



**HAL**  
open science

# Synthèse chimio-enzymatique de dérivés de laminari-oligosaccharides, et leur utilisation biochimique

Emilie Montel

► **To cite this version:**

Emilie Montel. Synthèse chimio-enzymatique de dérivés de laminari-oligosaccharides, et leur utilisation biochimique. Autre. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2006. Français. NNT : . tel-00123485

**HAL Id: tel-00123485**

**<https://theses.hal.science/tel-00123485v1>**

Submitted on 9 Jan 2007

**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.

**UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER - GRENOBLE 1**

**THÈSE**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER**

(Arrêtés ministériels du 5 juillet 1984 et du 30 mars 1992)

*Spécialité* : **CHIMIE ORGANIQUE**

Présentée par

**Emilie MONTEL**

Soutenue publiquement le 19 octobre 2006

**SYNTHÈSE CHIMIO-ENZYMATIQUE DE DÉRIVÉS DE  
LAMINARI-OLIGOSACCHARIDES, ET LEUR UTILISATION BIOCHIMIQUE**

JURY

**Pr. Eric DEFRANCQ**

**Pr. Patrick ROLLIN** (Rapporteur)

**Pr. Richard PLANTIER-ROYON** (Rapporteur)

**Pr. Sylvain COTTAZ**

**Dr. Hugues DRIGUEZ**







**UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER - GRENOBLE 1**

**THÈSE**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER**

(Arrêtés ministériels du 5 juillet 1984 et du 30 mars 1992)

*Spécialité* : **CHIMIE ORGANIQUE**

Présentée par

**Emilie MONTEL**

Soutenue publiquement le 19 octobre 2006

**SYNTHÈSE CHIMIO-ENZYMATIQUE DE DÉRIVÉS DE  
LAMINARI-OLIGOSACCHARIDES, ET LEUR UTILISATION BIOCHIMIQUE**

JURY

**Pr. Eric DEFRANCQ**

**Pr. Patrick ROLLIN** (Rapporteur)

**Pr. Richard PLANTIER-ROYON** (Rapporteur)

**Pr. Sylvain COTTAZ**

**Dr. Hugues DRIGUEZ**



*à ceux qui m'aiment malgré tout mes défauts*



*"Faites que le rêve dévore votre vie, afin que la vie ne dévore pas votre rêve"*

Philippe Chatel



*Le moment est venu de remercier les personnes sans qui cette étape importante de ma vie n'aurait pu avoir lieu.*

*L'essentiel de ces travaux a été réalisé au CERMAV, je tiens donc à remercier son directeur, Serge Pérez, de m'y avoir accueillie.*

*J'aimerais ensuite remercier Hugues Driguez de m'avoir acceptée au sein de l'équipe "Glycochimie et biotechnologie des oligosaccharides". Je tiens à lui témoigner mon admiration sur sa manière de diriger l'équipe : toujours disponible, attentif à ces étudiants, et capable d'autant de sérieux que d'humour... Que demander de plus!?*

*Evidemment, merci à Sylvain Cottaz qui m'a fait découvrir et aimer la chimie des sucres dès mon premier stage avec beaucoup de pédagogie et qui m'a ensuite encouragé à continuer dans cette voie.*

*Je remercie Patrick Rollin et Richard Plantier-Royon pour avoir accepté de juger ce travail, ainsi qu'Eric Defrancq qui a bien voulu présider le jury de soutenance.*

*Je tiens également à remercier Jürgen Ebel pour l'excellent séjour que j'ai passé au sein de l'équipe "Biochimie et phytopathologie" de l'Institut botanique de Munich, dans le cadre du projet SACC-SIG-NET. Et merci infiniment à Judith Fliegmann d'avoir pensé à moi pour ce projet. Merci également à tous les autres membres de cette équipe, Agnes, Alma, Karina, Karin et Martina, pour leur gentillesse et leur aide.*

*Pour en revenir aux "Grenoblois" je voudrais essayer de remercier tout ceux qui m'ont aidé aux cours de ma thèse. Pour l'accueil et le soutien technique, je voudrais remercier Martine et Magali, Patrick et Claudius, ainsi que Claude Bosso et Stéphanie Boullanger pour leur travail en spectrométrie de masse, Robert Nardin, Michel Trierweiler et Isabelle Jeacomine pour leur soutien en RMN. Pour le soutien scientifique, il est impossible d'oublier Jean-Pierre Uille, son expérience et ses suggestions manqueront aux futurs doctorants. Merci à Régis et David d'avoir joué au bon et au méchant flic pour me remotiver dans mon travail. Merci à Sylvia pour sa constante bonne humeur et son aide indispensable en chimie, à part Hugues, je ne connais personne d'autre capable de suivre autant de projets différents en même temps. Merci à Martin pour le savoir-vivre et l'humour danois, et à Marc pour le soleil catalan qu'il nous a offert pendant quelques mois. Merci à LEMONIA et Marie pour nos conversations farfelues, et félicitations à Marie-Pierre qui depuis le*

*premier jour m'impressionne par sa capacité de réflexion en chimie, mais surtout je tiens à dire à quel point ce fût agréable de travailler et de vivre à vos côtés à toutes les trois.*

*La liste des personnes à remercier est encore longue car cette expérience n'aurait pas été aussi agréable sans toutes les personnes qui savent écouter ou trouver le mot juste quand vous avez besoin de soutien, plaisanter quelques minutes dans un couloir, vous expliquer enfin les mystères de la biologie... Bref, que toutes les personnes que j'ai croisées et appréciées au cours de ma thèse sachent que je ne les oublie pas.*

*Je tiens pour finir à remercier Michael, de loin la plus belle surprise que m'ai réservée l'Allemagne (il a même réussi à me faire aimer le foot). Et merci enfin à David d'avoir toujours été là, même lorsque j'étais encore plus pénible que d'habitude sous prétexte que j'étais en thèse.*

# **SOMMAIRE**



---

<b>INTRODUCTION GENERALE ET OBJECTIFS</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>5</b>
<b>1. GLYCOSIDE-HYDROLASES ET <math>\beta</math>-(1,3)-GLUCANASES</b>	<b>7</b>
1.1. <i>Classification</i>	7
1.1.1. La classification des enzymes de l'IUBMB	7
1.1.2. La classification CAZy	8
1.2. <i>Mode d'action des <math>\beta</math>-D-glycoside-hydrolases</i>	9
1.2.1. Enzymes agissant avec inversion de configuration	10
1.2.2. Enzymes agissant avec rétention de configuration	10
1.2.3. Topologie du site actif	11
1.2.4. Les substrats "FRET" pour le dosage des glycoside-hydrolases	12
1.3. <i>Les <math>\beta</math>-(1,3)-glucanases et les <math>\beta</math>-glucan-binding proteins (GBPs)</i>	16
1.3.1. Les $\beta$ -(1,3)-glucanases	16
1.3.2. Les $\beta$ -glucan-binding proteins (GBPs)	17
1.4. <i>Les glycoside-hydrolases en synthèse</i>	18
1.4.1. Les glycoside-hydrolases sauvages	19
1.4.2. Les glycosynthases	22
1.4.2.1. Les <i>exo</i> -glycosynthases	23
1.4.2.2. Les <i>endo</i> -glycosynthases	30
<b>2. <math>\beta</math>-(1,3)-GLUCANES ET <math>\beta</math>-(1,3)-GLUCO-OLIGOSACCHARIDES</b>	<b>37</b>
2.1. <i>Les <math>\beta</math>-(1,3)-glucanes</i>	37
2.1.1. Origine et structure	37
2.1.2. Propriétés biologiques	39
2.2. <i>Les <math>\beta</math>-(1,3)-gluco-oligosaccharides</i>	41
2.2.1. Propriétés biologiques	41
2.2.2. Synthèses de $\beta$ -(1,3)-gluco-oligosaccharides	42
<b>CHAPITRE II : SYNTHÈSE CHIMIO-ENZYMATIQUE DE <math>\beta</math>-(1,3)-GLUCO-OLIGOSACCHARIDES DE DP CONTROLE</b>	<b>47</b>
<b>1. INTRODUCTION</b>	<b>49</b>
<b>2. PRODUCTION DE LA GLYCOSYNTHASE GII E231G</b>	<b>49</b>
<b>3. SYNTHÈSE DE <math>\beta</math>-(1,3)-OLIGOSACCHARIDES DE DP CONTROLE</b>	<b>50</b>
3.1. <i>Principe de la synthèse d'oligosaccharides de DP contrôlé</i>	50
3.2. <i>Synthèse du fluorure d'<math>\alpha</math>-laminaribiosyle modifié en 3<sup>II</sup></i>	51
3.2.1. Première approche rétrosynthétique : utilisation d'un donneur acétylé	51
3.2.2. Premiers essais de synthèse du synthon modifié en 3 <sup>II</sup>	53
3.2.3. Deuxième approche rétrosynthétique : utilisation d'un donneur benzoylé	56
3.2.4. Essai de synthèse avec l'accepteur 15	57
3.2.5. Synthèse de l' $\alpha$ -fluorure de laminaribiosyle modifié 23	59
3.3. <i>Couplages enzymatiques</i>	61

## SOMMAIRE

---

3.3.1. Couplage avec l'accepteur laminaribiosidique	26	61
3.3.2. Couplage avec l'accepteur glucosidique	28	62
3.3.3. Couplage avec l'accepteur laminaritriosidique	31	64
3.4. Nouvelle stratégie de synthèse d'oligosaccharides de DP contrôlé		65
3.4.1. Nouvelle étude rétrosynthétique		65
3.4.2. Synthèse chimio-enzymatique du tétrasaccharide	35	66
<b>4. SYNTHÈSE CHIMIO-ENZYMATIQUE D'UN SUBSTRAT FLUORESCENT POUR L'ÉTUDE DE <math>\beta</math>-(1,3)-</b>		
<b>GLUCANASES</b>		<b>67</b>
4.1. Etude rétrosynthétique		67
4.2. Synthèse du tétrasaccharide fluorescent	42	69
4.2.1. Par couplage avec le glucose-EDANS	38	69
4.2.2. Par couplage avec le disulfure	39	70
4.3. Etude enzymatique		71
<b>5. RATIONALISATION DES RESULTATS OBTENUS AVEC LA GLYCOSYNTHESE GII E231</b>		<b>72</b>
5.1. Synthèse des glucosides	46 et 49	73
5.2. Donneurs et accepteurs de la glycosynthase GII E231G		73
<b>CHAPITRE III : LES <math>\beta</math>-GLUCAN-BINDING PROTEINS (GBPS)</b>		<b>77</b>
<b>1. INTRODUCTION</b>		<b>79</b>
<b>2. LA GLUCAN-BINDING PROTEIN DE <i>GLYCINE MAX</i> (SOJA)</b>		<b>79</b>
2.1. Spécificité de la <i>GmGBP</i> recombinante		79
2.2. Expression et purification de la <i>GBP</i> de <i>Glycine max</i> "CBP-tagged"		81
2.3. Stéréochimie de l'hydrolyse catalysée par la <i>GmGBP</i> recombinante		82
2.4. Expression de la <i>GmGBP</i> chez <i>Medicago truncatula</i>		83
2.4.1. Objectif		83
2.4.2. Transformation d' <i>A. rhizogenes</i>		84
2.4.3. Transformation des racines de <i>M. truncatula</i>		85
<b>3. LES GBPS DE <i>MEDICAGO TRUNCATULA</i></b>		<b>88</b>
3.1. <i>Medicago truncatula</i> : un modèle pour les Fabacées		88
3.2. Le domaine $\beta$ -(1,3)-glucanase des <i>MtGBPs</i>		88
3.3. Essais de clonage des gènes de la famille <i>MtGbp</i>		89
3.3.1. Objectif		89
3.3.2. <i>MtGbp1</i> et <i>MtGbp3</i>		90
3.3.2.1. Essai de clonage dans pYes-M/TEV/CBP		90
3.3.2.2. Essai de clonage dans pGem-T		91
3.3.2.3. Clonage dans pSTBlue-1		92
3.3.2.4. Nouveaux essais de clonage dans pYes-M/TEV/CBP		93
3.3.3. <i>MtGbp2</i>		94
3.3.3.1. Essai de clonage dans pYes-M/TEV/CBP		94
3.3.3.2. Essai de clonage dans pGem-T		95
3.3.3.3. Essais de clonage dans pSTBlue-1		95
3.3.4. <i>MtGbp4</i>		96

## SOMMAIRE

---

3.3.4.1. Essai de clonage dans pGem-T	96
3.3.4.2. Essai de clonage dans pSTBlue-1	96
3.3.4.3. Clonage dans pSC-A	96
3.3.5. Conclusion et perspectives	98
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b>	<b>99</b>
<b>PARTIE EXPERIMENTALE</b>	<b>103</b>
<b>1. METHODES GENERALES</b>	<b>105</b>
1.1. Solvants	105
1.2. Chromatographies	105
1.3. Analyses	105
1.4. Milieux de culture	106
1.5. PCRs et clonages	109
1.6. Gels, extraction des plasmides et purification des gènes	113
<b>2. SYNTHESSES ET CARACTERISATIONS</b>	<b>116</b>
<b>3. ENZYMES ET GENES</b>	<b>157</b>
3.1. Expression et purification de la glycosynthase GII E231G	157
3.2. Suivi par spectrofluorométrie de l'hydrolyse catalysée par la GmGBP	158
3.3. Stéréochimie de l'hydrolyse catalysée par la GmGBP	159
3.4. Transformations d' <i>Agrobacterium rhizogenes</i> et <i>Medicago truncatula</i>	159
3.5. Clonages des Gbps de <i>Medicago truncatula</i>	161
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>181</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>197</b>
Liste des abréviations	199
Liste des figures	203
Liste des schémas	205
Liste des tableaux	207



**INTRODUCTION GENERALE ET  
OBJECTIFS**



Les  $\beta$ -(1,3)-glucanes se rencontrent chez diverses espèces végétales et, en particulier, chez les champignons. Ces polysaccharides ont été identifiés chez différents champignons connus en Asie pour leurs propriétés médicinales. Les  $\beta$ -(1,3)-glucanes ont été reconnus pour leurs activités immunostimulantes chez les mammifères, mais ils sont également impliqués dans le système de défense des plantes. En effet, les oligosaccharides issus de la dégradation des  $\beta$ -(1,3)-glucanes contenus dans la paroi des pathogènes jouent le rôle d'éliciteur chez certaines plantes, et déclenchent des réactions de défense.

Si les propriétés des  $\beta$ -(1,3)-glucanes et des  $\beta$ -(1,3)-gluco-oligosaccharides ont bien été identifiées, leurs mécanismes d'action restent encore à préciser.

Afin de disposer des outils nécessaires à ce travail, nous avons entrepris la synthèse enzymatique de  $\beta$ -(1,3)-gluco-oligosaccharides. Ce travail a été réalisé au Centre de recherche sur les macromolécules végétales (CERMAV), dans l'équipe "Glycochimie et biotechnologie des oligosaccharides", où la synthèse par voie chimio-enzymatique d'oligosaccharides pour des études structure/activité en glycobiologie est l'une des principales thématiques de recherche.

L'étude des oligosaccharides agissant comme molécule/signal chez les plantes était également la thématique du projet européen de recherche "The oligosaccharide signalling in plants network" (SACC-SIG-NET, projet n°HPRN-CT-2202-00251). La seconde partie du travail présenté dans ce manuscrit a été effectuée au sein de l'équipe "Biochimie et phytopathologie" de l'Institut botanique de l'Université Ludwig-Maximilians (LMU, Munich, Allemagne) qui contribuait à ce projet en étudiant les récepteurs de  $\beta$ -glucanes.

Le premier chapitre de ce manuscrit comporte tout d'abord un rappel bibliographique sur les glycoside-hydrolases et leurs utilisations en synthèse, et plus particulièrement sur les glycosynthases. Ce chapitre présente également une introduction succincte aux "glucan-binding proteins", enzymes impliquées dans la reconnaissance des  $\beta$ -glucanes, ainsi qu'un état des lieux des connaissances acquises sur les  $\beta$ -(1,3)-glucanes et  $\beta$ -(1,3)-gluco-oligosaccharides, leurs propriétés biologiques et les synthèses décrites dans la littérature.

Le deuxième chapitre porte sur l'établissement d'une méthode de synthèse permettant d'obtenir des  $\beta$ -(1,3)-oligosaccharides de DP contrôlé. Ce travail repose sur l'utilisation d'une

enzyme, la glycosynthase GII E231G, issue du grain d'orge. En se basant sur la méthode développée en première partie de ce chapitre, la synthèse d'un substrat fluorescent destiné à l'étude d'*endo*- $\beta$ -(1,3)-glucanases est ensuite présentée. Le chapitre se termine sur un récapitulatif des travaux réalisés avec la glycosynthase GII E231G.

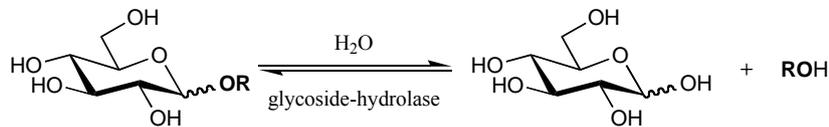
Le troisième et dernier chapitre traite des  $\beta$ -glucan-binding proteins (GBPs), et décrit le travail effectué, sous la direction du Pr. J. Ebel et du Dr. J. Fliegmann, dans le cadre du projet SACC-SIG-NET. Une première partie de ce travail concerne l'étude de la GBP de *Glycine max*. La deuxième partie porte sur le clonage d'une famille de gènes de *Medicago truncatula* codant pour des enzymes de type GBP, afin de pouvoir exprimer ces enzymes chez la levure *S. cerevisiae*, et disposer ainsi de quantités de protéine suffisantes pour procéder à des études enzymatiques.

**CHAPITRE I : ETUDE  
BIBLIOGRAPHIQUE**



## 1. Glycoside-hydrolases et $\beta$ -(1,3)-glucanases

Les saccharides, comme les  $\beta$ -(1,3)-glucanes, interviennent chez les champignons, les bactéries ou les plantes, en tant que composants structuraux, source d'énergie ou molécule-signal. La régulation de leur métabolisme nécessite donc de nombreuses enzymes. Parmi elles, les glycoside-hydrolases sont responsables de l'hydrolyse des oligo- et polysaccharides. Elles catalysent l'hydrolyse des liaisons glycosidiques entre un sucre et un aglycone (R), qui est souvent un autre sucre (Schéma 1).



*Schéma 1 : Réaction catalysée par les glycoside-hydrolases*

### 1.1. Classification

#### 1.1.1. La classification des enzymes de l'IUBMB<sup>a</sup>

Dans la nomenclature de l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire (IUBMB) basée sur le type de réaction catalysée et la spécificité de substrat, chaque enzyme reçoit un numéro EC.

Le premier chiffre de ce numéro classe l'enzyme suivant son activité. Le second chiffre désigne le type de fonction affectée par l'activité enzymatique. Le troisième et le quatrième chiffre permettent de préciser le substrat.

Les numéros correspondant aux glycoside-hydrolases sont donc du type EC 3.2.1.x, "x" dépendant du substrat.

<sup>a</sup> <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>

Ainsi en décomposant un numéro EC nous avons accès à la spécificité d'une enzyme d'une façon systématique. Par exemple, les *endo*- $\beta$ -(1,3)-glucanases, référencées sous le numéro EC 3.2.1.39, sont : (3) des hydrolases ; (2) des glycosylases ; (1) des *O*-glycosidases ; (39) hydrolysant les liaisons  $\beta$ -(1,3) des  $\beta$ -(1,3)-glucanes.

Cependant la classification de l'IUBMB ne tient pas compte des caractéristiques structurales, c'est-à-dire des similarités de séquences protéiques et donc de la structure tridimensionnelle et du mécanisme d'action (inversion ou rétention de configuration), des enzymes. Elle ne tient pas non plus compte du fait que ces enzymes peuvent agir sur différents substrats, et est donc mal adaptée à la description des glycoside-hydrolases.

### 1.1.2. La classification CAZy<sup>b</sup>

Depuis 1991, une autre classification a été proposée par B. Henrissat. Les glycoside-hydrolases y sont regroupées en familles en fonction des similitudes dans leur séquence d'acides aminés.<sup>1</sup> Ces similitudes sont appréciées par la méthode HCA ("Hydrophobic Cluster Analysis") qui est basée sur la détection de segments structuraux constituant le coeur hydrophobe des protéines globulaires. Grâce à cette approche, des similitudes dans le repliement tridimensionnel peuvent être détectées entre des protéines possédant des identités de séquences très basses (20%).

Cette classification diffère de la classification de l'IUBMB par le fait que des enzymes de spécificités différentes peuvent appartenir à la même famille, puisqu'il existe une relation directe entre similarités de séquences et repliements tridimensionnels. La classification CAZy (Carbohydrate-Active enZYmes) met ainsi en évidence les relations structure/fonction. Cette classification permet donc de prendre en considération la structure tridimensionnelle ainsi que le mécanisme moléculaire des glycoside-hydrolases.

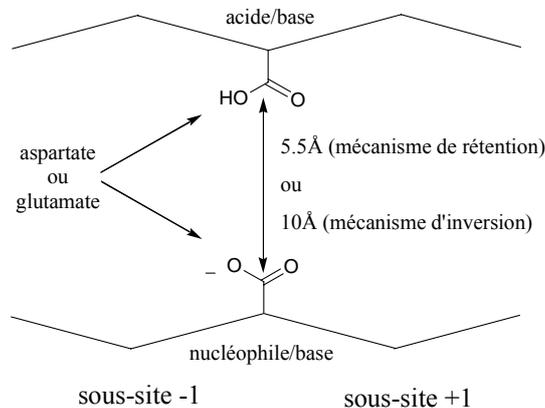
---

<sup>b</sup> P.M. Coutinho & B. Henrissat (1999) Carbohydrate-Active Enzymes server : <http://www.cazy.org/>

## 1.2. Mode d'action des $\beta$ -D-glycoside-hydrolases

L'hydrolyse enzymatique des liaisons glycosidiques est une réaction acido-basique qui peut s'effectuer selon deux mécanismes principaux.<sup>2</sup> Dans les deux cas, la réaction passe par un état de transition du type ion oxocarbenium. Cette réaction est généralement gouvernée par deux acides aminés (le plus souvent de type aspartate ou glutamate), l'un jouant le rôle de donneur de proton acide/base, l'autre de nucléophile/base (Figure 1).

D'autres mécanismes d'hydrolyse existent cependant, comme celui des lyases qui procèdent par  $\beta$ -élimination,<sup>3</sup> ou des mécanismes de type red/ox<sup>4</sup> mettant en jeu le cofacteur  $\text{NAD}^+$  ainsi qu'un métal divalent, du type  $\text{Mn}^{2+}$ , et généralement un agent réducteur.



**Figure 1 : Site actif des glycoside-hydrolases**

(Par convention, les sous-sites de reconnaissance du substrat sont numérotés à partir du site de coupure. Les sous-sites du côté non-réducteur de la liaison à hydrolyser sont numérotés négativement et ceux du côté réducteur sont numérotés positivement)

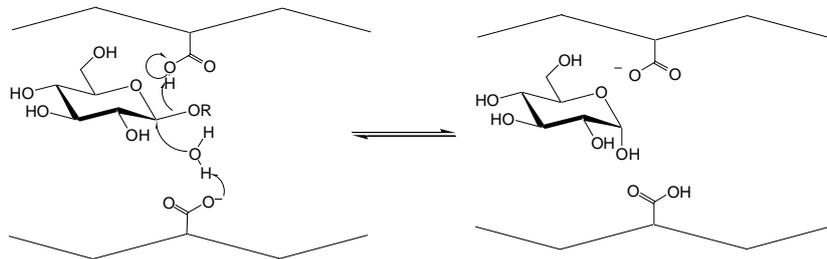
Les enzymes agissent soit avec un mécanisme de rétention de configuration, en libérant un produit dont la configuration du carbone anomère est identique à celle du substrat, soit avec un mécanisme d'inversion de configuration, en libérant un oligosaccharide de configuration opposée à celle du substrat. L'appartenance d'une glycoside-hydrolase à l'une de ces deux classes peut être facilement déterminée en suivant l'évolution de la réaction enzymatique par RMN du proton. L'apparition du signal correspondant au H-1 de l'extrémité réductrice d'un oligosaccharide de configuration identique, ou opposée, à celle du substrat, permet de déterminer le type de mécanisme.<sup>5,6</sup>

La différence de mécanisme entre deux enzymes se traduit par des modifications structurales au sein du site actif, notamment au niveau de la distance entre les acides aminés

catalytiques. En effet, les acides aminés catalytiques d'une enzyme agissant avec rétention de configuration sont distants en moyenne de 5.5Å, alors que ceux d'une enzyme agissant avec inversion de configuration sont distants de 10Å environ. Cette distance plus importante est nécessaire au mécanisme d'inversion, puisqu'une molécule d'eau et le substrat doivent être présents simultanément entre ces deux acides aminés.

### 1.2.1. Enzymes agissant avec inversion de configuration

Le mécanisme d'hydrolyse avec inversion de configuration se déroule en une seule étape (Schéma 2). L'atome d'oxygène interglycosidique est protoné par le résidu acide/base et le départ de l'aglycone s'accompagne de l'attaque d'une molécule d'eau activée par la base. Cette simple substitution conduit donc à un produit de configuration opposée à celle du substrat initial.

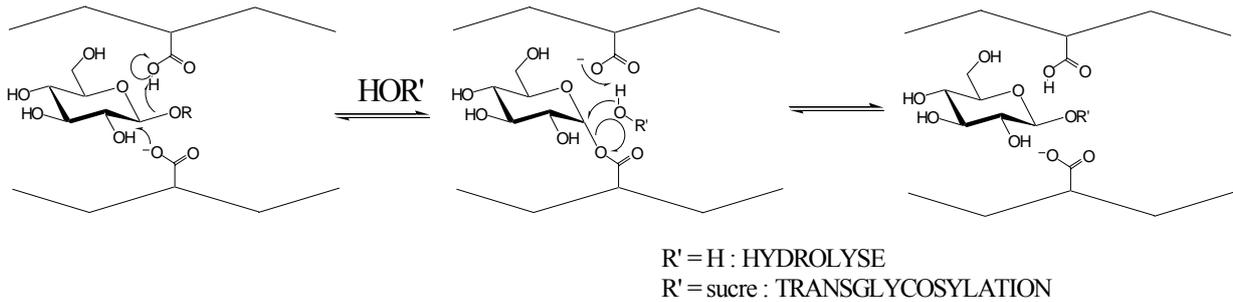


**Schéma 2 : Mécanisme d'une  $\beta$ -D-glycoside-hydrolase agissant avec inversion de configuration**

### 1.2.2. Enzymes agissant avec rétention de configuration

Ce mécanisme implique deux réactions d'inversion successives (Schéma 3). La première étape de l'hydrolyse est la protonation de l'atome d'oxygène interglycosidique par le résidu acide/base et le départ de l'aglycone assisté par le nucléophile pour conduire à la formation d'un glycosyl-enzyme. Dans une seconde étape, l'intermédiaire covalent est hydrolysé par une molécule d'eau et libère ainsi un produit de même configuration que le substrat initial.

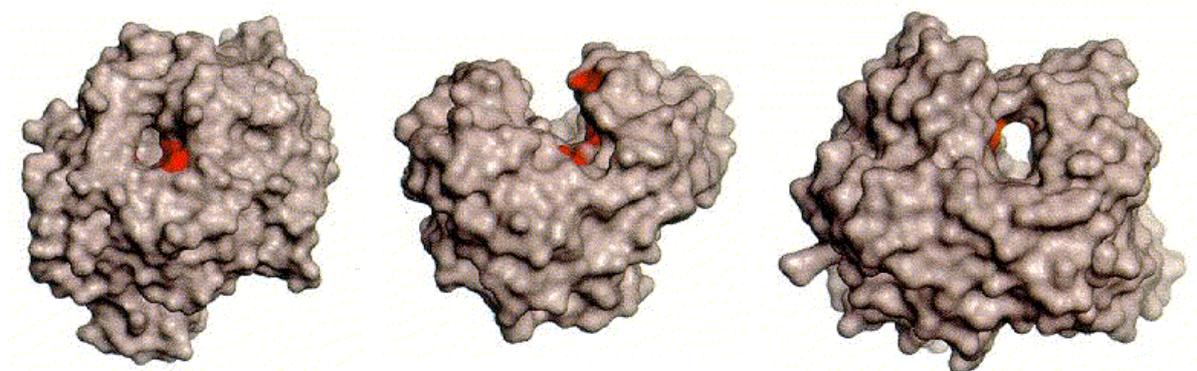
Si un autre sucre ou une molécule hydroxylée se trouve dans le milieu alors une réaction de transglycosylation entre en compétition avec la réaction d'hydrolyse, pouvant conduire à la formation d'un nouvel oligosaccharide ou d'un glycoside. Cette réactivité peut être utilisée à des fins synthétiques comme nous le verrons dans le paragraphe 1.4 de ce chapitre.



**Schéma 3 : Mécanisme d'une  $\beta$ -D-glycoside-hydrolase agissant avec rétention de configuration**

### 1.2.3. Topologie du site actif

Indépendamment de leur mécanisme, les glycoside-hydrolases adoptent différents modes de reconnaissance et d'action en relation avec la topologie de leur site actif. Parmi la diversité de repliements des enzymes, on peut distinguer trois catégories de sites actifs (Figure 2).<sup>7</sup>



**Figure 2 : Topologies du site actif des glycoside-hydrolases**

(Gauche : poche. Milieu : crevasse. Droite : tunnel)

**Poche** : Cette topologie est rencontrée chez les *exo*-enzymes, c'est-à-dire des enzymes capables d'hydrolyser un oligo- ou polysaccharide à partir d'un bout de chaîne en libérant un monosaccharide. Le fond de la poche accueille le sous-site donneur -1 et généralement 2 à 4 sous-sites accepteurs.

**Crevasse** : Cette structure ouverte, présente chez les *endo*-enzymes, permet la fixation de plusieurs unités saccharidiques. Les *endo*-glycoside-hydrolases sont capables d'hydrolyser une chaîne oligosaccharidique de façon aléatoire. Généralement, le site actif est constitué de 2 à 4 sous-sites de part et d'autre du point catalytique.

**Tunnel** : C'est une crevasse couverte par une ou plusieurs boucles. Cette structure est rencontrée chez les enzymes qui hydrolysent les polysaccharides de façon processive, et le site actif est généralement constitué de 2 sous-sites et 4 à 7 sous-sites de part et d'autre du point catalytique.

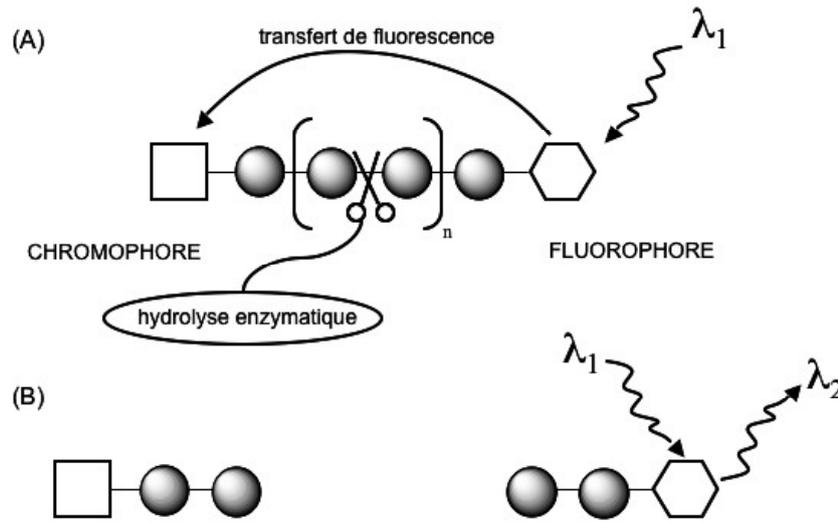
#### 1.2.4. Les substrats "FRET" pour le dosage des glycoside-hydrolases

Le phénomène de transfert intramoléculaire de fluorescence, ou "Fluorescence resonance energy transfer" (FRET), est utilisé depuis plusieurs dizaines d'années pour effectuer des mesures d'activité enzymatique, mais sert aussi pour d'autres applications.<sup>8</sup>

L'énergie absorbée par un fluorophore (le donneur) peut-être transférée de façon non-radiative à un second fluorophore, ou chromophore (l'accepteur), lorsque ces deux groupements sont suffisamment proches, comme lorsqu'ils sont portés par une même molécule (Schéma 4). Généralement, les distances entre lesquelles l'énergie est transférée de façon non-radiative se situent entre 15 et 70Å, et les longueurs d'onde utilisées pour enregistrer cet effet varient entre 300 et 600 nm.

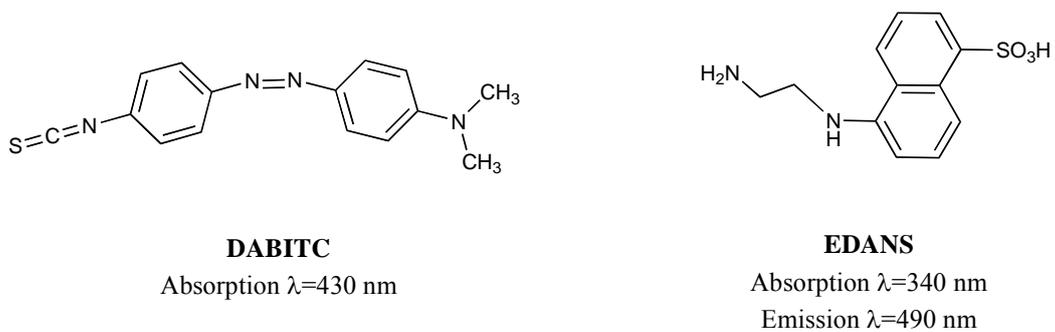
Différentes conditions<sup>9</sup> doivent être réunies pour obtenir un transfert d'énergie efficace :

- Une bonne superposition spectrale entre l'émission du donneur et l'absorption de l'accepteur.
- Un grand coefficient d'extinction molaire ( $> 20000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) de l'accepteur.
- Une région de superposition située le plus loin possible des grandes longueurs d'onde (infrarouge).
- Les spectres d'émission du donneur et de l'accepteur doivent être bien résolus.



**Schéma 4 : Principe du FRET**

Parmi les différentes paires potentielles de donneur/accepteur utilisées pour les mesures de transfert d'énergie de résonance, la paire choisie dans le travail présenté ci-après (voir chapitre 4 du paragraphe II) est la paire EDANS/DABITC, pour laquelle l'efficacité du transfert semble satisfaisante. L'EDANS absorbe à  $\lambda_{\text{max}} = 340 \text{ nm}$  et émet à  $\lambda_{\text{max}} = 490 \text{ nm}$ , alors que le DABITC absorbe à  $\lambda_{\text{max}} = 430 \text{ nm}$  (Figure 3).

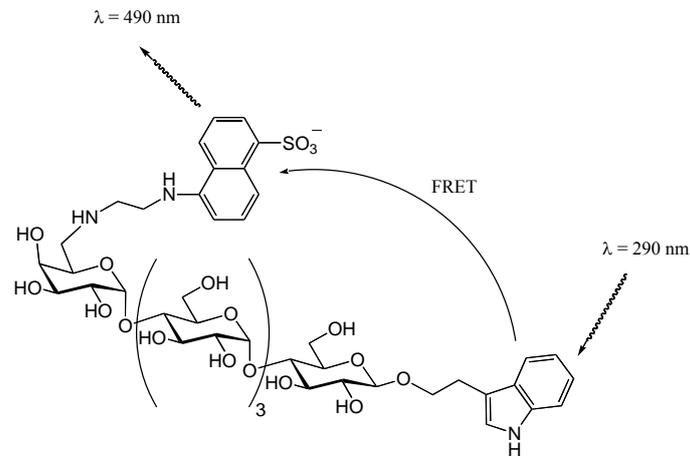


**Figure 3 : Longueurs d'onde d'absorption et d'émission du couple DABITC/EDANS**

Ces groupements peuvent être liés aux oligosaccharides par l'intermédiaire de liaisons suffisamment stables pendant le test enzymatique.

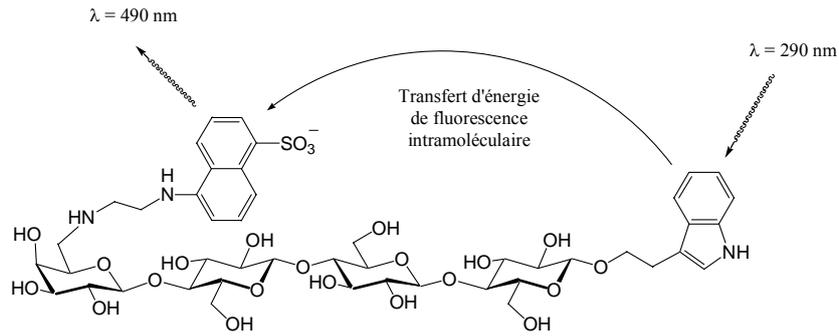
En 1979, Yaron et coll. furent les premiers à utiliser la technique du FRET pour doser l'activité de protéases.<sup>10</sup> En 1995, Matsuoka et coll. décrivent la synthèse d'un alkyl-lactoside fluorescent pour l'étude de céramide-glycanases.<sup>11</sup>

Cette technique fut également utilisée au laboratoire où plusieurs substrats fluorescents furent synthétisés pour le dosage d' $\alpha$ -amylases<sup>12</sup> (Figure 4), de cellulases<sup>13-15</sup> (Figure 5 et Schéma 9), ou de chitinases<sup>16</sup> (Schéma 5).



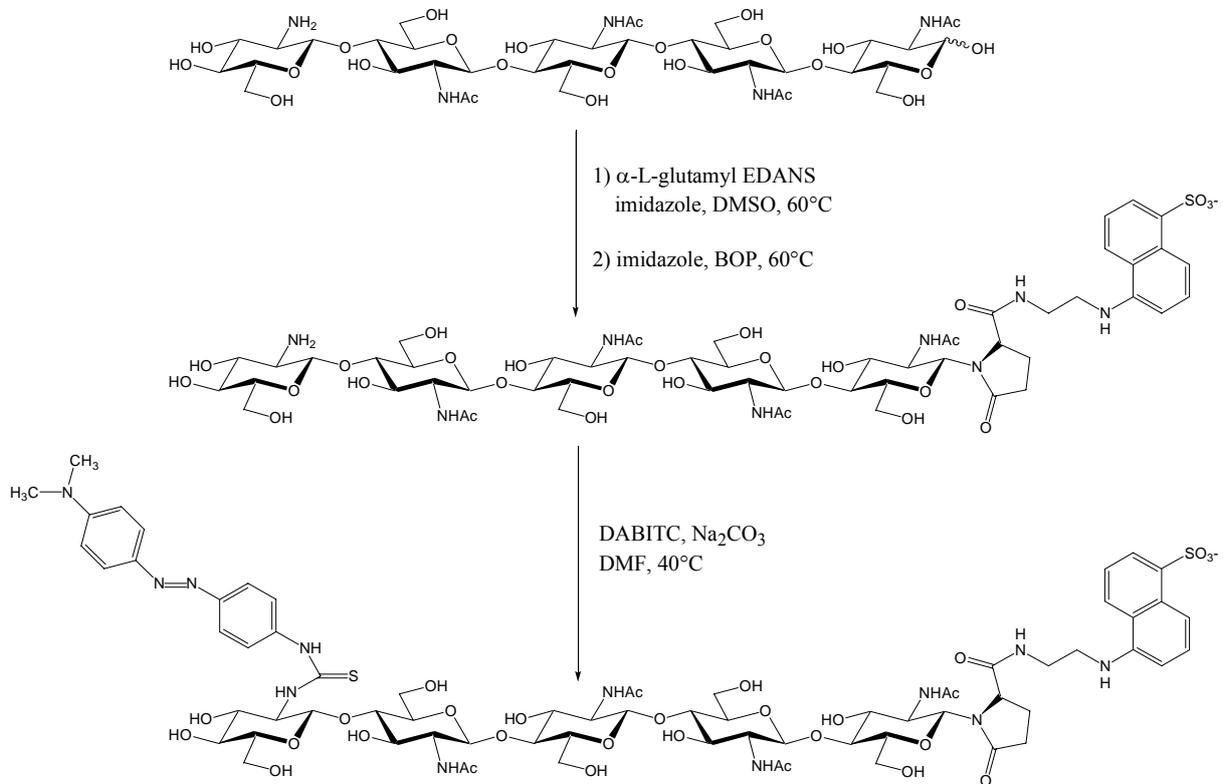
**Figure 4 : Substrat fluorescent pour le dosage d' $\alpha$ -amylases**

Le phénomène d'extinction de fluorescence est vérifié avec le pentasaccharide ci-dessus (Figure 4). Lorsqu'il est excité à 290 nm, la fluorescence émise par l'EDANS à 490 nm est 12 fois plus intense que celle de l'EDANS libre. L'émission de l'indolyléthyle à 345 nm est quand à elle divisée par cinq. En revanche, après incubation du substrat avec l' $\alpha$ -amylase pancréatique porcine, l'intensité de la fluorescence à 490 nm décroît rapidement indiquant ainsi que le pentasaccharide est hydrolysé.



**Figure 5 : Substrat fluorescent pour le dosage de cellulases**

Lors de l'hydrolyse par une cellulase du tétrasaccharide ci-dessus (Figure 5), la fluorescence émise par les groupements situés aux extrémités du composé permet de suivre l'évolution de la réaction et de déterminer à tout instant la concentration des produits formés. Ce substrat employé avec les cellobiohydrolases I et II d'*Humicola insolens*, a permis de montrer que ces enzymes avaient un mode d'action de type *endo*, contrairement à ce qui avait été précédemment suggéré.



**Schéma 5 : Substrat fluorescent pour le dosage d'endo-chitinases et chitobiosidases**

Sur huit différentes enzymes testées avec le chitopentaose fluorescent (Schéma 5), seules les activités *endo*-chitinase et chitobiosidase furent détectées. Le fait que des chitobiosidases soient capables d'hydrolyser un chitooligosaccharide fonctionnalisé aux deux extrémités démontre la possibilité d'un mode d'action de type *endo* pour cette classe de chitinases, généralement répertoriées comme *exo*-enzymes.

### **1.3. Les $\beta$ -(1,3)-glucanases et les $\beta$ -glucan-binding proteins (GBPs)**

#### **1.3.1. Les $\beta$ -(1,3)-glucanases**

Les enzymes capables d'hydrolyser les liaisons *O*-glucosidiques de type  $\beta$ -(1,3)- sont répertoriées dans la classification de l'IUBMB sous le numéro EC 3.2.1.39, si ce sont des *endo*- $\beta$ -(1,3)-glucanases, ou EC 3.2.1.58, si ce sont des *exo*- $\beta$ -(1,3)-glucanases. Ces enzymes se retrouvent aussi dans les familles GH-3, GH-5, GH-16, GH-17, GH-55, GH-64 et GH-81 de la classification CAZy. Elles peuvent hydrolyser les liaisons glycosidiques de divers  $\beta$ -glucanes et  $\beta$ -oligoglucosides contenant également des liaisons (1,2)-, (1,4)- ou (1,6)-, ou encore de  $\beta$ -glucosides d'aryle tels que le  $\beta$ -D-glucoside de 4-nitrophényle.

Les enzymes capables d'hydrolyser les  $\beta$ -(1,3)-glucanes se retrouvent chez un nombre étonnant d'organismes ; allant des procaryotes unicellulaires, et des algues eucaryotes, aux invertébrés, en passant par les bactéries, les levures et les champignons.

Les  $\beta$ -(1,3)-glucanases peuvent avoir pour rôle de digérer les  $\beta$ -(1,3)-glucanes extracellulaires, de mobiliser les réserves ou encore, de modifier certaines structures cellulaires lors des étapes de croissance et de différenciation.<sup>17</sup>

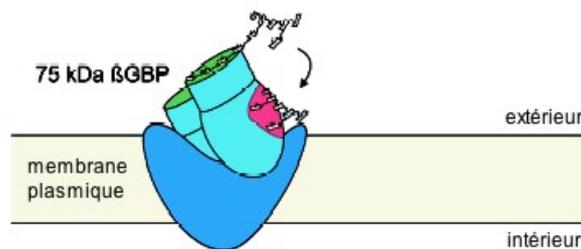
Chez les plantes supérieures, ces enzymes peuvent aussi jouer un rôle dans le mécanisme de défense lors d'attaques pathogènes. En effet, les plantes sont constamment exposées à une grande variété d'ennemis, tels que microbes, nématodes et insectes. Les premiers moyens de défense des plantes sont les barrières physiques, telles que la paroi cellulaire. Ces barrières peuvent éventuellement être renforcées par des composés toxiques ou des enzymes visant à détruire les organismes pathogènes. En plus de ces barrières physiques, chimiques ou biochimiques, les plantes possèdent un système de reconnaissance des signaux

chimiques, et la capacité de convertir ces signaux en réponses biochimiques appropriées. L'activation de gènes codant pour les protéines de défense contre les pathogènes (pathogenesis-related proteins) fait partie de ces réponses induites.<sup>18-21</sup> Les  $\beta$ -(1,3)-glucanases sont un des membres importants de ce groupe de protéines. La  $\beta$ -(1,3)-glucanase du grain d'orge, EC 3.2.1.39, isoenzyme GII, dont est issue la glycosynthase GII E231G (décrite au paragraphe 1.4.2.2) fait partie des ces enzymes dont la production est induite lors d'attaques microbiennes.<sup>22</sup>

### 1.3.2. Les $\beta$ -glucan-binding proteins (GBPs)

La reconnaissance des pathogènes peut s'effectuer de façon non-spécifique (entre plantes et pathogènes) ou de façon spécifique (entre un cultivar et un pathogène précis). La plupart des éliciteurs non-spécifiques font partie des couches externes des pathogènes, comme la chitine et les  $\beta$ -glucanes des champignons ou les lipopolysaccharides bactériens.<sup>19, 23</sup> Seuls quelques récepteurs des éliciteurs spécifiques ont été identifiés chez les plantes.<sup>24</sup>

Un récepteur du  $\beta$ -(1,6)-glucane ramifié  $\beta$ -(1,3), l'heptaglycoside HG, éliciteur dérivé de la paroi du pathogène oomycète *P. sojae* a initialement été décrit chez le soja.<sup>25</sup> Des procédures de purification ont ensuite permis d'isoler et de caractériser les  $\beta$ -glucan-binding proteins (GBPs), correspondant à ce récepteur, chez le soja et le haricot (*Phaseolus vulgaris*).<sup>26-29</sup> Le site de fixation de l'HG est contenu dans la GBP, qui fait elle-même partie d'un complexe situé dans la membrane plasmique (Figure 6).<sup>28, 30-32</sup>



**Figure 6 : Modèle proposé pour le complexe récepteur de  $\beta$ -glucanes**

Récemment, il a été montré que la GBP du soja (*Glycine max L.*) est composée de deux domaines différents, un N-terminal contenant le site de fixation de l'éliciteur (en rose sur la Figure 6), et un C-terminal présentant une activité hydrolytique (en vert sur la Figure 6).<sup>33</sup>

Malgré l'absence d'activité biologique ou de site de fixation pour les  $\beta$ -glucanes, des gènes relatifs aux GBPs existent vraisemblablement chez toutes les plantes. Ces protéines dérivent très probablement d'enzymes agissant sur les saccharides, et ayant conservé une activité hydrolytique.

#### **1.4. Les glycoside-hydrolases en synthèse**

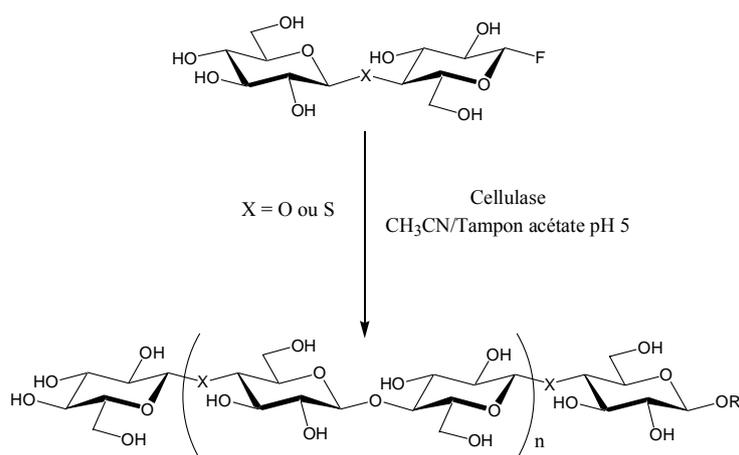
Les oligo- et polysaccharides servent de composants structuraux et de source d'énergie à de nombreux organismes, sont impliqués dans des mécanismes de reconnaissance cellulaire et peuvent avoir des applications thérapeutiques. Cependant, la production d'oligosaccharides à grande échelle reste difficile à mettre en œuvre par les méthodes de chimie classique. En effet, la formation d'une liaison glycosidique implique un grand nombre d'étapes de protection et d'activation sélective des groupements hydroxyle. Les synthèses sont donc souvent longues et les rendements faibles.

Une alternative consiste à utiliser des enzymes : les glycosyltransférases, les transglycosylases ou les glycoside-hydrolases. Mise à part la technologie de "l'usine cellulaire",<sup>34, 35</sup> les glycosyltransférases sont peu disponibles et leur utilisation coûteuse ce qui limite leur exploitation. Les transglycosylases et les glycoside-hydrolases, en revanche, sont plus facilement accessibles. Une cyclodextrine glycosyltransférase (CGTase) fut par exemple utilisée au laboratoire pour l'obtention de cyclodextrines modifiées,<sup>36</sup> d'hémi-C-malto-oligosaccharides,<sup>37</sup> et d'hémi-*thio*-maltodextrines.<sup>37, 38</sup> Les glycoside-hydrolases peuvent être utilisées sous leur forme sauvage dans des conditions réactionnelles favorisant la transglycosylation plutôt que l'hydrolyse. Le produit de la réaction reste cependant un substrat pour l'enzyme et peut être hydrolysé. Ces enzymes peuvent aussi parfois être transformées en glycosynthase par mutagenèse dirigée. Dans ces conditions, la transglycosylation se fait toujours, à partir de substrats activés comme les fluorures de glycosyle, mais le produit de la réaction ne peut plus être hydrolysé.

### 1.4.1. Les glycoside-hydrolases sauvages

Certaines glycoside-hydrolases, agissant avec rétention de configuration, possèdent une activité de transglycosylation qui peut être utilisée à des fins synthétiques. Les fluorures de glycosyle sont depuis longtemps connus pour être de bons donneurs de glycosyle lors des réactions de transglycosylation utilisant des glycoside-hydrolases natives.<sup>39</sup> Cette méthodologie fut exploitée lors de nombreuses synthèses chimio-enzymatiques d'oligosaccharides.<sup>40</sup>

En 1991, Kobayashi et coll.<sup>41</sup> décrivent la première synthèse enzymatique de cellulose, en utilisant une cellulase commerciale de *Trichoderma viride* (Schéma 6, X = O). Plus tard, ils se servirent de cette enzyme pour obtenir du xylane, par autocondensation du fluorure de  $\beta$ -xylobiosyle.<sup>42</sup>

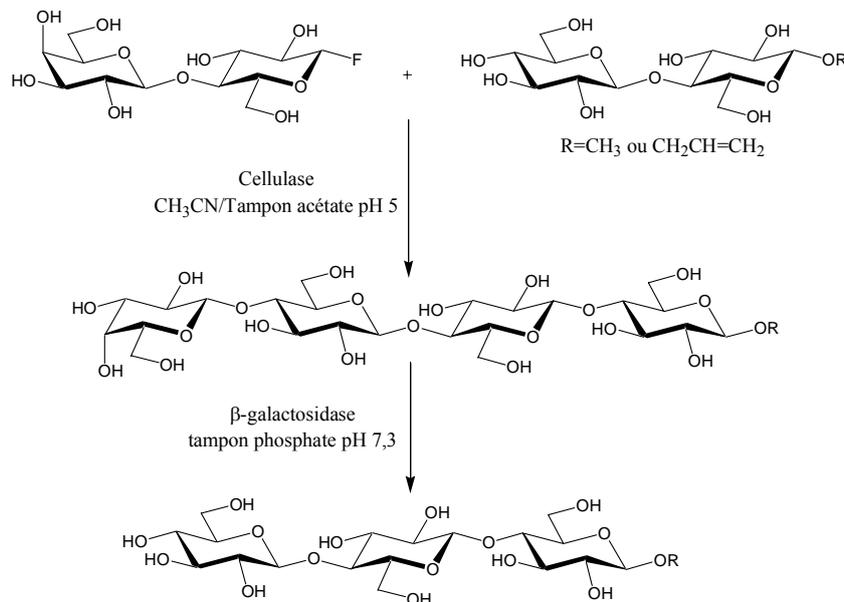


**Schéma 6 : Polymérisation de fluorure de  $\beta$ -cellobiosyle ou de  $\beta$ -4-thio-cellobiosyle catalysée par une cellulase**

De la même façon, l'équipe de H. Driguez décrit la préparation d'hémi-thio-cellodextrines.<sup>43</sup> Ces composés sont des oligomères de cellulose dont une unité sur deux est reliée à la suivante par une liaison thioglycosidique. Le substrat utilisé ici est le fluorure de  $\beta$ -4-thio-cellobiosyle (Schéma 6, X = S).

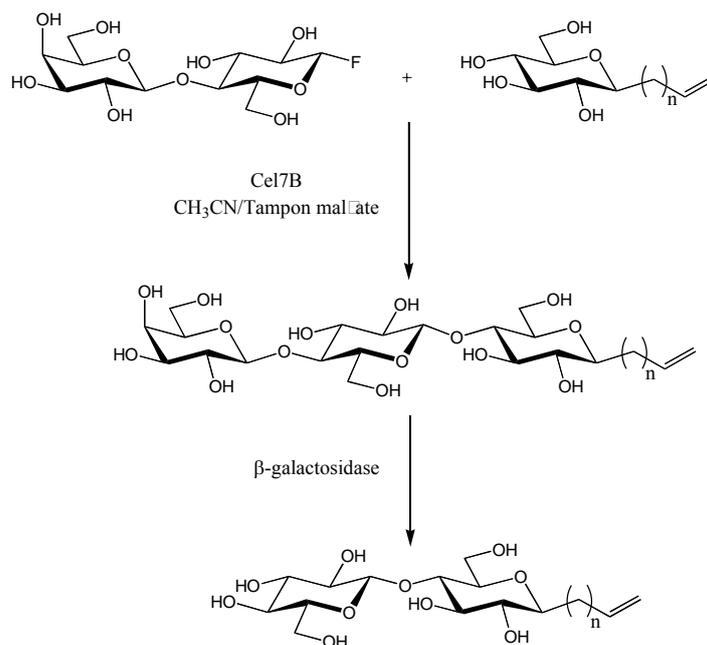
Le fluorure de  $\beta$ -lactosyle peut être utilisé comme donneur pour la préparation de dérivés de degré de polymérisation déterminé. Du fait de l'orientation axiale de l'hydroxyle 4<sup>II</sup>

celui-ci ne peut jouer le rôle d'accepteur et la polymérisation est ainsi évitée.<sup>44</sup> Un premier couplage enzymatique à l'aide d'une cellulase commerciale conduit à un tétrasaccharide dont l'unité non-réductrice est ensuite sélectivement hydrolysée par une  $\beta$ -galactosidase pour libérer un cellotrioside (Schéma 7).



**Schéma 7 : Obtention de cellotriosides et cellotétraosides assistée par l'utilisation successive d'une cellulase et d'une  $\beta$ -galactosidase**

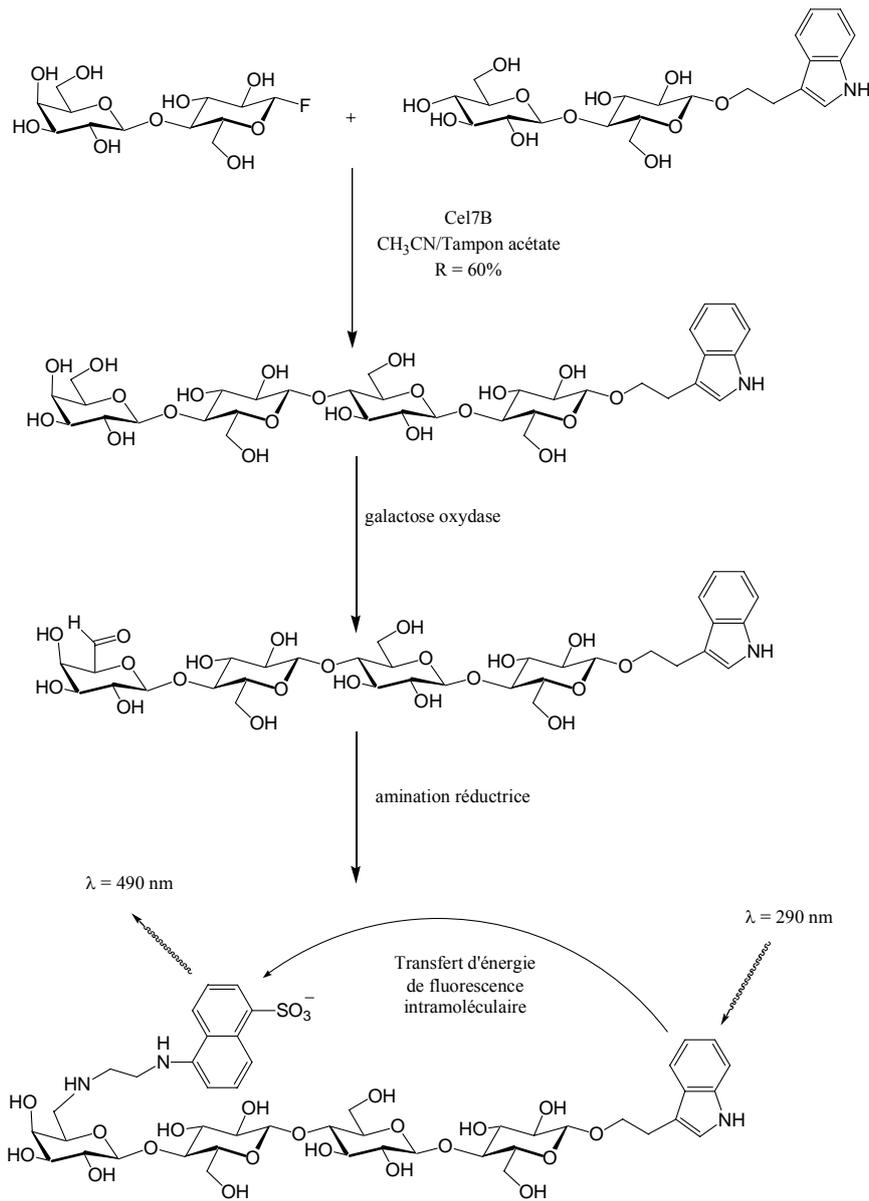
Une stratégie similaire a été employée par Fairweather et coll. pour obtenir des  $\beta$ -C-cellobiosides d'époxyalkyle.<sup>45</sup> Dans un premier temps, l'endoglucanase Cel7B d'*Humicola insolens* est utilisée pour condenser le  $\beta$ -fluorure de lactosyle sur divers  $\beta$ -D-C-glucopyranosides d'alcényle. Puis une  $\beta$ -galactosidase d'*Aspergillus oryzae* permet d'hydrolyser le résidu galactosyle. Les  $\beta$ -D-C-glucopyranosides d'alcényle ainsi obtenus sont alors convertis en  $\beta$ -D-C-glucopyranosides d'époxyalkyle par oxydation (Schéma 8).



**Schéma 8 : Utilisation d'hydrolases pour la synthèse de β-C-cellobiosides d'époxyalkyle**

Dans une autre étude<sup>46</sup> concernant l'utilisation des cellulases en synthèse, Kobayashi et coll. montrèrent que la cellulase de *Trichoderma viride* peut glycosyler différents accepteurs, comme des β-glycosides de méthyle monosaccharidiques (glucose, mannose, xylose) ou encore des disaccharides, comme le β-laminaribioside de méthyle. Les rendements de glycosylation obtenus restent assez faibles et dépassent rarement les 50%.

L'endoglucanase Cel7B, fut encore utilisée au laboratoire pour produire un tétrasaccharide fluorescent destiné au dosage de l'activité de cellulases (Schéma 9).<sup>14, 15</sup> Elle permet de coupler le fluorure de β-lactosyle au 3-indolyléthyl-β-cellobioside pour conduire au tétrasaccharide mono-fonctionnalisé. La bifonctionnalisation s'effectue par introduction de l'EDANS par amination réductrice en position 6 de l'unité galactosyle préalablement oxydée à l'aide d'une galactose oxydase.



**Schéma 9 : Synthèse enzymatique d'un substrat fluorescent pour le dosage de cellulases**

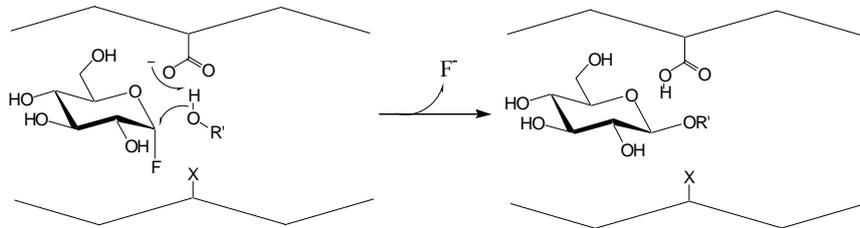
Une  $\alpha$ -amylase d'*Aspergillus oryzae* avait été utilisée de la même manière pour produire un substrat destiné au dosage d' $\alpha$ -amylases (Figure 4).<sup>12</sup>

#### 1.4.2. Les glycosynthases

L'utilisation de glycoside-hydrolases en milieu hydro-organique permet la synthèse d'oligosaccharides de degré de polymérisation variable (DP 3, 4, ...). Cependant, la synthèse

de dérivés de DP 6, 7, 8 ou plus, reste difficile avec ces enzymes sauvages car les produits formés, ayant une meilleure affinité pour l'enzyme que le substrat, sont rapidement dégradés par le biais de réactions de transglycosylation non contrôlables. Cette méthode est donc limitée par l'activité hydrolytique de l'enzyme. Ce problème peut être résolu en utilisant des glycoside-hydrolases modifiées : les glycosynthases.

Le concept de glycosynthase, présenté pour la première fois en 1998 par Withers et coll.,<sup>47</sup> définit les glycosynthases comme des glycoside-hydrolases agissant avec rétention de configuration dont l'acide aminé nucléophile du site actif est muté en acide aminé non-nucléophile (Schéma 10).



**Schéma 10 : Mécanisme d'une glycosynthase**

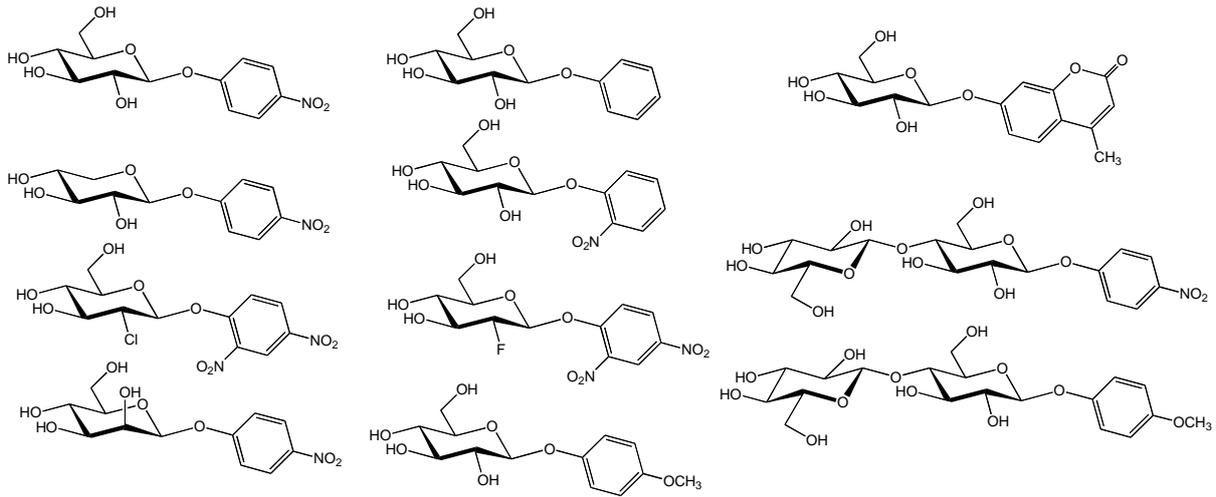
Ces enzymes conservent leur régio- et stéréosélectivité et peuvent catalyser des réactions de transglycosylation à partir de sucres donneurs activés, comme les fluorures d' $\alpha$ -glycosyle, qui miment le glycosyl-enzyme intermédiaire. En revanche, ces enzymes perdent leur capacité à hydrolyser le produit formé, qui peut alors s'accumuler dans le milieu.

Depuis cette première description, plusieurs glycosynthases furent obtenues et utilisées pour la synthèse d'oligosaccharides.

#### **1.4.2.1. Les *exo*-glycosynthases**

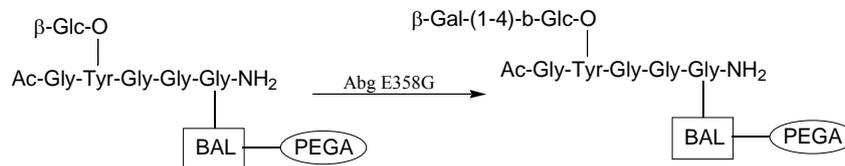
- La première glycosynthase, décrite par Withers, est issue de la  $\beta$ -glucosidase/galactosidase d'*Agrobacterium faecalis*. L'enzyme sauvage est efficace en transglycosylation et le mutant alanine (Abg E358A) ne présente aucune activité

hydrolytique. Cette *exo*-glycosynthase est capable, dans un milieu tamponné (pour neutraliser l'acide fluorhydrique libéré), de condenser un fluorure d' $\alpha$ -D-glucosyle ou galactosyle sur divers accepteurs, avec d'excellents rendements. La régiochimie des liaisons formées est toujours  $\beta$ -(1,4), sauf lorsque l'accepteur utilisé est un  $\beta$ -D-xyloside de 4-nitrophényle : la régiochimie est alors  $\beta$ -(1,3) (Figure 7).



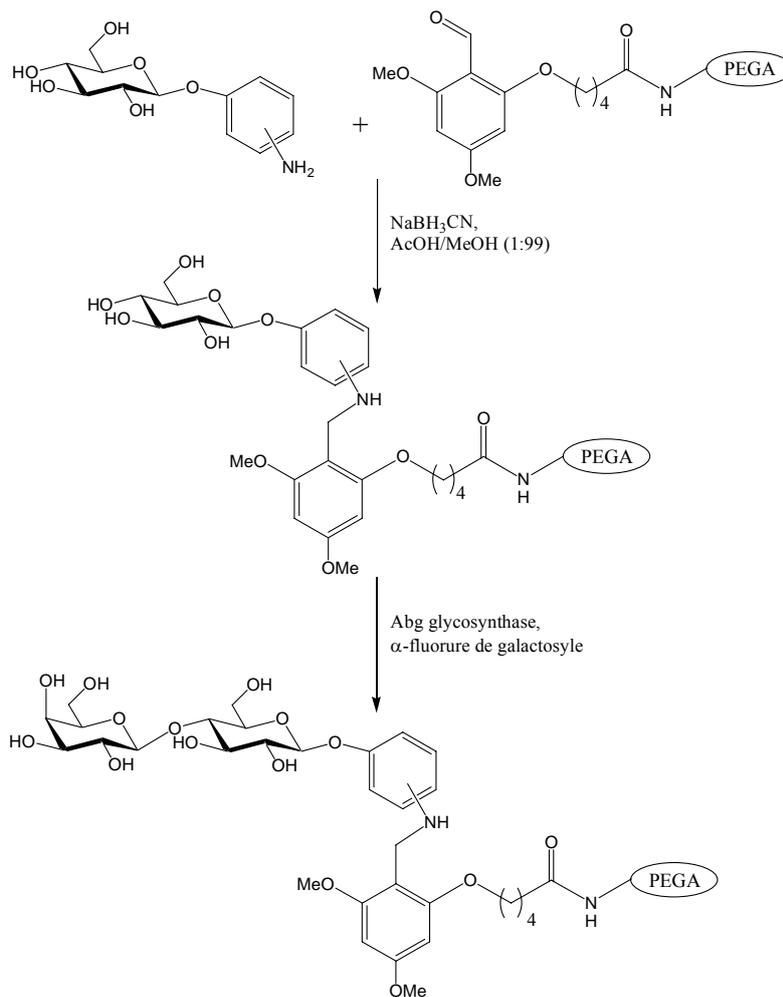
**Figure 7 : Exemples d'accepteurs reconnus par la  $\beta$ -glucosidase/galactosidase mutée E358A**

Plus récemment, deux autres mutants de la  $\beta$ -glucosidase/galactosidase, les mutants sérine (Abg E358S) et glycine (Abg E358G), furent utilisés pour synthétiser des glycopeptides (Schéma 11) et des oligosaccharides (Schéma 12) sur support solide.<sup>48</sup>



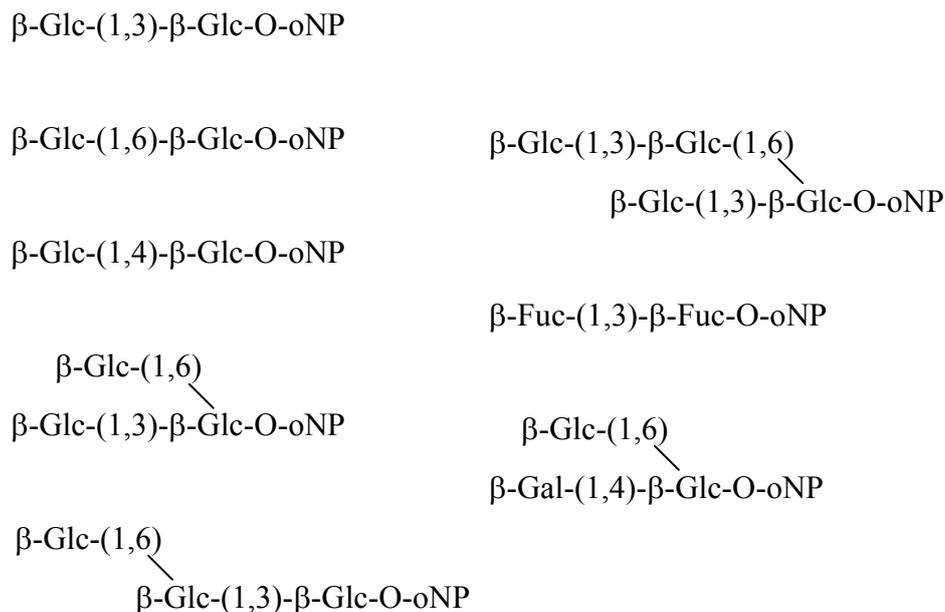
**Schéma 11 : Synthèse de glycopeptide sur support solide**

(BAL = bras espaceur, PEGA = poly(éthylène glycol) polyacrylamide)



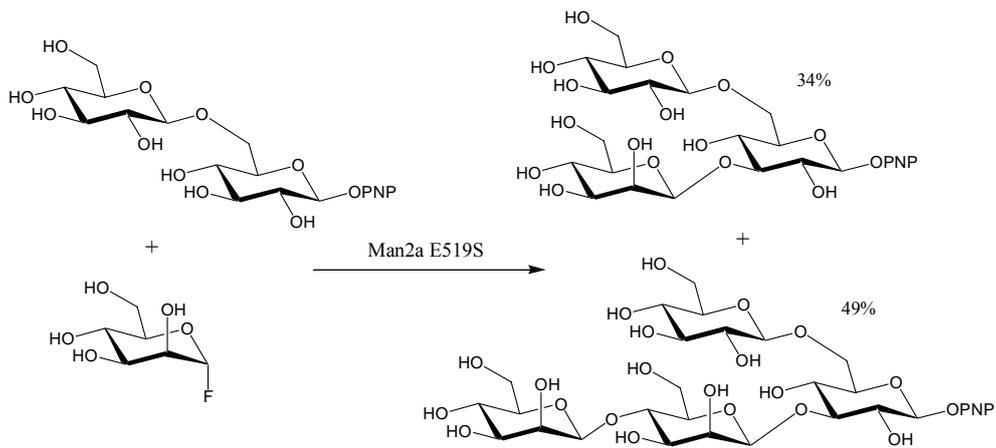
**Schéma 12 : Synthèse d'oligosaccharides sur support solide**

- Le mutant glycine Ss-β-Gly E387G de la β-glucosidase de *Sulfolobus solfataricus*, décrit par Rossi et Moracci,<sup>49</sup> présente un intérêt particulier pour la synthèse d'oligosaccharides ramifiés (ayant un important potentiel au niveau pharmaceutique et agro-alimentaire). Cette glycosynthase accepte comme donneur des fluorures d'α-D-glucosyle, α-D-galactosyle et α-D-fucosyle, mais peut également condenser un β-glycoside de nitrophényle en présence de formiate (synthèse par assistance d'un nucléophile externe) (Figure 8).



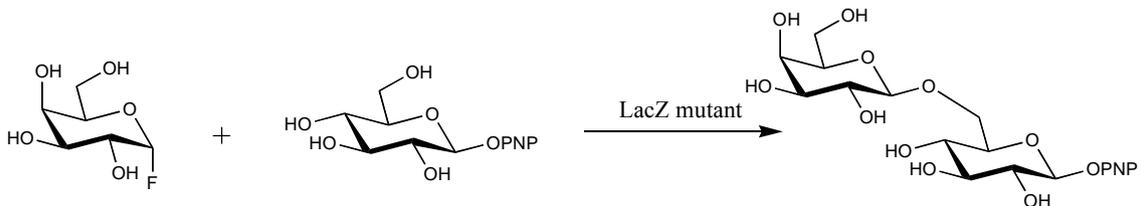
**Figure 8 : Exemples d'oligosaccharides formés avec *Ss-β-Gly E387G***

- Le mutant sérine Man2a E519S de la  $\beta$ -mannosidase de *Cellulomonas fimi*, décrit par l'équipe de Withers,<sup>50</sup> permet aussi de synthétiser des oligosaccharides ramifiés, par exemple à partir de fluorure d' $\alpha$ -mannosyle et de  $\beta$ -gentiobioside de *p*-nitrophényle (Schéma 13). La Man2a E519S fonctionne aussi avec d'autres accepteurs tels que le  $\beta$ -mannoside de *p*-nitrophényle, le 2-deoxy-2-fluoro- $\beta$ -mannoside de 2,4-dinitrophényle, le  $\beta$ -glucoside de *p*-nitrophényle, le  $\beta$ -xylobioside de *p*-nitrophényle ou le  $\beta$ -cellobioside de *p*-nitrophényle. Les produits de glycosylation sont obtenus avec des rendements allant de 70 à 99%.



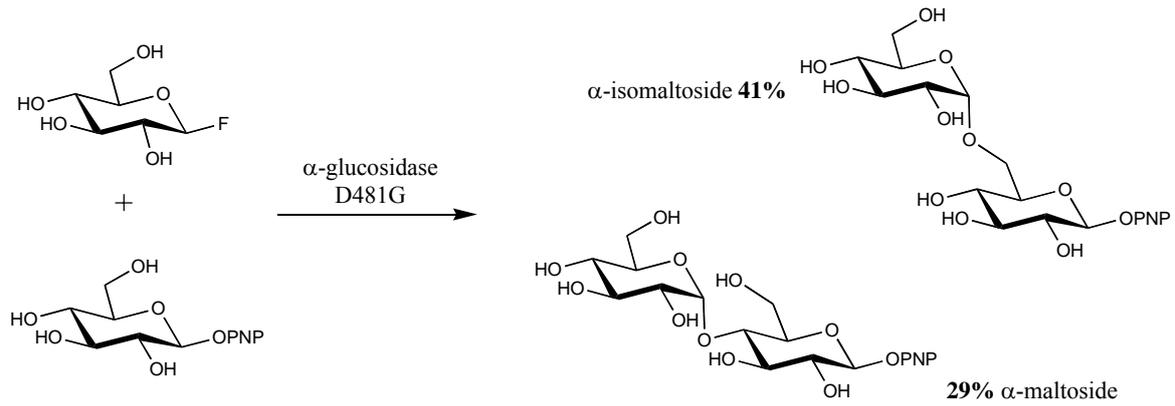
**Schéma 13 : Exemple de synthèse d'oligosaccharides ramifiés à l'aide d'une mannosynthase**

- Un mutant de la  $\beta$ -galactosidase *LacZ* d'*Escherichia coli* permet de condenser le fluorure d' $\alpha$ -galactosyle avec des glucosides d'aryle pour former une liaison  $\beta$ -(1,6) (Schéma 14). Une autre mutation ponctuelle à l'intérieur de l'enzyme, à proximité du site actif, permet d'augmenter le rendement de façon significative.<sup>51</sup>



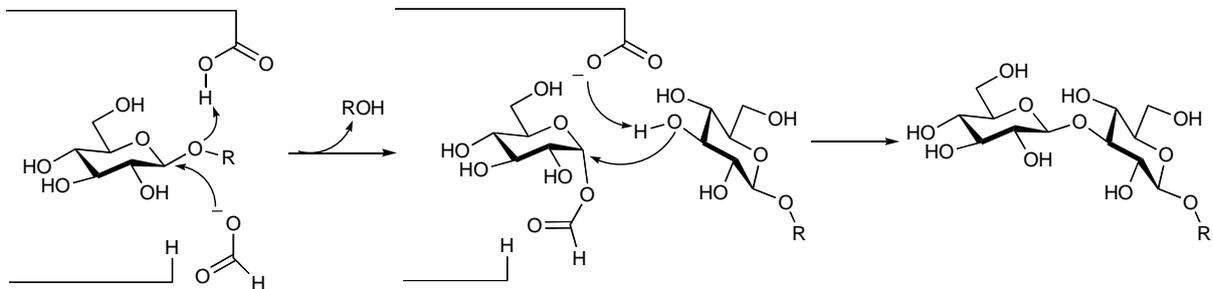
**Schéma 14 : Exemple de couplage catalysé par la  $\beta$ -galactosidase mutée**

- Le mutant D481G de l' $\alpha$ -glucosidase de *Schizosaccharomyces pombe* catalyse la formation de liaisons  $\alpha$ , par couplage d'un fluorure de  $\beta$ -glucosyle avec un  $\alpha$ -glucoside de *p*-nitrophényle, donnant ainsi l' $\alpha$ -isomaltoside et l' $\alpha$ -maltoside (Schéma 15).<sup>52</sup>



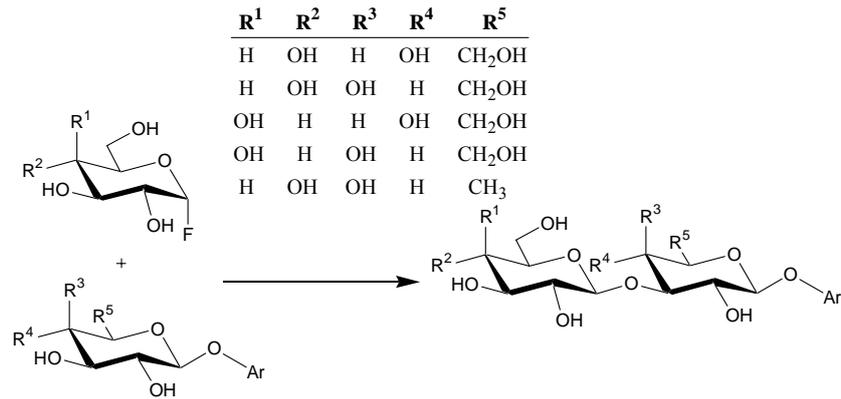
**Schéma 15 : Exemple de réaction catalysée par l' $\alpha$ -glucosidase D481G**

- Les mutants thermophiles des  $\beta$ -glucosidases de *Thermosphaera aggregans* (Ta $\beta$ -gly E386G) et *Pyrococcus furiosus* (CelB E372A) peuvent, en présence de formiate, catalyser la formation d'oligosaccharides,<sup>53</sup> par exemple à partir du glucoside de 2-nitrophényle, qui est à la fois donneur et accepteur (Schéma 16). Les di-, tri- ou tétrasaccharides formés contiennent des liaisons de type  $\beta$ -(1,3),  $\beta$ -(1,4) ou  $\beta$ -(1,6).



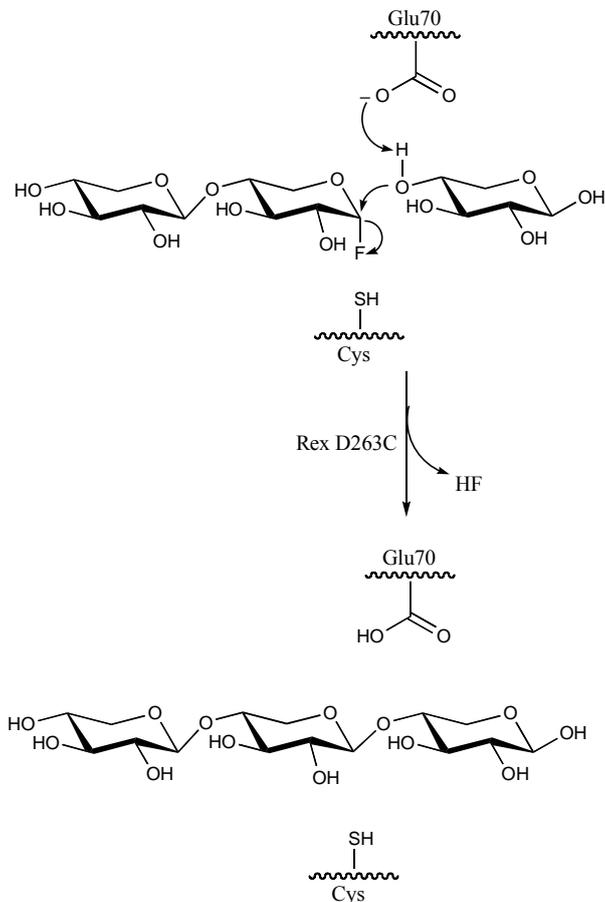
**Schéma 16 : Mécanisme de synthèse par assistance de nucléophile externe**

- Une autre  $\beta$ -glucosidase fut mutée plus récemment,<sup>54</sup> la glucosidase Tt- $\beta$ -Gly de *Thermus thermophilus*. Plusieurs mutants furent testés, les mutants sérine (E338S) et glycine (E338G) étant plus efficaces que le mutant alanine (E338A). Dans les conditions appropriées, ces mutants sont capables de catalyser la formation de galactosyl- et glucosyl- $\beta$ -(1,3)-glycosides avec des rendements pouvant atteindre 90% (Schéma 17).



**Schéma 17 : Réactions catalysées par les mutants de la glycosynthase Tt-β-Gly**

- Le mutant Rex D263C, issu de la glucosidase "Reducing-end xylose-releasing exooligoxylanase", est la première glycosynthase dérivée d'une glycoside-hydrolase agissant avec inversion de configuration. Cette enzyme catalyse la condensation du fluorure d' $\alpha$ -xylobiosyle sur le xylose (Schéma 18).<sup>55</sup>

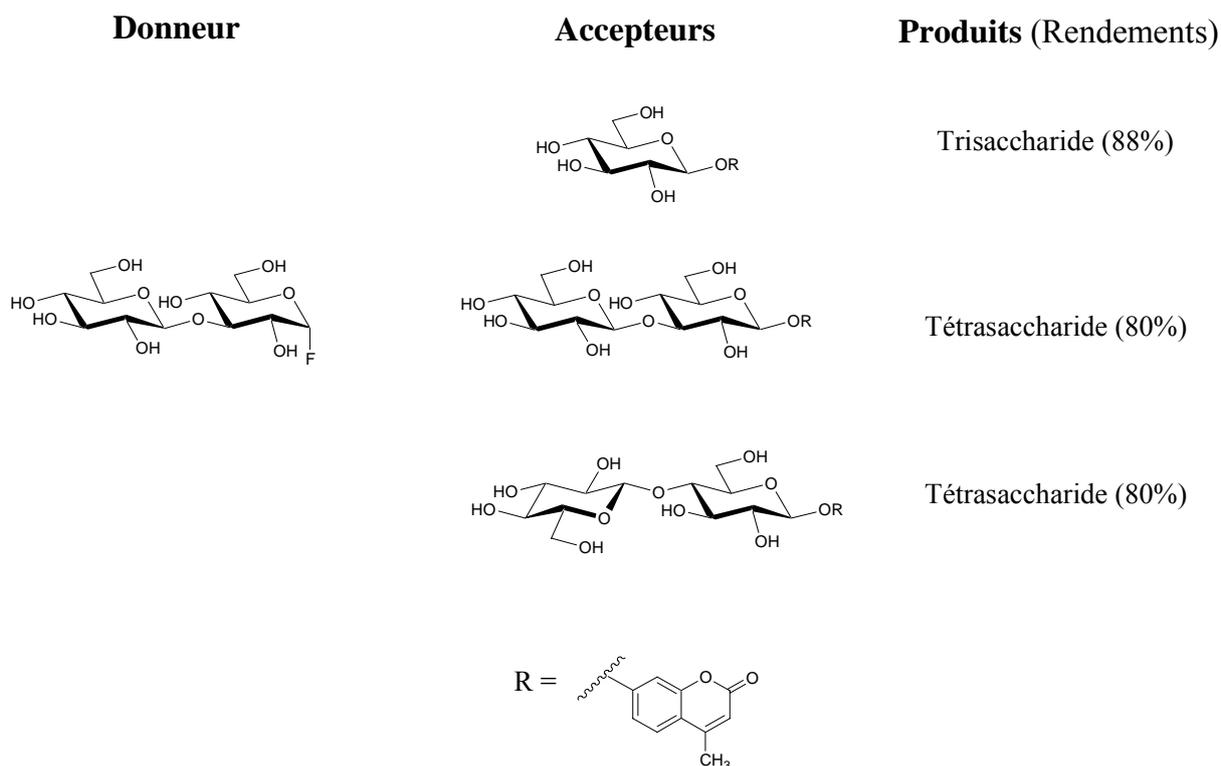


**Schéma 18 : Réaction catalysée par la glycosynthase Rex D263C**

### 1.4.2.2. Les *endo*-glycosynthases

En plus d'être régiospécifiques, les *endo*-glycosynthases présentent l'avantage, contrairement à la plupart des *exo*-glycosynthases connues, de pouvoir transférer plus d'une unité glycosidique à la fois et permettent ainsi de synthétiser aisément des polysaccharides.

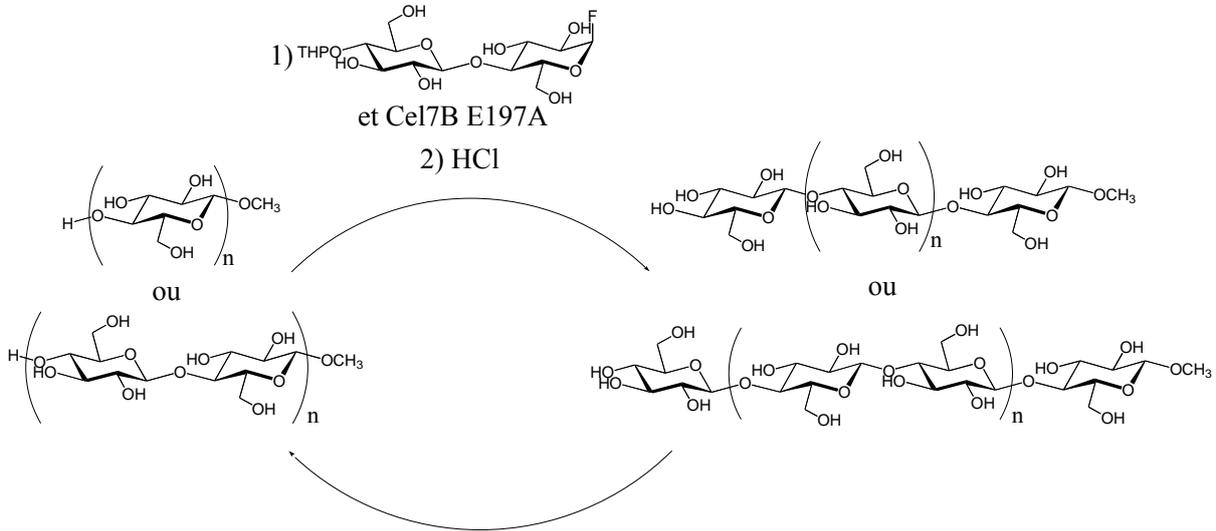
- La première *endo*-glycosynthase fut décrite en 1998 également, par Planas et coll.<sup>56</sup> Ce mutant (E134A) d'une  $\beta$ -(1,3/1,4)-glucanase de *Bacillus licheniformis* catalyse des glycosylations de type  $\beta$ -(1,4) entre un fluorure d' $\alpha$ -laminaribiosyle et un  $\beta$ -glucoside,  $\beta$ -cellobioside ou  $\beta$ -laminaribioside, et permet d'obtenir des composés mixtes  $\beta$ -(1,3)/ $\beta$ -(1,4) (Figure 9).



**Figure 9 : Réactions catalysées par la 1,3-1,4- $\beta$ -glycosynthase de *Bacillus licheniformis***

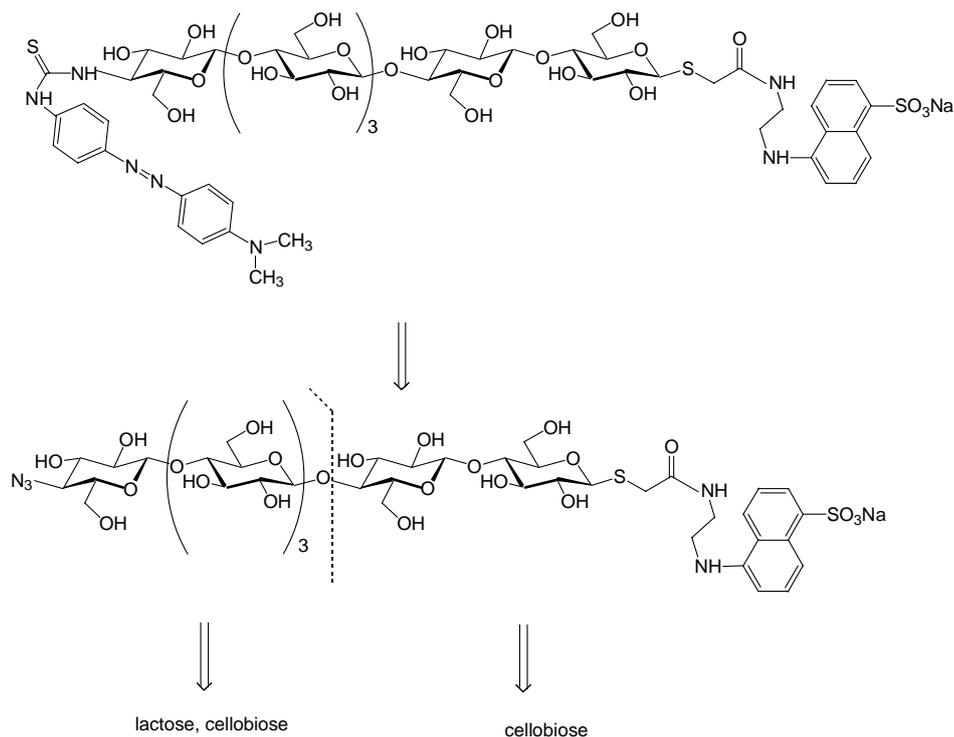
- La glycosynthase Cel7B E197A issue d'*Humicola insolens* fut décrite en 2000 par l'équipe de Driguez. Le mutant alanine fut utilisé à plusieurs reprises pour la synthèse de cellulose et de dérivés,<sup>57</sup> l'obtention d'oligosaccharides de longueur contrôlée (Schéma 19),<sup>58</sup> et la synthèse de substrats fluorescents destinés à l'étude de cellulases (Schéma 9).<sup>13</sup> Cel7B

E197A catalyse la condensation de fluorure d' $\alpha$ -lactosyle ou d' $\alpha$ -cellobiosyle sur des mono- ou disaccharides,  $\beta$ -glucosides,  $\beta$ -D-mannosides,  $\beta$ -D-glucosamine ou fluorure d' $\alpha$ -lactosyle, avec des rendements totaux variant entre 50 et 100 %.



**Schéma 19 : Utilisation de Cel7B E197A dans la synthèse d'oligosaccharides de longueur contrôlée**

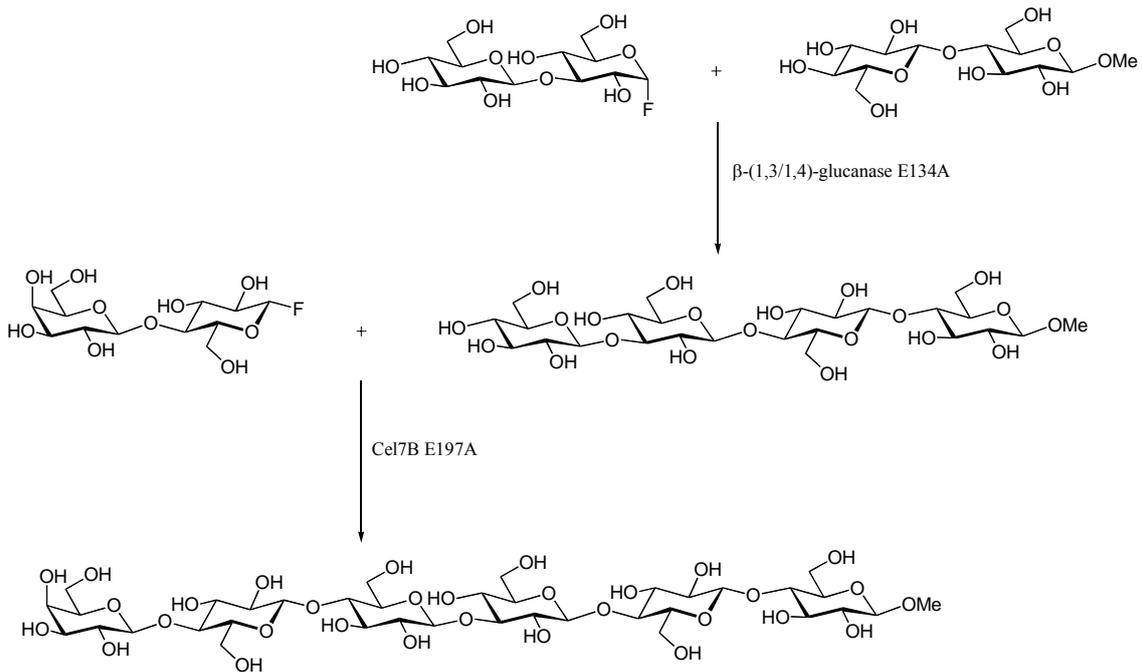
La synthèse d'oligosaccharides de longueur contrôlée se fait de la façon suivante : un fluorure d' $\alpha$ -cellobiosyle, protégé en 4<sup>II</sup> pour éviter l'autocondensation, est transféré sur un mono- ou disaccharide de type glucoside ou cellobioside. La position 4<sup>II</sup> peut alors être déprotégée et un nouveau fluorure protégé peut être transféré sur l'extrémité non réductrice. On peut ainsi obtenir des séries de tri-, penta-, hepta-, ... saccharides ou de tétra-, hexa-, ... saccharides.



**Schéma 20 : Rétrosynthèse d'un substrat fluorescent de cellulases**

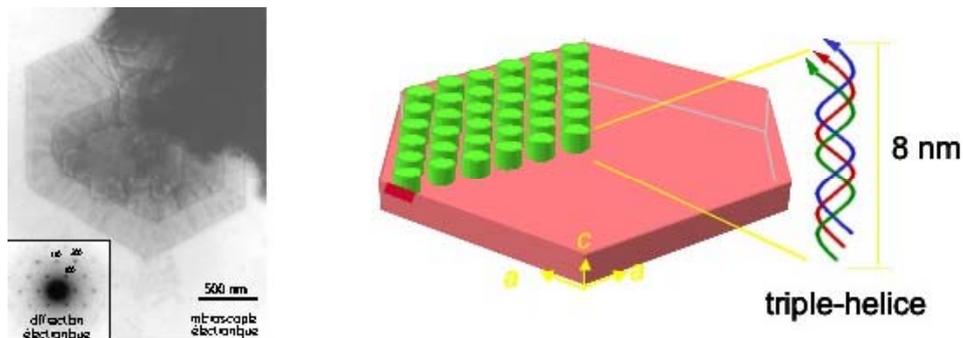
La synthèse d'un substrat fluorescent de cellulases est effectuée à partir de synthons préfonctionnalisés qui sont ensuite couplés par une glycosynthase telle que Cel7B E197A. La condensation d'un premier synthon, l' $\alpha$ -fluorure de 4<sup>II</sup>-azido-cellobiosyle, sur le cellobiose, à l'aide de la glycosynthase, conduit au tétrasaccharide modifié en position 4<sup>IV</sup>. Après fluoration de la position anomère, le tétrasaccharide obtenu est à son tour couplé à un synthon de type cellobiose-EDANS, en utilisant Cel7B E197A, pour conduire à l'hexasaccharide cible fluorescent.

Les équipes de H. Driguez et A. Planas ont également utilisé de concert les deux glycosynthases, dérivées de Cel7B d'*Humicola insolens* et de la  $\beta$ -(1,3/1,4)-glucanase de *Bacillus licheniformis*, dans le but de synthétiser dans un même ballon un hexasaccharide comportant des liaisons mixtes  $\beta$ -(1,3) et  $\beta$ -(1,4) avec un excellent rendement (Schéma 21).<sup>59</sup>



**Schéma 21 : Synthèse d'un hexasaccharide "mixte"  $\beta(1,3)/\beta(1,4)$**

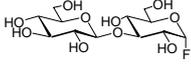
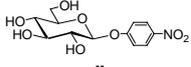
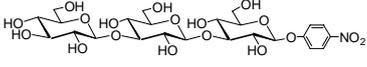
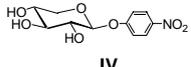
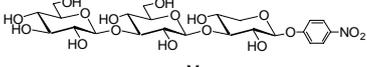
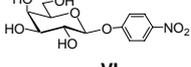
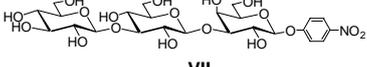
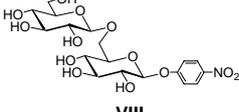
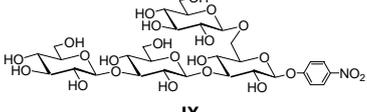
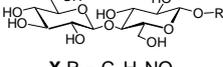
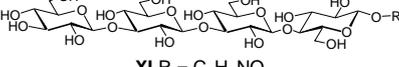
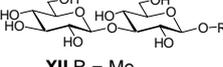
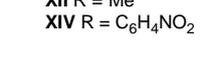
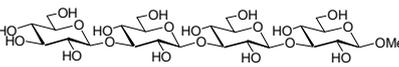
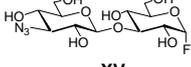
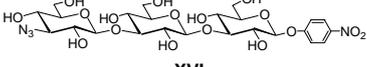
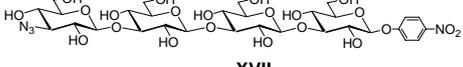
- La glycosynthase GII E231G issue d'une  $\beta(1,3)$ -glucanase d'*Hordeum vulgare*, décrite en 2002 par Hrmova et coll.<sup>60</sup>, est l'enzyme que nous utilisons pour la synthèse de  $\beta(1,3)$ -oligosaccharides décrite au chapitre II. Cette enzyme catalyse la polymérisation du fluorure de laminaribiosyle. Le  $\beta(1,3)$ -glucane obtenu s'organise en triple hélice et cristallise dans une structure hexagonale (Figure 10).

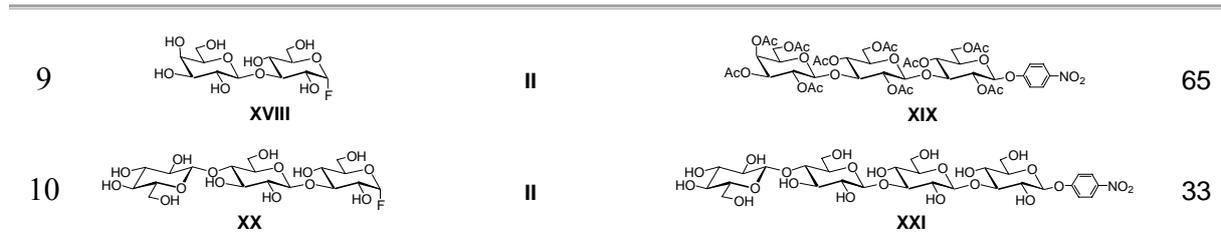


**Figure 10 : Structure cristalline du  $\beta(1,3)$ -glucane synthétisé par GII E231G**

GII E231G peut aussi catalyser le couplage de différents donneurs et accepteurs (Tableau 1).<sup>59</sup> Les Entrées 1, 2, 3 du Tableau 1 montrent que la condensation de l' $\alpha$ -fluorure

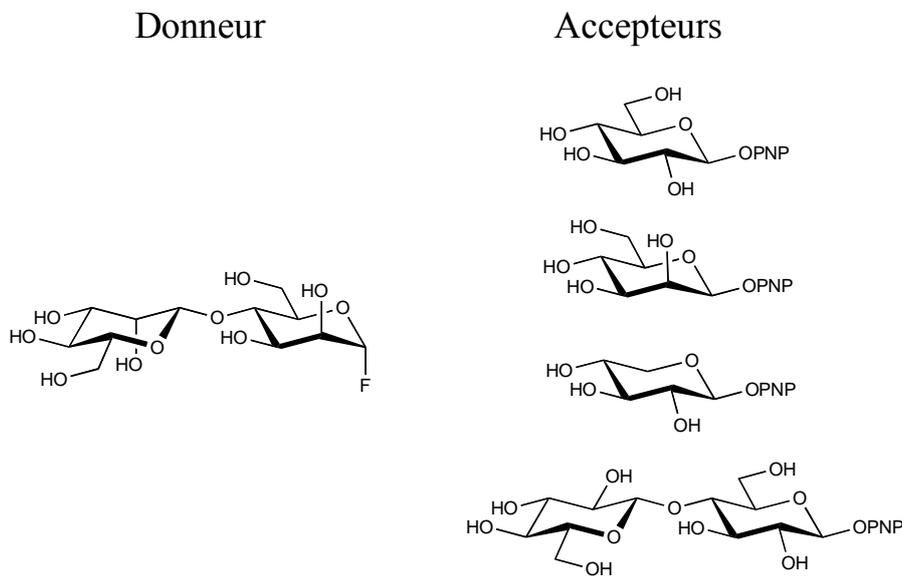
de laminaribiosyle sur le  $\beta$ -glucoside,  $\beta$ -xyloside ou  $\beta$ -galactoside de *p*-nitrophényle conduit au trisaccharide correspondant avec d'excellents rendements. Il faut cependant préciser que pour cela le rapport donneur/accepteur employé est de 1:5. En effet, dans les conditions équimolaires, seule l'autocondensation de fluorure **I** se produit. La condensation avec le gentiobioside **VIII** permet d'obtenir un trisaccharide ramifié avec un bon rendement. Il est également possible de condenser le fluorure **I** sur le  $\beta$ -cellobioside de *p*-nitrophényle ou le  $\beta$ -laminaribioside de méthyle, bien que les rendements soient moins élevés. En revanche, aucun couplage n'est observé avec le  $\beta$ -laminaribioside de *p*-nitrophényle. Ce résultat surprenant s'explique peut-être par une inhibition compétitive du donneur. Pour éviter l'autocondensation du fluorure, sans toutefois employer cinq équivalents d'accepteur, il est aussi possible d'utiliser un donneur modifié en 3<sup>II</sup> (Entrées 7 et 8). D'autres donneurs peuvent également être employés, comme le disaccharide **XVIII** et le trisaccharide **XX**.

Entrée	Donneur	Accepteur	Produit obtenu	Rdt(%)
1	 <b>I</b>	 <b>II</b>	 <b>III</b>	90
2	<b>I</b>	 <b>IV</b>	 <b>V</b>	82
3	<b>I</b>	 <b>VI</b>	 <b>VII</b>	89
4	<b>I</b>	 <b>VIII</b>	 <b>IX</b>	70
5	<b>I</b>	 <b>X</b> R = C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NO <sub>2</sub>	 <b>XI</b> R = C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NO <sub>2</sub>	55
6	<b>I</b>	 <b>XII</b> R = Me  <b>XIV</b> R = C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NO <sub>2</sub>	 <b>XIII</b>	45
7	 <b>XV</b>	<b>II</b>	 <b>XVI</b>	81
8	<b>XV</b>	<b>XIV</b>	 <b>XVII</b>	90



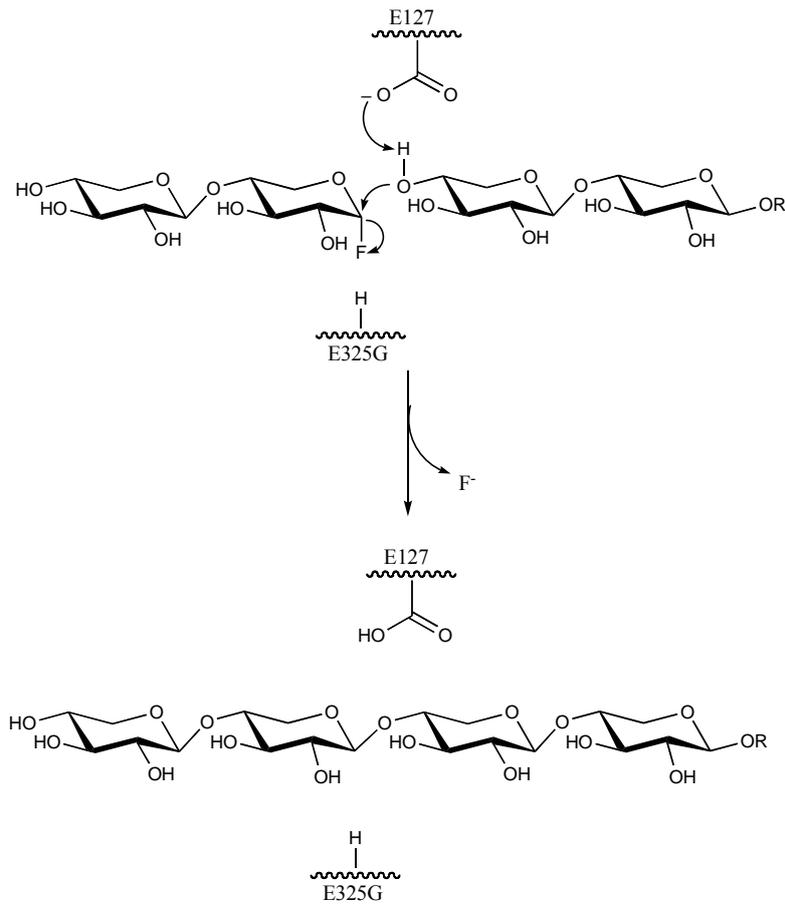
**Tableau 1 : Exemple d'oligosaccharides obtenus avec la glycosynthase *GII E231G***

- Le mutant E320G de la  $\beta$ -mannanase Man26A de *Cellvibrio japonicus*<sup>61</sup> permet la synthèse de manno-oligosaccharides par condensation du fluorure d' $\alpha$ -mannobiosyle sur divers accepteurs (Figure 11).



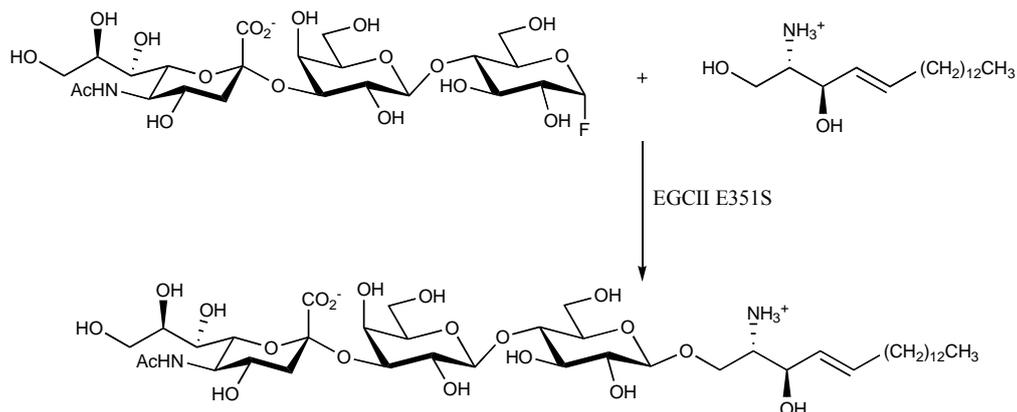
**Figure 11 : Quelques accepteurs de la  $\beta$ -mannanase E320G**

- En 2006, l'équipe de Withers décrit la première glycosynthase dérivée d'une endoxylanase de *Cellulomonas fimi* (CFXcd). Le mutant glycine, CFXcd E235G, est capable de transférer un résidu xylobiosyle, provenant de l' $\alpha$ -fluorure de xylobiosyle, sur un  $\beta$ -xylobioside de *p*-nitrophenyle ou sur un benzylthio- $\beta$ -xyloside (Schéma 22).<sup>62</sup>



**Schéma 22 : Réaction catalysée par la glycosynthase CFXcd E235G**

- Le groupe de Withers décrit également un nouveau type de glycosynthase. Contrairement aux autres glycosynthases qui transfèrent un résidu oligosaccharidique sur un accepteur également saccharidique, cette enzyme est capable de coupler un fluorure de 3'-sialyllactosyle à la *D-erythro*-sphingosine-*N*-diacylée, permettant ainsi d'obtenir le précurseur du ganglioside lyso-G<sub>M3</sub> (Schéma 23).<sup>63</sup>



**Schéma 23 : Réaction catalysée par le mutant EGCII E351S**

Cette glycosynthase est dérivée de l'*endo*-glycocéramidase II (EGCII) de *Rhodococcus*. D'autres glycosphingolipides furent également obtenus en couplant différents fluorures à la *D-erythro*-sphingosine-*N*-diacylée ou à ses analogues.

## 2. $\beta$ -(1,3)-Glucanes et $\beta$ -(1,3)-gluco-oligosaccharides

### 2.1. Les $\beta$ -(1,3)-glucanes

#### 2.1.1. Origine et structure

Le terme de  $\beta$ -(1,3)-glucanes désigne normalement les polysaccharides linéaires constitués de résidus D-glucopyranosyles liés par des liaisons de type  $\beta$ -(1,3). Cependant ce terme regroupe plus généralement tous les polysaccharides, ramifiés ou non, possédant un squelette  $\beta$ -(1,3)-glucane. Les ramifications s'effectuent en  $\beta$ -(1,6) et comportent généralement une seule unité glucosyle, mais il est également possible de rencontrer des glucanes ramifiés par plusieurs résidus glucosyle, à leur tour liés  $\beta$ -(1,3) ou  $\beta$ -(1,6).

La densité et la distribution des ramifications varient d'un type de  $\beta$ -(1,3)-glucane à l'autre. Le degré de polymérisation varie en fonction de l'origine du polymère et des méthodes d'extraction employées, leur masse molaire pouvant s'élever jusqu'à 2 000 000 g/mol environ.

Les  $\beta$ -(1,3)-glucanes de masse molaire élevée (>90 000 g/mol) peuvent s'organiser en triple hélice.<sup>64</sup>

Les  $\beta$ -(1,3)-glucanes sont des composants essentiels de la paroi cellulaire des champignons ; ils sont également présents chez les bactéries, les levures, les algues et les plantes supérieures<sup>17</sup> (Tableau 2).

Source	Glucane (nom trivial)	Structure (DB)
<b>Bactéries</b>		
<i>Agrobacterium</i> sp.	curdlane	linéaire
<b>Champignons</b>		
<i>Schizophyllum commune</i>	SPG, schizophyllane, sizofilane, sizofirane, sonifilane	1/3
<i>Sparassis crispa</i>	---	1/3
<i>Ganoderma lucidum</i>	LB-NB	2/9
	PL-3	hautement ramifié
	---	ramifié
<i>Grifola frondosa</i>	GRN, grifolane	1/3
<i>Poria cocos</i>	pachymane	faiblement ramifié
<i>Agaricus blazei</i>	---	hautement ramifié
<i>Lentinus edodes</i>	lentinane	2/5
<i>Pleurotus ostratus</i>	pleurane	¼
<i>Pleurotus tuber-regium</i>	TM8	1/3
<i>Omphalia lapidescens</i>	OL-2	2/3
<i>Boletus erythropus</i>	---	1/3
<i>Amanita muscaria</i>	AM-ASN	2/7
<i>Cryptoporus volvatus</i>	H-3-B	¼
<i>Volvariella volvacea</i>	FCAP	1/5 ou 1/6
<i>Auricularia</i> sp.	U-3-N	ramifié
<i>Sclerotium glukanicum</i> <i>Sclerotium rolfsii</i>	scléroglycane	1/3

<i>Sclerotinia scleroitum</i>	SSG	1/2
<i>Botrytis cinerea</i>	cinerean	1/3
<i>Epicoccum nigrum</i>	épigluane	2/3 ou 2/3
<i>Pestalotia</i> sp.	pestalotane	3/5
<i>Cryphonectria parasitica</i>	---	1/3
<i>Phytophthora parasitica</i>	---	ramifié
<b>Levures</b>		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PGG	ramifié
<i>Candida albicans</i>	CSBG	ramifié à un $\beta$ -(1,6) glucane ?
<b>Algues brunes</b>		
<i>Laminaria digitata</i>	laminarine, laminarane, phycarine	faiblement ramifié
<b>Algues unicellulaires</b>		
<i>Euglena gracilis</i>	paramylon	linéaire
<b>Plantes supérieures</b>		
	callose	linéaire

**Tableau 2 : Exemples des principales sources connues de  $\beta$ -(1,3)-glucanes**

Les  $\beta$ -(1,3)-glucanes peuvent intervenir comme composants structuraux ou sources d'énergie, ils peuvent aussi être synthétisés de manière ponctuelle à certains stades de croissance ou en réponse à un stimulus extérieur. Leur distribution et leur rôle physiologique mettent en évidence l'importance de ces polymères dans les domaines de l'agriculture, des biotechnologies ou de la médecine.<sup>17</sup>

### 2.1.2. Propriétés biologiques

Bien que les  $\beta$ -(1,3)-glucanes soient depuis longtemps connus pour leurs propriétés immunomodulatrices, leur mode d'action n'est pas encore clairement décrit.

Ces polysaccharides, qui peuvent participer aux mécanismes de défenses des plantes supérieures, sont également reconnus par le système immunitaire des vertébrés et des invertébrés. Chez les vertébrés, les  $\beta$ -glucanes sont reconnus exclusivement par des récepteurs situés à la surface des cellules (complement receptor 3,<sup>65, 66</sup> lactosylceramide,<sup>67</sup> scavenger receptors, Dectin-1<sup>68</sup>),<sup>69</sup> tandis que cette reconnaissance se produit essentiellement dans l'hémolymphe, par l'intermédiaire de diverses protéines (horseshoe crab factor G, gram negative binding proteins) chez les invertébrés.<sup>70, 71</sup> Dans ce paragraphe, nous nous intéresserons plus particulièrement à l'influence de ces polysaccharides sur le système immunitaire des mammifères.

Les  $\beta$ -(1,3)-glucanes sont décrits comme étant des "biological response modifiers",<sup>64</sup> autrement dit ils font partie des substances capables de modifier la réponse biologique de l'hôte en stimulant son système immunitaire. Bien que le mode d'action de ces polysaccharides soit mal connu, de nombreux articles traitant de leurs propriétés biologiques ont été publiés.

La plupart des données obtenues proviennent d'études *in vitro*. Elles ont permis de mettre en évidence les propriétés antitumorales<sup>72, 73</sup> des  $\beta$ -(1,3)-glucanes et plus précisément leur capacité à activer les macrophages,<sup>74</sup> déclencher ou augmenter la production de cytokines (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ )<sup>75-77</sup> ou d'autres substances, telles que l'oxyde nitrique.<sup>78</sup> Les  $\beta$ -(1,3)-glucanes possèdent également des propriétés antivirales. Le scléroglycane, par exemple, est capable d'inhiber la réplication des virus de l'herpès<sup>79, 80</sup> et de la rubéole.<sup>81</sup>

Des études *in vivo* ont également confirmé ces propriétés. Chez la souris, le SSG permet de lutter contre les infections à pneumocoques<sup>82</sup> et le lentinane et le SPG présentent des propriétés antitumorales.<sup>83, 84</sup> Chez le rat et le cobaye, le PGG réduit le risque d'infection dû aux staphylocoques.<sup>85, 86</sup> Le lentinane et le schizophyllane sont aussi employés pour usage clinique, au Japon, depuis 1986, dans le traitement de cancers.<sup>64</sup> Le lentinane, combiné à d'autres traitements, permet d'améliorer la durée et la qualité de vie (particulièrement l'appétit et le sommeil) de patients atteints de maladies chroniques ou de cancers avancés de l'estomac ou du colon.<sup>87, 88</sup> Le PGG permet de diminuer le taux d'infections post-opératoires.<sup>89, 90</sup>

Cependant seul les  $\beta$ -(1,3)-glucanes de faible DP sont solubles dans l'eau. Les  $\beta$ -(1,3)-glucanes insolubles sont impropres à la plupart des utilisations médicales. Pour essayer

d'améliorer la solubilité des  $\beta$ -(1,3)-glucanes, différents types de modification, tels que sulfatation, phosphorylation, ou carboxyméthylation, ont été testés.<sup>91</sup>

Les  $\beta$ -(1,3)-glucanes sulfatés ont souvent été étudiés pour leurs propriétés anticoagulantes, et pourraient éventuellement remplacer l'héparine.<sup>92, 93</sup> Mais ils présentent aussi une activité anti-VIH, à la fois *in vitro*<sup>94</sup> et *in vivo*<sup>95</sup>. Le curdlane sulfaté a fait l'objet d'études cliniques de stade I/II.<sup>96, 97</sup> Les glucanes phosphorylés permettent d'améliorer les chances de survie en cas de septicémie.<sup>98</sup> Les glucanes carboxyméthylés conservent une activité antitumorale, contre le sarcome 180<sup>99, 100</sup> ainsi que dans le cas de cancer de l'estomac, *in vitro* et *in vivo*.<sup>101</sup>

## 2.2. Les $\beta$ -(1,3)-gluco-oligosaccharides

### 2.2.1. Propriétés biologiques

Les  $\beta$ -(1,3)-gluco-oligosaccharides sont connus pour leur rôle d'éliciteurs dans les mécanismes de défense des plantes. Albersheim montra en 1984 qu'ils déclenchent la production de phytoalexines chez le soja lors d'attaques pathogènes.<sup>102, 103</sup>

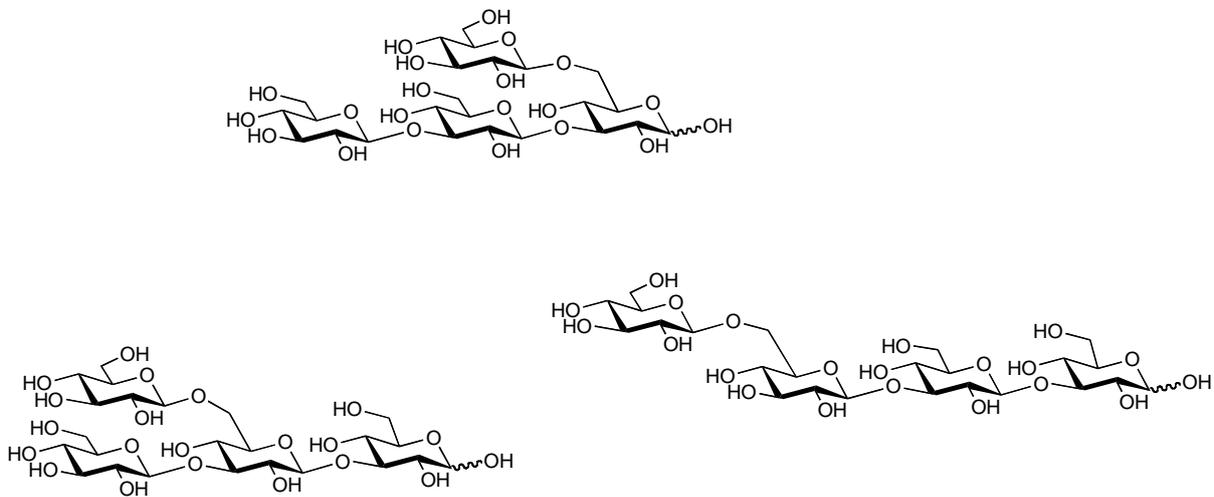
Les propriétés des  $\beta$ -(1,3)-gluco-oligosaccharides sont en revanche peu décrites chez les animaux. Les  $\beta$ -(1,3)-glucanes de faibles DP sont généralement considérés comme biologiquement inactifs, cependant quelques études récentes tendent à prouver le contraire. En 2003, Miyanishi et coll. étudièrent l'effet de  $\beta$ -(1,3)-oligosaccharides, dérivés de la laminarine, sur des monocytes humains. Ces oligosaccharides induisent la production de TNF- $\alpha$  et inhibent, indirectement, la prolifération de cellules leucémiques.<sup>104</sup> Encore plus récemment, Jamois et coll. synthétisèrent les laminaritétra- et pentaoses et comparèrent leur activité à celle de la phycarine. Ces  $\beta$ -(1,3)-oligosaccharides stimulent la phagocytose, en activant les macrophages, et de la même manière, inhibent la croissance du cancer du sein chez la souris.<sup>105</sup>

### 2.2.2. Synthèses de $\beta$ -(1,3)-gluco-oligosaccharides

Les  $\beta$ -(1,3)-glucanes ont été beaucoup étudiés, et leurs propriétés immunostimulantes prouvées à plusieurs reprises. Cependant, comme tout produit naturel, il n'est pas possible de les obtenir avec un degré de pureté de 100% ou un poids moléculaire constant. Il est donc nécessaire, pour pouvoir évaluer leurs propriétés cliniques, d'utiliser des oligosaccharides synthétiques de structure similaire.

Les synthèses chimiques de  $\beta$ -(1,3)-gluco-oligosaccharides décrites dans la littérature portent essentiellement sur deux sujets : l'obtention de l'unité de répétition de  $\beta$ -(1,3)-glucanes connus pour leur propriétés immunostimulantes ou la synthèse d'oligosaccharides éliciteurs de phytoalexines.

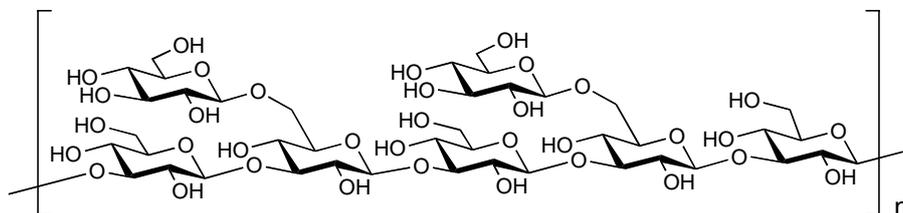
En 1986, Takeo et Tei décrivent la synthèse de trois tétrasaccharides pouvant être considérés comme l'unité de répétition du schizophyllane (Figure 12).<sup>106</sup>



**Figure 12 : Unités de répétition du schizophyllane**

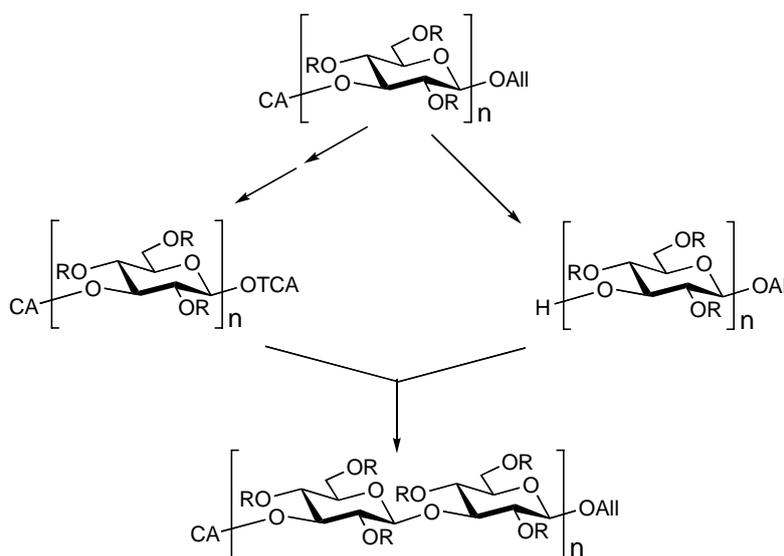
Pour obtenir ces composés, les auteurs eurent recours à plusieurs étapes de glycosylation, mettant en jeu des donneurs benzoylés ou acétylés, activés par un bromure, et des accepteurs benzoylés.

En 2000, Yang et Kong décrivent la synthèse d'un heptaglycoside d'allyle représentant l'unité de répétition du lentinane (Figure 13).<sup>107</sup>



**Figure 13 : Unité de répétition du lentinane**

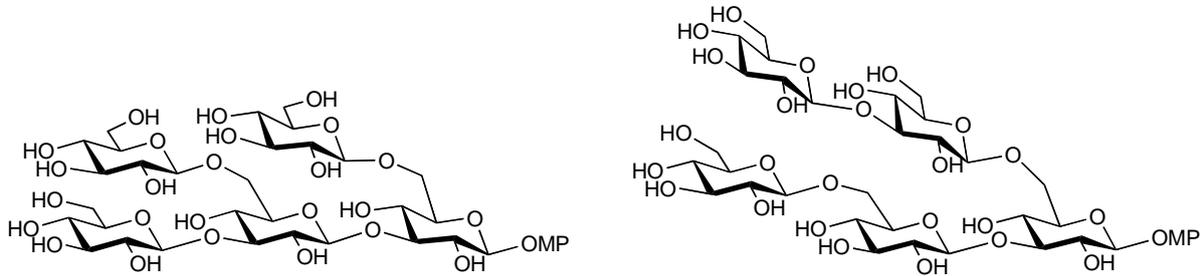
La stratégie choisie pour cette synthèse est l'emploi de composés protégés en position 3 de l'extrémité non réductrice par un groupement chloroacétyle, et en position anomère par un allyle. Ces composés peuvent devenir soit donneurs, soit accepteurs pour la glycosylation, selon la position que l'on choisit de déprotéger. Après déprotection, la position anomère est activée par un groupement imidate. Les étapes de déprotection/glycosylation peuvent ensuite être répétées jusqu'à l'obtention de l'oligosaccharide désiré (Schéma 24).



**Schéma 24 : Schématisation de la stratégie de synthèse de l'unité de répétition du lentinane**

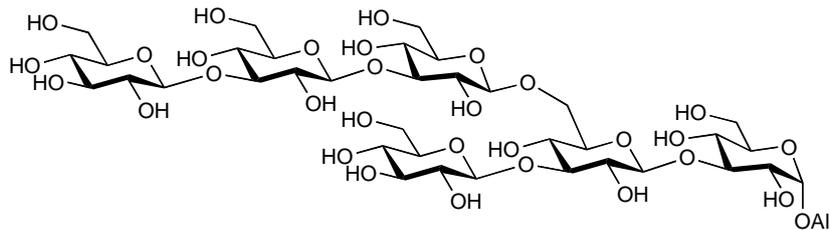
Kong et coll. décrivent ensuite, en 2003<sup>108</sup> puis en 2005,<sup>109</sup> la synthèse d'hepta- et de nonasaccharides de structure analogue à l'unité de répétition du lentinane.

En 2002, Zeng et coll. décrivent la synthèse de deux pentasaccharides, possibles unités de répétition d'un  $\beta$ -glucane du microchampignon *Epicoccum nigrum*.<sup>110</sup>



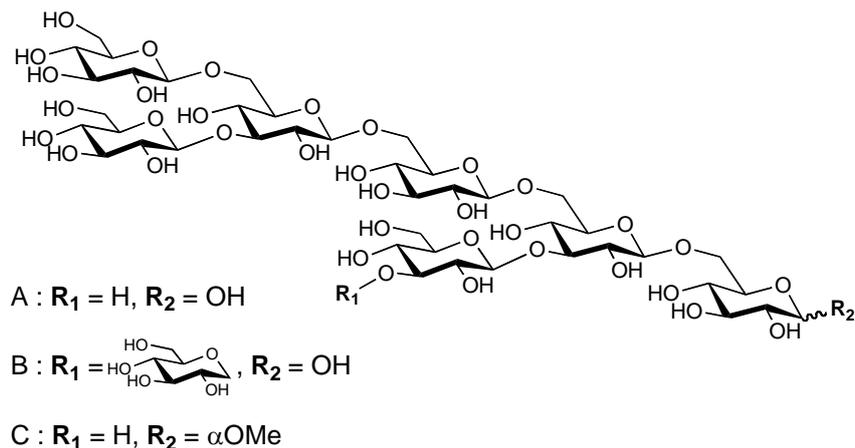
**Figure 14 : Possibles unités de répétition d'un  $\beta$ -glucane d'*Epicoccum nigrum***

Ce groupe décrit ensuite, en 2003, la synthèse d'un hexagluco-side d'allyle de structure similaire à un  $\beta$ -glucane de *Phytophthora parasitica* (Figure 15).<sup>111</sup>



**Figure 15 : Hexagluco-side dérivé d'un  $\beta$ -glucane de *Phytophthora parasitica***

En ce qui concerne la synthèse d'éliciteurs de phytoalexines, Ossowski et coll. furent les premiers à synthétiser ce type d'oligosaccharides, d'après les structures proposés par Albersheim (Figure 16, A et B).<sup>112, 113</sup>

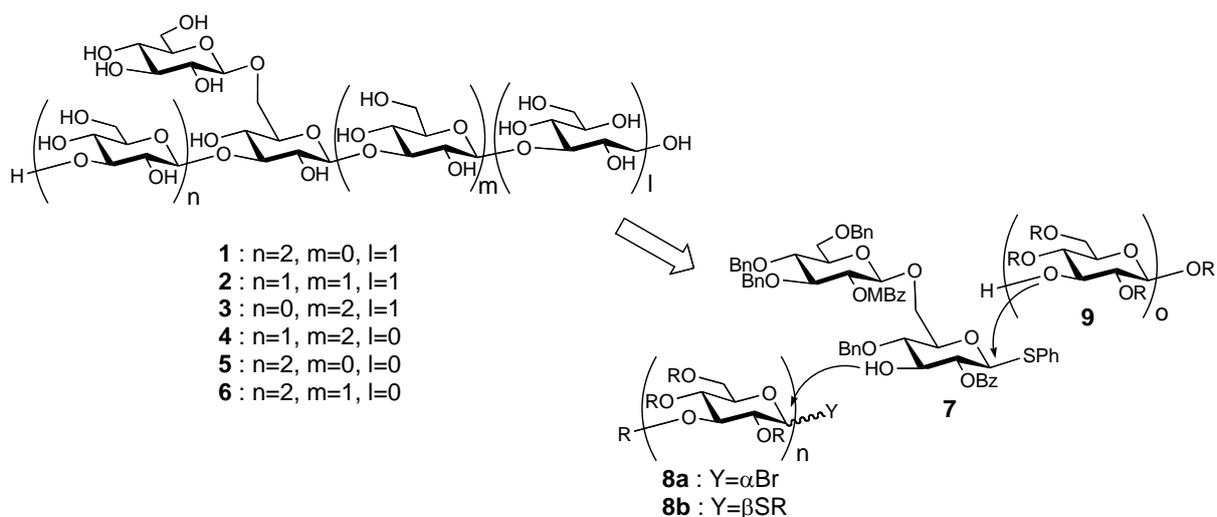


**Figure 16 : Premiers oligosaccharides proposés comme éliciteurs de phytoalexines**

Dans cette synthèse, les glycosylations, catalysées par du triflate d'argent, mettent en jeu comme donneurs des bromures de glycosyle benzoylés.

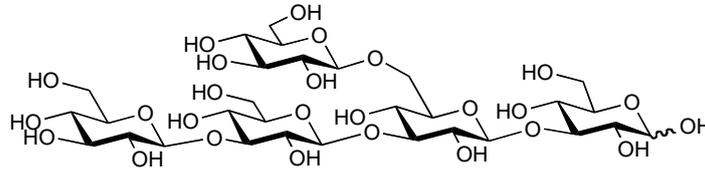
En 1993, Verduyn et coll. proposèrent la synthèse de l' $\alpha$ -glucoside de méthyle dérivé du composé décrit initialement par Albersheim (Figure 16, C).<sup>114</sup>

En 2001, Amaya et coll. synthétisèrent pour la première fois un glucitol de tétraglucosyle, éliciteur de phytoalexines, en utilisant une stratégie de glycosylation itérative (Schéma 25).<sup>115</sup>



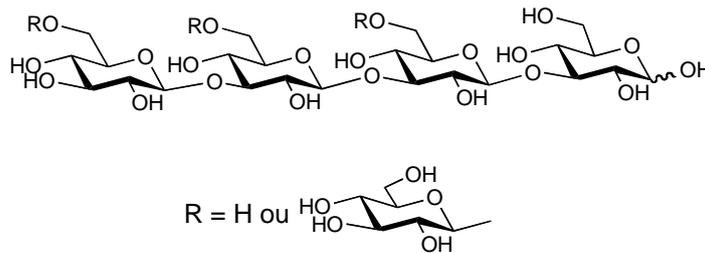
**Schéma 25 : Structure et stratégie de synthèse des éliciteurs de phytoalexines du riz**

En 2003, Egusa et coll. mirent en place la synthèse en phase solide d'un éliciteur pentasaccharidique, de *Pyricularia oryzae* (Figure 17).<sup>116</sup>



**Figure 17 : Pentasaccharide éliciteur de phytoalexine de *Pyricularia oryzae***

Également en 2003, Tanaka et coll. décrivent la synthèse d'oligosaccharides ayant en commun un squelette tétrasaccharidique  $\beta$ -(1,3)-glucane, et pouvant être mono-, di-, ou tri-ramifiés en  $\beta$ -(1,6) (Figure 18).<sup>117</sup>



**Figure 18 : Oligosaccharides ramifiés, dérivés des éliciteurs de phytoalexines du riz**

Il faut également citer, parmi les exemples de synthèses de  $\beta$ -(1,3)-oligosaccharides, les travaux de Fincher et Driguez,<sup>118</sup> déjà décrits au paragraphe 1.4.2.2 de ce chapitre à propos de l'usage des glycosynthases. Cette équipe fut en effet la première à employer une glycosynthase pour produire des  $\beta$ -(1,3)-oligosaccharides.

L'essentiel de ces synthèses décrit la préparation d'oligosaccharides ramifiés, à l'exception de Takeo et coll., qui décrivent l'obtention de  $\beta$ -laminari-oligosaccharides de méthyle,<sup>119</sup> et, plus récemment, de Jamois et coll. qui décrivent la synthèse d'oligosaccharides linéaires possédant des propriétés immunostimulantes.<sup>105</sup>

Le travail présenté dans le chapitre II de ce manuscrit porte également sur la synthèse de  $\beta$ -(1,3)-oligosaccharides linéaires.

**CHAPITRE II : SYNTHÈSE CHIMIO-  
ENZYMATIQUE DE  $\beta$ -(1,3)-GLUCO-  
OLIGOSACCHARIDES DE DP CONTRÔLE**



## 1. Introduction

Afin de mieux comprendre le mécanisme d'action des  $\beta$ -(1,3)-glucanes, d'identifier leurs récepteurs, mais également d'étudier les propriétés des  $\beta$ -(1,3)-glucanases, l'obtention de  $\beta$ -(1,3)-gluco-oligosaccharides de structure parfaitement définie est nécessaire.

Contrairement à la plupart des synthèses actuellement décrites dans la littérature (voir paragraphe 2.2.2 du Chapitre I), nous avons cherché ici à obtenir des oligosaccharides linéaires. Dans un premier temps, nous avons entrepris de synthétiser des  $\beta$ -(1,3)-oligosaccharides protégés en position anomère, ainsi qu'en position 3 de l'extrémité non réductrice, et donc, potentiellement fonctionnalisables. Le second objectif de notre travail a été l'obtention d'un substrat fluorescent pour l'étude de  $\beta$ -(1,3)-glucanases. Enfin, la particularité essentielle de ce travail est l'emploi d'une  $\beta$ -(1,3)-glucosynthase, la glycosynthase GII E231G, facilitant l'élongation de la chaîne oligosaccharidique. La production de cette glycosynthase, effectuée au laboratoire, sera décrite très brièvement avant de revenir, à la fin de ce chapitre, sur l'ensemble des travaux réalisés avec cette enzyme.

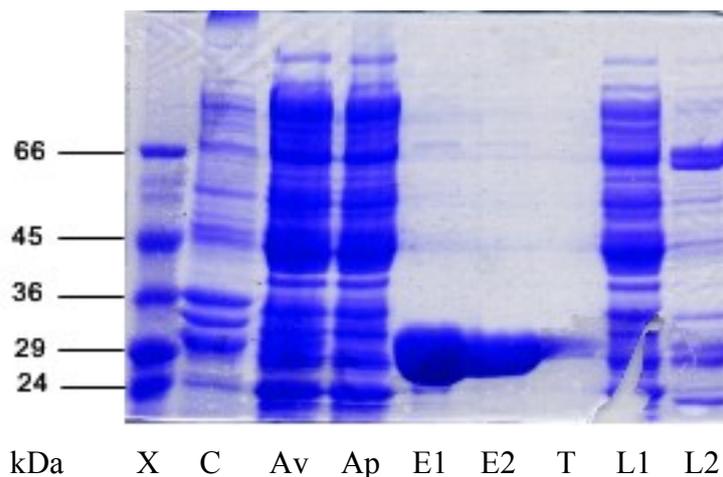
## 2. Production de la glycosynthase GII E231G

La glycosynthase utilisée lors des couplages enzymatiques est le mutant E231G de l'*endo*- $\beta$ -1,3-glucanase GII de *Hordeum vulgare* (EC 3.2.1.39) appartenant à la famille 17 des glycosides hydrolases.<sup>3</sup> Ce mutant est exprimé dans le vecteur pET 3a dans la souche BL21 (DE3) pLysS d'*Escherichia coli*. Cette souche nous a été fournie par Maria Hrmova et Geoffrey B. Fincher de l'Université d'Adélaïde, Australie.<sup>60</sup> L'enzyme a ensuite été exprimée et purifiée au laboratoire, au cours de ce travail de thèse, avec un rendement de 6 à 7 mg/L de milieu de culture.

Après lyse des bactéries et centrifugation, la protéine, présente dans le surnageant, est purifiée sur résine Ni-NTA (Figure 19).

---

<sup>3</sup> P.M. Coutinho & B. Henrissat (1999) Carbohydrate-Active Enzymes server : <http://www.cazy.org/>



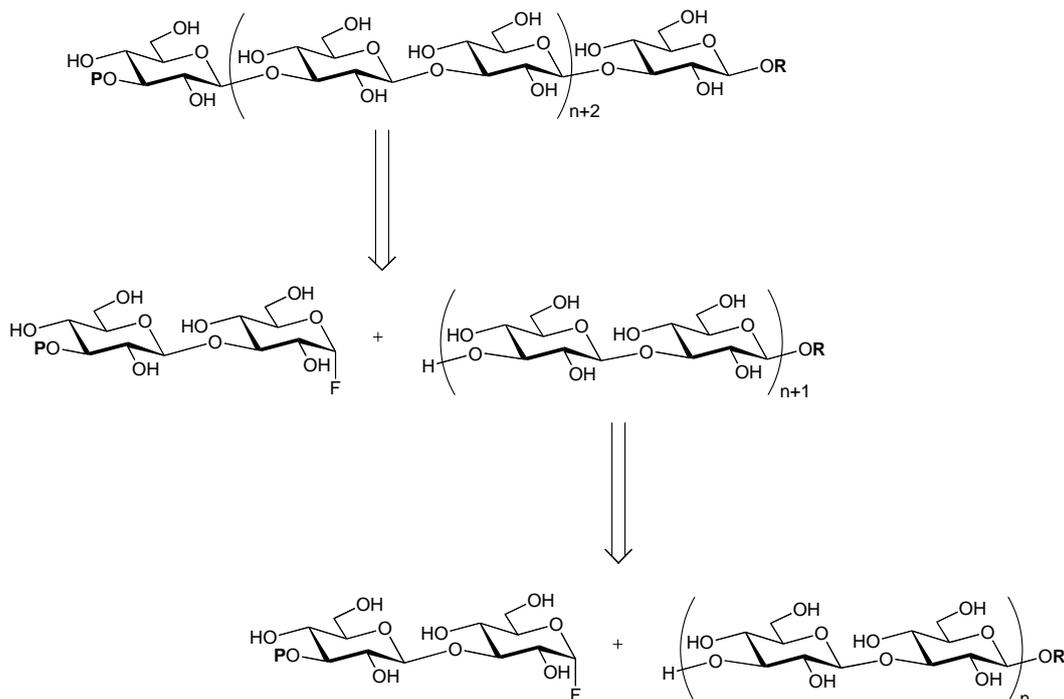
**Figure 19 : Gel SDS-PAGE de la purification de la glycosynthase GII E231G**

X : marqueur de taille, C : culot, Av : surnageant avant passage sur la résine, Ap : surnageant après passage sur la résine, E1-2 : fractions d'élution, T : témoin (GII E231G), L1-2 : fractions de lavage

### 3. Synthèse de $\beta$ -(1,3)-oligosaccharides de DP contrôlé

#### 3.1. Principe de la synthèse d'oligosaccharides de DP contrôlé

Nous avons vu au paragraphe 1.4.2 du Chapitre I, que les  $\beta$ -(1,3)-glycosynthases peuvent être utilisées dans la synthèse d'oligosaccharides de DP contrôlé.<sup>58</sup> Il suffit pour cela que le fluorure utilisé soit protégé temporairement de manière à éviter l'autocondensation. Nous avons donc envisagé d'appliquer ce principe à la synthèse de  $\beta$ -(1,3)-gluco-oligosaccharides (Schéma 26).



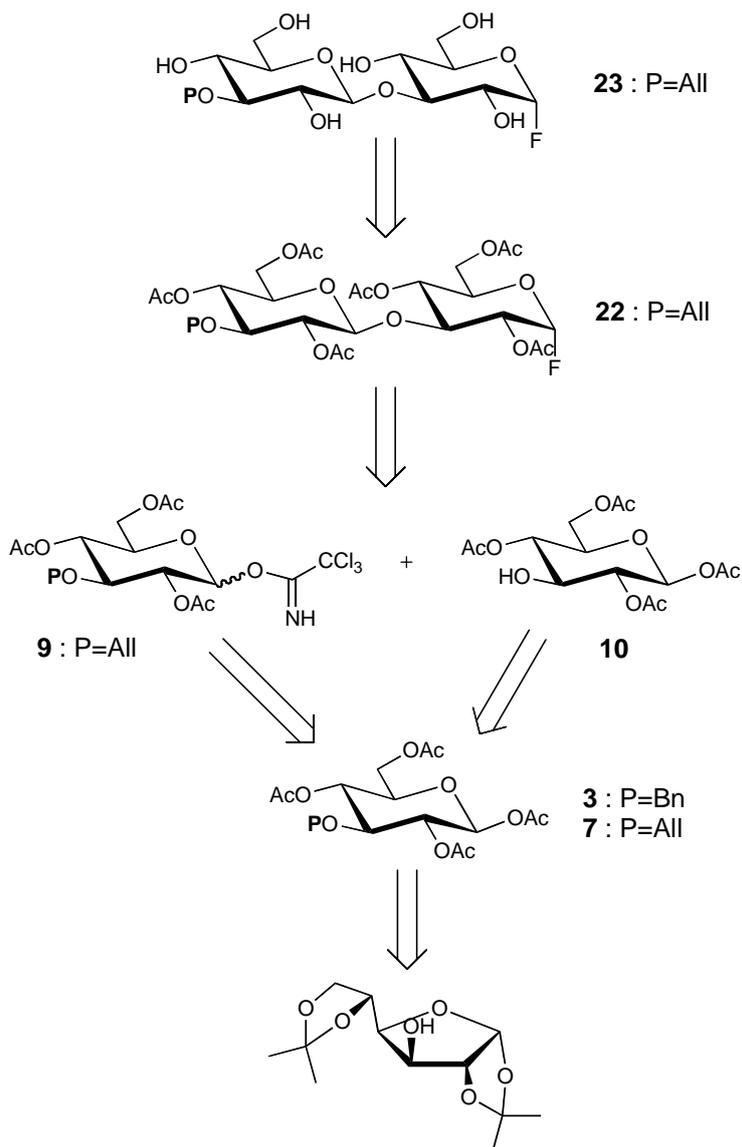
**Schéma 26 : Principe de la synthèse d'oligosaccharides de DP contrôlé**

Notre premier objectif fut de synthétiser un fluorure de laminaribiosyle protégé en position 3<sup>II</sup>. Ce synthon clé devait, dans une première étape, être couplé à un accepteur laminaribiosidique, puis, dans une succession d'étapes de déprotection/couplage, servir de "brique" à la construction des  $\beta$ -(1,3)-gluco-oligosaccharides de longueur désirée.

### 3.2. Synthèse du fluorure d' $\alpha$ -laminaribiosyle modifié en 3<sup>II</sup>

#### 3.2.1. Première approche rétrosynthétique : utilisation d'un donneur acétylé

La première étape-clé dans l'obtention du synthon cible est l'introduction du groupement protecteur en position 3<sup>II</sup>. Cette étape doit se faire avant de former le disaccharide. Le groupement choisi doit donc être résistant aux conditions de glycosylation et de fluoration et compatible avec les autres groupements protecteurs utilisés.



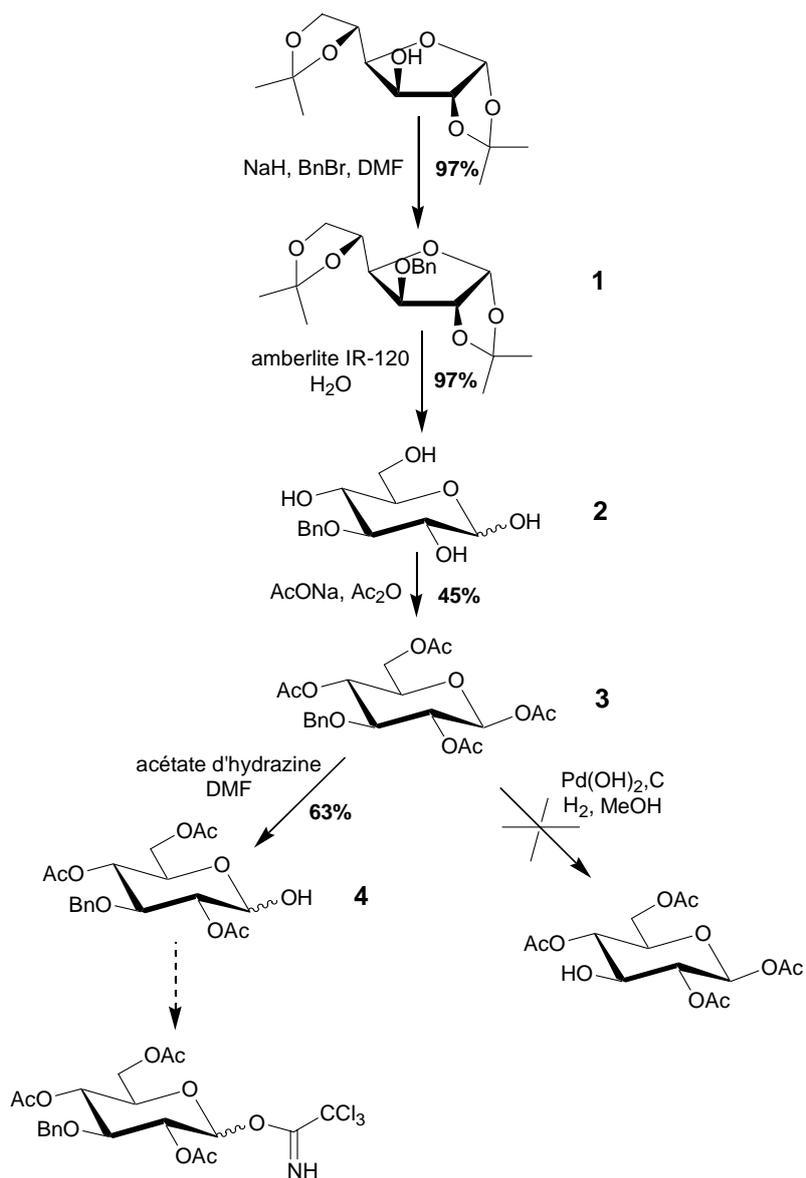
**Schéma 27 : Rétrosynthèses pour l'obtention du synthon modifié en 3<sup>II</sup>**

Dans un premier temps, deux groupements protecteurs potentiels furent envisagés : un benzyle ou un allyle. Dans les deux cas, le principe de la synthèse est le même : l'obtention d'un glucose acétylé, modifié en position 3, qui serve de précurseur à la fois au donneur et à l'accepteur de l'étape de glycosylation conduisant au laminaribiose acétylé, modifié en position 3<sup>II</sup>. Après fluoration et désacétylation du disaccharide, cette voie de synthèse devait conduire au synthon cible, un fluorure d' $\alpha$ -laminaribiosyle modifié en position 3<sup>II</sup>.

### 3.2.2. Premiers essais de synthèse du synthon modifié en 3<sup>II</sup>

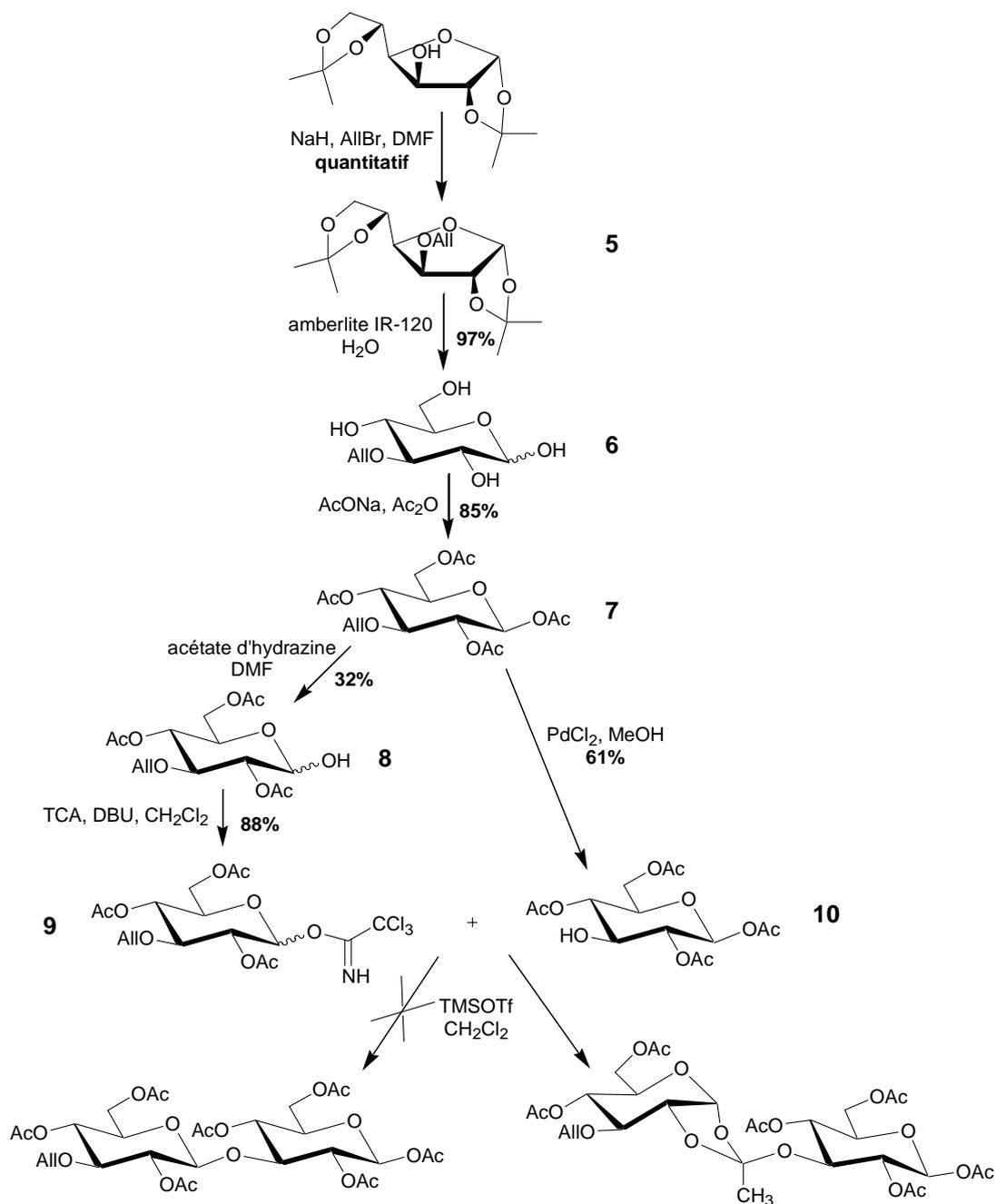
Dans les deux cas, que le groupement choisi soit un benzyle ou un allyle, le composé de départ est le diisopropylidène glucose commercial. Ce composé permet d'introduire sélectivement un groupement protecteur en position 3. Le benzyle ou l'allyle sont introduits, respectivement, à partir du bromure de benzyle ou du bromure d'allyle, en présence d'hydrure de sodium dans le diméthylformamide (DMF). Les groupements isopropylidène sont hydrolysés sous l'action de la résine Amberlite IR-120, dans l'eau,<sup>120</sup> pour conduire au composé **2**, ou **6**, de façon quasi-quantitative. Ces composés sont alors acétylés, dans l'anhydride acétique, en présence d'acétate de sodium,<sup>121</sup> afin de former les produits **3** et **7**, précurseurs à la fois du donneur et de l'accepteur de la glycosylation (Schéma 28 et Schéma 29). Le donneur s'obtient par déprotection sélective de la position anomère, sous l'action de l'acétate d'hydrazine, dans le DMF,<sup>122</sup> suivi de la formation de l'imidate par réaction avec le trichloroacétonitrile, en présence de DBU, dans le dichlorométhane anhydre.<sup>123</sup> L'accepteur s'obtient par déprotection de la position 3.

C'est à ce stade qu'un choix s'imposa finalement entre le groupement benzyle et le groupement allyle. D'une part, la déprotection du benzyle s'avéra plus problématique que celle de l'allyle. En effet, l'essai de déprotection de la position 3 du composé **3** par hydrogénolyse catalytique, en utilisant l'hydroxyde de palladium sur charbon, conduit bien à l'élimination du groupement benzyle, mais également à la désacétylation complète du composé. D'autres catalyseurs auraient pu être testés mais il semblait plus intéressant de se concentrer sur la synthèse utilisant le groupement allyle. Des problèmes furent rencontrés aussi lors de la déprotection de la position 3 du composé **7**, le groupement acétate de la position 2 migrant vers la position 3, mais ils purent être maîtrisés en limitant la durée de la réaction. D'autre part, le groupement allyle présente un avantage non négligeable sur le groupement benzyle, il peut, nous venons de le voir, être déprotégé, mais, s'il est conservé, il peut également servir à une fonctionnalisation ultérieure.



**Schéma 28 : ...en utilisant un groupement benzyle**

Ce double avantage nous conduit finalement à préférer l'allyle comme groupement protecteur de la position 3<sup>II</sup> du synthon-cible.



**Schéma 29 : ...en utilisant un groupement allyle**

Cependant, l'étape de glycosylation entre les composés **9** et **10**, catalysée par le trifluorométhanesulfonate de triméthylsilyle (TMSOTf) dans le dichlorométhane anhydre,<sup>124</sup> ne conduit pas au 3<sup>II</sup>-*O*-allyl-laminaribiose attendu (voir Schéma 29) mais à l'orthoester correspondant.

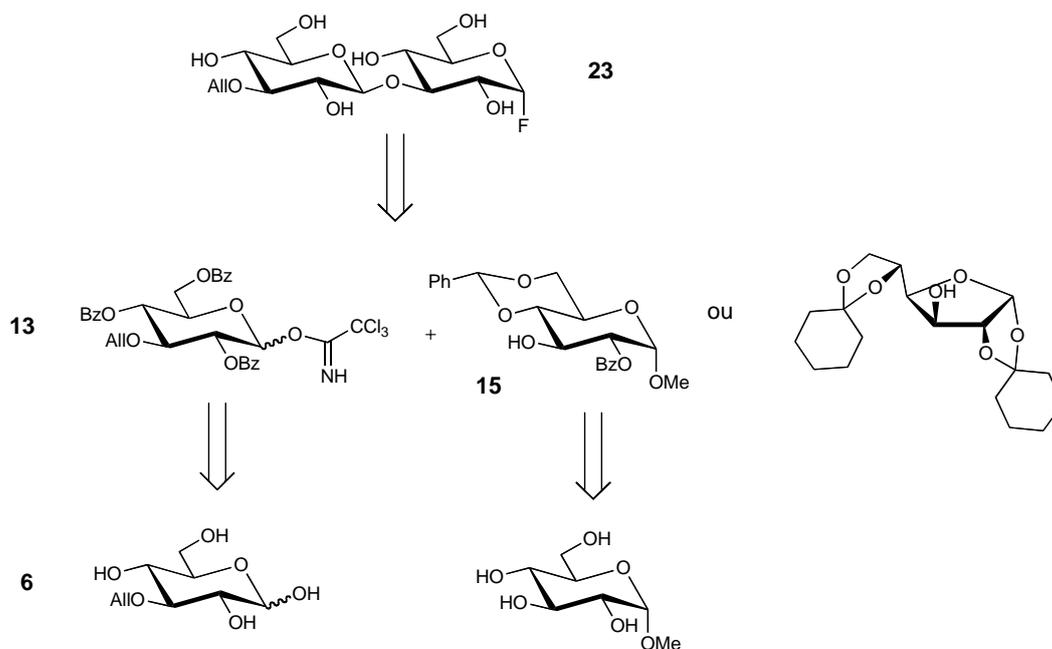
La formation de l'orthoester au lieu du disaccharide voulu est un problème fréquemment rencontré lors des réactions de glycosylation. Il est nécessaire d'envisager une autre méthode de glycosylation.

### 3.2.3. Deuxième approche rétrosynthétique : utilisation d'un donneur benzoylé

Deux voies de synthèse, utilisant un donneur benzoylé, peuvent être proposées (Schéma 30).

La première voie emploie une méthode de glycosylation déjà testée au laboratoire<sup>125</sup> avec comme accepteur le 4,6-*O*-benzylidène-2-*O*-benzoyl-glucoside de méthyle **15**. Nous avons donc décidé de synthétiser l'imidate benzoylé **13**, portant le groupement allyle en position 3. Ce composé peut être formé en partant du 3-*O*-allyl-glucose **6** décrit au paragraphe précédent. Le composé **15** est obtenu en deux étapes à partir de l' $\alpha$ -glucoside de méthyle commercial.

La seconde voie envisagée utilise comme accepteur le dicyclohexylidène glucose, ce composé commercial est décrit comme étant un bon accepteur de glycosylation pour la synthèse du laminaribiose.<sup>126</sup>



**Schéma 30 : Rétrosynthèses possibles pour l'obtention du synthon 23**

### 3.2.4. Essai de synthèse avec l'accepteur **15**

Le donneur benzoylé **13** est obtenu en trois étapes à partir de l'allyl-glucose **6**. Le composé **6** réagit avec le chlorure de benzoyle, dans la pyridine, pour donner l'allyl-glucose benzoylé **11** de façon quantitative. La position anomère est alors déprotégée sélectivement par l'action de la méthylamine, dans le THF,<sup>116</sup> avec un rendement de 86%. L'imidate **13** est finalement obtenu avec un rendement de 93%, par réaction du composé **12** avec le trichloroacétonitrile, en présence de DBU, dans le dichlorométhane.

D'autre part, l'accepteur **15** est obtenu à partir de l' $\alpha$ -glucoside de méthyle commercial. Une première étape consiste à bloquer les positions 4 et 6 de ce composé par l'action de l' $\alpha,\alpha$ -diméthoxytoluène, en présence d'acide camphorsulfonique, dans un mélange chloroforme/DMF. Le composé **14** est alors isolé, avec un rendement de 35%, par simple cristallisation dans un mélange chloroforme/hexane. La position 2 est ensuite protégée sélectivement, par addition lente de chlorure de benzoyle à  $-35^{\circ}\text{C}$ , pour conduire au donneur **15** avec un rendement de 77%.

L'étape de glycosylation s'effectue avec un excellent rendement de 83%, sous l'action du triflate de triméthylsilyle dans le dichlorométhane anhydre, pour conduire au disaccharide **16**. Après débenzoylation et hydrolyse du benzylidène, le disaccharide est acétylé. le laminaribioside **17** est obtenu avec un rendement de 92% sur les trois étapes.

Mais c'est finalement l'étape d'acétolyse, visant à enlever le groupement méthyle, qui pose problème. En effet, le groupement allyle s'est avéré sensible à l'acétolyse, il nous a été impossible de trouver des conditions dans lesquelles le méthyle soit éliminé et l'allyle conservé.

Cette voie de synthèse a donc dû être abandonnée.

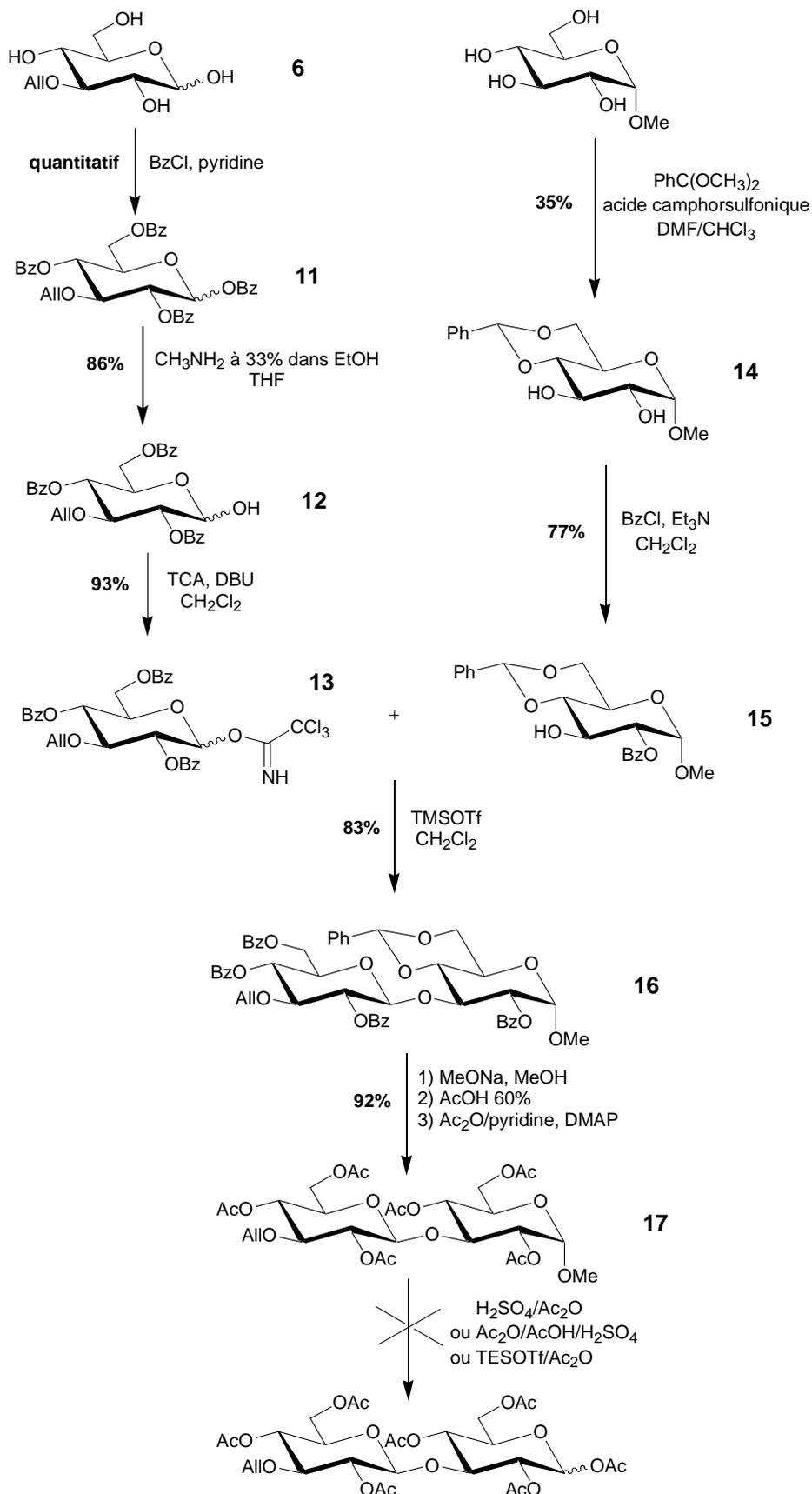


Schéma 31 : Essai de synthèse avec l'accepteur 15

### 3.2.5. Synthèse de l' $\alpha$ -fluorure de laminaribiosyle modifié **23**

La seconde possibilité de synthèse, en conservant le même donneur pour la glycosylation, l'imidate **13**, met en jeu comme accepteur le dicyclohexylidène glucose, ce qui permet d'éviter le problème rencontré avec le groupement méthyle en position anomère.

Comme pour la synthèse précédente, l'étape de glycosylation s'effectue avec un excellent rendement, en présence de triflate de triméthylsilyle dans le dichlorométhane, pour conduire au disaccharide **18**. Les groupements cyclohexylidène sont alors hydrolysés dans un mélange acide trifluoroacétique/eau. Le disaccharide **19** ainsi obtenu est débenzoylé puis acétylé pour conduire au 3<sup>II</sup>-*O*-allyl-laminaribiose **20** avec un rendement de 80%. L'allyl-laminaribiose  $\beta$ -acétate **21** est obtenu par formation de l' $\alpha$ -bromure qui réagit ensuite avec l'acétate d'argent, dans un mélange anhydride acétique/acide acétique.<sup>127</sup> Après cristallisation dans l'éthanol, l'anomère  $\beta$  pur **21** est obtenu avec un rendement de 55% sur les deux étapes. Le composé **21** peut alors être traité par un mélange HF/pyridine<sup>128</sup> pour conduire au fluorure **22** avec un rendement de 90%. L'étape finale de désacétylation, sous l'action du méthanolate de sodium dans le méthanol, conduit au fluorure-cible **23** de façon quantitative.

Le fluorure d' $\alpha$ -laminaribiosyle, modifié en position 3<sup>II</sup> ainsi obtenu peut maintenant être utilisé dans les couplages enzymatiques devant conduire à l'obtention d'oligosaccharides de  $\beta$ -(1,3)-glucanes.

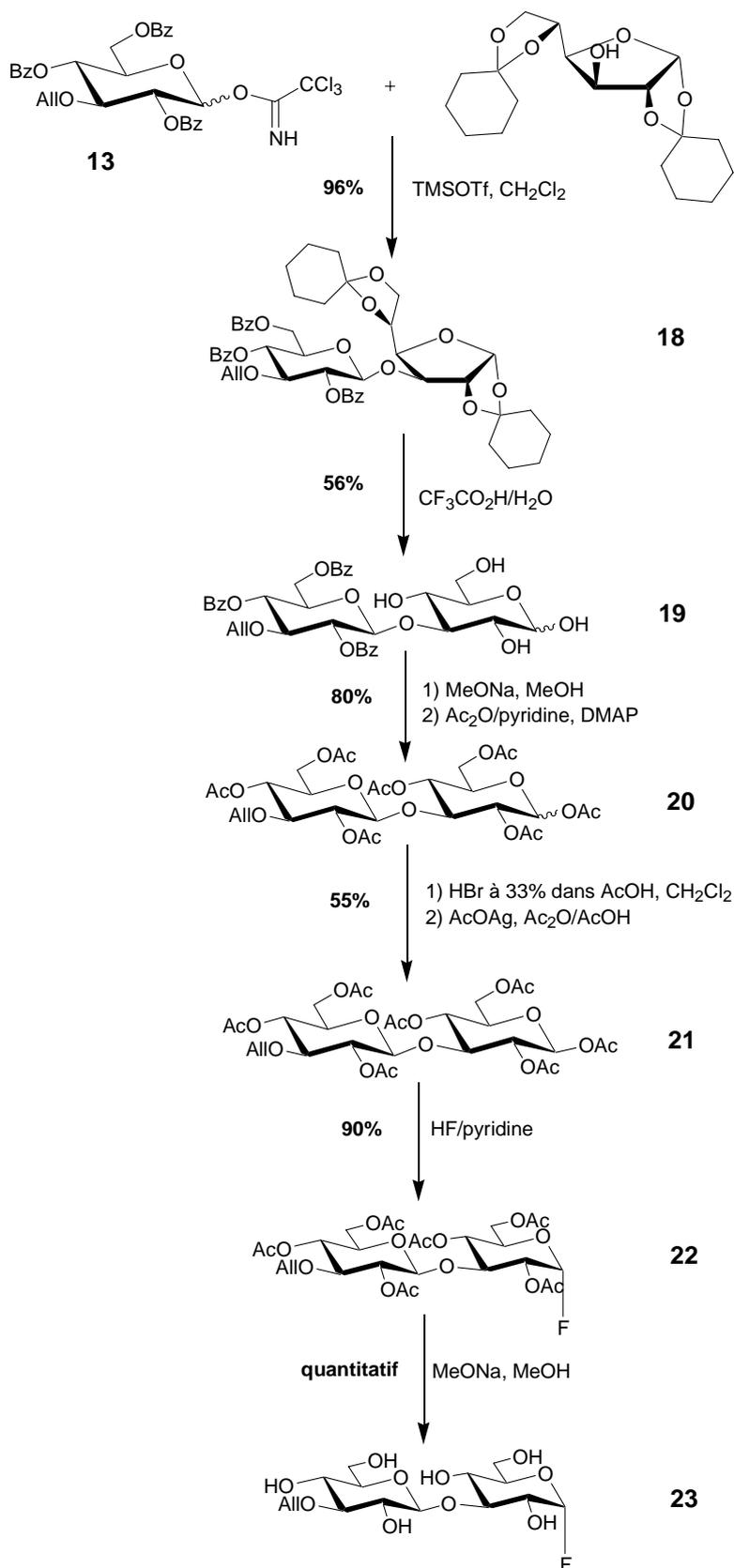


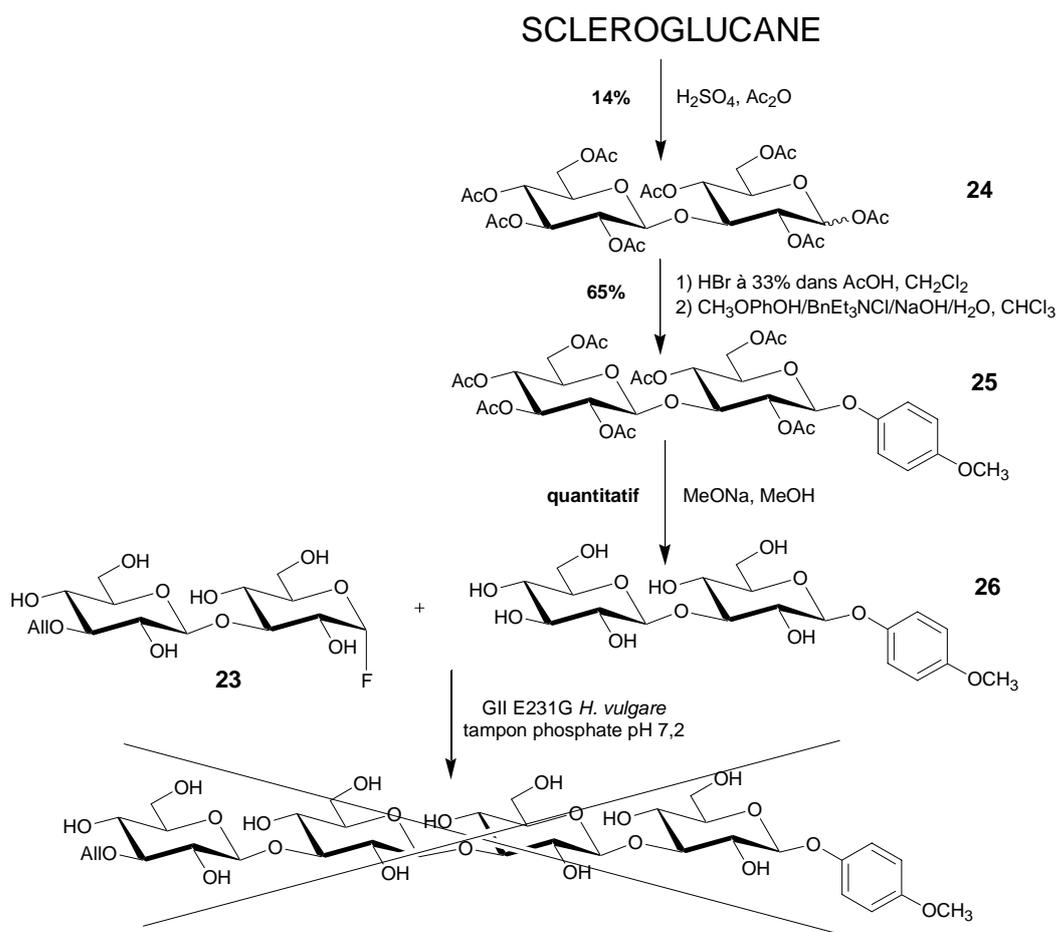
Schéma 32 : Synthèse du fluorure-cible 23

### 3.3. Couplages enzymatiques

#### 3.3.1. Couplage avec l'accepteur laminaribiosidique **26**

Le premier couplage enzymatique envisagé est la condensation du fluorure **23** sur le laminaribioside de *p*-méthoxyphényle **26**.

L'acétylolyse du sclérogucane commercial permet d'obtenir du laminaribiose peracétylé. Le disaccharide **25** est obtenu par formation de l' $\alpha$ -bromure qui réagit ensuite avec le 4-méthoxyphénol, par simple déplacement nucléophile dans des conditions de catalyse par transfert de phase.<sup>129</sup> Le laminaribioside de *p*-méthoxyphényle **25** est ainsi obtenu avec un rendement de 65% sur les deux étapes. La désacétylation du composé **25**, par le méthanolate de sodium dans le méthanol, conduit finalement à l'accepteur laminaribiosidique **26**.



**Schéma 33 : Couplage avec l'accepteur laminaribiosidique **26****

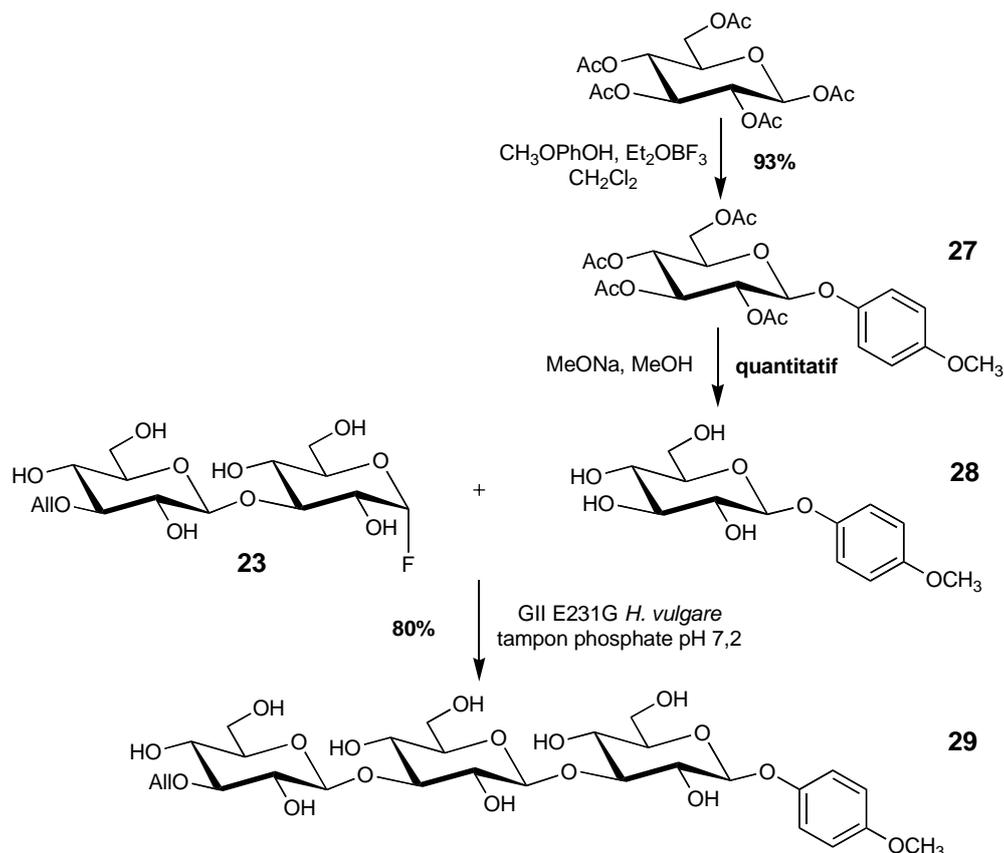
Mais, contrairement au résultat espéré, aucun produit de couplage ne se forme lorsque les disaccharides **23** et **26** sont mis en présence de la glycosynthase GII E231G. Ce problème avait été rencontré une fois auparavant avec le  $\beta$ -laminaribioside de *p*-nitrophényle (voir paragraphe 1.4.2.2 du Chapitre I).

Nous avons vu au paragraphe 1.4.2.2 du Chapitre I que la glycosynthase GII E231G couplait les fluorures de façon plus effective sur les accepteurs monosaccharidiques que sur les accepteurs disaccharidiques. Nous avons donc décidé de tester la condensation du fluorure **23** sur le glucoside **28** (Schéma 34).

### 3.3.2. Couplage avec l'accepteur glucosidique **28**

Le glucoside de *p*-méthoxyphényle **27** est synthétisé facilement à partir du  $\beta$ -glucose peracétylé, par réaction avec le 4-méthoxyphénol, en présence d'éthérate de trifluorure de bore, dans le dichlorométhane.<sup>130</sup> L'accepteur glucosidique **28** est obtenu par désacétylation du composé **27**.

Après incubation avec la glycosynthase GII E231G, le trisaccharide **29** issu de la condensation du fluorure **23** sur le glucoside **28**, est obtenu avec un rendement de 80%.



**Schéma 34 : Couplage avec l'accepteur glucosidique 28**

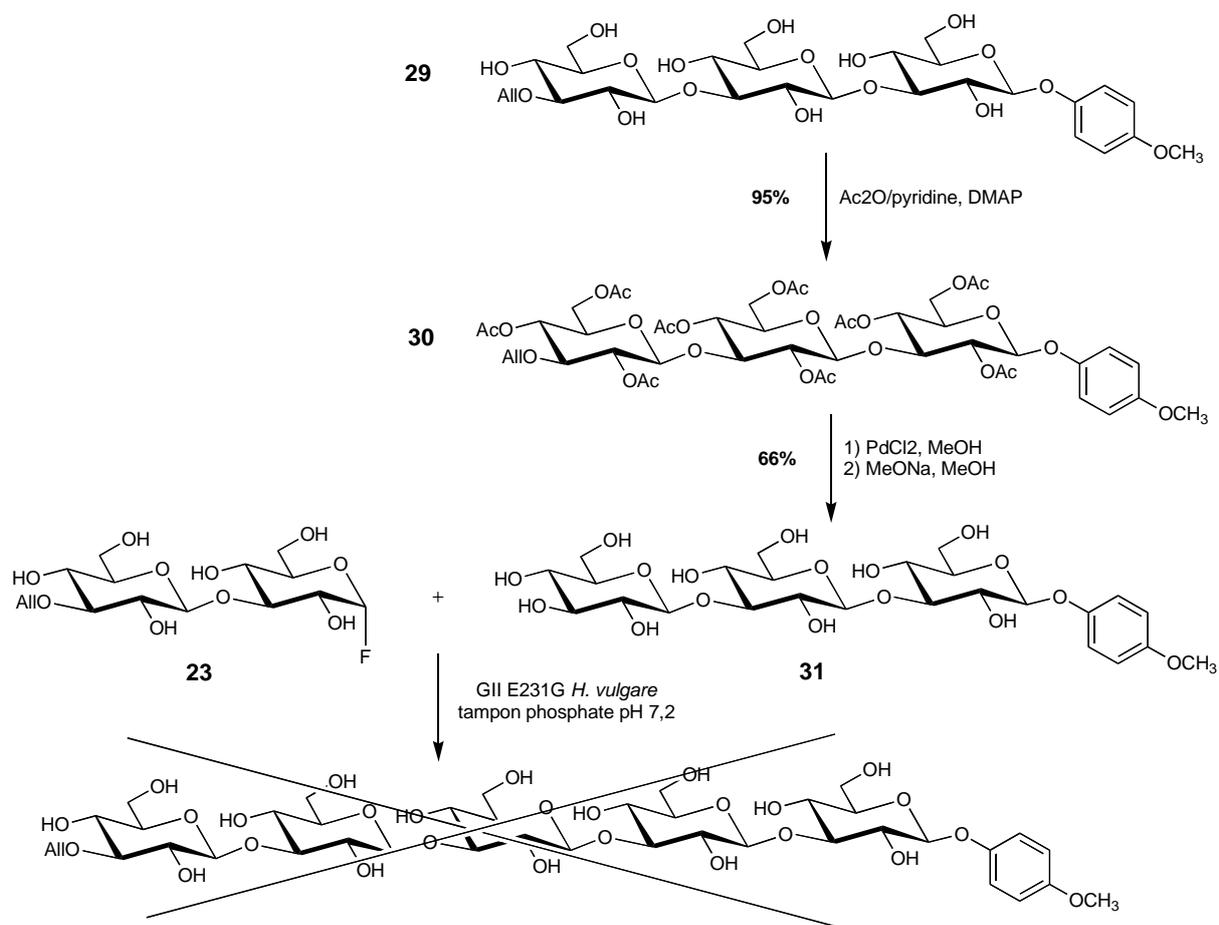
Cette expérience confirme bien que le problème dans le couplage précédent était dû au fait que l'accepteur soit un disaccharide et non un monosaccharide. En effet, le fluorure **23** est bien un bon donneur pour les réactions de couplage catalysées par la glycosynthase GII E231G.

Il est possible qu'il y ait un problème d'inhibition compétitive par l'accepteur disaccharidique au niveau des sous-sites donneurs de la glycosynthase ou un mauvais positionnement de l'accepteur dans le centre actif de l'enzyme dû à la présence du groupement méthoxyphényle.

Pour confirmer cette hypothèse, nous avons alors envisagé une tentative de couplage du fluorure **23** avec un accepteur trisaccharidique.

### 3.3.3. Couplage avec l'accepteur laminaritriosidique **31**

Après acétylation du trisaccharide **29**, dans un mélange anhydride acétique/pyridine, en présence de DMAP, avec un rendement de 95%, la position 3<sup>III</sup> du composé **30** est déprotégé par l'action du chlorure de palladium dans le méthanol. Après élimination du chlorure de palladium, le trisaccharide est désacétylé pour conduire à l'accepteur trisaccharidique **31**, avec un rendement de 66% sur les deux étapes.



**Schéma 35 : Couplage avec l'accepteur laminaritriosidique **31****

Cependant aucun produit de couplage n'est observé après incubation du fluorure **23** et de l'accepteur **31** avec la glycosynthase GII E231G.

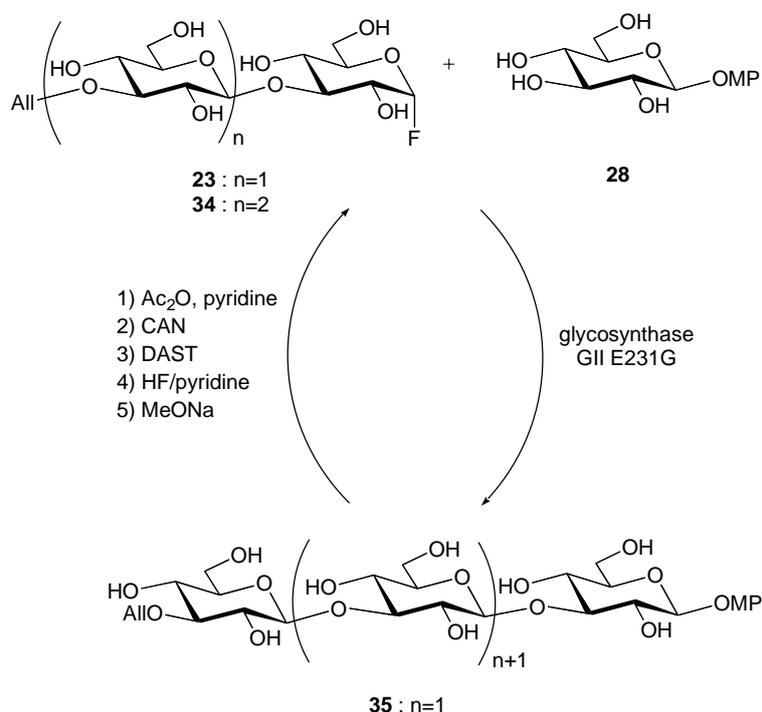
Cette observation semble bien indiquer qu'il existerait un problème de compétition entre le fluorure **23** et l'accepteur **26** ou **31** dans les sous-sites donneurs de l'enzyme.

Ce problème remet en cause le principe de la synthèse par addition d'unités disaccharidiques à l'extrémité non-réductrice. Une autre stratégie de synthèse doit être envisagée pour l'obtention de  $\beta$ -(1,3)-oligosaccharides de DP contrôlé.

### 3.4. Nouvelle stratégie de synthèse d'oligosaccharides de DP contrôlé

#### 3.4.1. Nouvelle étude rétrosynthétique

La nouvelle voie de synthèse envisagée consiste à procéder par additions successives d'unités monosaccharidiques sur l'extrémité réductrice du fluorure **23**. La position anomère de l'oligosaccharide obtenu après condensation enzymatique doit alors être fluorée, en quelques étapes de synthèse chimique, afin que cet oligosaccharide puisse être mis en jeu dans une nouvelle étape de couplage enzymatique.



**Schéma 36 : Nouvelle stratégie de synthèse d'oligosaccharides de DP contrôlé**

### 3.4.2. Synthèse chimio-enzymatique du tétrasaccharide 35

La position anomère du composé **30**, obtenu par un premier couplage enzymatique (voir paragraphe 3.3.2) puis acétylé, peut être déprotégée par le nitrate d'ammonium cérique (CAN) dans un mélange hydro-organique,<sup>131</sup> pour conduire à l'hémiacétal **32** avec un rendement de 85%. Le traitement au trifluorure de (diéthylamino)sulfure (DAST) dans le dichlorométhane,<sup>132</sup> puis l'anomérisation, dans un mélange HF/pyridine,<sup>133</sup> permettent d'obtenir l'anomère  $\alpha$  pur **33** avec un rendement de 67% sur les deux étapes. La désacétylation du fluorure **33**, par le méthanolate de sodium, conduit au donneur **34**.

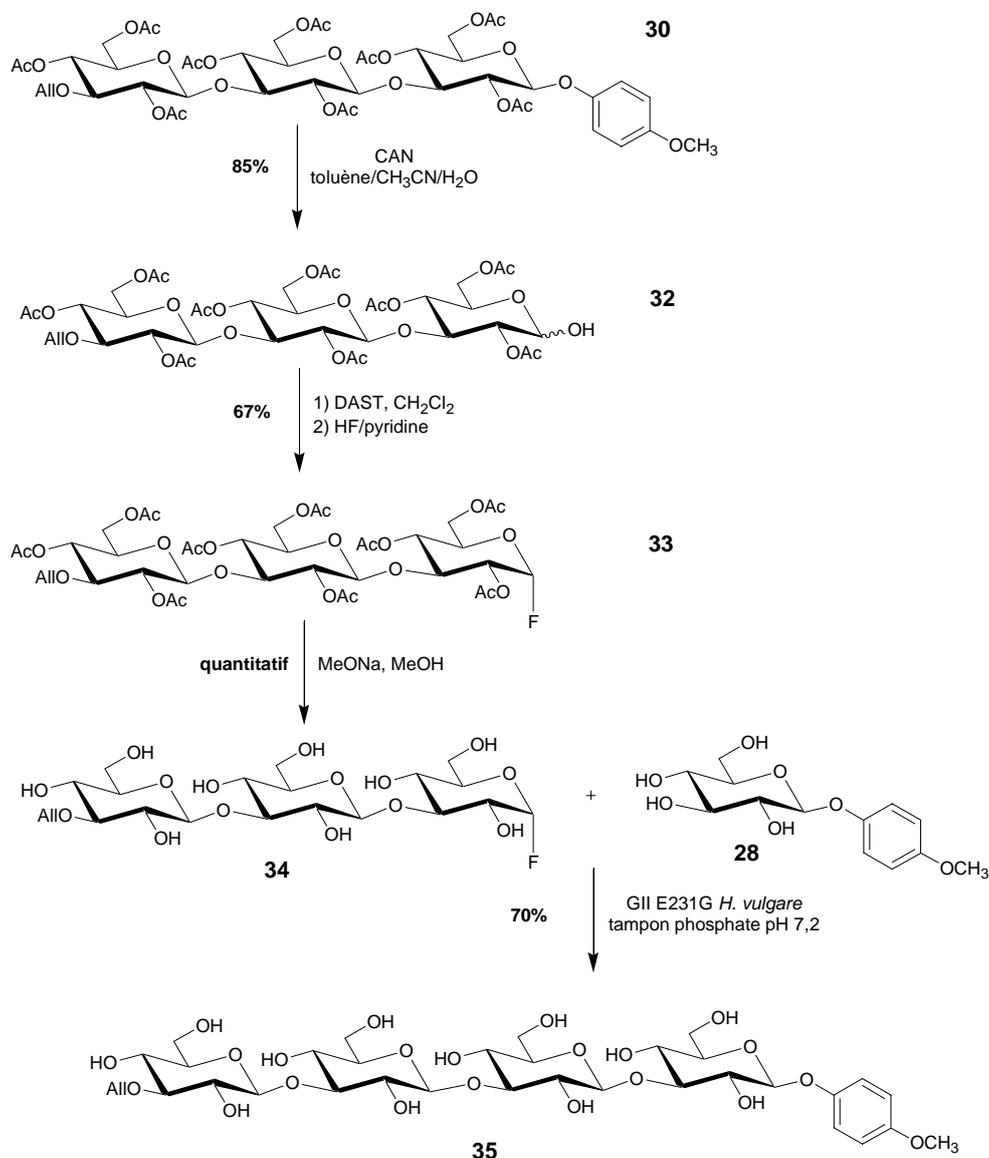


Schéma 37 : Synthèse chimio-enzymatique du tétrasaccharide 35

La condensation enzymatique, catalysée par la glycosynthase GII E231G, du fluorure **34** sur l'accepteur glucosidique **28**, permet d'obtenir le tétrasaccharide **35** avec un rendement de 70%.

Ce  $\beta$ -(1,3)-oligosaccharide peut faire l'objet d'une nouvelle élongation, en reproduisant le processus décrit ci-dessus, il est également fonctionnalisable par l'intermédiaire de la fonction allyle en position 3 de l'extrémité non-réductrice. Il est aussi possible de fonctionnaliser cet oligosaccharide du côté réducteur, soit en modifiant la position anomère, soit, au moment de la condensation enzymatique, en couplant le fluorure donneur à un glycoside différent, porteur d'une fonction d'intérêt.

La synthèse de ce composé fera l'objet d'une publication.

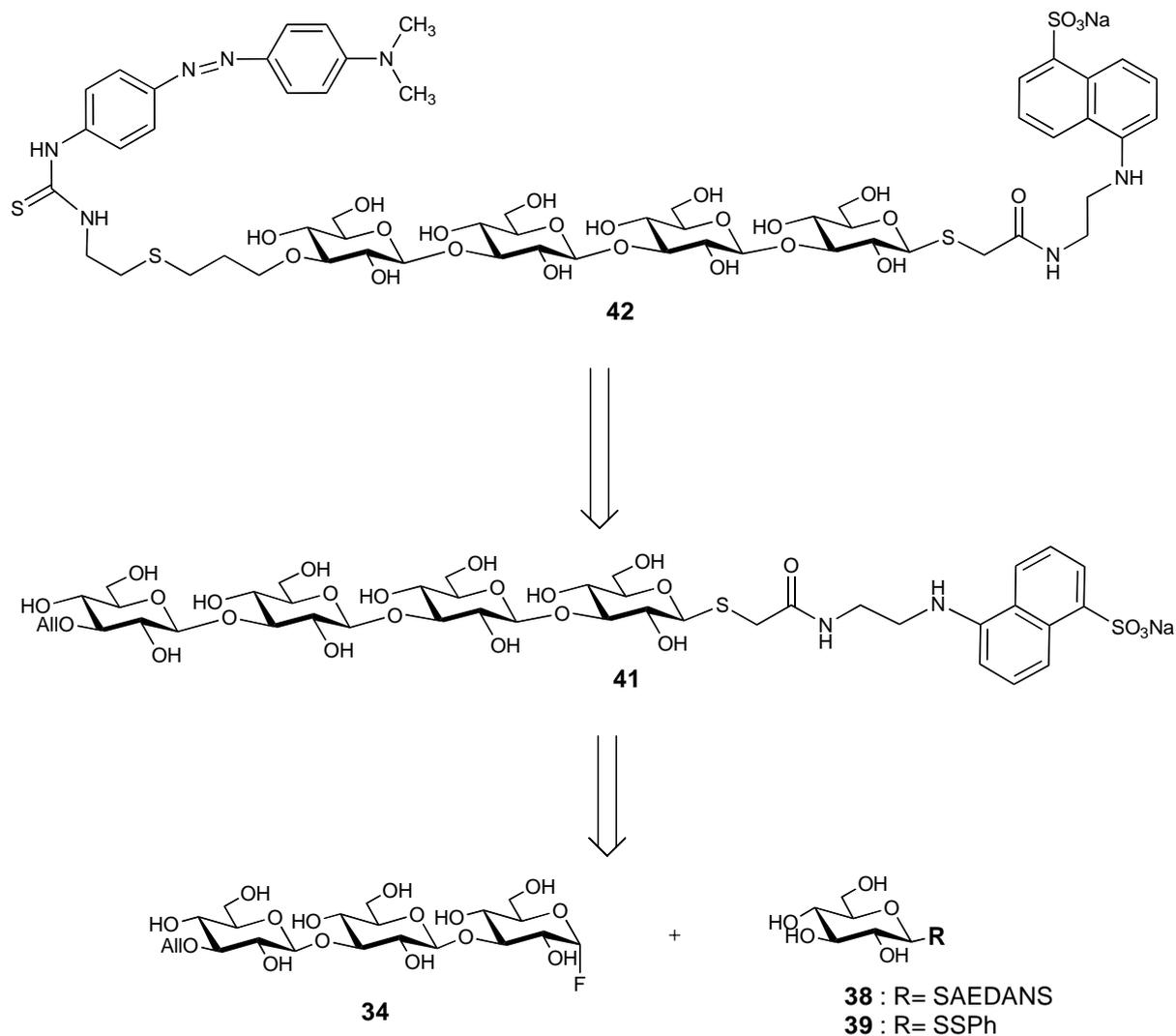
#### **4. Synthèse chimio-enzymatique d'un substrat fluorescent pour l'étude de $\beta$ -(1,3)-glucanases**

Après la synthèse de  $\beta$ -(1,3)-oligosaccharides de DP contrôlé, notre deuxième objectif fut de synthétiser un substrat pour le dosage d'activité *endo*- $\beta$ -(1,3)-glucanase. Comme nous l'avons vu au paragraphe 1.2.4 du chapitre I, l'utilisation de substrats fluorescents est une bonne méthode pour doser spécifiquement l'activité d'une enzyme.

##### **4.1. Etude rétrosynthétique**

Nous avons vu au paragraphe 3.4.2 de ce chapitre qu'il était possible de fonctionnaliser les oligosaccharides obtenus, au moment de la condensation enzymatique, en couplant le fluorure donneur à un glycoside porteur d'une fonction d'intérêt.

La voie de synthèse envisagée pour le substrat cible **42** se base donc sur le couplage du fluorure **36** avec un glucoside fonctionnalisé, afin d'introduire le fluorophore EDANS à l'extrémité réductrice de l'oligosaccharide.



*Schéma 38 : Rétrosynthèse du substrat fluorescent*

L'extrémité non réductrice doit ensuite être fonctionnalisée par le DABITC. Ce chromophore peut être greffé par couplage avec une amine, elle-même obtenue par réaction du 2-aminoéthanthiol sur le groupement allyle.

## 4.2. Synthèse du tétrasaccharide fluorescent 42

### 4.2.1. Par couplage avec le glucose-EDANS 38

Nous avons tout d'abord envisagé de coupler le donneur **34** directement sur un glucoside porteur du groupement EDANS.

Ce glucoside est obtenu en deux étapes : tout d'abord l'iodoacétamido-EDANS (IAEDANS) réagit sur le thioacétate de glucose **36**, disponible au laboratoire, en présence de diéthylamine, dans le DMF, puis le glucose-EDANS acétylé **37** ainsi obtenu est déprotégé par l'action du méthanolate de sodium dans le méthanol, pour conduire à l'accepteur **38** avec un rendement de 78%.

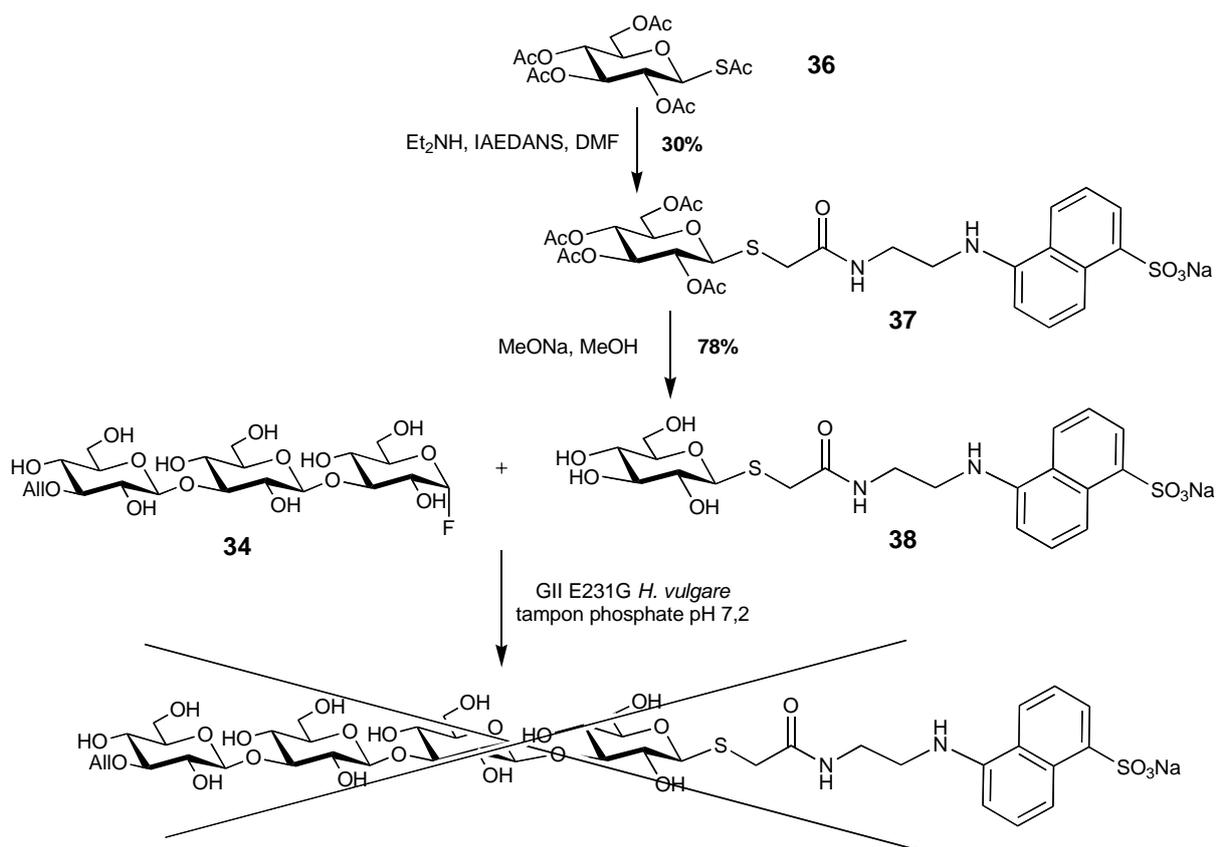


Schéma 39 : Essai de synthèse par couplage avec le glucose-EDANS 38

Cependant, après incubation du fluorure **34** avec le glucoside **38** en présence de la glycosynthase GII E231G, aucun produit de couplage n'est observé.

Le glucoside-EDANS **38** n'est donc pas un bon accepteur et il faut envisager l'emploi d'un autre glucoside, permettant l'introduction du fluorophore après l'étape de couplage enzymatique.

#### 4.2.2. Par couplage avec le disulfure **39**

C'est dans cette optique que nous avons synthétisé le disulfure **39**. Comme précédemment, cet accepteur est obtenu à partir du thioacétate de glucose **36**, qui est d'abord désacétylé par l'action du méthanolate de sodium, dans le méthanol, avant de réagir avec le benzèthiosulfonate de *S*-phényle, pour conduire au glucoside **39** avec un rendement de 74%. Le couplage du donneur **34** et de l'accepteur **39** catalysé par la glycosynthase GII E231G, conduit au tétrasaccharide **40** avec un rendement de 96%, après purification sur phase inverse. Après dissociation du pont disulfure grâce au dithiothréitol (DTT) dans le DMF, le fluorophore peut être introduit par réaction avec l'IAEDANS, en présence de triéthylamine. Le tétrasaccharide fluorescent **41** est ainsi obtenu avec un rendement de 96%.

L'ajout final du chromophore à l'extrémité non-réductrice se fait en deux étapes. Dans un premier temps, le 2-aminoéthanethiol est introduit sur le composé **41**, par addition radicalaire, initié par l' $\alpha,\alpha'$ -azodiisobutyramidine dihydrochlorydrate (V-50), dans l'eau. Le brut réactionnel est purifié rapidement, sur phase inverse, pour éliminer l'excès de 2-aminoéthanethiol et le V-50. Le composé intermédiaire, porteur de l'amine à l'extrémité non-réductrice a bien été identifié par spectrométrie de masse (ESI :  $m/z = 1104 [M-H]^+$ ). Finalement le DABITC est mis en réaction avec le dérivé aminé, en présence de carbonate de sodium, dans le DMF, pour conduire au tétrasaccharide fluorescent **42**, avec un rendement de 32% sur les deux étapes. Une synthèse à plus grande échelle du composé **42**, afin de permettre une caractérisation complète de celui-ci, est actuellement en cours.

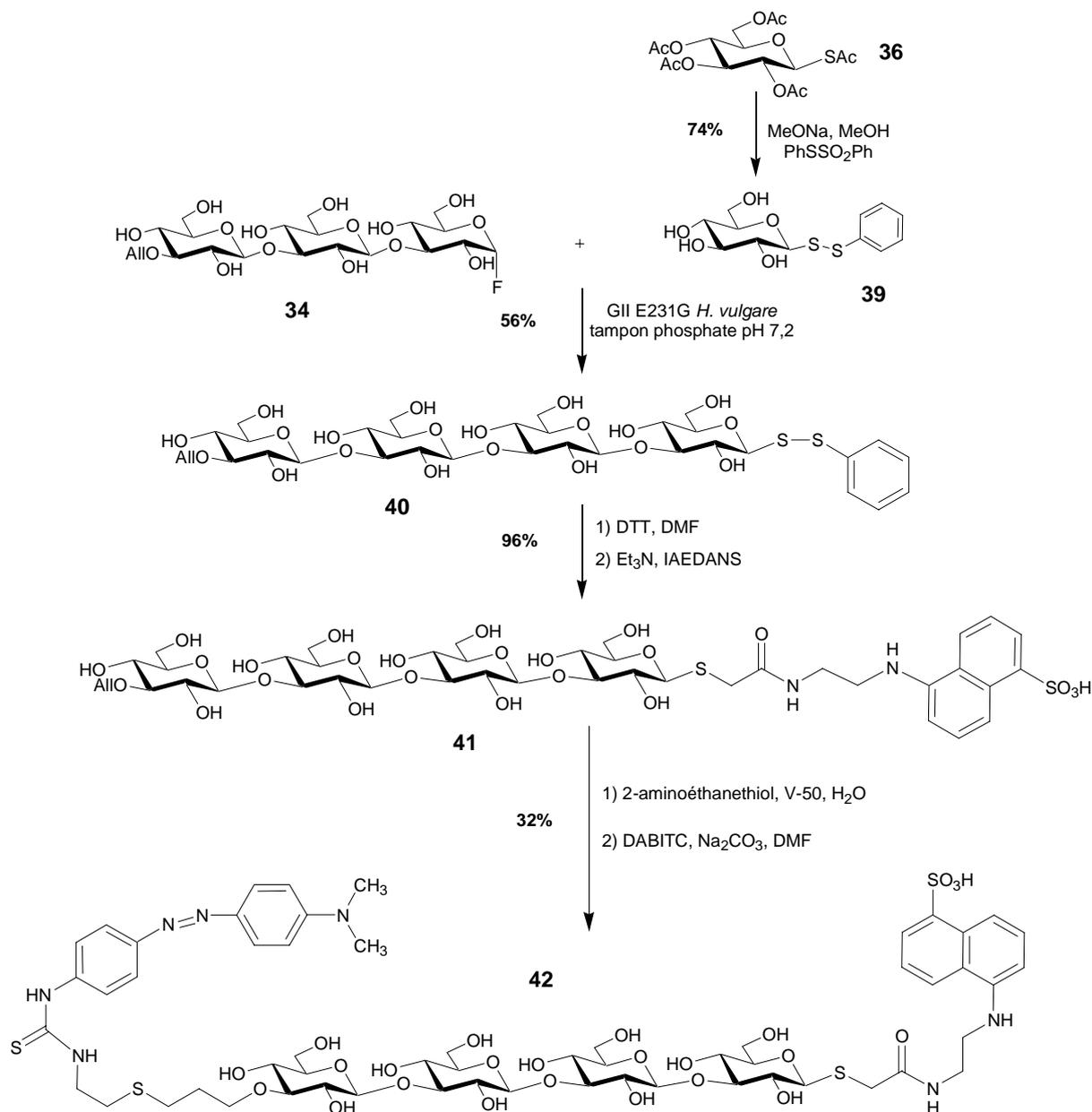


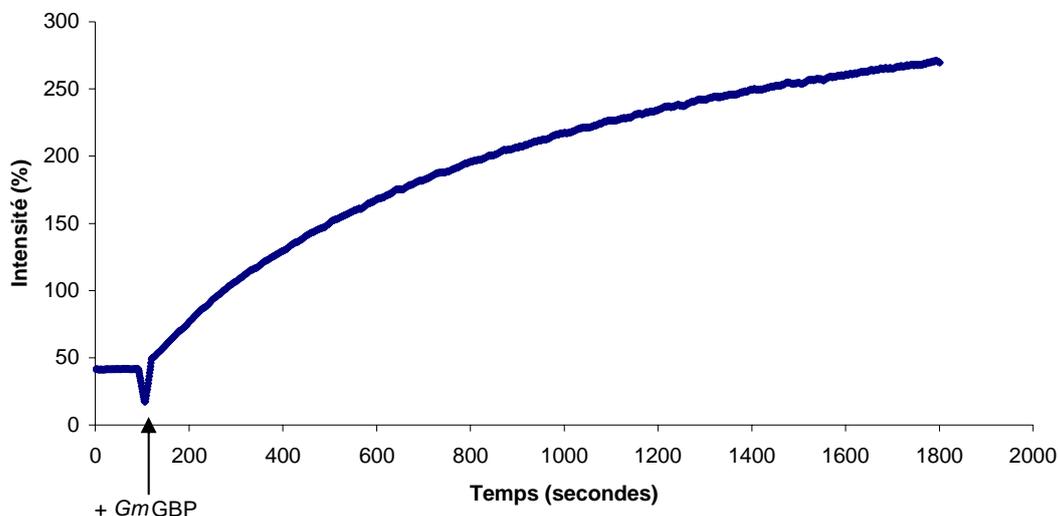
Schéma 40 : Synthèse du tétrasaccharide fluorescent

### 4.3. Etude enzymatique

Le test enzymatique suivant a été réalisé en utilisant la *GmGBP*. Cette enzyme est une  $\beta$ -glucan-binding protein, issu du soja (*Glycine max*), et présentant une activité  $\beta$ -(1,3)-glucanase. Cette enzyme sera décrite de façon plus détaillée au paragraphe 2 du Chapitre III.

Une solution du substrat **42** est placée dans la cellule du spectrofluorimètre. La valeur

de la fluorescence émise (à 470 nm) est constante et stable. Après quelques secondes, une solution de *GmGBP* est ajoutée au substrat, et la variation de fluorescence est enregistrée.



**Figure 20 : Suivi de l'hydrolyse du tétrasaccharide 42 par la *GmGBP***

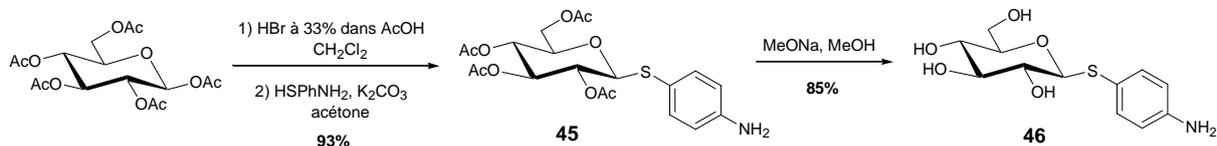
Comme espéré, l'ajout d'enzyme provoque une augmentation de la fluorescence (à 470 nm), due à l'hydrolyse du substrat par la *GmGBP*.

Le substrat fluorescent **42** devrait donc pouvoir être utilisé avec succès pour le dosage spécifique d'activité *endo*- $\beta$ -(1,3)-glucanase.

## **5. Rationalisation des résultats obtenus avec la glycosynthase GII E231**

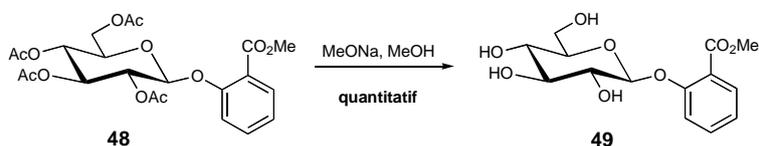
Afin de compléter les premiers travaux sur la glycosynthase GII E231G (présenté au paragraphe 1.4.2.2 du Chapitre I) et de confirmer nos hypothèses concernant la préférence de l'enzyme pour les accepteurs monosaccharidiques, différents donneurs et accepteurs potentiels ont été testés (Tableau 3).

### 5.1. Synthèse des glucosides 46 et 49



*Schéma 41 : Synthèse du glucoside 46*

Le  $\beta$ -glucose peracétylé commercial réagit avec le bromure d'hydrogène, pour former le bromure d' $\alpha$ -glucosyle et permettre l'introduction du 4-aminothiophényle sur la position anomère, afin de former le  $\beta$ -thioglucoside **45** avec un rendement de 93% sur les deux étapes. Ce composé est alors désacétylé dans les conditions classiques pour conduire au thioglucoside **46**. Le  $\beta$ -thioglucoside de 4-aminothiophényle **46** n'est pas obtenu avec un rendement quantitatif car la résine Amberlite IR-120, employée pour neutraliser le milieu réactionnel, retient une partie du produit à cause de l'interaction avec l'amine.



*Schéma 42 : Synthèse du glucoside 49*

Le glucoside **49** est obtenu par désacétylation quantitative du composé **48** disponible au laboratoire.

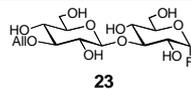
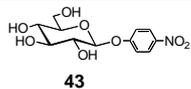
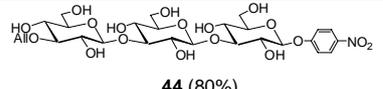
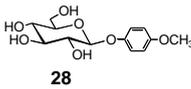
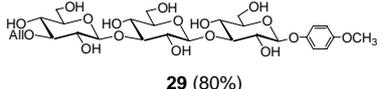
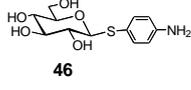
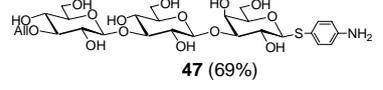
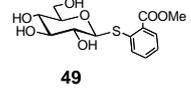
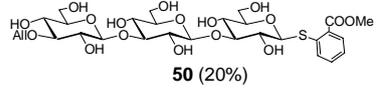
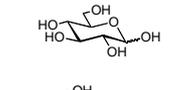
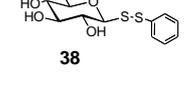
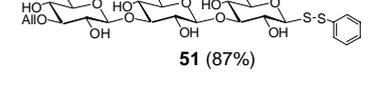
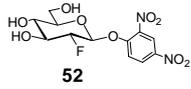
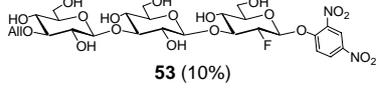
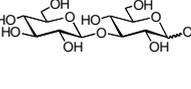
### 5.2. Donneurs et accepteurs de la glycosynthase GII E231G

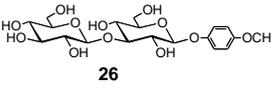
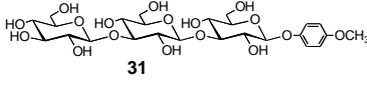
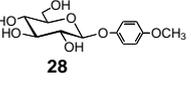
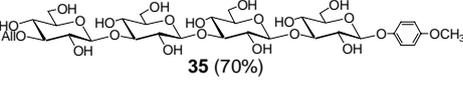
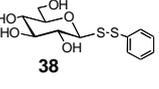
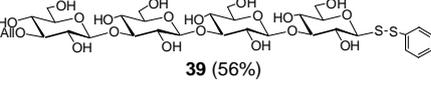
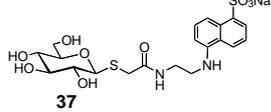
Le fluorure d' $\alpha$ -laminaribiosyle **23**, porteur du groupement allyle en position 3<sup>II</sup>, a été mis en présence de différents accepteurs monosaccharidiques, et incubé avec la glycosynthase GII E231G (Tableau 3, Entrées 1 à 7). Dans la plupart des cas, le produit attendu se forme, sauf avec le glucose ou aucun produit de couplage n'est observé. Le composé commercial **52**

(Entrée 7) est un accepteur potentiel particulièrement intéressant car les composés de ce type, porteurs d'un fluorure en position 2, sont connus pour leur rôle d'inhibiteurs de glucosidases.<sup>134-136</sup> Malheureusement, le couplage avec le donneur **23**, conduisant au trisaccharide **53**, inhibiteur potentiel de  $\beta$ -(1,3)-glucanases, s'effectue avec un rendement très faible.

Les couplages avec les accepteurs **43**, **28**, **46** et **38**, s'effectuent avec de très bons rendements, allant de 69 à 87%. En revanche, le rendement du couplage avec l'accepteur **49** est sensiblement plus faible (20%). Ce résultat et celui du couplage avec le composé **52** suggèrent que la présence d'un groupement en *ortho* sur le phényle (composés **49** et **52**) serait défavorable au couplage, par rapport à la présence d'un groupement en position *para* (glucosides **43**, **28** et **46**) ou à l'absence de groupement (composé **38**).

Aucun essai de couplage avec un di- ou trisaccharide n'a conduit à un résultat positif. Comme proposé au paragraphe 3.3 de ce chapitre, il est possible qu'il existe un problème de compétition entre le fluorure **23** et les accepteurs di- ou trisaccharidiques dans les sous-sites donneurs de l'enzyme.

Entrée	Donneur	Accepteur	Produit obtenu (rendement)
1	 <b>23</b>	 <b>43</b>	 <b>44</b> (80%)
2	<b>23</b>	 <b>28</b>	 <b>29</b> (80%)
3	<b>23</b>	 <b>46</b>	 <b>47</b> (69%)
4	<b>23</b>	 <b>49</b>	 <b>50</b> (20%)
5	<b>23</b>	 <b>38</b>	aucun
6	<b>23</b>	 <b>38</b>	 <b>51</b> (87%)
7	<b>23</b>	 <b>52</b>	 <b>53</b> (10%)
8	<b>23</b>	 <b>38</b>	aucun

9	23		aucun
10	23		aucun
11	34		
12	34		
13	34		aucun

**Tableau 3 : Donneurs et accepteurs de la glycosynthase GII E231G**

Les accepteurs **28** et **38** ont pu être couplés avec le fluorure trisaccharidique **34** avec des rendements presque aussi élevés que ceux des couplages avec le disaccharide **23**. En revanche, comme nous l'avons vu au paragraphe 4.2.1 de ce chapitre, aucun couplage de se produit avec le glucose-EDANS **37**.

Il est probable qu'une interaction hydrophobe, entre le sous-site +2 et les glucosides d'aryle **28**, **38**, **43** et **46**, permette leur fixation dans le site accepteur avec une bonne affinité. La présence d'un substituant en *ortho* sur l'aryle est défavorable, et cette interaction hydrophobe ne peut être mise en jeu pour le glucose et le dérivé **37**.

Ces derniers résultats, ajoutés à ceux de la littérature, permettent de préciser la spécificité de la glycosynthase GII E231G, en particulier vis-à-vis des accepteurs possibles pour cette enzyme.



# **CHAPITRE III : LES $\beta$ -GLUCAN- BINDING PROTEINS (GBPs)**



## 1. Introduction

Le travail présenté dans ce chapitre a été effectué à l'Institut botanique de l'Université Ludwig-Maximilians (LMU, Munich, Allemagne) dans le cadre du programme européen de recherche SACC-SIG-NET (Projet n°HPRN-CT-2202-00251) portant sur les oligosaccharides agissant comme molécule-signal chez les plantes.

Une première partie de ce travail, effectué au sein de l'équipe Biochimie et Phytopathologie, en collaboration avec le Dr. J. Fliegmann et sous la direction du Pr. J. Ebel, porte sur l'expression et la purification de la GBP de *Glycine max*. Seule l'étude par RMN  $^1\text{H}$  du mécanisme d'action de cette enzyme a été effectué au CERMAV.

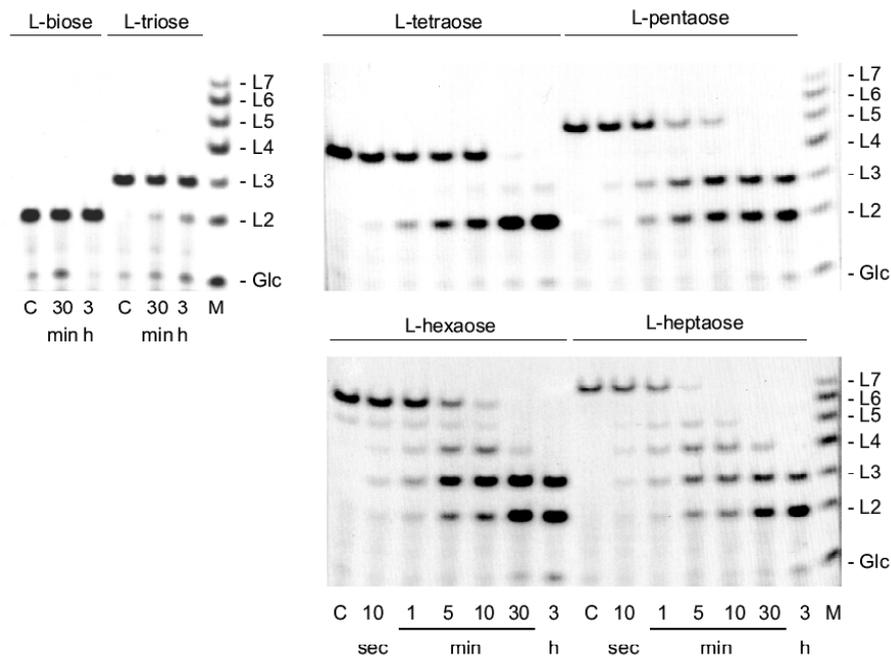
La deuxième partie de ce travail, effectué au LMU, porte sur le clonage d'une famille de gènes de *Medicago truncatula* codant probablement pour plusieurs enzymes de type GBP.

## 2. La glucan-binding protein de *Glycine max* (soja)

Il a été démontré que la glucan-binding protein du soja (*GmGBP*) possédait une double activité : la reconnaissance spécifique et la fixation de l'éliciteur heptaglycoside  $\beta$ -(1,6)-ramifié  $\beta$ -(1,3) d'une part,<sup>26</sup> et l'hydrolyse des  $\beta$ -(1,3)-glucanes linéaires d'autre part.<sup>33</sup>

### 2.1. Spécificité de la *GmGBP* recombinante

Pour mieux caractériser les propriétés enzymatiques de la *GmGBP*, comme la vitesse d'hydrolyse de différents  $\beta$ -(1,3)-oligosaccharides, une GBP recombinante produite dans des cellules d'insectes a été utilisée (Figure 21).



**Figure 21 : Hydrolyse de  $\beta$ -(1,3)-oligosaccharides par la GmGBP recombinante**

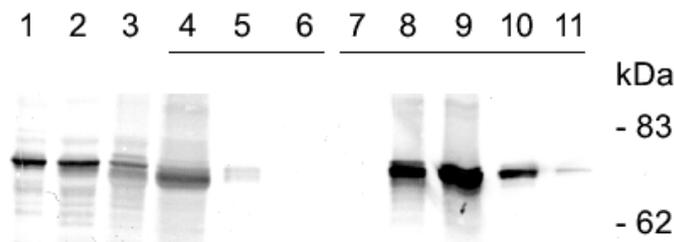
Des laminari-oligosaccharides de différentes tailles ont été incubés avec un extrait de protéines solubles, dérivé des cellules d'insectes infectées (*Sf9:GmGbp*) durant les temps indiqués. Les produits de réaction et standards (M) ont été dérivatisés par le fluorochrome chargé ANTS, puis séparés sur gel polyacrylamide et observés sous lumière UV (360 nm). Pour les contrôles (C), un extrait de protéines solubles, dérivé des cellules d'insectes non-infectées (*Sf9:wt-virus*), a été incubé 3h avec les différents oligosaccharides. Les substrats et standards utilisés sont : le laminaribiose (L-biose, L2), le laminaritriose (L-triose, L3), le laminaritétrase (L-tetraose, L4), le laminaripentaose (L-pentaose, L5), le laminarihexaose (L-hexaose, L6), le laminariheptaose (L-heptaose, L7) et le glucose (uniquement comme standard, Glc).

Le laminaritétrase est le motif minimum pouvant être efficacement hydrolysé par la *GmGBP*. L'hydrolyse du laminaripentaose conduit aux dimère et trimère. L'hydrolyse des laminarihexaose et -heptaose passe par les intermédiaires tétramériques ou tétra- et pentamériques, respectivement, pour conduire à nouveau aux laminaribiose et -triose uniquement. Aucune libération de glucose n'a été observée.

Dans leur ensemble, ces données indiquent un mode d'attaque du substrat par la *GmGBP* de type *endo*. Le suivi par spectrofluorométrie de l'hydrolyse catalysée par la *GmGBP*, présenté au paragraphe 4.3 du Chapitre II, confirme bien que cette enzyme est une *endo*- $\beta$ -(1,3)-glucanase.

## 2.2. Expression et purification de la GBP de *Glycine max* "CBP-tagged"

De plus amples études des propriétés enzymatiques de la *Gm*GBP nécessitent sa purification. Afin de bénéficier d'un système de production plus simple et plus rapide dans un hôte eucaryote, la *Gm*GBP a été exprimée dans une levure, *Saccharomyces cerevisiae*. Le plasmide conçu apporte différentes caractéristiques à la protéine recombinante : du côté N-terminal, un peptide permettant la myristoylation et, après acylation *in vivo*, la fixation de la protéine à la membrane plasmique<sup>137</sup> et du côté C-terminal, un "calmodulin-binding peptide" (CBP) séparé de la protéine cible par un site de coupure par une TEV-protéase, du type de ceux présents dans les vecteurs TAP-tag.<sup>138</sup> Ces caractéristiques ont été choisies après observation du fait que la quantité de *Gm*GBP recombinante obtenue est toujours plus élevée si le peptide-signal Myr est présent du côté N-terminal (J. Fliegmann, LMU-Munich, résultats non-publiés). Le fractionnement des extraits de levure exprimant soit la fusion Myr-GBP/TEV/CBP soit la version sans signal de myristoylation, mène dans les deux cas à la récupération de la *Gm*GBP, à la fois dans les fractions microsomales et solubles. La méthode de purification<sup>5</sup> permet d'obtenir des fractions assez pures, contenant seulement des traces de contamination par d'autres protéines (Figure 22).



**Figure 22 : Purification de la *Gm*GBP-"CBP-tagged"**

Les fractions ont été déposées sur gel SDS-polyacrylamide à 10% (coloré à l'argent) dans l'ordre suivant : 1, fraction microsomale; 2, lysat; 3, fraction précipitée avec 35-75% de sulfate d'ammonium ; 4, après passage sur la résine d'affinité ; 5, fraction de lavage 9 ; 6 à 10, fractions d'élution 1 à 5. 3  $\mu$ g de protéine ou 10  $\mu$ L de fraction ont été déposés sur les colonnes 1 à 4 et 5 à 10, respectivement. Les emplacements des protéines du marqueur de taille sont notés à droite.

Les mesures de la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ), d'affinité pour le substrat, de la protéine purifiée et de la GBP endogène du soja, donnent des valeurs proches, respectivement 39 et 49  $\mu$ g/mL de laminarine. Ce résultat montre qu'il n'est pas nécessaire d'éliminer la queue CBP pour conserver les propriétés de la *Gm*GBP sauvage. Pour

comparaison, les valeurs de  $K_m$  de la *Gm*GBP exprimée dans les cellules d'insectes varient entre 42 et 262  $\mu\text{g/mL}$ .<sup>33</sup>

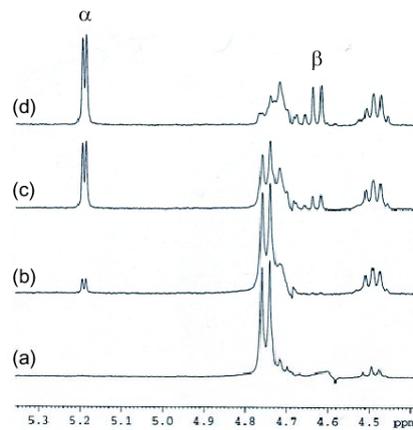
### 2.3. Stéréochimie de l'hydrolyse catalysée par la *Gm*GBP recombinante

L'analyse de la séquence d'acides aminés de la GBP de *Glycine max* a montré que cette enzyme appartient à la famille 81 des glycoside-hydrolases.<sup>d</sup> Le mécanisme moléculaire d'hydrolyse de cette famille n'étant pas décrit, il était intéressant de le déterminer expérimentalement.

L'évolution de la stéréochimie de la réaction d'hydrolyse catalysée par la *Gm*GBP a été suivie par spectroscopie RMN du proton. Environ 0.36 mg de la GBP-"CBP-tagged" purifiée ont été incubés avec 6 mg de laminarine, tandis que des spectres étaient enregistrés à intervalles réguliers (Figure 23). Avant addition de l'enzyme, la région des protons anomères (4.4 – 5.3 ppm) montre un doublet centré à 4.75 ppm, avec un couplage de 8.0Hz, représentant le signal des protons H-1 axiaux des liaisons  $\beta$ -(1,3)- internes, mais aucun signal correspondant aux extrémités réductrices libres n'est détectable (Figure 23a). Dix minutes après addition de l'enzyme, un nouveau doublet est observé à 5.20 ppm, avec un couplage de 3.9Hz, correspondant au H-1 équatorial de l'extrémité réductrice (Figure 23b). Au cours de la réaction, la mutarotation spontanée de l'anomère  $\alpha$  nouvellement créé, conduit à l'apparition d'un doublet à 4.63 ppm, avec un couplage de 8.0Hz, attribuable au H-1  $\beta$ -anomère de l'unité réductrice (Figure 23c,d).

---

<sup>d</sup> P.M. Coutinho & B. Henrissat (1999) Carbohydrate-Active Enzymes server : <http://www.cazy.org/>



**Figure 23 : Evolution de l'hydrolyse de la laminarine catalysée par la GBP purifiée**

(a) région des protons anomères du spectre RMN  $^1\text{H}$ , sans enzyme, à  $40^\circ\text{C}$   
 (b, c, d) après 10, 40 et 90 min d'incubation avec l'enzyme, à  $30^\circ\text{C}$

Cette analyse spectroscopique montre clairement que l'hydrolyse des  $\beta$ -(1,3)-glucanes catalysée par la GBP de *Glycine max* s'effectue avec un mécanisme d'inversion de configuration, et précise ainsi pour la première fois le mode d'action d'une glycoside-hydrolase appartenant à la famille GH-81.<sup>139</sup>

## 2.4. Expression de la *Gm*GBP chez *Medicago truncatula*

### 2.4.1. Objectif

Pour poursuivre l'étude de la *Gm*GBP, et en particulier la reconnaissance de l'éliciteur  $\beta$ -glucane HG, il est nécessaire d'exprimer cette protéine au sein de son complexe. Comme nous allons le voir plus en détail au paragraphe 3, *M. truncatula* exprime aussi des enzymes de type GBP. Il semble donc que cette plante soit un bon candidat pour exprimer la *Gm*GBP au sein du complexe récepteur.

Les racines de *M. truncatula* peuvent être transformées en utilisant la bactérie *Agrobacterium rhizogenes*, car cette bactérie est naturellement capable d'infecter la plante. Il faut donc au préalable introduire dans *A. rhizogenes* le plasmide porteur du gène à exprimer.

Suite aux travaux de Julie Leclercq, différents plasmides contenant, ou non, la *GmGBP* sont disponibles au LMU.

Plasmide	Abréviation
pGreen:35S-insert-TAP-Tag	#3-
pGreen:35S- <i>GmGbp</i> -TAP-Tag	#3+
pGreen:35S-insert-GFP	#6-
pGreen:35S- <i>GmGbp</i> -GFP	#6+
pGreen:35S-mRFP	#9-
pGreen:35S- <i>GmGbp</i> -mRFP	#9+

**Tableau 4 : Plasmides pour la transformation de *M. truncatula* via *A. rhizogenes***

(TAP : tandem affinity purification, GFP : green fluorescence protein, RFP : red fluorescence protein)

Les plasmides #3+, #6+ et #9+ contiennent les séquences codant, respectivement, pour un élément TAP, devant permettre de purifier le complexe, une protéine fluorescente verte (la GFP) et une protéine fluorescente rouge (la mRFP), en plus du gène *GmGbp* lui-même. Les constructions fluorescentes permettent de voir, par microscopie confocale, dans quelles zones la *GmGBP* est exprimée. La construction contenant l'élément TAP, doit permettre la purification du complexe et servir à étudier la *GmGBP* proprement dite. Les constructions #3-, #6- et #9-, dépourvues du gène *GmGbp*, servent de contrôle. Un autre plasmide, le plasmide pSoup, doit également être inséré dans *A. rhizogenes* car il est nécessaire à la réplication du plasmide pGreen.<sup>140</sup>

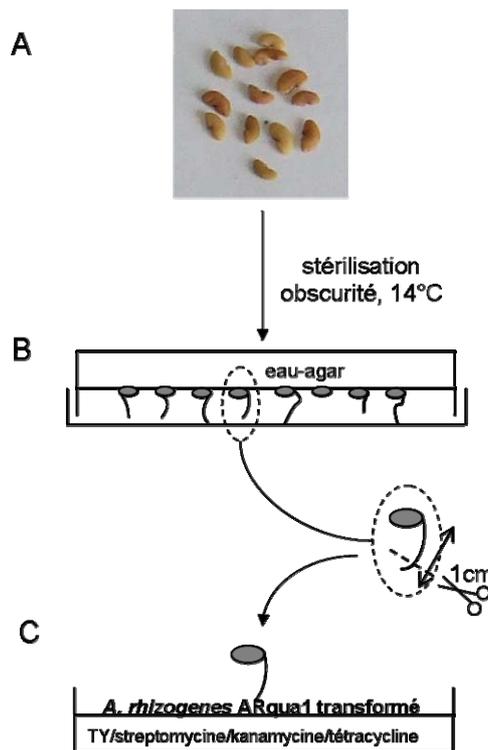
#### 2.4.2. Transformation d'*A. rhizogenes*

Les cellules compétentes ARqual,<sup>141</sup> d'*A. rhizogenes*, sont transformées par la méthode de congélation-décongélation,<sup>142</sup> puis cultivées sur le milieu solide TY/streptomycine/kanamycine/tétracycline (Les cellules Arqual sont résistantes à la streptomycine. La kanamycine permet la sélection du vecteur pGreen et la tétracycline celle du plasmide pSoup). Les colonies obtenues sont testées par PCR. Toutes les colonies testées se sont révélées positives. Six souches contenant respectivement les constructions #3-, #3+, #6-, #6+, #9-, #9+, ainsi que le plasmide pSoup, ont ainsi été obtenues.

Les cellules ARqua1 transformées sont cultivées dans le milieu liquide TY/streptomycine/kanamycine/tétracycline, puis une partie de ces cultures liquides est cultivée sur le milieu solide TY/streptomycine/kanamycine/tétracycline jusqu'à former une couche de bactéries à la surface des boîtes de Pétri. C'est à ce stade que les cellules sont utilisées pour inoculer les racines de *M. truncatula*.

### 2.4.3. Transformation des racines de *M. truncatula*

Les graines de *M. truncatula* (Figure 24A) stérilisées sont mises à germer à l'obscurité, à 14°C, jusqu'à ce que leur racine atteigne 1 cm de long environ (Figure 24B). L'extrémité de la racine est alors coupée, et la racine est inoculée par simple contact avec les cellules transformées d'*A. rhizogenes* (Figure 24C).



**Figure 24 : Transformation des racines de *M. truncatula***

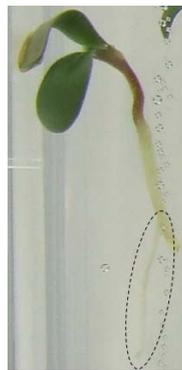
A : Graines de *Medicago truncatula*. B : Les graines stérilisées germent sur un milieu eau-agar. Lorsque la racine atteint 1 cm environ, son extrémité est sectionnée au scalpel. C : Les pousses sont transformées par contact de la partie sectionnée avec la bactérie transformée.

Les jeunes pousses sont ensuite cultivées sur le milieu solide Fahraeus modifié en présence de kanamycine (Figure 25).



**Figure 25 : Pousses de *M. truncatula*, 5 jours après transformation avec #6+**

Les racines transformées sont sélectionnées directement grâce à leur résistance à l'antibiotique. Elles apparaissent juste au dessus de la zone sectionnée, après 1 à 2 semaines environ (Figure 26).

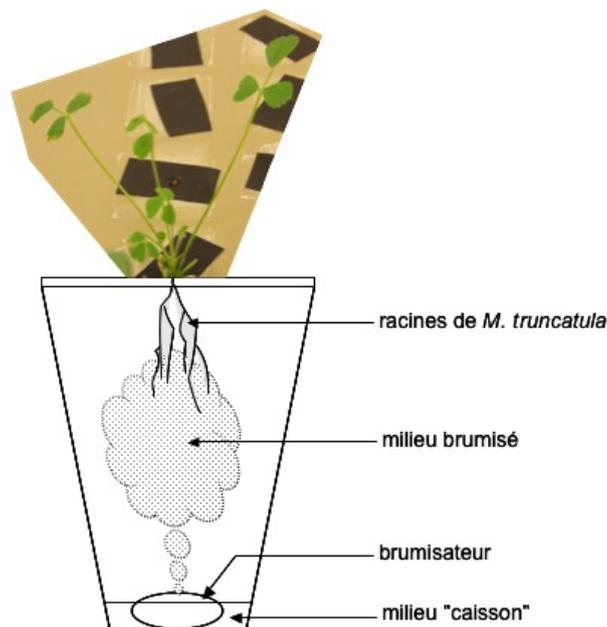


**Figure 26 : Apparition d'une première racine, 7 jours après transformation avec #3+**

Après 2 à 3 semaines, il est déjà possible d'étudier par microscopie confocale, les racines transformées avec les constructions fluorescentes #6-, #6+, #9- et #9+. En effet, aucune purification n'est nécessaire, ces constructions permettent seulement de visualiser rapidement les zones d'expression de la *GmGBP*. En revanche, pour purifier le complexe-

récepteur, grâce à l'élément TAP exprimé par la construction #3+, il faudrait beaucoup plus de matériel.

Une solution, pour obtenir plus de racines, est de transférer les plantes dans un système appelé "caisson" (Figure 27). Ce système fermé permet de faire pousser les plantes sans aucun support. Le caisson est seulement percé de trous au niveau du couvercle, à travers lesquels les plantes poussent. Les racines des plantes se trouvent donc suspendues à l'intérieur du caisson, où un milieu nutritif est brumisé en continu. Ce milieu contient également de la kanamycine afin de maintenir une pression de sélection.



**Figure 27 : Culture de *M. truncatula* dans le caisson**

L'analyse des racines transformées avec les constructions #6+ et #9+ est actuellement en cours à l'Institut botanique de Munich.

Les plantes, dont les racines ont été transformées avec la construction #3+, doivent se développer encore pour permettre la purification du complexe contenant la *GmGBP*.

### 3. Les GBPs de *Medicago truncatula*

#### 3.1. *Medicago truncatula* : un modèle pour les Fabacées

L'affinité des récepteurs et la réponse aux éliciteurs  $\beta$ -glucanes ont été décrites uniquement dans la famille des Fabacées, et non, par exemple, chez *A. thaliana* ou la tomate. Parmi les légumineuses, le soja et *Medicago truncatula* sont tout deux infectés par les espèces *Phytophthora*, respectivement *P. sojae* et *P. medicagensis*. Chez ces deux pathogènes, les  $\beta$ -glucanes ramifiés constituent l'essentiel de la paroi cellulaire du mycélium.<sup>143</sup> Les propriétés biochimiques et d'affinité des récepteurs de  $\beta$ -glucanes ont été étudiées en détail chez *M. truncatula*, mais aucune autre analyse moléculaire n'a été réalisée.

Récemment, quatre gènes codant probablement pour des GBPs de *M. truncatula* (*MtGBP1*, 2, 3, et 4) ont été isolés (Leclercq et coll., LMU-Munich, résultats non publiés). Contrairement aux gènes Gbps du soja et du haricot caractérisés précédemment,<sup>26</sup> les gènes Gbps de *M. truncatula* forment une famille.

*M. truncatula* a été proposé comme modèle pour les Fabacées en raison de la petite taille de son génome, de sa croissance rapide et de sa relative facilité à être transformé.

#### 3.2. Le domaine $\beta$ -(1,3)-glucanase des *MtGBPs*

Le domaine glucanase de la GBP du soja contient deux motifs peptidiques, dont la structure correspond à celle des  $\beta$ -(1,3)-glucanases d'origine microbienne, appartenant à la famille GH-81.<sup>33, 144</sup> Ces motifs sont également présents dans la famille *MtGBP* (Figure 28).

---

	418	494	498
<i>Gm</i> GBP	YNDH <sup>418</sup> HYHLGY	<b>E</b> ST <b>S</b> E	
<i>Pv</i> GBP	YNDH <sup>418</sup> HYHLGY	<b>E</b> ST <b>S</b> E	
<i>Mt</i> GBP1	YNDH <sup>418</sup> HFHLGY	<b>E</b> ST <b>S</b> E	
<i>Mt</i> GBP2	YNDH <sup>418</sup> HYHLGY	<b>E</b> SS <b>S</b> E	
<i>Mt</i> GBP3	YNDHADHLGY	<b>K</b> ST <b>S</b> Q	
<i>Mt</i> GBP4	YNDH <sup>418</sup> HYHLGY	<b>E</b> ST <b>S</b> E	

**Figure 28 : Régions conservées chez les GBPs de *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris* et *Medicago truncatula***

Dans le second motif, l'un des deux résidus acide glutamique a été proposé comme pouvant être le résidu nucléophile du site actif.<sup>145</sup> La substitution d'un de ces résidus par une glutamine élimine l'activité hydrolytique.<sup>33</sup> De même, la mutation du résidu aspartate 418 dans le premier motif, conduit à une perte de l'activité enzymatique chez la GBP du soja. Il est intéressant de noter que les deux résidus acide glutamique du second motif sont présents chez toutes les *Mt*GBPs, à l'exception de *Mt*GBP3. Chez *Mt*GBP3, ces résidus sont remplacés par une lysine et une glutamine, suggérant que *Mt*Gbp3 puisse coder pour un variant hydrolytiquement inactif de la famille de GBP de *M. truncatula*.

### 3.3. Essais de clonage des gènes de la famille *MtGbp*

#### 3.3.1. Objectif

Pour pouvoir éventuellement confirmer cette hypothèse et étudier de façon plus approfondie les propriétés des *Mt*GBPs, il est nécessaire de les obtenir en quantité suffisante et sous forme purifiée. Pour cela, nous avons envisagé d'exprimer ces protéines chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* INVSc2 en utilisant le vecteur pYes-M/TEV/CBP<sup>5</sup> permettant à la fois le clonage chez *E. coli* et l'expression des GBPs chez la levure.

Suite au travail entrepris par Julie Leclercq (LMU-Munich, résultats non publiés), les gènes *MtGbps* étaient disponibles sous la forme suivante : *MtGbp1*, *MtGbp2* et *MtGbp3*, clonés dans le vecteur pGem-T, et *MtGbp4*, sous forme d'ADN génomique.

L'objectif suivant de ce travail était de cloner les gènes *MtGbp1*, *MtGbp2*, *MtGbp3* et *MtGbp4* dans le vecteur pYes-M/TEV/CBP afin de pouvoir exprimer les protéines *MtGBP1*, *MtGBP2*, *MtGBP3* et *MtGBP4* dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* INVSc2.

### 3.3.2. *MtGbp1* et *MtGbp3*

#### 3.3.2.1. Essai de clonage dans pYes-M/TEV/CBP

Afin de pouvoir insérer les gènes *MtGbp1* et *MtGbp3* dans le vecteur pYes-M/TEV/CBP, il est nécessaire d'insérer les sites de restriction pour les enzymes *Bam*HI et *Msc*I pour le gène *MtGbp1*, et *Bam*HI et *Ecl*136II pour *MtGbp3* (Tableau 5). Ces sites sont introduits par PCR en utilisant les oligonucléotides *MtGbp1\_Bam*HI\_for et *MtGbp1\_Msc*I\_rev pour *MtGbp1*, et *MtGbp3\_Bam*HI\_for et *MtGbp3\_Ecl*136\_rev pour *MtGbp3*.

	ADN parent	après restriction :	
BamHI	5' - <b>nnnG↓GATC</b> Cnnn-3' 3' - <b>nnnC</b> <b>CTAG↓</b> Gnnn-5'	5' - <b>nnnG</b> -3'	5' - <b>GATCC</b> nnn-3' 3' - <b>Gnnn</b> -5'
MscI	5' - <b>TGG↓CCA</b> -3' 3' - <b>ACC↑GGT</b> -5'	5' - <b>nnnTGG</b> -3'	5' - <b>CCAnnn</b> -3' 3' - <b>GGTnnn</b> -5'
Ecl136II	5' - <b>GAG↓CTC</b> -3' 3' - <b>CTC↑GAG</b> -5'	5' - <b>nnnGAG</b> -3'	5' - <b>CTC</b> nnn-3' 3' - <b>GAG</b> nnn-5'

**Tableau 5 : Sites de restriction pour les enzymes *Bam*HI et *Msc*I et *Ecl*136II**

Le vecteur pYes-M/TEV/CBP est linéarisé, par digestion par les enzymes *Bam*HI et *Msc*I, puis purifié. Les gènes *MtGbp1* et *MtGbp3* sont amplifiés par PCR, avec la *Pfu*-polymérase, en utilisant les oligonucléotides ci-dessus, puis digérés par les enzymes *Bam*HI et

*MscI*, et *BamHI* et *Ecl136II*, respectivement, et purifiés sur gel d'agarose en utilisant le kit de purification NucleoSpin Extract II.

Les gènes purifiés sont incubés avec le vecteur linéarisé pYes-M/TEV/CBPx*BamHI*x*MscI*, en présence de la ligase T-4. Le produit de ligation est utilisé pour transformer les cellules ultracompétentes XL10-Gold. Après culture sur le milieu solide LB/ampicilline, aucune colonie ne s'est développée.

Après la PCR permettant l'insertion des sites de restriction, les extrémités des produits de l'amplification peuvent être trop courtes pour permettre une bonne reconnaissance par les enzymes de restriction. Pour éviter ce problème, il est possible d'insérer d'abord la totalité du produit de l'amplification, dans un vecteur intermédiaire, avant de procéder à la restriction enzymatique.

### ***3.3.2.2. Essai de clonage dans pGem-T***

Les produits issus de la PCR sont directement purifiés par extraction au phénol. Une étape d'incubation avec la *Taq*-polymérase permet d'ajouter une déoxyadénosine (dA) en 3' du produit de PCR, afin de permettre le couplage avec le vecteur pGem-T. Les produits de cette réaction sont alors incubés avec le vecteur pGem-T, en présence de ligase T-4. Le produit de la ligation est utilisé pour transformer les cellules ultracompétentes XL10-Gold. Ces cellules sont ensuite cultivées sur le milieu solide LB/ampicilline, contenant également de l'IPTG et du X-Gal pour permettre une détection bleu/blanc des clones négatifs/positifs. Pour chaque échantillon, quatre colonies blanches sont prélevées et cultivées le milieu liquide LB/ampicilline.

Après extraction de l'ADN par miniprep et analyse par PCR, en utilisant les oligonucléotides *MtGbp1\_BamHI\_for* et *MtGbp1\_MscI\_rev* pour *MtGbp1*, et *MtGbp1\_BamHI\_for* et *MtGbp1\_Ecl136\_rev* pour *MtGbp3*, il semble que toutes les colonies contiennent le vecteur pGem-T et le gène *MtGbp1* ou *MtGbp3*.

Cependant, après séquençage des plasmides obtenus, il s'avère que les cellules n'ont pas été transformées par les plasmides contenant les sites de restriction pour les enzymes *BamHI* et *MscI*, mais par les traces résiduelles du plasmide pGem-T:*MtGbp1*, ou pGem-

T:*MtGbp3* originel, qui n'a pas été éliminé lors de la purification par simple extraction au phénol.

Pour être sûr d'éliminer ce plasmide, nous avons décidé d'utiliser un vecteur résistant à un antibiotique différent de celui du vecteur originel.

### **3.3.2.3. Clonage dans *pSTBlue-1***

Nous avons utilisé un nouveau kit de clonage, Perfectly Blunt Cloning Kit (Novagen), comprenant le vecteur *pSTBlue-1*, résistant à la kanamycine (ce qui n'est pas le cas du vecteur *pGem-T*).

Comme précédemment, les produits de la PCR sont purifiés directement par extraction au phénol. Le Perfectly Blunt Cloning Kit procède d'abord par une étape de conversion des extrémités des produits de la PCR, avant ligation avec le vecteur *pSTBlue-1*, par la ligase T4. Cette solution est ensuite utilisée pour transformer les cellules compétentes NovaBlue Singles. Les colonies obtenues après incubation sur le milieu solide LB/kanamycine/tétracycline/X-Gal/IPTG, sont sélectionnées par détection bleu/blanc.

Deux colonies blanches de chaque échantillon sont prélevées et cultivées dans le milieu LB/ampicilline. Après extraction des plasmides par miniprep et analyse par restriction avec l'enzyme *EcoRI*, le gel d'agarose présente bien les bandes correspondant au vecteur *pSTBlue-1* (3851 bp) et aux fragments, issus de la digestion par l'enzyme, des gènes *MtGbp1* (1520 bp et 247/245 bp) et *MtGbp3* (1380 bp et 585 bp).



**Figure 29 : Gel d'agarose de l'analyse par restriction des plasmides pSTBlue-1: MtGbp1 et pSTBlue-1: MtGbp 3**

X : Marqueur de taille. 1,2: Plasmides pSTBlue-1: MtGbp1. 3, 4 : Plasmides pSTBlue-1: MtGbp3.

Ce clonage a donc permis d'insérer les gènes *MtGbp1* et *MtGbp3*, contenant les sites de restriction désirés, dans le vecteur intermédiaire pSTBlue-1. Il faut maintenant transférer ces gènes dans le vecteur cible pYes-M/TEV/CBP.

#### **3.3.2.4. Nouveaux essais de clonage dans pYes-M/TEV/CBP**

Les plasmides pSTBlue-1: *MtGbp1* et pSTBlue-1: *MtGbp3* sont digérés par les enzymes *Bam*HI et *Msc*I, et *Bam*HI et *Ecl*136II, respectivement, puis purifiés sur gel d'agarose.

Les gènes purifiés sont incubés avec le vecteur linéarisé pYes-M/TEV/CBPx*Bam*HIx*Msc*I, en présence de la ligase T-4. Le produit de la ligation est utilisé pour transformer les cellules ultracompétentes XL10-Gold.

Après culture sur le milieu solide LB/ampicilline, aucune colonie ne s'est développée pour l'échantillon *MtGbp3*, quatre colonies se sont développées pour l'échantillon *MtGbp1*. Les colonies sont cultivées dans le milieu liquide LB/ampicilline puis analysées par miniprep et restriction avec l'enzyme *Hind*III. Aucune colonie ne contient le plasmide cible pYes-M/TEV/CBP: *MtGbp1*.

Les pertes d'ADN dues aux étapes de purification classiques peuvent être l'une des raisons de l'échec de ce clonage. Afin d'éviter ces pertes, les plasmides pSTBlue-1:*MtGbp1* et pSTBlue-1:*MtGbp3*, digérés par les enzymes *Bam*HI et *Msc*I, et *Bam*HI et *Ecl*136II, respectivement, sont purifiés sur un gel "low-melt". Ce gel permet de purifier le produit, et la bande contenant le gène est séparée du reste du gel comme dans une purification classique, mais, en revanche, le gène n'est pas extrait du gel. Ce gel a une température de liquéfaction suffisamment basse pour être fondu sans dénaturer l'ADN. La solution ainsi obtenue peut alors être directement utilisée pour effectuer la ligation avec le vecteur pYes-M/TEV/CBP. Le produit de ligation est utilisé pour transformer les cellules ultracompétentes XL10-Gold.

Après culture des bactéries sur le milieu solide LB/ampicilline, aucune colonie ne s'est développée pour l'échantillon *MtGbp3*. Les cinq colonies de l'échantillon *MtGbp1* sont cultivées dans le milieu liquide LB/ampicilline puis analysées par miniprep et restriction avec l'enzyme *Hind*III. Aucune colonie ne contient le plasmide cible pYes-M/TEV/CBP:*MtGbp1*.

A ce stade, il faudrait essayer de déterminer quelle étape du clonage pose problème, l'étape de ligation ou la transformation des cellules compétentes, afin de pouvoir proposer une solution.

### **3.3.3. *MtGbp2***

#### ***3.3.3.1. Essai de clonage dans pYes-M/TEV/CBP***

Pour pouvoir insérer le gène *MtGbp2* dans le vecteur pYes-M/TEV/CBP, il est nécessaire d'insérer les sites de restriction pour les enzymes *Bam*HI et *Msc*I (Tableau 5). Ces sites sont introduits par PCR, avec la *Pfu*-polymérase, en utilisant les oligonucléotides *MtGbp2\_BamHI\_for* et *MtGbp2\_MscI\_rev*.

L'essai de clonage de *MtGbp2* dans pYes-M/TEV/CBP a été effectué en parallèle avec les premiers essais de clonage de *MtGbp1* et *MtGbp3*, et aucune colonie ne s'est développée.

### **3.3.3.2. Essai de clonage dans pGem-T**

L'essai de clonage de *MtGbp2* dans pGem-T a été effectué en parallèle avec les essais de clonages de *MtGbp1* et *MtGbp3* avec un résultat identique (voir paragraphe 3.3.2.2).

### **3.3.3.3. Essais de clonage dans pSTBlue-1**

Le premier essai de clonage de *MtGbp2* dans pSTBlue-1 a été effectué en parallèle avec les clonages de *MtGbp1* et *MtGbp3* mais sans succès.

Deux nouveaux essais de clonage ont été tentés, l'un en purifiant le produit de PCR sur gel d'agarose, l'autre sans aucune purification afin d'éviter toute perte d'ADN. Mais ces nouveaux essais ne conduisent pas à plus de réussite.

Finalement, toujours dans l'idée d'éviter la perte d'ADN, le produit de PCR est purifié sur un gel "low-melt". Le produit de ligation avec le vecteur pSTBlue-1 est utilisé pour transformer les cellules ultracompétentes XL10-Gold. Les colonies obtenues après incubation sur le milieu solide LB/kanamycine/tétracycline/X-Gal/IPTG, sont sélectionnées par détection bleu/blanc. Quatre colonies blanches sont prélevées et cultivées dans le milieu LB/kanamycine/tétracycline, puis analysées par miniprep et restriction avec l'enzyme *EcoRI*. Aucune colonie testée ne contient la construction pSTBlue-1:*MtGbp2*.

Comme dans le cas de *MtGbp1* et *MtGbp3*, il faudrait essayer de déterminer quelle étape doit être modifiée ou optimisée, car aucun essai de clonage n'a été fructueux jusqu'à présent avec le gène *MtGbp2*.

### **3.3.4. *MtGbp4***

#### **3.3.4.1. *Essai de clonage dans pGem-T***

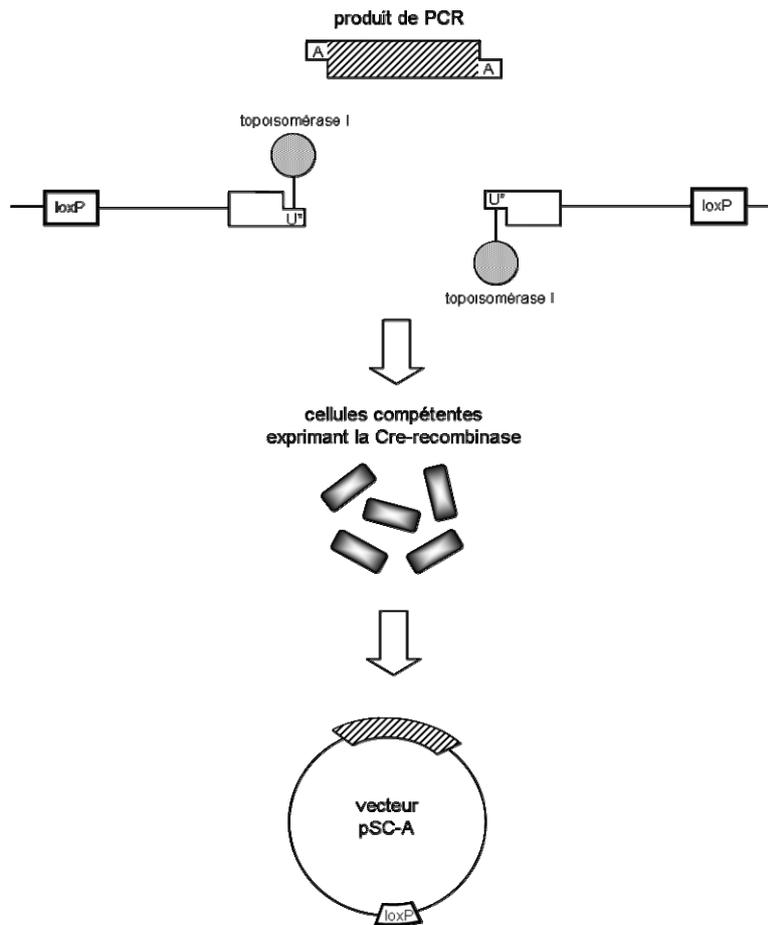
*MtGbp4* est amplifié par PCR, avec la *Taq*-polymérase à partir d'ADN génomique en utilisant les oligonucléotides **MtGbp10\_ATG\_for** et **MtGbp10\_Stop\_Rev**, et purifié sur gel d'agarose. Une moitié du produit de PCR purifié est traité avec la *Taq*-polymérase, l'autre moitié ne subit pas ce traitement. Ces deux produits sont alors mis en ligation avec le vecteur pGem-T. Les produits de ligation sont utilisés pour transformer les cellules ultracompétentes XL10-Gold. Les cellules sont cultivées sur le milieu solide LB/ampicilline/IPTG/X-Gal et sélectionnées par détection bleu/blanc. Pour chaque échantillon, quatre colonies blanches sont prélevées et cultivées sur le milieu liquide LB/ampicilline. Après miniprep et analyse par restriction avec l'enzyme *EcoRI* et par PCR, en utilisant les oligonucléotides **MtGbp10\_ATG\_for** et **MtGbp10\_Stop\_Rev**, aucune colonie testée ne contient le gène et le vecteur voulu.

#### **3.3.4.2. *Essai de clonage dans pSTBlue-1***

Le Perfectly Blunt Cloning Kit est utilisé pour essayer de cloner le gène *MtGbp4*, purifié sur gel d'agarose après PCR, dans le vecteur pSTBlue-1. Les cellules compétentes NovaBlue Singles transformées sont cultivées sur le milieu solide LB/kanamycine/tétracycline/X-Gal/IPTG, puis sélectionnées par détection bleu/blanc. Quatre colonies blanches prélevées et cultivées dans le milieu liquide LB/kanamycine/tétracycline. Après extraction des plasmides par miniprep et analyse par restriction avec l'enzyme *EcoRI*, aucune colonie testée ne contient le plasmide pSTBlue-1:*MtGbp4*.

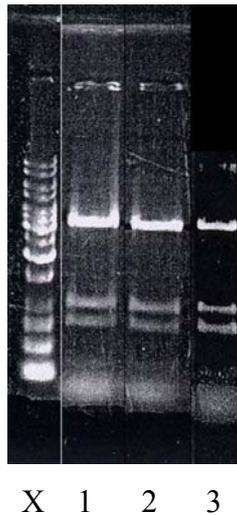
#### **3.3.4.3. *Clonage dans pSC-A***

Un nouveau kit de clonage, Strataclone, propose un système combinant l'utilisation *in vivo*, de la topoisomérase I du virus *Vaccinia* et de la Cre recombinase du bactériophage P1, afin d'insérer rapidement un produit de PCR dans le vecteur pSC-A (Figure 30).



**Figure 30 : Principe du système Strataclone**

Le gène *MtGbp4* est amplifié par PCR en utilisant la polymérase Easy-A, dont l'emploi est recommandé avec le kit Strataclone. Le produit de PCR ainsi obtenu est utilisé directement selon le protocole du kit Strataclone. Les cellules Strataclone SoloPack transformées sont cultivées sur le milieu solide LB/ampicilline/X-Gal/IPTG, puis sélectionnées par détection bleu/blanc. Six colonies blanches sont prélevées et cultivées dans le milieu liquide LB/ampicilline. Après extraction des plasmides par miniprep et analyse par restriction avec l'enzyme *EcoRI*, trois des colonies testées s'avèrent contenir le plasmide pSC-A:*MtGbp4*. Le gel d'agarose présente les bandes correspondant au vecteur pSC-A (3.5 kb) et aux fragments, issus de la digestion par l'enzyme, du gène *MtGbp4* (1041 bp, 769 bp et 227 bp).



**Figure 31 : Gel d'agarose de l'analyse par restriction des plasmides pSC-A: MtGbp4**

X : Marqueur de taille. 1, 2, 3 : Plasmides pSC-A: MtGbp4.

En utilisant le kit Strataclone, le gène *MtGbp4* a pu être cloné pour la première fois. Le plasmide pSC-A: *MtGbp4* peut maintenant être utilisé pour amplifier *MtGbp4* tout en insérant les sites de restriction pour les enzymes *Bam*HI et *Msc*I. Ces sites de restriction sont introduits par PCR, avec la *Pfu*-polymérase, en utilisant les oligonucléotides *MtGbp4\_Bam*HI\_for et *MtGbp4\_Msc*I\_rev.

### 3.3.5. Conclusion et perspectives

Les gènes *MtGbp1* et *MtGbp3*, porteur des sites de restrictions permettant leur introduction dans le vecteur pYes-M/TEV/CBP (respectivement *Bam*HI et *Msc*I pour *MtGbp1* et *Bam*HI et *Ecl*136II pour *MtGbp3*) ont pu être clonés dans un vecteur intermédiaire, le vecteur pSTBlue-1. Le clonage dans le vecteur cible pYes-M/TEV/CBP reste à mettre au point.

Le gène *MtGbp2* n'a pu être cloné avec succès dans aucun des vecteurs proposés. Il faut essayer d'identifier l'origine du problème avec les vecteurs testés ou envisager l'insertion du gène dans un vecteur différent.

Le gène *MtGbp4* a pour la première fois été cloné à partir d'ADN génomique, dans le vecteur pSC-A. Les sites de restriction *Bam*HI et *Msc*I, pour l'insertion du gène dans le vecteur pYes-M/TEV/CBP, ont également été introduits avec succès. Un premier essai de clonage dans le vecteur pYes-M/TEV/CBP a été effectué, les résultats sont en cours d'analyse.

## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**



La première partie des travaux présentés dans ce manuscrit a été réalisée au CERMAV, au sein de l'équipe "Glycochimie et biotechnologie des oligosaccharides", et a permis de mettre au point une méthode de synthèse de  $\beta$ -(1,3)-gluco-oligosaccharides linéaires, de DP contrôlé, à l'aide d'une  $\beta$ -(1,3)-glucosynthase, la glycosynthase GII E231G. Les difficultés rencontrées au cours de cette synthèse nous ont permis de mieux appréhender la spécificité de cette glycosynthase. La méthodologie établie a également servi de base à la synthèse d'un substrat fluorescent destiné au dosage d'activité *endo*- $\beta$ -(1,3)-glucanase.

La voie de synthèse mise en place demande à être optimisée, mais elle permet déjà d'envisager des possibilités de fonctionnalisation sur les extrémités, réductrice et non-réductrice, des oligosaccharides obtenus, et donc d'obtention d'outils pour l'étude des mécanismes impliquant les  $\beta$ -(1,3)-glucanes et  $\beta$ -(1,3)-gluco-oligosaccharides, comme par exemple, la mesure de l'activité  $\beta$ -(1,3)-glucanase par la technique du FRET, en utilisant le substrat fluorescent **42**.

La deuxième partie des travaux présentés a été effectuée au sein de l'équipe "Biochimie et phytopathologie" de l'Institut botanique de l'Université Ludwig-Maximilians (LMU, Munich, Allemagne) dans le cadre du projet de recherche européen SACC-SIG-NET (n°HPRN-CT-2202-00251).

Dans un premier temps, nous avons cherché à mieux caractériser la  $\beta$ -glucan-binding protein de *Glycine max*. L'analyse par spectroscopie RMN de l'hydrolyse catalysée par la *GmGBP* a montré que la réaction procède selon un mécanisme d'inversion de configuration, et a permis de déterminer pour la première fois le mécanisme moléculaire d'hydrolyse d'une glycoside-hydrolase appartenant à la famille GH-81. Afin de caractériser également l'affinité du récepteur pour l'éliciteur HG, le complexe contenant la *GmGBP* a été exprimé dans les racines de *M. truncatula*, par transformation via *A. rhizogenes*. Des premières études par microscopie confocale, avec les constructions fluorescentes #6+ et #9+, montrant la répartition de l'expression de la *GmGBP* au sein de la cellule, sont en cours. La purification du complexe lui-même nécessite plus de matériel, les plantes contenant le plasmide #3+ sont actuellement cultivées dans cet objectif.

Dans un second temps, un travail sur la famille de gènes Gbps de *Medicago truncatula*, plante modèle pour les Fabacées, a permis de cloner pour la première fois le gène *MtGbp4*, à partir d'ADN génomique, et de cloner, dans un vecteur intermédiaire, les gènes

*MtGbp1* et *MtGbp3*, porteurs des sites de restrictions pour l'insertion dans le vecteur cible pYes-M/TEV/CBP. L'insertion des gènes *MtGbp1*, *MtGbp2*, *MtGbp3* et *MtGbp4*, dans le vecteur pYes-M/TEV/CBP, devant permettre l'expression des protéines *MtGBP1*, *MtGBP2*, *MtGBP3* et *MtGBP4* chez *S. cerevisiae* reste à mettre au point.

Le substrat fluorescent **42** sera un outil précieux de caractérisation biochimique, après expression et purification de ces protéines.

# **PARTIE EXPERIMENTALE**



## 1. Méthodes générales

### 1.1. Solvants

Le dichlorométhane est distillé sur anhydride phosphorique ( $P_2O_5$ ), puis conservé sur tamis moléculaire. La pyridine est distillée sur hydroxyde de potassium, puis conservée sur tamis moléculaire, sur hydroxyde de potassium ou sur hydrure de calcium.

Lors des étapes de glycosylation, les solvants utilisés sont fraîchement distillés.

### 1.2. Chromatographies

L'avancement des réactions est suivi par chromatographie sur couche mince (CCM) sur plaque de gel de silice (Merk 60 F<sub>254</sub>) en utilisant des systèmes d'éluants appropriés. La révélation est effectuée par irradiation sous lumière UV ( $\lambda = 254$  nm) et/ou par trempage dans un révélateur acide (acide sulfurique/méthanol/eau : 5-45-45) puis chauffage à 300 °C.

Les séparations par chromatographie rapide sont réalisées sous pression d'air comprimé sur colonne de gel de silice (Merk Geduran SI 60; 40-63  $\mu$ m) avec l'éluant indiqué.

### 1.3. Analyses

Les pouvoirs rotatoires sont mesurés, à 25 °C sur un polarimètre Perkin Elmer 341.

Les points de fusion sont mesurés sur un appareil Büchi 535.

Les spectres de masse basse résolution ont été effectués au CERMAV sur un appareil quadripolaire NERMAG R 10-10C version 2000, pour les méthodes d'ionisation de type bombardement par atomes accélérés (FAB) et ionisation chimique (DCI), sur un spectromètre Waters Micromass ZQ pour la méthode d'ionisation de type electrospray (ESI) et sur un appareil Bruker Autoflex pour la technique MALDI.

Les analyses élémentaires sont réalisées par le service central de microanalyses du CNRS (Vernaison).

---

Les mesures de masses exactes par spectrométrie de masse haute résolution ont été réalisées sur un spectromètre Micromass ZABSpec-TOF (technique electrospray) par le service de spectrométrie de masse du Centre Régional de Mesure Physique de l'Ouest (CRMPO - Rennes).

Les spectres RMN ont été réalisés sur des appareils Bruker AC300 et Avance 400. Les déplacements chimiques ( $\delta$ ) sont exprimés en partie par million (ppm) par rapport au tétraméthylsilane, ou par rapport au solvant lui-même, utilisé comme référence interne. Pour les mesures effectuées dans l'eau deutériée ( $D_2O \geq 99.97\%$ ), la référence utilisée pour les spectres proton est le pic résiduel de HDO (étalonné à  $\delta = 4.7$  ppm à 298K et à  $\delta = 4.6$  ppm à 303K). Pour les composés solubles dans le chloroforme, la référence utilisée pour les spectres protons est le signal du chloroforme (étalonné à  $\delta = 7.26$  ppm à 298K et 303K) ou, pour les spectres carbone, la raie centrale du signal du  $CDCl_3$  (étalonné à  $\delta = 77.0$  ppm à 298K et 303K). Pour les spectres réalisés dans le méthanol deutérié, la référence utilisée pour les spectres proton est le signal de l'eau (étalonné à  $\delta = 4.87$  ppm à 298K) ou du méthanol (étalonné à  $\delta = 3.34$  ppm à 303K) ou, pour les spectres carbones, la raie centrale du signal du méthanol (étalonné à  $\delta = 49.86$  ppm à 298K et à  $\delta = 49.80$  ppm à 303K).

Les expériences bidimensionnelles homo- ou hétéronucléaires sont calibrées par analogie avec les spectres à une dimension correspondants. Les programmes utilisés sont ceux de la bibliothèque de la société Bruker.

Les constantes de couplages ( $J$ ) sont mesurées en Hz. La notation utilisée pour la description des spectres est la suivante : s (singulet), d (doublet), dd (doublet de doublet), ddd (doublet de doublet de doublet), m (massif ou multiplet),  $H_{\text{arom}}$  (proton aromatique),  $C_{\text{arom}}$  (carbone aromatique),  $C_q$  (carbone quaternaire) et  $C_{q\text{arom}}$  (carbone quaternaire aromatique).

#### 1.4. Milieux de culture

La composition des milieux de culture est donnée pour 1 L, sauf pour le caisson où les quantités sont données pour 10 L de milieu. Les milieux sont stérilisés par chauffage en autoclave, sauf le milieu du caisson. Les milieux solides sont obtenus en additionnant de l'agar (15 g/L) avant stérilisation. Sauf mention contraire, toutes les solutions utilisées sont des solutions aqueuses.

- LB :
  - Extrait de levure, 5 g
  - Peptone, 10 g
  - Chlorure de sodium, 5 g
  
- TB :
  - Extrait de levure, 24 g
  - Peptone, 12 g
  - Glycérol, 4 mL
  - Après autoclave, une solution stérile d'hydrogénophosphate de potassium (12.54 g) et de dihydrogénophosphate de potassium (2.31 g) dans l'eau (20 mL) est ajoutée au milieu.
  
- TY :
  - Extrait de levure, 3 g
  - Peptone, 5 g
  - Après autoclave, une solution stérile de chlorure de calcium (0.7 g) dans l'eau (10 mL) est ajoutée au milieu.
  
- SOC :
  - Peptone, 20 g
  - Extrait de levure, 5 g
  - Chlorure de sodium, 5 mol/L, 2 mL
  - Chlorure de potassium, 1 mol/L, 2.5 mL
  - Chlorure de magnésium, 1 mol/L, 10 mL
  - Sulfate de magnésium, 1 mol/L, 10 mL
  - Glucose, 1 mol/L, 20 mL
  
- Fahraeus modifié :

Macroéléments :

  - Chlorure de calcium, 0.9 mmol/L
  - Sulfate de magnésium, 0.5 mmol/L
  - Dihydrogénophosphate de potassium, 0.7 mmol/L
  - Hydrogénophosphate de sodium, 0.8 mmol/L

- Citrate ferrique, 20  $\mu$  mol/L
- Nitrate d'ammonium, 0.5 mmol/L

Micro-éléments, 100  $\mu$ g/L de chacun des composés suivants :

- Chlorure de manganèse
- Sulfate de cuivre
- Chlorure de zinc
- Acide borique
- Molybdate de sodium

Le pH est ajusté à 7.5 avant stérilisation.

- Caisson :
  - Chlorure de calcium, 1 mmol/L, 5 mL
  - Sulfate de magnésium, 0.25 mmol/L, 5 mL
  - Sulfate de potassium, 0.5 mmol/L, 5 mL
  - Fer/EDTA, 0.05 mmol/L, 50 mL
  - Oligoéléments, 10 mL
    - . Acide borique, 32 mmol/L
    - . Sulfate de manganèse, 10.6 mmol/L
    - . Sulfate de zinc, 696  $\mu$ mol/L
    - . Sulfate de cuivre, 320  $\mu$ mol/L
    - . Molybdate de sodium, 1 mmol/L
    - . Chlorure de cobalt, 84  $\mu$ mol/L
  - Tampon phosphate, 50 mL
    - . Dihydrogénophosphate de potassium, 0.343 mmol/L
    - . Hydrogénophosphate de potassium, 0.757 mmol/L
  - Nitrate d'ammonium, 5 mmol/L, 50 mL

Antibiotiques utilisés :

Antibiotique	Solution mère	Concentration finale
Ampicilline	50 mg/mL	100 µg/mL
Chloramphénicol	25 mg/mL	25 µg/mL
Kanamycine	50 mg/mL	30 µg/mL (LB) 100 µg/mL (TY) 20 µg/mL (Fahraeus, Caisson)
Tétracycline	10 mg/mL (éthanol)	12.5 µg/mL (LB) 10 µg/mL (TY)
Streptomycine	600 mg/mL	600 µg/mL

Détection bleu/blanc :

	Solution mère	Concentration finale
IPTG	1 mol/L	0.4 mmol/L
X-Gal	50 mg/mL (DMSO)	50 µg/mL

## 1.5. PCRs et clonages

- Vecteurs et cellules compétentes

- Séquence partielle du vecteur pYes-M/TEV/CBP,<sup>5</sup> ce vecteur comporte au total 5959 paires de bases.

```

      D S L * G I L S F * T M G N S A S K S R G S E W P E
481 CGACTCACTATAGGGAATATTAAGCTTCTAGACCATGGGTAATTCAGCTTCTAAGAGTCGAGGATCCGAA TGGCCA GAAA 560
      SspI      XbaI                               BamHI      MscI
      HindIII      NcoI

N L Y F Q G E F R S M E K R R W K K N F I A V S A A N
561 ATTTGTATTTCAAGGTGAATTCAGATCCATGGAAAAGAGAAGATGGAAAAGAATTCATAGCCGTCTCAGCAGCCAAC 640
      EcoRI      NcoI

R F K K I S S S G A L D * R P L E H A S R G P H H V I
641 CGCTTTAAGAAAATCTCATCTCCGGGGCACTTGATTAGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCGCATCATGTAAT 720
      NotI      XhoI      SphI
      EagI      NsiI
      BsrBI      XbaI

```

## Partie expérimentale

**M G N S A S K**

Site Myr, conduit normalement à l'addition d'un acide myristique sur la glycine (G) à la seconde position, ce qui doit conduire à l'ancrage de la protéine dans la membrane plasmique

**E N L Y F Q G**

site de reconnaissance TEV, la TEV-protéase hydrolyse la protéine entre la glutamine (Q) et la glycine (G) ; en utilisant la rTEV-protéase, l'extrémité C-terminale peut être enlevée, si nécessaire

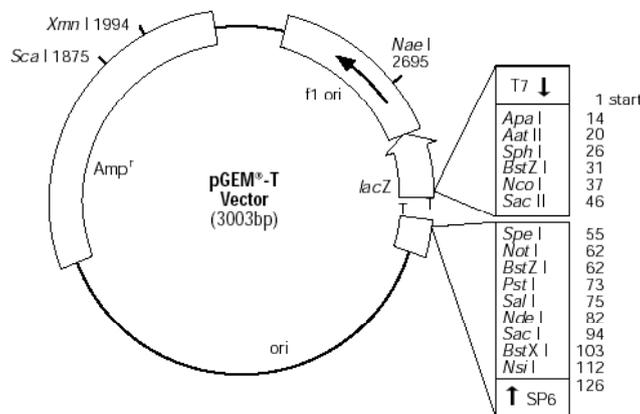
**K R R ...**

calmodulin-binding peptide, pour la purification de la protéine recombinante sur la calmoduline

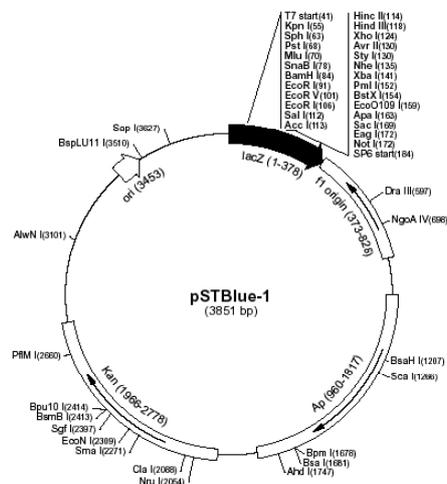
**BamHI, MscI**

sites de reconnaissance pour les enzymes de restriction, les séquences *MtGBPs* seront introduites en utilisant ces sites

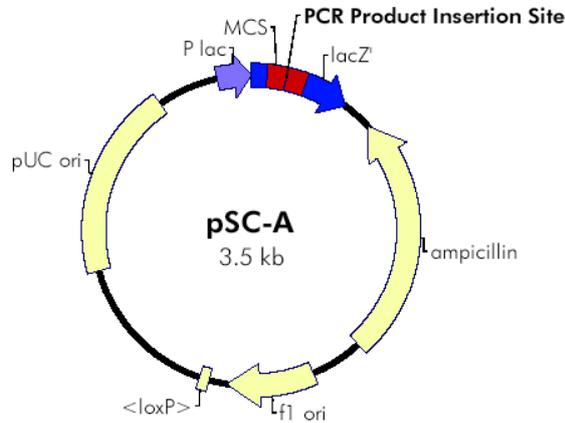
- Le vecteur pGem-T provient de Promega.



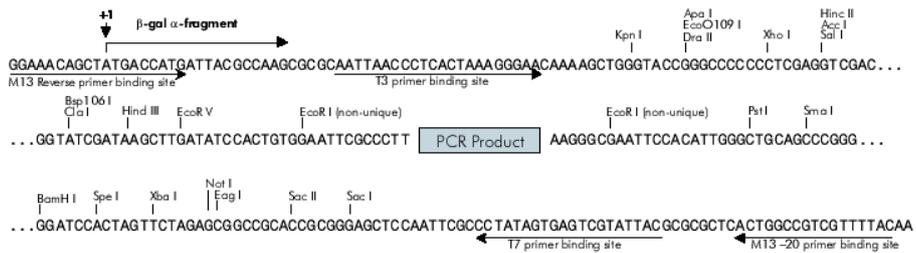
- Le kit de clonage Perfectly Blunt Cloning Kit contenant le vecteur pSTBlue-1 et les cellules compétentes NovaBlue Singles, provient de Novagen.



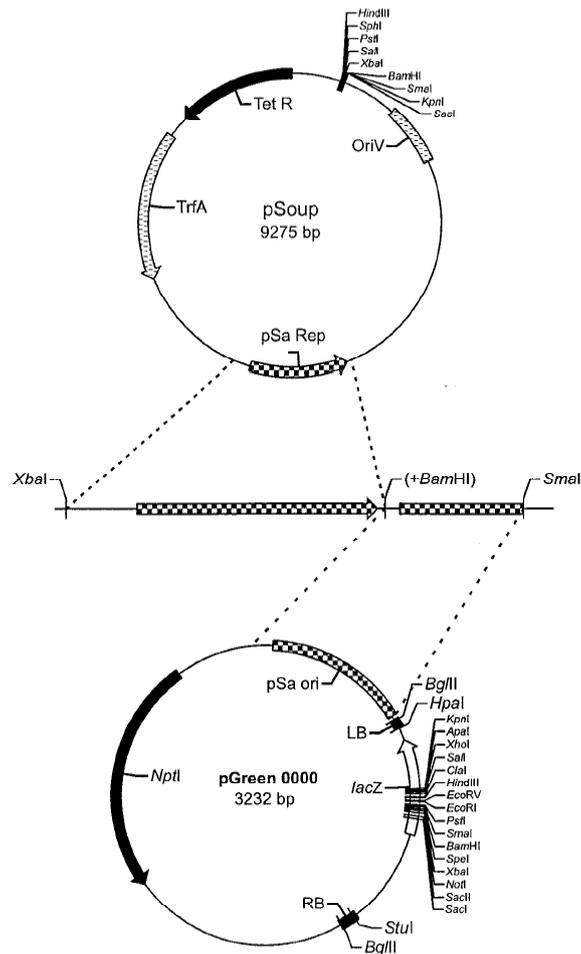
- Les cellules ultracompetentes XL10-Gold et le kit de clonage StrataClone PCR Cloning Kit, contenant les cellules compétentes StrataClone SoloPack et le vecteur pSC-A, proviennent de Stratagene.



**pSC-A PCR Cloning Vector PCR Product Insertion Site Region**  
(sequence shown 3458–3467, 1–250)



- pSoup est un plasmide RK2 modifié qui porte le gène de la pSa réplicase, et pGreen, le vecteur de clonage T-DNA avec l'origine de répliation pour la pSa. Le locus de répliation de la pSa a été modifié par mutagénèse dirigée pour introduire un site *Bam*HI, permettant de séparer ces deux régions.<sup>140</sup>



- La souche ARQual 1 est un dérivé Sm de la souche A4T d'*A. rhizogenes*.<sup>141</sup>

- Enzymes

- *Pfu*-polymérase (Promega), 3 U/μL
- *Taq*-polymérase (Qbiogene), 5 U/μL
- Easy-A-polymérase (Stratagene), 5 U/μL
- Ligase T-4 (Promega), 3 U/μL
- *Bam*HI (MBI), 10 U/μL
- *Msc*I (NEB), 3 U/μL
- *Ecl*136II (MBI), 12 U/μL
- *Eco*RI (MBI), 10 U/μL
- *Hind*III (MBI), 10 U/μL

Lorsqu'il n'y a pas de précision supplémentaire, les tampons utilisés sont les tampons commerciaux fournis avec les enzymes ou les kits de clonage.

- Oligonucléotides

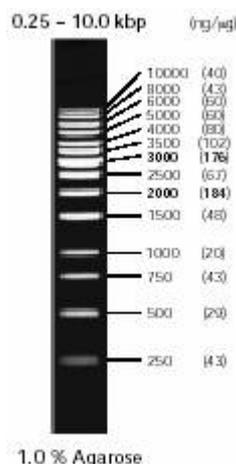
<b>MtGbp1_BamHI_for</b>	5' - ataggatCCATGTCCTTCTACTATCAACA - 3'
<b>MtGbp1_MscI_rev</b>	5' - aattggccAACCTCTGCTATGAATC - 3' 3' - CTAAGTATCGTCTCCAaccggttaa - 5'
<b>MtGbp2_BamHI_for</b>	5' - attggatCcATGTCCTTCTGTTCCCTTTC - 3'
<b>MtGbp2_MscI_rev</b>	5' - atatggccaCCTACTATGAATCCACC - 3' 3' - CCACCTAAGTATCATCCaccggtata - 5'
<b>MtGbp3_BamHI_for</b>	5' - ataggatCcATGACAGATTCAAGTTCAAAT - 3'
<b>MtGbp3_Ecl136_rev</b>	5' - atagagctcTTCTCTACTATAAATCCACC - 3' 3' - CCACCTAAATATCATCTCTTctcgagata - 5'
<b>MtGbp4_BamHI_for</b>	5' - ataggatccATGCATCATTTACCAAAA - 3'
<b>MtGbp4_MscI_rev</b>	5' - tattggCcAATGACAGTAATTACCAAAC - 3' 3' - CAAACCATTAATGACAGTAAcCggttat - 5'
<b>MtGBP10_ATG-For</b>	5' - CACAACAACAACCTCAGTTAAC - 3'
<b>MtGBP10-Stop-Rev</b>	5' - GCAATAAATGGTACAAAGCAGG - 3'
<b>Barrell</b>	5' - TTCGTAATGGATCCAATGATGTCA - 3'
<b>Xho-anti</b>	5' - TGCTGGCTCGAGCTTAGTG - 3'

## 1.6. Gels, extraction des plasmides et purification des gènes

- Les gels utilisés pour évaluer la pureté de la glycosynthase GII E231G, sont des gels SDS-PAGE, colorés au bleu de Coomassie "Brillant Blue R250" (250 mg) dans un mélange éthanol/eau/acide acétique 45-45-10 (100 mL) et décolorés avec une solution éthanol/eau/acide acétique 45-45-10.

- Les gels utilisés pour visualiser et purifier l'ADN lors des essais de clonages sont des gels d'agarose à 0,8%. L'ADN est coloré par fixation du bromure d'éthydiu et visualisé sous

lumière ultra-violette. La taille des fragments d'ADN est évaluée à l'aide du marqueur 1 kb DNA-Leiter (Peggold).



- Les plasmides sont extraits par midiprep en utilisant le kit "Plasmid Midi Kits" (Qiagen) ou par miniprep selon la procédure suivante, en employant les solutions indiquées ci-dessous.

Solution	Composition	
Solution I	D-Glucose	50 mmol/L
	Tris-HCl pH 8	25 mmol/L
	EDTA pH 8	10 mmol/L
Solution II	SDS	1%
	NaOH	0.2 mol/L
Solution III	KAc pH 4.3	3 mol/L
TE	Tris/HCl	10 mmol/L
	EDTA	1 mmol/L

La solution phénol/chloroforme/isoamylalcool (25:24:1) provient de Roth.

1,5 mL d'une culture de 12h d'*E. coli* transformée est transférée dans un tube Eppendorf de 1.5 mL, et centrifugé (1min, à température ambiante, 13200 rpm). Le surnageant est éliminé et les cellules sont à nouveau centrifugées 30 s. Le culot est placé 10 min à -20°C puis les cellules sont mises en suspension dans la solution I (50 µL), vortexées et incubées à température ambiante pendant 5 min. Les cellules sont ensuite mélangées doucement avec la solution II (100 µL) et incubées 5 min à 0°C. Les parties insolubles (parois

---

cellulaires, ADN génomique, protéines) sont précipitées par centrifugation (18000 rpm, 3 min, à 15°C). Le surnageant de cette centrifugation est ajouté à la solution de phénol/chloroforme/isoamylalcool (200 µL). Le mélange est vortexé quelques 2 à 3 secondes, puis centrifugé (5min, à température ambiante, 13200 rpm). Le surnageant est transféré à nouveau, dans un tube Eppendorf contenant de l'éthanol (500 µL), mélangé doucement, et incubé à température ambiante pendant 10 min. L'ADN est finalement collecté par centrifugation (14000 rpm, 5 min, à 15°C) lavé avec une solution d'éthanol à 75%, centrifugé à nouveau (14000 rpm, 3 min, à 15°C), puis séché à 37°C et repris dans le tampon TE (50 µL).

- Les gènes sont purifiés sur gel d'agarose à 0.8% en utilisant le kit de purification NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel) ou par extraction au phénol, et précipités comme indiqué ci-dessous.

- Méthode A : Après purification avec le kit NucleoSpin, les acides nucléiques sont précipités par addition d'une solution d'acétate de sodium 3M, pH 5.2 (10 µL) et d'éthanol (300 µL). Après 12 h à 48 h à -20°C, et centrifugation (14000 rpm, 15 min, à 4°C), l'ADN est lavé avec une solution d'éthanol à 75% (50 µL), centrifugé à nouveau (14000 rpm, 5 min, à 4°C), séché à température ambiante (5 à 10 min) et repris dans l'eau.

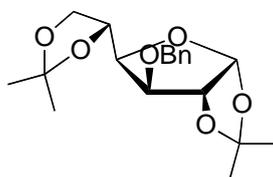
- Méthode B : Pour la purification par extraction au phénol, les produits de PCR sont repris dans un volume total de 50 µL (par ajout d'eau) puis extrait avec la solution phénol/chloroforme/isoamylalcool (50 µL), vortexé 2 à 3 s et centrifugé (5min, à température ambiante, 13200 rpm). Le surnageant est transféré dans un tube Eppendorf contenant de l'isopropanol (28.86 µL), incubé à température ambiante pendant 30 min et centrifugé (14000 rpm, 15 min, à 20°C). L'ADN précipité est lavé avec une solution d'éthanol à 75% (30 µL), centrifugé à nouveau (14000 rpm, 5 min, à 4°C), séché à température ambiante (5 à 10 min) et repris dans l'eau.

Les gènes peuvent également être purifiés sur gel d'agarose "low-melt". Ces gels sont obtenus en utilisant un agarose "low-melting temperature" (LMT, 0.25 g/100 mL de gel). Contrairement à l'agarose usuel, l'agarose LMT se dissout à environ 65°C (~90°C habituellement) et se gélifie au dessous de 30°C (~40°C habituellement).

## 2. Synthèses et caractérisations

La nomenclature utilisée a été adaptée de celle publiée en anglais : "International Union of Pure and Applied Chemistry and International Union of Biochemistry and Molecular Biology" (1997) Nomenclature of carbohydrates, *J. Carbohydr. Chem.*, **16**, 1191-1280.

### 3-*O*-Benzyl-1,2:5,6-di-*O*-isopropylidène- $\alpha$ -D-glucofuranose (**1**)<sup>146</sup> BRN : 1353733

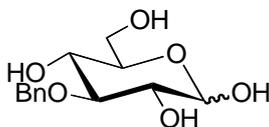


À une solution refroidie à 0°C de 1,2:5,6-di-*O*-isopropylidène- $\alpha$ -D-glucofuranose commercial (2.1 g, 8.1 mmol), dans le DMF anhydre (50 mL), est ajouté de l'hydrure de sodium (2 éq, 350 mg). Le milieu réactionnel est agité pendant 30 min, à 0°C avant l'addition de bromure de benzyle (3 éq, 3 mL) et d'iodure de tétrabutylammonium (quantité catalytique). Après 30 min à 0°C et 12h à température ambiante, le mélange réactionnel est additionné de méthanol (2 mL) puis neutralisé à l'aide de triéthylamine (2 mL). Le mélange est concentré sous pression réduite puis purifié par chromatographie sur gel de silice (éther de pétrole/acétate d'éthyle : 19-1, + 1% de triéthylamine). Le composé benzylé **1** est obtenu avec un rendement de 97% (2.7 g, 7.8 mmol).

**Masse** (DCI) :  $m/z = 351 [M+H]^+$

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) :  $\delta$  (ppm) = 7.46-7.27 (m, 5H, H<sub>arom</sub>) ; 5.90 (d, 1H, H-1,  $J_{1,2} = 3.9$ Hz) ; 4.66 (d, 2H, -CH<sub>2</sub>-) ; 4.58 (d, 1H, H-2) ; 4.17-4.08 (m, 2H, H-5, H-6a) ; 4.03-3.97 (m, 2H, H-3, H-6b) ; 1.49, 1.43, 1.37, 1.31 (4s, 12H, -CH<sub>3</sub>)

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 75MHz) :  $\delta$  (ppm) = 137.7, 128.4, 127.8, 127.7 (C<sub>arom</sub>) ; 111.8, 109.0 (C<sub>q</sub>), 105.3 (C-1) ; 82.7 (C-2) ; 81.7 (C-3) ; 81.4 (C-4) ; 72.6, 72.4 (-CH<sub>2</sub>-, C-5) ; 67.4 (C-6) ; 26.9, 26.8, 26.3, 25.4 (CH<sub>3</sub>)

**3-O-Benzyl-D-glucopyranose (2)** BRN : 2056243

À une suspension du produit **1** (2.35 g, 6.7 mmol) dans l'eau (100 mL) est additionnée de la résine Amberlite IR-120 (20 g). Après 4h à 40°C la résine est éliminée par filtration ; le milieu réactionnel est évaporé à sec pour conduire au 3-O-benzyl-glucose **2** avec un rendement de 97% (1.77 g, 6.5 mmol).

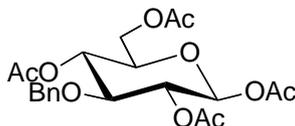
anomère  $\beta$

**Point de fusion** : 133°C (acétate d'éthyle) lit.<sup>147</sup>132-134°C

**Masse** (ESI) :  $m/z = 293 [M+NH_4]^+$

**RMN <sup>1</sup>H** (D<sub>2</sub>O, 300MHz) :  $\delta$  (ppm) = 7.35-7.30 (m, 5H, H<sub>arom</sub>) ; 4.76 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-) ; 4.53 (d, 1H, H-1,  $J_{1,2} = 7.8$ Hz) ; 3.77 (dd, 1H, H-6a) ; 3.59 (dd, 1H, H-6b) ; 3.42-3.34 (m, 3H, H-2, H-4, H-5) ; 3.23 (m, 1H, H-3)

**RMN <sup>13</sup>C** (D<sub>2</sub>O, 75MHz) :  $\delta$  (ppm) = 135.2, 126.4, 126.3, 126.0 (C<sub>arom</sub>) ; 93.6 (C-1) ; 81.6 (C-3) ; 73.6, 72.5, 71.6 (C-2, C-5, -CH<sub>2</sub>-) ; 67.0 (C-4) ; 58.4 (C-6)

**1,2,4,6-Tétra-O-acétyl-3-O-benzyl- $\beta$ -D-glucopyranose (3)** BRN : 4277988

Une solution d'anhydride acétique (10 éq, 1.5 mL) contenant de l'acétate de sodium (1 éq, 122 mg) est portée à reflux puis le benzyl-glucose **2** (400 mg, 1.5 mmol) est ajouté en plusieurs portions. Le milieu réactionnel est agité pendant 30 min à reflux puis versé dans l'eau glacée et dilué par du dichlorométhane. La phase organique est lavée à l'eau, puis séchée

sur sulfate de sodium anhydre et concentrée sous pression réduite. Le produit acétylé **3** est obtenu avec un rendement de 45 % (290 mg, 0.66 mmol) après recristallisation dans l'éthanol.

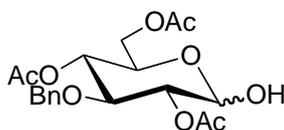
**Point de fusion** : 101°C (éthanol) lit.<sup>147</sup>105-107°C

**Masse** (DCI) :  $m/z = 456 [M+NH_4]^+$

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) :  $\delta$  (ppm) = 7.37-7.20 (m, 5H, C<sub>arom</sub>); 5.65 (d,  $J_{1,2} = 8.2$ Hz, 1H, H-1) ; 5.16 (dd, 1H, H-2) ; 5.15 (t, 1H, H-4) ; 4.61 (s, 2H, Ph-CH<sub>2</sub>-) ; 4.22 (dd, 1H, H-6a) ; 4.10 (dd, 1H, H-6b) ; 3.75 (t, 1H, H-3) ; 3.72 (m, 1H, H-5) ; 2.10-1.98 (m, 12H, -CH<sub>3</sub>)

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 75MHz) :  $\delta$  (ppm) = 170.7, 169.2, 169.0 (C=O) ; 137.6, 128.5, 128.0, 127.8 (C<sub>arom</sub>) ; 92.0 (C-1) ; 80.0 (C-3) ; 74.2, 73.0, 71.6 (C-2, C-5, -CH<sub>2</sub>-) ; 69.1 (C-4) ; 61.8 (C-6) ; 20.8, 20.7 (-CH<sub>3</sub>)

**2,4,6-Tri-O-acétyl-3-O-benzyl-D-glucopyranose (4)** BRN : 7663199



À une solution du composé **3** (295 mg, 674  $\mu$ mol) dans le DMF (1 mL) est ajouté de l'acétate d'hydrazine (1.5 éq, 93 mg). Le milieu réactionnel est agité pendant 2 h à 50°C. La solution est diluée avec de l'acétate d'éthyle (5 mL), lavée avec une solution saturée de chlorure de sodium (2x5 mL) et de l'eau. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre puis concentrée sous pression réduite. Le mélange est purifié par chromatographie sur gel de silice (éther de pétrole/acétate d'éthyle : 2-1). Le composé **4** est obtenu avec un rendement de 63 % (168 mg, 424  $\mu$ mol).

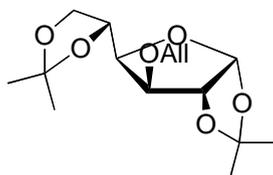
**Masse** (DCI) :  $m/z = 414 [M+NH_4]^+$

anomère  $\alpha$

**RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) :  $\delta$  (ppm) = 7.35-7.20 (m, 5H,  $\text{C}_{\text{arom}}$ ) ; 5.45 (d, 1H, H-1,  $J_{1,2} = 3.7\text{Hz}$ ) ; 5.09 (t, 1H, C-4) ; 4.87 (dd, 1H, H-2) ; 4.66 (q, 1H, Ph- $\text{CH}_2$ -) ; 4.20-4.07 (m, 4H, H-5, H-6a, H-6b) ; 4.04 (t, 1H, H-3) ; 2.08, 2.06, 1.95 (3s, 9H,  $\text{CH}_3$ )

**RMN  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 75MHz) :  $\delta$  (ppm) = 171.0, 170.1, 169.5 (C=O) ; 138.2-127.6 ( $\text{C}_{\text{arom}}$ ) ; 90.3 (C-1) ; 76.9, 74.9, 73.4, 69.8, 67.8 (C-2, C-3, C-4, C-5,  $-\text{CH}_2-$ ) ; 62.3 (C-6), 20.8-20.7 ( $\text{CH}_3$ )

**3-*O*-Allyl-1,2:5,6-di-*O*-isopropylidène- $\alpha$ -D-glucofuranose (5)**<sup>146</sup> BRN : 1350571



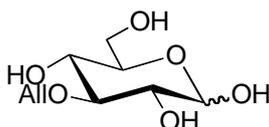
À une solution refroidie à  $0^\circ\text{C}$  de 1,2:5,6-di-*O*-isopropylidène- $\alpha$ -D-glucofuranose commercial (20 g, 77 mmol), dans le DMF anhydre (400 mL), est ajouté de l'hydrure de sodium (2 éq, 3.7 g). Le milieu réactionnel est agité pendant 30 min, à  $0^\circ\text{C}$  avant l'addition du bromure d'allyle (1.1 éq, 7.2 mL). Après 1h à  $0^\circ\text{C}$  l'excès d'hydrure de sodium est détruit par addition de méthanol (15 mL). La solution est diluée avec de l'éther (300 mL) et lavée à l'eau. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre puis concentrée sous pression réduite. Le composé allylé **5**, obtenu sous forme d'huile, avec un rendement quantitatif, est utilisé sans autre purification.

**Masse (DCI) :**  $m/z = 318$   $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$

**RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz) :  $\delta$  (ppm) = 5.95-5.83 (m, 1H, =CH-) ; 5.87 (d,  $J_{1,2} = 3.5\text{Hz}$ , 1H, H-1) ; 5.32-5.17 (m, 2H,  $\text{CH}_2=$ ) ; 4.53 (d, 1H, H-2) ; 4.30 (m, 1H, H-5) ; 4.17-4.06 (m, 4H, H-4,  $-\text{CH}_2-$ , H-6a) ; 3.99 (dd, 1H, H-6b) ; 3.94 (d, 1H, H-3) ; 1.49, 1.42, 1.34, 1.30 (4s, 12H,  $\text{CH}_3$ )

**RMN  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 100MHz) :  $\delta$  (ppm) = 134.1 (=CH-); 117.3 ( $\text{CH}_2=$ ) ; 111.7, 108.9 ( $2\text{C}_q$ ) ; 105.2 (C-1) ; 82.7 (C-2) ; 81.4 (C-3) ; 81.1 ( $-\text{CH}_2-$ ) ; 72.5 (C-5) ; 71.3 (C-4) ; 67.3 (C-6) ; 26.8-25.4 ( $\text{CH}_3$ )

**3-O-Allyl-D-glucopyranose (6)** <sup>148, 149</sup> BRN : 4184519



À une suspension du produit **5** (23.1 g) dans l'eau (600 mL) est additionnée de la résine Amberlite IR-120 (220 g). Après 48h à 40°C la résine est filtrée, le milieu réactionnel est concentré puis lyophilisé pour conduire à l'allyl-glucose **6** avec un rendement de 97% (16.5 g, 75 mmol).

**Masse** (ESI) :  $m/z = 243$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$

anomère  $\alpha$

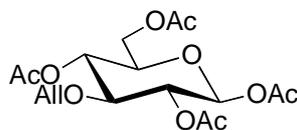
**RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz) :  $\delta$  (ppm) = 5.79 (m, 1H, =CH-) ; 5.17-5.04 (m, 2H,  $\text{CH}_2=$ ) ; 5.01 (d,  $J_{1,2} = 3.4\text{Hz}$ , 1H, H-1) ; 4.15 (d, 2H,  $-\text{CH}_2-$ ) ; 3.70-3.48 (m, 2H, H-6a, H-6b) ; 3.45-3.35 (m, 2H, H-2, H-3) ; 3.26 (m, 2H, H-4, H-5)

**RMN  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 100MHz) :  $\delta$  (ppm) = 133.1 (=CH-); 117.5 ( $\text{CH}_2=$ ) ; 91.1 (C-1) ; 79.8 (C-3) ; 74.8 (C-4) ; 73.0 ( $-\text{CH}_2-$ ) ; 70.5 (C-5) ; 70.2 (C-2) ; 59.4 (C-6)

anomère  $\beta$

**RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400MHz) :  $\delta$  (ppm) = 5.79 (m, 1H, =CH-) ; 5.17-5.04 (m, 2H,  $\text{CH}_2=$ ) ; 4.44 (d,  $J_{1,2} = 7.9\text{Hz}$ , 1H, H-1) ; 4.15 (d, 2H,  $-\text{CH}_2-$ ) ; 3.70-3.48 (m, 2H, H-6a, H-6b) ; 3.28-3.19 (m, 3H, H-3, H-4, H-5) ; 3.08 (t, 1H, H-2)

**RMN  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 100MHz) :  $\delta$  (ppm) = 133.1 (=CH-) ; 117.4 ( $\text{CH}_2=$ ) ; 94.8 (C-1) ; 82.4 (C-3) ; 74.8 (C-4) ; 72.9 (C-2) ; 72.8 ( $-\text{CH}_2-$ ) ; 68.2 (C-5) ; 59.6 (C-6)

**1,2,4,6-Tétra-O-acétyl-3-O-allyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (7)** BRN : 3570581

Une solution d'anhydride acétique (10 éq, 25 mL) contenant de l'acétate de sodium (1 éq, 2.2 g) est portée à reflux puis l'allyl-glucose **6** (5.9 g, 27 mmol) est ajouté en plusieurs portions. Le milieu réactionnel est agité pendant 30 min à reflux puis versé dans l'eau glacée et dilué par du dichlorométhane. La phase organique est lavée à l'eau, puis séchée sur sulfate de sodium anhydre et concentrée sous pression réduite. Le produit acétylé **7** est obtenu avec un rendement de 85 % (8.9 g, 23 mmol).

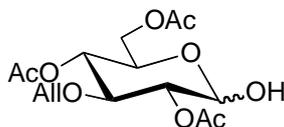
**Point de fusion** : 118°C (éthanol) lit.<sup>149</sup> 119-120°C

$[\alpha]_D$  : -1.3 (*c* 1.0, chloroforme) lit.<sup>149</sup>  $[\alpha]_D$  : -1.5 (*c* 1.9, chloroforme)

**Masse (DCI)** :  $m/z = 406 [M+NH_4]^+$

**RMN  $^1H$**  (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) :  $\delta$  (ppm) = 5.76 (m, 1H, =CH-) ; 5.64 (d,  $J_{1,2} = 8\text{Hz}$ , 1H, H-1); 5.24-5.04 (m, 4H, CH<sub>2</sub>=, H-2, H-4) ; 4.21 (dd, 1H, H-6a) ; 4.12-4.05 (m, 3H, H-6b, -CH<sub>2</sub>-) ; 3.72 (m, 1H, H-5) ; 3.63 (t, 1H, H-3) ; 2.10-2.05 (m, 12H, -CH<sub>3</sub>)

**RMN  $^{13}C$**  (CDCl<sub>3</sub>, 75MHz) :  $\delta$  (ppm) = 170.7, 169.2, 169 (C=O) ; 134.0 (=CH-) ; 117.2 (CH<sub>2</sub>=) ; 92.0 (C-1) ; 79.7, 73.1, 73.0, 71.5, 69.0 (C-2, C-3, C-4, C-5, -CH<sub>2</sub>-) ; 61.8 (C-6) ; 20.8-20.7 (CH<sub>3</sub>)

**2,4,6-Tri-O-acétyl-3-O-allyl-D-glucopyranose (8)** BRN : 4762195

À une solution du composé **7** (4.6 g, 12 mmol) dans le DMF (12 mL) est ajouté de l'acétate d'hydrazine (1.5 éq, 1.6 g). Le milieu réactionnel est agité pendant 4 h à 50°C. La solution est diluée avec de l'acétate d'éthyle (40 mL), lavée avec une solution saturée de chlorure de sodium (2 fois) et de l'eau. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre puis concentrée sous pression réduite. Le mélange est purifié par chromatographie sur gel de silice (éther de pétrole/acétate d'éthyle : 2-1 puis 1-1). Le composé **8** est obtenu avec un rendement de 32% (1.32 g, 3.8 mmol).

**Masse** (DCI) :  $m/z = 364 [M+NH_4]^+$

anomère  $\alpha$

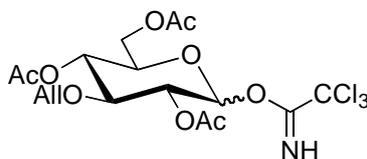
**RMN  $^1H$**  (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) :  $\delta$  (ppm) = 5.80 (m, 1H, =CH-) ; 5.42 (d, 1H, H-1,  $J_{1,2} = 3.7$ Hz); 5.24-5.10 (m, 2H, CH<sub>2</sub>=) ; 5.02 (t, 1H, H-4) ; 4.80 (dd, 1H, H-2) ; 4.20-4.03 (m, 5H, H-5, H-6a, H-6b, -CH<sub>2</sub>-) ; 3.91 (t, 1H, H-3) ; 2.12-2.07 (3s, 9H, CH<sub>3</sub>)

**RMN  $^{13}C$**  (CDCl<sub>3</sub>, 75MHz) :  $\delta$  (ppm) = 166.4, 165.7, 165.1 (C=O); 134.4 (=CH-) ; 117.3 (CH<sub>2</sub>=) ; 90.5 (C-1) ; 76.4, 73.7, 73.3, 69.8, 67.6 (C-2, C-3, C-4, C-5, -CH<sub>2</sub>-) ; 62.3 (C-6), 20.9-20.7 (CH<sub>3</sub>)

anomère  $\beta$

**RMN  $^1H$**  (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) :  $\delta$  (ppm) = 4.61 (d, 1H, H1,  $J_{1,2} = 8.0$  Hz) ; 3.62 (m, 1H, H-5), 3.60 (t, 1H, H-3)

**RMN  $^{13}C$**  (CDCl<sub>3</sub>, 75MHz) :  $\delta$  (ppm) = 95.7 (C-1)

**Trichloroacétimide de 2,4,6-tri-*O*-acétyl-3-*O*-allyl-D-glucopyranosyle (9)** BRN : 5891852

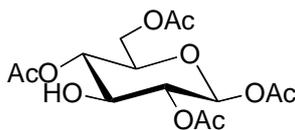
À une solution refroidie à 0°C du composé **8** (470 mg, 1.36 mmol) dans le dichlorométhane anhydre (4 mL) sont additionnés du trichloroacétonitrile (3 éq, 400 µL) et du DBU (0.3 éq, 60 µL). Le milieu réactionnel, maintenu sous argon, est agité pendant 12 h à température ambiante. Le mélange est concentré sous pression réduite puis purifié par chromatographie sur gel de silice (éther de pétrole/acétate d'éthyle : 2-1). L'imide **9** est obtenu avec un rendement de 88% (585 mg, 1.19 mmol).

**Masse** (ESI) :  $m/z = 513 [M+Na]^+$

anomère  $\alpha$

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) :  $\delta$  (ppm) = 8.65 (s, 1H, NH) ; 6.52 (d, 1H, H-1,  $J_{1,2} = 3.7$ Hz) ; 5.80 (m, 1H, =CH-) ; 5.25-5.10 (m, 3H, CH<sub>2</sub>=, H-4) ; 5.03 (dd, 1H, H-2) ; 4.23-4.06 (m, 5H, H-6a, H-6b, H-5, -CH<sub>2</sub>-) ; 3.96 (t, 1H, H-3) ; 2.09, 2.06, 2.04 (3s, 9H, -CH<sub>3</sub>-)

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 75MHz) :  $\delta$  (ppm) = 169.7-169.2 (C=O) ; 160.7 (C=N) ; 134.3 (=CH-) ; 116.9 (CH<sub>2</sub>=) ; 93.4 (C-1) ; 76.5, 73.7, 72.0, 70.6, 68.9 (C-2, C-3, C-4, C-5, -CH<sub>2</sub>-) ; 61.7 (C-6) ; 26.9 (CCl<sub>3</sub>) ; 20.8, 20.7, 20.6 (CH<sub>3</sub>)

**1,2,4,6-Tétra-*O*-acétyl- $\beta$ -D-glucopyranose (10)** BRN : 95910

À une solution du composé **7** (100 mg, 260 µmol) dans le méthanol (3 mL) est additionné du chlorure de palladium (0.3 éq, 14 mg). Le milieu réactionnel, est agité pendant 2 h à température ambiante. La solution est diluée dans le dichlorométhane, filtrée sur Célite,

concentrée sous pression réduite puis purifié par chromatographie sur gel de silice (éther de pétrole/acétate d'éthyle : 3-2, 1% de triéthylamine). Le composé **10** est obtenu avec un rendement de 61% (55 mg, 158  $\mu$ mol).

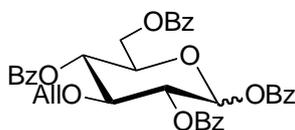
**Point de fusion** : 124°C (dichlorométhane/éther) lit.<sup>150</sup> 124-126°C

**Masse (DCI)** :  $m/z = 364 [M+NH_4]^+$

**RMN  $^1H$**  (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) :  $\delta$  (ppm) = 5.66 (d, 1H, H-1,  $J_{1,2} = 8.4$ Hz) ; 4.99 (dd, 1H, H-2) ; 4.97 (t, 1H, H-4) ; 4.29 (dd, 1H, H-6a) ; 4.12 (dd, H-6b) ; 3.81-3.73 (m, 2H, H-3, H-5) ; 2.11-2.06 (4s, 12H, CH<sub>3</sub>)

**RMN  $^{13}C$**  (CDCl<sub>3</sub>, 75MHz) :  $\delta$  (ppm) = 170.6-169.1 (C=O) ; 91.6 (C-1) ; 73.8 (C-3) ; 72.9 (C-2) ; 72.8 (C-5) ; 70.4 (C-4) ; 61.7 (C-6) ; 20.8-20.7 (CH<sub>3</sub>)

### 3-*O*-Allyl-1,2,4,6-tétra-*O*-benzoyl-D-glucopyranose (**11**)



À une solution refroidie à 0°C du composé **6** (8.9 g, 40 mmol) dans la pyridine anhydre (150 mL) est ajouté du chlorure de benzoyle (6 éq, 30 mL). Le milieu réactionnel est agité pendant 12 h à température ambiante. La solution est diluée avec du dichlorométhane, lavée successivement avec une solution saturée d'hydrogénosulfate de potassium, une solution saturée de chlorure de sodium et de l'eau. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre puis concentrée. Le produit benzoylé **11** est obtenu avec un rendement quantitatif.

anomère  $\beta$

**Point de fusion** : 192°C (éthanol)

**Masse (FAB)** :  $m/z = 659 [M+Na]^+$

**Analyse élémentaire** pour C<sub>37</sub>H<sub>32</sub>O<sub>10</sub>

Théorique : C 69.80, H 5.07 ; Trouvée : C 69.66, H 5.09

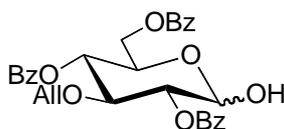
**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz) : δ (ppm) = 8.10-7.35 (m, 20H, H<sub>arom</sub>); 6.18 (d, J<sub>1,2</sub> = 8Hz, 1H, H-1); 5.71-5.55(m, 3H, H-2, H-4, =CH-); 5.11-4.94 (m, 2H, CH<sub>2</sub>=); 4.63 (dd, 1H, H-6a); 4.45 (dd, 1H, H-6b); 4.27 (m, 1H, H-5); 4.42-4.10 (m, 3H, H-3, -CH<sub>2</sub>-)

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 100MHz) : δ (ppm) = 166.2-164.8 (C=O); 134.0 (=CH-); 133.7-128.3 (C<sub>arom</sub>); 117.8 (CH<sub>2</sub>=); 92.6 (C-1); 79.2 (C-3); 73.4 (-CH<sub>2</sub>-); 73.2 (C-5); 72.0 (C-2); 70.4 (C-4); 63.0 (C-6)

anomère α

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz) : δ (ppm) = 8.10-7.35 (m, 20H, H<sub>arom</sub>); 6.76 (d, J<sub>1,2</sub> = 3.7Hz, 1H, H-1); 5.71-5.55(m, 2H, H-4, =CH-); 5.52 (dd, 1H, H-2); 5.11-4.94 (m, 2H, CH<sub>2</sub>=); 4.60 (dd, 1H, H-6a); 4.50 (m, 1H, H-5); 4.41 (dd, 1H, H-6b); 4.38 (t, 1H, H-3); 4.17 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-)

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 100MHz) : δ (ppm) = 166.2-164.4 (C=O); 134.2 (=CH-); 133.7-128.3 (C<sub>arom</sub>); 117.4 (CH<sub>2</sub>=); 90.4 (C-1); 76.9 (C-3); 73.9-70.5 (C-2, C-4, C-5, -CH<sub>2</sub>-); 62.7 (C-6)

**3-O-Allyl-2,4,6-tri-O-benzoyl-D-glucopyranose (12)**

À une solution du composé **11** (9 g, 14 mmol), dans le THF, est ajoutée une solution de méthylamine à 33% dans l'éthanol (9.5 mL). Le milieu réactionnel est agité pendant 3 h à température ambiante. Le mélange est concentré sous pression réduite puis purifié par chromatographie sur gel de silice (chloroforme/acétone : 50-1). Le composé **12** est obtenu avec un rendement de 86% (6.5 g, 12 mmol).

anomère α

**Point de fusion** : 167°C (éthanol)

**Masse (DCI) :**  $m/z = 550 [M+NH_4]^+$

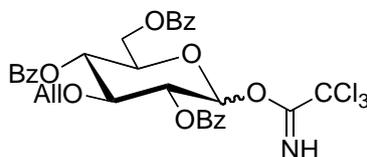
**Analyse élémentaire** pour  $C_{30}H_{28}O_9$

Théorique : C 67.66, H, 5.30 ; Trouvée : C 67.49, H 5.41

**RMN  $^1H$**  ( $CDCl_3$ , 400MHz) :  $\delta$  (ppm) = 8.28-7.38 (m, 15H,  $H_{arom}$ ); 5.67-5.58 (m, 2H, =CH-, H-1,  $J_{1,2} = 3.6Hz$ ); 5.53 (t, 1H, H-4); 5.15 (dd, 1H, H-2); 5.09-4.91 (m, 2H,  $CH_2=$ ); 4.60 (dd, 1H, H-6a); 4.45 (m, 1H, H-5); 4.35 (dd, 1H, H-6b); 4.30 (t, 1H, H-3); 4.19-4.08 (m, 2H, - $CH_2-$ )

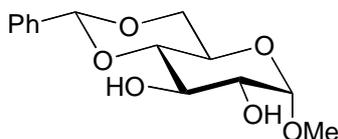
**RMN  $^{13}C$**  ( $CDCl_3$ , 100MHz) :  $\delta$  (ppm) = 166.4, 165.7, 165.1 (C=O); 134.4 (=CH-); 133.4-128.5 ( $C_{arom}$ ); 117.3 ( $CH_2=$ ); 90.5 (C-1); 76.4 (C-3); 74.0 (- $CH_2-$ ); 73.8 (C-2); 70.9 (C-4); 67.8 (C-5); 63.0 (C-6)

### Trichloroacétimide de 3-*O*-allyl-2,4,6-tri-*O*-benzoyl-D-glucopyranosyle (**13**)



À une solution, refroidie à 0°C du composé **12** (6.5 g, 12.2 mmol) dans le dichlorométhane anhydre (45 mL) sont additionnés du trichloroacétonitrile (3 éq, 3.7 mL) et du DBU (0.3 éq, 560  $\mu$ L). Le milieu réactionnel, maintenu sous argon, est agité pendant 12 h à température ambiante. Le mélange est concentré sous pression réduite puis purifié par chromatographie sur gel de silice (éther de pétrole/acétate d'éthyle : 6-1). L'imide **13** est obtenu avec un rendement de 93% (7.7 g, 11.4 mmol).

**Masse (CI) :**  $m/z = 695 [M+NH_4]^+$

**4,6-*O*-Benzylidène- $\alpha$ -D-glucopyranoside de méthyle (14)** BRN : 1291458

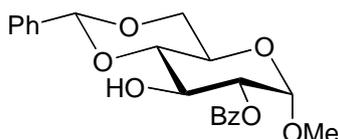
À une solution d' $\alpha$ -D-glucopyranoside de méthyle (10 g, 52 mmol) dans un mélange DMF/chloroforme 5:255 (300 mL) sont additionnés du benzaldéhyde diméthylacétal (1.4 éq, 11 g) et de l'acide camphorsulfonique (0.004 éq, 50 mg). Le milieu réactionnel est agité pendant 12 h à 70°C. La réaction est arrêtée par ajout de carbonate de potassium (5 g, 36 mmol). Le mélange est filtré à chaud, concentré sous pression réduite puis purifié par cristallisation dans un mélange chloroforme/hexane. Le composé **14** est obtenu avec un rendement de 35% (5.1 g, 18 mmol).

**Point de fusion** : 166°C (chloroforme/hexane) lit.<sup>151</sup> 166-167°C

**Masse** (ESI) :  $m/z = 281$  [M-H]<sup>-</sup>

**RMN <sup>1</sup>H** (CD<sub>3</sub>OD, 400MHz) :  $\delta$  (ppm) = 7.51-7.33 (m, 5H, H<sub>arom</sub>) ; 5.57 (s, 1H, H-7) ; 4.73 (d, 1H, H-1,  $J_{1,2} = 3.8$ Hz) ; 4.22 (m, 1H, H-6a) ; 3.82 (t, 1H, H-3) ; 3.76-3.73 (m, 2H, H-5, H-6b) ; 3.52 (dd, 1H, H-2) ; 3.45 (t, 1H, H-4) ; 3.43 (3H, -O-CH<sub>3</sub>)

**RMN <sup>13</sup>C** (CD<sub>3</sub>OD, 100MHz) :  $\delta$  (ppm) = 130.7-128.4 (C<sub>arom</sub>) ; 103.9 (C-7) ; 102.9 (C-1) ; 83.7 (C-4) ; 74.9 (C-2) ; 72.9 (C-3) ; 70.9 (C-6) ; 64.7 (C-5) ; 56.6 (-O-CH<sub>3</sub>)

**2-*O*-Benzoyl-4,6-*O*-benzylidène- $\alpha$ -D-glucopyranoside de méthyle (15)** BRN : 96098

À une solution, refroidie à -35°C du composé **14** (8.65 g, 30 mmol) dans le dichlorométhane anhydre (90 mL), en présence de tamis moléculaire 3Å, est additionnée de la

triéthylamine (4.7 mL). Le milieu réactionnel est agité pendant 20 min à  $-35^{\circ}\text{C}$  avant l'addition goutte à goutte de chlorure de benzoyle (1 éq, 3.5 mL). Le milieu réactionnel est agité pendant 12 h à  $-35^{\circ}\text{C}$  puis additionné de méthanol (19.5 mL). Le mélange est filtré sur coton, concentré sous pression réduite puis purifié par chromatographie sur gel de silice (éther de pétrole/acétate d'éthyle : 4-1). Le composé **15** est obtenu avec un rendement de 77% (9 g, 23 mmol).

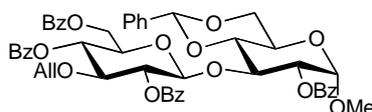
**Point de fusion** :  $170^{\circ}\text{C}$  (acétate d'éthyle/éther de pétrole) lit.<sup>152</sup>  $168-170^{\circ}\text{C}$

**Masse** (DCI) :  $m/z = 387$   $[\text{M}+\text{H}]^{+}$

**RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz) :  $\delta$  (ppm) = 8.12-7.38 (m, 10H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ) ; 5.58 (s, 1H, H-7) ; 5.08 (d, 1H, H-1,  $J_{1,2} = 3.8\text{Hz}$ ) ; 5.04 (dd, 1H, H-2) ; 4.35 (dd, 1H, H-3) ; 4.33 (dd, 1H, H-6a) ; 3.92 (ddd, 1H, H-5) ; 3.80 (t, 1H, H-6b) ; 3.63 (t, 1H, H-4) ; 3.40 (s, 3H,  $-\text{O}-\text{CH}_3$ ) ; 2.59 (s, 1H, OH)

**RMN  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 100MHz) :  $\delta$  (ppm) = 166.2 (C=O) ; 137.0-126.3 ( $\text{C}_{\text{arom}}$ ) ; 102.0 (C-7) ; 97.7 (C-1) ; 81.4 (C-4) ; 74.1 (C-2) ; 68.9 (C-3) ; 68.8 (C-6) ; 62.0 (C-5) ; 55.5 ( $-\text{O}-\text{CH}_3$ )

**(3-*O*-Allyl-2,4,6-tri-*O*-benzoyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 3)-2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidène- $\alpha$ -D-glucopyranoside de méthyle (**16**)**



Du triflate de triméthylsilyle (0.28 éq, 130  $\mu\text{L}$ ) est ajouté à une solution contenant l'imidate **13** (1.4 éq, 2.5 g, 3.70 mmol) et le composé **14** (1 éq, 1 g, 2.59 mmol), dans le dichlorométhane anhydre (40 mL), en présence de tamis moléculaire 4Å. Le milieu réactionnel est agité sous argon pendant 45 min, à  $-15^{\circ}\text{C}$ . Le triflate de triméthylsilyle est décomposé par ajout de triéthylamine (200  $\mu\text{L}$ ) et le tamis moléculaire est éliminé par filtration sur célite. Le filtrat est concentré sous pression réduite puis purifié par

chromatographie sur gel de silice (éther de pétrole/acétate d'éthyle : 4-1). Le disaccharide **16** est obtenu avec un rendement de 83 % (1.94 g, 2.16 mmol).

**Point de fusion** : 199°C (éthanol)

$[\alpha]_D$  : +28 (*c* 1.0, chloroforme)

**Masse** (ESI) :  $m/z = 923 [M+Na]^+$

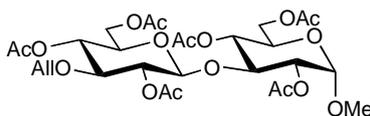
**Analyse élémentaire** pour  $C_{51}H_{48}O_{15}$

Théorique : C 67.99, H 5.37 ; Trouvée : C 67.84, H 5.41

**RMN  $^1H$**  ( $CDCl_3$ , 400MHz) :  $\delta$  (ppm) = 8.00-7.15 (m, 20H,  $H_{arom}$ ) ; 5.61 (s, 1H,  $H-7^I$ ) ; 5.45 (t, 1H,  $H-4^{II}$ ) ; 5.44 (m, 1H, =CH-) ; 5.33 (dd, 1H,  $H-2^{II}$ ) ; 5.01 (2d, 2H,  $H-1^I$ ,  $J_{1,2} = 3.9Hz$ ,  $H-1^{II}$ ,  $J_{1,2} = 7.6Hz$ ) ; 4.98 (dd, 1H,  $H-2^I$ ) ; 4.86 (m, 2H,  $CH_2=$ ) ; 4.53 (dd, 1H,  $H-6a^{II}$ ) ; 4.42 (t, 1H,  $H-3^I$ ) ; 4.35 (dd, 1H,  $H-6b^{II}$ ) ; 4.28 (dd, 1H,  $H-6a^I$ ) ; 3.91 (d, 2H,  $-CH_2-$ ) ; 3.84 (t, 1H,  $H-4^I$ ) ; 3.87-3.75 (m, 3H,  $H-5^I$ ,  $H-5^{II}$ ,  $H-6b^{II}$ ) ; 3.77 (t, 1H,  $H-3^{II}$ ) ; 3.40 (s, 3H,  $-O-CH_3$ )

**RMN  $^{13}C$**  ( $CDCl_3$ , 100MHz) :  $\delta$  (ppm) = 166.3, 165.2, 165.0, 164.7 (C=O) ; 137.2 (=CH-) ; 134,1-126,0 ( $C_{arom}$ ) ; 117.4 ( $CH_2=$ ) ; 101.2 ( $C-7^I$ ,  $C-1^{II}$ ) ; 97.3 ( $C-1^I$ ) ; 79.5, 79.3 ( $C-4^I$ ,  $C-3^{II}$ ) ; 75.7 ( $C-3^I$ ) ; 74.0 ( $C-2^I$ ) ; 73.2 ( $C-2^{II}$ ) ; 72.8 ( $-CH_2-$ ) ; 71.9 ( $C-5^{II}$ ) ; 71.1 ( $C-4^{II}$ ) ; 68.8 ( $C-6^I$ ) ; 63.6 ( $C-6^{II}$ ) ; 62.5 ( $C-5^I$ ) ; 55.3 ( $-O-CH_3$ )

**(2,4,6-Tri-O-acétyl-3-O-allyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 3)-2,4,6-tri-O-acétyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside de méthyle (17)**



Une solution de méthanolate de sodium dans le méthanol (1 mol/L, 10 mL) est ajoutée à une solution refroidie à 0°C du composé **16** (1.02 g, 1.13 mmol) dans le méthanol (100 mL). Le milieu réactionnel est agité pendant 4 h à température ambiante. La solution est neutralisée

avec de la résine Amberlite IR-120, filtrée et concentrée. Le solide obtenu est dissous dans l'acide acétique à 60 % (20 mL) et chauffé à 90°C pendant 30 min. La solution est concentrée et co-évaporée au toluène. Le résidu est repris dans un mélange pyridine/anhydride acétique 1:1 (12 mL) en présence de DMAP (quantité catalytique), et agité pendant 12 h à température ambiante. L'anhydride acétique est détruit par addition de méthanol à 0°C. La solution est concentrée puis diluée avec du dichlorométhane, lavée successivement à l'eau, avec une solution d'hydrogénocarbonate de sodium, à l'eau, séchée sur sulfate de sodium anhydre puis concentrée sous pression réduite. Après purification par chromatographie rapide sur gel de silice (cyclohexane/acétate d'éthyle : 2-1), le composé **17** est obtenu avec un rendement de 92 % (674 mg, 1.04 mmol).

**Point de fusion** : 181°C (éthanol)

$[\alpha]_D^{25}$  : +35 (*c* 1.0, chloroforme)

**Masse (DCI)** :  $m/z = 666 [M+NH_4]^+$

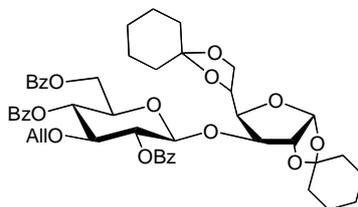
**Analyse élémentaire** pour  $C_{28}H_{40}O_{17}$

Théorique : C 51.85, H 6.22 ; Trouvée : C 51.97, H 6.25

**RMN  $^1H$**  ( $CDCl_3$ , 400MHz) :  $\delta$  (ppm) = 5.72 (m, 1H, =CH-) ; 5.19-5.07 (m, 2H,  $CH_2=$ ) ; 5.01 (t, 1H, H-4<sup>I</sup>) ; 4.96 (t, 1H, H-4<sup>II</sup>) ; 4.89-4.83 (m, 3H, H-2<sup>II</sup>, H-2<sup>I</sup>, H-1<sup>I</sup>,  $J_{1,2} = 4.0$ Hz) ; 4.55 (d, 1H, H-1<sup>II</sup>,  $J_{1,2} = 8.1$ Hz) ; 4.25 (dd, 1H, H-6a<sup>I</sup>) ; 4.17 (dd, 1H, H-6a<sup>II</sup>) ; 4.12 (dd, 1H, H-6b<sup>II</sup>) ; 4.09 (t, 1H, H-3<sup>II</sup>) ; 4.02 (dd, 1H, H-6b<sup>I</sup>) ; 4.00 (d, 2H, - $CH_2-$ ) ; 3.90 (m, 1H, H-5<sup>II</sup>) ; 3.53 (m, 1H, H-5<sup>I</sup>) ; 3.50 (t, 1H, H-3<sup>I</sup>) ; 3.39 (s, 3H, -O- $CH_3$ ) ; 2.17-2.01 (m, 9H,  $COCH_3$ )

**RMN  $^{13}C$**  ( $CDCl_3$ , 100MHz) :  $\delta$  (ppm) = 170.7-168.8 (6 x C=O) ; 134.1 (=CH-) ; 116.8 ( $CH_2=$ ) ; 101.0 (C-1<sup>II</sup>) ; 96.7 (C-1<sup>I</sup>) ; 79.9 (C-3<sup>I</sup>) ; 75.9 (C-3<sup>II</sup>) ; 72.8 (C-2<sup>I</sup>) ; 72.2 (- $CH_2-$ ) ; 72.1 (C-2<sup>II</sup>) ; 71.9 (C-5<sup>I</sup>) ; 69.2 (C-4<sup>I</sup>) ; 68.0 (C-4<sup>II</sup>) ; 67.3 (C-5<sup>II</sup>) ; 62.1 (C-6<sup>I</sup>, C-6<sup>II</sup>) ; 55.3 (-O- $CH_3$ )

**(3-*O*-Allyl-2,4,6-tri-*O*-benzoyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 3)-1,2:5,6-di-*O*-cyclohexylidène- $\alpha$ -D-glucofuranose (**18**)**



À une solution sous argon, refroidie à  $-5^{\circ}\text{C}$ , contenant l'imidate **13** (1.88 g, 2.78 mmol) et du 1,2:5,6-di-*O*-cyclohexylidène- $\alpha$ -D-glucofuranose commercial (1 éq, 945 mg), dans le dichlorométhane anhydre (20 mL), en présence de tamis moléculaire 4 Å, est ajouté du triflate de triméthylsilyle (0.6 éq, 300  $\mu\text{L}$ ). Le milieu réactionnel est agité pendant 45 min à  $-5^{\circ}\text{C}$ . La réaction est arrêtée par ajout de triéthylamine (2.5 mL). Le tamis moléculaire est éliminé par filtration sur Célite. Le mélange est concentré sous pression réduite puis purifié par chromatographie sur gel de silice (éther de pétrole/acétate d'éthyle : 5-1). Le disaccharide **18** est obtenu avec un rendement de 96% (2.29 g, 2.68 mmol).

**Point de fusion** :  $187^{\circ}\text{C}$  (éthanol)

$[\alpha]_{\text{D}}^{\text{b}}$  : -3 (*c* 1.0, chloroforme)

**Masse** (ESI) :  $m/z = 877$   $[\text{M}+\text{Na}]^{+}$

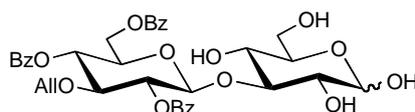
**Analyse élémentaire** pour  $\text{C}_{48}\text{H}_{54}\text{O}_{14}$

Théorique : C 67.43, H 6.37 ; Trouvée : C 67.36, H 6.38

**RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz) :  $\delta$  (ppm) = 8.09-7.36 (m, 15H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ); 5.58 (m, 1H, =CH-); 5.52(t, 1H, H-4<sup>II</sup>); 5.45 (d, 1H, H-1<sup>I</sup>,  $J_{1,2} = 3.7\text{Hz}$ ); 5.32 (dd, 1H, H-2<sup>II</sup>); 5.06-4.90 (m, 2H,  $\text{CH}_2=$ ); 4.83 (d, 1H, H-1<sup>II</sup>,  $J_{1,2} = 7.7\text{Hz}$ ); 4.59 (dd, 1H, H-6a<sup>II</sup>); 4.43 (dd, 1H, H-6b<sup>II</sup>); 4.35 (q, 1H, H-5<sup>I</sup>); 4.29 (d, 2H, H-2<sup>I</sup>, H-3<sup>I</sup>); 4.18 (dd, 1H, H-4<sup>I</sup>); 4.07-3.89 (m, 6H, H-6a<sup>I</sup>, H-6b<sup>I</sup>, H-3<sup>II</sup>, H-5<sup>II</sup>, - $\text{CH}_2\text{-O}$ ); 1.60-1.20 (20H, - $\text{CH}_2\text{-}$ )

**RMN  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz) :  $\delta$  (ppm) = 166.2, 165.0, 164.6 (C=O); 134.1 (=CH-); 133.4-128.2 ( $\text{C}_{\text{arom}}$ ); 117.5 ( $\text{CH}_2=$ ); 112.5, 109.1 ( $\text{C}_q$ ); 104.6 (C-1<sup>I</sup>); 100.0 (C-1<sup>II</sup>); 82.4-70.9 (C-2<sup>I</sup>, C-2<sup>II</sup>, C-3<sup>I</sup>, C-3<sup>II</sup>, C-4<sup>I</sup>, C-4<sup>II</sup>, C-5<sup>I</sup>, C-5<sup>II</sup> et -CH<sub>2</sub>-O); 66.1 (C-6<sup>I</sup>); 63.3 (C-6<sup>II</sup>); 36.3-23.5 (-CH<sub>2</sub>-)

**(3-*O*-Allyl-2,4,6-tri-*O*-benzoyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucopyranose (19)**



À une solution refroidie à 0°C du composé **18** (3.95 g, 4.63 mmol), dans le dichlorométhane (4 mL), est ajoutée une solution d'acide trifluoroacétique/eau 1:1 (40 mL). Le milieu réactionnel est agité pendant 12h à 40°C, puis le produit brut est précipité dans l'eau, filtré et lavé plusieurs fois à l'eau. Après purification par chromatographie sur gel de silice (chloroforme/méthanol : 2-1), le composé **19** est obtenu avec un rendement de 56% (1.79 g, 2.58 mmol).

**Masse (ESI)** :  $m/z = 717$  [ $\text{M}+\text{Na}$ ]<sup>+</sup>

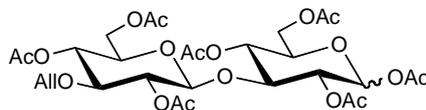
**Masse haute résolution (HRESI)** calculé pour  $\text{C}_{36}\text{H}_{38}\text{O}_{14}\text{Na}$  [ $\text{M}+\text{Na}$ ]<sup>+</sup>

Théorique :  $m/z = 717.21593$  ; Trouvé :  $m/z = 717.2160$

**RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300MHz) :  $\delta$  (ppm) = 8.15-7.42 (m, 15H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ); 5.56 (m, 1H, =CH-); 5.45 (t, 1H, H-4<sup>II</sup>); 4.06 (d, 2H, -CH<sub>2</sub>-)

**RMN  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 75MHz) :  $\delta$  (ppm) = 168.5-167.6 (C=O) ; 136.3 (=CH-) ; 135.6-130.3 ( $\text{C}_{\text{arom}}$ ) ; 118.2 ( $\text{CH}_2=$ ) ; 103.6, 103.5 (C-1<sup>II $\alpha$</sup> , C-1<sup>II $\beta$</sup> ) ; 99.2 (C-1<sup>II $\beta$</sup> ) ; 94.8 (C-1<sup>I $\alpha$</sup> ) ; 85.3, 82.2 (C-3<sup>I</sup>, C-3<sup>II</sup>) ; 78.4-70.7 (C-2<sup>I</sup>, C-2<sup>II</sup>, C-4<sup>I</sup>, C-4<sup>II</sup>, C-5<sup>I</sup>, C-5<sup>II</sup>, -CH<sub>2</sub>-) ; 65.2, 63.4 (C-6<sup>I</sup>, C-6<sup>II</sup>)

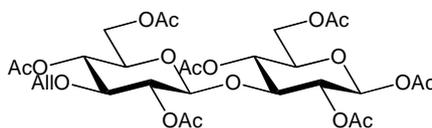
**(2,4,6-Tri-*O*-acétyl-3-*O*-allyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 3)-1,2,4,6-tétra-*O*-acétyl-D-glucopyranose (20)**



À une solution refroidie à 0°C du composé **19** (1.3 g, 1.87 mmol) dans le méthanol (90 mL) est ajoutée une solution de méthanolate de sodium dans le méthanol (1 mol/L, 9 mL). Le milieu réactionnel est agité pendant 4h à température ambiante. Le milieu réactionnel est neutralisé avec de la résine Amberlite IR-120, filtré et évaporé à sec. Le résidu est repris dans un mélange pyridine/anhydride acétique 1:1 (4 mL) en présence de DMAP (quantité catalytique), et acétylé pendant 12h à température ambiante, à l'abri de la lumière. L'anhydride acétique est détruit par addition de méthanol, à 0°C. La solution est concentrée puis diluée avec du dichlorométhane, lavée successivement à l'eau glacée, avec une solution d'hydrogénocarbonate de sodium glacée, à l'eau glacée, séchée sur sulfate de sodium anhydre puis concentrée. Après purification par chromatographie rapide sur gel de silice (éther de pétrole/acétate d'éthyle : 2-3), le composé **20** est obtenu avec un rendement de 80 % (1.02 g, 1.51 mmol).

**Masse (FAB) :**  $m/z = 699 [M+Na]^+$

**(2,4,6-Tri-*O*-acétyl-3-*O*-allyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 3)-1,2,4,6-tétra-*O*-acétyl- $\beta$ -D-glucopyranose (21)**



À une solution refroidie à 0°C du composé **20** (1.74 g, 2.6 mmol) dans le dichlorométhane anhydre (24 mL) est ajoutée une solution à 33 % de bromure d'hydrogène dans l'acide acétique (12 mL). Le milieu réactionnel est agité pendant 50 min à 0°C. La solution est diluée avec du dichlorométhane, lavée successivement à l'eau glacée, avec une solution d'hydrogénocarbonate de sodium glacée, puis à nouveau à l'eau glacée, séchée sur

---

sulfate de sodium anhydre puis concentrée. Le dérivé bromé est utilisé directement sans autre purification.

Le bromure est repris dans un mélange anhydride acétique/acide acétique (1-1, 24 mL). De l'acétate d'argent (4 éq, 1.6 g) est ajouté et la réaction est maintenue 12 h à température ambiante et à l'abri de la lumière. Après filtration sur Célite, le filtrat est lavé à l'eau, puis avec une solution d'hydrogénocarbonate de sodium, à nouveau à l'eau, séché sur sulfate de sodium anhydre et concentré. Après cristallisation dans l'éthanol, le composé **21** est obtenu avec un rendement de 55% (950 mg, 1.4 mmol).

**Point de fusion** : 164°C (éthanol)

$[\alpha]_D$  : -23 (c 1.0, chloroforme)

**Masse** (ESI) : m/z = 699 [M+Na]<sup>+</sup>

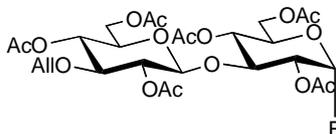
**Analyse élémentaire** pour C<sub>29</sub>H<sub>40</sub>O<sub>18</sub>

Théorique : C 51.48, H 5.96 ; Trouvée : C 51.08, H 5.91

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz) : δ (ppm) = 5.73 (m, 1H, =CH-) ; 5.61 (d, 1H, H-1<sup>I</sup>, J<sub>1,2</sub> = 8.3Hz) ; 5.20-5.08 (m, 2H, CH<sub>2</sub>=) ; 5.10 (dd, 1H, H-2<sup>I</sup>) ; 5.01 (t, 1H, H-4<sup>II</sup>) ; 4.99 (t, 1H, H-4<sup>I</sup>) ; 4.88 (dd, 1H, H-2<sup>II</sup>) ; 4.50 (d, 1H, H-1<sup>II</sup>, J<sub>1,2</sub> = 8.1Hz) ; 4.28 (dd, 1H, H-6a<sup>II</sup>) ; 4.20 (dd, 1H, H-6a<sup>I</sup>) ; 4.13 (dd, 1H, H-6b<sup>I</sup>) ; 4.04 (dd, 1H, H-6b<sup>II</sup>) ; 4.02 (d, 2H, -CH<sub>2</sub>-) ; 3.92 (t, 1H, H-3<sup>I</sup>) ; 3.80 (m, 1H, H-5<sup>I</sup>) ; 3.57 (m, 1H, H-5<sup>II</sup>) ; 3.53 (t, 1H, H-3<sup>II</sup>) ; 2.12-2.01 (m, 12H, CH<sub>3</sub>)

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 100MHz) : δ (ppm) = 170.7-168.7 (C=O) ; 134.1 (=CH-) ; 117.0 (CH<sub>2</sub>=) ; 101.2 (C-1<sup>II</sup>) ; 91.7 (C-1<sup>I</sup>) ; 79.8 (C-3<sup>II</sup>) ; 78.5 (C-3<sup>I</sup>) ; 72.8 (C-5<sup>I</sup>) ; 72.4 (-CH<sub>2</sub>-) ; 72.0 (C-2<sup>I</sup>, C-5<sup>II</sup>, C-2<sup>II</sup>) ; 69.2 (C-4<sup>II</sup>) ; 67.7 (C-4<sup>I</sup>) ; 62.0 (C-6<sup>II</sup>) ; 61.7 (C-6<sup>I</sup>) ; 20.8-20.4 (CH<sub>3</sub>)

**Fluorure de (2,4,6-tri-*O*-acétyl-3-*O*-allyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 3)-2,4,6-tri-*O*-acétyl- $\alpha$ -D-glucopyranosyle (22)**



Le composé **21** (824 mg, 1.2 mmol) est dissous dans un mélange fluorure d'hydrogène/pyridine 70:30 (5 mL). La réaction est maintenue 45 min à 0°C. Le milieu réactionnel est dilué avec du dichlorométhane puis versé dans un mélange eau glacée/dichlorométhane/ammoniaque. La phase organique est lavée à l'eau (2 fois) puis séchée sur sulfate de sodium anhydre et concentrée. Après purification par chromatographie sur gel de silice (cyclohexane/acétate d'éthyle : 2-1), le composé **22** est obtenu avec un rendement de 90 % (700 mg, 1.1 mmol).

**Point de fusion** : 158°C (acétate d'éthyle/éther)

$[\alpha]_D$  : +12 (*c* 1.0, chloroforme)

**Masse** (ESI) :  $m/z = 659 [M+Na]^+$

**Analyse élémentaire** pour C<sub>27</sub>H<sub>37</sub>FO<sub>16</sub>

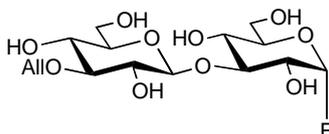
Théorique : C 50.94, H 5.86, F 2.98 ; Trouvée : C 50.58, H 5.84, F 2.99

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz) :  $\delta$  (ppm) = 5.74 (m, 1H, =CH-) ; 5.66 (dd, 1H, H-1<sup>I</sup>,  $J_{1,2} = 2.8\text{Hz}$ ,  $J_{H,F} = 53.5\text{Hz}$ ) ; 5.21-5.10 (m, 2H, CH<sub>2</sub>=) ; 5.07 (t, 1H, H-4<sup>I</sup>) ; 5.04 (t, 1H, H-4<sup>II</sup>) ; 4.92 (ddd, 1H, H-2<sup>I</sup>) ; 4.89 (dd, 1H, H-2<sup>II</sup>) ; 4.56 (d, 1H, H-1<sup>II</sup>,  $J_{1,2} = 8.1\text{Hz}$ ) ; 4.29 (dd, 1H, H-6a<sup>II</sup>) ; 4.23-4.09 (m, 3H, H-6a<sup>I</sup>, H-6b<sup>I</sup>, H-5<sup>I</sup>) ; 4.12 (t, 1H, H-3<sup>I</sup>) ; 4.05 (dd, 1H, H-6b<sup>II</sup>) ; 4.02 (m, 2H, CH<sub>2</sub>) ; 3.59 (m, 1H, H-5<sup>II</sup>) ; 3.54 (t, 1H, H-3<sup>II</sup>) ; 2.20-2.03 (CH<sub>3</sub>)

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 100MHz) :  $\delta$  (ppm) = 170.6-168.8 (C=O) ; 134.1 (=CH-) ; 117.0 (CH<sub>2</sub>=) ; 104.0 (d, C-1<sup>I</sup>,  $J_{C,F} = 226.0\text{Hz}$ ) ; 101.1 (C-1<sup>II</sup>) ; 79.8 (C-3<sup>II</sup>) ; 75.4 (C-3<sup>I</sup>) ; 72.4 (CH<sub>2</sub>) ; 72.1

(C-2<sup>I</sup>, C-2<sup>II</sup>) ; 72.0 (C-5<sup>II</sup>) ; 70.1 (C-5<sup>I</sup>) ; 69.2 (C-4<sup>II</sup>) ; 66.9 (C-4<sup>I</sup>) ; 62.0 (C-6<sup>II</sup>) ; 61.4 (C-6<sup>I</sup>) ; 20.8-20.4 (CH<sub>3</sub>)

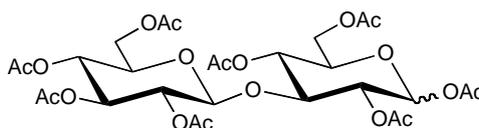
### Fluorure de (3-*O*-allyl-β-D-glucopyranosyl)-(1→3)-α-D-glucopyranosyle (**23**)



À une solution refroidie à 0°C du composé **22** (310 mg, 487 μmol) dans le méthanol (48 mL) est ajoutée une solution de méthanolate de sodium dans le méthanol (1 mol/L, 480 μL). Le milieu réactionnel est agité pendant 1h à 0°C puis 1h30 à température ambiante. La solution est neutralisée avec de la résine Amberlite IR-120, filtrée et concentrée. Le solide obtenu est repris dans l'eau puis lyophilisé. Le composé désacétylé **23** est obtenu avec un rendement quantitatif (187 mg, 487 μmol).

Masse (FAB) :  $m/z = 407 [M+Na]^+$

### (2,3,4,6-Tétra-*O*-acétyl-β-D-glucopyranosyl)-(1→3)-1,2,4,6-tétra-*O*-acétyl-D-glucopyranose (**24**)



Du scléroglycane commercial (20 g) est mis en suspension dans l'anhydride acétique (130 mL). Une solution d'acide sulfurique (3.5 mL) dans l'anhydride acétique (10 mL) est ajoutée goutte-à-goutte à 0°C. Après 5 jours sous agitation magnétique à 55°C une seconde solution d'acide sulfurique (3.5 mL) dans l'anhydride acétique (10 mL) est additionnée à 0°C. Le mélange est à nouveau agité pendant 5 jours à 55°C puis versé dans l'eau glacée. Après 12 h sous agitation, la solution est extraite au chloroforme. La phase organique est lavée avec une solution saturée de chlorure de sodium, une solution d'hydrogénocarbonate de sodium, de l'eau, puis séchée sur sulfate de sodium anhydre et concentrée. Le composé **24** est obtenu,

après purification par chromatographie rapide sur gel de silice (éther de pétrole/acétate d'éthyle : 1-1), avec un rendement molaire de 14% (4.6 g, 6.78 mmol). Ce rendement molaire est calculé en considérant que le scléroglycane est essentiellement constitué d'unités de répétition tétrasaccharidiques (similaires au schizophyllane, voir chapitre I, Figure 12), et que deux moles de ce motif de répétition peuvent être converties en trois moles de laminaribiose peracétylé.

anomère  $\alpha$

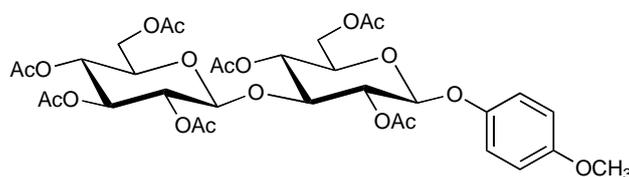
**Point de fusion** : 80°C (éthanol) lit.<sup>153</sup> 78-80°C

**Masse (DCI)** :  $m/z = 696 [M+NH_4]^+$

**RMN  $^1H$**  (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz) :  $\delta$  (ppm) = 6.23 (d, 1H, H-1<sup>I</sup>,  $J_{1,2} = 3.7\text{Hz}$ ) ; 5.14 (t, 1H, H-3<sup>II</sup>) ; 5.08 (t, 1H, H-4<sup>II</sup>) ; 5.05 (dd, 1H, H-4<sup>I</sup>) ; 5.04 (dd, 1H, H-2<sup>I</sup>) ; 4.89 (dd, 1H, H-2<sup>II</sup>) ; 4.64 (d, 1H, H-1<sup>II</sup>,  $J_{1,2} = 8.1\text{Hz}$ ) ; 4.38 (dd, 1H, H-6<sup>aII</sup>) ; 4.18 (dd, 1H, H-6<sup>aI</sup>) ; 4.12-4.03 (m, 3H, H-6<sup>bI</sup>, H-6<sup>bII</sup>, H-5<sup>I</sup>) ; 4.05 (t, 1H, H-3<sup>I</sup>) ; 3.74 (m, 1H, H-5<sup>II</sup>) ; 2.18-1.96 (m, 24H, CH<sub>3</sub>)

**RMN  $^{13}C$**  (CDCl<sub>3</sub>, 100MHz) :  $\delta$  (ppm) = 170.7-168.7 (C=O) ; 100.8 (C-1<sup>II</sup>) ; 89.2 (C-1<sup>I</sup>) ; 76.1 (C-3<sup>I</sup>) ; 72.8 (C-3<sup>II</sup>) ; 71.6 (C-5<sup>II</sup>) ; 71.3, 71.2 (C-2<sup>I</sup>, C2<sup>II</sup>) ; 69.9 (C-5<sup>I</sup>) ; 68.0 (C-4<sup>II</sup>) ; 67.4 (C-4<sup>I</sup>) ; 61.6 (C-6<sup>I</sup>, C-6<sup>II</sup>) ; 20.9-20.3 (COCH<sub>3</sub>)

**(2,3,4,6-Tétra-*O*-acétyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 3)-2,4,6-tri-*O*-acétyl- $\beta$ -D-glucopyranoside de 4-méthoxyphényle (25)**



À une solution refroidie à 0°C du composé **24** (252 mg, 370  $\mu\text{mol}$ ) dans le dichlorométhane anhydre (4 mL) est ajoutée une solution à 33 % de bromure d'hydrogène dans l'acide acétique (2 mL). Le milieu réactionnel est agité pendant 30 min à 0°C puis 1h à température ambiante. La solution est diluée avec du dichlorométhane, lavée successivement à l'eau glacée, avec une solution d'hydrogénocarbonate de sodium glacée, à l'eau glacée,

séchée sur sulfate de sodium anhydre puis concentrée. Après purification par chromatographie rapide sur gel de silice (cyclohexane/acétate d'éthyle : 1-1), le dérivé bromé est obtenu avec un rendement de 84% (218 mg, 312  $\mu\text{mol}$ ).

Le bromure est repris dans un mélange de chloroforme (1.3 mL) et d'une solution d'hydroxyde de sodium (1.25 mol/L) contenant du 4-méthoxyphénol (2 éq, 80 mg) et du chlorure de benzyltriéthylammonium (0.8 éq, 58 mg). La réaction est maintenue 1h30 à 60°C. Le milieu réactionnel est dilué avec du chloroforme (3 mL) et lavé avec une solution d'hydroxyde de sodium (1.25 mol/L, 2 x 5 mL), puis à l'eau. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre, concentré et purifié par chromatographie rapide sur gel de silice (cyclohexane/acétate d'éthyle : 1-1). Le composé **25** est obtenu avec un rendement de 65% (152 mg, 205  $\mu\text{mol}$ ).

**Point de fusion** : 85°C (éthanol)

$[\alpha]_D^{25}$  : -27 (*c* 1.0, chloroforme)

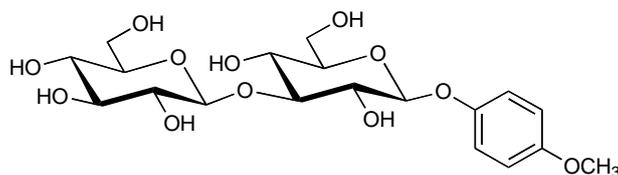
**Masse** (DCI) :  $m/z = 760$   $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$

**Masse exacte** (ESI) calculé pour  $\text{C}_{33}\text{H}_{42}\text{O}_{19}\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$

Théorique :  $m/z = 765.2218$  ; Trouvé :  $m/z = 765.2209$

**RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) :  $\delta$  (ppm) = 6.92-6.78 (m, 4H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ) ; 5.23 (dd, 1H,  $\text{H-2}^{\text{I}}$ ) ; 5.15 (t, 1H,  $\text{H-4}^{\text{II}}$ ) ; 5.06 (t, 1H,  $\text{H-4}^{\text{I}}$ ) ; 5.01 (t, 1H,  $\text{H-2}^{\text{II}}$ ) ; 4.91 (t, 1H,  $\text{H-3}^{\text{II}}$ ) ; 4.81 (d, 1H,  $\text{H-1}^{\text{I}}$ ,  $J_{1,2} = 7.8\text{Hz}$ ) ; 4.62 (d, 1H,  $\text{H-1}^{\text{II}}$ ,  $J_{1,2} = 7.8\text{Hz}$ ) ; 4.36 (m, 1H,  $\text{H-6a}^{\text{II}}$ ) ; 4.88 (m, 2H,  $\text{H-6a}^{\text{I}}$ ,  $\text{H-6b}^{\text{I}}$ ) ; 4.05 (dd, 1H,  $\text{H-6b}^{\text{II}}$ ) ; 3.95 (t, 1H,  $\text{H-3}^{\text{I}}$ ) ; 3.78 (m, 1H,  $\text{H-5}^{\text{I}}$ ) ; 3.76 (s, 3H,  $-\text{O}-\text{CH}_3$ ) ; 3.69 (m, 1H,  $\text{H-5}^{\text{II}}$ ) ; 2.15-1.98 (m, 21H,  $\text{COCH}_3$ )

**RMN  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 75MHz) :  $\delta$  (ppm) = 170.6-169.2 (C=O) ; 155.7, 151.1 ( $\text{C}_{\text{q arom}}$ ) ; 118.5, 114.5 ( $\text{CH}_{\text{arom}}$ ) ; 100.9 ( $\text{C-1}^{\text{II}}$ ) ; 100.3 ( $\text{C-1}^{\text{I}}$ ) ; 78.7 ( $\text{C-3}^{\text{I}}$ ) ; 72.9 ( $\text{C-2}^{\text{I}}$ ) ; 72.4 ( $\text{C-3}^{\text{II}}$ ) ; 71.9 ( $\text{C-2}^{\text{II}}$ ) ; 71.7 ( $\text{C-5}^{\text{I}}$ ) ; 71.1 ( $\text{C-5}^{\text{II}}$ ) ; 68.3 ( $\text{C-4}^{\text{I}}$ ) ; 68.1 ( $\text{C-4}^{\text{II}}$ ) ; 62.2 ( $\text{C-6}^{\text{I}}$ ) ; 61.7 ( $\text{C-6}^{\text{II}}$ ) ; 55.6 ( $-\text{O}-\text{CH}_3$ ) ; 20.7-20.3 ( $\text{COCH}_3$ )

**$\beta$ -D-Glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucopyranoside de 4-méthoxyphényle (26)**

À une solution refroidie à 0°C du composé **25** (120 mg, 162  $\mu$ mol) dans le méthanol (16 mL) est ajoutée une solution de méthanolate de sodium dans le méthanol (1 mol/L, 160  $\mu$ L). Le milieu réactionnel est agité pendant 12 h à température ambiante. La solution est neutralisée avec de la résine Amberlite IR-120, filtrée, concentrée. Le solide obtenu est repris dans l'eau puis lyophilisé. Le composé désacétylé **26** est obtenu avec un rendement de quantitatif (72 mg, 161  $\mu$ mol).

$[\alpha]_D$  : -37 (*c* 1.0, eau)

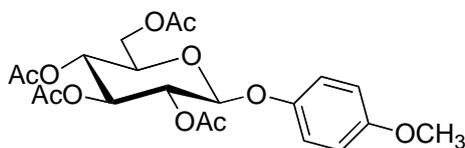
Masse (ESI) :  $m/z = 471 [M+Na]^+$

Masse exacte (ESI) calculé pour  $C_{19}H_{28}O_{12}Na [M+Na]^+$

Théorique :  $m/z = 471.14785$  ; Trouvé :  $m/z = 471.1481$

**RMN  $^1H$**  ( $D_2O$ , 400MHz) :  $\delta$  (ppm) = 7.06-6.88 (m, 4H,  $H_{arom}$ ) ; 4.95 (d, 1H,  $H-1^I$ ,  $J_{1,2} = 7.9$ Hz) ; 4.70 (d, 1H,  $H-1^{II}$ ,  $J_{1,2} = 7.9$ Hz) ; 3.87-3.82 (m, 2H,  $H-6_a^I$ ,  $H-6_a^{II}$ ) ; 3.80-3.62 (m, 3H,  $H-3^I$ ,  $H-6_b^I$ ,  $H-6_b^{II}$ ) ; 3.73 (s, 3H, -O- $CH_3$ ) ; 3.65 (dd, 1H,  $H-2^I$ ) ; 3.53-3.50 (m, 2H,  $H-4^I$ ,  $H-5^I$ ) ; 3.46 (dd, 1H,  $H-3^{II}$ ) ; 3.41-3.39 (m, 1H,  $H-5^{II}$ ) ; 3.34 (dd, 1H,  $H-4^{II}$ ) ; 3.30 (dd, 1H,  $H-2^{II}$ )

**RMN  $^{13}C$**  ( $D_2O$ , 100MHz) :  $\delta$  (ppm) = 156.1, 152.1 ( $C_q$  arom) ; 119.5, 116.3 ( $CH_{arom}$ ) ; 104.1 ( $C-1^{II}$ ) ; 102.3 ( $C-1^I$ ) ; 85.5 ( $C-3^I$ ) ; 77.3, 77.0 ( $C-4^I$ ,  $C-5^I$ ) ; 76.8 ( $C-3^{II}$ ) ; 74.7 ( $C-2^I$ ) ; 74.0 ( $C-2^{II}$ ) ; 70.9 ( $C-4^{II}$ ) ; 69.2 ( $C-5^{II}$ ) ; 62.0, 61.8 ( $C-6^I$ ,  $C-6^{II}$ ) ; 57.1 (-O- $CH_3$ )

**2,3,4,6-Tétra-O-acétyl-β-D-glucopyranoside de 4-méthoxyphényle (27)**

À une solution sous argon, à 0°C de β-D-glucopyranose peracétylé (1 g, 2.56 mmol) dans le dichlorométhane anhydre (28 mL) sont ajoutés du 4-méthoxyphénol (2 éq, 636 mg) et de l'éthérate de trifluorure de bore (2 éq, 650 μL). Le milieu réactionnel est agité pendant 2h30 à 0°C puis dilué avec du dichlorométhane, lavé avec une solution d'hydrogénocarbonate de sodium (2 fois) et de l'eau. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre puis concentrée. Après purification par chromatographie rapide sur gel de silice (cyclohexane/acétate d'éthyle : 2-1), le glucoside de 4-méthoxyphényle **27** est obtenu avec un rendement de 93% (1.088 g, 2.40 mmol).

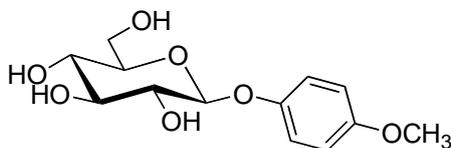
**Point de fusion** : 100°C (éthanol) lit.<sup>154</sup> 90-92°C

$[\alpha]_D^{20}$  : -16 (c 1.0, chloroforme) lit.<sup>154</sup>  $[\alpha]_D^{20}$  : -14 (c 1.0, chloroforme)

**Masse (DCI)** : m/z = 472 [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) : δ (ppm) = 6.96-6.79 (m, 4H, H<sub>arom</sub>) ; 5.30-5.10 (m, 3H, H-2, H-3, H-4) ; 4.95 (d, 1H, H-1, J<sub>1,2</sub> = 7.2Hz) ; 4.27-4.11 (m, 2H, H-6a, H-6b) ; 3.78 (m, 1H, H-5) ; 3.77 (s, 3H, -O-CH<sub>3</sub>) ; 2.07-2.02 (m, 12H, CH<sub>3</sub>)

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 75MHz) : δ (ppm) = 170.5-169.3 (C=O) ; 155.8, 150.9 (C<sub>q</sub> arom) ; 118.7, 114.6 (CH<sub>arom</sub>) ; 100.3 (C-1) ; 72.8, 72.0, 71.3, 68.4 (C-2, C-3, C-4, C-5) ; 62.0 (C-6) ; 55.7 (-O-CH<sub>3</sub>) ; 20.7-20.6 (COCH<sub>3</sub>)

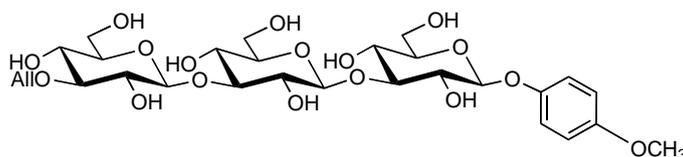
**$\beta$ -D-Glucopyranoside de 4-méthoxyphényle (28)**<sup>155</sup>

À une solution refroidie à 0°C du composé **27** (492 mg, 1.1 mmol) dans le méthanol (40 mL) est ajoutée une solution de méthanolate de sodium dans le méthanol (1 mol/L, 400  $\mu$ L). Le milieu réactionnel est agité pendant 12h à température ambiante. La solution est neutralisée avec de la résine Amberlite IR-120, filtrée, concentrée. Le solide obtenu est repris dans l'eau puis lyophilisé. Le composé désacétylé **28** est obtenu avec un rendement quantitatif (309 mg, 1.08 mmol).

**Masse** (ESI) :  $2m/z = 595 [2M+Na]^+$

**RMN  $^1H$**  ( $D_2O$ , 300MHz) :  $\delta$  (ppm) = 7.00-6.82 (m, 4H,  $H_{arom}$ ) ; 4.86 (d, 1H, H-1,  $J_{1,2} = 6.9$ Hz) ; 3.81-3.58 (m, 2H, H-6a, H-6b) ; 3.67 (s, 3H, -O-CH<sub>3</sub>) ; 3.46-3.35 (m, 4H, H-2, H-3, H-4, H-5)

**RMN  $^{13}C$**  ( $D_2O$ , 75MHz) :  $\delta$  (ppm) = 152.4, 148.5 ( $C_{q\ arom}$ ) ; 115.9, 112.7 ( $CH_{arom}$ ) ; 98.9 (C-1) ; 73.8, 73.3, 70.7, 67.1 (C-2, C-3, C-4, C-5) ; 58.3 (C-6) ; 53.5 (-O-CH<sub>3</sub>)

**(3-O-Allyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucopyranoside de 4-méthoxyphényle (29)**

À une solution du fluorure **23** (60 mg, 160  $\mu$ mol) et du glucoside de méthoxyphényle **28** (1 éq, 45 mg), dans du tampon phosphate de sodium, 0.2 M à pH7 (3.2 mL), est ajouté une solution de glycosynthase GII E231G (800  $\mu$ L) à 1 mg/mL de tampon phosphate de sodium,

0.2 M à pH7. Le milieu réactionnel est agité pendant 17h à 37°C. Il est ensuite concentré et purifié par chromatographie sur gel de silice C18 (eau à eau/méthanol : 9-1). Le trisaccharide **29** est obtenu avec un rendement de 80% (82 mg, 126  $\mu\text{mol}$ ).

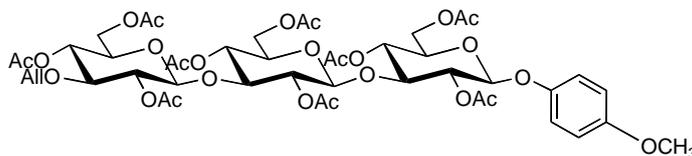
$[\alpha]_D$  : -28 (c 1.0, eau)

Masse (ESI) :  $m/z = 672$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$

Masse exacte (ESI) calculé pour  $\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{O}_{17}\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$

Théorique :  $m/z = 673.2320$  ; Trouvé :  $m/z = 673.2322$

**(2,4,6-Tri-O-acétyl-3-O-allyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 3)-(2,4,6-tri-O-acétyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 3)-2,4,6-tri-O-acétyl- $\beta$ -D-glucopyranoside de 4-méthoxyphényle (30)**



À une solution refroidie à 0°C du composé **29** (57 mg, 88  $\mu\text{mol}$ ) dans la pyridine anhydre (1 mL) sont ajoutés de l'anhydride acétique (1 mL) et de la DMAP (quantité catalytique). Le milieu réactionnel est agité pendant 5h à température ambiante. L'anhydride acétique est décomposé par addition de méthanol, à 0°C. La solution est concentrée puis diluée avec du dichlorométhane, lavée successivement à l'eau, avec une solution d'hydrogénocarbonate de sodium, à l'eau, séchée sur sulfate de sodium anhydre puis concentrée. Le composé **30** est obtenu avec un rendement de 95% (85 mg, 83  $\mu\text{mol}$ ).

$[\alpha]_D$  : -43 (c 1.0, chloroforme)

Masse (FAB) :  $m/z = 1051$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$

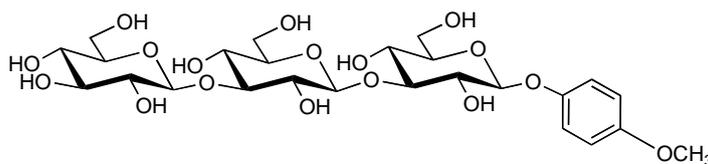
**Masse exacte** (ESI) calculé pour  $C_{46}H_{60}O_{26}Na$   $[M+Na]^+$

Théorique :  $m/z = 1051.3271$  ; Trouvé :  $m/z = 1051.3275$

**RMN  $^1H$**  ( $D_2O$ , 400MHz) :  $\delta$  (ppm) = 6.91-6.79 (m, 4H,  $H_{arom}$ ) ; 5.73 (m, 1H, =CH-) ; 5.20 (dd, 1H, H-2<sup>I</sup>) ; 5.20-5.10 (m, 2H,  $CH_2=$ ) ; 5.03(t, 1H, H-4<sup>III</sup>) ; 4.98 (t, 1H, H-4<sup>I</sup>) ; 4.90 (t, 2H, H-4<sup>II</sup>, H-2<sup>II</sup>) ; 4.87 (t, 1H, H-2<sup>III</sup>) ; 4.81 (d, 1H, H-1<sup>I</sup>,  $J_{1,2} = 7.9Hz$ ) ; 4.49 (d, 1H, H-1<sup>II</sup>,  $J_{1,2} = 8.1Hz$ ) ; 4.42 (d, 1H, H-1<sup>III</sup>,  $J_{1,2} = 8.1Hz$ ) ; 4.33-4.26 (m, 2H, H-6a<sup>III</sup>, H-6a<sup>II</sup>) ; 4.19 (m, 2H, H-6a<sup>I</sup>, H-6b<sup>I</sup>) ; 4.08-4.00 (m, 4H, H-6b<sup>II</sup>, H-6b<sup>III</sup>,  $CH_2$ ) ; 3.94 (t, 1H, H-3<sup>I</sup>) ; 3.82 (t, 1H, H-3<sup>II</sup>) ; 3.78 (m, 1H, H-5<sup>I</sup>) ; 3.76 (s, 3H, -O- $CH_3$ ) ; 3.68 (m, 1H, H-5<sup>II</sup>) ; 3.56 (m, 1H, H-5<sup>III</sup>) ; 3.51 (t, 1H, H-3<sup>III</sup>) ; 2.17-2.00 (m, 27H,  $CH_3$ )

**RMN  $^{13}C$**  ( $D_2O$ , 100MHz) :  $\delta$  (ppm) = 170.6-168.7 (C=O) ; 155.7, 151.0 ( $C_q$  arom) ; 134.1 (=CH-) ; 118.4, 114.5 ( $CH_{arom}$ ) ; 117.0 ( $CH_2=$ ) ; 101.2 (C-1<sup>III</sup>) ; 100.6 (C-1<sup>II</sup>) ; 100.1 (C-1<sup>I</sup>) ; 79.7 (C-3<sup>III</sup>) ; 78.5 (C-3<sup>II</sup>) ; 78.0 (C-3<sup>I</sup>) ; 73.0 (C-2<sup>I</sup>) ; 72.4 ( $CH_2$ ) ; 71.9 (C-2<sup>III</sup>) ; 71.8 (C-5<sup>III</sup>, C-5<sup>II</sup>) ; 71.7 (C-5<sup>I</sup>) ; 69.2 (C-4<sup>III</sup>) ; 68.4 (C-2<sup>II</sup>, C-4<sup>II</sup>) ; 68.3 (C-4<sup>I</sup>) ; 62.2 (C-6<sup>I</sup>) ; 62.0 (C-6<sup>II</sup>, C-6<sup>III</sup>) ; 55.6 (-O- $CH_3$ ) ; 21.0-20.5 ( $COCH_3$ )

**$\beta$ -D-Glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucopyranoside de 4-méthoxyphényle (31)**



À une solution du composé **30** (18 mg, 18  $\mu$ mol) dans le méthanol (1 mL), est ajouté du chlorure de palladium (0.9 éq, 3 mg). Le milieu réactionnel est agité pendant 5 h à température ambiante puis filtré sur gel de silice (cyclohexane/acétate d'éthyle : 1-4, puis acétate d'éthyle/méthanol : 1-1). Le filtrat est concentré puis repris dans le méthanol (2 mL) à 0°C. Une solution de méthanolate de sodium dans le méthanol (1 mol/L, 200  $\mu$ L) est ajoutée. Après purification sur phase inverse (silice C-18), le trisaccharide **31** est obtenu avec un rendement de 66% (7 mg, 12  $\mu$ mol).

**Masse (ESI) :**  $m/z = 633 [M+Na]^+$

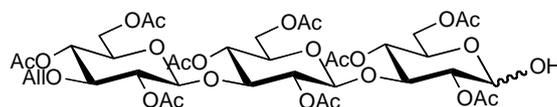
**Masse exacte (ESI) calculé pour**  $C_{25}H_{38}O_{17}Na [M+Na]^+$

Théorique :  $m/z = 633.2007$  ; Trouvé :  $m/z = 633.1990$

**RMN  $^1H$**  ( $D_2O$ , 400MHz) :  $\delta$  (ppm) = 7.06-6.89 (m, 4H,  $H_{arom}$ ) ; 4.96 (d, 1H,  $H-1^I$ ,  $J_{1,2} = 8.0Hz$ ) ; 4.75 (d, 1H,  $H-1^{II}$ ,  $J_{1,2} = 8.0Hz$ ) ; 4.68 (d, 1H,  $H-1^{III}$ ,  $J_{1,2} = 8.0Hz$ ) ; 3.88-3.61 (m, 9H,  $H-2^I$ ,  $H-3^I$ ,  $H-3^{II}$ ,  $H-6a^I$ ,  $H-6b^I$ ,  $H-6a^{II}$ ,  $H-6b^{II}$ ,  $H-6a^{III}$ ,  $H-6b^{III}$ ) ; 3.74 (s, 3H,  $CH_3$ ) ; 3.55-3.38 (m, 7H,  $H-2^{II}$ ,  $H-4^I$ ,  $H-4^{II}$ ,  $H-4^{III}$ ,  $H-5^I$ ,  $H-5^{II}$ ,  $H-5^{III}$ ) ; 3.35-3.26 (m, 2H,  $H-2^{III}$ ,  $H-3^{III}$ )

**RMN  $^{13}C$**  ( $D_2O$ , 100MHz) :  $\delta$  (ppm) = 155.2, 151.2 ( $C_q$  arom) ; 118.6, 115.4 ( $CH_{arom}$ ) ; 103.2 ( $C-1^{II}$ ) ; 102.9 ( $C-1^{III}$ ) ; 101.4 ( $C-1^I$ ) ; 84.6, 84.3 ( $C-3^I$ ,  $C-3^{II}$ ) ; 76.4 ( $C-3^{III}$ ) ; 76.1, 76.0, 75.9 ( $C-4^I$ ,  $C-4^{II}$ ,  $C-4^{III}$ ) ; 73.8, 73.6, 73.2 ( $C-2^I$ ,  $C-2^{II}$ ,  $C-2^{III}$ ) ; 69.9, 68.5, 68.3 ( $C-5^I$ ,  $C-5^{II}$ ,  $C-5^{III}$ ) ; 61.1-60.9 ( $C-6^I$ ,  $C-6^{II}$ ,  $C-6^{III}$ ) ; 56.2 ( $CH_3$ )

**(2,4,6-Tri-*O*-acétyl-3-*O*-allyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 3)-(2,4,6-tri-*O*-acétyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 3)-2,4,6-tri-*O*-acétyl- $\beta$ -D-glucopyranose (32)**



À une solution du composé **30** (123 mg, 120  $\mu$ mol), dans un mélange toluène/acétonitrile/eau (2.8-3.9-2.8, 9.5 mL), est ajouté du CAN (10 éq, 653 mg). Le milieu réactionnel est agité pendant 2 h à température ambiante puis dilué avec du dichlorométhane, lavé successivement avec des solutions saturées de chlorure de sodium, d'hydrogencarbonate de sodium et à l'eau, séché sur sulfate de sodium anhydre puis concentré. Après purification par chromatographie rapide sur gel de silice (cyclohexane/acétate d'éthyle : 1-2). Le trisaccharide **32** est obtenu avec un rendement de 85% (94 mg, 102  $\mu$ mol).

anomère  $\beta$

**Masse (FAB) :**  $m/z = 945 [M+Na]^+$

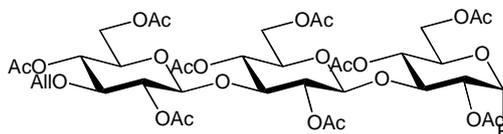
**Masse exacte** (ESI) calculé pour  $C_{39}H_{54}O_{25}Na$   $[M+Na]^+$

Théorique :  $m/z = 945.2852$  ; Trouvé :  $m/z = 945.2862$

**RMN  $^1H$**  ( $CDCl_3$ , 400MHz) :  $\delta$  (ppm) = 5.73 (m, 1H, =CH-) ; 5.20-5.10 (m, 2H,  $CH_2=$ ) ; 5.05-4.95 (m, 2H, H-4<sup>I</sup>, H-4<sup>III</sup>) ; 4.92-4.84 (m, 4H, H-2<sup>I</sup>, H-4<sup>II</sup>, H-2<sup>II</sup>, H-2<sup>III</sup>) ; 4.88 (d, 1H, H-1<sup>I</sup>,  $J_{1,2} = 8.0Hz$ ) ; 4.53 (d, 1H, H-1<sup>II</sup>,  $J_{1,2} = 8.1Hz$ ) ; 4.41 (d, 1H, H-1<sup>III</sup>,  $J_{1,2} = 8.1Hz$ ) ; 4.33-4.26 (m, 2H, H-6a<sup>III</sup>, H-6a<sup>II</sup>) ; 4.21-4.14 (m, 4H, H-3<sup>I</sup>, H-5<sup>I</sup>, H-6a<sup>I</sup>, H-6b<sup>I</sup>) ; 4.08-4.00 (m, 4H, H-6b<sup>II</sup>, H-6b<sup>III</sup>,  $CH_2$ ) ; 3.79 (t, 1H, H-3<sup>II</sup>) ; 3.66 (m, 1H, H-5<sup>II</sup>) ; 3.57 (m, 1H, H-5<sup>III</sup>) ; 3.51 (t, 1H, H-3<sup>III</sup>) ; 2.20-2.01 (m, 27H,  $CH_3$ )

**RMN  $^{13}C$**  ( $CDCl_3$ , 100MHz) :  $\delta$  (ppm) = 170.8-168.4 (C=O) ; 134.1 (=CH-) ; 117.0 ( $CH_2=$ ) ; 101.2 (C-1<sup>III</sup>) ; 100.6 (C-1<sup>II</sup>) ; 90.2 (C-1<sup>I</sup>) ; 79.7 (C-3<sup>III</sup>) ; 78.7 (C-3<sup>II</sup>) ; 75.2 (C-3<sup>I</sup>) ; 73.1 (C-2<sup>II</sup>) ; 73.0 (C-2<sup>I</sup>) ; 72.4 ( $CH_2$ ) ; 71.9 (C-2<sup>III</sup>) ; 71.8 (C-5<sup>III</sup>) ; 71.6 (C-5<sup>II</sup>) ; 69.2 (C-4<sup>III</sup>) ; 68.4 (C-4<sup>II</sup>) ; 67.9 (C-5<sup>I</sup>) ; 67.6 (C-4<sup>I</sup>) ; 62.1 (C-6<sup>III</sup>, C-6<sup>II</sup>, C-6<sup>I</sup>) ; 21.0-20.5 ( $CH_3$ )

**Fluorure de (2,4,6-tri-*O*-acétyl-3-*O*-allyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 3)-(2,4,6-tri-*O*-acétyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 3)-2,4,6-tri-*O*-acétyl- $\alpha$ -D-glucopyranosyle (33)**



À une solution, refroidie à  $-45^\circ C$  d'hémiacétal **32** (117 mg, 127  $\mu mol$ ) dans du dichlorométhane (4.1 mL) est ajouté du DAST (5 éq, 84  $\mu L$ ). Le milieu réactionnel est agité pendant 2h30, pendant que la température remonte jusqu'à  $-20^\circ C$ . La solution est diluée avec du dichlorométhane et lavée à l'eau glacée (3 fois). La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre et évaporée à sec.

Le brut est repris dans un mélange fluorure d'hydrogène/pyridine 70:30 (4.5 mL), à  $-52^\circ C$ . La réaction est maintenue sous agitation pendant 2h30, la température remonte jusqu'à  $-12^\circ C$ . Le milieu réactionnel est alors dilué avec du dichlorométhane puis versé dans un mélange eau glacée/dichlorométhane/ammoniacque et lavé à l'eau glacée (2 fois). La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre et concentrée. Après purification par

chromatographie sur gel de silice (toluène/acétate d'éthyle : 1-1), le composé **33** est obtenu avec un rendement de 67% (78 mg, 84  $\mu$ mol).

$[\alpha]_D^{20}$  : -13 (c 1.0, chloroforme)

Masse (DCI) :  $m/z = 942 [M+NH_4]^+$

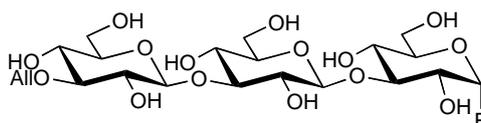
Masse exacte (ESI) calculé pour  $C_{39}H_{53}O_{24}FNa [M+Na]^+$

Théorique :  $m/z = 947.2809$  ; Trouvé :  $m/z = 947.2806$

RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 400MHz) :  $\delta$  (ppm) = 5.72 (m, 1H, =CH-) ; 5.64 (dd, 1H, H-1<sup>I</sup>,  $J_{1,2} = 2.7$ Hz,  $J_{H,F} = 53.4$ Hz) ; 5.19-5.10 (m, 2H, CH<sub>2</sub>=) ; 5.05 (t, 1H, H-4<sup>I</sup>) ; 5.02 (t, 1H, H-4<sup>III</sup>) ; 4.91 (ddd, 1H, H-2<sup>I</sup>) ; 4.89 (t, 1H, H-4<sup>II</sup>) ; 4.88 (t, 1H, H-2<sup>II</sup>) ; 4.86 (t, 1H, H-2<sup>III</sup>) ; 4.50 (d, 1H, H-1<sup>II</sup>,  $J_{1,2} = 8.1$ Hz) ; 4.40 (d, 1H, H-1<sup>III</sup>,  $J_{1,2} = 8.0$ Hz) ; 4.30 (m, 2H, H-6a<sup>III</sup>, H-6a<sup>II</sup>) ; 4.17 (m, 2H, H-6a<sup>I</sup>, H-6b<sup>I</sup>) ; 4.14-4.08 (m, 1H, H-5<sup>I</sup>) ; 4.11 (t, 1H, H-3<sup>I</sup>) ; 4.05-4.00 (m, 2H, H-6b<sup>II</sup>, H-6b<sup>III</sup>) ; 4.00 (d, 2H, CH<sub>2</sub>) ; 3.80 (t, 1H, H-3<sup>II</sup>) ; 3.69 (m, 1H, H-5<sup>II</sup>) ; 3.57 (m, 1H, H-5<sup>III</sup>) ; 3.51 (t, 1H, H-3<sup>III</sup>) ; 2.21-2.01 (m, 27H, CH<sub>3</sub>)

RMN  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 100MHz) :  $\delta$  (ppm) = 170.6-168.4 (C=O) ; 134.1 (=CH-) ; 117.0 (CH<sub>2</sub>=) ; 104.0 (d, C-1<sup>I</sup>,  $J_{C,F} = 226.1$ Hz) ; 101.2 (C-1<sup>III</sup>) ; 100.1 (C-1<sup>II</sup>) ; 79.7(C-3<sup>III</sup>) ; 78.6 (C-3<sup>II</sup>) ; 75.1 (C-3<sup>I</sup>) ; 73.0 (C-2<sup>II</sup>) ; 72.4 (CH<sub>2</sub>) ; 72.1 (C-2<sup>I</sup>) ; 71.9 (C-2<sup>III</sup>) ; 71.8 (C-5<sup>III</sup>) ; 71.7 (C-5<sup>II</sup>) ; 70.1 (C-5<sup>I</sup>) ; 69.2 (C-4<sup>III</sup>) ; 68.3 (C-4<sup>II</sup>) ; 66.7 (C-4<sup>I</sup>) ; 62.0 (C-6<sup>III</sup>, C-6<sup>II</sup>) ; 61.4 (C-6<sup>I</sup>) ; 20.8-20.4 (CH<sub>3</sub>)

Fluorure de  $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-glucopyranosyle (**34**)



À une solution refroidie à 0°C du composé **33** (33 mg, 36  $\mu$ mol) dans le méthanol (4 mL) est ajoutée une solution de méthanolate de sodium dans le méthanol (1 mol/L, 40  $\mu$ L). Le

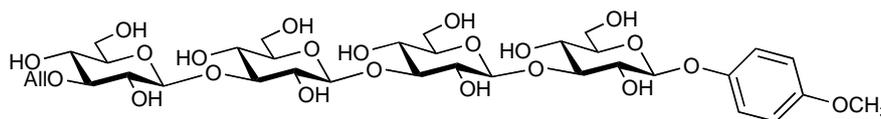
milieu réactionnel est agité pendant 12 h à température ambiante. La solution est neutralisée avec de la résine Amberlite IR-120, filtrée, concentrée. Le solide obtenu est repris dans l'eau puis lyophilisé. Le composé désacétylé **34** est obtenu avec un rendement de quantitatif (20 mg, 36  $\mu\text{mol}$ ).

**Masse (ESI) :**  $m/z = 569 [M+\text{Na}]^+$

**Masse exacte (ESI) calculé pour**  $\text{C}_{21}\text{H}_{35}\text{O}_{15}\text{FNa} [M+\text{Na}]^+$

Théorique :  $m/z = 569.1858$  ; Trouvé :  $m/z = 569.1855$

**(3-O-Allyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucopyranoside de 4-méthoxyphényle (**35**)**



À une solution du fluorure **34** (7.7 mg, 14  $\mu\text{mol}$ ) et du  $\beta$ -glucoside de 4-méthoxyphényle **28** (1.3 éq, 5.2 mg), dans du tampon phosphate de sodium, 0.2M à pH 7.0 (360  $\mu\text{L}$ ), est ajoutée une solution à 1 mg/mL de glycosynthase GII E231G (90  $\mu\text{L}$ ). Le milieu réactionnel est agité pendant 24h à 37°C. Il est ensuite purifié par chromatographie sur gel de silice C18 (eau à eau/méthanol : 7-3). Le tétrasaccharide **35** est obtenu avec un rendement de 70% (8 mg, 10  $\mu\text{mol}$ ).

**Masse (ESI) :**  $m/z = 835 [M+\text{Na}]^+$

**Masse exacte (ESI) calculé pour**  $\text{C}_{34}\text{H}_{52}\text{O}_{22}\text{Na} [M+\text{Na}]^+$

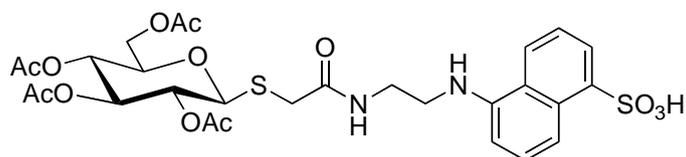
Théorique :  $m/z = 835.2848$  ; Trouvé :  $m/z = 835.2846$

**RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400MHz) :  $\delta$  (ppm) = 7.11-6.95 (m, 4H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ) ; 5.59 (m, 1H, =CH-) ; 5.35-5.20 (m, 2H,  $\text{CH}_2=$ ) ; 5.01 (d, 1H,  $\text{H}-1^{\text{I}}$ ,  $J_{1,2} = 8.0\text{Hz}$ ) ; 4.80 (d, 1H,  $\text{H}-1^{\text{II}}$ ,  $J_{1,2} = 8.1\text{Hz}$ ) ; 4.78 (d, 1H,  $\text{H}-1^{\text{III}}$ ,  $J_{1,2} = 8.5\text{Hz}$ ) ; 4.74 (d, 1H,  $\text{H}-1^{\text{IV}}$ ,  $J_{1,2} = 7.5\text{Hz}$ ) ; 4.34 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ) ; 3.89-3.71 (m, 12H,  $\text{H}-2^{\text{I}}$ ,  $\text{H}-3^{\text{I}}$ ,  $\text{H}-3^{\text{II}}$ ,  $\text{H}-3^{\text{III}}$ ,  $\text{H}-6_{\text{a}}^{\text{I}}$ ,  $\text{H}-6_{\text{b}}^{\text{I}}$ ,  $\text{H}-6_{\text{a}}^{\text{II}}$ ,  $\text{H}-6_{\text{b}}^{\text{II}}$ ,  $\text{H}-6_{\text{a}}^{\text{III}}$ ,  $\text{H}-6_{\text{b}}^{\text{III}}$ ,  $\text{H}-6_{\text{a}}^{\text{IV}}$ ,  $\text{H}-6_{\text{b}}^{\text{IV}}$ ) ;

3.79 (s, 3H, -O-CH<sub>3</sub>) ; 3.59-3.46 (m, 12H, H-2<sup>II</sup>, H-2<sup>III</sup>, H-2<sup>IV</sup>, H-3<sup>IV</sup>, H-4<sup>I</sup>, H-4<sup>II</sup>, H-4<sup>III</sup>, H-4<sup>IV</sup>, H-5<sup>I</sup>, H-5<sup>II</sup>, H-5<sup>III</sup>, H-5<sup>IV</sup>)

**RMN <sup>13</sup>C** (D<sub>2</sub>O, 100MHz) : δ (ppm) = 156.2, 152.2 (C<sub>q</sub> arom) ; 135.6 (=CH-) ; 119.8 (CH<sub>2</sub>=) ; 119.6, 116.4 (CH<sub>arom</sub>) ; 104.1 (C-1<sup>IV</sup>) ; 103.9 (C-1<sup>II</sup>, C-1<sup>III</sup>) ; 102.4 (C-1<sup>I</sup>) ; 85.5-85.4 (C-3<sup>I</sup>, C-3<sup>II</sup>, C-3<sup>III</sup>) ; 84.6 (C-3<sup>IV</sup>) ; 77.2-77.0 (C-2<sup>II</sup>, C-2<sup>III</sup>, C-2<sup>IV</sup>) ; 74.1 (C-2<sup>I</sup>) ; 70.6-69.3 (C-5<sup>I</sup>, C-5<sup>II</sup>, C-5<sup>III</sup>, C-5<sup>IV</sup>) ; 62.0-61.2 (C-6<sup>I</sup>, C-6<sup>II</sup>, C-6<sup>III</sup>, C-6<sup>IV</sup>) ; 57.2 (-O-CH<sub>3</sub>)

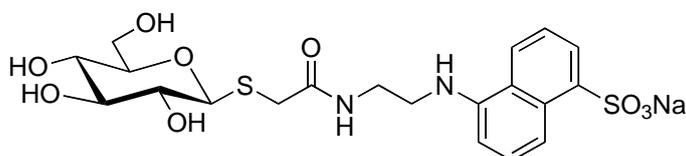
**Acide** *N*-[2-*N*-[(2-*S*-(2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl-β-*D*-glucopyranosyl))-2-thioacétyl]-aminoéthyl]-1-naphthylamine-5-sulfonique (**37**)



À une solution de 1-*S*-acétyl-2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl-β-*D*-glucopyranose (47 mg, 116 μmol) et de l'acide *N*-(iodoacétamidoéthyl)-1-naphthylamine-5-sulfonique commercial (1 éq, 50 mg) dans le DMF (1.8 mL), à l'abri de la lumière, est ajouté de la diéthylamine (15 éq, 180 μL). La solution est agitée pendant 4h30 à température ambiante, 0.5 éq; de glucose- *S*-acétate sont alors ajoutés, puis à nouveau 0.5 éq 2h plus tard, le milieu réactionnel est maintenu encore 1h à température ambiante, puis évaporé sous vide. Après purification par chromatographie sur gel de silice (chloroforme/méthanol : 95-5, puis 90-10, puis 50-50). Le glucoside **37** est obtenu avec un rendement de 30% (23 mg, 34 μmol).

**Masse** (FAB) :  $m/z = 693 [M+Na]^+$

*N*-[2-*N*-[(2-*S*-β-*D*-Glucopyranosyl))-2-thioacétyl]-aminoéthyl]-1-naphthylamine-5-sulfonate de sodium (**38**)



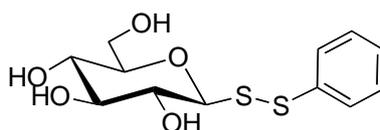
À une solution refroidie à 0°C du composé **37** (23 mg, 34 µmol) dans le méthanol (4 mL) est ajoutée une solution de méthanolate de sodium dans le méthanol (1 mol/L, 40 µL). Le milieu réactionnel est agité pendant 5 h à température ambiante. La solution est neutralisée avec de la résine Amberlite IR-120, filtrée, concentrée. Le solide obtenu est repris dans l'eau puis lyophilisé. Le composé désacétylé **38** est obtenu avec un rendement de 78% (14 mg, 27 µmol).

**Masse** (ESI) :  $m/z = 501 [M-Na]^+$

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) :  $\delta$  (ppm) = 8.06-6.72 (m, 6H, H<sub>arom</sub>) ; 4.23 (d, 1H, H-1,  $J_{1,2} = 9.9$ Hz) ; 3.52-2.90 (m, 12H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6a, H-6b)

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 75MHz) :  $\delta$  (ppm) = 170.8 (C=O) ; 141.4, 135.9 (C<sub>q</sub>-NH, C<sub>q</sub>-SO<sub>3</sub>Na) ; 126.8, 122.1 (C<sub>q</sub> arom) ; 126.1, 123.9, 122.7, 121.2, 112.6, 104.0 (CH<sub>arom</sub>) ; 82.5 (C-1) ; 77.4, 74.5, 69.8, 66.9 (C-2, C-3, C-4, C-5) ; 58.3 (C-6) ; 40.5, 36.3, 31.0 (S-CH<sub>2</sub>-, NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH)

### Disulfure de $\beta$ -D-glucopyranosyle de phényle (**39**)



À une solution refroidie à 0°C de 2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl-1-thio- $\beta$ -D-glucopyranose (505 mg, 1.24 mmol) dans le méthanol (60 mL) est ajoutée une solution de méthanolate de sodium dans le méthanol (1.1 éq, 1.4 mL à 1 mol/L). Après 12 h à température ambiante, sous agitation, du benzèthiosulfonate de *S*-phényle (1.5 éq, 466 mg) est ajouté à la solution refroidie à 0°C. Après 18 h à température ambiante, sous agitation, du gel de silice (8 mL) est versé dans le milieu réactionnel. La solution est évaporée et une chromatographie rapide (acétonitrile puis acétonitrile/eau : 9-1) conduit au composé **39** avec rendement de 74% (280 mg, 920 µmol).

anomère  $\beta$

**Masse (FAB) :**  $m/z = 327 [M+Na]^+$

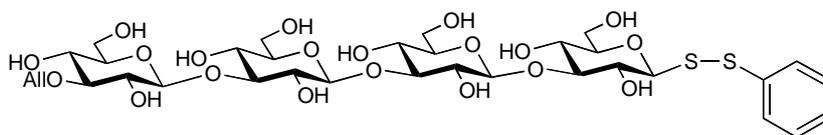
**Masse exacte (ESI) calculé pour  $C_{12}H_{16}O_5NaS_2 [M+Na]^+$**

Théorique :  $m/z = 327.0340$  ; Trouvé :  $m/z = 327.0337$

**RMN  $^1H$**  ( $CD_3OD$ , 300MHz) :  $\delta$  (ppm) = 7.71-7.25 (m, 5H,  $H_{arom}$ ); 4.47 (d, 1H, H-1,  $J_{1,2} = 9.3Hz$ ); 3.86-3.30 (m, 6H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6a, H-6b)

**RMN  $^{13}C$**  ( $CD_3OD$ , 75MHz) :  $\delta$  (ppm) = 140.0-128.9 ( $C_{arom}$ ); 93.0 (C-1); 83.2, 80.4, 74.1, 72.2 (C-2, C-3, C-4, C-5); 63.8 (C-6)

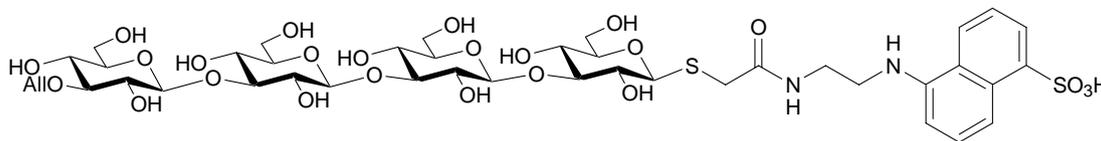
**Disulfure de (3-*O*-allyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucopyranosyle de phényle (40)**



À une solution du fluorure **34** (26.9 mg, 49  $\mu$ mol) et du composé **39** (1 éq, 15 mg), dans du tampon phosphate de sodium, 0.2 mol/L à pH7 (980  $\mu$ L), sont ajoutés de la benzoquinone (1 éq, 5.3 mg) et la glycosynthase GII E231G (1.5 mL, 1 mg/mL de tampon phosphate de sodium, 0.2 mol/L à pH7). Le milieu réactionnel est agité pendant 12h à 37°C. Après purification par chromatographie sur phase inverse (gel de silice C-18, eau à eau/méthanol : 6-4). Le tétrasaccharide **40** est obtenu avec un rendement de 56% (23 mg, 41  $\mu$ mol).

**Masse (ESI) :**  $m/z = 853 [M+Na]^+$

**Acide** [2-[2-((3-*O*-allyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-thioacétyl]-aminoéthyl]-5-aminonaphtalène-1-sulfonique (**41**)



À une solution du composé **40** (23 mg, 28  $\mu$ mol) dans le DMF (500  $\mu$ L) est ajouté du dithiothréitol (10 éq, 43 mg). Le milieu réactionnel est agité pendant 10 min à température ambiante, puis de la triéthylamine (10 éq, 40  $\mu$ L) et de l'acide *N*-(iodoacétamidoéthyl)-1-naphthylamine-5-sulfonique commercial (2.5 éq, 30 mg) sont additionnés. La solution est agitée pendant 12 h à température ambiante, puis concentrée sous vide en présence de silice. Après purification par chromatographie sur gel de silice (acétonitrile à acétonitrile/eau : 8-2), le tétrasaccharide **41** est obtenu avec un rendement de 96% (28 mg, 27  $\mu$ mol).

**Masse** (ESI) :  $m/z = 1027 [M-H]^-$

**Masse exacte** (ESI) calculé pour  $C_{41}H_{59}N_2O_{24}Na_2S_2 [M+Na]^+$

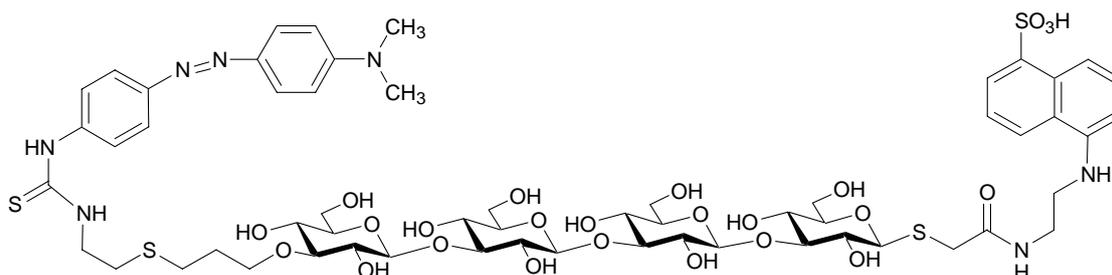
Théorique :  $m/z = 1073.2695$  ; Trouvé :  $m/z = 1073.2699$

**RMN  $^1H$**  ( $D_2O$ , 400MHz) :  $\delta$  (ppm) = 8.37-6.78 (m, 6H,  $CH_{arom}$ ) ; 5.93 (m, 1H, =CH-) ; 5.23 (m, 2H,  $CH_2=$ ) ; 4.70 (d, 1H, H-1<sup>II</sup>,  $J_{1,2} = 8.0$ Hz) ; 4.68 (d, 1H, H-1<sup>III</sup>,  $J_{1,2} = 8.0$ Hz) ; 4.43 (d, 1H, H-1<sup>IV</sup>,  $J_{1,2} = 8.0$ Hz) ; 4.32 (d, 1H, H-1<sup>I</sup>,  $J_{1,2} = 9.8$ Hz) ; 4.28 (d, 2H, - $CH_2-O$ ) ; 3.90-3.75 (m, 4H, H-6a<sup>I</sup>, H-6a<sup>II</sup>, H-6a<sup>III</sup>, H-6a<sup>IV</sup>) ; 3.75-3.14 (m, 24H, H-2<sup>I</sup>, H-2<sup>II</sup>, H-2<sup>III</sup>, H-2<sup>IV</sup>, H-3<sup>I</sup>, H-3<sup>II</sup>, H-3<sup>III</sup>, H-3<sup>IV</sup>, H-4<sup>II</sup>, H-4<sup>III</sup>, H-4<sup>IV</sup>, H-5<sup>II</sup>, H-5<sup>III</sup>, H-5<sup>IV</sup>, H-6b<sup>I</sup>, H-6b<sup>II</sup>, H-6b<sup>III</sup>, H-6b<sup>IV</sup>,  $CH_2-O$ , S- $CH_2$ , NH- $CH_2-CH_2$ -NH) ; 3.14-2.99 (m, 2H, H-4<sup>I</sup>, H-5<sup>I</sup>)

**RMN  $^{13}C$**  ( $D_2O$ , 100MHz) :  $\delta$  (ppm) = 174.4 (C=O) ; 145.2, 139.6 ( $C_q-NH$ ,  $C_q-SO_3Na$ ) ; 135.5 (=CH-) ; 130.4, 125.7 ( $C_q arom$ ) ; 129.8, 127.6, 126.4, 124.9, 116.3, 107.5 ( $CH_{arom}$ ) ; 119.8 ( $CH_2=$ ) ; 104.0 (C-1<sup>IV</sup>) ; 103.8 (C-1<sup>II</sup>, C-1<sup>III</sup>) ; 87.0 (C-3<sup>I</sup>) ; 85.6 (C-1<sup>I</sup>) ; 85.5, 85.3 (C-3<sup>II</sup>, C-3<sup>III</sup>) ; 84.6 (C-3<sup>IV</sup>) ; 80.6 (C-4<sup>I</sup>) ; 77.1, 76.9, 76.8 (C-4<sup>II</sup>, C-4<sup>III</sup>, C-4<sup>IV</sup>) ; 75.2 ( $CH_2-O$ ) ;

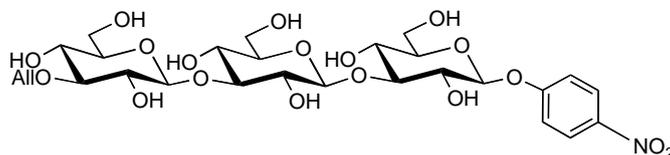
74.6-74.5 (C-2<sup>II</sup>, C-2<sup>III</sup>, C-2<sup>IV</sup>) ; 73.0 (C-2<sup>I</sup>) ; 70.6, 69.4, 69.3, 69.1 (C-5<sup>I</sup>, C-5<sup>II</sup>, C-5<sup>III</sup>, C-5<sup>IV</sup>) ; 61.9 (C-6<sup>I</sup>, C-6<sup>II</sup>, C-6<sup>III</sup>, C-6<sup>IV</sup>) ; 44.3, 39.9, 34.4 (S-CH<sub>2</sub>-, NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH)

**Acide [2-[2-(3-(*N*-diméthylaminophénylazophénylthiouréido-*N*-3-thiahexylamine)- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-thioacétyl]-aminoéthyl]-5-aminonaphtalène-1-sulfonique (42)**



À une solution du composé **41** (8 mg, 7.6  $\mu$ mol) dans l'eau (1 mL) sont ajoutés du 2-aminoéthanethiol (13 éq, 11.3 mg) et du  $\alpha,\alpha'$ -azodiisobutyramidine dihydrochlorure (2.5 éq, 5.2 mg). Le milieu réactionnel est dégazé puis maintenu sous argon pendant 30h à 60°C. Le milieu réactionnel est filtré sur phase inverse (gel de silice C-18, eau à eau/méthanol : 4-6), pour éliminer l'excès de 2-aminoéthanethiol et le V-50. Les fractions contenant le tétrasaccharide sont réunies et concentrées. Le solide obtenu est repris dans l'eau puis lyophilisé. Le lyophilisat est repris dans le DMF (1 mL) et du DABITC (1 éq, 2.2 mg) et du carbonate de sodium (13 mg) sont ajoutés à la solution. Après 24h à 40°C, le milieu réactionnel est évaporé sous vide puis repris dans l'eau et purifié sur phase inverse (gel de silice C-18, eau à eau/méthanol : 4-6). Le tétrasaccharide **42** est obtenu avec un rendement de 32% (3.5 mg, 2.5  $\mu$ mol).

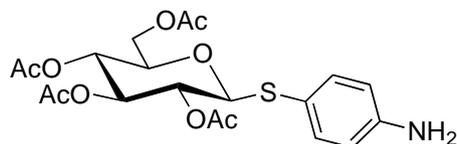
**(3-*O*-Allyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucopyranoside de 4-nitrophényle (**44**)**



À une solution du fluorure **23** (5 mg, 13  $\mu$ mol) et du glucoside de 4-nitrophényle commercial **43** (1 éq, 3.9 mg), dans du tampon phosphate de sodium, 0.2 M à pH7 (260  $\mu$ L), est ajoutée une solution de glycosynthase GII E231G (65  $\mu$ L à 1 mg/mL de tampon phosphate de sodium, 0.2 M à pH7). Le milieu réactionnel est agité pendant 24 h à 37°C, puis concentré et purifié par chromatographie sur phase inverse (gel de silice C18, eau à eau/méthanol : 7-3). Le trisaccharide **44** est obtenu avec un rendement de 80% (6.9 mg, 10  $\mu$ mol).

**Masse (ESI) :**  $m/z = 688 [M+Na]^+$

**2,3,4,6-Tétra-*O*-acétyl-1-thio- $\beta$ -D-glucopyranoside de 4-aminophényle (**45**)**



À une solution refroidie à 0°C de  $\beta$ -D-glucose peracétylé commercial (3.6 g, 9 mmol) dans le dichlorométhane anhydre (25 mL) est ajoutée une solution à 33 % de bromure d'hydrogène dans l'acide acétique (20 mL). Le milieu réactionnel est agité pendant 30 min à 0°C puis 1 h à température ambiante. La solution est diluée avec du dichlorométhane, lavée successivement à l'eau glacée, avec une solution d'hydrogénocarbonate de sodium glacée, à l'eau glacée, séchée sur sulfate de sodium anhydre puis concentrée. Le dérivé bromé est utilisé directement sans autre purification.

Le bromure est repris dans l'acétone (100 mL). Du 4-aminothiophénol (3 éq, 3.47 g) et une solution aqueuse de carbonate de potassium (1.5 éq, 38 mL à 50 g/L) sont ajoutés à la réaction, et agités pendant 30 min à température ambiante. Le milieu réactionnel est concentré

sous pression réduite puis repris dans le dichlorométhane. La phase organique est lavée à l'eau et séchée sur sulfate de sodium anhydre puis concentrée. Après purification par chromatographie sur gel de silice (éther de pétrole/acétate d'éthyle : 2-1), le composé **45** est obtenu avec un rendement de 93% (3.9 g, 8.57 mmol).

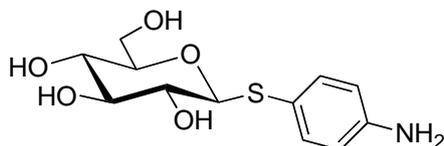
**Point de fusion** : 120°C (éthanol)

**Masse** (ESI) :  $m/z = 477 [M+Na]^+$

**RMN  $^1H$**  ( $CDCl_3$ , 300MHz) :  $\delta$  (ppm) = 7.30-6.56 (m, 4H,  $H_{arom}$ ) ; 5.16, 4.96, 4.85 (3t, 3H, H-2, H-3, H-4) ; 4.48 (d, 1H, H-1,  $J_{1,2} = 10.1$ Hz) ; 4.15 (m, 2H, H-6a, H-6b) ; 3.63 (m, 1H, H-5) ; 2.06, 2.04, 1.97, 1.95 (4s, 12H,  $CH_3$ )

**RMN  $^{13}C$**  ( $CDCl_3$ , 75MHz) :  $\delta$  (ppm) = 170.5-169.2 (C=O) ; 147.3, 117.7 ( $C_q$  arom) ; 136.7, 115.2 ( $CH_{arom}$ ) ; 85.9 (C-1) ; 75.7, 74.1, 69.9, 68.2 (C-2, C-3, C-4, C-5) ; 62.1 (C-6) ; 20.8-20.5 ( $COCH_3$ )

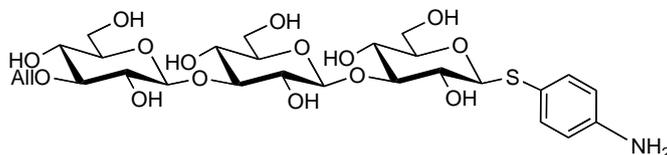
### 1-Thio- $\beta$ -D-glucopyranoside de 4-aminophényle (**46**)



À une solution refroidie à 0°C du composé **45** (966 mg, 2.2 mmol) dans le méthanol (22 mL) est ajoutée une solution de méthanolate de sodium dans le méthanol (1 mol/L, 2.2 mL). Le milieu réactionnel est agité pendant 3 h à température ambiante. La solution est neutralisée avec de la résine Amberlite IR-120, filtrée, concentrée. Le solide obtenu est repris dans l'eau puis lyophilisé. Le composé désacétylé **46** est obtenu avec un rendement de 85% (625 mg, 1.58 mmol).

**Masse** (ESI) :  $m/z = 310 [M+Na]^+$

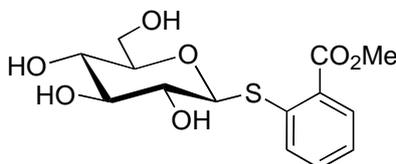
**(3-*O*-Allyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-1-thio- $\beta$ -D-glucopyranoside de 4-aminophényle (**47**)**



À une solution du fluorure **23** (5 mg, 13  $\mu$ mol) et du composé **46** (1 éq, 4.4 mg), dans du tampon phosphate de sodium, 0.2 M à pH7 (260  $\mu$ L), est ajoutée une solution de glycosynthase GII E231G (65  $\mu$ L, à 1 mg/mL de tampon phosphate de sodium, 0.2 mol/L à pH7). Le milieu réactionnel est agité pendant 24 h à 37°C, puis concentré et purifié par chromatographie sur phase inverse (gel de silice C18, eau à eau/méthanol : 7-3). Le trisaccharide **47** est obtenu avec un rendement de 69% (5.8 mg, 9  $\mu$ mol).

**Masse (ESI) :**  $m/z = 674 [M+Na]^+$

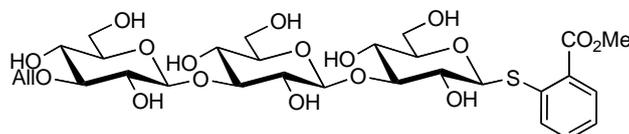
**1-Thio- $\beta$ -D-glucopyranoside de 2-carboxyméthylphényle (**49**)**



À une solution refroidie à 0°C du 2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl-1-thio- $\beta$ -D-glucopyranoside de 2-carboxyméthylphényle **48** (20 mg, 40  $\mu$ mol) dans le méthanol (4 mL) est ajoutée une solution de méthanolate de sodium dans le méthanol (1 mol/L, 40  $\mu$ L). Le milieu réactionnel est agité pendant 2 h à température ambiante. La solution est neutralisée avec de la résine Amberlite IR-120, filtrée, concentrée. Le solide obtenu est repris dans l'eau puis lyophilisé. Le composé désacétylé **49** est obtenu avec un rendement quantitatif (13 mg, 40  $\mu$ mol).

**Masse (ESI) :**  $m/z = 353 [M+Na]^+$

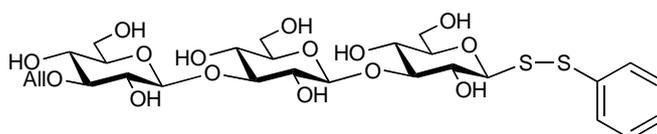
**(3-*O*-Allyl-β-D-glucopyranosyl)-(1→3)-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-1-thio-β-D-glucopyranoside de 2-carboxyméthylphényle (50)**



À une solution du fluorure **23** (5 mg, 13 μmol) et du composé **46** (1 éq, 4.3 mg), dans du tampon phosphate de sodium, 0.2 mol/L à pH7 (260 μL), est ajoutée une solution de glycosynthase GII E231G (65 μL, à 1 mg/mL de tampon phosphate de sodium, 0.2 mol/L à pH7). Le milieu réactionnel est agité pendant 36h à 37°C, puis concentré et purifié par chromatographie sur phase inverse (gel de silice C18, eau à eau/méthanol : 7-3). Le trisaccharide **50** est obtenu avec un rendement de 20% (1.8 mg, 2.6 μmol).

**Masse (ESI) :**  $m/z = 717 [M+Na]^+$

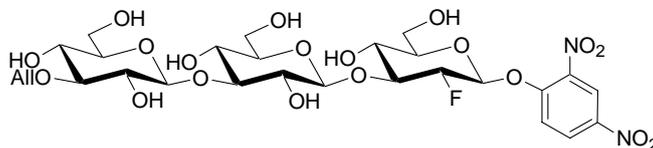
**Disulfure de (3-*O*-allyl-β-D-glucopyranosyl)-(1→3)-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-β-D-glucopyranosyle de phényle (51)**



À une solution du fluorure **23** (5 mg, 13 μmol) et du composé **38** (1 éq, 4 mg), dans du tampon phosphate de sodium, 0.2 mol/L à pH7 (260 μL), est ajoutée une solution de glycosynthase GII E231G (65 μL à 1 mg/mL de tampon phosphate de sodium, 0.2 mol/L à pH7). Le milieu réactionnel est agité pendant 12h à 37°C. Après purification par chromatographie sur phase inverse (gel de silice C-18, eau à eau/méthanol : 6-4). Le trisaccharide **49** est obtenu avec un rendement de 87% (7.6 mg, 11 μmol).

**Masse (ESI) :**  $m/z = 691 [M+Na]^+$

**(3-*O*-Allyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-2-fluoro-2-déoxy- $\beta$ -D-glucopyranoside de 2,4-dinitrophényle (**53**)**



À une solution du fluorure **23** (5 mg, 13  $\mu$ mol) et du 2-fluoro-2-déoxy- $\beta$ -D-glucopyranoside de 2,4-dinitrophényle commercial **52** (1 éq, 4.5 mg), dans du tampon phosphate de sodium, 0.2 mol/L à pH7 (260  $\mu$ L), est ajoutée une solution de glycosynthase GII E231G (65  $\mu$ L à 1 mg/mL de tampon phosphate de sodium, 0.2 mol/L à pH7). Le milieu réactionnel est agité pendant 12h à 37°C. Après purification par chromatographie sur colonne ouverte de gel de silice (acétonitrile à acétonitrile/eau : 9-1). Le trisaccharide **53** est obtenu avec un rendement de 10% (0.9 mg, 1.3  $\mu$ mol).

Masse (ESI) :  $m/z = 735 [M+Na]^+$

### 3. Enzymes et gènes

#### 3.1. Expression et purification de la glycosynthase GII E231G

La souche BL21 (DE3) pLysS d'*E. coli*, contenant le plasmide permettant l'expression de la glycosynthase GII E231G, est ressuscitée, à partir de la culture conservée à -80°C en présence de glycérol, sur le milieu LB/ampicilline/chloramphénicol, pendant 24 h à 37°C. 2 colonies sont prélevées et placées dans 2 tubes de 50 mL contenant chacun 10 mL de TB/ampicilline/chloramphénicol. Les tubes sont placés à 37°C et agités à 190 rpm pendant 14 h. Ces 20 mL de pré-culture sont utilisés pour inoculer 980 mL de milieu TB/ampicilline/chloramphénicol, placés à 37°C et agités à 140 rpm. Lorsque la  $DO_{600} \approx 0.75$  l'expression est induite par addition d'IPTG (2 mL à 50 mg/mL). Le milieu est agité doucement à 25°C pendant 4 h puis centrifugé (7000g, 20 min, à 4°C). Le culot contenant les bactéries est congelé à -20°C.

Le tampon **A** utilisé ci-après est un tampon phosphate de sodium à 50 mmol/L, pH 7.8, contenant 300 mmol/L de chlorure de sodium et de l'imidazole à la concentration indiquée. La protéine est purifiée par chromatographie d'affinité sur colonne de Nickel "LiquiChip Ni-NTA Beads" (Qiagen).

Les cellules sont lysées par un cycle de congélation/décongélation puis resuspendues dans le tampon **A** contenant 20 mmol/L d'imidazole (20 mL). Le milieu est alors conservé dans la glace. La suspension est fluidifiée par sonication puis centrifugée (8000g, 20 min, à 4°C). Le surnageant est séparé du culot, et le processus de sonication/centrifugation est répété jusqu'à obtenir un surnageant limpide.

La protéine est purifiée sur une colonne Ni-NTA (1 mL), pré-équilibrée avec le tampon **A** contenant 20 mmol/L d'imidazole. La colonne est lavée avec le tampon **A** à 50 mmol/L d'imidazole (10 à 15 mL), puis la protéine est éluée avec le tampon **A** à 200 mmol/L (3 à 5 mL) puis à 400 mmol/L d'imidazole (5 à 7,5 mL). La concentration en protéine dans les fractions d'élution est déterminée par dosage de Bradford,<sup>156</sup> en utilisant la BSA comme étalon. La pureté de la protéine est estimée sur gel SDS-PAGE.

Finalement la protéine est dialysée contre du tampon phosphate de sodium à 0.2mol/L, pH7.0, puis concentrée à une concentration finale de 1mg/mL et conservée à -20°C.

La quantité de glycosynthase GII E231G obtenue est de 6 à 7 mg/L de culture.

### **3.2. Suivi par spectrofluorométrie de l'hydrolyse catalysée par la *GmGBP***

L'hydrolyse enzymatique du substrat **42** est suivie sur un spectrofluorimètre Perkin Elmer LS50, en utilisant une longueur d'onde d'excitation de 340 nm et une longueur d'onde d'émission de 470 nm. L'hydrolyse du substrat est suivie grâce à l'augmentation de fluorescence à 470 nm. La fente d'excitation utilisée est de 5 nm, et la fente d'émission est de 20 nm.

Le substrat et l'enzyme sont en solution dans du tampon phosphate à 5mmol/L, à pH6. La *GmGBP* utilisée a été purifiée comme décrit dans la littérature.<sup>5</sup> Une solution du substrat **42** (100 µL, 5 µmol/L) est placée dans la cuve en quartz du spectrofluorimètre, à température ambiante. Après 100 s environ, une solution de *GmGBP* (10 µL, 1 µmol/L) est ajoutée au milieu. L'augmentation de la fluorescence est enregistrée toutes les secondes pendant 1800 s.

### 3.3. Stéréochimie de l'hydrolyse catalysée par la *GmGBP*

La stéréochimie de la réaction d'hydrolyse a été déterminée par RMN  $^1\text{H}$  à 400MHz. Tous les spectres furent enregistrés dans du  $\text{D}_2\text{O}$  à 99.96%. Les protons des hydroxyles du substrat  $\beta$ -(1,3)-glucane, la laminarine de *Laminaria digitata* (Fluka), furent échangés avec du  $\text{D}_2\text{O}$  à 99.8%. La *GmGBP* utilisée (360  $\mu\text{g}$  dans du tampon phosphate à 50 mmol/L, pH 6) a été purifiée comme décrit,<sup>5</sup> puis lyophilisée avant usage. Le pic résiduel de l'eau a été éliminé par présaturation (atténuation à 59dB). Le spectre de la laminarine (6 mg dans 540  $\mu\text{L}$  de  $\text{D}_2\text{O}$ ) a été enregistré comme référence ( $t = 0$ ) à 313K. La *GmGBP* recombinante purifiée (360  $\mu\text{g}$  dans 420  $\mu\text{L}$  de  $\text{D}_2\text{O}$ ) a été ajoutée à un nouveau lot de laminarine (6 mg dans 120  $\mu\text{L}$  de  $\text{D}_2\text{O}$ ). Le premier spectre  $^1\text{H}$  fut enregistré, à 303K, 10 min après addition, les spectres suivants furent mesurés toutes les 5 min pendant 30 min, puis toutes les 10 min pendant les 90 min suivantes. Tous les spectres furent enregistrés sur une largeur spectrale de 4006 Hz avec 8 scans pour une durée totale de 38 s chacun.

### 3.4. Transformations d'*Agrobacterium rhizogenes* et *Medicago truncatula*

- Transformation d'*Agrobacterium rhizogenes* ARqual par la méthode de congélation-décongélation<sup>142</sup>

La souche ARqual d'*A. rhizogenes* est ressuscitée sur le milieu solide TY/streptomycine, à partir de la culture conservée à  $-80^\circ\text{C}$  en présence de glycérol. Après 48h à  $28^\circ\text{C}$ , 1 colonie est prélevée et cultivée dans 2.5 mL de milieu TY/streptomycine, 12h à  $28^\circ\text{C}$ . 2 mL de cette culture sont additionnés à 50 mL de milieu TY dans un erlenmeyer de 250 mL, et agités (250 rpm) à  $28^\circ\text{C}$  pendant 7h ( $\text{DO}_{600} = 0.72$ ). La culture est refroidie sur de la glace, puis centrifugée (3000 g, 10 min, à  $4^\circ\text{C}$ ). Le surnageant est éliminé et les cellules sont remises en suspension dans une solution de chlorure de calcium (5 mL, 20 mmol/L, à  $0^\circ\text{C}$ ). La suspension est centrifugée (4000 g, 5 min, à  $4^\circ\text{C}$ ). Le surnageant est éliminé et les cellules sont à nouveau mises en suspension dans une solution de chlorure de calcium (1 mL, 20 mmol/L, à  $0^\circ\text{C}$ ). Des aliquots de 60  $\mu\text{L}$  sont répartis dans des tubes Eppendorf préalablement refroidis. Les plasmides pGreen (1  $\mu\text{g}$ ) et pSoup (250 ng) sont ajoutés à partir

des solutions mères dont les concentrations sont indiquées ci-dessous. Le volume ajouté est également précisé.

Plasmide		Solution mère	Volume
pGreen:35S-insert-TAP-Tag	#3-	0.68 µg/µL	1.471 µL
pGreen:35S- <i>GmGbp</i> -TAP-Tag	#3+	0.66 µg/µL	1.515 µL
pGreen:35S-insert-GFP	#6-	0.52 µg/µL	1.923 µL
pGreen:35S- <i>GmGbp</i> -GFP	#6+	0.44 µg/µL	2.27 µL
pGreen:35S-mRFP	#9-	0.90 µg/µL	1.111 µL
pGreen:35S- <i>GmGbp</i> -mRFP	#9+	1.18 µg/µL	0.847 µL
pSoup		50 ng/µL	5 µL

Les cellules sont ensuite congelées dans l'azote liquide puis décongelées 37°C pendant 5 min. Après addition de milieu SOC (600 µL, à 37°C), les tubes sont agités doucement pendant 2h à 28°C. Les cellules sont finalement réparties dans des boîtes contenant le milieu solide TY/streptomycine/kanamycine/tétracycline, et incubées à 28°C pendant 3 jours. Les colonies obtenues pour les échantillons #3+, #6+ et #9+ sont testées par PCR en utilisant les oligonucléotides **barrel1** et **Xho-anti** et le plasmide pZA6, correspondant exactement à la séquence de *GmGbp* initialement isolée,<sup>26</sup> comme contrôle positif.

solution mère	concentration	concentration finale	réaction
tampon <i>Taq</i> -polymérase	10 x	1 x	0.8 µL
MgCl <sub>2</sub>	25 mmol/L	1 mmol/L	0.32 µL
dNTPs	10 mmol/L	0.2 mmol/L	0.16 µL
<b>barrel1</b>	50 pmol/µL	1 pmol/µL	0.16 µL
<b>Xho-anti</b>	50 pmol/µL	1 pmol/µL	0.16 µL
<i>Taq</i> -polymérase	5 U/µL	0.025 U/µL	0.04 µL
Eau			6.36 µL
ADN ou pZA6	20 ng/µL		d'une colonie 0.5 µL

Toutes les colonies testées se sont révélées positives.

- Transformation des racines de *Medicago truncatula*<sup>157</sup>

Les graines de *M. truncatula* sont stérilisées par le traitement suivant :

- acide sulfurique concentré, 5 min
- lavage 5 fois à l'eau stérile
- hypochlorite de sodium à 12%, 3 min
- lavage 5 fois à l'eau stérile

Puis mises à germer dans l'obscurité, à 14°C, sur un milieu solide eau-agar.

Les souches ARqua1 contenant les plasmides pGreen:3-/pSoup, pGreen:3+/pSoup, pGreen:6-/pSoup, pGreen:6+/pSoup, pGreen:9-/pSoup ou pGreen:9+/pSoup, sont cultivées dans 2.5 mL de milieu TY/streptomycine/kanamycine/tétracycline pendant 12h à 28°C. Puis 400 µL de chaque culture sont déposés sur milieu solide et incubés pendant 24h à 28°C. De cette façon, une couche de bactéries, pouvant être utilisés pour inoculer *M.truncatula*, se forme dans les boîtes de Pétri.

Après 40h de germination environ, les racines mesurent approximativement 1 cm. La racine est sectionnée au scalpel à environ 3 mm de son extrémité puis légèrement frottée à la surface de la boîte contenant la souche d'*A. rhizogenes* transformée. Les jeunes pousses sont finalement transférées dans une boîte de Petri carré, contenant le milieu Fahraeus modifié/kanamycine et placées dans une chambre de culture à 20°C, avec une photopériode de 16h. Les boîtes sont fermées par du parafilm dans lequel des ouvertures sont découpées pour permettre les échanges gazeux. Les boîtes sont inclinées à 45° pendant 48h, pour éviter la chute des graines, avant d'être disposées verticalement. Les premières racines transformées apparaissent au niveau de la section inoculée, après 1 à 2 semaines. 2 à 3 semaines plus tard, les plants sont transférés dans une chambre à 25°C, avec une photopériode de 16h.

### **3.5. Clonages des Gbps de *Medicago truncatula***

- Séquences des gènes *MtGbps* et positionnement des oligonucléotides utilisés pour l'insertion des sites de restriction

ATG, TAG	codons start et stop, respectivement
souligné	oligonucleotides dessinés par Julie Leclercq
YNDHH	peptide conservé, D418 chez <i>GmGbp</i>
ESTSE	peptides conservés, E494 et E498 chez <i>GmGbp</i>
BamHI, MscI, Ecl1136II	sites de reconnaissance pour les enzymes de restriction

- *MtGbp1*

5' - **ataggatCC**ATGTCTTCTACTATCAACA - 3'

**cagc**ataaccacc**atgctcttctactatc**AAACAAGAACAAACCTTTTCTATTCCCACAAGGTAATTCCACTGTCTCCCTGACCCCTCCAAATTCT  
TCTCTCCAAATCTGCTATCCACACCCCTGCCTACAACTCTTTCTTCCAAAACCTTTGTTCTCAACAATGGTGATGCACCTGAATACTTTTCATCC  
TTACCTCATCAATCATCAAACCTCATCACTTTCTGTCTCATACCTACTCGCTCTT**CGAATTCTGCTGTCATATCCCAAGTTT**CCACAATGAT  
CTCACCATAACTTCTAATCAACAGAATACCAACAAAGTTCTAATGGAAAACACATAATCTCTTCTTATAGTGATCTCGGTGTTACCTTAGATA  
TCCCTTCTCAAATCTCAGTTTCTTCTTGTAGAGGAAGTCCATTATTGACTTTTCTGTAACAAAACCAACCCCTCTTTCCATTTCCACCAT  
TCATGCCATTACTTCTTCTCTCAAATAGCGCCCTTACCAGGATCAAGTTTCAACTTAACAATGGTCAAACATGGATACTATATGCTTCCTCG  
CCAATCAAGTTGAGTCATTTTACTTCTCAGATAACTTCTGAC**ACCTTTTCCGGTATAAATTCGG**ATTGCTTTGCTACCGGGTCTGATT**CGAAA**  
**ACGAAGCTGTTCTTGACAG**ATTAGTTCCTGTCAACCTTTAGCAGGTAATGCTAAACTCAGAGAACCATTTTGTGTTGAGTATAAGTTTGAGAA  
GAATGTTTCAGGTGATTTGTTATTATTAGCACACCCCTCTTCATCTTCAACTTCTGTCAAAAAGTGAGAGTGATGTAACCTGTTCTTGATGATTTT  
AAGTATAACAAGCATTGATGGTGACCTTGTGGTGTGTTGGTGATTTCATGGATTTTGA AAAACAGAACCTGTTTCCATGACTTGGCACTCAAGCA  
AAGG**TGTA**AAAG**ACGAATCACGC**CAATGAAATGTTTTCATCACTTTCTAAAAGATGTTGAAGGTTTAAACTCATCTGCAACAAAACAAAACAAATC  
GTCTTATTTTATGGA AAAATTAATTGCAAGAGCAGCTAGGCTTGCAATTGATAGCTGAAGAGGTTTCTTCTTGTGATGCTATTGAAAAAGTAAGA  
AACTTTTGAAGGAAACCATTGAGCCTTGGCTTGATGGAACTTTAATGGAATGGATTTCTATATGATAAAAAATGGGGAGGACTTATTA  
AACAAAGGTCTAATGATGGTGGTGGTATTTCGGTTTCGGAATTTACAATGATCATCACTTTCCTTAGGATATTT**TCTTTACGCAATAGCAGT**  
**GC**TTGTAAAGATCGATCCAACATGGGGTAGGAAATATAAGGCTCAAGCCTATTCACTTGTGGAAGATTTTATGAACTTAAGCATAGAATCGAAC  
TCAAATATACCGCTTTAAGGTGTTTCGATCTTACAAGTTGCATTCGTGGGCCGGAGGGCTAACCGAGTTTTCAGATGGAAGGAATCAAGAGA  
GTACTAGTGAAGCTGTGAATGCATACTATGCTGCAGCATTGATGGGAATAGCATAATGGTGATTCTCAACTTGTGTCCATTGGATCAACACTAAC  
ATCATTGGAAATCTTGGAAACAAAATGTTGGTGGCATGTTAAGAAGAATGGGAAATGTTATGAAGAAGAGTTTACAAAAGAGAATAGAATAGTG  
GGAGTTTTGTGGAATAATAAAAGAGATAGTGGACTTTGGTTTGTCTCCACCTGAATGGAGAGAAGCTAGGACAGGAATTCAGCTTATACCATTGG  
CTCCTATTTCTGAAGATTTGTTTCTGATGTTGATTATGTTAAAGATCTTGTGAGTGGACATTGCCTGCTTTGAATAGGGAAGGTGGTGGTGG  
AGAAGGATGGAAGGGATCTTATATTCAATTGGAAGGAATTTATGATAATGAAAGTGCATTGAAGAAGATAAGAAGCTTGAATGGTTTTGATGGT  
GGAAACTCTTTGACTAATCTTTTGTGGTGGATTCATAGCAGAGGT**TAA**GGTGGT**GATGATGAGTGGAAAAGATTT**GGTTCTACTTACCATTTTG

3' - **CCACCTAAGTATCGTCTCCA**accggttaa - 5'

GTTATCATAATTTCAATTCATGTATTGTATCTTACTTTTTGTTGTTTCAATTGTTAAGTGCTTGATGCAAGAAATGTTTGGATGATATGGTTCT  
GGTTTGTACGGTCTATTTTATTTTACGCGACTCGAAAAATTAATTTTTCGGTTGCGAGCGGAGGATACACGATTTCAAACAAATAAATAAAT  
TGTCTTTTTTTTTTAGGGGAATAAATAAATTTGGTGCCACTTGTAAACAATTCATGGTATGATTAATAAAAAGTTGTGTACCTTTCAATTCATT  
TTGGTACATGAACNANANAAAAAANAAAAAANAAAAAANAAAAA

MSSTINKNKPFLFPQGNSTVLPDPSKFFSPNLLSTPLPTNSFFQNFVLNNGDAPEYFHPYLIKSSNSLSVSYPRSSNSAVISQVFNHDLTIT  
SNQQNTKQSSNGKHI ISSYSDLVLTLDIPSSNLSFFLVRGSPYLTFVSKPTPLSISTIHAI TSFSSNSALTRIKFQLNNGQTWILYASSPIKL  
SHFTSQITSDTSLGIIRIALLPGS DSKNEAVLDRFSSCHPLAGNAKLREFFCVEYKFEKNVSGDLLLHPLHLQLLSKSES DVTVLDDFKYTS  
IDGDLVGVVGD SWILKTEPVSMTWHSSKGVKDESRNEIVSSLSKDV EGLNSSATKQTKSSYFYGKLIARAARLALIAEEVFFDAIEKVRNFLK  
ETIEPWL DGT FNNGFLYDKKWGLITQQGSNDGGDFGFI **YNDHH**FHLGYFLYAI AVLVKIDPTWGRKYKAQAYS LVEDFMNLSIESNSNYT  
RLRCFDLYKLH SWAGGLETFSDGRNQ **ESTSE**AVNAYYAAALMGIAYGDSQLVSI GSTLTSLEILGTKMWHVKKNGKLYEEEFTKENRIVGVLW  
NNKRD SGLWFAPPEWREARTGIQLIPLAPISEDLFSDVDYVKDLV EWTLPALNREGVGEWKGFLYSLEGIYDNESALKKIRSLNGFDGNSL  
TNLLWIIHSRG\*

- *MtGbp2*

**attggatCcaATGTCCTTCTGTTCCCTTC-3'**  
**ccaatcacaatgtcttctgttcc**TTTCCTTTTTCTCCTCAAACCTCATTCAACTGTCTTCCAAACCTTCCAATTTCTTCTCACAAAACCTACTA  
TCCACACCTCTCCCTACAAAACCTATTCTTCCAATATTTTGGTCTACAAAATGGTGATCAACATGAATACATTACCCTTACCTTGTCAAATCCT  
CAAACCTCTCCCTATCTGTTTCATACCCTCTTCTCCTCTTTTCAACAGCAATGTTGTACCAAGTTTTTTCACCAGATCTTACAATATCTTCCCTC  
ACAAAAACTCACACAAATATACAAAAAACCATGTTATTTTCATCTTATAGTGATCTTGGTGTGACTCTTGATATTCCTCTTCAAACCTAAGA  
TTCTTTTTGGTTAGAGGAAGCCCTTTTTAACTGCTTCAGTTACAAAACCAATACCTCTTTCAATCACACAATTCATAGTATAATTTCTTTGT  
CTCCATTTGATAAGAAAAAACCAATATACCCTTCA**ACTCAATAACAATCAGACATGGA**TCATATACACTTCTTCAACCAATCAACTtCAACCA  
TGATGGTTCCGAGGTTAAATCCGGTCCATTTTCCGGTATTATTTCGTATCGCGGTTGTTCTCGATTCCAATGGTGAGAAAAATCTTGATAAATTT  
AGCTCTTGTACCTATCTCTGGTGATGCAAACATCAAGAAGAAATTTGGTTTTGGTATATAAATGGCAAAGAAAAATTTCTGGTGATTTACTCA  
TGCTAGCACACCTCTTCATGTTAAGCTTTTATCAAAAAGTAAACATCATGGTGTACTGTTCTTAATGATTTTTAAGTATAAAAGTGTGATGG  
TGATCTTGTGGTGTGTTGGAAATTCATGGAATTTGAAAACCTGATTCTGTTAATGTAACATGGCATTCAAATAAAGGTGTGCAAAAAGAAATCA  
AATGCTGAAATTTGTTCTgCTCTGTTAATGATGTGAAGAAGCTAAACTTTTCGTCGATAACAACAAATTCATCTTATTTTTATGGTAAGATTG  
TTGGAAGAGCTGCAAGGTTTGCCTTAATAGCTGAAGAAGTTTCTTACCCTAAAGTGATTCCAATTATCAAGAATTTTTTGAAGGAACTATTGA  
GCCATGGTTGGATGGAATTTCAAAGGGAATGGTTTTTCTATGAAAAAGTTGGGGTGGATTAGTTACTCAACaAGGGATTAATGATCAAGT  
GCTGATTTTGGTTTTGGAATGTATAATGATCATCATTATCATTAGGTTATTTCTTTTATGGAATGGAGTCTTGCAAAAAATGATCCTTCTT  
GGGGACAAAAGTATAAACCCACAAGTTTATTCACCTGTGAAAGATTTTTATGAaCTTGGGCCAAAGGGATAACAAAAATTCACCACTTTAAGGTG  
TTTTGATCCATACAAGTGCATTCTTGGGCATCGGGTTTGACCGAATTTGAACATGGAAGAAATCAAGAAAGTCTAGTGAAGCTGTGAATGCG  
TACTATTCACTAGCATTGGTTGGTTTAGCATATGGCGACAAAGATCTTGTGCGCCACTGGATCAACGCTTTTAGCGTTGGAAGTCAATGCCGTG  
AAACTTGGTGGCATGTGAAAGCTGAAAATAATTTGATGTTGGAGATTTTGCAGAAAGAGAATAGAATAGTGGGAATTTTGTGGGCTAATAAAAG  
AGATAGTGCACATAGGTGGGCTTCATCTGAATGTAGAGAGTGTAGGCTTAGTATACAAGTTTTGCCTTTGTTGCCTATAACTGAGTCTTTGTTT  
AACGATGGTGTATGCTAAGGAGCTTGTGGAATGGACAGT**GCCTTCTTCAAGAACAAAACCTAATATT**GAAGGTTGAAAGGGTTTACCTATG  
CTTTGCAAGGTGTTTATGATAAGAAGAATGCATTGAAGAATATTAGAATGTTGAAAGGTTTTGATGATGGAAACTCTTTTAGTAATTTGTTATG  
3' - C  
GTGGATTCATAGTAGG**TGA**AGAATGATGTATAAgagcaattgtgcaaaatttaataatca  
**CACCTAAGTATCATCCaccogtata-5'**

MSSVPFLFPQTHSTVLPNPSNFFSQNLLSTPLPTNSFFQNFVLQNGDQHEYIHPYLVKSSNSSLSVSYPLLLFSTAMLYQVFSPLDTISSSQKT  
HTNIPKNHVISSYSDLGVTLDIPSSNLRFVLRGSPFLTASVTKPIPLSITTIHSIISLSPFDKTKKYTLQLNQNQTIWIYTSSEFINFNHDGS  
EVKSGPFSGIIRIAVVPDSNGEKILDKFSSCYPIISGDANIKKKFGLVYKQKNSGDLMLLAHPLHVKLLSKSNNHGVTVLNDFKYKSVGDGLV  
GVVGNWNLKTDSVNVTVHNSKGVAKESNAEIVSTLVNDVKKLNFSSITNNSYFYGKIVGRAARFALIAEVSYPKVIPIIKNFLKETIEPWL  
DGNFKNGFFYEKSWGGLVTQQGINDSSADDFGFM**YNDHH**YHLGYFLYGIVLAKIDPSWGQYKYPQVYSLVKDFMNLGQRDNKNYPTLRCDFP  
YKLHWSAGLTFEHRNQ**ESSSE**AVNAYYSVALVGLAYGDKDLVATGSTLLALEVNAVQTTWWHVKAENNLGGDFAKENRIVGILWANKRDSA  
LWWASSECRECLSIQVLPPLPITESLFNDGVYAKELVEWTVPSFKNKNTNIEGWKGFYALQGVYDKKNALKNIRMLKGFDDGNSFSNLLWWIHR  
RS\*

- *MtGbp3*

**ataggatCcaATGACAGATTCAAGTTCAAAT-3'**  
nnnnnnn**caatgacagattcaagttcaaatattatcc**CAGACCCCTCCAAATCTTCTCTAAAAATCTGCTATCTAAACCCCTCCCCACAAAAC  
CTTTCTTCCAAAACCTTTGTTCTCAACAACGGTGACCAACCTGAATATTTTCATCCTTACCTCATCAAATCATCAGACTCATCACTTTCTGTTTC  
ATATCCATCTATTTCATCAGCCCTTCTGCTATATCTCAAGTTTTCTACTGCTGATCTTACCATCACTTCCGCTACGAAAACCTTCCAATGAAAaA  
CATGTAGTATCTT**CTTTTAGTGATCTCGGTGTC**ACCTTAGATATCCCTTCTTCAAATCTCACCTTCTTCTTGTAAAGAGGAAGTCCCTTTTTAA  
CTTTCTTGTAGCAGATTCAACACCTCTTCCATAACTACTATTCATTCCATTCTGTTCTTTTTCGTCAAATGATTCCTTTACTAAGTACACATT  
TAAGTTAGACAATGATCAAACATGGATTTTATACTCTTCCCTTGCCAATCAAGTTAAGTATGCGCTTTCTAAGATCACTTCTGAGGCCTTTTCT  
GGTGAATTCGAATGCTTTGTTGACGAATCCAATTCACAAAATGAAGAAGTTCTTGACATGTTTAGTACTTGTACCTGTGTCGGCGCAGC  
CTTCATTCAAATGAAGCATTACTATGGAGTATAACTGGGAGAAGAAAGGTTCAAGTAGTGATTTGTTGATGTTAGCTCACCCCTTTCATATTC

Partie expérimentale

GCTCCTCAATCTAATAGTACTGACCATAACGCTCTGGTTTTTGGATGATTTTAAGTATCAAAGCATTGATGGAGACCTTGTGGTGTGGTGGT  
GATTCATGGCTTTTGGAACTGATCCTGTTTATGTTACATGGCTTTCAACCAATGGTGTGAAGAAAGAAATCTCGTGATGAGATCGTTTCATCAC  
TTGTAAGAGATGTTGGCAGTCTAGATTCATTGAAAATAACAACGAAGGATCTTACTCTTATGGTAAATTGATTGGAAGGGCGCGAGGTTTGC  
ATTGATAGCCGAAGAGGTTTCATACTTAGATGTGATTCCAAAGGTTAAGAAGTTTTTGAAGAAACCATTGAGCCTGGTTAGATGGAACTTTA  
AATGGGAATGGATTTCTACAAGATGATAAAATGGGGTGGCATTGTTACCATACAAGGGTCTGTTGATTCATGCTGATCCGGTTTCGGAATCT  
ATAATGATCATGCTGATCACTTAGGATACTTTCTTTATGGAATGCTGTTCTTACTAAGATTGACACTGCATGGGGTGGAAATATAAGTCTGC  
GGCCTATTCACTTATGAAAGATTTTATGAACTGAACTCGGGACCAGACTCCGATGACACACGTTTAAAGATATTAATGATCTTTATCA**TGGCCAC**  
AATCATAGTCCAGGGTTAATTCAGTATAAAGATGGAAGAAACCATAAGAGCACAAGTCAAGCTGCAAATGCATATTATTCCGCAGCATTGATGG  
GTTTGGCGTACAACGACGACGACCTTTTTATCCTTGGATCGACACTTTTAGCCTTTGGAATTAAGCGGGCTCAAATGTGGTGGCATATAAAAAGA  
AGGAGGAAAACATATATGCCGAAGAATTTACAAAAGCGAATCGGATCATGGGATTTCTATGGTCCAACAAGAGAGAAAAGTGGACTTTGGTTTGGCT  
CCACCGGAATATAAAGAATGTAGGGTTGGAGTTCAGCTCTTACCATTGCTTCTTATTTCTGAAGTATTGTTCTCTGATGTGCAATATGTGAAGC  
AACTTGTGTAATGGGCATTGCC**TGCTTTGAAAAGAGATGGTGTGAA**GAAAGGATGGAAAGGGTTGTATATGCCTTACAAGGAATTTATGATAA  
GGAAAATGCATTGAAGAATATAAGAATTTAAAAGGATTTGATGATGGAAACTCATTGACTAATCTCTTGTGGTGGATTTATAGTAGAGAA**TGA**

3' - **CCACCTAAATATCATCTCTTctcgagata**

AAAACACTgcatgtggtttgattattacatccTATCCTATATGTATAAAAATAAGTTCATGTATAAGAACAAAACATACTAAAGTGCATAC  
AATATAATCATGCAATATTGTGTATCTT

MTDSSNIIPDPKFFSKNLLSKPLPTNSFFQNFVNLNGDQPEYFHPYLIKSSDSSLVSYPSISISPSAISQVFTADLTIITSATKTSNEKHVV  
SSFSDLGVTLDIPSSNLTFVLRGSPFLTFVADSTPLSITTHSIRSFSNSDFTKYTFKLDNDQTWILYSSLPKLSHGLSKITSEAFSGVI  
RIALLTNSNSQNEEVLDMFSTCYPVSGDASFNEAFTMEYNWEKKGSSDLLMLAHLPLHIQLLQSNSTDHNVLVFDDFKYQSIDGLVGVGDSW  
LLETDPVYVWTLSTNGVKESRDEIVSSLVRDVGSLDSLKITTSDSYSGKLIIGRAARFALIAEEVSYLDVPIPKVKFLKETIEPWLDTLNGN  
GFLQDDKGGIVTIQGSVDSNADSGFI**YNDH**DHLGYFLYGI AVLTKIDTAWGEKYKSAAYS LMKDFMNLNSGPDSDDRRLRYyDLYHGHNS  
PGLIQYKDRNH**STS**AANAYSAALMGLAYNDADLFI LGSTLLAFGIKAAQMWWHIKEGGKLYAEEFTKANRIMGFLWSNKRESGLWFAPPE  
YKECRVGVQLPLLPISSEVLFSDVEYVKQLVEWALPALKRDGVEEGWKGFVYALQGIYDKENALKNIRNLKGFDDGNSLNLNLLWYISRE\*

- *MiGbp4*

5' - **ataggatccATGCATCATTTCACCAAAA** - 3'

**cacaacaacaacctcagttaac**actgccagtgaaccaccatctccaaca**atg**catcatttcacacaaaaaaccaaacctttctattcccaca  
gactcattccacggctcctccctgacccccacaaacttctctctccaaatctgctatccacaccctccccacaaactcttctccaaaacttt  
gtctcaaaaatggTGACCAACCTGAATACATTATCCATATCTCATCAAATCTTCAAACCTCATCACTTCTCTTCTTACCATCTCGTTTCT  
TCAACTCTTCTTTCATATACCAAGTTTTCAACCCTGATCTCCCATATCCAGTCAAAAAATCGAACCTTTATCTCATTCACAAATCACAATCTC  
TTCTTACAATGATCTCAGTGTACATTGGATATACCTTCATCAAATCTGCGGTTTTTTCTTGTAGAGGAAGTCCCTTTTTGACATCTC**TGTA**  
**ACACAACCAACACCTC**TTTCAATCACAACAATCCATGCAATTTCTAGTTTTAGTTCTAATGATTCTCTTACAAGCATACTTTTCAGTTTAAACA  
ATGGTCAAACATGGATTTTGTATGCTTCTTCTGCTATAAGATTGAGTCAATGGTGTCTTCTGAGATTGTTTCTGAGGCTTTTTATGGTGTGGTTAG  
GATTGCTTTGTTGCCGTGATTCTGATTCAAGCATGAAGATGTTCTTGACAGGTTTAGTTCTGTTACCCTTTATGTTGGTGTGCTGTTTTTACA  
AAACCATTTGTGTTGAGTATAAATGGGAGAAGAAAGGTTGGGGGATTTATTATGTTAGCACATCTCTTCATGTTGACGTTTTGTATGATA  
GTGATTGTGATAATGTTACTGTTTTGAATGATTTTAAAGTATAGAAGTATTGATGGTGTCTTGTGGTGTGTTGGTGTATCATGGTGTGTTGAA  
AACCGATCCGGTTTCTGTAACCTGGCATTCTACTAAGGGTGTAAAGAAGAATCTCATGATGAGATTGTTCCGTTCTTTTGAAGATGTTGAA  
GGTTTGAATTCGCTGCAATAGCAGCAATTCGCTTACTTTTATGGCAAGTTGATTGCTAGGGCTGCTAGGTTGGCTTTGATTGCTGAAGAGG  
TTGTTTCCCTTGTGATTCCGAAAATTAGGAAGTTTTTGAAGGAACTATTGAGCCTTGGCTTGTGGAACTTTAAATGGAATGGATTTCT  
CTATGATGAAAATGGGAGGAATGTTACCAACAAGGGTCTAATGATACTGGTGTGATTTGGATTCCGAGTTTATAATGATCATCATTAT  
CATTTAGGATACTTTCTCTATGGAATTGCTGTGCTTGCAAAGATTGATCCAATTTGGGGTAGGAAGTATAAGCCTCAAGCTTATTCATCATGG  
CTGATTTTATGAACTTGAGCAGAAATCCGAACTCGAATTACACCCGCTAAGGTGTTTCGATCTTTTTAAATGCATTCgTGGCCGGAGGGTT  
AACT**GAGTTCGGAGATGGAAGAAA**TCAAGAGAGTACTAGTGAAGCTGTGAATGCATACATTCAGCAGCTTTGATGGGTTTGGCATATGGCGAC  
ACTCATCTCGTTGACAGTGGATCGACACTTACATCATTGGAATTCATGCAGCTCAAATGTGGTGGCATGTAAAAGGTGGAGATAATGTTTACG  
ACGAGGTTTTTGGCAAAGAGAATAAGGTGGTGGTGTCTTTGGGCTAACAAGAGACAGTGGATTATGGTTTGTCTCTCTGAATGGAAGA  
ATGTAGGCTTGGGATTCAGCTCTTACCATTGCTTCCAATTTCTGAATCTTATTTCAAATGTTGATTTGTGAAGGAACCTGTGGAGTGGACA

## Partie expérimentale

TTGCCTGCTTTGAATAGGGAAGGTGTTGGAGAAGGATGGAAAGGGTTTGTCTATGCCTTGAAGGAGTTTATGATAATGAAAGTGGATTGAAGA  
 AGATAAGAAGCTGAATGGTTTTGATGATGAAACTCATTGACTAATCTCTTATGGTGGATTTCATAGTAGAGTAATGAAGATGAGGAGTTGG  
 TCATGGAAAACACTGCTGGTTTGGTAATTAAGTGCAT **TAG**GAGTATTTGTTAATGATTTCAAATT **ctgctttgtaccaattattgc**TGTAGTT

**3' -CAAACCATTAATGACAGTAAcCggttat-5'**

AACACGATGCTTGTATAAATTTGTTTGTGAATAAAAAGTATGTTGTGTTTGCTTATG

MHHFTKTKPFLFPQTHSTVLPDPTNFFSPNLLSTPLPTNSFFQNFVLKNGDQPEYIHPYLIKSSNSSLSLSYPSRFFNSSFIYQVFNPDLTIS  
 SQKIEPLSHSNHKISSYNDLSVTLTDIPSSNLRFFLVRGSPFLTFVSVTQPTPLSITTIHAILSFSNSDSLTKHTQFNNGQTWILYASSAIRLSH  
 GVSEIVSEAFYGVVRIALLPDSDFKHEDVLDLRFSSCYPLCGDAVFTKPCFVEYKWEKKGWGDLLELLAHPLHVQLLYDSDCDNVTVLNDFKYRSI  
 DGDVGVVGDVSWLLKTDVSVTWHSTKGVKEESHDEIVSVLLKDVLEGLNSSAIATNSSYFYGKLIARAARLALIAEEVCFDVIPIKIRKFLKET  
 IEPWLDGTFNGNGFLYDGKGGIVTKQGSNDTGADFGFV **YNDHH**YHLGYFLYGI AVLAKIDPIWGRKYKQAYS LMADEFMNLSRNPNSNYTRL  
 RCFDLFKLHSWAGGLTEFGDGRNQ **ESTSE**AVNAYYSALMGLAYGDTHLVAAGSTLTSLEIHAAQMWHVKGGDNVYDEVFAKENKVVGVVLAN  
 KRDSGLWFAPPEWKECRGLGIQLLPLLPISEFLFSNVDFVKELVEWTLPALNREGVGEWKGFFVYALEGVYDNEGLKKIRSLNGFDDGNSLTNL  
 LWWIHSRGNEDDEFHGKHCWFGNYCH

- PCR pour l'amplification du gène complet *MtGbp4* à partir d'ADN génomique.

solution mère	concentration	concentration finale	réaction
tampon <i>Taq</i> -polymérase	10 x	1 x	3 µL
MgCl <sub>2</sub>	25 mmol/L	1 mmol/L	1.2 µL
dNTPs	10 mmol/L	0.2 mmol/L	0.6 µL
<b>MtGBP10_ATG-For</b>	50 pmol/µL	1 pmol/µL	0.6 µL
<b>MtGBP10-Stop-Rev</b>	50 pmol/µL	1 pmol/µL	0.6 µL
<i>Taq</i> -polymérase	5 U/µL	0.025 U/µL	0.15 µL
eau			20.85 µL
ADN génomique	100 ng/µL	10 ng/µL	3 µL

- PCR pour l'amplification du gène complet *MtGbp4* en vue de son insertion dans le vecteur pSC-A du kit Strataclone.

solution mère	concentration	concentration finale	réaction
tampon Easy-A-polymérase	10 x	1 x	3 µL
MgCl <sub>2</sub>	25 mmol/L	0.5 mmol/L	0.6 µL
dNTPs	10 mmol/L	0.2 mmol/L	0.6 µL
<b>MtGBP10_ATG-For</b>	50 pmol/µL	1 pmol/µL	0.6 µL
<b>MtGBP10-Stop-Rev</b>	50 pmol/µL	1 pmol/µL	0.6 µL
Easy-A-polymérase	5 U/µL	0.05 U/µL	0.15 µL
Eau			21.3 µL
ADN génomique	100 ng/µL	10 ng/µL	3 µL

- PCRs permettant l'introduction des sites de restriction, pour les enzymes *Bam*HI, *Msc*I et *Ecl*136II, pour l'introduction des gènes *MtGbp*1, 2, 3 et 4 dans le vecteur pYes-M/TEV/CBP.

Pour ces PCRs, l'amplification est effectuée à partir des plasmides pGem-T:*MtGbp*1, pGem-T:*MtGbp*2 et pGem-T:*MtGbp*3 (obtenus par J. Leclercq) ou du plasmide pSC-A:*MtGbp*4.

- Amplification de *MtGbp*1

solution mère	concentration	concentration finale	réaction
tampon <i>Pfu</i> -polymérase	10 x	1 x	3 µL
dNTPs	10 mmol/L	0.2 mmol/L	0.6 µL
<b>MtGbp1_BamHI_for</b>	50 pmol/µL	1 pmol/µL	0.6 µL
<b>MtGbp1_MscI_rev</b>	50 pmol/µL	1 pmol/µL	0.6 µL
<i>Pfu</i> -polymérase	3 U/µL	0.06 U/µL	0.6 µL
eau			21.6µL
ADN	10ng/µL	1ng/µL	3 µL

- Amplification de *MtGbp*2

solution mère	concentration	concentration finale	réaction
tampon <i>Pfu</i> -polymérase	10 x	1 x	3 µL
dNTPs	10 mmol/L	0.2 mmol/L	0.6 µL
<b>MtGbp2_BamHI_for</b>	50 pmol/µL	1 pmol/µL	0.6 µL
<b>MtGbp2_MscI_rev</b>	50 pmol/µL	1 pmol/µL	0.6 µL
<i>Pfu</i> -polymérase	3 U/µL	0.06 U/µL	0.6 µL
eau			21.6µL
ADN	10ng/µL	1ng/µL	3 µL

- Amplification de *MtGbp3*

solution mère	concentration	concentration finale	réaction
tampon <i>Pfu</i> -polymérase	10 x	1 x	3 µL
dNTPs	10 mmol/L	0.2 mmol/L	0.6 µL
<b>MtGbp3_BamHI_for</b>	50 pmol/µL	1 pmol/µL	0.6 µL
<b>MtGbp3_Ecl136_rev</b>	50 pmol/µL	1 pmol/µL	0.6 µL
<i>Pfu</i> -polymérase	3 U/µL	0.06 U/µL	0.6 µL
eau			21.6µL
ADN	10ng/µL	1ng/µL	3 µL

- Amplification de *MtGbp4*

solution mère	concentration	concentration finale	réaction
tampon <i>Pfu</i> -polymérase	10 x	1 x	3 µL
dNTPs	10 mmol/L	0.2 mmol/L	0.6 µL
<b>MtGbp4_BamHI_for</b>	50 pmol/µL	1 pmol/µL	0.6 µL
<b>MtGbp4_MscI_rev</b>	50 pmol/µL	1 pmol/µL	0.6 µL
<i>Pfu</i> -polymérase	3 U/µL	0.06 U/µL	0.6 µL
eau			21.6µL
ADN	10ng/µL	1ng/µL	3 µL

L'analyse des colonies par PCR se fait comme ci-dessus, mais en amplifiant l'ADN soit à partir du dilution par 10 d'une préparation miniprep, soit directement à partir d'un échantillon de colonie.

- Production du vecteur linéarisé pYes-M/TEV/CBPx*BamHI*x*MscI*

La souche d'*E. coli* contenant le vecteur pYes-M/TEV/CBP est ressuscitée sur le milieu solide LB/ampicilline, à partir de la culture conservée à -80°C en présence de glycérol. Après 24 h à 37°C, 1 colonie est prélevée et placée dans 1 tube de 10 mL contenant 1 mL de LB/ampicilline, et agité à 190 rpm, 3h à 37°C. 40 µL de cette pré-culture sont alors transférés dans 40 mL de LB/ampicilline et incubés pendant 12h à 37°C, à 190 rpm. Le milieu de culture est ensuite centrifugé (6000 rpm, 15 min, à 4°C) et le vecteur pYes-M/TEV/CBP est purifié en utilisant le kit Plasmid Midi kits (Qiagen). L'ADN est finalement repris dans 50 µL de tampon TE (voir procédure miniprep).

La concentration de la solution, déterminée par spectrophotométrie, est de 1.77 µg/µL.

Le vecteur pYes-M/TEV/CBP est linéarisé par digestion, pendant 4h à 37°C, dans les conditions suivantes :

ADN	2.82 µL, 5 µg
tampon 10x Y/Tango	12 µL
<i>Bam</i> HI	1.5 µL
<i>Msc</i> I	4.5 µL
eau	39.2 µL

Puis purifié sur gel d'agarose en utilisant le kit de purification NucleoSpin Extract II (Qiagen) et repris dans l'eau (10 µL).

- Essais de clonage de *MtGbp1* et *MtGbp3*

- dans pYes-M/TEV/CBP

En utilisant directement le produit de PCR, les gènes *MtGbp1* et *MtGbp3* sont digérés dans les conditions suivantes :

<i>MtGbp1</i>	27 µL
tampon 10x Y/Tango	12 µL
<i>Bam</i> HI	1.5 µL
<i>Msc</i> I	4.5 µL
eau	15 µL
4h à 37°C	

<i>MtGbp3</i>	27 µL
tampon 10x Y/Tango	5 µL
<i>Ecl</i> 136II	2 µL
eau	16 µL
2h à 37°C	
tampon 10x Y/Tango	7 µL
<i>Bam</i> HI	1.5 µL
eau	1.5 µL
2h à 37°C	

Puis purifiés sur gel d'agarose en utilisant le kit de purification NucleoSpin Extract II et repris dans l'eau (5µL). Cette solution est utilisée pour l'étape de ligation avec le vecteur linéarisé pYes-M/TEV/CBPx*Bam*HIx*Msc*I.

	<i>MtGbp1</i>	<i>MtGbp3</i>
ADN	2 µL	2 µL
eau	1.9 µL	1.9 µL
vecteur	0.1 µL	0.1 µL
tampon 10x ligase T-4	0.5 µL	0.5 µL
ligase T-4	0.5 µL	0.5 µL

Après 18h à 16°C, la ligase est inactivée par chauffage à 65°C pendant 10 min. Le produit de ligation est refroidi sur la glace et 2 µL sont utilisés pour transformer les cellules ultracompétentes XL10-Gold, selon le protocole de Stratagene. Seul le milieu NZY+ utilisé dans le protocole est remplacé par le milieu SOC.

Les bactéries sont incubées 15h à 37°C, sur le milieu solide LB/ampicilline. Aucune colonie ne se développe.

- dans pGem-T

Les produits de la PCR sont purifiés par la méthode B et repris dans l'eau (8.9 µL). Après ajout de tampon *Taq*-polymérase (1 µL) et de *Taq*-polymérase (0.2 µL), les solutions sont incubés 30 min à 70°C, puis refroidie sur la glace, avant ligation avec le vecteur pGem-T dans les conditions suivantes :

ADN	2 µL
tampon 10x "slow"	0.5 µL
vecteur	0.5 µL
ligase T-4	0.5 µL
eau	1.5 µL

2 µL des solutions de ligation sont utilisés pour transformer les cellules ultracompétentes XL10-Gold. Les cellules sont cultivées, 12h à 37°C, sur le milieu solide LB/ampicilline/IPTG/X-Gal. Pour chaque échantillon, quatre colonies blanches sont prélevées et cultivées, chacune dans 2 mL de LB/ampicilline, à 37°C pendant 12h.

Les colonies sont analysées par PCR, en utilisant les oligonucléotides **MtGbp1\_BamHI\_for** et **MtGbp1\_MscI\_rev** pour *MtGbp1*, et **MtGbp1\_BamHI\_for** et **MtGbp1\_Ecl136\_rev** pour *MtGbp3*.

Les plasmides obtenus sont finalement séquencés, ils correspondent en fait aux plasmides initiaux.

- dans pSTBlue-1

Les produits de la PCR purifiés par la méthode B et repris dans l'eau (10  $\mu$ L). 2  $\mu$ L de ces solutions sont utilisés pour transformer les cellules compétentes NovaBlue Singles, en utilisant le kit Perfectly Blunt Cloning Kit de Novagen.

Les bactéries transformées sont incubées 15h à 37°C sur le milieu solide LB/kanamycine/tétracycline/X-Gal/IPTG. Deux colonies blanches de chaque échantillon sont prélevées et cultivées, chacune dans 2 mL de LB/ampicilline, à 37°C pendant 12h. Après extraction par miniprep, les solutions obtenues sont analysées par restriction dans les conditions suivantes :

RNase	0.5 $\mu$ L
tampon <i>Eco</i> RI	1 $\mu$ L
<i>Eco</i> RI	0.2 $\mu$ L
Eau	6.3 $\mu$ L
Miniprep	2 $\mu$ L
2h, 37°C	

Le gel d'agarose présente bien les bandes correspondant au vecteur pSTBlue-1 (3851 bp) et aux fragments, issus de la digestion par l'enzyme, des gènes *MtGbp1* (1520 bp et 247/245 bp) et *MtGbp3* (1380 bp et 585 bp).

Une colonie de chaque échantillon est cultivée dans 2 mL de LB/kanamycine, à 37°C pendant 12h. 1 mL de cette culture est mélangé à 430  $\mu$ L d'une solution de glycérol à 50%. Les deux souches d'*E. coli* contenant respectivement les plasmides pSTBlue-1:*MtGbp1* et pSTBlue-1:*MtGbp3*, sont ainsi conservées à -80°C.

- nouveaux essais dans pYes-M/TEV/CBP

30 mL de LB/kanamycine sont inoculés avec la souche d'*E. coli* contenant le plasmide pSTBlue-1:*MtGbp1* et 30 mL avec la souche contenant pSTBlue-1:*MtGbp3*. Après 12h à

37°C, les cultures sont centrifugées (5500 rpm, 15 min, à 4°C) puis purifiées en utilisant le kit Plasmid Midi kits (Qiagen). L'ADN est finalement repris dans 50 µL de tampon TE

. La concentration des solutions est de 3.22 µg/µL pour pSTBlue-1:*MtGbp1* et 1.17 µg/µL pour pSTBlue-1:*MtGbp3*.

En utilisant ces solutions, les plasmides pSTBlue-1:*MtGbp1* et pSTBlue-1:*MtGbp3* sont digérés dans les conditions suivantes :

<i>MtGbp1</i>	4.66 µL, 15 µg	<i>MtGbp3</i>	12.82 µL, 15 µg
tampon 10x Y/Tango	12 µL	tampon 10x Y/Tango	5 µL
<i>Bam</i> HI	1.5 µL	<i>Ecl</i> 136II	2 µL
<i>Msc</i> I	4.5 µL	eau	30.2 µL
eau	37.3 µL	2h à 37°C	
4h à 37°C		tampon 10x Y/Tango	7 µL
		<i>Bam</i> HI	1.5 µL
		eau	1.5 µL
		2h à 37°C	

Puis les gènes *MtGbp1* et *MtGbp3* sont purifiés sur gel d'agarose en utilisant le kit de purification NucleoSpin et repris dans l'eau (5µL). Cette solution est utilisée pour l'étape de ligation avec le vecteur linéarisé pYes-M/TEV/CBPx*Bam*HIx*Msc*I.

ADN	3.71 µL
Vecteur	0.29 µL
tampon 10x ligase T-4	0.5 µL
ligase T-4	0.5 µL

Après 18h à 16°C, la ligase est inactivée par chauffage à 65°C pendant 10 min. Le produit de ligation est refroidi sur la glace et 2 µL sont utilisés pour transformer les cellules ultracompétentes XL10-Gold.

Les bactéries sont incubées 15h à 37°C, sur le milieu solide LB/ampicilline. Aucune colonie ne se développe pour l'échantillon *MtGbp3*. Les quatre colonies de l'échantillon

*MtGbp1* sont cultivées, chacune dans 2 mL de LB/ampicilline, à 37°C pendant 12h. Après extraction par miniprep, les solutions obtenues sont analysées par restriction dans les conditions suivantes :

RNase	0.5 µL
Tampon R+	1 µL
<i>Hind</i> III	0.3 µL
Eau	5.7 µL
Miniprep	2.5 µL
2h, 37°C	

Aucune colonie ne contient le plasmide cible pYes-M/TEV/CBP:*MtGbp1*.

En utilisant les solutions midiprep, les plasmides pSTBlue-1:*MtGbp1* et pSTBlue-1:*MtGbp3* sont digérés dans les conditions suivantes :

<i>MtGbp1</i>	2.33 µL, 7.5 µg
tampon 10x Y/Tango	6 µL
<i>Bam</i> HI	0.75 µL
<i>Msc</i> I	2.25 µL
eau	18.67 µL
4h à 37°C	

<i>MtGbp3</i>	6.41 µL, 7.5 µg
tampon 10x Y/Tango	2.5 µL
<i>Ecl</i> 136II	1 µL
eau	15.1 µL
2h à 37°C	
tampon 10x Y/Tango	3.5 µL
<i>Bam</i> HI	0.75 µL
eau	0.75 µL
2h à 37°C	

Puis les gènes *MtGbp1* et *MtGbp3* sont purifiés sur gel "low-melt".

Les bandes de gel sont pesées, ce qui permet d'estimer leur volume et donc d'évaluer approximativement la concentration en ADN. La moitié de la solution de restriction est purifiée, soit 3.75 µg d'ADN et le gène représente environ 1/3 du plasmide. Finalement, les concentrations sont évaluées à 25 ng/µL pour *MtGbp1* et 15 ng/µL pour *MtGbp3*.

Les bandes de gel sont solubilisées à 70°C puis maintenues à 37°C. Cette solution est finalement ajoutée au milieu de ligation.

ADN	5 $\mu$ L
Vecteur	0.5 $\mu$ L
tampon 10x ligase T-4	1 $\mu$ L
ligase T-4	1 $\mu$ L

Après 24h à 16°C, la ligase est inactivée par chauffage à 75°C pendant 5 min. Le milieu de ligation est redissous et 2  $\mu$ L sont utilisés pour transformer les cellules ultracompétentes XL10-Gold.

Les bactéries sont cultivées sur le milieu solide LB/ampicilline. Aucune colonie ne se développe pour l'échantillon *MtGbp3*. Les cinq colonies de l'échantillon *MtGbp1* sont cultivées, chacune dans 2 mL de LB/ampicilline, à 37°C pendant 12h. Après extraction par miniprep, les solutions obtenues sont analysées par restriction dans les conditions suivantes :

RNase	0.5 $\mu$ L
Tampon R+	1 $\mu$ L
<i>Hind</i> III	0.3 $\mu$ L
Eau	5.7 $\mu$ L
Miniprep	2.5 $\mu$ L
2h, 37°C	

Aucune colonie ne contient le plasmide cible pYes-M/TEV/CBP:*MtGbp1*.

- Essais de clonage de *MtGbp2*

- dans pYes-M/TEV/CBP

En utilisant directement le produit de PCR, le gène *MtGbp2* est digéré dans les conditions suivantes :

<i>MtGbp1</i>	27 $\mu$ L
tampon 10x Y/Tango	12 $\mu$ L
<i>Bam</i> HI	1.5 $\mu$ L
<i>Msc</i> I	4.5 $\mu$ L
Eau	15 $\mu$ L
4h à 37°C	

Puis purifié sur gel d'agarose en utilisant le kit de purification NucleoSpin Extract II et repris dans l'eau (5 $\mu$ L). Cette solution est utilisée pour l'étape de ligation avec le vecteur linéarisé pYes-M/TEV/CBPx*Bam*HIx*Msc*I.

ADN	3.9 $\mu$ L
Vecteur	0.1 $\mu$ L
tampon 10x ligase T-4	0.5 $\mu$ L
ligase T-4	0.5 $\mu$ L

Après 18h à 16°C, la ligase est inactivée par chauffage à 65°C pendant 10 min. Le produit de ligation est refroidi sur la glace et 2  $\mu$ L sont utilisés pour transformer les cellules ultracompétentes XL10-Gold.

Les bactéries sont incubées 15h à 37°C, sur le milieu solide LB/ampicilline. Aucune colonie ne se développe.

- dans pGem-T

L'essai de clonage de *MtGbp2* dans pGem-T a été effectué en parallèle avec les essais de clonages de *MtGbp1* et *MtGbp3*.

Le produit de la PCR est purifié par la méthode B et repris dans l'eau (8.9  $\mu$ L). Après ajout de tampon *Taq*-polymérase (1  $\mu$ L) et de *Taq*-polymérase (0.2  $\mu$ L), la solution est incubée 30 min à 70°C, puis refroidie sur la glace, avant ligation avec le vecteur pGem-T dans les conditions suivantes :

---

ADN	2 $\mu$ L
tampon 10x "slow"	0.5 $\mu$ L
Vecteur	0.5 $\mu$ L
ligase T-4	0.5 $\mu$ L
eau	1.5 $\mu$ L

2  $\mu$ L de la solution de ligation sont utilisés pour transformer les cellules ultracompétentes XL10-Gold. Les cellules sont cultivées, 12h à 37°C, sur le milieu solide LB/ampicilline/IPTG/X-Gal. Pour chaque échantillon, quatre colonies blanches sont prélevées et cultivées, chacune dans 2 mL de LB/ampicilline, à 37°C pendant 12h.

Les colonies sont analysées par PCR, en utilisant les oligonucléotides **MtGbp2\_BamHI\_for** et **MtGbp2\_MscI\_rev**.

Comme dans le cas de *MtGbp1* et *MtGbp3*, le plasmide obtenu correspond en fait au plasmide initial.

- dans pSTBlue-1

Le premier essai de clonage de *MtGbp2* dans pSTBlue-1 a été effectué en parallèle avec les clonages de *MtGbp1* et *MtGbp3*.

Le produit de la PCR purifié par la méthode B est repris dans l'eau (10  $\mu$ L). 2  $\mu$ L de cette solution sont utilisés pour transformer les cellules compétentes NovaBlue Singles, en utilisant le kit Perfectly Blunt Cloning Kit de Novagen.

Les bactéries transformées sont incubées 15h à 37°C sur le milieu solide LB/kanamycine/tétracycline/X-Gal/IPTG. Deux colonies blanches de chaque échantillon sont prélevées et cultivées, chacune dans 2 mL de LB/ampicilline, à 37°C pendant 12h. Après extraction par miniprep, les solutions obtenues sont analysées par restriction dans les conditions suivantes :

RNase	0.5 $\mu$ L
Tampon <i>Eco</i> RI	1 $\mu$ L
<i>Eco</i> RI	0.2 $\mu$ L
Eau	6.3 $\mu$ L
Miniprep	2 $\mu$ L
2h, 37°C	

Aucune colonie ne contient le plasmide cible pYes-M/TEV/CBP:*MtGbp2*.

Deux nouveaux essais de clonage ont été tentés, l'un en purifiant le produit de PCR sur gel d'agarose, avec le kit NucleoSpin, l'autre sans aucune purification du produit de PCR afin d'éviter toute perte d'ADN. Les colonies sont cultivées et analysées comme ci-dessus. Aucune colonie ne contient le plasmide cible.

Un autre test est effectué en purifiant le produit de PCR sur un gel "low-melt". La moitié du produit de PCR est purifié. La bande de gel est solubilisée à 70°C puis maintenue à 37°C. Cette solution est finalement ajoutée au milieu de ligation.

ADN	5 $\mu$ L
Vecteur	0.5 $\mu$ L
tampon 10x ligase T-4	1 $\mu$ L
ligase T-4	1 $\mu$ L

Après 24h à 16°C, la ligase est inactivée par chauffage à 75°C pendant 5 min. Le milieu de ligation est redissous et 2  $\mu$ L sont utilisés pour transformer les cellules ultracompétentes XL10-Gold.

Les bactéries sont cultivées sur le milieu solide LB/kanamycine/tétracycline/X-Gal/IPTG. Cinq colonies blanches sont prélevées et cultivées, chacune dans 2 mL de LB/kanamycine/tétracycline, à 37°C pendant 12h. Après extraction par miniprep, les solutions obtenues sont analysées par restriction dans les conditions suivantes :

RNase	0.5 µL
Tampon <i>EcoRI</i>	1 µL
<i>EcoRI</i>	0.2 µL
Eau	5.8 µL
Miniprep	2.5 µL
2h, 37°C	

Aucune colonie ne contient le plasmide cible pYes-M/TEV/CBP:*MtGbp2*.

- Essais de clonage de *MtGbp4*

- dans pGem-T

Le produit de la PCR est purifié sur gel d'agarose en utilisant le kit de purification NucleoSpin et repris dans l'eau (5 µL). Une partie de cette solution est traité par la *Taq*-polymérase dans les conditions suivantes :

Tampon <i>Taq</i> -polymérase	0.5 µL
<i>Taq</i> -polymérase	0.2 µL
ATP 1 mmol/L	1 µL
Eau	1.3 µL
ADN	2 µL
30 min, 70°C	

La solution traitée par la *Taq*-polymérase (*Taq*<sup>+</sup>) et celle non traitée (*Taq*<sup>-</sup>) sont utilisées pour la ligation dans les conditions suivantes :

	<i>Taq</i> <sup>+</sup>	<i>Taq</i> <sup>-</sup>
ADN	3.5 µL	1.5 µL
tampon 10x "slow"	0.5 µL	0.5 µL
Vecteur	0.5 µL	0.5 µL
ligase T-4	0.5 µL	0.5 µL
Eau	--	2 µL

Après 12h à 5°C, 2 µL des solutions de ligation sont utilisés pour transformer les cellules ultracompétentes XL10-Gold. Les cellules sont cultivées, 12h à 37°C, sur un milieu solide LB/ampicilline/IPTG/X-Gal et sélectionnées par détection bleu/blanc.

Pour chaque échantillon, quatre colonies blanches sont prélevées et cultivées, chacune dans 2 mL de LB/ampicilline, à 37°C pendant 12h. Après miniprep et analyse par PCR, en utilisant les oligonucléotides **MtGbp10\_ATG\_for** et **MtGbp10\_Stop\_Rev**, aucune colonie testée ne contient le gène et le vecteur voulu.

- dans pSTBlue-1

Le produit de la PCR est purifié sur gel d'agarose en utilisant le kit de purification NucleoSpin et repris dans l'eau (5 µL). 2 µL de cette solution sont utilisés pour transformer les cellules compétentes NovaBlue Singles, en utilisant le kit Perfectly Blunt Cloning Kit de Novagen.

Les bactéries transformées sont incubées 15h à 37°C sur le milieu solide LB/kanamycine/tétracycline/X-Gal/IPTG. Quatre colonies blanches sont prélevées et cultivées, chacune dans 2 mL de LB//kanamycine/tétracycline, à 37°C pendant 12h. Après extraction par miniprep, les solutions obtenues sont analysées par restriction dans les conditions suivantes :

RNase	0.5 µL
tampon <i>EcoRI</i>	1 µL
<i>EcoRI</i>	0.2 µL
Eau	6.3 µL
Miniprep	2 µL
2h, 37°C	

Aucune colonie testée ne contient le plasmide pSTBlue-1:*MtGbp4*.

- dans pSC-A

Le produit de PCR, obtenu en utilisant la polymérase Easy-A, est utilisé directement selon le protocole du kit Strataclone. Les cellules Strataclone SoloPack transformées sont

---

cultivées, 12h à 37°C, sur le milieu solide LB/ampicilline/X-Gal/IPTG, puis sélectionnées par détection bleu/blanc.

Six colonies blanches sont prélevées et cultivées, chacune dans 2 mL de LB/ampicilline, à 37°C pendant 12h. Après extraction par miniprep, les solutions obtenues sont analysées par restriction dans les conditions suivantes :

RNase	0.5 µL
tampon <i>EcoRI</i>	1 µL
<i>EcoRI</i>	0.2 µL
Eau	5.8 µL
Miniprep	2.5 µL
2h, 37°C	

Trois des colonies testées contiennent le plasmide pSC-A:*MtGbp4*.



## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



- 
- [1] P. M. Coutinho, B. Henrissat, Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach, in *Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering*, H. J. Gilbert, G. Davies, B. Henrissat, B. Svensson Eds. **1999**, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp.3-12.
- [2] D. E. Koshland, Jr., Stereochemistry and the mechanism of enzymic reactions, *Biol. Revs. Cambridge Phil. Soc.* **1953**, 28, 416-436.
- [3] S. S. Lee, S. Yu, S. G. Withers, Detailed Dissection of a New Mechanism for Glycoside Cleavage:  $\alpha$ -(1,4)-Glucan Lyase, *Biochemistry* **2003**, 42 (44), 13081-13090.
- [4] V. L. Y. Yip, A. Varrot, G. J. Davies, S. S. Rajan, X. Yang, J. Thompson, W. F. Anderson, S. G. Withers, An Unusual Mechanism of Glycoside Hydrolysis Involving Redox and Elimination Steps by a Family 4  $\beta$ -Glycosidase from *Thermotoga maritima*, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126 (27), 8354-8355.
- [5] J. Fliegmann, E. Montel, A. Djulic, S. Cottaz, H. Driguez, J. Ebel, Catalytic properties of the bifunctional soybean  $\beta$ -glucan-binding protein, a member of family 81 glycoside hydrolases, *FEBS Lett.* **2005**, 579 (29), 6647.
- [6] T. Nishimura, C. Bignon, J. Allouch, M. Czjzek, H. Darbon, T. Watanabe, B. Henrissat, *Streptomyces matensis* laminaripentaose hydrolase is an "invertin"  $\beta$ -(1,3)-glucanase, *FEBS Lett.* **2001**, 499 (1-2), 187.
- [7] G. Davies, B. Henrissat, Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases, *Structure* **1995**, 3 (9), 853-859.
- [8] J. Szollosi, S. Damjanovich, L. Matyus, Application of fluorescence resonance energy transfer in the clinical laboratory: routine and research, *Cytometry* **1998**, 34 (4), 159-179.
- [9] R. H. Fairclough, C. R. Cantor, The use of singlet-singlet energy transfer to study macromolecular assemblies, *Methods Enzymol.* **1978**, 48, 347-379.
- [10] A. Yaron, A. Carmel, E. Katchalski-Katzir, Intramolecularly quenched fluorogenic substrates for hydrolytic enzymes, *Anal. Biochem.* **1979**, 95 (1), 228-235.
- [11] K. Matsuoka, S. Nishimura, Y. C. Lee, A bi-fluorescence-labeled substrate for ceramide glycanase based on fluorescence energy transfer, *Carbohydr. Res.* **1995**, 276 (1), 31-42.
- [12] N. Payre, S. Cottaz, H. Driguez, Chemoenzymic synthesis of a modified pentasaccharide as a specific substrate for a sensitive assay of  $\alpha$ -amylase by fluorescence quenching, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1995**, 34 (11), 1239-1241.
- [13] V. Boyer, S. Fort, T. P. Frandsen, M. Schulein, S. Cottaz, H. Driguez, Glycosynthase-assisted synthesis of oligosaccharides, part III. Chemoenzymatic synthesis of a bifunctionalized cellohexaside as a specific substrate for the sensitive assay of cellulase by fluorescence quenching, *Chem. Eur. J.* **2002**, 8 (6), 1389-1394.

- 
- [14] S. Armand, S. Drouillard, M. Schulein, B. Henrissat, H. Driguez, A bifunctionalized fluorogenic tetrasaccharide as a substrate to study cellulases [Erratum to document cited in CA126:196620], *J. Biol. Chem.* **1997**, 272 (11), 7565.
- [15] S. Armand, S. Drouillard, M. Schulein, B. Henrissat, H. Driguez, A bifunctionalized fluorogenic tetrasaccharide as a substrate to study cellulases, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272 (5), 2709-2713.
- [16] S. Cottaz, B. Brasme, H. Driguez, A fluorescence-quenched chitopentaose for the study of endo-chitinases and chitobiosidases, *Eur. J. Biochem.* **2000**, 267 (17), 5593-5600.
- [17] B. A. Stone, A. E. Clarke, *Chemistry and Biology of (1,3)- $\beta$ -Glucans*. **1992**, Bundoora, Australia, La Trobe University Press
- [18] R. A. Dixon, C. J. Lamb, Molecular Communication in Interactions Between Plants and Microbial Pathogens, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1990**, 41 (1), 339-367.
- [19] J. Ebel, Oligoglucoside elicitor-mediated activation of plant defense, *BioEssays* **1998**, 20 (7), 569-576.
- [20] J. Ebel, A. Mithofer, Early events in the elicitation of plant defence, *Planta* **1998**, 206 (3), 335.
- [21] B. J. Feys, J. E. Parker, Interplay of signaling pathways in plant disease resistance, *Trends Genet.* **2000**, 16 (10), 449.
- [22] J. N. Varghese, T. P. J. Garrett, P. M. Colman, L. Chen, P. B. Hoj, G. B. Fincher, Three-Dimensional Structures of Two Plant  $\beta$ -Glucan Endohydrolases with Distinct Substrate Specificities, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1994**, 91 (7), 2785-2789.
- [23] D. Zeidler, U. Zahringer, I. Gerber, I. Dubery, T. Hartung, W. Bors, P. Hutzler, J. Durner, Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: Lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, 101 (44), 15811-15816.
- [24] M. Montesano, G. Brader, E. T. Palva, Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants, *Molecular Plant Pathology* **2003**, 4 (1), 73-79.
- [25] E. G. Cosio, T. Frey, J. Ebel, Identification of a high-affinity binding protein for a hepta- $\beta$ -glucoside phytolaxin elicitor in soybean, *Eur. J. Biochem.* **1992**, 204, 1115-1123.
- [26] A. Mithofer, J. Fliegmann, G. Neuhaus-Url, H. Schwarz, J. Ebel, The hepta- $\beta$ -glucoside elicitor-binding proteins from legumes represent a putative receptor family, *Biol. Chem.* **2000**, 381, 705-713.

- 
- [27] A. Mithofer, J. Fliegmann, J. Ebel, Isolation of a French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) homolog to the  $\beta$ -glucan elicitor-binding protein of soybean (*Glycine max* L.), *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes* **1999**, 1418 (1), 127.
- [28] A. Mithofer, F. Lottspeich, J. Ebel, One-step purification of the  $\beta$ -glucan elicitor-binding protein from soybean (*Glycine max* L.) roots and characterization of an anti-peptide antiserum, *FEBS Letters* **1996**, 381 (3), 203.
- [29] N. Umemoto, M. Kakitani, A. Iwamatsu, M. Yoshikawa, N. Yamaoka, I. Ishida, The structure and function of a soybean beta-glucan-elicitor-binding protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, 94 (3), 1029-1034.
- [30] J. J. Cheong, R. Alba, F. Cote, J. Enkerli, M. G. Hahn, Solubilization of Functional Plasma Membrane-Localized Hepta- $\beta$ -Glucoside Elicitor-Binding Proteins from Soybean, *Plant Physiol.* **1993**, 103 (4), 1173-1182.
- [31] E. G. Cosio, H. Popperl, W. E. Schmidt, J. Ebel, High-affinity binding of fungal beta-glucan fragments to soybean (*Glycine max* L.) microsomal fractions and protoplasts, *Eur. J. Biochem* **1988**, 175 (2), 309-315.
- [32] W. E. Schmidt, J. Ebel, Specific Binding of a Fungal Glucan Phytoalexin Elicitor to Membrane Fractions from Soybean *Glycine max*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1987**, 84 (12), 4117-4121.
- [33] J. Fliegmann, A. Mithofer, G. Wanner, J. Ebel, An Ancient Enzyme Domain Hidden in the Putative  $\beta$ -Glucan Elicitor Receptor of Soybean May Play an Active Part in the Perception of Pathogen-associated Molecular Patterns during Broad Host Resistance, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279 (2), 1132-1140.
- [34] S. Cottaz, E. Samain, Genetic engineering of *Escherichia coli* for the production of  $N^I, N^{II}$ -diacetylchitobiose (chitinbiose) and its utilization as a primer for the synthesis of complex carbohydrates, *Metab. Eng.* **2005**, 7 (4), 311-317.
- [35] B. Priem, M. Gilbert, W. W. Wakarchuk, A. Heyraud, E. Samain, A new fermentation process allows large-scale production of human milk oligosaccharides by metabolically engineered bacteria, *Glycobiology* **2002**, 12 (4), 235-240.
- [36] S. Cottaz, H. Driguez, First regiospecific synthesis of 6A,6C,6E-tri-O-methylcyclomaltohexaose, *Chem. Commun.* **1989**(16), 1088-1089.
- [37] L. Bornaghi, J. P. Utile, D. Rekaï el, J. M. Mallet, P. Sinay, H. Driguez, Transfer reactions catalyzed by cyclodextrin glucosyltransferase using 4-thiomaltosyl and C-maltosyl fluorides as artificial donors, *Carbohydr. Res.* **1997**, 305 (3-4), 561-568.
- [38] L. Greffe, M. T. Jensen, F. Chang-Pi-Hin, S. Fruchard, M. J. O'Donohue, B. Svensson, H. Driguez, Chemoenzymatic syntheses of linear and branched hemithiomaltodextrins as potential inhibitors for starch-debranching enzymes, *Chem. Eur. J.* **2002**, 8 (23), 5447-5455.

- 
- [39] G. Okada, E. J. Hehre, De novo synthesis of glycosidic linkages by glycosylases. Utilization of  $\alpha$ -D-glucopyranosyl fluoride by amylosucrase, *Carbohydr. Res.* **1973**, 26 (1), 240-243.
- [40] S. J. Williams, S. G. Withers, Glycosyl fluorides in enzymatic reactions, *Carbohydr. Res.* **2000**, 327 (1-2), 27-46.
- [41] S. Kobayashi, K. Kashiwa, T. Kawasaki, S. Shoda, Novel method for polysaccharide synthesis using an enzyme: the first in vitro synthesis of cellulose via a nonbiosynthetic path utilizing cellulase as catalyst, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 3079-3084.
- [42] M. Fujita, S.-i. Shoda, S. Kobayashi, Xylanase-catalysed synthesis of a novel polysaccharide having a glucose-xylose repeating unit, a cellulose-xylan hybrid polymer, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 6411-6412.
- [43] V. Moreau, H. Driguez, Enzymic synthesis of hemithiocellodextrins, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1996**, 6, 525-527.
- [44] S. Shoda, T. Kawasaki, K. Obata, S. Kobayashi, A facile enzymatic synthesis of cellooligosaccharide derivatives using  $\beta$ -lactosyl fluoride, *Carbohydr. Res.* **1993**, 249 (1), 127-137.
- [45] J. K. Fairweather, R. V. Stick, D. M. G. Tilbrook, H. Driguez, The role of hydrolases in a synthesis of some epoxyalkyl  $\beta$ -C-cellobiosides, *Tetrahedron* **1999**, 55 (12), 3695.
- [46] O. Karthaus, S.-I. Shoda, H. Takano, K. Obata, S. Kobayashi, Cellulase-catalysed glycosylation reactions: simple route towards a highly selective synthesis of oligosaccharides, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1994**, 1851-1857.
- [47] L. F. Mackenzie, Q. Wang, R. A. J. Warren, S. G. Withers, Glycosynthases: Mutant Glycosidases for Oligosaccharide Synthesis, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120 (22), 5583-5584.
- [48] J. F. Tolborg, L. Petersen, K. J. Jensen, C. Mayer, D. L. Jakeman, R. A. J. Warren, S. G. Withers, Solid-Phase Oligosaccharide and Glycopeptide Synthesis Using Glycosynthases, *J. Org. Chem.* **2002**, 67 (12), 4143-4149.
- [49] A. Trincone, G. Perugino, M. Rossi, M. Moracci, A novel thermophilic glycosynthase that effects branching glycosylation, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, 10 (4), 365-368.
- [50] O. Nashiru, D. L. Zechel, D. Stoll, T. Mohammadzadeh, R. A. J. Warren, S. G. Withers,  $\beta$ -mannosynthase: synthesis of  $\beta$ -mannosides with a mutant  $\beta$ -mannosidase, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2001**, 40 (2), 417-420.
- [51] D. L. Jakeman, S. G. Withers, On expanding the repertoire of glycosynthases: mutant  $\beta$ -galactosidases forming  $\beta$ -(1,6)-linkages, *Can. J. Chem.* **2002**, 80 (8), 866-870.

- 
- [52] M. Okuyama, H. Mori, K. Watanabe, A. Kimura, S. Chiba, Alpha-glucosidase mutant catalyzes "alpha-glycosynthase"-type reaction, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2002**, 66 (4), 928-933.
- [53] G. Perugino, A. Trincone, A. Giordano, J. Van der Oost, T. Kaper, M. Rossi, M. Moracci, Activity of hyperthermophilic glycosynthases is significantly enhanced at acidic pH, *Biochemistry* **2003**, 42 (28), 8484-8493.
- [54] J. Drone, H.-y. Feng, C. Tellier, L. Hoffmann, V. Tran, C. Rabiller, M. Dion, *Thermus thermophilus* Glycosynthases for the Efficient Synthesis of Galactosyl and Glucosyl  $\beta$ -(1,3)-Glycosides, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 10, 1977-1983.
- [55] Y. Honda, M. Kitaoka, The First Glycosynthase Derived from an Inverting Glycoside Hydrolase, *J. Biol. Chem.* **2006**, 281 (3), 1426-1431.
- [56] C. Malet, A. Planas, From  $\beta$ -glucanase to  $\beta$ -glucansynthase: glycosyl transfer to  $\alpha$ -glycosyl fluorides catalyzed by a mutant endoglucanase lacking its catalytic nucleophile, *FEBS Lett.* **1998**, 440 (1-2), 208.
- [57] S. Fort, V. Boyer, L. Greffe, G. J. Davies, O. Moroz, L. Christiansen, M. Schuelein, S. Cottaz, H. Driguez, Highly Efficient Synthesis of  $\beta$ -(1,4)-Oligo- and -Polysaccharides Using a Mutant Cellulase, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122 (23), 5429-5437.
- [58] S. Fort, L. Christiansen, M. Schuelein, S. Cottaz, H. Driguez, Stepwise synthesis of cellodextrins assisted by a mutant cellulase, *Isr. J. Chem.* **2000**, 40 (3-4), 217-221.
- [59] M. Faijes, J. K. Fairweather, H. Driguez, A. Planas, Oligosaccharide synthesis by coupled endo-glycosynthases of different specificity: a straightforward preparation of two mixed-linkage hexasaccharide substrates of 1,3/1,4- $\beta$ -glucanases, *Chem. Eur. J.* **2001**, 7 (21), 4651-4655.
- [60] M. Hrmova, T. Imai, S. J. Rutten, J. K. Fairweather, L. Pelosi, V. Bulone, H. Driguez, G. B. Fincher, Mutated barley (1,3)- $\beta$ -D-glucan endohydrolases synthesize crystalline (1,3)- $\beta$ -D-glucans, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277 (33), 30102-30111.
- [61] M. Jahn, D. Stoll, R. A. J. Warren, L. Szabo, P. Singh, H. J. Gilbert, V. M. A. Ducros, G. J. Davies, S. G. Withers, Expansion of the glycosynthase repertoire to produce defined manno-oligosaccharides, *Chem. Commun.* **2003**(12), 1327-1329.
- [62] Y.-W. Kim, D. T. Fox, O. Hekmat, T. Kantner, L. P. McIntosh, R. A. J. Warren, S. G. Withers, Glycosynthase-based synthesis of xylo-oligosaccharides using an engineered retaining xylanase from *Cellulomonas fimi*, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4, 2025-2032.
- [63] M. D. Vaughan, K. Johnson, S. DeFrees, X. Tang, R. A. J. Warren, S. G. Withers, Glycosynthase-Mediated Synthesis of Glycosphingolipids, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128 (19), 6300-6301.
- [64] J. A. Bohn, J. N. BeMiller, (1,3)- $\beta$ -Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships, *Carbohydr. Polym.* **1995**, 28 (1), 3.

- 
- [65] G. Ross, J. Cain, P. Lachmann, Membrane complement receptor type three (CR3) has lectin-like properties analogous to bovine conglutinin as functions as a receptor for zymosan and rabbit erythrocytes as well as a receptor for iC3b, *J. Immunol.* **1985**, 134 (5), 3307-3315.
- [66] B. Thornton, V. Vetvicka, M. Pitman, R. Goldman, G. Ross, Analysis of the sugar specificity and molecular location of the beta- glucan-binding lectin site of complement receptor type 3 (CD11b/CD18), *J. Immunol.* **1996**, 156 (3), 1235-1246.
- [67] J. W. Zimmerman, J. Lindermuth, P. A. Fish, G. P. Palace, T. T. Stevenson, D. E. DeMong, A Novel Carbohydrate-Glycosphingolipid Interaction between a  $\beta$ -(1,3)-Glucan Immunomodulator, PGG-glucan, and Lactosylceramide of Human Leukocytes, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273 (34), 22014-22020.
- [68] G. D. Brown, S. Gordon, Immune recognition: A new receptor for  $\beta$ -glucans, *Nature* **2001**, 413 (6851), 36-37.
- [69] J. A. Willment, S. Gordon, G. D. Brown, Characterization of the human  $\beta$ -glucan receptor and its alternatively spliced isoforms, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276 (47), 43818-43823.
- [70] G. D. Brown, S. Gordon, Fungal  $\beta$ -glucans and mammalian immunity, *Immunity* **2003**, 19 (3), 311-315.
- [71] T. Muta, S. Iwanaga, The role of hemolymph coagulation in innate immunity, *Curr. Opin. Immunol.* **1996**, 8 (1), 41.
- [72] A. T. Borchers, C. L. Keen, M. E. Gershwin, Mushrooms, tumors, and immunity: an update, *Exp. Biol. Med.* **2004**, 229 (5), 393-406.
- [73] A. T. Borchers, J. S. Stern, R. M. Hackman, C. L. Keen, M. E. Gershwin, Mushrooms, tumors, and immunity, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1999**, 221 (4), 281-293.
- [74] K. Kataoka, T. Muta, S. Yamazaki, K. Takeshige, Activation of macrophages by linear (1, 3)- $\beta$ -D-glucans. Implications for the recognition of fungi by innate immunity, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277 (39), 36825-36831.
- [75] Y. Adachi, M. Okazaki, N. Ohno, T. Yadomae, Enhancement of cytokine production by macrophages stimulated with (1,3)- $\beta$ -D-glucan, grifolan (GRN), isolated from *Grifola frondosa*, *Biol. Pharm. Bull.* **1994**, 17 (12), 1554-1560.
- [76] D. S. Adams, S. C. Pero, J. B. Petro, R. Nathans, W. M. Mackin, E. Wakshull, PGG-Glucan activates NF- $\kappa$ B-like and NF-IL-6-like transcription factor complexes in a murine monocytic cell line, *J. Leukoc. Biol.* **1997**, 62 (6), 865-873.
- [77] L. Kubala, J. Ruzickova, K. Nickova, J. Sandula, M. Ciz, A. Lojek, The effect of (1,3)- $\beta$ -glucans, carboxymethylglucan and schizophyllan on human leukocytes in vitro, *Carbohydr. Res.* **2003**, 338 (24), 2835-2840.

- [78] N. Ohno, Y. Egawa, T. Hashimoto, Y. Adachi, T. Yadomae, Effect of  $\beta$ -glucans on the nitric oxide synthesis by peritoneal macrophage in mice, *Biol. Pharm. Bull.* **1996**, 19 (4), 608-612.
- [79] M. Marchetti, S. Pisani, V. Pietropaolo, L. Seganti, R. Nicoletti, A. Degener, N. Orsi, Antiviral effect of a polysaccharide from *Sclerotium glaucum* towards herpes simplex virus type 1 infection, *Planta Med.* **1996**, 62 (4), 303-307.
- [80] M. Marchetti, S. Pisani, V. Pietropaolo, L. Seganti, R. Nicoletti, N. Orsi, Inhibition of herpes simplex virus infection by negatively charged and neutral carbohydrate polymers, *J. Chemother.* **1995**, 7 (2), 90-96.
- [81] P. Mastromarino, R. Petruzzello, S. Macchia, S. Rieti, R. Nicoletti, N. Orsi, Antiviral activity of natural and semisynthetic polysaccharides on the early steps of rubella virus infection, *J. Antimicrob. Chemother.* **1997**, 39 (3), 339-345.
- [82] G. Hetland, N. Ohno, I. S. Aaberge, M. Lovik, Protective effect of beta-glucan against systemic *Streptococcus pneumoniae* infection in mice, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2000**, 27 (2), 111-116.
- [83] T. Mitamura, S. Sakamoto, S. Suzuki, S. Yoshimura, M. Maemura, H. Kudo, Effects of lentinan on colorectal carcinogenesis in mice with ulcerative colitis, *Oncol. Rep.* **2000**, 7 (3), 599-601.
- [84] M. Suzuki, T. Arika, K. Amemiya, M. Fujiwara, Cooperative role of T lymphocytes and macrophages in anti-tumor activity of mice pretreated with schizophyllan (SPG), *Jpn. J. Exp. Med.* **1982**, 52 (2), 59-65.
- [85] D. S. Kernodle, H. Gates, A. B. Kaiser, Prophylactic anti-infective activity of poly-(1-6)- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1-3)- $\beta$ -D-glucopyranose glucan in a guinea pig model of staphylococcal wound infection, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, 42 (3), 545-549.
- [86] J. Liang, D. Melican, L. Cafro, G. Palace, L. Fisette, R. Armstrong, M. L. Patchen, Enhanced clearance of a multiple antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* in rats treated with PGG-glucan is associated with increased leukocyte counts and increased neutrophil oxidative burst activity, *Int. J. Immunopharmacol.* **1998**, 20 (11), 595-614.
- [87] G. Chihara, J. Hamuro, Y. Y. Maeda, T. Shiio, T. Suga, N. Takasuka, T. Sasaki, Antitumor and metastasis-inhibitory activities of lentinan as an immunomodulator: an overview, *Cancer Detect. Prev. Suppl.* **1987**, 1, 423-443.
- [88] H. Nakano, K. Namatame, H. Nemoto, H. Motohashi, K. Nishiyama, K. Kumada, A multi-institutional prospective study of lentinan in advanced gastric cancer patients with unresectable and recurrent diseases: effect on prolongation of survival and improvement of quality of life., *Hepatogastroenterology.* **1999**, 46 (28), 2662-2668.
- [89] T. J. Babineau, A. Hackford, A. Kenler, B. Bistrain, R. A. Forse, P. G. Fairchild, S. Heard, M. Keroack, P. Caushaj, P. Benotti, A phase II multicenter, double-blind,

- randomized, placebo-controlled study of three dosages of an immunomodulator (PGG-glucan) in high-risk surgical patients, *Arch. Surg.* **1994**, 129 (11), 1204-1210.
- [90] T. J. Babineau, P. Marcello, W. Swails, A. Kenler, B. Bistrian, R. A. Forse, Randomized phase I/II trial of a macrophage-specific immunomodulator (PGG-glucan) in high-risk surgical patients, *Ann. Surg.* **1994**, 220 (5), 601-609.
- [91] D. B. Zekovic, S. Kwiatkowski, M. M. Vrvic, D. Jakovljevic, C. A. Moran, Natural and modified (1,3)- $\beta$ -D-glucans in health promotion and disease alleviation, *Crit. Rev. Biotechnol.* **2005**, 25 (4), 205-230.
- [92] S. Alban, G. Franz, Partial synthetic glucan sulfates as potential new antithrombotics: a review, *Biomacromolecules* **2001**, 2 (2), 354-361.
- [93] S. Alban, A. Schauerte, G. Franz, Anticoagulant sulfated polysaccharides: Part I. Synthesis and structure-activity relationships of new pullulan sulfates, *Carbohydr. Polym.* **2002**, 47 (3), 267.
- [94] T. Yoshida, Y. Yasuda, T. Mimura, Y. Kaneko, H. Nakashima, N. Yamamoto, T. Uryu, Synthesis of curdlan sulfates having inhibitory effects in vitro against AIDS viruses HIV-1 and HIV-2, *Carbohydr Res* **1995**, 276 (2), 425-436.
- [95] T. Yoshida, Synthesis of polysaccharides having specific biological activities, *Prog. Polym. Sci.* **2001**, 26 (3), 379.
- [96] M. Gordon, M. Guralnik, Y. Kaneko, T. Mimura, M. Baker, W. Lang, A phase I study of curdlan sulfate-an HIV inhibitor. Tolerance, pharmacokinetics and effects on coagulation and on CD4 lymphocytes, *J. Med.* **1994**, 25 (3-4), 163-180.
- [97] M. Gordon, M. Guralnik, Y. Kaneko, T. Mimura, J. Goodgame, W. Lang, Further clinical studies of curdlan sulfate (CRDS)-an anti-HIV agent, *J. Med.* **1995**, 26 (3-4), 97-131.
- [98] D. L. Williams, T. Ha, C. Li, J. H. Kalbfleisch, J. J. Laffan, D. A. Ferguson, Inhibiting early activation of tissue nuclear factor- $\kappa$ B and nuclear factor interleukin 6 with (1,3)- $\beta$ -glucan increases long-term survival in polymicrobial sepsis, *Surgery* **1999**, 126 (1), 54.
- [99] H. Kanayama, N. Adachi, M. Togami, A new antitumor polysaccharide from the mycelia of *Poria cocos* wolf, *Chem. Pharm. Bull.* **1983**, 31 (3), 1115-1118.
- [100] Y. Y. Maeda, G. Chihara, The effects of neonatal thymectomy on the antitumour activity of lentinan, carboxymethylpachymaran and zymosan, and their effects on various immune responses, *Int. J. Cancer* **1973**, 11 (1), 153-161.
- [101] Y.-J. Wang, S.-J. Yao, Y.-X. Guan, T.-X. Wu, J. F. Kennedy, A novel process for preparation of (1,3)- $\beta$ -D-glucan sulphate by a heterogeneous reaction and its structural elucidation, *Carbohydr. Polym.* **2005**, 59 (1), 93.
- [102] J. K. Sharp, P. Albersheim, P. Ossowski, A. Pilotti, P. Garegg, B. Lindberg, Comparison of the structures and elicitor activities of a synthetic and a mycelial-wall-

- derived hexa( $\beta$ -D-glucopyranosyl)-D-glucitol, *J. Biol. Chem.* **1984**, 259 (18), 11341-11345.
- [103] J. K. Sharp, B. Valent, P. Albersheim, Purification and partial characterization of a beta-glucan fragment that elicits phytoalexin accumulation in soybean, *J. Biol. Chem.* **1984**, 259 (18), 11312-11320.
- [104] N. Miyanishi, Y. Iwamoto, E. Watanabe, T. Odaz, Induction of TNF- $\alpha$  production from human peripheral blood monocytes with  $\beta$ -(1,3)-glucan oligomer prepared from laminarin with  $\beta$ -(1,3)-glucanase from *Bacillus clausii* NM-1, *J. Biosci. Bioeng.* **2003**, 95 (2), 192-195.
- [105] F. Jamois, V. Ferrieres, J.-P. Guegan, J.-C. Yvin, D. Plusquellec, V. Vetvicka, Glucan-like synthetic oligosaccharides: iterative synthesis of linear oligo- $\beta$ -(1,3)-glucans and immunostimulatory effects, *Glycobiology* **2005**, 15 (4), 393-407.
- [106] K. Takeo, S. Tei, Synthesis of the repeating units of schizophyllan, *Carbohydr. Res.* **1986**, 145 (2), 293-306.
- [107] G. Yang, F. Kong, Synthesis of a glucoheptaose - the repeating unit of lentinan, *Synlett* **2000**, 10, 1423-1426.
- [108] W. Zhao, G. Yang, F. Kong, Synthesis of two heptasaccharide analogues of the lentinan repeating unit, *Carbohydr. Res.* **2003**, 338 (24), 2813-2823.
- [109] G. Yang, F. Kong, Synthesis of heptasaccharide and nonasaccharide analogues of the lentinan repeating unit, *Carbohydr. Res.* **2005**, 340 (1), 39-48.
- [110] Y. Zeng, W. Zhang, J. Ning, F. Kong, Synthesis of two isomeric pentasaccharides, the possible repeating unit of the  $\beta$ -glucan from the micro fungus *Epicoccum nigrum* Ehrenb. ex Schlecht, *Carbohydr. Res.* **2002**, 337 (24), 2383.
- [111] Y. Zeng, F. Kong, Synthesis of  $\beta$ -D-glucose oligosaccharides from *Phytophthora parasitica*, *Carbohydr. Res.* **2003**, 338 (22), 2359.
- [112] P. Ossowski, A. Pilotti, P. J. Garegg, B. Lindberg, Synthesis of  $\alpha$ -glucoheptaose and  $\alpha$ -glucooctaose that elicit phytoalexin accumulation in soybean, *J. Biol. Chem.* **1984**, 259 (18), 11337-11340.
- [113] P. Ossowski, A. Pilotti, P. J. Garreg, B. Lindberg, Syntheses of a branched hepta- and an octasaccharide with phytoalexin-elicitor activity, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1983**, 22 (10), 793-794.
- [114] R. Verduyn, M. Douwes, P. A. M. van der Klein, E. M. Mosinger, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, Synthesis of a methyl heptaglucoside: Analogue of the phytoalexin elicitor from *Phytophthora megasperma*, *Tetrahedron* **1993**, 49 (33), 7301-7316.

- [115] T. Amaya, H. Tanaka, T. Yamaguchi, N. Shibuya, T. Takahashi, The first synthesis of tetraglucosyl glucitol having phytoalexin-elicitor activity in rice cells based on a sequential glycosylation strategy, *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42 (52), 9191-9194.
- [116] K. Egusa, S. Kusumoto, K. Fukase, Solid-phase synthesis of a phytoalexin elicitor pentasaccharide using a 4-azido-3-chlorobenzyl group as the key for temporary protection and catch-and-release purification, *E. J. Org. Chem.* **2003**(17), 3435-3445.
- [117] H. Tanaka, T. Amaya, T. Takahashi, Parallel synthesis of multi-branched oligosaccharides related to elicitor active pentasaccharide in rice cell based on orthogonal deprotection and glycosylation strategy, *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44 (15), 3053-3057.
- [118] J. K. Fairweather, M. Hrmova, S. J. Rutten, G. B. Fincher, H. Driguez, Synthesis of complex oligosaccharides by using a mutated (1,3)- $\beta$ -D-glucan endohydrolase from barley, *Chem. Eur. J.* **2003**, 9 (11), 2603-2610.
- [119] K. Takeo, K. Maki, Y. Wada, S. Kitamura, Synthesis of the laminara-oligosaccharide methyl  $\beta$ -glycosides of dp 3-8, *Carbohydr. Res.* **1993**, 245 (1), 81-96.
- [120] R. Faghih, F. C. Escribano, S. Catillon, J. Garcia, G. Lukacs, A. Olesker, T. T. Thang, Chiral Synthons for the Total Synthesis of Fluoro Amino Acids and Fluoro Analogues of Antibiotic Sugars, *J. Org. Chem.* **1986**, 51 (24), 4558 - 4564.
- [121] M. L. Wolfrom, A. Thompson, Acetylation, in *Methods in Carbohydrate Chemistry*. II, **1963**, pp.211-215.
- [122] G. Excoffier, D. Gagnaire, J. P. Utile, Synthesis of oligosaccharides on polymeric supports. V. Selective cleavage by hydrazine of the anomeric acetyl groups of acetylated glycosyl residues, *Carbohydr. Res.* **1975**, 39 (2), 368-373.
- [123] M. Mori, Y. Ito, T. Ogawa, Total synthesis of the mollu-series glycosyl ceramides  $\alpha$ -D-Manp-(1,3)- $\beta$ -D-Manp-(1,4)- $\beta$ -D-Glcp-(1,1)-Cer and  $\alpha$ -D-Manp-(1,3)-[ $\beta$ -D-Xylp-(1,2)]- $\beta$ -D-Manp-(1,4)- $\beta$ -D-Glcp-(1,1)-Cer, *Carbohydr. Res.* **1990**, 195 (2), 199.
- [124] R. R. Schmidt, G. Grundler, Glycosylimidates. Pt. 6.  $\alpha$ -Bonded disaccharides from O-( $\alpha$ -D-glycopyranosyl) trichloroacetimidates with trimethylsilyltrifluoromethane sulfonate as catalyst, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1982**, 94 (10), 790-791.
- [125] V. Moreau, *Synthèses chimiques et enzymatiques de thiooligosaccharides*, **1995**, Thèse de doctorat, Université Joseph Fourier, Grenoble, 150 p.
- [126] J.-C. Yvin, F. Jamois, V. Ferrieres, D. Plusquellec, Preparation of laminaribiose via coupling reaction, *PCT Int. Appl.* (Laboratoires Goemar, France) **1999**, 29 pp.
- [127] M. L. Wolfrom, D. L. Fields, A polymer-homologous series of  $\beta$ -D-acetates from cellulose, *Tappi* **1957**, 40, 335-337.
- [128] M. Hayashi, S. Hashimoto, R. Noyori, Simple synthesis of glycosyl fluorides, *Chem. Lett.* **1984**(10), 1747-1750.

- 
- [129] H. P. Kleine, D. V. Weinberg, R. J. Kaufman, R. S. Sidhu, Phase-transfer-catalyzed synthesis of 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl-D-galactopyranosides, *Carbohydr. Res.* **1985**, 142 (2), 333.
- [130] G. Magnusson, G. Noori, J. Dahmen, T. Frejd, T. Lave, Boron trifluoride-etherate induced formation of 2,2,2-trichloroethyl glycopyranosides. Selective visualization of carbohydrate derivatives on TLC plates, *Acta Chem. Scand., Series B: Organic Chemistry and Biochemistry* **1981**, 35 (3), 213-216.
- [131] I. Robina, E. Lopez-Barba, J. Fuentes, Fatty acylamino-trisaccharides. Synthesis and some stereochemical properties, *Tetrahedron* **1996**, 52 (32), 10771-10784.
- [132] P. J. Card, Fluorinated carbohydrates. Use of DAST in the synthesis of fluorinated sugars, *J. Org. Chem.* **1983**, 48 (3), 393-395.
- [133] T. K. Lindhorst, C. Braun, S. G. Withers, Syntheses of 4'-deoxy- $\alpha$ -maltosyl fluoride and 4''-deoxy- $\alpha$ -maltotriosyl fluoride as probes of  $\alpha$ -glucanotransferase mechanisms, *Carbohydr. Res.* **1995**, 268 (1), 93-106.
- [134] S. Cottaz, B. Henrissat, H. Driguez, Mechanism-based inhibition and stereochemistry of glucosinolate hydrolysis by myrosinase, *Biochemistry* **1996**, 35 (48), 15256-15259.
- [135] S. Fort, A. Varrot, M. Schulein, S. Cottaz, H. Driguez, G. J. Davies, Mixed-linkage cellooligosaccharides: a new class of glycoside hydrolase inhibitors, *ChemBiochem* **2001**, 2 (5), 319-325.
- [136] S. G. Withers, I. P. Street, P. Bird, D. H. Dolphin, 2-Deoxy-2-fluoroglucosides: A Novel Class of Mechanism-Based Glucosidase Inhibitors, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 7530-7531.
- [137] D. A. Towler, J. I. Gordon, S. P. Adams, L. Glaser, The Biology and Enzymology of Eukaryotic Protein Acylation, *Annu. Rev. Biochem.* **1988**, 57 (1), 69-97.
- [138] G. Rigaut, A. Shevchenko, B. Rutz, M. Wilm, M. Mann, B. Séraphin, A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome extrapolation, *Nat. Biotechnol.* **1999**, 17, 1030-1032.
- [139] B. Henrissat, A. Bairoch, Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases, *Biochem. J.* **1996**, 316 (2), 695-696.
- [140] R. P. Hellens, E. A. Edwards, N. R. Leyland, S. Bean, P. M. Mullineaux, pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation, *Plant Mol. Biol.* **2000**, 42 (6), 819.
- [141] H.-J. Quandt, A. Pahler, I. Broer, Transgenic root nodules of *Vicia hirsuta*: A fast and efficient system for the study of gene expression in indeterminate-type nodules, *Mol. Plant-Microbe Interact.* **1993**, 6, 699-706.
- [142] G. An, P. Ebert, A. Mitra, S. B. Ha, Binary vectors, in *Plant Molecular Biology Manual*, S. B. Gelvin, R. A. Schilperoort Eds. **1988**, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, pp.1-19.

- 
- [143] F. Côté, K. A. Roberts, M. G. Hahn, Identification of high-affinity binding sites for the hepta- $\beta$ -glucoside elicitor in membranes of the model legumes *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*, *Planta* **2000**, 211 (4), 596.
- [144] V. Baladron, S. Ufano, E. Duenas, A. B. Martin-Cuadrado, F. del Rey, C. R. Vazquez de Aldana, Eng1p, an Endo-(1,3)- $\beta$ -Glucanase Localized at the Daughter Side of the Septum, Is Involved in Cell Separation in *Saccharomyces cerevisiae*, *Eukaryotic Cell* **2002**, 1 (5), 774-786.
- [145] I. Mouyna, J. Sarfati, P. Recco, T. Fontaine, B. Henrissat, J. P. Latge, Molecular characterization of a cell wall-associated  $\beta$ -(1,3)-endoglucanase of *Aspergillus fumigatus*, *Med. Mycol.* **2002**, 40 (5), 455.
- [146] A. S. Meyer, T. Reichstein, *l*-Idose aus *d*-Glucose, sowie ein neuer Weg zur *l*-Idomethylose, *Helv. Chim. Acta* **1946**, 29 (1), 152-162.
- [147] B. H. Koeppen, Improved preparations of 1,2,3,6- and 1,2,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl-D-glucopyranose, *Carbohydr. Res.* **1972**, 24 (1), 154.
- [148] H. Ito, R. Eby, S. Kramer, C. Schuerch, Synthesis of a substituted 2,6-dioxabicyclo[3.1.1]heptane,1,3-anhydro-2,4,6-tri-O-benzyl- $\beta$ -glucopyranose, *Carbohydr. Res.* **1980**, 86 (2), 193.
- [149] K. i. Takeo, T. Nakaji, K. Shinmitsu, Synthesis of lycotetraose, *Carbohydr. Res.* **1984**, 133 (2), 275.
- [150] T. Utamura, K. Kuromatsu, S. Kiyoko, K. Koizumi, T. Shingu, Syntheses and <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-Nuclear Magnetic Resonance Spectra of All Positional Isomers of Tetra-O-Acetyl-D-glucopyranoses, and Their Monobenzyl and Monotrityl Derivatives, *Chem. Pharm. Bull.* **1986**, 34 (6), 2341-2353.
- [151] D. M. Hall, A practical synthesis of methyl 4,6-*O*-benzylidene- $\alpha$ - and - $\beta$ -glucopyranoside, *Carbohydr. Res.* **1980**, 86 (1), 158.
- [152] R. M. Munavu, H. H. Szmant, Selective Formation of 2 Esters of Some Methyl  $\alpha$ -D-Hexopyranosides via Dibutylstannylene Derivatives, *J. Org. Chem.* **1976**, 41 (10), 1832-1835.
- [153] L.-X. Wang, N. Sakairi, H. Kuzuhara, Peracetylated laminaribiose: preparation by specific degradation of curdlan and its chemical conversion into N-acetylhyalobiuronic acid, *Carbohydr. Res.* **1991**, 219, 133.
- [154] V. M. Sokolov, V. I. Zakharov, E. P. Studentsov, Stereoselectivity of Reactions at the Glycoside Center of Carbohydrates: VII. Synthesis of Aryl  $\alpha$  and  $\beta$ -D-Glucopyranosides by Helferich, Catalyzed by Boron Trifluoride Etherate, *Russ. J. Gen. Chem.* **2002**, 72 (5), 806.
- [155] J. Quintus, K.-A. Kovar, P. Link, H. Hamacher, Urinary Excretion of Arbutin Metabolites after Oral Administration of Bearberry Leaf Extracts, *Planta Med.* **2005**(2), 147.

- [156] M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248-254.
- [157] A. Boisson-Dernier, M. Chabaud, F. Garcia, G. Bécard, C. Rosenberg, D. G. Barker, *Agrobacterium rhizogenes*-Transformed Roots of *Medicago truncatula* for the Study of Nitrogen-Fixing and Endomycorrhizal Symbiotic Associations, *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2001**, 14 (6), 695-700.



# **ANNEXES**



---

## **Liste des abréviations**

A	alanine
Ac	acétyle
ANTS	acide 8-amino-naphtalène-1,3,6-trisulfonique
Bn	benzyle
BSA	bovine serum albumine
Bz	benzoyle
C	cystéine
CAN	nitrate d'ammonium cérique
CAZy	carbohydrate-active enzymes server
CBP	calmodulin-binding peptide
CCM	chromatographie sur couche mince
CGTase	cyclodextrine glycosyltransférase
CI	ionisation chimique
COSY	correlated spectroscopy
D	aspartate
DABITC	4-diméthylaminophénylazophényl-4'-isothiocyanate
DAST	trifluorure de diéthylaminosulfure
dATP	désoxyadénosine tri-phosphate
DBU	1,8-diazabicyclo-[5.4.0]-undéc-7-ène
DCI	désorption/ionisation chimique
dCTP	désoxycytosine tri-phosphate
DEPT	distortionless enhancement by polarization transfer
dGTP	désoxyguanosine tri-phosphate
DMAP	diméthylaminopyridine
DMF	<i>N,N</i> -diméthylformamide
dNTPs	mélange équimolaire de dATP, dCTP, dGTP et dTTP
DP	degré de polymérisation
DTT	dithiothreitol
dTTP	désoxythymidine tri-phosphate
E	glutamate
EC	enzyme commission
EDANS	acide <i>N</i> -(2- <i>N</i> -aminoéthyl)-1-naphtylamine-5-sulfonique
éq.	équivalent
ESI	électrospray

---

FAB	bombardement par atomes accélérés
FRET	fluorescence resonance energy transfer
Fuc	fucose
G	glycine
Gal	galactose
GFP	green fluorescence protein
GH	glycoside hydrolase
Glc	glucose
HCA	hydrophobic cluster analysis
HMQC	heteronuclear multiple quantum correlation
IAEDANS	acide <i>N</i> -(iodoacétamidoéthyl)-1-naphtylamine-5-sulfonique
IPTG	$\beta$ -D-thiogalactopyranoside d'isopropyle
IUBMB	union internationale de biochimie et de biologie moléculaire
M ou Myr	peptide-signal pour la myristoylation
MALDI	matrix-assisted laser desorption ionisation
MP	méthoxyphényle
NAD	nicotinamide adénosine dinucléotide
NP	nitrophényle
NTA	acide nitrilotriacétique
PCR	polymerase chain reaction
Ph	phényle
RFP	red fluorescence protein
RMIN	résonance magnétique nucléaire
S	sérine
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis
TAP	tandem-affinity purification
TCA	trichloroacétonitrile
TES	triéthylsilyle
TEV	tobacco etch virus
THF	tétrahydrofurane
THP	tétrahydropyranyle
TMSOTf	trifluorométhanesulfonate de triméthylsilyle

UV	ultra-violet
V-50	$\alpha,\alpha'$ -azodiisobutyramidine dihydrochlorhydrate



---

## **Liste des figures**

Figure 1 : Site actif des glycoside-hydrolases	9
Figure 2 : Topologies du site actif des glycosides hydrolases	11
Figure 3 : Longueurs d'onde d'absorption et d'émission du couple DABITC/EDANS	13
Figure 4 : Substrat fluorescent pour le dosage d' $\alpha$ -amylases	14
Figure 5 : Substrat fluorescent pour le dosage de cellulases	15
Figure 6 : Modèle proposé pour le complexe récepteur de $\beta$ -glucanes	17
Figure 7 : Exemples d'accepteurs reconnus par la $\beta$ -glucosidase/galactosidase mutée E358A	24
Figure 8 : Exemples d'oligosaccharides formés avec Ss- $\beta$ -Gly E387G	26
Figure 9 : Réactions catalysées par la 1,3-1,4- $\beta$ -glycosynthase de <i>Bacillus licheniformis</i>	30
Figure 10 : Structure cristalline du $\beta$ -(1,3)-glucane synthétisé par GII E231G	33
Figure 11 : Quelques accepteurs de la $\beta$ -mannanase E320G	35
Figure 12 : Unités de répétition du schizophyllane	42
Figure 13 : Unité de répétition du lentinane	43
Figure 14 : Possibles unités de répétition d'un $\beta$ -glucane d' <i>Epicoccum nigrum</i>	44
Figure 15 : Hexagluco-side dérivé d'un $\beta$ -glucane de <i>Phytophthora parasitica</i>	44
Figure 16 : Premiers oligosaccharides proposés comme éliciteurs de phytoalexines	45
Figure 17 : Pentasaccharide éliciteur de phytoalexine de <i>Pyricularia oryzae</i>	46
Figure 18 : Oligosaccharides ramifiés, dérivés des éliciteurs de phytoalexines du riz	46
Figure 19 : Gel SDS-PAGE de la purification de la glycosynthase GII E231G	50
Figure 20 : Suivi de l'hydrolyse du tétrasaccharide 42 par la GmGBP	72
Figure 21 : Hydrolyse de $\beta$ -(1,3)-oligosaccharides par la GmGBP recombinante	80
Figure 22 : Purification de la GmGBP-"CBP-tagged"	81
Figure 23 : Evolution de l'hydrolyse de la laminarine catalysée par la GBP purifiée	83
Figure 24 : Transformation des racines de <i>M. truncatula</i>	85
Figure 25 : Pousses de <i>M. truncatula</i> , 5 jours après transformation avec #6+	86
Figure 26 : Apparition d'une première racine, 7 jours après transformation avec #3+	86
Figure 27 : Culture de <i>M. truncatula</i> dans le caisson	87
Figure 28 : Régions conservées chez les GBPs de <i>Glycine max</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> et <i>Medicago truncatula</i>	89
Figure 29 : Gel d'agarose de l'analyse par restriction des plasmides pSTBlue-1:MtGbp1 et pSTBlue-1:MtGbp 3	93
Figure 30 : Principe du système Strataclone	97
Figure 31 : Gel d'agarose de l'analyse par restriction des plasmides pSC-A:MtGbp4	98



---

## **Liste des schémas**

Schéma 1 : Réaction catalysée par les glycoside-hydrolases	7
Schéma 2 : Mécanisme d'une $\beta$ -D-glycoside-hydrolase agissant avec inversion de configuration	10
Schéma 3 : Mécanisme d'une $\beta$ -D-glycoside-hydrolase agissant avec rétention de configuration	11
Schéma 4 : Principe du FRET	13
Schéma 5 : Substrat fluorescent pour le dosage d'endo-chitinases et chitobiosidases	15
Schéma 6 : Polymérisation de fluorure de $\beta$ -cellobiosyle ou de $\beta$ -4-thio-cellobiosyle catalysée par une cellulase	19
Schéma 7 : Obtention de cellotriosides et cellotétraosides assistée par l'utilisation successive d'une cellulase et d'une $\beta$ -galactosidase	20
Schéma 8 : Utilisation d'hydrolases pour la synthèse de $\beta$ -C-cellobiosides d'époxyalkyle	21
Schéma 9 : Synthèse enzymatique d'un substrat fluorescent pour le dosage de cellulases	22
Schéma 10 : Mécanisme d'une glycosynthase	23
Schéma 11 : Synthèse de glycopeptide sur support solide	24
Schéma 12 : Synthèse d'oligosaccharides sur support solide	25
Schéma 13 : Exemple de synthèse d'oligosaccharides ramifiés à l'aide d'une mannosynthase	27
Schéma 14 : Exemple de couplage catalysé par la $\beta$ -galactosidase mutée	27
Schéma 15 : Exemple de réaction catalysée par la $\alpha$ -glucosidase D481G	28
Schéma 16 : Mécanisme de synthèse par assistance de nucléophile externe	28
Schéma 17 : Réactions catalysées par les mutants de la glycosynthase Tt- $\beta$ -Gly	29
Schéma 18 : Réaction catalysée par la glycosynthase Rex D263C	29
Schéma 19 : Utilisation de Cel7B E197A dans la synthèse d'oligosaccharides de longueur contrôlée	31
Schéma 20 : Rétrosynthèse d'un substrat fluorescent de cellulases	32
Schéma 21 : Synthèse d'un hexasaccharide "mixte" $\beta$ -(1,3)/ $\beta$ -(1,4)	33
Schéma 22 : Réaction catalysée par la glycosynthase CFXcd E235G	36
Schéma 23 : Réaction catalysée par le mutant EGCII E351S	37
Schéma 24 : Schématisation de la stratégie de synthèse de l'unité de répétition du lentinane	43
Schéma 25 : Structure et stratégie de synthèse des éliciteurs de phytoalexines du riz	45
Schéma 26 : Principe de la synthèse d'oligosaccharides de DP contrôlé	51
Schéma 27 : Rétrosynthèses pour l'obtention du synthon modifié en 3 <sup>II</sup>	52
Schéma 28 : ...en utilisant un groupement benzyle	54
Schéma 29 : ...en utilisant un groupement allyle	55
Schéma 30 : Rétrosynthèses possibles pour l'obtention du synthon 23	56
Schéma 31 : Essai de synthèse avec l'accepteur 15	58
Schéma 32 : Synthèse du fluorure cible 23	60
Schéma 33 : Couplage avec l'accepteur laminaribiosidique 26	61
Schéma 34 : Couplage avec l'accepteur glucosidique 28	63

---

Schéma 35 : Couplage avec l'accepteur laminaritriosidique 31	64
Schéma 36 : Nouvelle stratégie de synthèse d'oligosaccharides de DP contrôlé	65
Schéma 37 : Synthèse chimio-enzymatique du tétrasaccharide 35	66
Schéma 38 : Rétrosynthèse du substrat fluorescent	68
Schéma 39 : Essai de synthèse par couplage avec le glucose-EDANS 38	69
Schéma 40 : Synthèse du tétrasaccharide fluorescent	71
Schéma 41 : Synthèse du glucoside 46	73
Schéma 42 : Synthèse du glucoside 49	73

---

## ***Liste des tableaux***

Tableau 1 : Exemple d'oligosaccharides obtenus avec la glycosynthase GII E231G	35
Tableau 2 : Exemples des principales sources connues de $\beta$ -(1,3)-glucanes	39
Tableau 3 : Donneurs et accepteurs de la glycosynthase GII E231G	75
Tableau 4 : Plasmides pour la transformation de <i>M. truncatula</i> via <i>A. rhizogenes</i>	84
Tableau 5 : Sites de restriction pour les enzymes BamHI et MscI et Ecl136II	90









## **Synthèse chimio-enzymatique de dérivés de laminari-oligosaccharides, et leur utilisation biochimique**

Les  $\beta$ -(1,3)-glucanes se rencontrent chez diverses espèces végétales et ont été reconnus pour leurs activités immunostimulantes chez les mammifères, ainsi que leur rôle dans le système de défense des plantes. Le premier chapitre de ce manuscrit est un rappel bibliographique sur les glycoside-hydrolases et, particulièrement sur les glycosynthases, et présente également une introduction aux "glucan-binding proteins", enzymes impliquées dans la reconnaissance des  $\beta$ -glucanes, ainsi qu'un état des lieux des connaissances acquises sur les  $\beta$ -(1,3)-glucanes et  $\beta$ -(1,3)-gluco-oligosaccharides. Le deuxième chapitre décrit le travail réalisé au CERMAV (Grenoble), afin de disposer des outils nécessaires à l'étude des mécanismes d'action des  $\beta$ -(1,3)-glucanes et des  $\beta$ -(1,3)-gluco-oligosaccharides. Une méthode de synthèse de  $\beta$ -(1,3)-gluco-oligosaccharides linéaires, de DP contrôlé, à l'aide de la  $\beta$ -(1,3)-glucosynthase GII E231G, ainsi que la synthèse d'un substrat fluorescent destiné au dosage d'activité endo- $\beta$ -(1,3)-glucanase, ont été mises au point. Le troisième chapitre traite des  $\beta$ -glucan-binding proteins, et décrit le travail effectué à l'institut botanique de la LMU (Munich), dans le cadre du projet de recherche européen SACC-SIG-NET (n°HPRN-CT-2202-00251). Cette recherche concerne d'une part, l'étude de la  $\beta$ -glucan-binding protein de Glycine max, et a permis de déterminer pour la première fois le mécanisme moléculaire d'hydrolyse d'une glycoside-hydrolase appartenant à la famille GH-81. D'autre part, un travail de clonage de la famille de gènes Gbps de Medicago truncatula, plante modèle pour les Fabacées, a été réalisé.

---

## **Chemo-enzymatic synthesis of laminari-oligosaccharide derivatives, and their biochemical use**

$\beta$ -(1,3)-glucans are found in a wide range of plants and have been recognised for their immunostimulating activities in mammals, as well as for their role in plant defence system. The first chapter of this manuscript is a short review on glycoside-hydrolases and, particularly on glycosynthases. Glucan-binding proteins, enzymes implied in  $\beta$ -glucan recognition, are also introduced, as well as the knowledge acquired on  $\beta$ -(1,3)-glucans and  $\beta$ -(1,3)-gluco-oligosaccharides. The second chapter describes the work done in the CERMAV (Grenoble), in order to obtain the necessary tools to study  $\beta$ -(1,3)-glucans and  $\beta$ -(1,3)-gluco-oligosaccharides action modes. The synthesis of linear  $\beta$ -(1,3)-gluco-oligosaccharides, of controled DP, using the  $\beta$ -(1,3)-glucosynthase GII E231G, and the synthesis of a fluorogenic substrate for *endo*- $\beta$ -(1,3)-glucanase activity study, are described. The third chapter is about  $\beta$ -glucan-binding proteins, and describes the work done in the botanical institute of the LMU (Munich), for the european research project SACC-SIG-NET (n°HPRN-CT-2202-00251). This research deals, on one hand, with the study of the Glycine max  $\beta$ -glucan-binding protein, which allowed to determined for the first time the hydrolysis molecular mechanism of a glycoside-hydrolase belonging to the GH-81 family. On the other hand, a cloning work on the Gbps gene family of Medicago truncatula, a model plant for the Fabaceae, is presented.