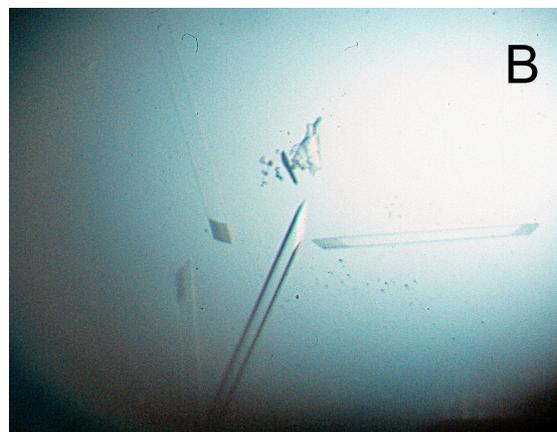
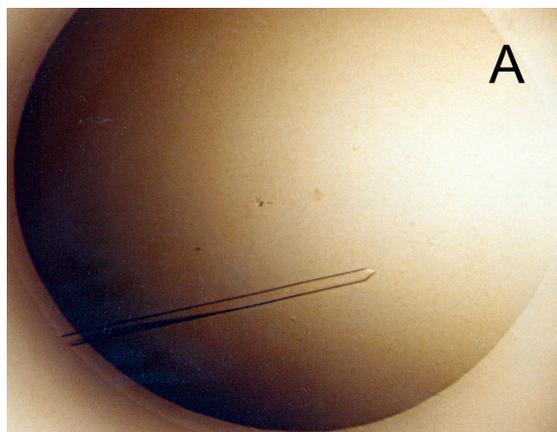
Enfin, un programme de recherche se poursuit en associant des approches de biologie structurale, de synthèse chimique, d'enzymologie et de biologie animale dans le but de concevoir des molécules à visée thérapeutique pour le traitement du diabète et des désordres métaboliques apparentés. Sa stratégie est la conception rationnelle, à partir des bases structurales, de molécules de type glyco-polyamique, dont les propriétés éventuelles d'inhibition seront ensuite caractérisées *in vitro* puis *in vivo* dans le modèle animal du rat.

Enfin, ces travaux montrent qu'une étude structurale n'est pas l'aboutissement d'une voie de recherche mais, au contraire, qu'elle est souvent à l'origine de nouveaux champs d'investigation. Elle montre aussi que la synergie des moyens et des compétences à l'interface (biochimie, enzymologie, biologie moléculaire, synthèse organique, biophysique, bioinformatique et biologie structurale, biologie animale, etc.) et les allers-retours entre ces disciplines sont plus que jamais nécessaires ; non seulement pour les aspects fondamentaux de l'étude, mais aussi pour toutes les applications potentielles en découlant (ingénierie protéique rationnelle, biotechnologie, conception de principes actifs, etc.).

Partie 5

Annexes

Annexe 1 : Quelques cristaux obtenus et utilisés dans le cadre de l'étude :



- (A) Cristal de AMY1 Δ 9.
 (B) Autres cristaux de AMY1 Δ 9.
 (C) Co-cristaux de AMY1 Δ 9 avec l'acarbose, colorés dans la goutte par le réactif *IZIT* (*Hampton*).
 (D) Cristaux typiques du mutant inactif AMY1_{D180A} poussant autour d'un germe central.
 (E) Co-cristaux typiques du mutant inactif AMY1_{D180A} avec l'acarbose.

Annexe 2 : Publications personnelles présentées dans l'étude :

Article publié :

- Xavier ROBERT, Tine E. GOTTSCHALK, Richard HASER, Birte SVENSSON & Nushin AGHAJARI (2002). Expression, purification and preliminary crystallographic studies of α -amylase isozyme 1 from barley seeds. *Acta Crystallogr.* **D52**, 683-686.

Article accepté, sous presse :

- Xavier ROBERT, Richard HASER, Birte SVENSSON & Nushin AGHAJARI (2002). Comparison of crystal structures of barley α -amylase 1 and 2: implications for isozyme differences in stability and activity. *Biologia, Bratislava*, **57/Suppl. 11**: 55-66; ISSN 0006-3088 (*Biologia*). ISSN 1335-6399 (*Biologia Section Cellular and Molecular Biology*).

Article à soumettre :

- Xavier ROBERT, Richard HASER, Tine E. GOTTSCHALK, Hugues DRIGUEZ, Birte SVENSSON & Nushin AGHAJARI. The structure of barley α -amylase isozyme 1 reveals a novel role of domain C in substrate recognition and binding: “a pair of sugar tongs”.

Annexe 3 : Collaborations scientifiques :

Programme Européen BIOTECH « AGADE » n° BIO4-CT98-0022

Intitulé du programme : « **AGADE** » (*Alpha-Glucan Active Designer Enzyme*)
Structure determination and redesign of enzymes active in the synthesis and hydrolysis of alpha-glucans for creation of novel specificities

Durée : Octobre 1998 – Octobre 2000

Collaboration : **Equipe de Hugues Driguez (Directeur de recherche au CNRS) :**
 « **Glycochimie et enzymologie moléculaire** »
 ► *Hugues DRIGUEZ, Lionel GREFFE & Sylvain COTTAZ*
Centre de recherches sur les macromolécules végétales (CERMAV)
CNRS UPR 5301 - BP 53 - 38041 Grenoble cedex 9

Equipe de Birte Svensson (Group Leader) – Laboratoire Carlsberg :
 ► *Birte SVENSSON* (Coordinatrice du programme « AGADE »),
Haruhide MORI, Morten TOVBORG JENSEN & Kristian Sass BAK-JENSEN
Carlsberg Laboratory, Department of Chemistry
Gamle Carlsberg Vej 10 – DK2500 Copenhagen-Valby - DANEMARK

Action CNRS / INSERM – Molécules et Cibles Thérapeutiques

Intitulé du programme : « **Développement d'une nouvelle classe de molécules antidiabète et antiobésité pour le contrôle de l'absorption intestinale du glucose** »

Durée : 2 ans - en cours.

Collaboration : **Equipe de Gilles Mithieux (Directeur de recherche au CNRS) :**
 « **Physiologie moléculaire de la production endogène de glucose** »
 ► *Gilles MITHIEUX & Carine ZITOUN*
Laboratoire « Mécanismes moléculaires du Diabète »
INSERM U449 - Faculté Laënnec, Guillaume Paradin - 69372 Lyon

Equipe de Hugues Driguez (Directeur de recherche au CNRS) :
 « **Glycochimie et enzymologie moléculaire** »
 ► *Hugues DRIGUEZ, Stéphanie CATELAN & Sylvain COTTAZ*
Centre de recherches sur les macromolécules végétales (CERMAV)
CNRS UPR 5301 - BP 53 - 38041 Grenoble cedex 9

Equipe de Bertrand Carboni (Directeur de recherche au CNRS)
 ► *Bertrand CARBONI, Alain HERCOUET & Françoise POSSEMEE*
Laboratoire de Synthèse et électrosynthèse organiques (SESO)
CNRS Université de Rennes UMR 6510 - Campus de Beaulieu - 35042 Rennes

Collaboration Industrielle avec l'entreprise COLETICA

Durée : Octobre 2000 - Janvier 2002

Collaboration : **Equipe Recherche et Développement en Cosmétologie**
 ► *Isabelle BONNET & Eric PERRIER*
COLETICA - 32, rue St Jean de Dieu - 69007 LYON

Partie 6

Références Bibliographiques

[A]

- Abe, J., Sidenius, U. & Svensson, B. (1993) Arginine is essential for the α -amylase inhibitory activity of the α -amylase/subtilisin inhibitor (BASI) from barley seeds. *Biochem. J.*, **293**, 151-155.
- Accelrys. (2001) ViewerLite v4.2. Accelrys Inc., San Diego.
- Adams, P.D., Pannu, N.S., Read, R.J. & Brünger, A.T. (1997) Cross-validated Maximum Likelihood Enhances Crystallographic Simulated Annealing Refinement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 5018-5023.
- Aghajari, N., Feller, G., Gerday, C. & Haser, R. (1998a) Crystal structures of the psychrophilic α -amylase from *Alteromonas haloplanctis* in its native form and complexed with an inhibitor. *Protein Sci.*, **7**, 564-572.
- Aghajari, N., Feller, G., Gerday, C. & Haser, R. (1998b) Structures of the psychrophilic *Alteromonas haloplanctis* α -amylase give insights into cold adaptation at a molecular level. *Structure*, **6**, 1503-1516.
- Aghajari, N., Robert, X. & Haser, R. (23/12/1999) Nouveaux inhibiteurs de glycosidases et leurs applications pharmacologiques, notamment pour traiter le diabète. *Brevet CNRS / INPI n°99-16409*, FRANCE.
- Aghajari, N., Robert, X. & Haser, R. (05/07/2001) Novel glycosidase inhibitors and their pharmacological uses, in particular for treating diabetes. *International Patent WO 01/47528*, FRANCE.
- Ajandouz, E.H., Abe, J., Svensson, B. & Marchis-Mouren, G. (1992) Barley malt α -amylase. Purification, action pattern, and subsite mapping of isozyme 1 and two members of the isozyme 2 subfamily using *p*-nitrophenylated maltooligosaccharide substrates. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1159**, 193-202.
- ALFEDIAM. (2001) Association de Langue Française pour l'Etude du Diabète et des Maladies Métaboliques – Site Internet : <http://www.alfediam.org>. Association ALFEDIAM, Paris, FRANCE.
- Andersen, J.S., Søgaard, M., Svensson, B. & Roepstorff, P. (1994) Localization of an O-glycosylated site in the recombinant barley α -amylase 1 produced in yeast and correction of the amino acid sequence using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of peptide mixtures. *Biol. Mass Spectrom.*, **23**, 547-554.
- André, G., Buléon, A., Haser, R. & Tran, V. (1999) Amylose chain behavior in an interacting context. III. Complete occupancy of the AMY2 barley α -amylase cleft and comparison with biochemical data. *Biopolymers*, **50**, 751-762.
- Audic, S., Lopez, F., Claverie, J.M., Poirot, O. & Abergel, C. (1997) SAmBA: an interactive software for optimizing the design of biological macromolecules crystallization experiments. *Proteins*, **29**, 252-257.

[B]

- Bacon, D.J. & Anderson, W.F. (1988) A Fast Algorithm for Rendering Space-Filling Molecule Pictures. *J. Mol. Graph.*, **6**, 219-220.
- Bailey, S., Smith, K., Fairlamb, A.H. & Hunter, W.N. (1993) Substrate interactions between trypanothione reductase and N1-glutathionylspermidine disulphide at 0.28-nm resolution. *Eur. J. Biochem.*, **213**, 67-75.
- Bairoch, A. & Apweiler, R. (2000) The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 45-48.
- Bak-Jensen, K.S. (1999) M. Sc. Master Thesis. *Department of Chemistry, Carlsberg laboratory*. University of Copenhagen, Copenhagen.
- Balfour, J.A. & McTavish, D. (1993) Acarbose. An update of its pharmacology and therapeutic use in diabetes mellitus. *Drugs*, **46**, 1025-1054.
- Banner, D.W., Bloomer, A.C., Petsko, G.A., Phillips, D.C., Pogson, C.I., Wilson, I.A., Corran, P.H., Furth, A.J., Milman, J.D., Offord, R.E., Priddle, J.D. & Waley, S.G. (1975) Structure of chicken

- muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 Å resolution using amino acid sequence data. *Nature*, **255**, 609-614.
- Banks, W. & Greenwood, C.T. (1975) *Starch and its components*. Ed. W. Banks and C. T. Greenwood, Edinburgh University Press.
- Battle, N., Carbonell, J.V. & Sendra, J.M. (2000) Determination of depolymerisation kinetics of amylose, amylopectin, and soluble starch by *Aspergillus oryzae* α -amylase using a fluorometric 2-*p*-toluidinylnaphthalene-6-sulfonate/flow-injection analysis system. *Biotechnology and Bioengineering*, **70**, 544-552.
- Bay-Smidt, A.M., Wischmann, B., Olsen, C.E. & Nielsen, T.H. (1994) Starch bound phosphate in potato tubers as studied by a simple method for determination of organic phosphate and ^{31}P -NMR. *Starch/Stärke*, **46**, 167-172.
- Bear, R.S. (1944) *J. Am. Chem. Soc.*, **66**, 2122-2123.
- Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N. & Bourne, P.E. (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 235-242.
- Bertoft, E., Andtfolk, C. & Kulp, S.E. (1984) Effect of Ph, Temperature, and Calcium-Ions on Barley Malt α -Amylase Isoenzymes. *Journal of the Institute of Brewing*, **90**, 298-302.
- BIAM. (2001) Banque de Données Automatisée sur les Médicaments – Site Internet : <http://www.biam2.org>. BIAM, Paris, FRANCE.
- Billeter, M., Kline, A.D., Braun, W., Huber, R. & Wuthrich, K. (1989) Comparison of the high-resolution structures of the α -amylase inhibitor tendamistat determined by nuclear magnetic resonance in solution and by X-ray diffraction in single crystals. *J. Mol. Biol.*, **206**, 677-687.
- Billeter, M., Schaumann, T., Braun, W. & Wuthrich, K. (1990) Restrained Energy Refinement with Two Different Algorithms and Force Fields of the Structure of the α -Amylase Inhibitor Tendamistat Determined by NMR in Solution. *Biopolymers*, **29**, 695-702.
- Blennow, A., Bay-Smidt, A.M., Olsen, C.E. & Moller, B.L. (1998) Analysis of starch bound glucose-3-phosphate and glucose-6-phosphate using a controlled acid treatment combined with high-performance anion-exchange chromatography. *J. Chromatogr.*, **A289**, 385-391.
- Blennow, A., Bay-Smidt, A.M., Olsen, C.E. & Moller, B.L. (2000) The distribution of covalently bound phosphate in the starch granule in relation to starch crystallinity. *Int. J. Biol. Macromol.*, **27**, 211-218.
- Blennow, A., Mette Bay-Smidt, A. & Bauer, R. (2001) Amylopectin aggregation as a function of starch phosphate content studied by size exclusion chromatography and on-line refractive index and light scattering. *Int. J. Biol. Macromol.*, **28**, 409-420.
- Blundell, T.L. & Johnson, L.N. (1976) *Protein Crystallography*. Academic Press, London.
- Boel, E., Brady, L., Brzozowski, A.M., Derewenda, Z., Dodson, G.G., Jensen, V.J., Petersen, S.B., Swift, H., Thim, L. & Woldike, H.F. (1990) Calcium binding in α -amylases: an X-ray diffraction study at 2.1 Å resolution of two enzymes from *Aspergillus*. *Biochemistry*, **29**, 6244-6249.
- Boistelle, R. & Astier, J.P. (1988) Solubility, phase-transition, kinetic ripening and growth-rates of porcine pancreatic α -amylase isozymes. *J. Crystal Growth*, **90**, 14-30.
- Bompard-Gilles, C., Rousseau, P., Rouge, P. & Payan, F. (1996) Substrate mimicry in the active center of a mammalian α -amylase: structural analysis of an enzyme-inhibitor complex. *Structure*, **4**, 1441-1452.
- Brayer, G.D., Luo, Y. & Withers, S.G. (1995) The structure of human pancreatic α -amylase at 1.8 Å resolution and comparisons with related enzymes. *Protein Sci.*, **4**, 1730-1742.
- Brady, R.L., Brzozowski, A.M., Derewenda, Z.S., Dodson, E.J. & Dodson, G.G. (1991) Solution of the structure of *Aspergillus niger* acid α -amylase by combined molecular replacement and multiple isomorphous replacement methods. *Acta Crystallogr.* **B47**, 527-535.
- Brisson, J., Chanzy, H. & Winter, W.T. (1991) The crystal and molecular structure of VH amylose by electron diffraction analysis. *Int. J. Biol. Macromol.*, **13**, 31-39.
- Brzozowski, A.M., Lawson, D.M., Turkenburg, J.P., Bisgaard-Frantzen, H., Svendsen, A., Borchert, T.V., Dauter, Z., Wilson, K.S. & Davies, G.J. (2000) Structural analysis of a chimeric bacterial α -amylase. High-resolution analysis of native and ligand complexes. *Biochemistry*, **39**, 9099-9107.
- Brünger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T. & Warren, G.L. (1998)

- Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr.* **D54**, 905-921.
- Brünger, A.T. (1992) Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature*, **355**, 472-475.
- Brünger, A.T., Krukowski, A. & Erickson, J. (1990) Slow-cooling protocols for crystallographic refinement by simulated annealing. *Acta Crystallogr.* **A46**, 585-593.
- Brünger, A.T., Kuriyan, M. & Karplus, M. (1987) Crystallographic R factor refinement by molecular dynamics. *Science*, **235**, 458-460.
- Buléon, A., Gallant, D.J., Bouchet, B., Mouille, G., D'Hulst, C., Kossmann, J. & Ball, S. (1997) Starches from A to C. *Chlamydomonas reinhardtii* as a model microbial system to investigate the biosynthesis of the plant amylopectin crystal. *Plant Physiol.*, **115**, 949-957.
- Buléon, A., Delage, M.M., Brisson, J. & Chanzy, H. (1990) Single crystals of V amylose complexed with isopropanol and acetone. *Int. J. Biol. Macromol.*, **12**, 25-33.
- Bush, D.S., Sticher, L., van Huystee, R., Wagner, D. & Jones, R.L. (1989) The calcium requirement for stability and enzymatic activity of two isoforms of barley aleurone α -amylase. *J. Biol. Chem.*, **264**, 19392-19398.

[C]

- Carter, C.W., Jr. & Carter, C.W. (1979) Protein crystallization using incomplete factorial experiments. *J. Biol. Chem.*, **254**, 12219-12223.
- CCP4 Collaborative Computational Project, N. (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr.* **D50**, 760-763.
- Chantalat, L., Leroy, D., Filhol, O., Nueda, A., Benitez, M.J., Chambaz, E.M., Cochet, C. & Dideberg, O. (1999) Crystal structure of the human protein kinase CK2 regulatory subunit reveals its zinc finger-mediated dimerization. *Embo J.*, **18**, 2930-2940.
- Colonna, P. & Mercier, C. (1984) Macromolecular structure of wrinkled and smooth-pea starch components. *Carbohydr. Res.*, **126**, 233-247.
- Colonna, P., Buleon, A., & Lemarie, F. (1988) Action of *Bacillus subtilis* α -amylase on native wheat starch. *Biotechnology and bioengineering*, **31**, 895-904.
- Coutinho, P.M. & Henrissat, B. (1999) Carbohydrate-Active Enzymes server at URL: <http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/index.html>.
- Cudney, B., Patel, S., Weisgraber, K., Newhouse, Y. & MacPherson, A. (1994) Screening and optimization strategies for macromolecular crystal growth. *Acta Crystallogr.* **D50**, 414-423.

[D]

- Dauter, Z., Dauter, M., Brzozowski, A.M., Christensen, S., Borchert, T.V., Beier, L., Wilson, K.S. & Davies, G.J. (1999) X-ray structure of Novamyl, the five-domain "maltogenic" α -amylase from *Bacillus stearothermophilus*: maltose and acarbose complexes at 1.7 Å resolution. *Biochemistry*, **38**, 8385-8392.
- Davies, G. & Henrissat, B. (1995) Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, **3**, 853-859.
- Davies, G.J., Wilson, K.S. & Henrissat, B. (1997) Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochem. J.*, **321**, 557-559.
- del-Rio, G., Morett, E. & Soberon, X. (1997) Did cyclodextrin glycosyltransferases evolve from α -amylases ? *FEBS Lett.*, **416**, 221-224.

- Denyer, K., Clarke, B., Hylton, C., Tatge, H. & Smith, A. (1996) The elongation of amylose and amylopectin chains in isolated starch granules. *Plant J.*, **10**, 1135-1143.
- Deswarte, J., De Vos, S., Langhorst, U., Steyaert, J. & Loris, R. (2001) The contribution of metal ion to the conformational stability of rionuclease T₁. Crystal versus solution. *Eur. J. Biochem.*, **268**, 3993-4000.
- Diabétologie (*Divers auteurs*). (1990) *Précis de Diabétologie*. Ed. PRADEL, Paris.
- Driguez, H. (2001) Thio-oligosaccharides as tools for structural biology. *ChemBiolChem.*, **2**, 111-118.
- Ducruix, A. & Giegé, R. (1992) *Crystallisation of nucleic acids and proteins: a practical approach*. IRL Press, Oxford University Press.

[E]

- Esnouf, R. (1999) BobScript. University of Oxford, U.K., Oxford.
- Eto, T.K. & Rubinsky, B. (1993) Antifreeze glycoproteins increase solution viscosity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **197**, 927-931.

[F]

- Flickinger, M.C. & Drew, S.W. (1999) *Encyclopedia of Bioprocess Technology: fermentation, biocatalysis, and bioseparation*. John Wiley & Sons.
- Frauenfelder, H. & Wolynes, P.G. (1994) Biomolecules: Where the Physics of Complexity and Simplicity Meet. *Physics Today*.
- Friedberg, F. (1983) On the primary structure of amylases. *FEBS Lett.*, **152**, 139-140.
- Fujimoto, Z., Takase, K., Doui, N., Momma, M., Matsumoto, T. & Mizuno, H. (1998) Crystal structure of a catalytic-site mutant α -amylase from *Bacillus subtilis* complexed with maltopentaose. *J. Mol. Biol.*, **277**, 393-407.
- Fulton, D.C., Edwards, A., Pilling, E., Robinson, H.L., Fahy, B., Seale, R., Kato, L., Donald, A.M., Geigenberger, P., Martin, C. & Smith, A. (2002) Role of Granule-Bound Starch Synthase in determination of amylopectin structure and starch granule morphology in potato. *sous presse*.

[G]

- Gamblin, S.J. & Rodgers, D.W. (1993) Data collection and processing. In *Proceedings of the CCP4 study week-end*. SERC Daresbury Laboratory, Warrington, UK.
- Garman, E.F. (1999) Cool data: quantity and quality. *Acta Crystallogr.* **D55**, 1641-1653.
- Garman, E.F. & Schneider, T.R. (1997) Macromolecular cryocrystallography. *J. Appl. Cryst.*, **30**, 211-237.
- Gessler, K., Uson, I., Takaha, T., Krauss, N., Smith, S.M., Okada, S., Sheldrick, G. & Saenger, W. (1999) V-Amylose at atomic resolution: X-ray structure of a cycloamylose with 26 glucose residues (cyclomaltohexaicosaoase). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 4246-4251.
- Giardina, T., Gunning, A.P., Juge, N., Faulds, C.B., Furniss, C.S., Svensson, B., Morris, V.J. & Williamson, G. (2001) Both Binding Sites of the Starch-binding Domain of *Aspergillus niger* Glucoamylase are Essential for Inducing a Conformational Change in Amylose. *J. Mol. Biol.*, **313**, 1149-1159.

- Gibson, R.M. & Svensson, B. (1987) Identification of Tryptophanyl Residues Involved in Binding of Carbohydrate Ligands to Barley α -Amylase 2. *Carlsberg Research Communications*, **52**, 373-379.
- Giegé, R., Dock, A.C., Kern, D., Lorber, B., Thierry, J.C. & Moras, D. (1986) The role of purification in the crystallization of proteins and nucleic acids. *J. Crystal Growth*.
- Gilliland, G.L., Tung, M., Blakeslee, D.M. & Ladner, J. (1994) The Biological Macromolecule Crystallization Database, Version 3.0: New Features, Data, and the NASA Archive for Protein Crystal Growth Data. *Acta Crystallogr.* **D50**, 408-413.
- Godfrey, T. & West, S. (1996) *Industrial Enzymology*. MacMillan.
- Gottschalk, T.E., Tull, D., Aghajari, N., Haser, R. & Svensson, B. (2001) Specificity modulation of barley α -amylase through biased random mutagenesis involving a conserved tripeptide in β - α loop 7 of the catalytic (β/α)₈-barrel domain. *Biochemistry*, **40**, 12844-12854.
- Gouet, P., Courcelle, E., Stuart, D.I. & Metz, F. (1999) ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics*, **15**, 305-308.
- Gough, J.A. & Murray, N.E. (1983) Sequence diversity among related genes for recognition of specific targets in DNA molecules. *J. Mol. Biol.*, **166**, 1-19.
- Gunning, A.P., Giardina, T.P., Faulds, C.B., Morris, V.J. & Williamson, G. (2000) Communication personnelle : "Visualising enzyme degradation of polysaccharides by Atomic Force Microscopy". Programme Biotech BIO4 CT98-0022 "AGADE" (Alpha-Glucan Active Designer Enzymes).

[H]

- Harker, D. (1956) The determination of the phases of the structure factors on non centrosymmetric crystals by the method of double isomorphous replacement. *Acta Crystallogr.*, **9**, 1-7.
- Helbert, W. & Chanzy, H. (1994) Single crystals of V amylose complexed with n-butanol or n-pentanol: structural features and properties. *Int. J. Biol. Macromol.*, **16**, 207-213.
- Hendrickson, W.A. (1985) Analysis of protein structure from diffraction measurement at multiple wavelengths. *Trans. Amer. Crystallogr. Assn.*, **21**, 11-21.
- Hendrickson, W.A. (1991) Determination of macromolecular structures from anomalous diffraction of synchrotron radiation. *Science*, **254**.
- Henrissat, B. & Bairoch, A. (1993) New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.*, **293 (Pt 3)**, 781-788.
- Henrissat, B. & Bairoch, A. (1996) Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.*, **316 (Pt 2)**, 695-696.
- Hizukuri, S. (1986) Polymodal distribution of the chains lengths of amylopectins and its significance. *Carbohydr. Res.*, **147**, 342-347.
- Hofmann, B.E., Bender, H. & Schulz, G.E. (1989) Three-dimensional structure of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* at 3.4 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **209**, 793-800.
- Holman, R.R., Cull, C.A. & Turner, R.C. (1999) A randomized double-blind trial of acarbose in type 2 diabetes shows improved glycemic control over 3 years (U.K. Prospective Diabetes Study 44). *Diabetes Care*, **22**, 960-964.
- Hoof, R.W., Vriend, G., Sander, C. & Abola, E.E. (1996) Errors in protein structures. *Nature*, **381**, 272.
- Hope, H., Frolow, F., von Bohlen, K., Makowski, I., Kratky, C., Halfon, Y., Danz, H., Webster, P., Bartels, K.S., Wittmann, H.G. & et al. (1989) Cryocrystallography of ribosomal particles. *Acta Crystallogr.* **B45**, 190-199.
- Huang, N., Koizumi, N., Reinl, S. & Rodriguez, R. (1991) Structural organization and differential expression of rice α -amylase genes. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 7007-7014.
- Huang, N., Stebbins, G.L. & Rodriguez, R.L. (1992) Classification and evolution of α -amylase genes in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 7526-7530.

Hulleman, S.H., Helbert, W. & Chanzy, H. (1996) Single crystals of V amylose complexed with glycerol. *Int. J. Biol. Macromol.*, **18**, 115-122.

[I]

Imberty, A., Chanzy, H., Perez, S., Buléon, A. & Tran, V. (1988) The double-helical nature of the crystalline part of A-starch. *J. Mol. Biol.*, **201**, 365-378.

Imberty, A. & Perez, S. (1988) A revisit to the three-dimensional structure of B-amylose. *Biopolymers*, **27**, 1205-1221.

Imberty, A. & Perez, S. (1989) Conformational analysis and molecular modelling of the branching point of amylopectin. *Int. J. Biol. Macromol.*, **11**, 177-185.

[J]

Jacob, G.S. (1995) Glycosylation inhibitors in biology and medicine. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **5**, 605-611.

Jacobsen, J.V. & Higgins, T.J.V. (1982) Characterization of the α -Amylases Synthesized by Aleurone Layers of Himalaya Barley in Response to Gibberellic-Acid. *Plant Physiology*, **70**, 1647-1653.

Jancarik, J. & Kim, S.H. (1991) Sparse matrix sampling: A screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Cryst.*, **24**, 409-411.

Jane, J. & Robyt, J.F. (1984) Structure studies of amylose-V complexes and retrograded amylose by action of α -amylases, and a new method for preparing amyloextrins. *Carbohydr. Res.*, **132**, 105-118.

Janecek, S. (1992) New conserved amino acid region of α -amylases in the third loop of their $(\beta/\alpha)_8$ -barrel domains. *Biochem J*, **288**, 1069-1070.

Janecek, S. (1994) Sequence similarities and evolutionary relationships of microbial, plant and animal α -amylases. *Eur. J. Biochem.*, **224**, 519-524.

JCBN. (1984) IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. Recommendations 1983. *Biochem. J.*, **219**, 345-373.

Jenkins, P.J. & Donald, A.M. (1995) The influence of amylose on starch granule structure. *Int. J. Biol. Macromol.*, **17**, 315-321.

Jensen, M.T. (1998) Thesis for the Cand. Degree in Chemistry and molecular biology - Conformational stability of barley α -amylase isozyme 1 and 2 and effects of isozyme 2 guided engineering of salt-bridges in isozyme 1. *Department of Life Science and Chemistry*. Roskilde University, p. 99.

Jespersen, H.M., MacGregor, E.A., Sierks, M.R. & Svensson, B. (1991) Comparison of the domain-level organization of starch hydrolases and related enzymes. *Biochem. J.*, **280**, 51-55.

Jiang, J.S. & Brünger, A.T. (1994) Protein hydration observed by x-ray diffraction: solvation properties of penicillopepsin and neuraminidase crystal structures. *J. Mol. Biol.*, **243**, 100-115.

Jones, R.L. & Jacobsen, J.V. (1991) Regulation of synthesis and transport of secreted proteins in cereal aleurone. *Int. Rev. Cytol.*, **126**, 49-88.

Juge, N., Andersen, J.S., Tull, D., Roepstorff, P. & Svensson, B. (1996) Overexpression, purification, and characterization of recombinant barley α -amylases 1 and 2 secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.*, **8**, 204-214.

Juge, N., Rodenburg, K.W., Guo, X.J., Chaix, J.C. & Svensson, B. (1995) Isozyme hybrids within the protruding third loop domain of the barley α -amylase $(\beta/\alpha)_8$ -barrel. Implication for BASI sensitivity and substrate affinity. *FEBS Lett.*, **363**, 299-303.

Juge, N., Søgaard, M., Chaix, J.C., Martin-Eauclaire, M.F., Svensson, B., Marchis-Mouren, G. & Guo, X.J. (1993) Comparison of barley malt α -amylase isozymes 1 and 2: construction of cDNA hybrids by in vivo recombination and their expression in yeast. *Gene*, **130**, 159-166.

[K]

- Kabsch, W. & Sander, C. (1983) Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, **22**, 2577-2637.
- Kadziola, A. (1993) *PhD Thesis: An α -amylase from barley and its complex with a substrate analogue inhibitor studied by X-ray Crystallography. Department of Chemistry. CNRS Marseille & University of Copenhagen, Copenhagen, p. 109.*
- Kadziola, A., Abe, J., Svensson, B. & Haser, R. (1994) Crystal and molecular structure of barley α -amylase. *J. Mol. Biol.*, **239**, 104-121.
- Kadziola, A., Søgaard, M., Svensson, B. & Haser, R. (1998) Molecular structure of a barley α -amylase-inhibitor complex: implications for starch binding and catalysis. *J. Mol. Biol.*, **278**, 205-217.
- Kainuma, K. & French, D. (1972) Nageli amylopectin and its relationship to starch granule structure II. Role of water in crystallization of B-Starch. *Biopolymers*, **11**, 2241-2250.
- Kamitori, S., Kondo, S., Okuyama, K., Yokota, T., Shimura, Y., Tonozuka, T. & Sakano, Y. (1999) Crystal structure of *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 α -amylase II (TVaII) hydrolyzing cyclodextrins and pullulan at 2.6 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **287**, 907-921.
- Khursheed, B. & Rogers, J.C. (1988) Barley α -amylase genes. Quantitative comparison of steady-state mRNA levels from individual members of the two different families expressed in aleurone cells. *J. Biol. Chem.*, **263**, 18953-18960.
- Klein, C. & Schulz, G.E. (1991) Structure of cyclodextrin glycosyltransferase refined at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **217**, 737-750.
- Kleywegt, G.J. & Brünger, A.T. (1996) Checking your imagination: Applications of the free R value. *Structure*, **4**, 897-904.
- Kleywegt, G.J. & Jones, T.A. (1998) Databases in protein crystallography. *Acta Crystallogr.* **D54**, 1119-1131.
- Kline, A.D., Braun, W. & Wuthrich, K. (1988) Determination of the complete three-dimensional structure of the α -amylase inhibitor tendamistat in aqueous solution by nuclear magnetic resonance and distance geometry. *J. Mol. Biol.*, **204**, 675-724.
- Knegtel, R.M., Strokopytov, B., Penninga, D., Faber, O.G., Rozeboom, H.J., Kalk, K.H., Dijkhuizen, L. & Dijkstra, B.W. (1995) Crystallographic studies of the interaction of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 with natural substrates and products. *J. Biol. Chem.*, **270**, 29256-29264.
- Koshland, D.E. (1953) Stereochemistry and mechanism of enzymatic reactions. *Biol. Rev.*, **28**, 416-436.
- Kraulis, P.J. (1991) MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.*, **24**, 946-950.
- Kubota, M., Matsuura, Y., Sakai, S. & Katsube, Y. (1990) Crystal structure of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus*. *Protein Eng.*, **3**, 328-329.
- Kuriki, T., Takata, H., Okada, S. & Imanaka, T. (1991) Analysis of the active center of *Bacillus stearothermophilus* neopullulanase. *J. Bacteriol.*, **173**, 6147-6152.
- Kuroki, R., Weaver, L.H. & Matthews, B.W. (1993) A covalent enzyme-substrate intermediate with saccharide distortion in a mutant T4 lysozyme. *Science*, **262**, 2030-2033.

[L]

- Larson, S.B., Greenwood, A., Cascio, D., Day, J. & McPherson, A. (1994) Refined molecular structure of pig pancreatic α -amylase at 2.1 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **235**, 1560-1584.
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W. & Moss, D.S. (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.*, **26**, 283-291.

- Lawson, C.L., van Montfort, R., Strokopytov, B., Rozeboom, H.J., Kalk, K.H., de Vries, G.E., Penninga, D., Dijkhuizen, L. & Dijkstra, B.W. (1994) Nucleotide sequence and X-ray structure of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 in a maltose-dependent crystal form. *J. Mol. Biol.*, **236**, 590-600.
- Leah, R. & Mundy, J. (1989) The bifunctional α -amylase/subtilisin inhibitor of barley: nucleotide sequence and patterns of seed specific expression. *Plant Mol. Biol.*, 673-682.
- Leloir, L.F., de Fekete, M.A.R. & Cardini, C.E. (1961) Starch and oligosaccharides synthesis from uridine diphosphate glucose. *J. Biol. Chem.*, **236**, 636-641.
- Leslie, A.G.W. (1987) A reciprocal space method for calculating a molecular envelope using the algorithm of B. C. Wang. *Acta Crystallogr.* **A43**, 134-136.
- Leslie, A.G.W. (1991) Molecular Data Processing. In *Crystallography Computing*. Moras, D., Podjarny, A. D., Thierry, J. C., Oxford University Press, pp. 50-61.

[M]

- McCarter, J.D. & Withers, S.G. (1994) Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **4**, 885-892.
- MacGregor, A.W. & Ballance, D.L. (1980) Hydrolysis of Large and Small Starch Granules from Normal and Waxy Barley Cultivars by α -Amylases from Barley Malt. *Cereal Chemistry*, **57**, 397-402.
- MacGregor, E.A. & MacGregor, A.W. (1985) The action of cereal α -amylases on solubilized starch and cereal starch granules. In Hill, R.D. and Munck, L. (eds.), *New approaches to Research on Cereal Carbohydrates*, Amsterdam, pp. 149-160.
- MacGregor, A.W. & Morgan, J.E. (1986) Hydrolysis of Barley Starch Granules by α -Amylases from Barley Malt. *Cereal Foods World*, **31**, 688-693.
- MacGregor, E.A., MacGregor, A.W., Macri, L.J. & Morgan, J.E. (1994) Models for the action of barley α -amylase isozymes on linear substrates. *Carbohydr. Res.*, **257**, 249-268.
- MacGregor, E.A., Janecek, S. & Svensson, B. (2001) Relationship of sequence and structure to specificity in the α -amylase family of enzymes. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1546**, 1-20.
- Machius, M., Vertesy, L., Huber, R. & Wiegand, G. (1996) Carbohydrate and protein-based inhibitors of porcine pancreatic α -amylase: structure analysis and comparison of their binding characteristics. *J. Mol. Biol.*, **260**, 409-421.
- Machius, M., Declerck, N., Huber, R. & Wiegand, G. (1998) Activation of *Bacillus licheniformis* α -amylase through a disorder→order transition of the substrate-binding site mediated by a calcium-sodium-calcium metal triad. *Structure*, **6**, 281-292.
- Mackay, F., Wilton, L.V., Pearce, G., Freemantle, S. & Mann, R.D. (1997) Acarbose and Gastrointestinal Intolerance. *13th International Conference on Pharmaco-epidemiology*. Pharmacoepidemiology & Drug Safety, Florida, Vol. 6: Suppl.2, Abstract No. 044.
- MacPherson, A. (1982) *Preparation and analysis of protein crystals*. Wiley, New York.
- MacRae, D. (1993) *Practical protein crystallography*. Academic Press, San Diego.
- Maddelaine, M.L., Libessart, N., Bellanger, F., Delrue, B., D'Hulst, C., Van den Koornhuise, N., Fontaine, T., Wieruszski, J.M., Decq, A. & Ball, S. (1994) Toward an understanding of the biogenesis of the starch granule. Determination of granule-bound and soluble starch synthase functions in amylopectin synthesis. *J. Biol. Chem.*, **269**, 25150-25157.
- Manley, R.S.J. (1964) Chain folding in amylose crystals. *J. Polym. Sci. Part A*, **2**, 4503-4512.
- Marshall, J., Sidebottom, C., Debet, M., Martin, C., Smith, A.M. & Edwards, A. (1996) Identification of the major starch synthase in the soluble fraction of potato tubers. *Plant Cell*, **8**, 1121-1135.
- Matsui, I. & Svensson, B. (1997) Improved activity and modulated action pattern obtained by random mutagenesis at the fourth β - α loop involved in substrate binding to the catalytic (β/α)₈-barrel domain of barley α -amylase 1. *J. Biol. Chem.*, **272**, 22456-22463.

- Matsuura, Y., Kusunoki, M., Harada, W. & Kakudo, M. (1984) Structure and possible catalytic residues of Taka-amylase A. *J. Biochem. (Tokyo)*, **95**, 697-702.
- Matthews, B.W. (1968) Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.*, **33**, 491-497.
- MDL. (1990-2001) ISIS/Draw. MDL Information System Inc.
- MELITIS. (2001) MELITIS (Benhamou, P.Y. & Pagonis, D.) – Site Internet : <http://www-sante.ujf-grenoble.fr/SANTE/alfediam/mellitis.html>. Alfediam / Melitis, Université Joseph Fourier, Grenoble, FRANCE.
- Merritt, E.A. & Bacon, D.J. (1997) Raster3D: Photorealistic Molecular Graphics. *Methods Enzymol.*, **277**, 505-524.
- Mikami, B., Hehre, E.J., Sato, M., Katsube, Y., Hirose, M., Morita, Y. & Sacchettini, J.C. (1993) The 2.0-Å resolution structure of soybean β -amylase complexed with α -cyclodextrin. *Biochemistry*, **32**, 6836-6845.
- Mikol, V., Rodeau, J.L. & Giegé, R. (1990) Experimental determination of water equilibration rates in the hanging drop method of protein crystallization. *Anal Biochem.*, **186**, 332-339.
- Mooradian, A.D. & Thurman, J.E. (1999) Drug therapy of postprandial hyperglycaemia. *Drugs*, **57**, 19-29.
- Mori, H., Bak-Jensen, K.S., Gottschalk, T.E., Motawia, M.S., Damager, I., Moller, B.L. & Svensson, B. (2001) Modulation of activity and substrate binding modes by mutation of single and double subsites +1/+2 and -5/-6 of barley α -amylase 1. *Eur. J. Biochem.*, **268**, 6545-6558.
- Müller, L., Junge, B., Rauenbusch, E., Frommer, W., Schmidt, D. & Truscheit, E. (1981) Chemical and enzymatic degradation of α -glucosidase inhibitors of the acarbose type. In Creutzfeldt, E.W. (ed.), *First international symposium on acarbose*, pp. 5-15.
- Mundy, J., Svendsen, I. & Hejgaard, J. (1983) Barley α -amylase/subtilisin inhibitor. Isolation and characterization. *Carlsberg Res. Commun.*, **48**, 81-90.

[N]

- Nakamura, A., Haga, K. & Yamane, K. (1994) The transglycosylation reaction of cyclodextrin glucanotransferase is operated by a Ping-Pong mechanism. *FEBS Lett.*, **337**, 66-70.
- Nakatani, H. (1996) Monte Carlo simulation of multiple attack mechanism of α -amylase. *Biopolymers*, **39**, 665-669.
- Navaza, J. (2001) Implementation of molecular replacement in AMoRe. *Acta Crystallogr.* **D57**, 1367-1372.
- Nelson, O.E. & Rines, H.W. (1962) The enzymatic deficiency in the waxy mutant of maize. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **9**, 297-300.
- Nicholls, A., Sharp, K.A. & Honig, B. (1991) Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins*, **11**, 281-296.
- Nielsen, T.H., Wischmann, B., Enevoldsen, K. & Moller, B.L. (1994) Starch phosphorylation in potato tubers proceeds concurrently with *de novo* biosynthesis of starch. *Plant Physiol.*, **105**, 111-117.

[O]

- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. In C.W. Carter, J. and Sweet, R.M. (eds.), *Methods in Enzymology*. Academic Press, Vol. 276: Macromolecular Crystallography, part A, pp. 307-326.

[P]

- Pannu, N.S. & Read, R.J. (1996) Improved structure refinement through maximum likelihood. *Acta Crystallogr.* **A52**, 659-668.
- Parisi, G. (1993) Statistical Physics and Biology. *Physics World*.
- Perutz, M.F. (1956) Isomorphous replacement and phase determination in non centrosymmetric space groups. *Acta Crystallogr.*, **9**, 867-873.
- Perez, S. & Revol, J.F. (1993) Molecular structure and morphology of carbohydrate polymers. *MSA Bulletin*, **23**, 28-43.
- Petsko, G.A. (1975) Protein crystallography at sub-zero temperatures: cryo-protective mother liquors for protein crystals. *J. Mol. Biol.*, **96**, 381-392.
- Pflugrath, J.W., Wiegand, G., Huber, R. & Vertesy, L. (1986) Crystal structure determination, refinement and the molecular model of the α -amylase inhibitor Hoe-467A. *J. Mol. Biol.*, **189**, 383-386.
- Pflugrath, J.W. (1992) Developments in X-ray detectors. *Curr. Opin. Struct. Biol.*
- Ponstein, A.S., Oosterhaven, K., Feenstra, W.J. & Witholt, B. (1991) Starch synthesis in potato-tubers: identification of the in vitro and the in vivo acceptor molecules of soluble starch synthase activity. *Starch/Stärke*, **43**, 208-220.
- Powell, M.J.D. (1977) Restart procedures for the Conjugate Gradient method. *Mathematical Programming*, **12**, 241-254.
- Preiss, J. & Sivak, M.N. (1998) Biochemistry, molecular biology and regulation of starch synthesis. *Genet. Eng.*, **20**, 177-223.
- Pujadas, G. & Palau, J. (1999) TIM barrel fold: structural, functional and evolutionary characteristics in natural and designed molecules. *Biologia, Bratislava*, **54**, 231-254.
- Pujadas, G. & Palau, J. (2001) Evolution of α -amylases: Architectural features and key residues in the stabilization of the $(\beta/\alpha)_8$ scaffold. *Mol Biol Evol*, **18**, 38-54.

[Q]

- Qian, M., Haser, R. & Payan, F. (1993) Structure and molecular model refinement of pig pancreatic α -amylase at 2.1 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **231**, 785-799.
- Qian, M., Haser, R., Buisson, G., Duee, E. & Payan, F. (1994) The active center of a mammalian α -amylase. Structure of the complex of a pancreatic α -amylase with a carbohydrate inhibitor refined to 2.2 Å resolution. *Biochemistry*, **33**, 6284-6294.
- Qian, M., Haser, R. & Payan, F. (1995) Carbohydrate binding sites in a pancreatic α -amylase-substrate complex, derived from X-ray structure analysis at 2.1 Å resolution. *Protein Sci.*, **4**, 747-755.
- Qian, M., Spinelli, S., Driguez, H. & Payan, F. (1997) Structure of a pancreatic α -amylase bound to a substrate analogue at 2.03 Å resolution. *Protein Sci.*, **6**, 2285-2296.
- Quiocho, F.A. (1989) Protein-carbohydrate interactions: basic molecule features. *Pure Appl. Chem.*, **61**, 1293-1306.

[R]

- Ramakrishnan, C. & Ramachandran, G.N. (1965) Stereochemical criteria for polypeptide and protein chain conformations. *Biophys J.*, **5**, 909-933.

- Ramasubbu, N., Paloth, V., Luo, Y.G., Brayer, G.D. & Levine, M.J. (1996) Structure of human salivary α -amylase at 1.6 Å resolution: Implications for its role in the oral cavity. *Acta Crystallogr.* **D52**, 435.
- Read, R.J. (1986) Improved Fourier coefficients for maps using phases from partial structures with errors. *Acta Crystallogr.* **A42**, 140-149.
- Recondo, E. & Leloir, L. (1961) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **6**, 85-88.
- Robert, X., Gottschalk, T.E., Haser, R., Svensson, B. & Aghajari, N. (2002a) Expression, purification and preliminary crystallographic studies of α -amylase isozyme 1 from barley seeds. *Acta Crystallogr.* **D58**, 683-686.
- Robert, X., Haser, R., Svensson, B. & Aghajari, N. (2002b) Comparison of crystal structures of barley α -amylase 1 and 2: implications for isozyme differences in stability and activity. *Biologia, Bratislava*, **57/Suppl. 11**, 55-66, *sous presse*.
- Robin, J.P., Mercier, C., Duprat, F., Charbinniere, R. & Guilbot, A. (1975) Amidons lintnésisés. Etudes chromatographique et enzymatique des résidus insolubles provenant de l'hydrolyse d'amidons de céréales, en particulier de maïs cireux. *Starch*, **27**, 36-45.
- Rodenburg, K.W., Juge, N., Guo, X.J., Søgaard, M., Chaix, J.C. & Svensson, B. (1994) Domain B protruding at the third β strand of the α/β barrel in barley α -amylase confers distinct isozyme-specific properties. *Eur. J. Biochem.*, **221**, 277-284.
- Rodenburg, K.W., Vallée, F., Juge, N., Aghajari, N., Guo, X., Haser, R. & Svensson, B. (2000) Specific inhibition of barley α -amylase 2 by barley α -amylase/subtilisin inhibitor depends on charge interactions and can be conferred to isozyme 1 by mutation. *Eur. J. Biochem.*, **267**, 1019-1029.
- Rodgers, D.W. (1997) Practical crystallography. *Methods Enzymol.*, **276**, 183-203.
- Rogers, J.C. (1985a) Conserved amino acid sequence domains in α -amylases from plants, mammals, and bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **128**, 470-476.
- Rogers, J.C. (1985b) Two barley α -amylase gene families are regulated differently in aleurone cells. *J. Biol. Chem.*, **260**, 3731-3738.
- Rogers, J.C. & Milliman, C. (1983) Isolation and sequence analysis of a barley α -amylase cDNA clone. *J. Biol. Chem.*, **258**, 8169-8174.
- Rossmann, M.G. (1990) The molecular replacement method. *Acta Crystallogr.* **A46**, 73-82.
- Rossmann, M.G. & Blow, D.M. (1962) The detection of subunits within the asymmetric unit. *Acta Crystallogr.*, **12**, 24-38.
- Roussel, A. & Cambillau, C. (1992) TURBO-FRODO. Biographics, AFMB, Marseille, France.
- Roussel, A., Serre, L., Frey, M. & Fontecilla-Camps, J. (1990) Rapid access to an updated biological macromolecule crystallization database through artificial intelligence. *J. Crystal Growth*, **106**, 405-409.
- Rundle, R.E. & Balwin, R.R. (1943) The Configuration of Starch and the Starch-Iodine Complex (I). The Dichroism of Flows of Starch-Iodine Solutions. *J. Am. Chem. Soc.*, **65**, 554-557.
- Rundle, R.E. & Edward, J. (1943) The Configuration of Starch and the Starch-Iodine Complex (IV). *J. Am. Chem. Soc.*, **65**, 2200-2203.
- Rundle, R.E. & French, D. (1943a) The Configuration of Starch and the Starch-Iodine Complex (II). *J. Am. Chem. Soc.*, **65**, 558-560.
- Rundle, R.E. & French, D. (1943b) The Configuration of Starch and the Starch-Iodine Complex (III). *J. Am. Chem. Soc.*, **65**, 1707-1709.

[S]

- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. In Cold Spring Harbor Laboratory, C.S.H. (ed.), New York.

- Schmidt, D.D., Frommer, B., Junge, L., Muller, W., Wingender, W. & Truscheit, E. (1977) α -glucosidases inhibitors. New complex oligosaccharides of microbial origin. *Naturwissenschaften*, **64**, 535-536.
- Schmidt, D.D., Frommer, B., Junge, L., Muller, W., Wingender, W. & Truscheit, E. (1981) α -glucosidases inhibitors of microbial origin. In Creutzfeldt, E.W. (ed.), *First international symposium on acarbose*, pp. 5-15.
- Scott, L.J. & Spencer, C.M. (2000) Miglitol: a review of its therapeutic potential in type 2 diabetes mellitus. *Drugs*, **59**, 521-549.
- Sibille, L., Clunie, J. & Baird, J.K. (1991) Solvent evaporation rates in the closed capillary vapor diffusion method of protein crystal-growth. *J. Crystal Growth*, **110**, 80-88.
- Sidenius, U., Olsen, K., Svensson, B. & Christensen, U. (1995) Stopped-flow kinetic studies of the reaction of barley α -amylase/subtilisin inhibitor and the high pI barley α -amylase. *FEBS Lett.*, **361**, 250-254.
- Sinnott, M. (1990) Catalytic mechanisms of enzymic glycosyl transfer. *Chem. Rev.*, **90**, 1171-1202.
- Smith, A.M. (2001) The biosynthesis of starch granules. *Biomacromolecules*, **2**, 335-341.
- Søgaard, M., Andersen, J.S., Roepstorff, P. & Svensson, B. (1993a) Electrospray mass spectrometry characterization of post-translational modifications of barley α -amylase 1 produced in yeast. *Biotechnology (NY)*, **11**, 1162-1165.
- Søgaard, M., Kadziola, A., Haser, R. & Svensson, B. (1993b) Site-directed mutagenesis of histidine 93, aspartic acid 180, glutamic acid 205, histidine 290, and aspartic acid 291 at the active site and tryptophan 279 at the raw starch binding site in barley α -amylase 1. *J. Biol. Chem.*, **268**, 22480-22484.
- Søgaard, M., Olsen, F.L. & Svensson, B. (1991) C-terminal processing of barley α -amylase 1 in malt, aleurone protoplasts, and yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 8140-8144.
- Søgaard, M. & Svensson, B. (1990) Expression of cDNAs encoding barley α -amylase 1 and 2 in yeast and characterization of the secreted proteins. *Gene*, **94**, 173-179.
- Strobl, S., Gomis-Ruth, F.X., Maskos, K., Frank, G., Huber, R. & Glockshuber, R. (1997) The α -amylase from the yellow meal worm: complete primary structure, crystallization and preliminary X-ray analysis. *FEBS Lett.*, **409**, 109-114.
- Strobl, S., Maskos, K., Betz, M., Wiegand, G., Huber, R., Gomis-Ruth, F.X. & Glockshuber, R. (1998) Crystal structure of yellow meal worm α -amylase at 1.64 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **278**, 617-628.
- Strokopytov, B., Penninga, D., Rozeboom, H.J., Kalk, K.H., Dijkhuizen, L. & Dijkstra, B.W. (1995) X-ray structure of cyclodextrin glycosyltransferase complexed with acarbose. Implications for the catalytic mechanism of glycosidases. *Biochemistry*, **34**, 2234-2240.
- Strynadka, N.C. & James, M.N. (1991) Lysozyme revisited: crystallographic evidence for distortion of an N-acetylmuramic acid residue bound in site D. *J. Mol. Biol.*, **220**, 401-424.
- Stutz, A.E. (1999) *Iminosugars as glycosidase inhibitors: Nojirimycin and beyond*, Weinheim; New York.
- Sugiyama, S., Matsuo, Y., Maenaka, K., Vassilyev, D.G., Matsushima, M., Kashiwagi, K., Igarashi, K. & Morikawa, K. (1996a) The 1.8 Å X-ray structure of the *Escherichia coli* PotD protein complexed with spermidine and the mechanism of polyamine binding. *Protein Sci.*, **5**, 1984-1990.
- Sugiyama, S., Vassilyev, D.G., Matsushima, M., Kashiwagi, K., Igarashi, K. & K., M. (1996b) Crystal structure of PotD, the primary receptor of the polyamine transport system in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **271**, 9519-9525.
- Suvd, D., Fujimoto, Z., Takase, K., Matsumura, M. & Mizuno, H. (2001) Crystal structure of *Bacillus stearothermophilus* α -amylase: possible factors determining the thermostability. *J. Biochem. (Tokyo)*, **129**, 461-468.
- Svendsen, I., Hejgaard, J. & Mundy, J. (1986) Complete amino acid sequence of the α -amylase/subtilisin inhibitor from barley. *Carlsberg Res. Commun.*, **51**, 43-50.
- Svensson, B., Gibson, R.M., Haser, R. & Astier, J.P. (1987) Crystallization of barley malt α -amylases and preliminary X-ray diffraction studies of the high pI isozyme, α -amylase 2. *J. Biol. Chem.*, **262**, 13682-13684.
- Svensson, B. (1991) Structure / function relationships in starch-hydrolases and related enzymes. *Denpun Kagaku*, **38**, 125-135.

- Svensson, B. (1994) Protein engineering in the α -amylase family: catalytic mechanism, substrate specificity, and stability. *Plant Mol. Biol.*, **25**, 141-157.
- Svensson, B., Bak-Jensen, K.S., Jensen, M.T., Sauer, J., Gottschalk, T.E. & Rodenburg, K.W. (1999) Studies on structure, function and protein engineering of starch-degrading enzymes. *J. Appl. Glycosci.*, **46**, 49-63.
- Svensson, B., Sauer, J., Jensen, M.T., Bak-Jensen, K.S. & Kramhoft, B. (2000) Structure, function and protein engineering of starch-degrading enzymes. *The Workshop on Amylases and Related Enzymes*. Research Center for New Bio-Materials in Agriculture, Seoul National University, pp. 2-18.
- Swift, H.J., Brady, L., Derewenda, Z.S., Dodson, E.J., Dodson, G.G., Turkenburg, J.P. & Wilkinson, A.J. (1991) Structure and molecular model refinement of *Aspergillus oryzae* (TAKA) α -amylase: an application of the simulated-annealing method. *Acta Crystallogr.* **B47**, 535-544.

[T]

- Tanaka, Y., Tao, W., Blanchard, J.S. & Hehre, E.J. (1994) Transition state structures for the hydrolysis of α -D-glucopyranosyl fluoride by retaining and inverting reactions of glycosidases. *J. Biol. Chem.*, **269**, 32306-32312.
- Tang, H., Ando, H., Watanabe, K., Takeda, Y. & Mitsunaga, T. (2001) Physicochemical properties and structure of large, medium and small granule starches in fractions of normal barley endosperm. *Carbohydr. Res.*, **330**, 241-248.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4673-4680.
- Truscheit, E., Frommer, W., Junge, B., Muller, L., Schmidt, D.D. & Wingender, W. (1981) Chemistry and biochemistry of microbial α -glucosidases inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **20**, 744-761.

[U]

- Uitdehaag, J.C., Kalk, K.H., van Der Veen, B.A., Dijkhuizen, L. & Dijkstra, B.W. (1999a) The cyclization mechanism of cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) as revealed by a γ -cyclodextrin-CGTase complex at 1.8 Å resolution. *J. Biol. Chem.*, **274**, 34868-34876.
- Uitdehaag, J.C., Mosi, R., Kalk, K.H., van der Veen, B.A., Dijkhuizen, L., Withers, S.G. & Dijkstra, B.W. (1999b) X-ray structures along the reaction pathway of cyclodextrin glycosyltransferase elucidate catalysis in the α -amylase family. *Nat. Struct. Biol.*, **6**, 432-436.
- Uitdehaag, J.C., van Alebeek, G.J., van Der Veen, B.A., Dijkhuizen, L. & Dijkstra, B.W. (2000) Structures of maltohexaose and maltoheptaose bound at the donor sites of cyclodextrin glycosyltransferase give insight into the mechanisms of transglycosylation activity and cyclodextrin size specificity. *Biochemistry*, **39**, 7772-7780.
- Uitdehaag, J.C., van der Veen, B.A., Dijkhuizen, L., Elber, R. & Dijkstra, B.W. (2001) Enzymatic circularization of a malto-octaose linear chain studied by stochastic reaction path calculations on cyclodextrin glycosyltransferase. *Proteins*, **43**, 327-335.

[V]

- Vallée, F., Kadziola, A., Bourne, Y., Abe, J., Svensson, B. & Haser, R. (1994) Characterization, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the complex between barley α -

- amylase and the bifunctional α -amylase/subtilisin inhibitor from barley seeds. *J Mol Biol*, **236**, 368-371.
- Vallée, F., Kadziola, A., Bourne, Y., Juy, M., Rodenburg, K.W., Svensson, B. & Haser, R. (1998) Barley α -amylase bound to its endogenous protein inhibitor BASI: crystal structure of the complex at 1.9 Å resolution. *Structure*, **6**, 649-659.
- van de Wal, M., D'Hulst, C., Vincken, J.P., Buléon, A., Visser, R. & Ball, S. (1998) Amylose is synthesized in vitro by extension of and cleavage from amylopectin. *J. Biol. Chem.*, **273**, 22232-22240.
- Villette, J.R., Krezewinski, F.S., Looten, P.J., Sicard, P.J. & Bouquelet, S.J.-L. (1992) Cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus circulans* E-192.4. Evidence for a raw starch-binding site and its interaction with a β -cyclodextrin copolymer. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **16**, 57-63.
- Vriend, G. (1990) WHAT IF: a molecular modelling and drug design program. *J. Mol. Graph.*, **8**, 52-56.
- Vyas, N.K. (1991) Atomic features of protein-carbohydrate interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1**, 732-740.

[W]

- Wallace, A.C., Laskowski, R.A. & Thornton, J.M. (1995) LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng.*, **8**, 127-134.
- Weselake, R.J. & Hill, R.D. (1983) Inhibition of α -Amylase-Catalyzed Starch Granule Hydrolysis by Cycloheptaamylose. *Cereal Chemistry*, **60**, 98-101.
- Whitaker, J.R. (1988) α -amylases inhibitors of higher plants and microorganisms. In Kinsella, J.E. and Soucle, W.G. (eds.), *Food Proteins - Prot. Co-prod. Symp., AM. Oil Chem. Soc. Champaign, IL, USA*, pp. 354-380.
- Wiegand, G., Epp, O. & Huber, R. (1995) The crystal structure of porcine pancreatic α -amylase in complex with the microbial inhibitor Tendamistat. *J. Mol. Biol.*, **247**, 99-110.
- Wlodaver, A. & Hodgson, K.O. (1975) Crystallization and crystal data for monellin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**.
- Wolf, E., Vassilev, A., Makino, Y., Sali, A., Nakatani, Y. & Burley, S.K. (1998) Crystal Structure of a Gcn5-Related N-Acetyltransferase: *Serratia marescens* Aminoglycoside 3-N-Acetyltransferase. *Cell*, **94**, 439-449.

[X-Y-Z]

- Yamamoto, T. (1988) Analytical application of amylases and related enzymes. In *Handbook of amylases and related enzymes. Their sources, isolation method, properties and applications*. Pergamon Press, Exeter, pp. 186-194.
- Yamamoto, T. (1995) Chemical aspects of mechanisms in hydrolysis of glycosidic linkages by glycosylases. In Yamamoto, T. (ed.), *Enzyme chemistry and molecular biology of amylases and related enzymes*. CRC Press, Inc., Boca Raton.
- Yamashita, Y. (1965) Single crystals of amylose V complexes. *J. Polym. Sci. Part A*, **3**, 3251-3260.
- Yamashita, Y. & Hirai, N. (1966) *J. Polym. Sci. Part A-2*, **4**, 161-171.
- Yamashita, Y. & Monobe, K. (1971) *J. Polym. Sci. Part A-2*, **9**, 1471-1481.
- Yoshida, M., Nakai, T., Fukuhara, K., Saitoh, S., Yoshikawa, W., Kobayashi, Y. & Nakamura, H. (1990) Three-dimensional structure of an α -amylase inhibitor HAIM as determined by nuclear magnetic resonance methods. *J. Biochem. (Tokyo)*, **108**, 158-165.

Xavier ROBERT – Institut de Biologie et Chimie des Protéines
CNRS UMR 5086 – Université Claude Bernard Lyon 1
Laboratoire de BioCristallographie (R.Haser)
7, passage du Vercors – 69007 Lyon cedex 07 – FRANCE
x.robert@ibcp.fr – <http://www.ibcp.fr> – <http://www.ibcp.fr/IBCP/haser/>