



HAL
open science

Ingénierie des protéines pour la synthèse d'oligosaccharides d'intérêts biologique et industriel

Remi Chambon

► **To cite this version:**

Remi Chambon. Ingénierie des protéines pour la synthèse d'oligosaccharides d'intérêts biologique et industriel. Sciences agricoles. Université de Grenoble, 2014. Français. NNT : 2014GRENV049 . tel-01553194

HAL Id: tel-01553194

<https://theses.hal.science/tel-01553194>

Submitted on 3 Jul 2017

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Chimie - Biologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Rémi CHAMBON

Thèse dirigée par **Sylvain COTTAZ**

Co-encadrée par **Sylvie ARMAND**

préparée au sein du **Centre de Recherches sur les
Macromolécules Végétales**

dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Ingénierie des protéines pour la synthèse d'oligosaccharides d'intérêts biologique et industriel

Thèse soutenue publiquement le **20 novembre 2014**,

Devant le jury composé de :

Dr Hans GEISELMANN

Professeur, Université de Grenoble, Président

Dr Gabrielle VERONESE

Directeur de Recherche, INRA-INSA, Toulouse, Rapporteur

Dr Jean-Jacques BONO

Chargé de Recherche, INRA, Toulouse, Rapporteur

Dr Jean-Pierre VORS

Directeur scientifique, Bayer CropScience, Lyon - La Dargoire, Membre

Dr Sylvie ARMAND

Maître de Conférences, Université de Grenoble, Membre

Dr Sylvain COTTAZ

Professeur, Université de Grenoble, Membre

Dr Sébastien FORT

Chargé de Recherche, CERMAV-CNRS, Grenoble, Invité



– Remerciements –

Cette thèse a été réalisée sous la direction du Professeur Sylvain Cottaz et du Docteur Sylvie Armand, au sein de l'équipe Chimie et Biotechnologie des Oligosaccharides, dirigée par Sébastien Fort. Ces travaux ont été financés par l'Agence Nationale de la Recherche. Je tiens à les remercier chaleureusement pour la confiance qu'ils m'ont accordée et les excellentes conditions de travail dont j'ai pu bénéficier.

Je souhaite particulièrement remercier Sylvie Armand. Ta pédagogie, ta patience, ainsi que ta confiance m'ont permis de réaliser ce travail dans la sérénité et le plaisir. Quels que soient nos sujets de discussions, tu as toujours pris de ton temps pour échanger avec moi, et me faire partager ton expérience. Je t'en suis sincèrement reconnaissant.

Je souhaite également remercier Sylvain Cottaz. Je suis très heureux qu'à travers ta direction, tu aies développé l'interface entre la chimie et la biologie. Pour tes qualités d'écoute, tes remarques, ta confiance et tes notes d'humour (qui te valent une certaine réputation.. !), je te remercie.

Je remercie aussi Sébastien Fort. Ton investissement dans ce travail a été précieux, ta porte toujours ouverte pour discuter et tes chaises vertes accueillantes pour se réunir.

J'exprime ma gratitude au Professeur Hans Geiselmann, au Docteur Gabrielle Véronèse, au Docteur Jean-Jacques Bono et au Docteur Jean-Pierre Vors d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie le Docteur Sandrine Ollagnier-de Choudens et le Professeur Franck Fieschi, membres du comité de suivi de thèse, pour vos regards extérieurs sur ce sujet.

Je souhaite remercier le Docteur Claire-Boisset, Laurine Buon et Philippe Colin-Morel, membres de la plate-forme de chromatographie, pour votre disponibilité et votre aide apportée. Je souhaite également remercier Laure Fort, Rodolphe Guéret et Stéphanie Boulanger pour l'aide technique en spectrométrie de masse.

Je remercie William, Aurélie, Bernard, Patricia, Mélanie, Hugues, Sami, Eric et Sophie, membres de l'équipe CBO, pour nos discussions, certaines sérieuses et d'autres moins, qui ont rendu ces années si agréables à passer.

En parlant de moments agréables, comment ne pas évoquer cette vidéo que vous m'avez donnée en cadeau de départ. C'est avec une certaine émotion que j'écris ces lignes où il me paraît soudain bien difficile de vous remercier à la hauteur de ce que vous m'avez offert.

Aussi, c'est avec beaucoup d'affection que je remercie Stéphanie (tes chitos, les espadriiiiilles ! et nos blagues Nuls), Marine (NodB et ton gâteau carotte), Mélanie (re-NodB et les rôles que tu me mets au footing) et Laurine (toutes tes colonnes, les blind-tests, les apéros, les parties de squash et plein d'autres choses encore).

Mélanie et Sophie, je vous décerne le prix d'interprétation féminine, dans la catégorie « chanson pourrie mais trop bien reprise ». Les effets spéciaux seront pour Antoine (fumée et explosion...), le cadrage pour Flavien (Don't fear the beard), les costumes pour Tinaïg (carotte et sopalins...) et la mise en scène pour Emeline, Claire, Sami, Emilie, Martine, Mélanie et Sophie.

Un grand merci aux anciens, partis sous d'autres cieux, Anica, Maude (la bretonne), Nathalie (et ta boîte de couture), Alexandre, Renato, Samuel, Cony, et Hélène.

Je remercie ma famille pour son soutien matériel et moral sans faille qui m'a permis de réaliser mes études. Voyez dans ce travail le fruit de votre appui. Enfin, je remercie Thuy-Khanh pour être à mes côtés, et m'avoir toujours encouragé au cours de ces années.

Grenoble, le vendredi 20 février 2015

Rémi Chambon

Avant-propos	17
Liste des abréviations	23

CHAPITRE I

LES FACTEURS DE NODULATION ET DE MYCORHIZATION **31**

I. Les symbioses plantes – micro-organismes	37
I.1. La symbiose <i>Rhizobium</i> – Légumineuses	38
I.1.1. Partenaires	38
I.1.1.1. La plante hôte	38
I.1.1.2. Le micro-organisme	38
I.1.2. Association biologique	39
I.2. La symbiose endomycorhizienne à arbuscule	41
I.2.1. Partenaires	41
I.2.1.1. La plante hôte	41
I.2.1.2. Le micro-organisme	41
I.2.2. Association biologique	42
I.3. Une voie commune de signalisation	43
I.4. Des réponses symbiotiques différentes	44
I.5. Symbiose et système immunitaire	45
II. Les lipochitinoligosaccharides	47
II.1. Structure des lipochitinoligosaccharides	47
II.1.1. Facteurs de nodulation	47
II.1.2. Facteurs de mycorhization	49
II.2. Intérêts	49
II.2.1. Biologique	49
II.2.2. Agronomique	50
II.2.3. Fixation de l'azote chez les non-légumineuses	50

III. Voies d'accès aux lipochitinoligosaccharides	53
III.1. Extraction naturelle	53
III.2. Synthèse chimique totale.....	53
III.3. Synthèse biotechnologique : l'usine cellulaire	54
III.4. Analogues de lipochitinoligosaccharides	57
III.4.1. Squelette saccharidique	57
III.4.2. Chaîne grasse	59
III.4.3. Liaisons glycosidiques	60
IV. Objectifs	61

CHAPITRE II

MATERIELS ET METHODES

65

I. Techniques de biologie moléculaire.....	71
I.1. Souches et plasmides.....	71
I.2. Clonage des gènes	76
I.2.1. Méthodologie	76
I.2.2. Clonage de Nolo (<i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234A)	77
I.2.3. Clonage de l'Aryl sulfotransférase IV (<i>Rattus norvegicus</i>)	77
I.2.4. Clonage de NodH (<i>Sinorhizobium meliloti</i>).....	77
I.2.5. Clonage de VC1280 (<i>Vibrio cholerae</i>)	77
I.2.6. Clonage de NodB (<i>Sinorhizobium meliloti</i>).....	77
I.3. Préparation des bactéries compétentes et transformation.....	78
II. Expression des protéines sous forme recombinante	79
II.1. Expression chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	79
II.1.1. Transformation.....	79
II.1.2. Expression.....	79
II.2. Expression chez <i>Pichia pastoris</i>	80
II.2.1. Transformation	80

II.2.2. Expression.....	80
II.3. Expression chez <i>Escherichia coli</i>	80
III. Techniques de biochimie.....	82
III.1. Préparation des fractions cytoplasmiques.....	82
III.2. Préparation des fractions périplasmiques.....	82
III.3. Purification sur résine de nickel.....	82
III.4. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS.....	83
III.5. Tests d'activité des enzymes.....	83
III.5.1. Tests d'activité de la chitinase C2 (<i>O.xanthineolytica</i>).....	83
III.5.2. Tests d'activité de Nolo (<i>S. fredii</i> NGR234).....	84
III.6. Dosage des activités chitine <i>N</i> -désacétylases.....	84
III.6.1. Chitine <i>N</i> -désacétylase VC1280 (<i>Vibrio cholerae</i>).....	84
III.6.2. Chitine <i>N</i> -désacétylase NodB (<i>Sinorhizobium meliloti</i>).....	84
III.6.3. Dosage des amines libres.....	85
IV. Préparation des Substrats.....	86
IV.1. Préparation de la chitine colloïdale.....	86
IV.2. Préparation des oligomères de chitine.....	86
V. Purification des oligomères de chitine <i>N</i>-désacétylés.....	88
V.1. Procédé VC1280.....	88
V.2. Procédé NodB.....	88
VI. Techniques chromatographiques.....	90
VI.1. Chromatographie sur couche mince de silice.....	90
VI.2. Chromatographie d'exclusion stérique.....	90
VI.3. Chromatographie en phase liquide haute performance.....	90
VII. Techniques physico-chimiques.....	91
VII.1. Spectrométrie de masse.....	91
VII.2. Résonance magnétique nucléaire.....	91

CHAPITRE III**ACCES AUX CHITINOLIGOSACCHARIDES****93**

I.	Rappels bibliographiques	97
I.1.	La chitine	97
I.1.1.	Généralités.....	97
I.1.2.	Obtention de la chitine et du chitosane	98
I.2.	Les oligomères de chitine	99
I.3.	Voies d'accès aux chitinoligosaccharides	99
I.3.1.	Approche descendante	100
I.3.1.1.	Dépolymérisation par hydrolyse acide.....	100
I.3.1.2.	Dépolymérisation enzymatique	100
I.3.2.	Approche ascendante	103
I.3.2.1.	Synthèse par voie chimique	103
I.3.2.2.	Utilisation de glycosyltransférases	103
I.3.2.3.	Utilisation de glycoside hydrolases.....	104
II.	Résultats	106
II.1.	La chitinase C2 (<i>Oerskovia xanthineolytica</i>).....	107
II.1.1.	Production et purification	107
II.1.2.	Test d'activité.....	108
II.2.	Les oligomères de chitosane.....	110
III.	Conclusion.....	114

CHAPITRE IV**DECORATION DES CHITINOLIGOSACCHARIDES****117**

I.	Rappels bibliographiques : la décoration par carbamoylation	124
I.1.	La carbamoylation chez les lipochitinoligosaccharides	124

I.2.	Le carbamoyle phosphate.....	125
I.2.1.	Généralités	125
I.2.2.	Synthèse chez les procaryotes	125
I.3.	Les types de carbamoylation	126
I.3.1.	La <i>N</i> -carbamoylation	126
I.3.2.	La <i>S</i> -carbamoylation	128
I.3.3.	La <i>O</i> -carbamoylation.....	130
I.4.	Des caractéristiques biochimiques communes.....	131
II.	Résultats et discussion de la décoration par carbamoylation	132
II.1.	Expression de NolO (<i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234A)	133
II.1.1.	Stratégie d'expression.....	133
II.1.2.	Etudes d'induction de l'expression de NolO	133
II.1.3.	Production et purification de NolO.....	135
II.2.	Etude de stabilité du carbamoyle phosphate	136
II.3.	Alignement de séquences d' <i>O</i> -carbamoyltransférases.....	138
II.4.	Tests d'activité de NolO	141
II.5.	Perspectives.....	143
II.5.1.	Séquence primaire.....	143
II.5.2.	Stratégie d'expression.....	144
II.5.3.	Production de chitinoligosaccharides carbamoylés <i>in vivo</i>	144
III.	Rappels bibliographiques : la décoration par sulfatation	145
III.1.	La sulfatation chez les lipochitinoligosaccharides	145
III.2.	Le 3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate	147
III.3.	Voies d'accès au PAPS.....	148
III.3.1.	Synthèse	148
III.3.2.	Synthèse et régénération du PAPS.....	149
IV.	Résultats et discussion de la décoration par sulfatation	152
IV.1.	Stratégie	152
IV.2.	Expression de l'arylsulfotransférase IV (<i>Rattus norvegicus</i>).....	152
IV.2.1.	Stratégie d'expression.....	152
IV.2.2.	Etude d'induction de l'expression de l'AST-IV	153

IV.2.3. Production et purification de l'AST-IV	154
IV.3. Expression de NodH (<i>Sinorhizobium meliloti</i>)	155
IV.3.1. Stratégie d'expression.....	155
IV.3.2. Etudes d'induction de l'expression de NodH.....	155
IV.3.3. Production et purification de NodH	157
IV.4. Synthèse préparative de chitinoligosaccharides sulfatés.....	157
V. Conclusion.....	160

CHAPITRE V

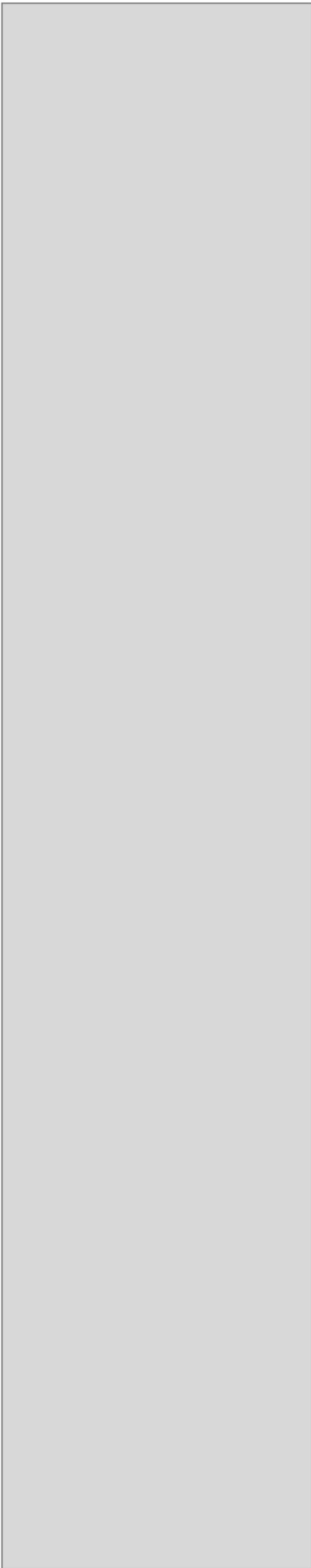
ACCES AUX LIPOCHITINOLIGOSACCHARIDES

163

I. Rappels bibliographiques	170
I.1. Les chitine <i>N</i> -désacétylases	170
I.1.1. Généralités.....	170
I.1.2. Répartition et rôles biologiques.....	171
I.1.2.1. Chitine <i>N</i> -désacétylases de champignons	171
I.1.2.2. Chitine <i>N</i> -désacétylases d'insectes.....	172
I.1.2.3. Chitine <i>N</i> -désacétylases bactériennes.....	172
I.1.2.1. Chitine <i>N</i> -désacétylases archéobactériennes	175
I.2. Modes d'action	175
I.2.1. Schéma de <i>N</i> -désacétylation.....	176
I.2.1.1. Attaques multiples	176
I.2.1.2. Attaque unique	177
I.2.2. Les cations métalliques.....	178
I.3. L'acylation des lipochitinoligosaccharides chez les rhizobiums	179
I.4. Acylation par couplage chimique	180

II. Résultats	182
II.1. Stratégie	182
II.2. La chitine <i>N</i> -désacétylase VC1280 (<i>Vibrio cholerae</i>).....	184
II.2.1. Expression et purification de VC1280.....	185
II.2.2. Caractérisation biochimique	186
II.3. Synthèses préparatives de COs-(N) par le procédé VC1280.....	188
II.3.1. Précurseur d'analogues de LCOs	189
II.3.2. Précurseurs de LCOs.....	191
II.3.3. Précurseur de LCO sulfaté	192
II.4. La chitine <i>N</i> -désacétylase NodB (<i>Sinorhizobium meliloti</i>)	194
II.4.1. Expression et purification de NodB.....	194
II.4.1.1. Tests d'expression chez la levure.....	195
II.4.1.2. Tests d'expression chez <i>E. coli</i> BL21.....	196
II.4.2. Caractérisation biochimique	201
II.5. Synthèse préparative de COs-(N) par le procédé NodB	204
II.5.1. Précurseurs de LCOs non fonctionnalisés.....	205
II.5.2. Précurseurs de LCOs fonctionnalisés.....	206
II.5.2.1. Précurseurs de LCOs sulfatés	206
II.5.2.2. Précurseur de LCO fucosylé	210
II.5.2.3. Précurseur de LCO propargylé.....	212
II.6. Bilan de préparation des précurseur de LCOs	214
II.7. Acylation des chitinoligomères <i>N</i> -désacétylés.....	215
III. Conclusion	216

SYNTHÈSES DE PRECURSEURS DE LIPOCHITINOLIGOSACCHARIDES	227
I. Préparation de précurseurs de LCOs : procédé VC1280	229
I.1. Synthèse du CO-VI(N ^V)	229
I.2. Synthèse du CO-V(N ^V)	230
I.3. Synthèse du CO-V(N ^{IV})	231
I.4. Synthèse du CO-IV(N ^{IV})	232
I.5. Synthèse du CO-IV(N ^{III})	233
II. Préparation de précurseurs de LCOs : procédé NodB	234
II.1. Synthèse du CO-IV(N ^{IV})	234
II.2. Synthèse du CO-V(N ^V)	235
II.3. Synthèse du CO-V(N ^V , S)	236
II.4. Synthèse du CO-IV(N ^{IV} , S)	237
II.5. Synthèse du CO-V(N ^V , MeFuc)	238
II.6. Synthèse du propargyl CO-IV(N ^{IV})	239
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	241
ANNEXES	261
I. Liste des figures	263
II. Liste des tableaux	271
III. Brevet	272



AVANT-PROPOS

Cette thèse de doctorat a été réalisée au Centre de Recherches sur les MACromolécules Végétales (CERMAV), sous la direction du Pr Sylvain Cottaz et du Dr Sylvie Armand, au sein de l'équipe Chimie et Biotechnologies des Oligosaccharides (CBO), dirigée par le Dr Sébastien Fort. Elle s'inscrit dans le projet « BioCOS » financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR). Elle regroupe trois partenaires académiques et un partenaire industriel. L'Institut des Matériaux Polymère (IMP) de Lyon (Dr Stéphane Trombotto et Dr Catherine Ladavière) est spécialisé dans la production d'oligomères de chitine et de chitosane. Le CERMAV présente une expertise dans le remodelage enzymatique d'oligosaccharides. L'Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay (ICMMO) (Dr Boris Vauzeilles, Dr Dominique Urban et Pr Jean-Marie Beau) possède une solide expérience en synthèse organique d'oligosaccharides. Bayer CropScience (Dr Jean-Pierre Vors), co-leader mondial dans la protection des cultures, a la capacité d'évaluer les propriétés biologiques de l'ensemble des composés synthétisés au cours de ce programme.

Ces partenaires sont associés au sein de ce projet autour de l'utilisation de la chitine pour l'élaboration de chitinoligosaccharides à haute valeur ajoutée. Ces composés possèdent de nombreuses propriétés biologiques, incluant l'activité fascinante des lipochitinoligosaccharides : les facteurs de nodulation et de mycorhization.

Le manuscrit de thèse est organisé en six chapitres structurés autour de la synthèse de ces lipochitinoligosaccharides, réalisée par une approche chimio-enzymatique.

- Le premier chapitre est une étude bibliographique sur les facteurs de nodulation et de mycorhization, décrivant leur rôle clé dans l'établissement des symbioses entre les plantes et les micro-organismes. Leurs caractéristiques structurales sont décrites, ainsi que les différentes voies d'accès pour leur obtention.
- Le second chapitre détaille les méthodes expérimentales utilisées dans l'étude.
- Le troisième chapitre décrit les accès aux chitinoligosaccharides, composant le squelette des facteurs de nodulation et de mycorhization. Deux approches de dépolymérisation enzymatique de la chitine sont décrites, afin de s'assurer d'un accès facile aux oligomères de chitine.
- Le quatrième chapitre rapporte les modifications réalisées sur ces oligomères précédemment obtenus. Deux décorations ont retenu l'attention pour cette étude, la carbamoylation et la sulfatation des chitinoligosaccharides.

- Le cinquième chapitre présente des voies d'accès aux lipochitinoligosaccharides à partir des chitinoligosaccharides précédemment obtenus, décorés ou non. L'emploi de deux chitine *N*-désacétylases est détaillé. Leur action suivie d'un couplage par voie chimique avec une chaîne grasse activée donne accès aux facteurs de nodulation et de mycorhization, ainsi qu'à leurs analogues.
- Le sixième chapitre est une conclusion générale de cette thèse de doctorat, ouvrant une nouvelle voie d'accès aux lipochitinoligosaccharides, et évoque les perspectives permises par cette étude.

Les travaux présentés dans cette étude ont fait l'objet des communications scientifiques nationales et internationales suivantes :

- **Glucidoc 2013**
Landéda, du 8 au 11 avril 2013 (communication orale)
Expression hétérologue d'une chitinoligosaccharide dé-N-acétylase pour la préparation de précurseurs de lipochitinoligosaccharides d'intérêt biologique et industriel
Rémi Chambon, Sébastien Fort, Sylvie Armand et Sylvain Cottaz
- **Société Chimique de France, Section Rhône-Alpes (SCF-SRA), Journée de Printemps**
Grenoble le 13 juin 2013 (communication par affiche)
Expression d'une chitinoligosaccharide dé-N-acétylase pour la préparation de précurseurs de lipochitinoligosaccharides d'intérêt biologique et industriel
Rémi Chambon, Sébastien Fort, Sylvie Armand et Sylvain Cottaz
- **Séminaire interne CERMAV**
Grenoble, le 25 février 2014 (communication orale)
Accès innovant à des lipochitinoligosaccharides issus de la biomasse et leurs dérivés en vue d'applications agrochimiques
Rémi Chambon, Stéphanie Pradeau, Sylvain Cottaz, Sébastien Fort et Sylvie Armand
- **25^{èmes} Journées du Groupe Français des Glycosciences (GFG)**
Paris, du 12 au 15 mai 2014 (communication orale)
Remodelage enzymatique de la chitine en vue d'applications agrochimiques
Rémi Chambon, Stéphanie Pradeau, Guillaume Despras, Dominique Urban, Boris Vauzeilles, Jean-Marie Beau, Sylvain Cottaz, Sébastien Fort et Sylvie Armand

- **25^{ème} Colloque du Club Biocatalyse et Synthèse Organique (CBSO)**
Carry le Rouet, du 3 au 6 juin 2014 (communication orale)
Remodelage enzymatique de la chitine pour des applications en agrochimie
Rémi Chambon, Stéphanie Pradeau, Sylvie Armand, Sylvain Cottaz et Sébastien Fort
- **16th European Congress on Biotechnology (ECB16)**
Edinbourg, du 13 au 16 juillet 2014 (communication orale)
Enzymatic remodeling of chitin for agrochemical applications
Rémi Chambon, Guillaume Despras, Dominique Urban, Boris Vauzeilles, Jean-Marie Beau, Sébastien Fort, Sylvie Armand et Sylvain Cottaz



LISTE DES ABREVIATIONS

A

ACP	Protéine porteuse d'acyle (<i>Acyl Carrier Protein</i>)
ADP	Adénosine 5'-diphosphate
Amp	Ampicilline
AMP	Adénosine monophosphate
APS	Adénosine 5'-phosphosulfate
AST-IV	Aryl sulfotransférase IV
ATP	Adénosine 5'-triphosphate

B

BSA	Serum albumine bovine
-----	-----------------------

C

CAZy	Carbohydrate Active enZymes
CCM	Chromatographie sur couche mince
CD	Chitine <i>N</i> -désacétylase
Cm	Chloramphénicol
CO	Chitinoligosaccharide
CO-II	Chitinbiose
CO-III	Chitintriose
CO-IV	Chitintétraose
CO-V	Chitinpentaose
CO-VI	Chitinhexaose
CO-VII	Chitinheptaose
CO(N)	Chitinoligosaccharide <i>N</i> -désacétylé
CO(S)	Chitinoligosaccharide sulfaté
CPS	Carbamoyl phosphate synthétase
CT	Carbamoyltransférase
CTP	Cytidine 5'-triphosphate

D

DHB	Acide 2,5-dihydroxybenzoïque
-----	------------------------------

DO	Densité optique
DP	Degré de polymérisation
DTT	Dithiothréitol

E

EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
ESI	ElectroSpray Ionisation

F

Facteur Myc	Facteur de mycorhization
Facteur Nod	Facteur de nodulation
Fuc	Fucose

G

Gal	D-Galactose
GH	Glycoside hydrolase
Glc	D-Glucose
GlcN	D-Glucosamine
GlcNAc	<i>N</i> -Acétyl-D-glucosamine
GT	Glycosyltransférase
GTP	Guanosine 5'-triphosphate

H

HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HPLC	Chromatographie liquide haute performance

I

IMAC	Immobilized metal ion affinity chromatography
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyrannoside

K

Kan	Kanamycine
-----	------------

Kcat	Constante catalytique
kDa	kiloDalton
Km	Constante de Michaelis

L

LB	Luria Broth
Leu	Leucine
LCO	Lipochitinoligosaccharide

M

MALDI-ToF	Matrix-assisted laser desorption / ionization -time of flight
MES	Acide 2-(<i>N</i> -morpholino)éthanesulfonique
MOPS	Acide 3-(<i>N</i> -morpholino)propanesulfonique
mQ	Eau ultrapure
ms	Milliseconde

N

NFP	Nod factor perception
NSP	Nodulation signaling pathway
NTA	Acide nitrilotriacétique

P

PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PAP	Adénosine 3',5'-diphosphate
PAPS	3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate
PCR	Polymerase chain reaction
Pi	Phosphate inorganique
<i>p</i> NPOH	4-nitrophénol
<i>p</i> NPS	4-nitrophényle sulfate
poly-HIS	Poly-histidine
PPi	Pyrophosphate inorganique
PTFE	Polytétrafluoroéthylène

R

RF	Facteur de rétention
R LysM	Récepteur à motifs Lysine
RMN	Résonance magnétique nucléaire
rpm	Révolution par minute

S

SDS	Dodécylsulfate de sodium
SEC	Chromatographie d'exclusion stérique
ST	Sulfotransférase

T

TB	Terrific broth
T _m	Température de fusion
Tris	2-amino-[hydroxyméthyl]-1,3-propanediol

U

UTP	Uridine 5'-triphosphate
-----	-------------------------

V

V _m	Vitesse maximale
----------------	------------------

Y

YNB	Yeast nitrogen base
-----	---------------------

CHAPITRE I

LES FACTEURS DE NODULATION ET DE MYCORHIZATION

I. Les symbioses plantes – micro-organismes.....	37
I.1. La symbiose <i>Rhizobium</i> – Légumineuses	38
I.1.1. Partenaires.....	38
I.1.1.1. La plante hôte.....	38
I.1.1.2. Le micro-organisme.....	38
I.1.2. Association biologique.....	39
I.2. La symbiose endomycorhizienne à arbuscule	41
I.2.1. Partenaires.....	41
I.2.1.1. La plante hôte.....	41
I.2.1.2. Le micro-organisme.....	41
I.2.2. Association biologique.....	42
I.3. Une voie commune de signalisation.....	43
I.4. Des réponses symbiotiques différentes.....	44
I.5. Symbiose et système immunitaire.....	45
II. Les lipochitinoligosaccharides	47
II.1. Structure des lipochitinoligosaccharides	47
II.1.1. Facteurs de nodulation	47
II.1.2. Facteurs de mycorhization.....	49
II.2. Intérêts	49
II.2.1. Biologique.....	49
II.2.2. Agronomique	50
II.2.3. Fixation de l'azote chez les non-légumineuses.....	50
III. Voies d'accès aux lipochitinoligosaccharides	53
III.1. Extraction naturelle.....	53
III.2. Synthèse chimique totale.....	53
III.3. Synthèse biotechnologique : l'usine cellulaire	54
III.4. Analogues de lipochitinoligosaccharides	57
III.4.1. Squelette saccharidique.....	57
III.4.2. Chaîne grasse	59
III.4.3. Liaisons glycosidiques.....	60
IV. Objectifs	61

Les principaux éléments constituant un organisme vivant sont l'hydrogène (H), l'oxygène (O), le carbone (C), l'azote (N), le phosphore (P). Les trois premiers (H, O et C) sont les composants majeurs des acides aminés, des acides nucléiques, et des sucres, lesquels étant particulièrement abondants chez les végétaux. Les plantes les trouvent au sein de l'air (O₂ et CO₂) ou bien de l'eau (H₂O) et les assimilent grâce au processus de la photosynthèse.

L'azote est important pour la nutrition végétale, car il entre dans la composition des acides nucléiques et des acides aminés. L'air atmosphérique est composé à 78% de diazote (N₂), mais sous cette forme, les plantes sont incapables d'assimiler cet élément car elles ne produisent pas de nitrogénase, enzyme bactérienne responsable de la transformation du diazote en ammoniacque. On retrouve l'azote en plus faible quantité dans le sol, sous forme assimilable comme l'ammoniacque ou bien les nitrates produits par des bactéries que l'on décrit comme fixatrices d'azote.

Le phosphore est lui aussi primordial pour le développement des végétaux. Il entre par exemple dans la composition de molécules dites de transport d'énergie, comme l'ATP, mais aussi dans celle des acides nucléiques. La seule forme de phosphore assimilable par les plantes est le phosphate (H₂PO₄⁻/ HPO₄²⁻), également peu présent dans le sol. Comme l'azote, le phosphore est assimilé par l'intermédiaire des racines.

Pour pallier aux carences des plantes en azote et phosphore, particulièrement chez les espèces cultivées, l'homme a développé des fertilisants chimiques enrichis en composés azotés et phosphatés. Leur utilisation, massive et généralisée, engendre de nombreux problèmes écologiques. On peut citer en premier lieu une pollution générée par ces traitements et une eutrophisation des milieux (ou étouffement). Le sol ainsi traité s'appauvrit en oxygène ce qui empêche le développement des micro-organismes naturels et entraîne une baisse de la fertilité du sol. Seuls 30 à 50% des composés répandus sont absorbés par les végétaux, le reste est lessivé par les pluies et va déstabiliser des écosystèmes voisins tels que les rivières, les lacs et les zones côtières. Une prolifération d'algues vertes/bleues, des eaux troubles et une raréfaction de l'oxygène en sont les conséquences. Les eaux souterraines sont aussi impactées avec de forts taux de nitrate qui les rendent impropres à la consommation humaine. Afin d'éviter tous risques sanitaires, l'industrie de l'eau doit supporter des coûts supplémentaires pour éliminer ces nitrates. Les ressources en phosphates sont importantes mais extrêmement localisées géographiquement, deux tiers des réserves mondiales étant détenues par le Maroc dans la région instable du Sahara occidental, ce qui pourrait être source de conflits futurs¹. De plus la synthèse, l'acheminement et l'épandage de ces fertilisants ne sont pas neutres en bilan carbone et consomment une grande quantité d'énergie fossile. Ainsi, aux problèmes

¹ Van Vuuren, D. P., Bouwman, A. F. and Beusen, A. H. W., **2010**, *Glob. Environ. Chang.*, 20, (3), 428-

écologiques se greffent également ceux relevant de la santé publique, de la géopolitique et de l'économie.

En parallèle, au cours des trente dernières années, de nombreux progrès ont été réalisés dans la compréhension des phénomènes de symbiose entre les plantes et les micro-organismes. Ces associations apparues au cours de l'évolution sont une adaptation naturelle aux problèmes d'assimilation de l'azote et du phosphore. Elles impliquent d'un côté une plante et de l'autre des bactéries ou des champignons. C'est une véritable vie en association qui s'établit entre les partenaires avec des bénéfices mutuels. Les micro-organismes apportent aux plantes des minéraux et autres composés nécessaires à leur croissance et en retour, ces dernières fournissent des molécules évoluées issues de leur photosynthèse. Ces échanges permettent à tous les partenaires de combler leurs carences et ainsi d'avoir un développement optimum.

La compréhension et le contrôle de ces symbioses nourrissent un grand intérêt d'un point de vue écologique et agronomique. Dans une démarche de développement durable, l'espoir est de pouvoir contrôler et induire ces phénomènes pour ainsi améliorer les rendements des cultures avec des impacts environnementaux pratiquement nuls.

I. Les symbioses plantes – micro-organismes

La symbiose *Rhizobium* - légumineuse (fixatrice d'azote) et la symbiose endomycorhizienne à arbuscule sont les deux grandes associations biologiques qui répondent aux problèmes de nutrition azotée et phosphatée. Cette dernière est la plus ancienne relation entre plantes et micro-organismes. Elle serait apparue il y a 400 millions d'années et aurait facilité la colonisation de la terre par les végétaux. La symbiose fixatrice d'azote date, elle, de seulement 60 millions d'années et résulterait d'une évolution de la première². La mise en place de ces associations est réalisée à travers un dialogue moléculaire entre partenaires (Figure 1). Dans un premier temps, des flavonoïdes ou des strigolactones sont sécrétés par la plante. Dans un second temps, ces composés perçus par les micro-organismes vont entraîner la synthèse puis la sécrétion de facteurs de nodulation (facteurs Nod) dans le cas de la symbiose fixatrice d'azote, et des facteurs de mycorrhization (facteurs Myc) pour la symbiose endomycorhizienne à arbuscule.

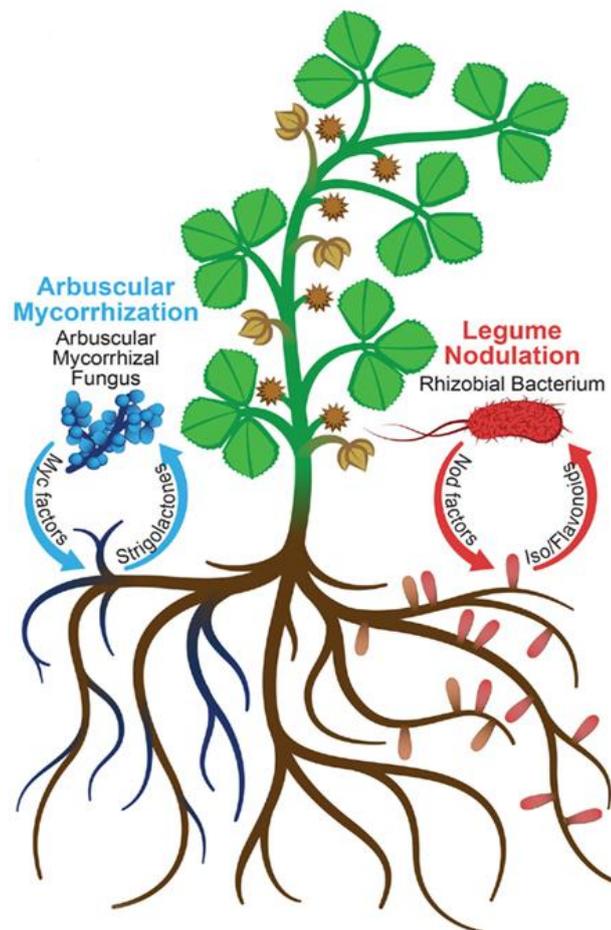


Figure 1. Mise en place des symbioses plantes – micro-organismes, adaptée de Jayarama *et al.*³.

² Bonfante, P. and Anca, I. A., **2009**, *Annu. Rev. Microbiol.*, 63, 363-383.

³ Jayaraman, D., Forshey, K., Grimsrud, P. and Ané, J. M., **2012**, *Plant Proteomics*, 3, 1-6.

Ces molécules signal vont engendrer de profondes modifications tissulaires au niveau des racines de la plante et permettre l'entrée en symbiose des partenaires. Les facteurs Nod et Myc jouent donc un rôle essentiel dans l'établissement de ces associations biologiques.

I.1. La symbiose *Rhizobium* – Légumineuses

I.1.1. Partenaires

I.1.1.1. La plante hôte

Les Fabacées, connues également sous le nom de légumineuses, représentent une famille de 12 000 espèces identifiées à ce jour. Ce sont les seules plantes sensibles aux *Rhizobiums* (excepté des non-légumineuses du genre *Parasponia*), et donc capables d'engager une symbiose fixatrice d'azote. Cette famille de plantes colonise aussi bien les zones tropicales que les zones froides, en passant par des climats tempérés. Dans nos régions, ce sont des plantes herbacées, mais elles peuvent être arborescentes ou sous forme de lianes dans les zones climatiques plus chaudes. De nombreuses plantes cultivées par l'homme appartiennent à cette famille. On retrouve notamment le soja, le haricot, l'arachide, le pois, la luzerne, la lentille et la réglisse. Les Fabacées ont la capacité de créer un nouvel organe racinaire, la nodosité, afin d'accueillir les bactéries partenaires. Elles y expriment également une hémoprotéine, la leghémoglobine⁴. D'une structure proche de l'hémoglobine, elle joue un rôle similaire de fixation et de transport d'oxygène. Cela permet de protéger la nitrogénase bactérienne qui est inhibée par l'oxygène, et ainsi de favoriser la réduction du diazote par la *Rhizobium*.

I.1.1.2. Le micro-organisme

Les bactéries collectivement regroupées sous le terme de Rhizobia vivent dans la rhizosphère, qui est l'environnement proche des racines des végétaux. Elles s'y développent à faible vitesse mais en infectant une plante, elles peuvent rapidement former des colonies au sein d'une nodosité qui peut contenir jusqu'à 10⁸ bactéries (Figure 2). Les rhizobiums possèdent notamment, en plus de leur chromosome, un « méga-plasmide ». On retrouve sur cette ADN circulaire extra chromosomique un réservoir de gènes adaptatifs procurant à ces bactéries des propriétés uniques⁵. Elles ont la capacité de fixer de l'azote atmosphérique pour le réduire en ammoniacque et possèdent une batterie de gènes *nod* pour la synthèse des facteurs de nodulation.

⁴ Garrocho-Villegas, V., Gopalasubramaniam, S. K. and Arredondo-Peter, R., **2007**, *Gene*, 398, (1-2), 78-85.

⁵ Freiberg, C., Fellay, R., Bairoch, A., Broughton, W. J., Rosenthal, A. and Perret, X., **1997**, *Nature*, 387, (6631), 394-401.

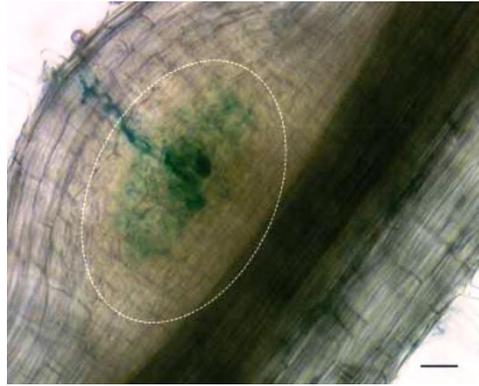


Figure 2. Nodosité en cours de formation lors de l'interaction entre *Rhizobium leguminosarum* et son symbiote *Vicia hirsuta*, adapté d'Oldroyd et Downie⁶.

La réduction de l'azote atmosphérique en ammoniacque est catalysée par la nitrogénase⁷ selon la réaction suivante :



Seize moles d'ATP sont nécessaires pour transformer une seule mole de N₂. Ce coût énergétique très important est entièrement assuré par les bactéries fixatrices d'azote, au bénéfice des plantes. En retour, l'hôte fournit des produits issus de sa photosynthèse comme des hexoses. Cependant, ce transfert de molécules présente un coût pour l'hôte et la plante doit trouver un équilibre afin d'assurer son développement.

I.1.2. Association biologique

La symbiose fixatrice d'azote est initiée par la sécrétion de flavonoïdes synthétisés par la plante hôte. Les rhizobiums captent ces signaux et vont à leur tour synthétiser des molécules signal à destination de la légumineuse : les facteurs Nod, qui sont des lipochitinoligosaccharides (LCOs). Il s'agit de la symbiose racinaire la plus étudiée, particulièrement au niveau génétique et moléculaire. D'importants travaux, notamment avec la plante modèle *Medicago truncatula* (luzerne) et son symbiote *Sinorhizobium meliloti*, ont permis de mettre en évidence les facteurs Nod indispensables à l'infection de la plante puis à la formation de la nodosité⁸.

Les rhizobiums ont la capacité d'infecter les racines de la plante par deux voies, soit au

⁶ Oldroyd, G. E. D. and Downie, J. A., **2004**, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 5, (7), 566-576.

⁷ Howard, J. B. and Rees, D. C., **1996**, *Chem. Rev.*, 96, (7), 2965-2982.

⁸ Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Prome, J. C. and Dénarié, J., **1990**, *Nature*, 344, (6268), 781-784.

niveau des poils racinaires (cellule épidermique à croissance apicale) soit par une faiblesse de la paroi : c'est une infection dite par « crack entry ». Les bactéries profitent de lésions épidermiques provoquées lors de l'émergence de racines latérales et passent alors directement entre les cellules en générant des poches d'infection⁹.

L'infection la plus courante s'établit via le poil racinaire, en deux grandes phases indépendantes mais coordonnées : l'infection et l'organogénèse de la nodosité. Lorsque le facteur Nod se lie à son récepteur, des oscillations de concentration en Ca^{2+} sont observées au sein des noyaux des cellules environnantes. Ces variations constituent des seconds messagers traduisant la perception du LCO jusqu'aux noyaux pour induire une expression de gènes en réponse. Au niveau de l'épiderme, le poil racinaire amorce une courbure en crosse de berger qui va piéger la bactérie. La rhizobium pénètre alors au sein d'une cellule et initie son infection vers le cortex de la racine (Figure 3).

La plante forme un filament pré-infectieux pour favoriser la progression des bactéries. Les cellules végétales, quant à elles, modifient leur cytosquelette pour indiquer le passage au filament infectieux. Au niveau du cortex, un nouvel organe se forme.

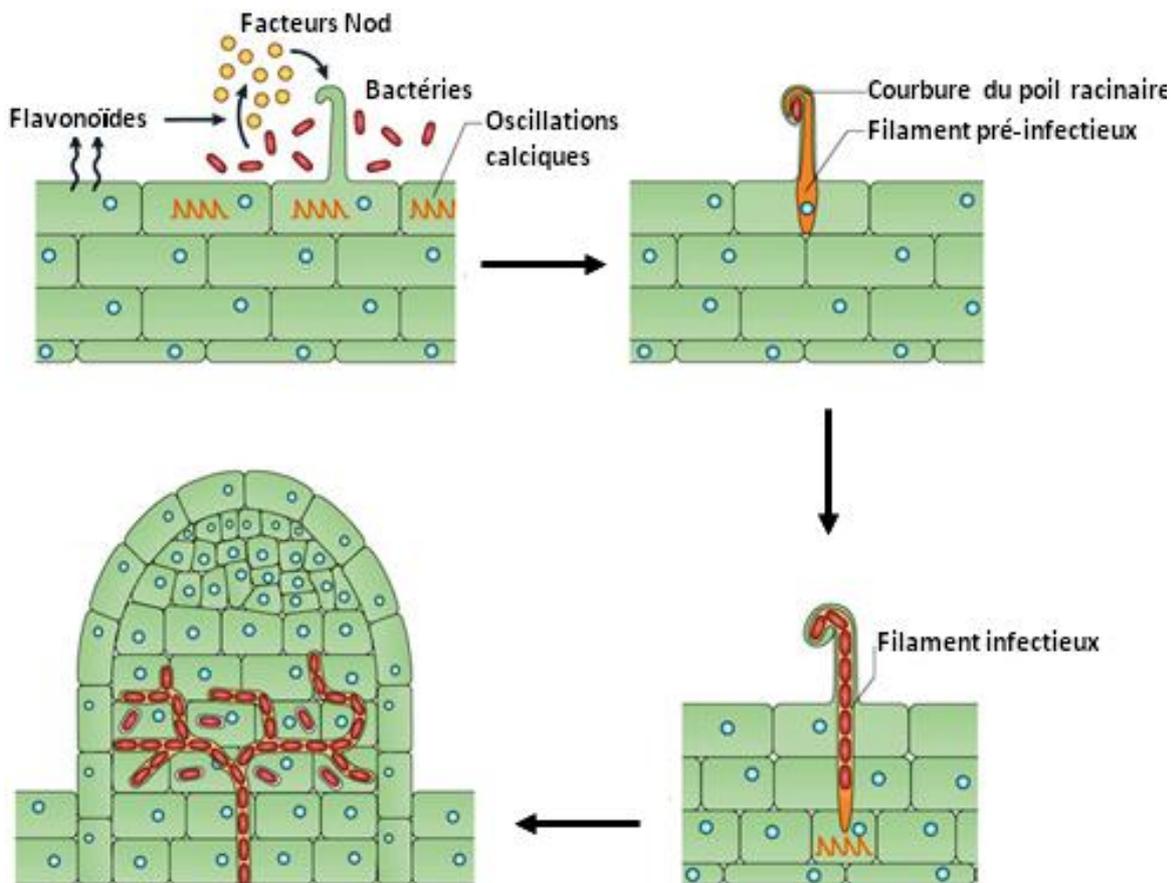


Figure 3. Etablissement de la symbiose *Rhizobium*-légumineuses, d'après Oldroyd *et al.*¹⁰.

⁹ Goormachtig, S., Capoen, W. and Holsters, M., **2004**, *Trends Plant Sci.*, 9, (11), 518-522.

¹⁰ Oldroyd, G. E. D., **2013**, *Nat. Rev. Microbiol.*, 11, (4), 252-263.

Des hormones de croissance provoquent des divisions et croissances cellulaires, pour former un méristème. L'infection bactérienne se ramifie et progresse vers cette pré-nodosité. Les rhizobiums vont alors être relarguées au sein des cellules végétales, dans un nouveau compartiment cellulaire appelé le symbiosome. Elles vont se différencier en bactéroïdes et former une nodosité mature, lieu de fixation de l'azote et d'échanges. La symbiose est alors établie.

I.2. La symbiose endomycorhizienne à arbuscule

I.2.1. Partenaires

I.2.1.1. La plante hôte

Un très large spectre de plantes (70 à 90% des végétaux terrestres) est impliqué dans cette symbiose. On retrouve le groupe des angiospermes, qui sont des végétaux à fleurs, donc à fruits, composé d'environ 300 000 espèces connues à ce jour. Les gymnospermes, également concernées, sont principalement des conifères. Enfin, des plantes moins évoluées de type fougères (ptéridophytes) et des mousses (bryophytes) complètent le spectre de reconnaissance. Les légumineuses appartiennent au groupe des angiospermes, elles sont donc aussi partenaires dans cette symbiose en plus de l'être dans la symbiose fixatrice d'azote.

I.2.1.2. Le micro-organisme

Au sein du règne fongique, une dizaine de divisions classe les espèces de champignons. Parmi elles, le phylum des glomérormycètes recouvre environ 200 espèces. Ces champignons, via leurs filaments (hyphes), vont coloniser les racines des plantes pour s'y associer et former des mycorhizes (du grec *myco* : champignon et *rhiza* : racine). Parce que de très nombreuses ramifications vont se développer au cœur même de la racine, cette symbiose est dite endomycorhizienne à arbuscule (Figure 4).

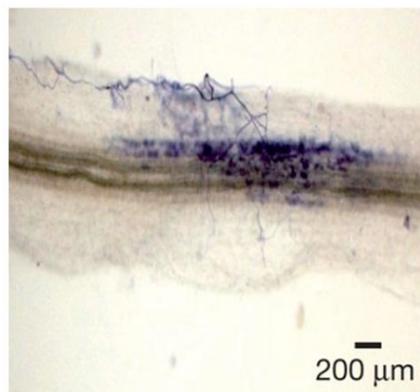


Figure 4. Endomycorhizes à arbuscule de *G. intraradices* et *M. truncatula*, adapté de Maillet *et al.*¹².

I.2.2. Association biologique

Après la sécrétion de strigolactones par la plante hôte¹¹, le champignon va à son tour exsuder dans son environnement des molécules signal : les facteurs Myc¹², qui sont également des lipochitinoligosaccharides (LCOs). La perception de ces molécules précède la préparation de la plante hôte pour la réception du micro-organisme (Figure 5), sans que le rôle des LCOs ne soit encore bien établi à ce niveau. Le premier contact entre les partenaires s'effectue par un hyphopodium à la surface d'une racine¹³. Les cellules épidermiques vont ensuite fusionner leurs cytoplasmes pour former un appareil de pré-pénétration similaire à celui du processus de nodulation, afin de favoriser l'entrée de l'hyphe. Le champignon va développer une structure en arbuscule au sein du cortex interne de la racine pour augmenter les surfaces d'échanges entre les partenaires. Les cellules de la plante vont entourer l'arbuscule d'une membrane péri-arbusculaire, à travers laquelle vont s'effectuer les échanges. Une véritable connexion s'établit entre les racines de la plante et une chaîne dense et étendue d'hyphes du champignon.

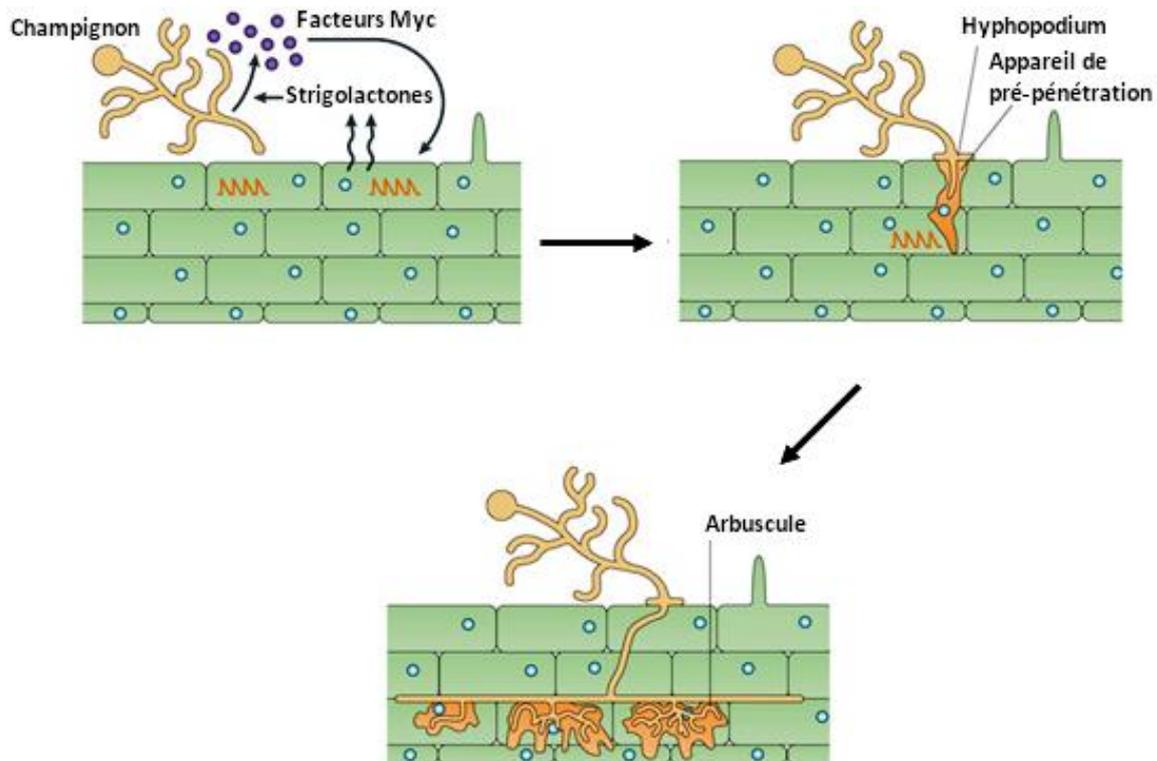


Figure 5. Etablissement de la symbiose endomycorhizienne à arbuscule, d'après Oldroyd *et al.*¹⁰.

¹¹ Akiyama, K., Matsuzaki, K. and Hayashi, H., **2005**, *Nature*, 435, (7043), 824-827.

¹² Maillet, F., Poinot, V., Andre, O., Puech-Pages, V., Haouy, A., Gueunier, M., Cromer, L., Giraudet, D., Formey, D., Niebel, A., Martinez, E. A., Driguez, H., Bécard, G. and Dénarié, J., **2011**, *Nature*, 469, (7328), 58-63.

¹³ Genre, A., Chabaud, M., Timmers, T., Bonfante, P. and Barker, D. G., **2005**, *Plant Cell*, 17, (12), 3489-3499.

Des valeurs de dizaines de mètres d'hyphes par cm³ de terre ont été mesurées¹⁴. La capacité de la plante à capter l'eau et les nutriments du sol en est augmentée d'autant.

I.3. Une voie commune de signalisation

Afin de mieux comprendre la biologie des symbioses et d'identifier les voies de signalisation déclenchées, deux plantes modèles ont été retenues, *Lotus japonicus* (un lotier) et *Medicago truncatula* (une luzerne). Ces deux légumineuses sont sensibles à la mycorhization et à la nodulation. Afin d'identifier les gènes responsables des voies de réponse, des mutants ont été générés. La publication récente du génome complet de *M. truncatula*¹⁵, et de son symbiote *Sinorhizobium meliloti*¹⁶ illustrent les progrès réalisés et le travail à accomplir afin d'identifier les composants de la signalisation des symbioses.

On retrouve de nombreux points communs dans les cascades de signalisation déclenchées par les facteurs Nod ou Myc, de la perception du signal à la réponse morphologique de l'hôte¹⁷. Il existe une voie commune de signalisation qui va permettre l'organogénèse de la nodosité et promouvoir l'invasion des racines par le champignon (Figure 6).

Dans le cas des facteurs Nod, le LCO est perçu par une combinaison de deux récepteurs NFP (« nod factor perception »). Nommés NFR1 et NFR5 chez *Lotus japonicus* et NFP et LYK3 chez *Medicago truncatula*, ils sont situés à la surface des cellules épidermiques de la racine¹⁸.

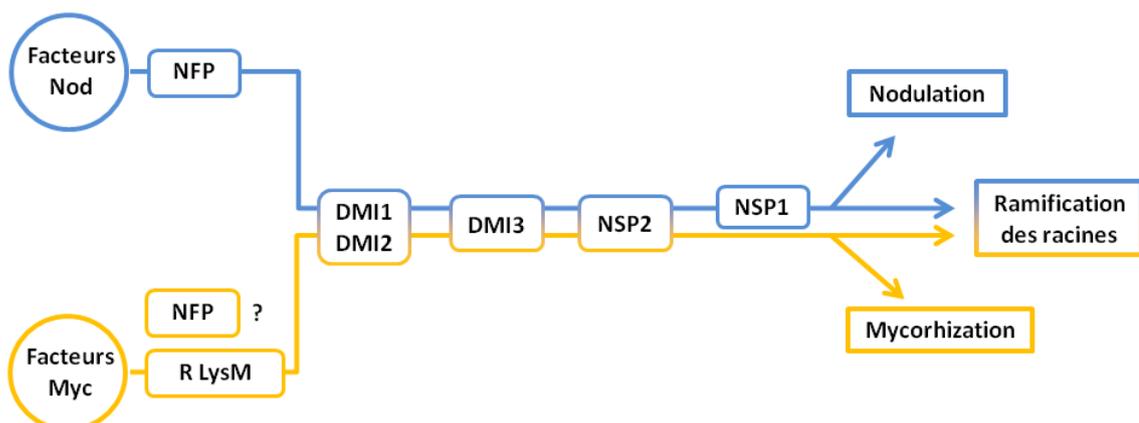


Figure 6. Schéma de la voie commune de signalisation des LCOs, adapté de Maillet *et al.*¹².

¹⁴ Pampolina, N. M., Dell, B. and Malajczuk, N., **2002**, *For. Ecol. Manag.*, 158, (1-3), 291-304.

¹⁵ Young, N. D., *et al.*, **2011**, *Nature*, 480, (7378), 520-524.

¹⁶ Galibert, F., *et al.*, **2001**, *Science*, 293, (5530), 668-672.

¹⁷ Oldroyd, G. E. D. and Downie, J. M., **2008**, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 519-546.

¹⁸ Radutoiu, S., Madsen, L. H., Madsen, E. B., Felle, H. H., Umehara, Y., Gronlund, M., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S., Sandal, N. and Stougaard, J., **2003**, *Nature*, 425, (6958), 585-592.

Ces récepteurs possèdent un domaine à motifs lysine extracellulaire (R LysM), un domaine transmembranaire et un domaine kinase intracellulaire. Des récepteurs de même nature ont été décrits pour la symbiose endomycorhizienne à arbuscule¹⁹.

Lorsque le LCO interagit avec son récepteur, des phénomènes d'oscillations calciques près du noyau de la cellule apparaissent. Les mécanismes qui relient l'activation du récepteur par le LCO aux oscillations calciques sont encore inconnus.

En utilisant des plantes mutantes incapables de s'associer à des micro-organismes, la série de gène *dmi1*, *dmi2* et *dmi3* (does not make infections) ainsi que les facteurs de transcription NSP1 et NSP2 (nodulation signaling pathway) ont été identifiés et ordonnés par rapport aux réponses cellulaires et tissulaires observées lors de la perception par les facteurs Nod et Myc. Un modèle de voie commune de signalisation a ainsi pu être proposé²⁰.

Il est à noter que lorsqu'une plante entre en symbiose avec un micro-organisme, elle réduit voire supprime sa capacité d'association avec un nouveau partenaire. Ainsi, une plante ne pourra pas « noduler » et « mycorhizer » simultanément, ou bien elle le fera mais sur de grandes distances racinaires et l'une des deux symbioses l'emportera largement sur l'autre¹⁹.

I.4. Des réponses symbiotiques différentes

Le modèle de voie commune de signalisation symbiotique met en évidence le fait que des molécules signal possédant des structures proches, facteurs Nod et facteurs Myc, induisent des voies de réponse similaires chez les végétaux. Cependant, il ne suffit pas à expliquer comment une plante hôte arrive à distinguer la nodulation de la mycorhization. En effet, une même plante peut être capable de répondre à un facteur Nod en provoquant la nodulation et à un facteur Myc en induisant les phénomènes de mycorhization.

La mycorhization semble quasiment omniprésente dans le règne végétal, et de très nombreuses espèces possèdent ainsi les voies de réponses aux LCOs. Chez les légumineuses, des composants de cette voie ont évolué pour permettre l'association supplémentaire avec les rhizobiums. Il y a 60 millions d'années, le génome des légumineuses a été dupliqué¹⁵. Il est probable qu'un degré de complexité supplémentaire soit apparu au sein de leur voie symbiotique, comme par exemple au niveau des récepteurs reconnaissant les facteurs Nod. Les légumineuses posséderaient donc une voie de signalisation spécifique à chaque symbiose. Cette hypothèse est en adéquation avec la plus grande complexité des facteurs de nodulation, en regard des structures plus simples des facteurs Myc, telles qu'elles sont

¹⁹ Gough, C. and Cullimore, J., **2011**, *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 24, (8), 867-878.

²⁰ Parniske, M., **2008**, *Nature Rev. Microbiol.*, 6, (10), 763-775.

connues à ce jour.

La mise en évidence de la liaison directe du facteur Nod avec son récepteur suggère une médiation de la réponse symbiotique au début du processus de symbiose²¹. Il est également probable que d'autres voies de signalisation, parallèles à la voie symbiotique commune, ajustent la réponse physiologique aux micro-organismes. Les mécanismes permettant d'adapter la réponse symbiotique en fonction du micro-organisme restent donc encore mal connus à ce jour.

I.5. Symbiose et système immunitaire

Afin de lutter contre des infections potentielles par les micro-organismes, les plantes ont développé une immunité contre des motifs moléculaires associés à des agents pathogènes. Ces motifs sont des éléments caractéristiques des micro-organismes pathogènes (bactéries ou champignons). Parmi eux, on retrouve les chitinoligosaccharides (COs) qui composent la paroi des champignons et qui présentent des analogies structurales avec le peptidoglycane de la paroi bactérienne. Ces oligomères de chitine sont des éliciteurs des réponses de défense des plantes²² (Figure 7).

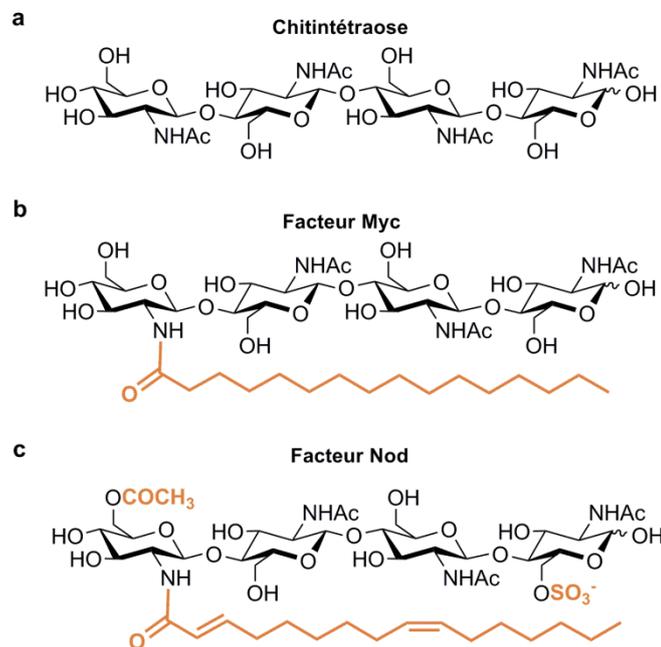


Figure 7. Structures de CO et LCOs. (a) Chitintétraose (b) Facteurs Myc de *Glomus intraradices* Myc-LCO (C_{16:0}) (c) Facteur Nod de *Sinorhizobium meliloti* NodSm-IV (C_{16:2}, Ac; S).

²¹ Broghammer, A., Krusell, L., Blaise, M., Sauer, J., Sullivan, J. T., Maolanon, N., Vinther, M., Lorentzen, A., Madsen, E. B., Jensen, K. J., Roepstorff, P., Thirup, S., Ronson, C. W., Thygesen, M. B. and Stougaard, J., **2012**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 109, (34), 13859-13864.

²² Boller, T. and Felix, G., **2009**, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 60, 379-406.

Les symbioses seraient une évolution des relations plantes - pathogènes et, comme pour les LCOs, la perception de ces oligosaccharides est réalisée via des récepteurs à motifs lysine¹⁰. La combinaison des récepteurs identifiant un LCO ou un oligomère de chitine est différente et va déclencher des voies de signalisation opposées. Soit la plante accepte le symbiote, soit elle active son système immunitaire pour repousser l'agresseur.

Les modalités de déclenchement de ces voies sont également mal connues à ce jour. En effet, une étude récente révèle que des oligomères de chitine (chitintétraose ou chitinpentaose) induisent une réponse symbiotique similaire aux facteurs Myc, chez *M. truncatula*²³. Ces chitinoligosaccharides déclenchent des oscillations calciques chez la plante, induisent l'expression des gènes *dmi1* et *dmi2* mais ne sont pas reconnus par les récepteurs NFP. Une nouvelle voie d'initiation de symbiose à partir de ces oligomères serait donc envisageable. Les molécules de nature chitinoligosaccharidique sont donc capables soit d'activer le système immunitaire des plantes, soit de l'inhiber, afin de permettre la communication avec un micro-organisme. Ces réponses antagoniques utilisent des voies métaboliques qui possèdent des points communs. Les décorations portés par les facteurs Nod et Myc peuvent expliquer, au regard des simples oligomères de chitine, les différentes réponses de la plante.

²³ Genre, A., Chabaud, M., Balzergue, C., Puech-Pages, V., Novero, M., Rey, T., Fournier, J., Rochange, S., Becard, G., Bonfante, P. and Barker, D. G., **2013**, *New Phytol.*, 198, (1), 179-189.

II. Les lipochitinoligosaccharides

Les facteurs de nodulation et de mycorhization sont des lipochitinoligosaccharides. Ce sont des molécules signal diffusibles cruciales pour la mise en place des symbioses plantes-micro-organismes. En effet, des bactéries mutantes qui ne produisent pas de facteurs Nod sont incapables d'entrer en symbiose. De même, des légumineuses mutantes ne possédant pas de récepteurs NFR1 et NFR5 ne peuvent accueillir de rhizobiums¹⁸. L'essentiel des connaissances sur la structure et la biosynthèse des lipochitinoligosaccharides (LCOs) est regroupé chez les rhizobiums. En effet, peu d'informations sur les facteurs de mycorhization sont aujourd'hui disponibles et seule leur structure est connue.

II.1. Structure des lipochitinoligosaccharides

II.1.1. Facteurs de nodulation

Les facteurs Nod produits par les rhizobiums sont constitués d'un squelette chitinoligosaccharidique, composé d'unités *N*-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) reliées entre elles par des liaisons $\beta(1-4)$. Chitintétraose (CO-IV) et chitinpentaose (CO-V) sont les oligomères majoritaires qui composent le cœur des facteurs Nod. L'extrémité non-réductrice est *N*-acylée et ces LCOs peuvent également présenter de nombreuses décorations sur le sucre réducteur et non-réducteur (Figure 8).

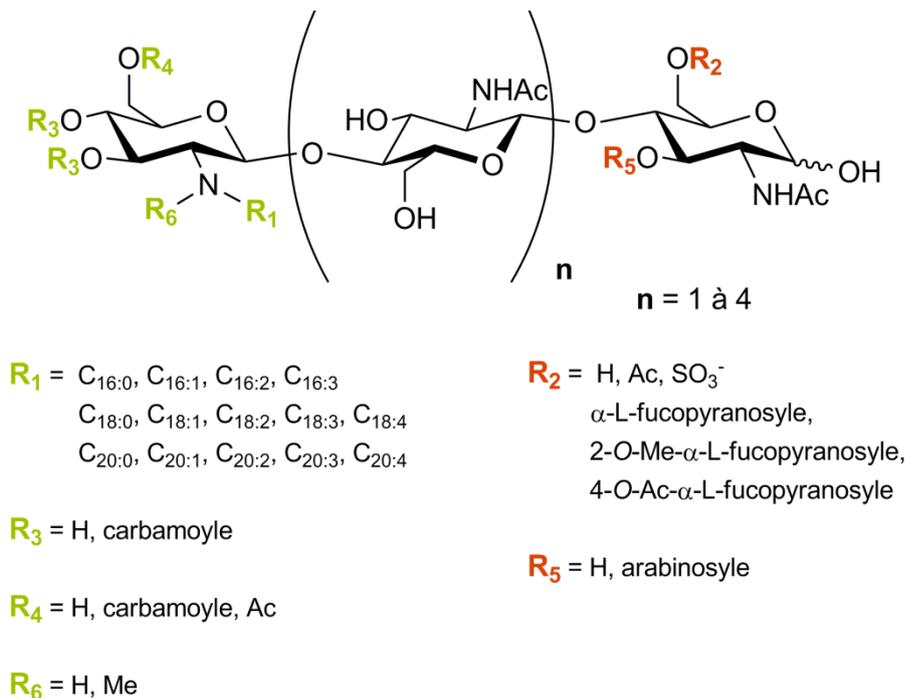


Figure 8. Structure générale des facteurs de nodulation, d'après D'Haeze et Holsters²⁴.

Au total, plus d'une centaine de structures de facteurs de nodulation ont été décrites²⁴. La présence des groupements méthyle, fucosyle, arabinosyle, acétyle, carbamoyle et sulfate, ainsi que la longueur et l'insaturation de la chaîne grasse sont très variables d'un facteur Nod à un autre. Ils jouent un rôle dans la spécificité d'interaction entre les bactéries et les légumineuses hôtes²⁵, bien que les facteurs Nod soient sécrétés par les rhizobiums sous forme de mélange, dans le but d'élargir le spectre de reconnaissance.

Les gènes *nod* se classent en deux catégories. La première concerne les gènes ubiquitaires chez les rhizobiums, qui sont impliqués dans les caractères communs de facteurs Nod, à savoir la synthèse du squelette saccharidique, et l'acylation. On retrouve *nodC*²⁶ qui code pour une $\beta(1-4)$ -*N*-acétyl-D-glucosaminyltransférase et qui permet donc de synthétiser le squelette chitinoligosaccharidique. Le gène *nodB*²⁷ code, lui, pour une carbohydate estérase qui *N*-désacétyle régiosélectivement le sucre non-réducteur qui sera ensuite acylé par le produit du gène *nodA*²⁸. La mutation de l'un de ces trois gènes supprime la capacité des rhizobiums à synthétiser un LCO. La seconde catégorie regroupe tous les gènes nécessaires à la décoration des facteurs Nod qui joue un rôle dans la spécificité de reconnaissance entre les bactéries fixatrices d'azote et la plante-hôte²⁹ (Figure 9).

Par exemple, chez le symbiote *Sinorhizobium meliloti*, les gènes *nodE* et *nodF* sont impliqués dans la modification de la chaîne grasse, *nodL* dans l'*O*-acétylation et *nodH*, *nodP* et *nodQ* dans la sulfatation du squelette saccharidique.

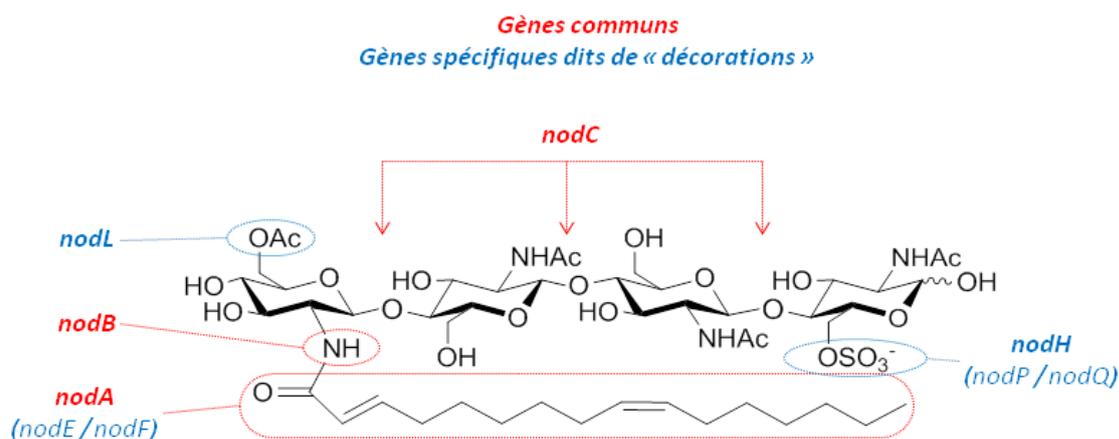


Figure 9. Gènes impliqués dans la biosynthèse de facteurs Nod chez *S. meliloti*.

²⁴ D'Haese, W. and Holsters, M., **2002**, *Glycobiology*, 12, (6), 79R-105R.

²⁵ Dénarié, J., Debellé, F. and Promé, J. C., **1996**, *Annu. Rev. Biochem.*, 65, 503-535.

²⁶ Geremia, R. A., Mergaert, P., Geelen, D., Vanmontagu, M. and Holsters, M., **1994**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 91, (7), 2669-2673.

²⁷ John, M., Rohrig, H., Schmidt, J., Wieneke, U. and Schell, J., **1993**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90, (2), 625-629.

²⁸ Rohrig, H., Schmidt, J., Wieneke, U., Kondorosi, E., Barlier, I., Schell, J. and John, M., **1994**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 91, (8), 3122-3126.

²⁹ Perret, X., Staehelin, C. and Broughton, W. J., **2000**, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64, (1), 180-201.

II.1.2. Facteurs de mycorhization

Glomus intraradices produit également des LCOs. Par rapport aux facteurs Nod, l'élucidation de la structure des facteurs Myc a été plus difficile pour deux raisons majeures : (i) la difficulté à obtenir un mélange sécrété par le champignon et (ii) le fait que ce dernier a besoin de la plante hôte pour achever son cycle de reproduction. La structure des facteurs Myc connus à ce jour est beaucoup plus simple que celle des facteurs Nod. Sur un tétramère ou pentamère d'unités GlcNAc, reliées par des liaisons $\beta(1-4)$, une seule décoration (groupement sulfate sur l'unité réductrice) a été identifiée ; les chaînes grasses fixées sur l'extrémité non-réductrice sont en C16 ou C18 avec une à deux insaturations (Figure 10). Les facteurs Myc sont également sécrétés sous forme de mélange¹², mais le tétramère est très majoritaire (90%).

II.2. Intérêts

L'initiation des phénomènes symbiotiques est portée par les LCOs. L'intérêt qui leur est accordé est donc directement relié aux phénomènes qu'ils engendrent.

II.2.1. Biologique

Les facteurs Nod et facteurs Myc peuvent être actifs à des concentrations aussi faibles que 10^{-13} M et 10^{-11} M, respectivement¹⁹. De très nombreux phénomènes ne sont pas encore compris, tant pour la symbiose fixatrice d'azote, que pour la symbiose endomycorhizienne à arbuscule. Identifier de nouveaux récepteurs et effecteurs afin de mettre à jour de nouvelles voies de signalisation est un immense travail.

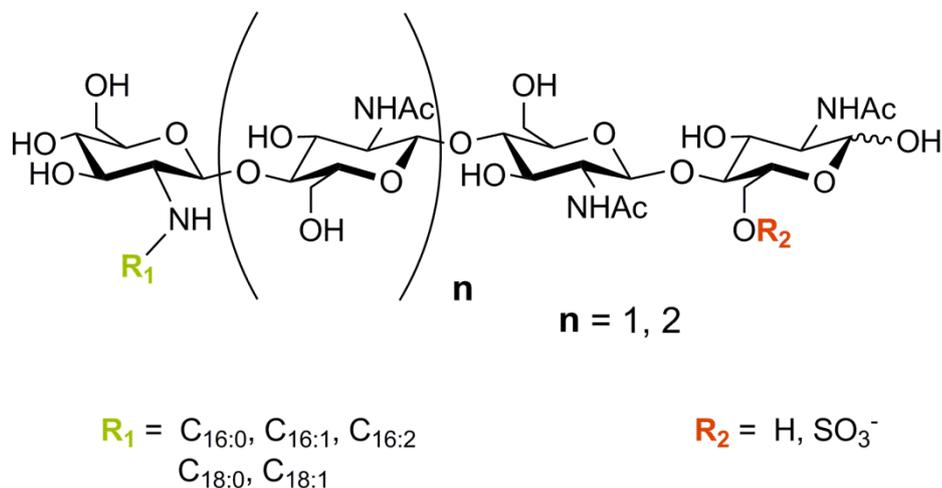


Figure 10. Structure générale des facteurs de mycorhization, d'après Maillet *et al.*¹².

Cela inclut tout particulièrement la compréhension des phénomènes d'interférences entre les voies de signalisation des lipochitinoligosaccharides (facteurs Nod et Myc) et des chitinoligosaccharides (COs). Enfin, et contrairement aux facteurs Nod, les facteurs Myc ont un spectre d'action très large. Afin d'expliquer cette différence observée, il est possible que ces uniques structures récemment mises en évidence ne suffisent pas pour déclencher seules les symbioses, et que d'autres molécules secrétées par les champignons mycorhiziens complètent les exsudats du micro-organisme (autres LCOs ? COs ?).

II.2.2. Agronomique

Le coût annuel estimé des engrais azotés synthétiques atteint cent milliards de dollars. Cette somme tient compte de la production, de l'épandage et des efforts de dépollution à fournir³⁰. D'un autre côté, on estime maintenant que les symbioses azotées sont capables de fixer entre 75 et 300 kg d'azote par hectare et par an. L'impact de ces symbioses sur l'assimilation des composés azotés est donc considérable. Cette capacité est tellement marquée que les Fabacées jouent un rôle dans la rotation des cultures. Une fois récoltées, elles laissent des sols enrichis en sels d'ammonium, lesquels sont exploités, par exemple, pour les céréales qui sont incapables de fixer naturellement l'azote. Des brevets ont été déposés afin d'en favoriser l'exploitation industrielle et trois millions d'hectares sont actuellement traités en Europe, en Amérique du Nord et en Amérique du Sud par des inoculas enrichis en LCOs, afin de favoriser l'apparition de ces symbioses. Enfin, les légumineuses sont des plantes riches en protéines, largement présentes dans l'alimentation³¹.

La symbiose endomycorhizienne à arbuscule possède elle aussi un rôle agronomique important, du fait du large spectre de plantes qu'elle couvre. Les angiospermes, par exemple, représentent une part importante de notre alimentation (fruits, céréales), et sont exploitées industriellement comme matières premières avec les Euphorbiacées (Hévéa), ou bien encore les fibres textiles (coton et lin). Les gymnospermes sont principalement des conifères. Leur importance en qualité de matériaux de construction (bois) ou d'énergie (chauffage) en fait également des végétaux largement exploités. Par ailleurs, les végétaux qui ont développé cette symbiose ont des capacités de résistance accrues au stress hydrique, et peuvent se développer sur des sols pauvres en nutriments, particulièrement en phosphate.

II.2.3. Fixation de l'azote chez les non-légumineuses

Une des perspectives les plus excitantes de la symbiose *Rhizobium* – légumineuses serait de

³⁰ Beatty, P. H. and Good, A. G., **2011**, *Science*, 333, (6041), 416-417.

³¹ Graham, P. H. and Vance, C. P., **2003**, *Plant Physiol.*, 131, (3), 872-877.

pouvoir transférer cette association aux non-légumineuses, particulièrement aux céréales telles que le maïs, le blé ou le riz. Différentes approches sont retenues pour cela³² (Figure 11).

La première idée consiste à rendre les non-légumineuses capables de « noduler ». En travaillant à la compréhension de la voie commune symbiotique, adapter la symbiose fixatrice d'azote aux non-légumineuses devient une perspective envisageable. Les progrès réalisés dans la compréhension des phénomènes biochimiques des symbioses avec (i) la résolution de la structure des facteurs Myc, de même nature que les facteurs Nod et (ii) la récente mise en évidence de la sensibilité des non-légumineuses aux facteurs Nod les ont rapprochées.

En effet, il était établi que les non-légumineuses n'avaient pas la possibilité de répondre aux facteurs de nodulation. Cependant, des travaux récents³³ ont montré qu'*Arabidopsis thaliana*, le maïs et la tomate sont sensibles aux facteurs Nod. On observe une diminution importante de la réponse immunitaire chez ces plantes traitées par des facteurs Nod issus de *Bradyrhizobium japonicum* (le symbiote du soja). Cette réaction indique que la plante accepte le « symbiote » en abaissant ses défenses.

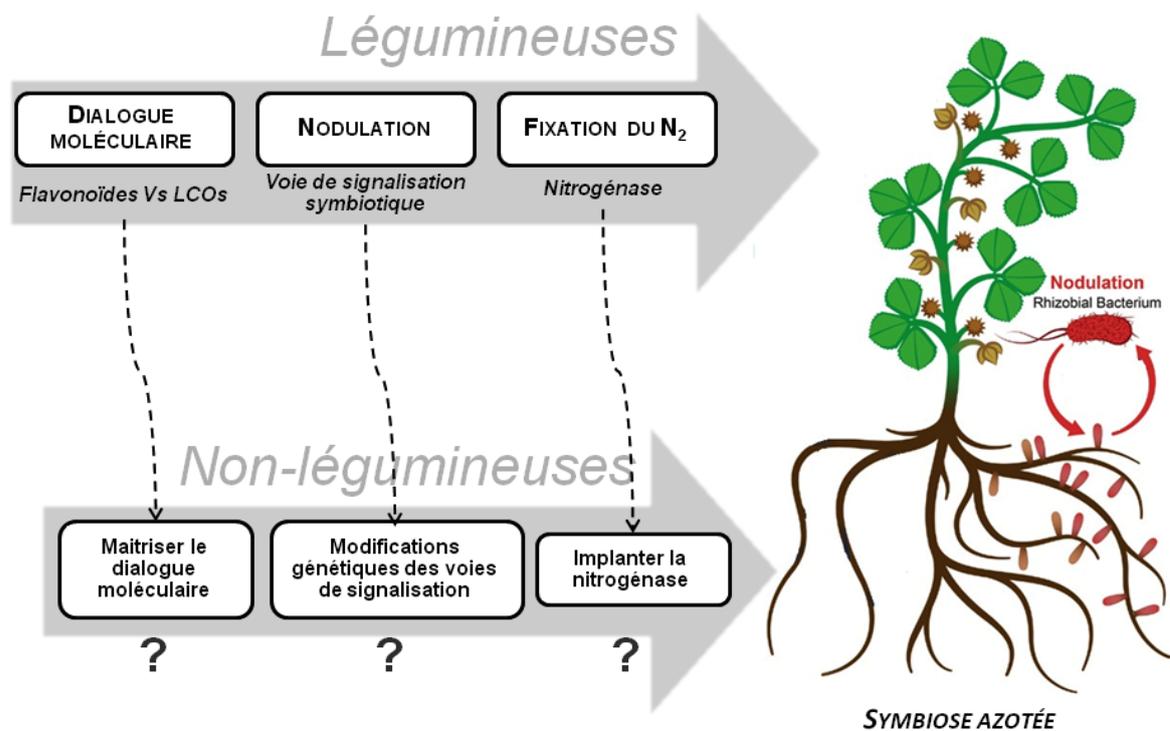


Figure 11. Hypothèses étudiées pour fixer l'azote chez les non-légumineuses.

³² Oldroyd, G. E. D. and Dixon, R., **2014**, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 26, 19-24.

³³ Liang, Y., Cao, Y. R., Tanaka, K., Thibivilliers, S., Wan, J. R., Choi, J., Kang, C. H., Qiu, J. and Stacey, G., **2013**, *Science*, 341, (6152), 1384-1387.

Dans la même étude, il est à noter que les oligomères de chitine avec un degré de polymérisation (DP) de quatre (CO-IV) induisent également une diminution de la réponse immunitaire. Cela confirmerait que les COs jouent un rôle dans l'établissement des symbioses et pas uniquement dans des mécanismes de défense²³. Enfin, *Arabidopsis thaliana* n'est pas une plante sensible aux symbioses telles que décrites ici. Il est donc supposé qu'une voie indépendante à la voie commune symbiotique existe. Elle pourrait la précéder dans l'évolution et ainsi être ubiquitaire chez les végétaux. D'immenses promesses découlent de ces travaux et confirment l'importance des LCOs, justifiant la poursuite des études nécessaires à la compréhension de ces mécanismes.

S'il s'avérait impossible de pouvoir contrôler le dialogue moléculaire déclenchant les entrées en symbiose, la seconde idée serait de transférer génétiquement les composants spécifiques de la voie de signalisation de la symbiose fixatrice d'azote chez les non-légumineuses. Il faudrait alors non seulement déclencher les mécanismes de reconnaissance entre les symbiotes à l'aide de facteurs Nod mais aussi initier les processus de la nodulation qui sont l'infection et l'organogénèse de la nodosité. Enfin, l'assurance que la nitrogénase des rhizobiums fonctionne correctement au sein de la plante, avec un environnement dépourvu d'oxygène est indispensable.

La dernière voie envisagée serait de modifier génétiquement les plantes pour qu'elles expriment la série de gènes impliqués dans la fixation du diazote atmosphérique (gènes *nif*), avec notamment la nitrogénase, enzyme responsable de la réduction du diazote en ammoniac. La réalisation de cet objectif nécessite l'ingénierie de la nitrogénase chez la plante, ainsi que des cofacteurs nécessaires à son activité. Il faudrait également identifier une localisation subcellulaire compatible avec le fort besoin en ATP indispensable à son fonctionnement. La mitochondrie et le chloroplaste sont des organites candidats. Cependant, ce dernier est le lieu de production de l'oxygène par la photosynthèse, il semble donc peu adapté au fonctionnement anaérobie de la nitrogénase. La mitochondrie serait le compartiment d'expression privilégié de la nitrogénase, et la série des gènes *nif* serait intégrée au génome de la plante. Le niveau de complexité de cette dernière approche est supérieur aux autres³⁰.

Ces trois perspectives offriront des résultats à plus ou moins long terme et l'un des premiers leviers à la compréhension de ces voies reste l'accès aux LCOs, point de départ de l'étude de tous les processus biologiques aval.

III. Voies d'accès aux lipochitinoligosaccharides

III.1. Extraction naturelle

La voie la plus rapide pour obtenir les LCOs est de les isoler directement à partir du milieu de culture où ils sont sécrétés. De par leur caractère amphiphile, les facteurs Nod ont été extraits soit par extraction liquide/liquide soit par extraction solide/liquide. Cette technique a permis les premières caractérisations de facteurs Nod⁸. Mais elle reste peu adaptée pour étudier les voies de signalisation déclenchées par les LCOs et étudier biochimiquement les processus mis en jeu. En effet, les facteurs Nod sont produits en infimes quantités par les rhizobiums, et sous forme de mélange. Il n'est donc pas aisé de réussir à les isoler et les purifier.

III.2. Synthèse chimique totale

Dès l'identification des premières structures de facteur de nodulation au début des années 1990, de nombreux groupes se sont intéressés à leur synthèse chimique. La première synthèse totale a été publiée à peine deux ans après la découverte de la structure des facteurs Nod³⁴. Deux structures particulièrement complexes et représentant un réel challenge synthétique ont retenu l'attention, NodSm-IV (C_{16:2}, Ac, S)³⁴⁻³⁵⁻³⁶ sécrété par *Sinorhizobium meliloti* pour la symbiose avec la luzerne (*Medicago sativa*) et NodBj-V (C_{18:1}, Fuc)^{37,38} produit par *Bradyrhizobium japonicum* et qui intervient dans la symbiose avec le soja (Figure 12).

Les synthèses chimiques totales de ces oligosaccharides sont difficiles étant donné le nombre de groupements hydroxyles présents sur le squelette lors de la fixation d'une décoration ou bien encore le nombre de groupements NHAc (équivalent au DP) pour fixer la partie lipidique, ce qui exclut l'utilisation d'un simple oligomère de chitine comme synthon de départ. La stratégie commune de l'ensemble de ces synthèses nécessite d'utiliser la N-acétylglucosamine comme synthon de départ, de la transformer en différents monomères aptes à réagir comme donneur ou accepteur de glycosylation et convenablement protégés pour permettre l'introduction régiosélective des différents substituants (acétyle, chaîne grasse, sulfate, fucosyle...).

³⁴ Nicolaou, K. C., Bockovich, N. J., Carcanague, D. R., Hummel, C. W. and Even, L. F., **1992**, *J. Am. Chem. Soc.*, 114, (22), 8701-8702.

³⁵ Wang, L. X., Li, C., Wang, Q. W. and Hui, Y. Z., **1993**, *Tetrahedron Lett.*, 34, (48), 7763-7766.

³⁶ Tailler, D., Jacquinet, J. C. and Beau, J. M., **1994**, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, (16), 1827-1828.

³⁷ Ikeshita, S., Nakahara, Y. and Ogawa, T., **1994**, *Glycoconj. J.*, 11, (3), 257-261.

³⁸ Debenham, J. S., Rodebaugh, R. and Fraser-Reid, B., **1996**, *J. Org. Chem.*, 61, (19), 6478-6479.

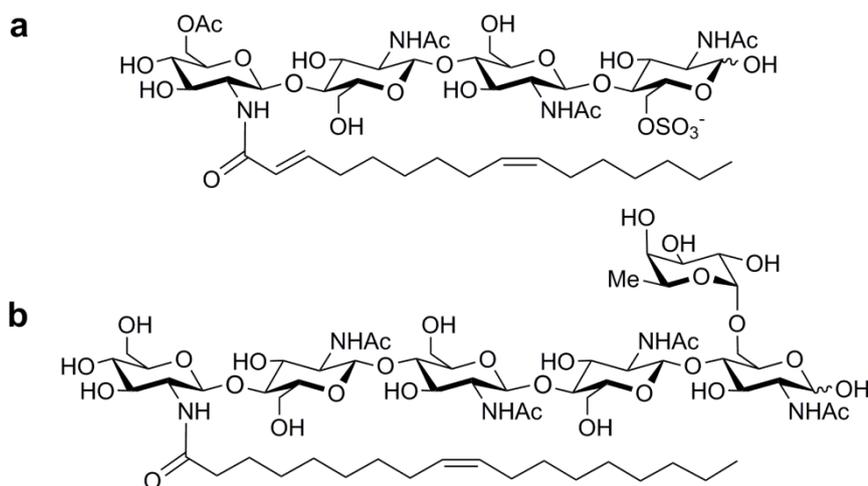


Figure 12. Facteurs de nodulation ciblés lors des synthèses chimiques totales.

(a) NodSm-IV (C_{16:2}, Ac, S) (b) NodBj-V (C_{18:1}, Fuc).

De nombreuses étapes de protection et de déprotection sont donc nécessaires, ce qui rend ce type d'approche particulièrement fastidieuse et coûteuse et donc peu adaptée à des synthèses à plus grande échelle. Une première synthèse chimique totale d'un facteur Myc a également été décrite³⁹ après la découverte de leur structure.

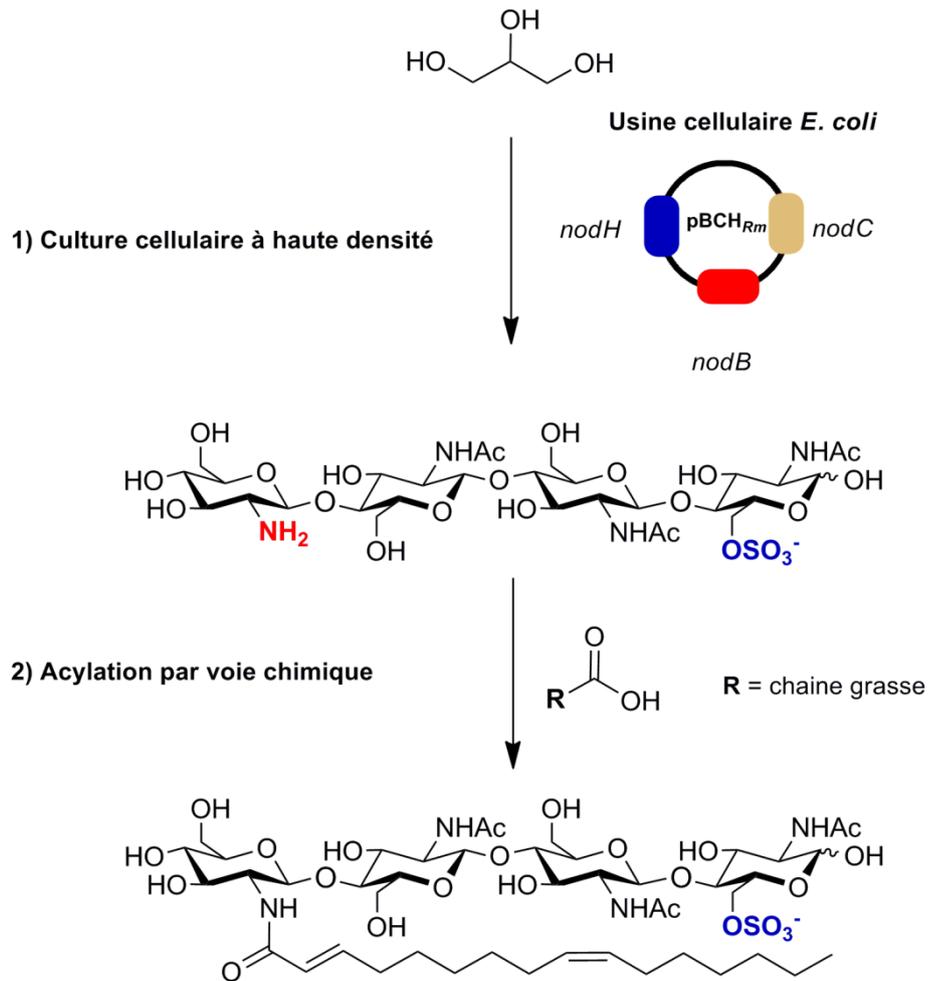
III.3. Synthèse biotechnologique : l'usine cellulaire

L'usine cellulaire constitue une approche biotechnologique permettant la synthèse d'oligosaccharides *in vivo*. En utilisant des souches d'*E. coli* génétiquement modifiées, la machinerie cellulaire peut être détournée vers la synthèse de précurseurs de LCOs, avec le glycérol comme source de carbone (Figure 13). Les précurseurs obtenus, une fois purifiés, peuvent être acylés par voie chimique et conduire aux LCOs. Cette méthodologie de synthèse met ainsi en œuvre seulement deux étapes, ce qui constitue un grand progrès par rapport aux approches de synthèse totale.

L'intérêt de cette approche se trouve dans l'utilisation des enzymes responsables de la biosynthèse des LCOs. La première étape consiste à surexprimer la *N*-acétylglucosaminyltransférase NodC responsable de la synthèse du squelette saccharidique. Deux glycosyltransférases ont été utilisées, l'une issue de *Sinorhizobium meliloti* qui produit majoritairement du chitintétraose (CO-IV)⁴⁰ et l'autre d'*Azorhizobium cauldronans*, qui produit majoritairement du chitinpentaose (CO-V)²⁶.

³⁹ Gillard, L., Stevenin, A., Schmitz-Afonso, I., Vauzeilles, B., Boyer, F. D. and Beau, J. M., **2013**, *Eur. J. Org. Chem.*, 2013, (32), 7382-7390.

⁴⁰ Schultze, M., Quicletsire, B., Kondorosi, E., Virelizier, H., Glushka, J. N., Endre, G., Gero, S. D. and Kondorosi, A., **1992**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 89, (1), 192-196.

Figure 13. Synthèse de NodSm-IV (C_{16:2}, S).

Le donneur de ces enzymes est un nucléotide sucre (UDP-GlcNAc) naturellement présent chez la bactérie car il entre dans les processus de biosynthèse du peptidoglycane de la paroi bactérienne. Il y a donc un réservoir endogène de nucléotide sucre. Dans un second temps, le squelette saccharidique formé est régiosélectivement *N*-désacétylé par NodB (*Sinorhizobium meliloti*)²⁷ à l'extrémité non-réductrice, ce qui conduit à un premier niveau de précurseur de LCOs⁴¹.

D'autres enzymes impliquées dans les décorations du squelette chitinoligosaccharidique peuvent être surexprimées pour fournir des précurseurs de LCOs plus élaborés. Parmi elles, NodH (*Sinorhizobium meliloti*) qui est responsable de la sulfatation⁴². Elle catalyse le transfert d'un groupement sulfate du 3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate (PAPS) sur le

⁴¹ Samain, E., Drouillard, S., Heyraud, A., Driguez, H. and Geremia, R. A., **1997**, *Carbohydr. Res.*, 302, (1-2), 35-42.

⁴² Schultze, M., Staehelin, C., Rohrig, H., John, M., Schmidt, J., Kondorosi, E., Schell, J. and Kondorosi, A., **1995**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 92, (7), 2706-2709.

O-6 de l'extrémité réductrice. Le PAPS est également naturellement présent chez *E. coli*, ce qui signifie que tout comme la synthèse du squelette saccharidique, la machinerie cellulaire va pouvoir être détournée à des fins de synthèse de chitinoligosaccharides sulfatés (Figure 14). L'ensemble des gènes responsables de ces biosynthèses est porté par une combinaison de un à trois plasmides différents au sein de la bactérie. Au final, une huitaine de molécules précurseur est ainsi produite grâce à ces cultures à haute densité avec des rendements de synthèse permettant leur exploitation à l'échelle préparative (entre 0,2 et 2 g/L de culture)⁴³. La seconde étape de synthèse est une acylation par voie chimique⁴⁴.

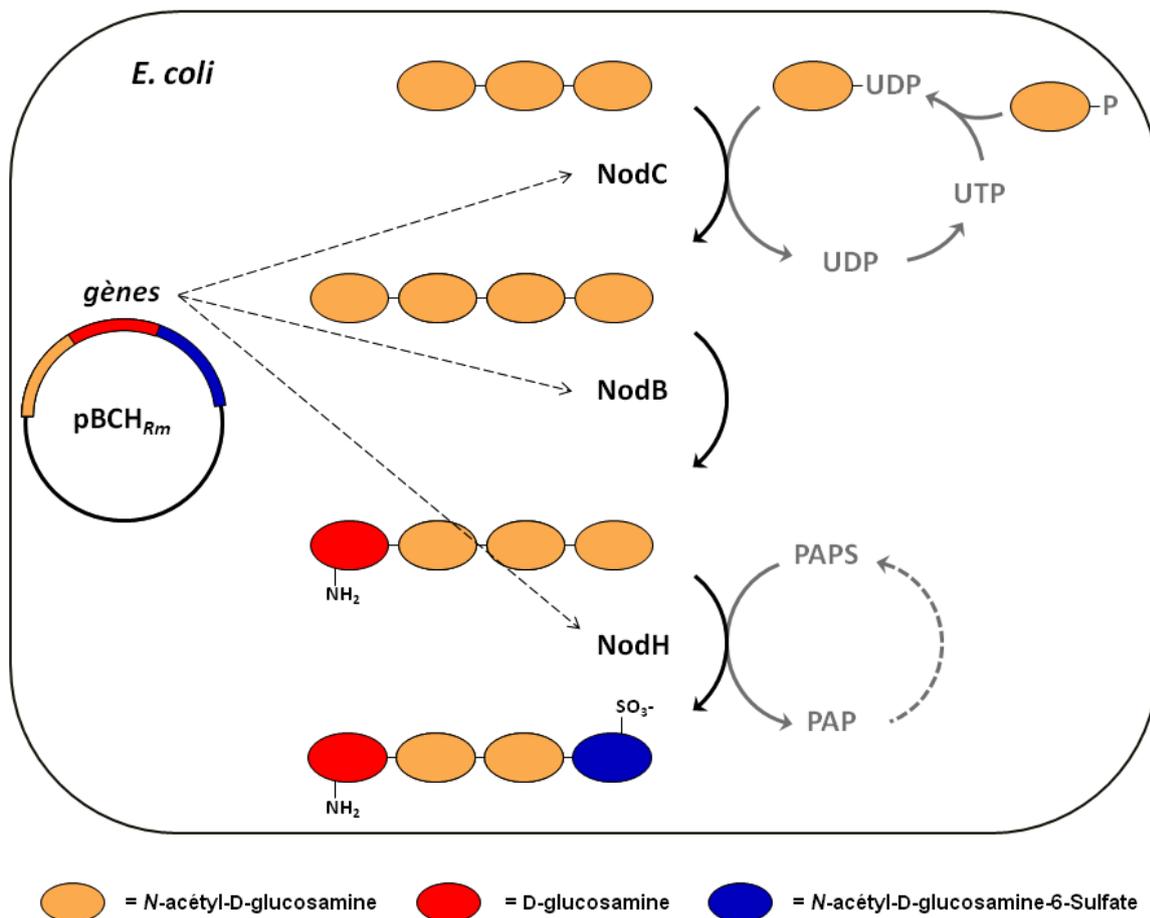


Figure 14. Principe de l'usine cellulaire pour la synthèse de précurseurs de LCOs.

⁴³ Geremia, R. A., Samain, E., Ernst, B., Hart, G. W. and Sinaý, P., **2008**, *Carbohydrates in Chemistry and Biology*, Wiley-VCH Verlag GmbH: 845-860.

⁴⁴ Rasmussen, M. O., Hogg, B., Bono, J. J., Samain, E. and Driguez, H., **2004**, *Org. Biomol. Chem.*, 2, (13), 1908-1910.

Cependant, ce procédé, utilisant les voies de biosynthèse naturelles des facteurs de nodulation, rend complexe la purification des oligosaccharides. La synthèse des COs étant cytoplasmique, ils s'accumulent au cours de la culture au sein des bactéries, et il faut donc les isoler à partir d'un mélange complexe de biomolécules. De plus, ce sont très souvent des mélanges de COs et précurseurs de LCOs qui sont obtenus, NodC produisant naturellement un mélange d'oligomères de tailles variées. Plusieurs oligomères (généralement chitintétra- et pentaose), plus ou moins décorés, doivent ainsi être isolés les uns des autres, ce qui complexifie les étapes de purification.

III.4. Analogues de lipochitinoligosaccharides

En plus de synthèses délicates, les processus biologiques engendrés par l'action des LCOs restent encore mal compris. Afin de simplifier les synthèses et/ou d'identifier les rôles des composants structuraux des LCOs, des séries d'analogues ont été synthétisées.

III.4.1. Squelette saccharidique

Etrangement, un LCO issu de *Rhizobium fredii* possède une unité glucose (Glc) à la place d'une unité *N*-acétylglucosamine au sein du squelette saccharidique (Figure 15)⁴⁵. Une première étude impliquant des analogues de COs synthétiques, a été réalisée⁴⁶ en utilisant des charpentes saccharidiques comportant une ou deux unités D-glucosyle (Figure 16). Le CO présentant une unité glucosyle induit une réponse biologique du système immunitaire chez la plante équivalente au chitintétraose, alors que l'analogue présentant deux unités glucosyle ne possède aucune activité.

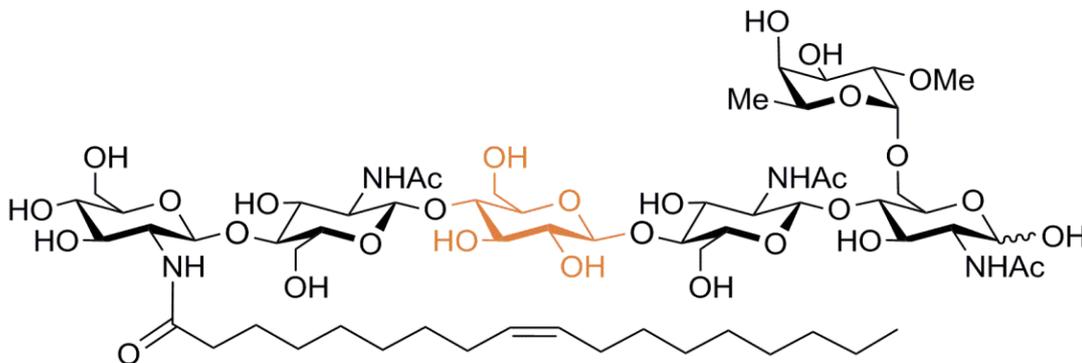


Figure 15. Structure du facteur Nod de *Rhizobium fredii* NodRf-V-Glc (C_{18:1}, MeFuc)⁴⁵.

⁴⁵ Bec-Ferté, M.-P., Krishnan, H. B., Savagnac, A., Pueppke, S. G. and Promé, J. C., **1996**, *FEBS Lett.*, 393, (2-3), 273-279.

⁴⁶ Robina, I., Gomez-Bujedo, S., Fernandez-Bolanos, J. G., Fuentes, J. and Spaink, H. P., **2002**, *Tetrahedron*, 58, (3), 521-530.

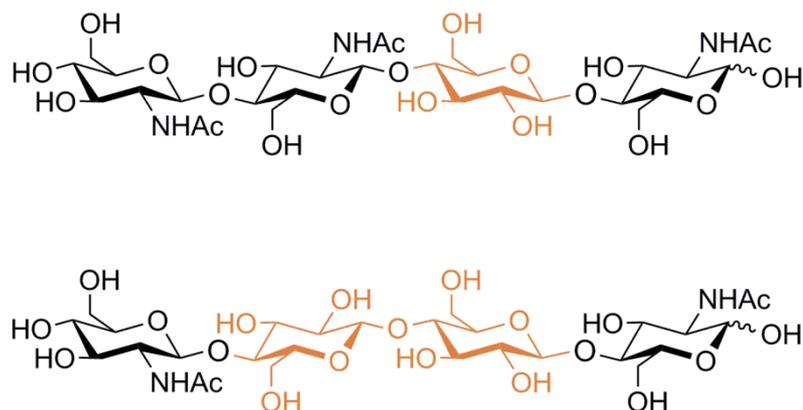


Figure 16. Structures des analogues de COs possédant des unités D-glucosyles, d'après Robina *et al.*⁴⁶.

La nature chitinique du squelette saccharidique semble donc jouer un rôle dans les propriétés biologiques et/ou physicochimiques (interaction avec les récepteurs, solubilité...) des COs. Un analogue de LCOs dans lequel le glucose remplace la *N*-acétylglucosamine sur les unités non acylées (squelette "cellodextrine") a également été synthétisé⁴⁷ (Figure 17). L'intérêt de cette approche chimio-enzymatique est l'obtention d'analogues en seulement 3 étapes de synthèse. De plus, les cellodextrines étant des éliciteurs⁴⁸, il est légitime de penser qu'un LCO à squelette cellodextrine puisse être un bon candidat pour une activité biologique. Des tests d'activité sont en cours.

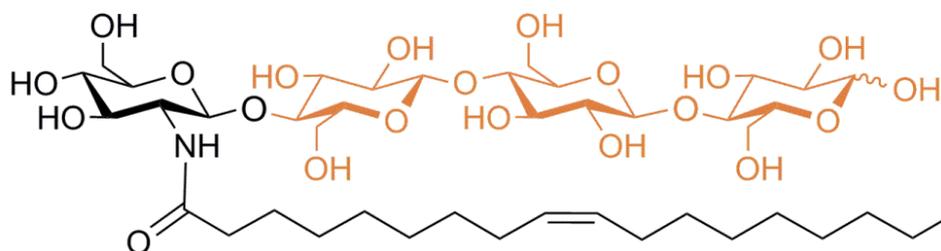


Figure 17. Analogue de LCO GlcNH(C_{18:1}) – (Glc)₃, d'après Claisse et Fort⁴⁷.

⁴⁷ Claisse, N. *Préparation et modification d'oligosaccharides de cellulose par chimie douce bio-inspirée*. Université Joseph Fourier, Grenoble, **2012**.

⁴⁸ Shibuya, N. and Minami, E., **2001**, *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 59, (5), 223-233.

III.4.2. Chaîne grasse

Une série d'analogues de facteurs Nod a été construite avec des chaînes grasses non naturelles⁴⁹ à partir de COs issus de l'usine cellulaire (Figure 18). La synthèse de ces LCOs est plus facilement accessible car elle utilise des précurseurs commerciaux pour l'analogie de la chaîne grasse.

Un cycle aromatique stabilise la liaison amide et remplace une insaturation de la chaîne grasse. Sa présence peut également être mise à profit pour introduire un groupement photoactivable utile dans l'identification de nouveaux récepteurs chez la plante⁵⁰.

Ces analogues ont montré une activité biologique chez la luzerne, le partenaire naturel du symbiote *S. meliloti*⁵¹. D'autres tests biologiques sont en cours sur différentes espèces de légumineuses. Ces LCOs modifiés sur la chaîne grasse présentent donc un intérêt pour des études biologiques mais possèdent également un potentiel d'exploitation industrielle.

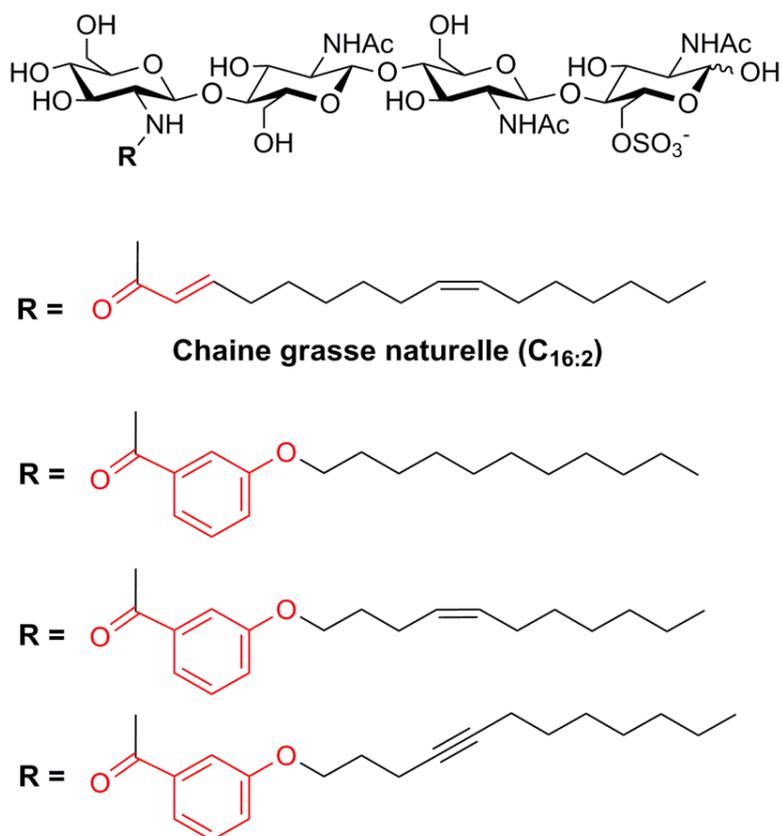


Figure 18. Facteurs NodSm-IV (S) comportant des chaînes grasses non naturelles, adapté de Beau *et al.*⁵².

⁴⁹ Grenouillat, N., Vauzeilles, B., Bono, J. J., Samain, E. and Beau, J. M., **2004**, *Angew. Chem. Int. Edit.*, 43, (35), 4644-4646.

⁵⁰ Fliegmann, J., *et al.*, **2013**, *ACS Chem. Biol.*, 8, (9), 1900-1906.

⁵¹ Beau, J. M., Denarie, J., Greiner, A., Grenouillat, N., Maillet, F. and Vauzeilles, B. CT/EP Patent Appl. No. PCT/EP2004/014909, **2004** ; WO Patent Appl. No. WO2005/063784, **2005**.

⁵² Beau, J. M., **2011**, *Chimia*, 65, (1-2), 45-48.

III.4.3. Liaisons glycosidiques

Les facteurs de nodulation sont sensibles aux chitinases présentes dans les racines des plantes²⁴. Des questions se posent sur le rôle que peut jouer cette dégradation dans la signalisation et la réponse de l'hôte. Un analogue de CO non hydrolysable a été synthétisé⁵³, avec des liaisons thioglycosidiques remplaçant les liaisons *O*-glycosidiques du squelette naturel, afin de le rendre résistant aux hydrolyses enzymatiques. Le thiooligomère a ensuite été modifié par les enzymes NodB, NodA et NodH de *S. meliloti* (Figure 19)⁵⁴. Cependant, l'acylation ayant été réalisée à l'aide de bactéries rhizobiums perméabilisées, l'analyse précise du produit final au sein d'un mélange complexe est impossible. La nature de la chaîne grasse fixée est ainsi indéterminée, et les tests biologiques préliminaires sont rendus complexes par le bruit de fond dû à la présence d'activités parasites.

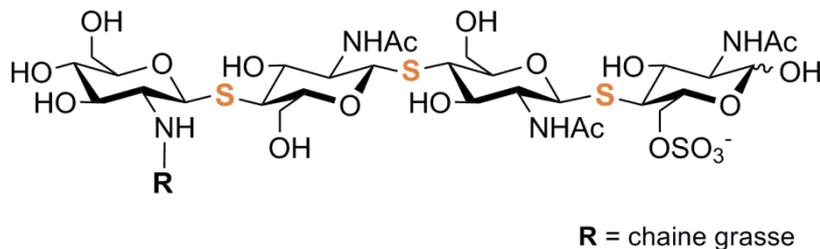


Figure 19. Structure d'un thiochitintétraose, d'après Southwick *et al.*⁵⁴.

⁵³ Wang, L. X. and Lee, Y. C., **1996**, *J. Chem. Soc.-Perkin Trans. 1*, (6), 581-591.

⁵⁴ Southwick, A. M., Wang, L. X., Long, S. R. and Lee, Y. C., **2002**, *J. Bacteriol.*, 184, (14), 4039-4043.

IV. Objectifs

Si les activités biologiques des lipochitinoligosaccharides sont parfaitement reconnues, leur mode d'action reste encore à éclaircir, ce qui nécessite de disposer de molécules pures aux structures chimiques parfaitement contrôlées. La production d'oligomères de la chitine nécessite originellement la mise en œuvre d'une chimie fastidieuse, et l'usine cellulaire constitue une alternative ouvrant l'accès à une production à l'échelle préparative de précurseurs de LCOs naturels.

Le but de ce travail est de mettre au point de nouveaux outils enzymatiques permettant la production de lipochitinoligosaccharides naturels ou non, purs, de taille et de degré d'acétylation parfaitement contrôlés, et convenablement substitués par des groupements variés que l'on retrouve chez les LCOs naturels. L'ensemble des molécules obtenues constituerait une bibliothèque unique en vue d'études de relation structure-activité biologique.

Pour cela, nous chercherons à produire des enzymes recombinantes impliquées ou non dans la biosynthèse des LCOs, et à utiliser leur activité afin de générer une panoplie de LCOs de structure moléculaire parfaitement définie à partir d'oligomères de chitine issus de la biomasse (Figure 20).

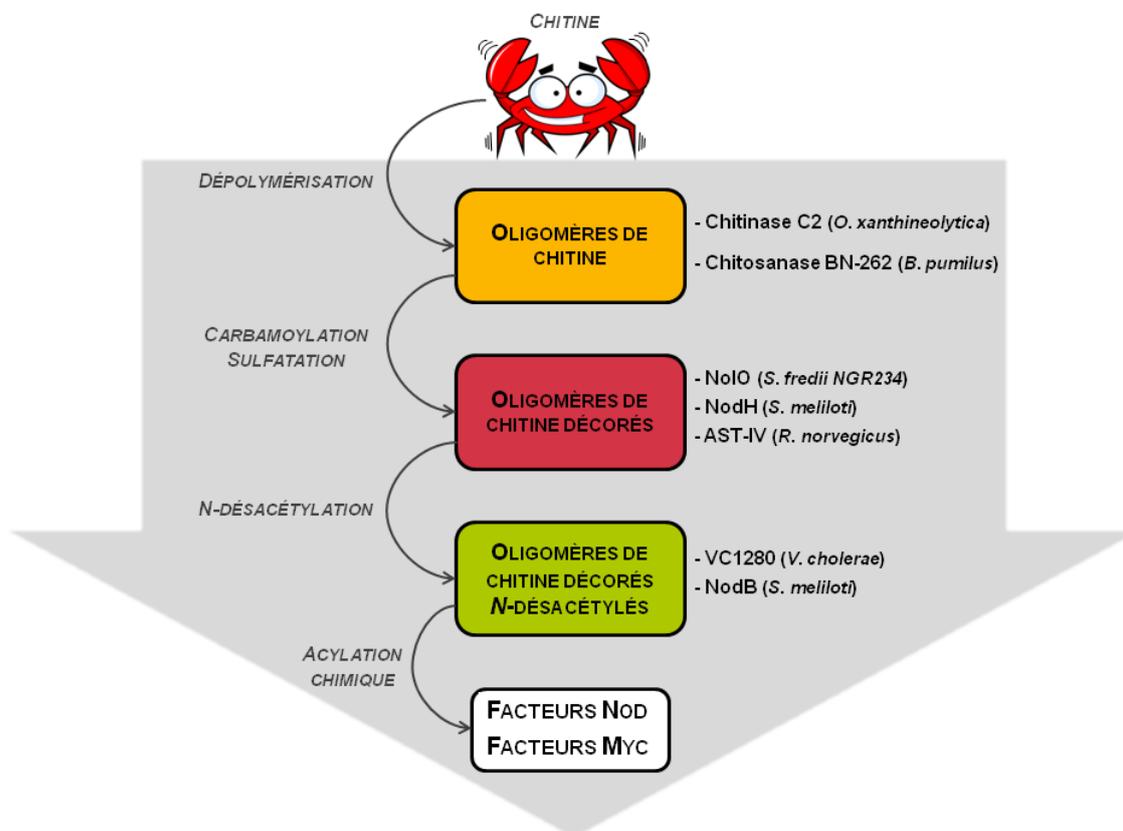


Figure 20. Stratégie de voie d'accès aux lipochitinoligosaccharides.

Les substitutions étudiées seront la carbamoylation de l'unité GlcNAc non-réductrice et la sulfatation de l'unité réductrice. Les outils enzymatiques envisagés seront la carbamoyltransférase Nolo (*Sinorhizobium fredii* NGR234), la sulfotransférase NodH (*Sinorhizobium meliloti*) et l'aryl sulfotransférase IV (AST-IV) de rat. L'introduction de la chaîne grasse nécessitera la mise au point d'une méthodologie de *N*-désacétylation régiosélective catalysée par les chitine *N*-désacétylases VC1280 (*Vibrio cholerae*) et NodB (*Sinorhizobium meliloti*).

CHAPITRE II

MATERIELS ET METHODES

I.	Techniques de biologie moléculaire	71
I.1.	Souches et plasmides.....	71
I.2.	Clonage des gènes	76
I.2.1.	Méthodologie	76
I.2.2.	Clonage de NoLO (<i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234A).....	77
I.2.3.	Clonage de l'Aryl sulfotransférase IV (<i>Rattus norvegicus</i>)	77
I.2.4.	Clonage de NodH (<i>Sinorhizobium meliloti</i>).....	77
I.2.5.	Clonage de VC1280 (<i>Vibrio cholerae</i>)	77
I.2.6.	Clonage de NodB (<i>Sinorhizobium meliloti</i>)	77
I.3.	Préparation des bactéries compétentes et transformation.....	78
II.	Expression des protéines sous forme recombinante	79
II.1.	Expression chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	79
II.1.1.	Transformation	79
II.1.2.	Expression.....	79
II.2.	Expression chez <i>Pichia pastoris</i>	80
II.2.1.	Transformation	80
II.2.2.	Expression.....	80
II.3.	Expression chez <i>Escherichia coli</i>	80
III.	Techniques de biochimie.....	82
III.1.	Préparation des fractions cytosoliques.....	82
III.2.	Préparation des fractions périplasmiques.....	82
III.3.	Purification sur résine de nickel	82
III.4.	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS	83
III.5.	Tests d'activité des enzymes	83
III.5.1.	Tests d'activité de la chitinase C2 (<i>O.xanthineolytica</i>).....	83
III.5.2.	Tests d'activité de NoLO (<i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234).....	84
III.6.	Dosage des activités chitine N-désacétylases.....	84
III.6.1.	Chitine N-désacétylase VC1280 (<i>Vibrio cholerae</i>).....	84
III.6.2.	Chitine N-désacétylase NodB (<i>Sinorhizobium meliloti</i>).....	84
III.6.3.	Dosage des amines libres.....	85

IV. Préparation des Substrats.....	86
IV.1. Préparation de la chitine colloïdale.....	86
IV.2. Préparation des oligomères de chitine	86
V. Purification des oligomères de chitine <i>N</i>-désacétylés (COs-(N))	88
V.1. Procédé VC1280	88
V.2. Procédé NodB	88
VI. Techniques chromatographiques.....	90
VI.1. Chromatographie sur couche mince de silice.....	90
VI.2. Chromatographie d'exclusion stérique.....	90
VI.3. Chromatographie en phase liquide haute performance	90
VII. Techniques physico-chimiques	91
VII.1. Spectrométrie de masse.....	91
VII.2. Résonance magnétique nucléaire (RMN).....	91

I. Techniques de biologie moléculaire

I.1. Souches et plasmides

Les souches utilisées pour les clonages et pour l'expression de protéines recombinantes sont regroupées dans le Tableau 1.

Souches	Caractéristiques	Référence
Clonage		
<i>Escherichia coli</i> TOP10	Souche utilisée pour les clonages et la propagation des plasmides. Permet un nombre élevé de copies des plasmides.	Life technologies
Expression chez la levure		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> EBY100	Système d'expression eucaryote, capable de réaliser des modifications post-traductionnelles telles que la <i>N</i> - et la <i>O</i> -glycosylation, la phosphorylation et la formation des ponts disulfures.	Invitrogen
<i>Pichia pastoris</i> GS115	Système d'expression eucaryote, capable de réaliser des modifications post-traductionnelles comme la <i>N</i> - et la <i>O</i> -glycosylation, la phosphorylation et la formation des ponts disulfures. Cette levure est méthylotrophique, c'est-à-dire capable de métaboliser le méthanol comme seule source de carbone.	Life technologies
Expression chez la bactérie		
<i>Escherichia coli</i> BL21	Souche de référence pour l'expression de protéines recombinantes, déficiente en protéases OmpT et Lon. La désignation (DE3) signifie que la souche porte une copie chromosomale du gène de l'ARN polymérase T7 sous le contrôle du promoteur <i>lacUV5</i> et donc inductible à l'IPTG.	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> BL21 plysS	Souche portant le plasmide pLysS, et de ce fait résistante au chloramphénicol. L'expression basale de la protéine recombinante est limitée grâce à une inhibition de l'expression basale de l'ARN polymérase T7 par le lysozyme T7.	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> BL21 STAR	La stabilité des ARNm est augmentée grâce à la mutation <i>rne131</i> de la RNase E. Peu adaptée à l'expression des gènes toxiques, car elle possède une plus forte expression basale que la BL21.	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> BL21 Rosetta	Porte le plasmide pRARE, et donc une résistance au chloramphénicol. Ce plasmide code pour des ARNt rares chez <i>E. coli</i> , permettant d'augmenter le niveau d'expression pour des gènes non optimisés chez <i>E. coli</i> .	Novagen

Tableau 1. Caractéristiques des souches utilisées dans l'étude.

Les différentes souches d'*E. coli* utilisées pour l'expression recombinante de protéines dérivent de la BL21 (DE3)⁵⁵. Ces souches sont capables d'accumuler en grande quantité des protéines exprimées par induction à l'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG).

Les plasmides utilisés pour les clonages et pour l'expression des protéines sont regroupés dans le Tableau 2. Les différents plasmides pET sont utilisés comme plasmides d'expression chez *E. coli*. Ils possèdent le promoteur du phage T7 inductible à l'IPTG pour réguler l'expression des protéines recombinantes (Novagen).

Plasmide	Résistance	Caractéristiques	Référence
Clonage			
pCR4Blunt-TOPO	Amp / Kan	Plasmide utilisé comme vecteur de sous-clonage, bien adapté pour le séquençage et utilisé pour la ligation des produits PCR.	Invitrogen (Figure 21)
Expression chez la levure			
pESC-Leu	Amp	L'expression du gène cloné dans ce plasmide est sous le contrôle de promoteurs <i>GAL</i> , inductibles au galactose. Il possède un marqueur d'auxotrophie à la leucine (LEU2).	Agilent Technologies (Figure 22)
pPICZ α A	Zéocine	L'expression du gène cloné dans ce plasmide est sous le contrôle du promoteur AOX1 inductible au méthanol. Le facteur α permet la sécrétion dans le milieu de culture de la protéine, exprimée avec une étiquette poly-histidine (poly-His) en C-terminale.	Invitrogen (Figure 23)
Expression chez la bactérie			
pET20b(+)	Amp	La protéine peut être exprimée chez <i>E. coli</i> au sein du périplasma (grâce à la séquence pelB leader en N-terminale) et avec une étiquette poly-His en C-terminale.	Novagen (Figure 24)
pET21d(+)	Amp	La protéine peut être exprimée chez <i>E. coli</i> au sein du cytoplasme avec une étiquette poly-His en C-terminale et une étiquette T7 en N-terminale.	Novagen (Figure 25)
pET26b(+)	Kan	La protéine peut être exprimée chez <i>E. coli</i> au sein du périplasma (grâce à la séquence pelB leader en N-terminale) et avec une étiquette poly-His en C-terminale.	Novagen (Figure 26)
pET28a(+)	Kan	La protéine peut être exprimée chez <i>E. coli</i> au sein du cytoplasme avec une étiquette poly-His en N et C-terminale et une étiquette T7 en N-terminale.	Novagen (Figure 27)
pET32a(+)	Amp	La protéine peut être exprimée chez <i>E. coli</i> au sein du cytoplasme en fusion avec la thioredoxine. Une séquence poly-His relie les deux protéines en fusion et une étiquette poly-His supplémentaire est présente en C-terminale.	Novagen (Figure 28)

Tableau 2. Caractéristiques des plasmides utilisés dans l'étude.

⁵⁵ Studier, F. W. and Moffatt, B. A., 1986, *J. Mol. Biol.*, 189, (1), 113-130.

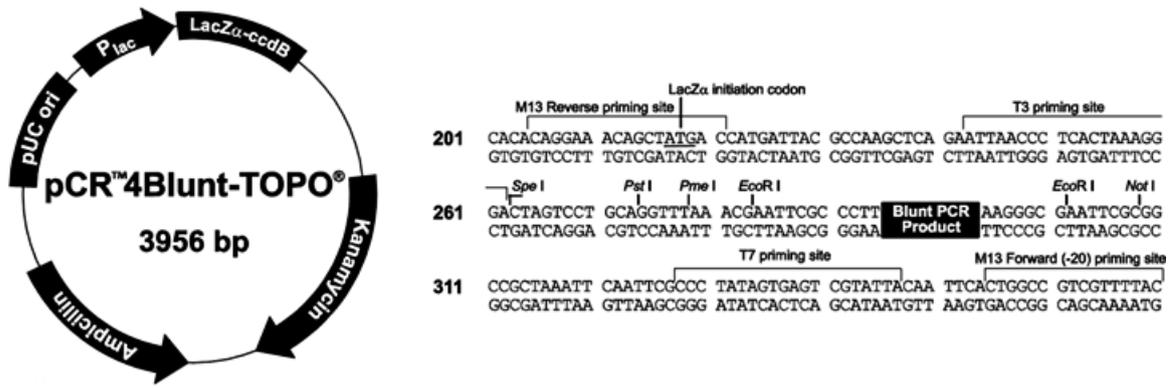


Figure 21. Schéma du vecteur pCR4Blunt-TOPO et carte de restriction du site de clonage multiple.

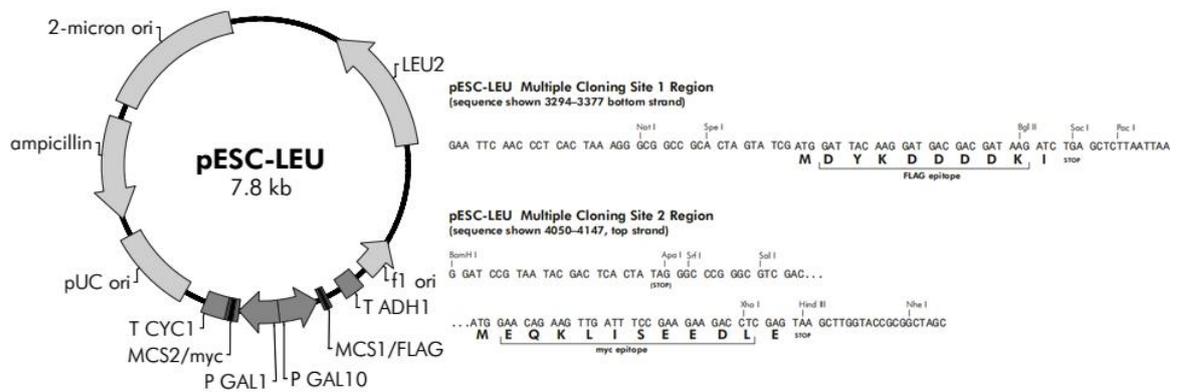


Figure 22. Schéma du vecteur pESC-LEU et carte de restriction du site de clonage multiple.

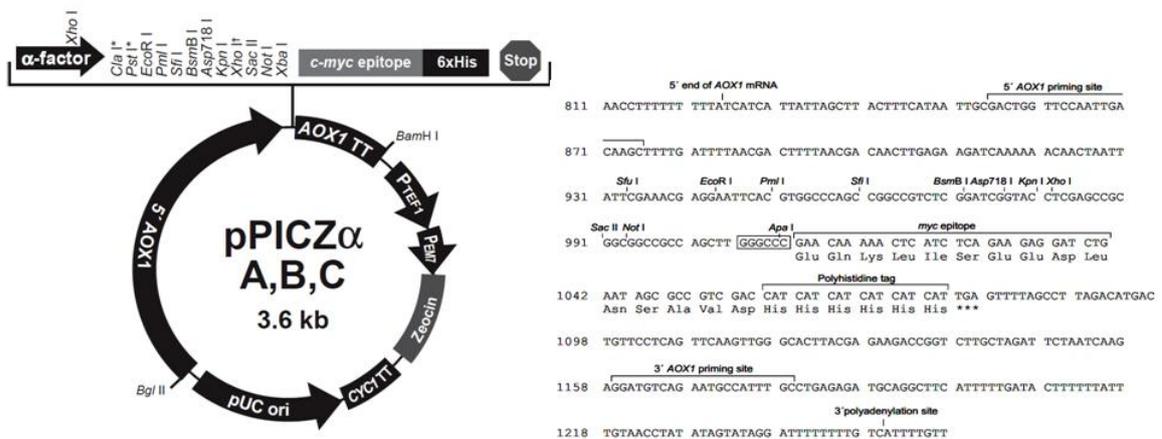


Figure 23. Schéma du vecteur pPICZα et carte de restriction du site de clonage multiple.

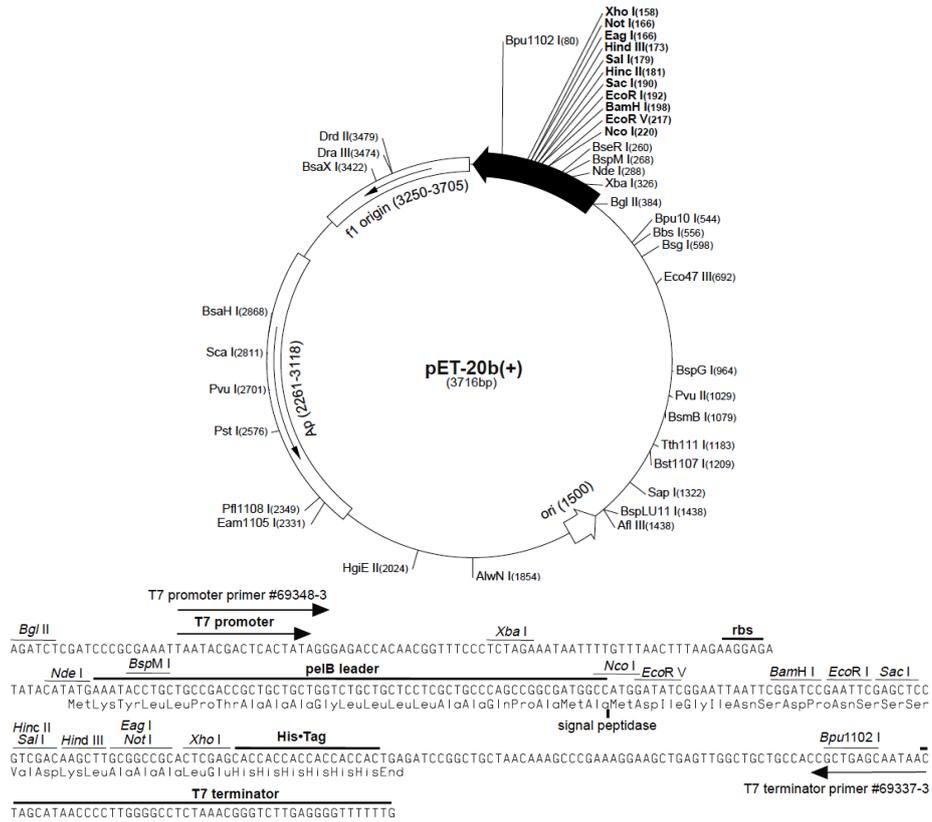


Figure 24. Schéma du vecteur pET20b(+) et carte de restriction du site de clonage multiple.

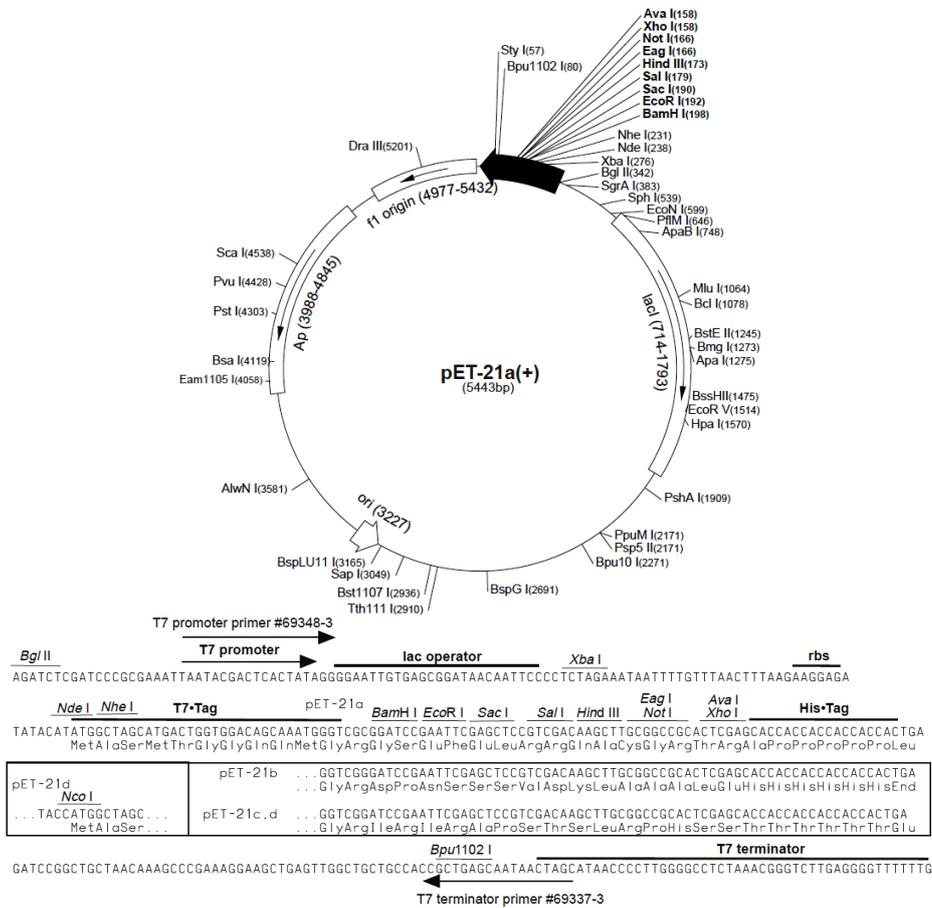


Figure 25. Schéma du vecteur pET21a-d(+) et carte de restriction du site de clonage multiple.

I.2.2. Clonage de *nolO* (*Sinorhizobium fredii* NGR234A)

Le gène *nolO* (*Sinorhizobium fredii* NGR234A) optimisé pour l'expression chez *E. coli* a été synthétisé par la société Genearth (www.lifetechnologies.com) et cloné entre les sites de restriction NdeI et SacI dans le plasmide pET20b(+).

I.2.3. Clonage de l'Aryl sulfotransférase IV (*Rattus norvegicus*)

Le gène de l'arylsulfotransférase IV (*Rattus norvegicus*) optimisé pour l'expression chez *E. coli* a été synthétisé par la société NZYTech (www.nzytech.com) et cloné entre les sites de restriction NdeI et BamHI dans le plasmide pET28a(+).

I.2.4. Clonage de NodH (*Sinorhizobium meliloti*)

L'expression cytoplasmique de NodH a été évaluée dans différentes souches d'*E. coli*. Les amorces utilisées et les plasmides construits sont regroupés dans le Tableau 3.

Amorces	Séquences (5' → 3')	Plasmides construits	Organisme d'expression
nodH_NdeI (5')	ggcatatgacccattccacgctgc	pET20b_nodH	<i>E. coli</i>
nodH_BamHI (3')	ccggatcccgcgttagcaagctcgaac	pET21a_nodH	

Tableau 3. Amorces de clonage de NodH (*S. meliloti*).

I.2.5. Clonage de VC1280 (*Vibrio cholerae*)

La construction pET26b_VC1280 a été gracieusement fournie par le regretté Saul Roseman (*Department of Biology, The Johns Hopkins University, Baltimore, MD 21218, USA*). Le gène est cloné entre les sites NcoI (5') et XhoI (3') dans le plasmide pET26b(+).

I.2.6. Clonage de NodB (*Sinorhizobium meliloti*)

Différentes approches ont été abordées dans ce travail concernant l'expression de la CD NodB. Plusieurs organismes d'expression ont été testés (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* et *Escherichia coli*). Le compartiment d'expression a aussi été évalué chez *E. coli* (périplasme et cytoplasme), tout comme la position et la présence ou non des étiquettes. Les amorces utilisées dans ce travail et les plasmides construits sont regroupées dans le Tableau 4.

Amorces	Séquences (5' → 3')	Plasmides construits	Organismes d'expressions
nodB_BamHI (5')	cgggatccatgaagcacctcgattacatac	pESC-LEU_nodB	<i>S. cerevisiae</i>
nodB_Sall (3')	gcgctcgacgtgatgcgagggaagtggg		
nodB_XbaI (5')	cgtctagatgcgagggaagtggg	pPICZαA_nodB	<i>P. pastoris</i>
nodB_EcoRI (3')	ggatgaattcatgaagcacctcg		
nodB_NcoI (5')	ggccatggagcacctcgattac	pET21d_nodB	
nodB_XhoI (3')	cctcgaggtgatgcgagggaag	pET21d_nodB-His	<i>E. coli</i>
nodB_XhoIstop (3')	gtgctcgagtcagtgatgcgagggaag	pET26b_nodB	
		pET32a_nodB	

Tableau 4. Amorces de clonage de la CD NodB.

I.3. Préparation des bactéries compétentes et transformation

5 mL de LB sont inoculés avec un stock glycérol d'une souche d'*E. coli*, et incubés une nuit à 37°C sous agitation à 180 rpm. Un volume de 100 mL de LB est inoculé au 1/100^e avec la pré-culture, puis placé à 37°C à 180 rpm jusqu'à obtenir une densité optique à 600 nm (DO_{600nm}) proche de 0,5. La culture est alors placée à 4°C pendant 10 min, puis centrifugée 7 min à 5800 g à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu délicatement dans 40 mL de CaCl₂ 50 mM froid (4°C). Après une incubation de 15 min à 4°C, les cellules sont centrifugées 7 min à 5800 g à 4°C. Le surnageant est éliminé, et le culot est repris dans 2 mL de CaCl₂ 72 mM froid (4°C). Les bactéries sont conservées dans la glace et sont compétentes dans les 2 à 24 heures qui suivent. Les cellules sont ensuite stockées à -80°C dans 25 % de glycérol, et restent compétentes pendant plusieurs mois dans ces conditions.

Un aliquot de 100 µL d'*E. coli* est transformé avec 5 µL de plasmide. Le mélange est incubé pendant 30 minutes dans la glace. Un choc thermique de 45 secondes est ensuite réalisé à 42°C. 900 µL de LB non sélectif sont ajoutés et les bactéries sont placées pendant 1 h à 37°C sans agitation, avant étalement sur LB agar – antibiotique. Les bactéries sont ensuite incubées à 37°C toute la nuit.

II. Expression des protéines sous forme recombinante

II.1. Expression chez *Saccharomyces cerevisiae*

II.1.1. Transformation

La levure *Saccharomyces cerevisiae* doit subir un traitement de déstabilisation de ses membranes pour ingérer le plasmide porteur du gène d'intérêt. Une préculture en YTD (1 % Yeast Extract / 2 % Tryptone / 2 % Glc) est réalisée à partir d'un stock glycérol de *S. cerevisiae* EBY100. Elle est incubée une nuit, à 30°C, sous agitation (220 rpm). La culture de YTD est ensuite ensemencée de manière à obtenir une DO_{600nm} autour de 0,25, puis placée à 30°C sous agitation (220rpm) jusqu'à obtenir une DO_{600nm} autour de 1. La culture est alors centrifugée 5 min à 1000 g et à 20°C. Le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 10 mL de tampon LTE (LiOAc 0,1 M / Tris-HCl 10 mM pH 7,5 / EDTA 1 mM). Les cellules sont à nouveau centrifugées pendant 5 min à 1000 g et à 20°C. Le culot est repris dans 500 μ L de tampon LTE. Les levures sont compétentes pendant 3 jours à 4°C.

Lors de la transformation des levures compétentes, 1 à 3 μ g de plasmide sont ajoutés à 50 μ L de EBY100 compétentes. Le mix de transformation (300 μ L) (PEG3350 40 % / LiOAc 0,1 M / Tris HCl 10 mM pH 7,5 / EDTA 1 mM) est ajouté au mélange. Les levures sont alors incubées pendant 30 min à 30°C puis 15 min à 42°C. Les cellules sont ensuite centrifugées pendant 5 min à 1000 g et à 20°C. Le culot est repris avec 1 mL d'eau ultrapure (mQ), et les levures sont de nouveau centrifugées 5 min à 1000 g et à 20°C. Le culot est repris dans 100 μ L d'eau mQ et étalé sur un milieu minimum (0,67 % Yeast Nitrogen Base/ Glc 2 % / Trp 0,01 %). Les boîtes sont incubées 2 à 3 jours à 30°C.

II.1.2. Expression

Le protocole standard utilisé dans cette étude pour les études d'induction est inspiré du « *pYD1 Yeast Display Vector Kit* » (Invitrogen). A partir d'un transformant frais (une à deux semaines), une préculture est réalisée en milieu minimum (Yeast Nitrogen Base (YNB) 0,67 % / casa-aminoacides 0,5 % / Glc 2 %). Elle est incubée à 30°C sous agitation (220 rpm), et lorsque la DO_{600nm} indique une valeur d'au moins 2 (16 heures environ), les cellules sont centrifugées pendant 5 min à 3000 g et resuspendues dans un milieu minimum (YNB 0,67 % / casa-aminoacides 0,5 %) contenant 0,5 %, 1 % ou 2 % de galactose (Gal). L'induction de l'expression des protéines est initiée par la présence de Gal à différentes concentrations, et se poursuit pendant des temps définis et à la température contrôlée de 25°C.

II.2. Expression chez *Pichia pastoris*

II.2.1. Transformation

L'expression chez *Pichia pastoris* s'effectue par intégration génomique du plasmide à la différence de *S. cerevisiae*. Pour cela, il est nécessaire de disposer d'une grande quantité de plasmide recombinant obtenue à l'aide du kit Qiagen « plasmid maxi kit ».

Les protocoles de préparation et de transformation de la levure sont décrits dans le manuel « *pPICZ α A, B, and C* » (Invitrogen) et utilisent une méthode de transformation par électroporation, réalisée à 1500 Volts (Electroporator 2510, Eppendorf).

II.2.2. Expression

Le protocole standard utilisé dans cette étude pour les études d'induction est inspiré du manuel « *Pichia expression kit* » (Invitrogen). A partir d'un transformant frais (une à deux semaines), une préculture est réalisée, en BMGY (1 % Yeast Extract / 2 % Tryptone / 1,34 % YNB / $0,4 \times 10^{-5}$ % biotine / 1 % glycérol) contenant du glycérol comme source de carbone. Elle est incubée à 30°C sous agitation (250 rpm) et lorsque la DO_{600nm} indique une valeur d'environ 3 (16 heures environ), les cellules sont centrifugées pendant 5 min à 3000 g à température ambiante. Le culot est repris dans du BMMY (1 % Yeast Extract / 2 % Tryptone / 1,34 % YNB / $0,4 \times 10^{-5}$ % biotine / 0,5 % méthanol) contenant du méthanol comme source de carbone, de telle sorte que la DO_{600nm} soit d'environ 1. L'induction de l'expression des protéines est initiée par la présence de méthanol, et se poursuit pendant des temps définis et à la température contrôlée de 30°C. Toutes les 24 heures, du méthanol est rajouté à la culture à une concentration finale de 0,5 %, afin de maintenir l'induction.

II.3. Expression chez *Escherichia coli*

La bactérie *E. coli* est l'organisme le plus utilisé pour l'expression de protéines recombinantes en raison des connaissances avancées sur son génome et son métabolisme. Il existe de nombreux critères sur lesquels jouer afin de réussir à exprimer une protéine recombinante chez cet organisme. Le choix des souches, le choix des vecteurs et le compartiment d'expression, la présence ou non d'étiquettes pour aider à la purification de la protéine, la température, la durée et la force de l'induction, sont autant de critères à envisager pour réussir une expression hétérologue⁵⁷. La nature du milieu de culture a

⁵⁷ Graslund, S., et al., 2008, *Nat. Methods*, 5, (2), 135-146.

également été prise en compte, avec l'utilisation du milieu « Terrific broth » (TB)⁵⁸ à la place du LB.

Un protocole standard est utilisé dans cette étude. Une préculture en LB - antibiotique ou TB-antibiotiques est réalisée à partir d'un transformant frais (une à deux semaines), préalablement isolé sur boîte de pétri. Elle est incubée une nuit, à 37°C, sous agitation (180 rpm). La culture de LB - antibiotique ou TB-antibiotique est ensuiteensemencée au 1/50^o, et placée à 37°C sous agitation (180 rpm), jusqu'à obtenir une DO_{600nm} proche de 0,5. L'induction de l'expression des protéines est alors initiée par l'ajout d'IPTG à différentes concentrations selon la protéine étudiée, et se poursuit pendant des temps définis et à des températures contrôlées, toujours inférieures à la température de croissance optimale d'*E. coli*. (37°C).

Un troisième milieu de culture a été testé, le milieu ZYP-5052⁵⁹. C'est un milieu de culture riche et auto-inductible dont la particularité est sa composition en nombreux métaux. Il est donc intéressant pour la culture de protéines métallo-dépendantes. Le protocole est différent de celui utilisé auparavant. Une préculture en LB - antibiotique est réalisée mais la culture de ZYP-5052 est ensuiteensemencée au 1/100^o, et placée à 20°C sous agitation (180 rpm), jusqu'à 72 heures. L'expression des protéines est légèrement initiée pendant la croissance de la culture puis élevée lorsque la phase stationnaire est atteinte. Un suivi par DO_{600nm} permet d'observer la croissance et donc l'induction de la protéine.

⁵⁸ Tartof, K. D. and Hobbs, C. A., **1987**, Bethesda Res. Lab. Focus.

⁵⁹ Studier, F. W., **2005**, *Protein Express. Purif.*, 41, (1), 207-234.

III. Techniques de biochimie

III.1. Préparation des fractions cytosoliques

Au terme des expressions, les cultures bactériennes sont centrifugées 10 min à 8500 g à 4°C. Les culots sont soit congelés à -20°C en attente de traitement, soit repris dans le tampon Tris-HCl 100 mM pH 8, 500 mM NaCl. Les cellules sont ensuite cassées au disrupteur de cellules (Constant cell) à 1,9 kBars de pression pour *E. coli* et 2,5 kBars pour les levures, puis centrifugées 30 min à 50000 g à 4°C. Le surnageant correspond aux extraits cytoplasmiques.

III.2. Préparation des fractions périplasmiques

Au terme des expressions, les cultures bactériennes sont centrifugées 10 min à 8500 g à 4°C. Les culots sont repris dans du saccharose 20 % (p/v) / Tris-HCl 20 mM pH 8 / EDTA 1 mM et conservés 10 min à température ambiante. Les culots sont ensuite centrifugés 10 min à 8500 g à 4°C puis repris dans du MgSO₄ 5 mM froid, et incubés 10 min à 4°C. Les cellules sont alors centrifugées pendant 10 min à 21000 g et à 4°C. Le surnageant correspond à la fraction périplasmique.

III.3. Purification sur résine de nickel

L'ensemble des protéines décrites ici possède des étiquettes poly-histidine permettant une purification par chromatographie d'affinité IMAC (Immobilized Metal ion Affinity Chromatography). Le principe de cette technique réside dans la formation de liaisons ioniques entre les noyaux imidazole de résidus histidines de la séquence protéique et les dications Ni²⁺ immobilisés sur la phase stationnaire. L'élution par compétition, à l'aide de solutions de concentrations croissantes en imidazole, va permettre de décrocher les protéines retenues, et de purifier la protéine d'intérêt.

La purification se déroule à température ambiante, à l'aide d'une résine de Ni-acide nitrilotriacétique (Ni-NTA) agarose (Qiagen) d'une capacité de fixation de 50 mg de protéines par mL de phase. La colonne est préalablement équilibrée avec 10 volumes de tampon Tris-HCl 20 mM pH 8, 500 mM NaCl. Les extraits cytoplasmiques, sont alors chargés sur la colonne. Une étape de lavage est réalisée avec du tampon Tris-HCl 20 mM pH 8, 500 mM NaCl, 20 mM d'imidazole, afin de décrocher les protéines faiblement attachées à la résine. Ce lavage est suivi visuellement par un dosage des protéines par la méthode de Bradford⁶⁰. L'élution est menée par palier avec des concentrations croissantes en imidazole

(50 à 300 mM). La colonne de nickel est régénérée après chaque utilisation selon les indications du fournisseur.

Après une analyse qualitative de la purification sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE), les fractions retenues sont regroupées et dialysées contre le tampon adéquat, puis dosées par la méthode de Bradford⁶⁰ avant d'être stockées à -80°C, ou utilisées immédiatement.

III.4. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS

Les échantillons protéiques sont repris dans un tampon de dénaturation (Tris-HCl 0,2 M pH 6,8, glycérol 20 % (v/v), SDS 4 %, β -mercaptoéthanol 10 % (v/v), bleu de bromophénol 0,4 %) puis placés à 100°C pendant 3 min avant d'être déposés sur le gel. Les analyses SDS-PAGE ont été réalisées sur des systèmes d'électrophorèse Mini Protean System (Bio-Rad) avec des gels de concentration à 5 % d'acrylamide (pH 6,8) et des gels de séparation au pourcentage d'acrylamide variable (8-12 %, pH 8,8), selon la taille de la protéine étudiée.

L'électrophorèse est réalisée dans du tampon de migration (Tris 25 mM, pH 8,5, glycine 192 mM, SDS 0,1 %) à 30 mA par gel sur un système Power Pac1000 (Bio-Rad). Les protéines sont révélées par incubation du gel dans une solution d'InstantBlue (Expedeon) pendant 30 min à température ambiante, sous agitation. Les gels sont scannés (GelDOc EZ Imager, BioRad) puis analysés par le logiciel ImageLab (5.0).

III.5. Tests d'activité des enzymes

III.5.1. Tests d'activité de la chitinase C2 (*O.xanthineolytica*)

La souche *Oerskovia xanthineolytica* est cultivée dans un litre de milieu de culture (NaNO₃ 0,3 % - K₂HPO₄ 0,1 % - KCl 0,05 % - MgSO₄·7H₂O 0,05 % - FeSO₄ 0,001 % - pH 7) et contenant 1 % (p/v) de chitine colloïdale, pendant 72 heures, à 45°C et 180 rpm. Les bactéries sont centrifugées 15 minutes à 8450 g et 4°C, et les protéines présentes dans le surnageant sont précipitées au sulfate d'ammonium, à 75 % de la saturation (476 g rajoutés progressivement dans un litre de culture). Après 15 minutes de centrifugation à 21000 g et 4°C, le culot est récupéré puis les protéines sont resuspendues dans du tampon phosphate de potassium 25 mM pH 7,5.

Afin de séparer la chitinase C2 (66 kilodaltons (kDa)) de la chitinase C1 (23 kDa), le mélange est dialysé à travers une membrane de 30 kDa (Macrosep, Pall) contre du tampon phosphate de potassium 25 mM pH 7,5. Le test d'activité de C2 (50 μ g) a lieu à 55°C, pendant 20 heures,

⁶⁰ Bradford, M. M., 1976, *Anal. Biochem.*, 72, (1-2), 248-254.

sous agitation (500 rpm), avec 0,5 % de chitine colloïdale, dans 1 mL de tampon phosphate de potassium 25 mM pH 7,5.

Pour disposer d'un contrôle positif, la chitinase vacuolaire de haricot (50 µg) est incubée à 37°C, pendant 20 heures, sous agitation (500 rpm), avec 0,5 % de chitine colloïdale, dans 1 mL de tampon phosphate de potassium 25 mM pH 7,5. L'avancement des réactions est suivi par CCM.

III.5.2. Tests d'activité de NoIO (*Sinorhizobium fredii* NGR234)

Pour les tests d'activité sur les extraits bruts, le milieu réactionnel (30 µL) contient 10 µL d'extraits bruts de NoIO (environ 2 µM de CT NoIO, 5 µg), 10 mM de carbamoylphosphate et entre 600 et 800 µM d'accepteur. Le milieu peut-être supplémenté en ATP (10 mM), ainsi que par des solutions de MnSO₄, MgCl₂, ZnCl₂, FeCl₃, (NH₄)₂Fe(SO₄)₂, FeSO₄ et FeCl₂ à 1 mM, seuls ou en combinaison dans du tampon Tris-HCl pH 8, 50 mM ou 100 mM. Le milieu réactionnel est placé à 30°C, pendant une nuit, sans agitation.

Pour les tests d'activité sur la protéine purifiée, le milieu réactionnel (30 µL) contient 6 µM de NoIO (15 µg), entre 600 et 800 µM d'accepteur, 10 mM de carbamoylphosphate, 10 mM d'ATP ainsi que des cations dans du tampon Tris-HCl pH 8, 50 mM ou 100 mM. Le milieu réactionnel est placé à 30°C, pendant une nuit, sans agitation.

III.6. Dosage des activités chitine N-désacétylases

III.6.1. Chitine N-désacétylase VC1280 (*Vibrio cholerae*)

Le milieu réactionnel (350 µL) contient 0,2 à 3 mM de chitinbiose (CO-II) et 25 µg (0,5 nM) de CD VC1280 dans le tampon HEPES 20 mM pH 7. Les cinétiques se déroulent à 37°C avec des prélèvements de 50 µL de milieu réactionnel toutes les 2 min pendant 10 min. La concentration en amines libres est déterminée par la méthode de Tsuji *et al.*⁶¹. Les paramètres cinétiques sont déterminés par régression non linéaire à l'aide du logiciel GraFit (v4.06).

III.6.2. Chitine N-désacétylase NodB (*Sinorhizobium meliloti*)

Le milieu réactionnel (350 µL) contient 0,2 à 4,5 mM de chitinbiose (CO-II) ou de chitinpentaose (CO-V), 6,5 µg (0,15 nM) de NodB-thioredoxine, dans le tampon MOPS 20 mM pH 7,2 contenant du sulfate de manganèse (MnSO₄, 1 mM) et du dithiothréitol (DTT, 10 mM). Les cinétiques se déroulent à 30°C avec des prélèvements de 50 µL de milieu

⁶¹ Tsuji, A., Kinoshita, T. and Hoshino, M., 1969, *Chem. Pharm. Bull.*, 17, (7), 1505-10.

réactionnel toutes les 5 min pendant 25 min. La concentration en amines libres est déterminée par la méthode de Tsuji *et al.*⁶¹. Les paramètres cinétiques sont déterminés par régression non linéaire à l'aide du logiciel GraFit (4.06).

III.6.3. Dosage des amines libres

50 μL de mélange réactionnel sont ajoutés à 50 μL de sulfate acide de potassium (KHSO_4 5 % (p/v) dans de l'eau ultrapure (mQ)) (contenant 1 mM d'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) pour NodB) dans une plaque de microtitration déposée sur un lit de glace. A partir de cette étape, le dosage se poursuit à température ambiante contrôlée (20°C). 50 μL de nitrite de sodium (NaNO_2 5 % (p/v) dans de l'eau mQ) sont ajoutés et le milieu est placé sous agitation pendant 15 min puis 50 μL de sulfamate d'ammonium ($\text{NH}_4\text{SO}_3\text{NH}_2$ 12,5 % (p/v) dans de l'eau mQ) sont ajoutés et le mélange est placé sous agitation pendant 5 min. 50 μL de monohydrate de l'hydrochlorure de l'hydrazone de 3-méthyl-2-benzothiazolinone (MBTH 0,5 % (p/v) dans de l'eau mQ) sont additionnés et le mélange est incubé 1 heure à 20°C. Enfin, 50 μL de chlorure de fer (FeCl_3 0,5 % (p/v) dans de l'eau mQ) sont ajoutés et le tout est incubé 30 min à 30°C avant de lire l'absorbance à 655 nm (Biorad 400). La gamme étalon est réalisée avec une gamme de concentration de glucosamine allant de 0 à 1,2 mM.

IV. Préparation des Substrats

IV.1. Préparation de la chitine colloïdale⁶²

A 20 g de chitine issue de carapaces de crabes (Fluka) sont progressivement ajoutés 150 mL d'HCl 12N (37 % (p/v)). La solution est agitée pendant une heure. Le mélange chitine-HCl est ensuite filtré à travers 8 couches de gaze pour retirer les gros fragments de chitine. La chitine est ensuite précipitée en ajoutant progressivement 2 litres d'eau distillée à 4°C. La solution est filtrée sur papier et la chitine est lavée avec environ 10 litres d'eau jusqu'à obtenir un pH 7, puis reprise dans un litre d'eau ultrapure et autoclavée. La chitine colloïdale est conservée à température ambiante. Un volume précis de solution de chitine colloïdale est prélevé puis lyophilisé pour déterminer la concentration massique de la solution (2,12 % (p/v)).

IV.2. Préparation des oligomères de chitine

Le mélange d'oligomères de chitosane commercial (FACOS, 4 g) est solubilisé dans 600 mL d'un mélange 1:1 H₂O/MeOH. 40 mL d'anhydride acétique sont ajoutés lentement et le pH est ajusté à 8-9 à l'aide de triéthylamine (60 mL environ). La solution est agitée à température ambiante pendant une nuit. Le mélange est co-évalué plusieurs fois au toluène puis lyophilisé. L'analyse MALDI-ToF du brut réactionnel révèle une *N*-acétylation partielle (Figure 29).

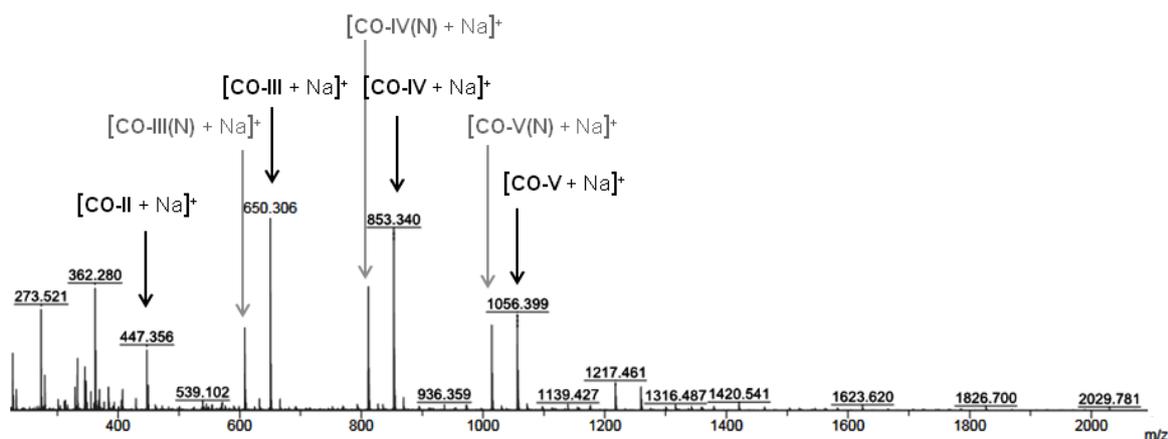


Figure 29. Spectre de masse MALDI-ToF (mode positif) du FACOS.

⁶² Murthy, N. K. S. and Bleakley, B. H., 2012, *Internet J. Microb.*, 10, (2).

Afin de séparer les composés per *N*-acétylés des composés partiellement *N*-acétylés, le mélange est purifié sur une résine échangeuse de cations DOWEX 50WH⁺. Le mélange (1 g), est déposé sur la résine, élué avec 2 litres d'eau puis 2 litres de NH₄OH 2 %. La première fraction est neutralisée sur résine Amberlite IRA 400 HO⁻, concentrée et lyophilisée.

L'analyse MALDI-ToF de la fraction montre un mélange de CO-II à CO-IX per *N*-acétylés (Figure 30). Le mélange est ensuite purifié par exclusion de taille sur Biogel P4, avec de l'eau comme éluant. La pureté des oligosaccharides est évaluée par spectrométrie de masse MALDI-ToF (mode positif) et par chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC). Les fractions correspondant aux produits d'intérêts sont rassemblées, puis concentrées et lyophilisées. Les produits sont conservés à 4°C sous cette forme.

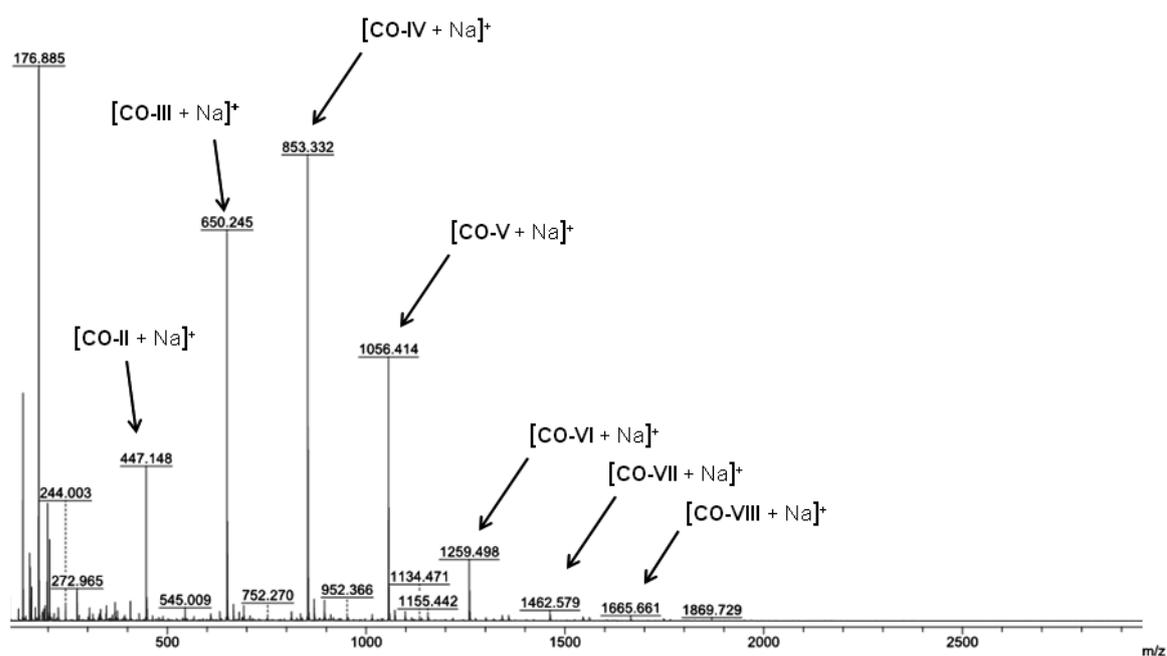


Figure 30. Spectre de masse MALDI-ToF du FACOS per *N*-acétylé.

V. Purification des oligomères de chitine *N*-désacétylés (COs-(N))

V.1. Procédé VC1280

La CD VC1280, conservée dans du tampon phosphate de potassium 20 mM pH 8, est dialysée contre du carbonate d'ammonium 10 mM pH 7,9 (centricon 10 kDa, Pall). Le chitinoligosaccharide est placé en réaction avec la CD VC1280 dans le carbonate d'ammonium 10 mM pH 7,9 pendant 20 h à 37°C, sans agitation. Le suivi de la réaction par CCM montre une conversion totale du produit de départ.

Le milieu réactionnel est ensuite placé à 100°C pendant 10 min afin de dénaturer l'enzyme. Cette dernière est alors éliminée par centrifugation pendant 10 min à 21000 g, à 4°C. Le surnageant est recueilli et le culot remis en suspension dans l'eau puis le mélange est à nouveau centrifugé dans les mêmes conditions. Cette opération est renouvelée une fois. Les surnageants sont regroupés, puis lyophilisés. Les COs *N*-désacétylés en pénultième position sont alors caractérisés par spectrométrie de masse haute résolution (ESI-ToF mode positif) et leur homogénéité est confirmée par analyse chromatographique liquide haute performance.

La β -Galactosidase d'*Aspergillus oryzae*, commerciale (Sigma-Aldrich), est contaminée par une activité β -*N*-acétylhexosaminidase (*A. oryzae*). Elle est mise en solution dans l'eau à une concentration de 1 mg.mL⁻¹, puis dialysée à l'aide d'une membrane de 10 kDa (Nanosep, Pall). Le rétentat est ajouté au chitinoligosaccharide *N*-désacétylé en pénultième position et le milieu réactionnel est placé pendant 20 heures à 37°C, sans agitation. Le suivi de la réaction par CCM montre une conversion totale du produit de départ.

La réaction est alors dialysée sur une membrane de 10 kDa (Nanosep, Pall) et l'éluat contenant l'oligosaccharide et la *N*-acétylglucosamine libérée est additionné d'un mélange d'eau et d'acétone (1/20). Le précipité contenant seulement l'oligosaccharide est lyophilisé, puis caractérisé par spectrométrie de masse haute résolution (ESI-ToF mode positif) et par chromatographie liquide haute performance.

V.2. Procédé NodB

L'oligomère de chitine est mis en solution dans le tampon MOPS 20 mM pH 7,2, contenant 10 mM de DTT et 1 mM de MnSO₄, puis additionné de l'enzyme NodB-thioredoxine. Le milieu réactionnel est placé pendant 20 heures, à 30°C, à l'abri de la lumière, sans agitation. Le suivi de la réaction par CCM montre une conversion totale du produit de départ.

Le milieu réactionnel est placé à 100°C pendant 10 min afin de dénaturer l'enzyme. Cette dernière est ensuite éliminée par centrifugation selon le même protocole que pour le procédé VC1280. Le brut réactionnel est lyophilisé, puis analysé en MALDI-ToF pour confirmer l'analyse par CCM.

Pour les oligomères non fonctionnalisés, le lyophilisat est repris dans un volume minimum d'eau puis précipité dans de l'acétone froid (20 volumes). Le précipité ne contenant que l'oligosaccharide est lyophilisé, puis caractérisé par spectrométrie de masse haute résolution (ESI-ToF mode positif) et par chromatographie liquide haute performance.

Pour les oligomères fonctionnalisés (sulfaté, alkylé ou fucosylé), le lyophilisat est purifié par chromatographie d'exclusion de tailles (HW40, éluant carbonate d'ammonium 50 mM). Le dérivé de CO-(N) est ensuite caractérisé par spectrométrie de masse haute résolution (ESI-ToF mode positif) et par chromatographie liquide haute performance.

VI. Techniques chromatographiques

VI.1. Chromatographie sur couche mince de silice

Les réactions enzymatiques sont suivies par CCM sur plaque de gel de silice (Merck 60 F₂₅₄). Les éluants utilisés sont indiqués dans les chapitres IV « Décoration des chitinoligosaccharides » et chapitre V « Accès aux lipochitinoligosaccharides ». Les sucres sont révélés par trempage dans un révélateur composé de diphénylamine, d'aniline et d'acide phosphorique puis chauffés à 300°C⁶³.

VI.2. Chromatographie d'exclusion stérique

Les mélanges de chitinoligosaccharides, préalablement filtrés sur des membranes de 0,2 µm en polytétrafluoroéthylène (PTFE) avant injection, ont été séparés par chromatographie d'exclusion stérique sur Biogel P4 (gel de polyacrylamide). L'élution est réalisée dans l'eau, à un débit de 1,8 mL.min⁻¹. La chaîne est composée d'une colonne préparative (1 m x 5 cm) thermostatée à 60°C, d'une pompe Smartline 100 (Knauer), d'un réfractomètre Smartline 2400 (Knauer) et d'un collecteur Foxy R1 (Teledyne Isco).

Les chitinoligosaccharides fonctionnalisés *N*-désacétylés, également filtrés sur des membranes de 0,2 µm en PTFE avant injection, ont été purifiés par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) sur HW40 (gel de polyméthacrylate). L'élution est réalisée dans le carbonate d'ammonium 50 mM, à un débit de 0,5 mL.min⁻¹. La chaîne est composée d'une colonne analytique (1 m x 2,5 cm), d'une pompe Smartline 100 (Knauer), d'un réfractomètre Iota 2 (Precision Instruments) et d'un collecteur Foxy R1 (Teledyne Isco). Les données sont collectées à l'aide du logiciel Azur.

VI.3. Chromatographie en phase liquide haute performance

Les solutions sont filtrées sur des membranes de 0,2 µm en PTFE avant injection.

Les analyses par HPLC ont été réalisées sur deux colonnes analytiques d'exclusion de tailles 802,5 – 802 (Shodex), montées en série. L'élution est réalisée dans le nitrate d'ammonium 0,1 M, à un débit de 0,5 mL.min⁻¹. La chaîne chromatographique est composée d'une pompe 510 (Waters) et d'un réfractomètre 410 (Waters) ou alternativement d'un système Ultimate 3000 HPLC (Thermo Scientific) équipé d'un réfractomètre Iota 2 (Precision Instruments). Les données sont collectées respectivement par les logiciels Azur et Chromeleon.

⁶³ Walkley, J. M. and Tillman, J., 1977, *J. Chromatogr.*, (132), 172-174.

VII. Techniques physico-chimiques

VII.1. Spectrométrie de masse

Les analyses de spectrométrie de masse ont été effectuées par le service de spectrométrie de masse de l'Institut de Chimie Moléculaire de Grenoble (ICMG) (www.icmg.ujf-grenoble.fr).

Les analyses à basse résolution ont été réalisées sur un spectromètre Maldi-ToF-ToF Speed (Bruker Daltonics). Les conditions d'analyse utilisent une matrice acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB) (50 mg/ mL dans l'eau) et un réflectron, en mode positif ou négatif. L'échantillon est dissout à 0,2 mM dans l'eau. Le dépôt est réalisé avec 0,5 μ L d'échantillon et 0,5 μ L de matrice.

Les analyses à haute résolution ont été réalisées sur un spectromètre HRESI Xevo G2-S QTof (Waters).

VII.2. Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les analyses de RMN ^{31}P ont été réalisées sur un spectromètre Brüker Avance III 500 MHz, équipé d'une sonde Prodigy deux canaux 5 mm, par le service du plateau de résonance magnétique nucléaire de l'ICMG (www.icmg.ujf-grenoble.fr). Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en partie par million (ppm).

CHAPITRE III

ACCES AUX CHITINOLIGOSACCHARIDES

I.	Rappels bibliographiques	97
I.1.	La chitine.....	97
I.1.1.	Généralités	97
I.1.2.	Obtention de la chitine et du chitosane.....	98
I.2.	Les oligomères de chitine	99
I.3.	Voies d'accès aux chitinoligosaccharides	99
I.3.1.	Approche descendante.....	100
I.3.1.1.	Dépolymérisation par hydrolyse acide.....	100
I.3.1.2.	Dépolymérisation enzymatique	100
I.3.2.	Approche ascendante	103
I.3.2.1.	Synthèse par voie chimique	103
I.3.2.2.	Utilisation de glycosyltransférases.....	103
I.3.2.3.	Utilisation de glycoside hydrolases.....	104
II.	Résultats	106
II.1.	La chitinase C2 (<i>Oerskovia xanthineolytica</i>).....	107
II.1.1.	Production et purification	107
II.1.2.	Test d'activité.....	108
II.2.	Les oligomères de chitosane.....	110
III.	Conclusion.....	114

I. Rappels bibliographiques

I.1. La chitine

I.1.1. Généralités

La chitine rivalise avec la cellulose comme polysaccharide le plus abondant sur notre planète. Ce polymère joue un rôle structural et compose l'exosquelette des arthropodes, la cuticule des insectes mais également la paroi des champignons et des levures. Il est difficile d'estimer précisément la quantité disponible, mais il semble qu'au moins 10^9 tonnes sont générées chaque année, rien que dans le milieu marin⁶⁴.

La chitine est synthétisée sous forme d'un enchainement linéaire d'unités *N*-acétyl-*D*-glucosaminyle liées en $\beta(1-4)$. La structure de la chitine est proche de celle de la cellulose, seul un groupe acétamide en C2 les différencie. La chitine est donc une source d'azote en plus d'être une source carbonée (C:N = 8:1). Son dérivé le plus important est le chitosane, obtenu par *N*-désacétylation chimique ou enzymatique (Figure 31). Les autres dérivés largement exploités, issus de ce polysaccharide, sont les monomères *N*-acétyl-*D*-glucosamine (GlcNAc) et *D*-glucosamine (GlcN).

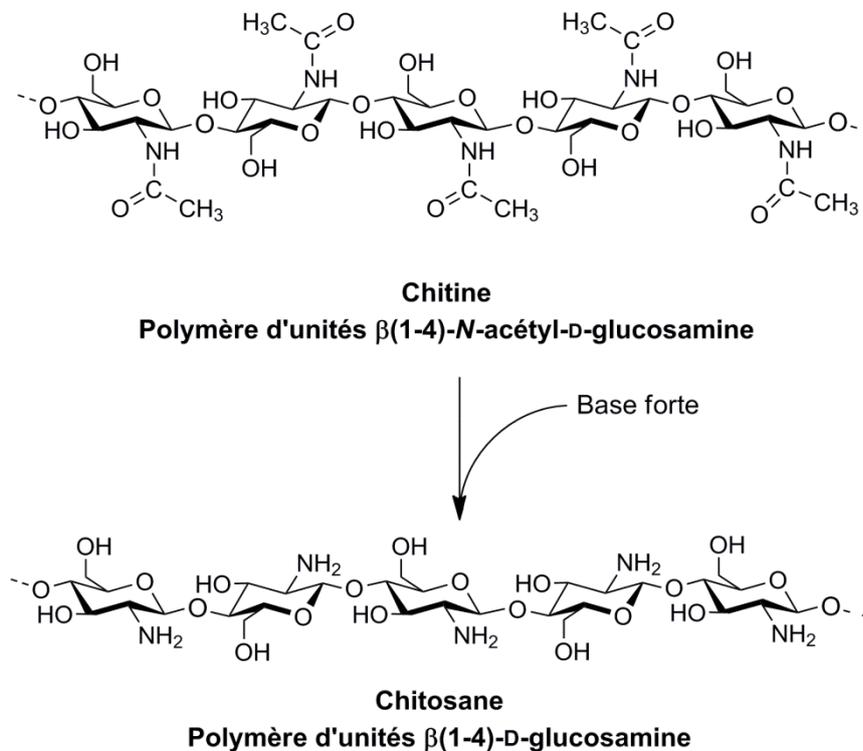


Figure 31. Structure de la chitine et de son dérivé *N*-désacétylé, le chitosane.

⁶⁴ Souza, C. P., Almeida, B. C., Colwell, R. R. and Rivera, I. N. G., **2011**, *Mar. Biotechnol.*, 13, (5), 823-830.

La chitine peut être constituée exclusivement de résidus GlcNAc, ou d'un mélange de GlcNAc et de GlcN. Il en est de même pour le chitosane. Ainsi le polymère constitué majoritairement de GlcNAc sera nommé chitine avec pour caractéristique une forte cristallinité et une insolubilité dans l'eau. A l'inverse, le chitosane contiendra une majorité de résidus GlcN et sera soluble en solution aqueuse faiblement acide.

La chitine se trouve naturellement sous deux formes de microfibrilles cristallines, α et β . La forme α , constituée de chaînes antiparallèles qui favorisent les liaisons hydrogène, est la plus rigide et la plus abondante (carapaces de crustacés). La forme β se trouve notamment dans les plumes de calamars, elle est composée de chaînes parallèles, avec des liaisons hydrogène moins favorisées, offrant plus de flexibilité. Enfin il existe une troisième forme (γ), très peu étudiée, qui serait un mélange des deux premières⁶⁵.

I.1.2. Obtention de la chitine et du chitosane

La chitine est extraite le plus couramment de carapaces de crustacés, lesquelles sont issues principalement de l'importante quantité de déchets des sous-produits de l'industrie de la pêche. Ces carapaces sont composées d'un mélange de protéines, de carbonate de calcium, de chitine et de pigments lipidiques comme les caroténoïdes. La chitine est extraite par des traitements acido-basiques afin d'éliminer les contaminants (Figure 32).

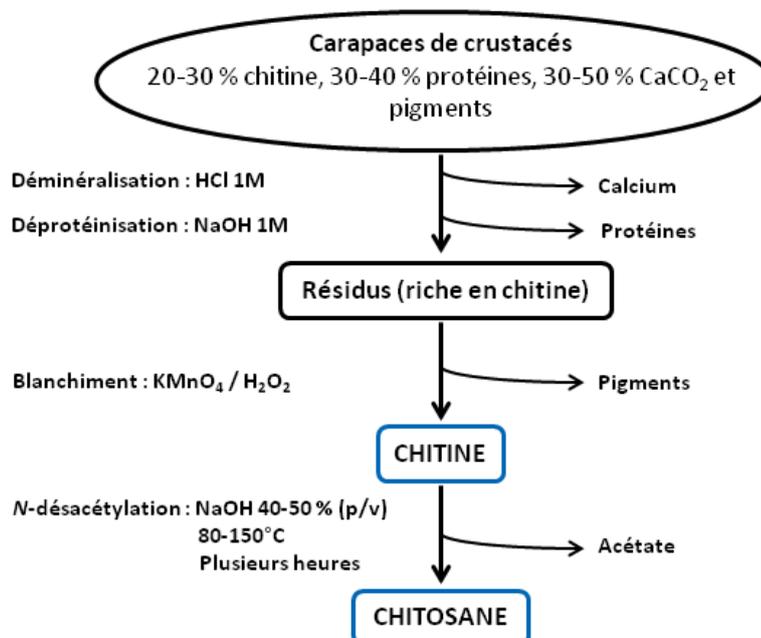


Figure 32. Préparation de chitine et de chitosane à partir de carapaces de crustacés, adapté de Kaur et Dhillon⁶⁶.

⁶⁵ Aranaz, I., Mengibar, M., Harris, R., Panos, I., Miralles, B., Acosta, N., Galed, G. and Heras, A., **2009**, *Curr. Chem. Biol.*, 3, (2), 203-230.

⁶⁶ Kaur, S. and Dhillon, G. S., **2014**, *Crit. Rev. Microbiol.*, 40, (2), 155-175.

Un blanchiment permet d'en retirer les pigments. Afin d'obtenir le chitosane, un traitement à la soude concentrée et à haute température permet de *N*-désacétyler les fonctions amines. Cette réaction n'est généralement pas totale, et le chitosane conserve des unités *N*-acétylés. Il se définit donc comme un copolymère comprenant une majorité d'unités GlcN et une minorité d'unités GlcNAc.

La chitine et le chitosane sont des polymères biocompatibles, biodégradables, non toxiques et peu coûteux. Ils sont donc d'excellents candidats à des applications médicales, dans l'industrie alimentaire ou comme agents dépolluants⁶⁷. Cependant, l'insolubilité de la chitine dans l'eau et les principaux solvants organiques ainsi que la viscosité du chitosane limitent leur utilisation.

I.2. Les oligomères de chitine

Les chitinoligosaccharides (COs) solubles en phase aqueuse sont les produits de dépolymérisation de degré de polymérisation (DP) compris entre deux et dix (CO-II à CO-X), obtenus par hydrolyse chimique ou enzymatique de la chitine. Ils présentent également de nombreuses applications potentielles. Selon le degré de polymérisation (au moins quatre unités), le niveau et le profil de *N*-désacétylation, différentes réponses biologiques peuvent être observées. Des propriétés antifongiques, antibactériennes, antitumorales, anticoagulantes, anticancéreuses ainsi qu'une aide à la cicatrisation des plaies ont été mises en évidence⁶⁸.

Les oligomères de chitine constituent une classe de molécules importantes dans les relations plantes micro-organismes. Ce sont des motifs moléculaires associés à des agents pathogènes qui vont induire des réponses immunitaires chez les végétaux²². Ils sont également capables de favoriser l'établissement de la symbiose endomycorhizienne²³, et enfin composent la base du squelette moléculaire des facteurs de nodulation et de mycorhization¹⁹.

I.3. Voies d'accès aux chitinoligosaccharides

Au regard de l'abondance de ce biopolymère, l'accès à des chitinoligosaccharides purs est délicat. Leur obtention est « simple », par dégradation chimique ou enzymatique, mais les produits de dégradation se trouvent sous forme de mélange, avec des tailles d'oligomères et des profils d'acétylation variés. Ces multiples états complexifient les étapes de purification

⁶⁷ Rinaudo, M., **2006**, *Prog. Polym. Sci.*, 31, (7), 603-632.

⁶⁸ Lodhi, G., Kim, Y. S., Hwang, J. W., Kim, S. K., Jeon, Y. J., Je, J. Y., Ahn, C. B., Moon, S. H., Jeon, B. T. and Park, P. J., **2014**, *Biomed Res. Int.*, 13.

et rendent finalement fastidieux l'accès à des structures pures et parfaitement définies. Il existe deux grandes stratégies pour accéder aux oligomères de chitine : (i) à partir du polymère dégradé en oligomères par des approches descendantes, (ii) à partir du monomère pour construire un oligomère par des approches ascendantes.

I.3.1. Approche descendante

La première approche, la plus courante mais peu contrôlée, est la dépolymérisation de la biomasse pour obtenir de la chitine ou du chitosane de bas poids moléculaire.

I.3.1.1. Dépolymérisation par hydrolyse acide

L'hydrolyse acide est une voie répandue pour accéder aux COs car sa mise en œuvre est simple et peu coûteuse malgré des conditions d'hydrolyse dures. Les acides les plus utilisés sont l'acide chlorhydrique (HCl), l'acide nitreux (HNO₂) ou l'acide fluorhydrique (HF). Dans un premier temps, le polysaccharide est dégradé en petites unités oligomériques, puis ces unités sont à leur tour dégradées en monomères GlcNAc et enfin, ces derniers peuvent être convertis en GlcN. Au final, on obtient en mélange, des séries de produits de tailles variées et de degrés d'acétylation différents⁶⁹. Les rendements d'hydrolyse sont faibles, notamment à cause de la majorité de monomères GlcN obtenus. De plus, les oligomères obtenus à partir de cette méthode sont potentiellement contaminés par les composés chimiques toxiques nécessaires à leur obtention (acides par exemple), ce qui peut être un frein à leur utilisation dans des domaines tel que le biomédical. Sur cet aspect, l'approche de dépolymérisation par voie enzymatique est préférentiellement utilisée.

I.3.1.2. Dépolymérisation enzymatique

Les chitinases (EC 3.2.1.14) sont responsables de la dépolymérisation de la chitine. Elles appartiennent aux familles des glycoside hydrolases (GH) GH18, GH19, GH23 et GH48 dans la classification CAZy⁷⁰, fondée sur les homologies de séquences en acides aminés (www.cazy.org). L'activité d'hydrolyse des liaisons glycosidiques par les chitinases est notamment définie par la présence essentielle du groupement acétamido au sein du sous-site -1, qui va jusqu'à participer au mécanisme réactionnel pour certaines d'entre elles⁷¹. Ainsi, les chitinases sont capables d'hydrolyser les liaisons GlcNAc-GlcNAc et GlcNAc-GlcN, la présence d'un résidu GlcNAc dans le sous-site -1 étant indispensable.

⁶⁹ Trombotto, S., Ladaviere, C., Delolme, F. and Domard, A., **2008**, *Biomacromolecules*, 9, (7), 1731-1738.

⁷⁰ Lombard, V., Ramulu, H. G., Drula, E., Coutinho, P. M. and Henrissat, B., **2013**, *Nucleic Acids Res.*, 42, (D1), D490-D495.

⁷¹ van Aalten, D. M. F., Komander, D., Synstad, B., Gaseidnes, S., Peter, M. G. and Eijsink, V. G. H., **2001**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98, (16), 8979-8984.

Les chitinases se classent en deux grandes catégories, les endochitinases et les exochitinases. Ces dernières libèrent de courts oligomères de chitine, par une activité processive à partir des extrémités réductrices ou non-réductrices de la chaîne polysaccharidique. Les produits générés sont en mélange, mais majoritairement composé de chitinbiose, le motif structural de répétition de base de la chitine (Figure 33).

Les endochitinases, quant à elles, se fixent aléatoirement le long de la chaîne polysaccharidique et hydrolysent une liaison osidique, ouvrant un nouvel accès aux exochitinases. Par la suite, une chitobiosidase ou une β -*N*-acétylhexosaminidase dégrade en monomères GlcNAc les produits générés par l'action concertée des chitinases. Dans le but de dépolymériser totalement la chitine, il est donc nécessaire d'utiliser un cocktail de chitinases qui vont, par étapes successives, hydrolyser la chaîne en monomères. Cela ne reste valable que pour un substrat modèle, comme la chitine colloïdale, préalablement traité (déméralisé, déprotéinisé, et blanchi).

Dans la nature, d'autres enzymes sont mises en jeu afin de s'attaquer aux autres composants associés à la chitine (protéases par exemple). Ce modèle de machinerie chitinolytique est inspiré de celui de la bactérie *Serratia marcescens* particulièrement bien décrit, et l'ensemble des chitinases synthétisées par ce microorganisme ont été étudiées⁷².

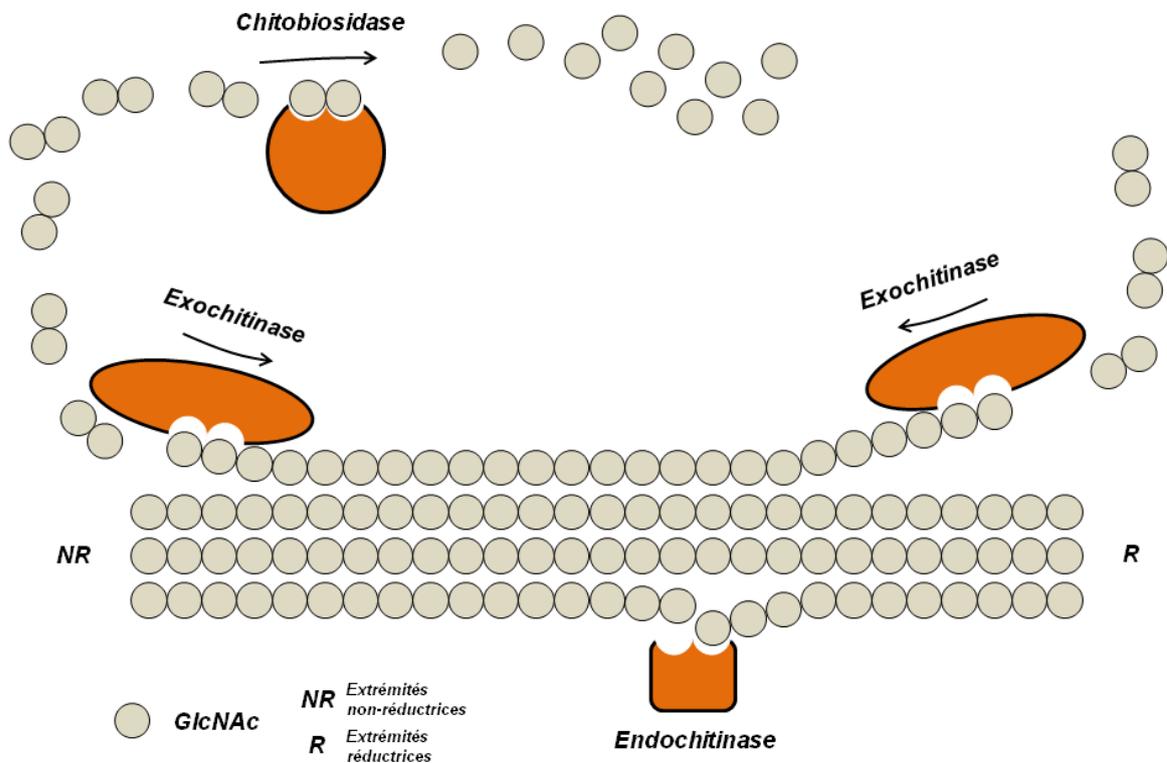


Figure 33. Modes d'action des chitinases, adapté de Vaaje-Kolstad *et al.*⁷².

⁷² Vaaje-Kolstad, G., Horn, S. J., Sorlie, M. and Eijsink, V. G. H., 2013, *FEBSJ.*, 280, (13), 3028-3049.

Les chitosanases (EC 3.2.1.132) sont responsables de la dépolymérisation du chitosane. Elles se retrouvent au sein des familles GH5, GH7, GH8, GH46, GH75 et GH80 dans la classification CAZy⁷⁰. Elles peuvent hydrolyser différents types de liaisons, dont celle impliquant deux résidus GlcN, commune à l'ensemble de ces enzymes. Le second caractère commun aux chitosanases est la non-reconnaissance des liaisons impliquant deux résidus GlcNAc. Quant aux liaisons entre résidus GlcNAc et GlcN (GlcN-GlcNAc ou GlcNAc-GlcN), elles sont différemment reconnues et hydrolysées selon les chitosanases⁷³.

A l'aide d'une chitosanase de champignon (*Aspergillus sp.*), des synthèses à l'échelle préparative (centaine de grammes) d'oligomères de chitosane ont été décrites⁷⁴. Le mélange généré comprend des oligosaccharides allant du DP2 au DP8, et est centré sur le DP4. Des mélanges d'oligomères sont également commercialisés à partir d'hydrolyse de chitosane par des chitosanases⁷⁵. A ce jour, il n'existe aucun protocole de purification performant pour traiter ces mélanges d'oligomères de chitosane.

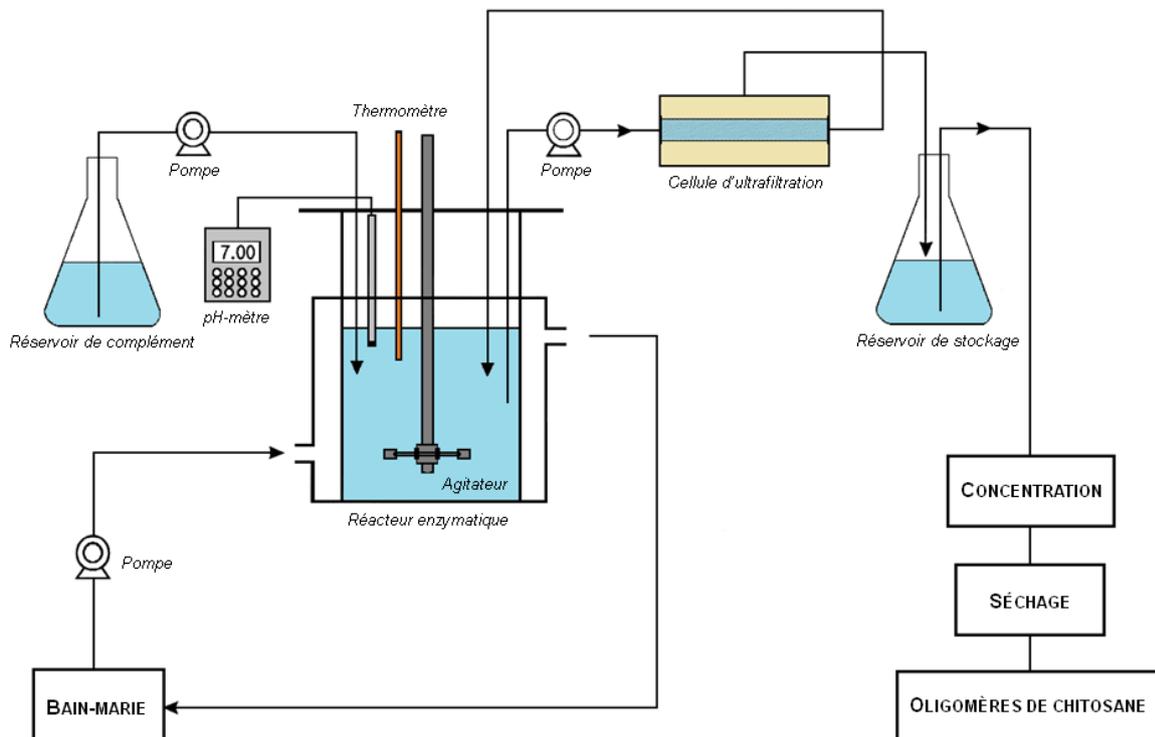


Figure 34. Production d'oligomères de chitosane en réacteur, couplée à une cellule d'ultrafiltration, d'après Jeon et Kim⁷⁵.

⁷³ Hoell, I. A., Vaaje-Kolstad, G. and Eijsink, V. G. H., **2010**, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 27, 331-366.

⁷⁴ Cheng, C. Y. and Li, Y. K., **2000**, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 32, 197-203.

⁷⁵ Jeon, Y. J. and Kim, S. K., **2000**, *Carbohydr. Polym.*, 41, (2), 133-141.

Le coût élevé d'accès aux chitosanases, comparé au plus faible coût des hydrolyses acides, a conduit à l'élaboration de protocoles permettant d'optimiser au maximum l'utilisation de ces enzymes, et de rentabiliser les synthèses de COs⁷⁶. L'enzyme et son substrat peuvent être placés dans des réacteurs finement régulés (température, pH, agitation) ; la chitosanase peut également être immobilisée sur un support ou couplée à l'utilisation de cellules d'ultrafiltration pour augmenter les rendements de synthèse (Figure 34). Le degré de polymérisation des produits obtenus, ainsi que les proportions, en font l'approche la plus séduisante pour obtenir facilement des oligomères de chitosane qui peuvent être ensuite acétylés pour conduire à des chitinoligosaccharides.

I.3.2. Approche ascendante

I.3.2.1. Synthèse par voie chimique

La mise en place d'une chimie permettant de construire un CO reste fastidieuse. En effet, il est nécessaire de protéger et de manipuler sélectivement des molécules donneur et accepteur de glycosylation. Ceci multiplie les étapes et influe négativement sur les rendements globaux de synthèse. Cependant, il s'agit d'une voie d'accès qui offre des produits finaux parfaitement définis⁷⁷⁻⁷⁸. La synthèse de chitintétraose à partir d'un monomère GlcNAc nécessite une quinzaine d'étapes avec un rendement total inférieur à 5%⁷⁹. L'approche enzymatique est une alternative à ces problématiques grâce à la régiosélectivité des réactions, couplée à des rendements de synthèse plus élevés.

I.3.2.2. Utilisation de glycosyltransférases

Selon la classification CAZy⁷⁰, il existe actuellement 96 familles de glycosyltransférases (GT). Ces enzymes catalysent le transfert d'un sucre activé sur un accepteur spécifique, en formant des liaisons glycosidiques. Le donneur peut être activé par un nucléotide phosphate, comme l'UDP-GlcNAc, et ces GTs portent alors le nom d'enzymes de Leloir (Figure 35).

Une synthèse *in vitro* à l'échelle préparative avec une enzyme de Leloir est difficilement envisageable en raison du coût important du donneur. Il est cependant possible, via un système complexe, de régénérer le nucléotide-sucre⁸⁰.

⁷⁶ Kim, S. K. and Rajapakse, N., **2005**, *Carbohydr. Polym.*, 62, (4), 357-368.

⁷⁷ Yang, Y. and Yu, B., **2014**, *Tetrahedron*, 70, (5), 1023-1046.

⁷⁸ Barroca-Aubry, N., Pernet-Poil-Chevrier, A., Domard, A. and Trombotto, S., **2010**, *Carbohydr. Res.*, 345, (12), 1685-1697.

⁷⁹ Aly, M. R. E., Ibrahim, E. S. I., El Ashry, E. S. H. and Schmidt, R. R., **2001**, *Carbohydr. Res.*, 331, (2), 129-142.

⁸⁰ Zhao, G. H., Guan, W. Y., Cai, L. and Wang, P. G., **2010**, *Nat. Protoc.*, 5, (4), 636-646.

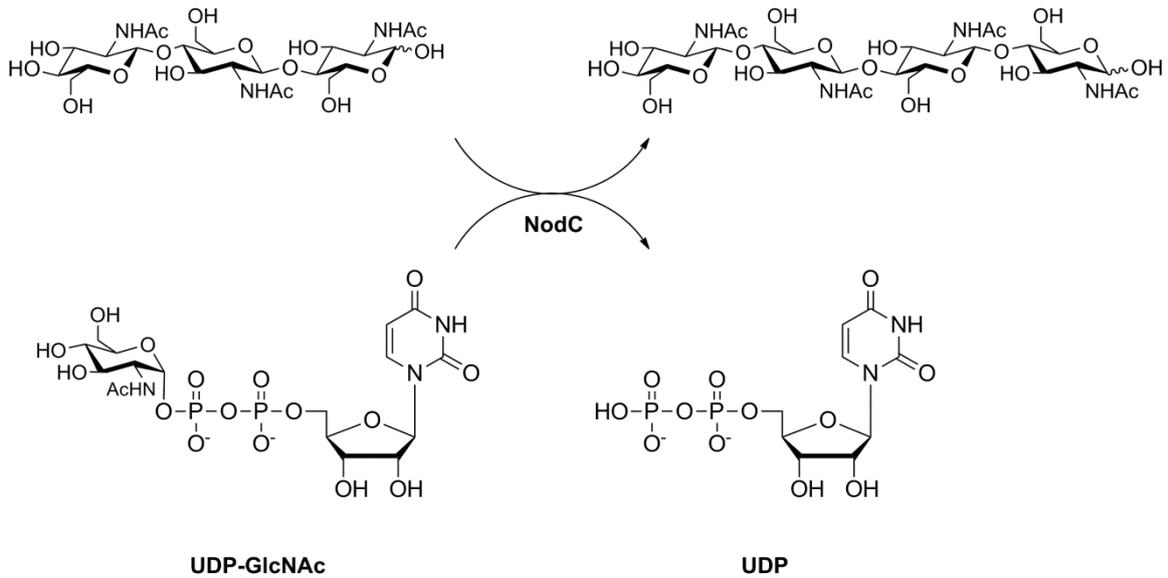


Figure 35. Mode d'action d'une glycosyltransférase de Leloir, NodC (*A. caulidonans*)²⁶.

En revanche, par un principe de synthèse *in vivo*, le coût énergétique de régénération du donneur peut être pris en charge par la cellule, rendant ainsi cette voie d'accès particulièrement intéressante pour une application à grande échelle. Cette approche qu'applique l'usine cellulaire via *E. coli*, permet de synthétiser des COs à l'échelle du gramme en utilisant les *N*-acétylglucosaminyltransférases NodC (*A. caulidonans*) et NodC (*S. meliloti*)⁴¹, qui donnent accès respectivement au chitinpentaose et au chitintétraose.

I.3.2.3. Utilisation de glycoside hydrolases

Une autre approche dans l'utilisation d'enzymes à des fins de synthèse est l'emploi de glycoside hydrolases. En dehors de leur activité d'hydrolyse des liaisons glycosidiques, un grand nombre de ces enzymes est capable de former de nouvelles liaisons entre un sucre donneur et un accepteur, par réaction de transglycosylation⁸¹. Les chitinases de la famille GH18, sont des glycoside hydrolases à rétention de configuration, potentiellement utilisables comme outils de synthèse en mettant à profit leur capacité à catalyser des réaction de transglycosylation. Cependant, le produit issu de l'activité de transglycosylation est également substrat pour la chitinase. L'oligomère nouvellement formé est donc hydrolysable par la même enzyme. Afin d'éviter cette hydrolyse, des enzymes mutantes peuvent être générées en modifiant dans le site catalytique certains acides aminés responsables de l'activité d'hydrolyse, tout en conservant la capacité de l'enzyme à réaliser

⁸¹ Zakariassen, H., Hansen, M. C., Joranli, M., Eijsink, V. G. H. and Sorlie, M., **2011**, *Biochemistry*, 50, (25), 5693-5703.

une réaction de couplage entre un donneur activé et un accepteur⁸².

Cette approche est limitée par l'accessibilité à un donneur de glycosylation activé (sous forme d'oxazoline) et la multiplicité des produits de réaction obtenus à cause de réactions de transglycosylation parasites et incontrôlées⁸³.

Il est à noter que l'expression de chitinases est intimement liée au processus de nodulation lors des symbioses plantes micro-organismes. De nombreuses études font état de chitinases au sein des nodosités, dégradant les LCOs, et régulant ainsi le signal⁸⁴. La spécificité de ces chitinases, notamment pour discriminer les COs des lipochitinoligosaccharides (LCOs), est remarquable⁸⁵. Par le procédé de transglycosylation, ces chitinases pourraient être un outil précieux pour accéder à des oligomères de chitines plus évolués, comme ceux portant des décorations (chaîne grasse, arabinose, fucose, sulfate, acétate, carbamoyle).

⁸² Kohri, M., Kobayashi, A. and Shoda, S.-i., **2007**, *Trends Glycosci. Glyc.*, 19, (107), 165-180.

⁸³ Martinez, E. A., Boer, H., Koivula, A., Samain, E., Driguez, H., Armand, S. and Cottaz, S., **2012**, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 74, (1-2), 89-96.

⁸⁴ Staehelin, C., Granado, J., Müller, J., Wiemken, A., Mellor, R. B., Felix, G., Regenass, M., Broughton, W. J. and Boller, T., **1994**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 91, (6), 2196-2200.

⁸⁵ Tian, Y., Liu, W., Cai, J., Zhang, L. Y., Wong, K. B., Feddermann, N., Boller, T., Xie, Z. P. and Staehelin, C., **2013**, *Plant Physiol.*, 163, (3), 1179-1190.

II. Résultats

L'identification d'une chitinase capable de dégrader la chitine pour ne donner majoritairement qu'un seul type d'oligomère constituerait une voie d'accès innovante aux COs. Par exemple, les chitobiosidases sont des exochitinases qui permettent la production de chitinbiose comme seul produit de dégradation. Ce dimère ne présente pas d'intérêt pour notre application. En revanche, il existe une laminaripentaose $\beta(1,3)$ -glucanase qui dépolymérise la laminarine, un homopolymère de $\beta(1,3)$ glucose, pour donner exclusivement du laminaripentaose⁸⁶. La question se pose de savoir s'il existe, chez les endochitinases, une enzyme capable de produire un oligomère de chitine d'au moins quatre unités.

Trois chitinases bactériennes ont pour caractéristique de ne produire majoritairement qu'un seul oligomère par digestion de la chitine. Les endochitinases ASCHI53 et ASCHI61 d'*Aeromonas schubertii* ont été décrites pour produire majoritairement du chitinhexaose à partir de chitine colloïdale⁸⁷⁻⁸⁸. L'endochitinase C2 de la bactérie mésophile *Oerskovia xanthineolytica* NCIM 2839 formerait, quant à elle, principalement du chitintétraose à partir du même substrat⁸⁹ (Figure 36). Le chitintétraose étant le squelette oligosaccharidique commun aux facteurs Nod et Myc, nous avons envisagé de purifier et de tester la capacité de la chitinase C2 pour la préparation de chitintétraose à l'échelle préparative.

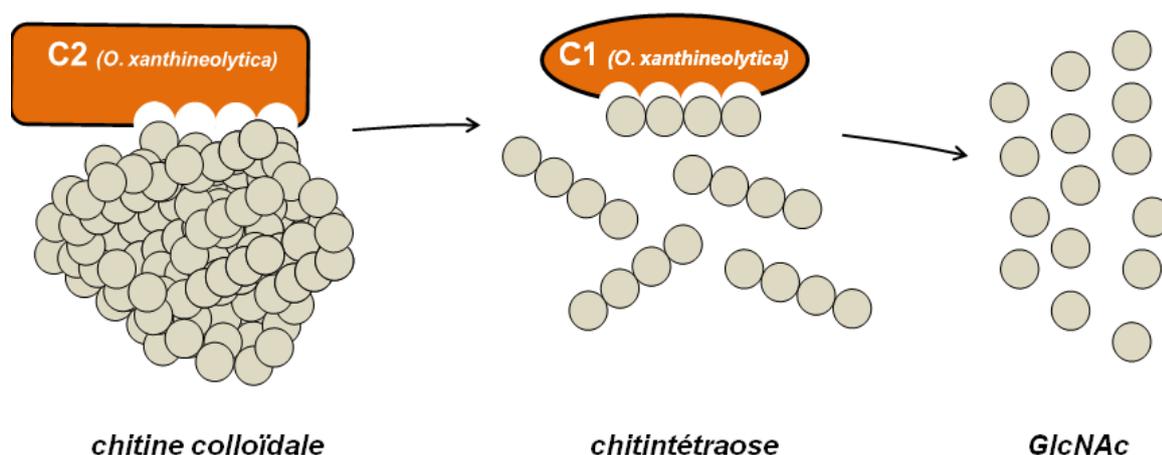


Figure 36. Mode d'action des chitinases C2 et C1 (*O. xanthineolytica*).

⁸⁶ Nakabayashi, M., Nishijima, T., Ehara, G., Nikaidou, N., Nishihashi, H. and Watanabe, T., **1998**, *J. Ferment. Bioeng.*, 85, (5), 459-464.

⁸⁷ Liu, C. L., Shen, C. R., Hsu, F. F., Chen, J. K., Wu, P. T., Guo, S. H., Lee, W. C., Yu, F. W., Mackey, Z. B., Turk, J. and Gross, M. L., **2009**, *Biotechnol. Prog.*, 25, (1), 124-131.

⁸⁸ Liu, C. L., Lin, T. H. and Juang, R. S., **2013**, *Int. J. Biol. Macromol.*, 62, 518-522.

⁸⁹ Waghmare, S. R. and Ghosh, J. S., **2010**, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 86, (6), 1849-1856.

Oerskovia xanthineolytica produit deux chitinases thermostables. Ces enzymes, secrétées dans le milieu de culture, dégradent la chitine afin de fournir à l'organisme une source de carbone et d'azote. L'une, nommée C2, est une endochitinase, qui possède une activité chitinolytique conduisant à un motif chitintétraose (CO-IV). L'autre, C1, est une exochitinase qui dégrade le produit de la première en monomères GlcNAc.

Au moment de l'étude, les séquences génétiques de ces enzymes n'ont pas été identifiées. Aussi, il n'est pas possible d'utiliser une approche d'expression recombinante de la chitinase C2. Le premier objectif est donc de mettre en évidence cette activité en induisant l'expression des chitinases chez l'organisme d'origine, puis d'isoler et d'évaluer l'activité de production du chitintétraose par C2.

II.1. La chitinase C2 (*Oerskovia xanthineolytica*)

II.1.1. Production et purification

La souche *Oerskovia xanthineolytica* a été obtenue à partir de la Collection Nationale de Micro-organismes Industriels indienne (www.ncl-india.org/files/NCIM/). Afin de vérifier l'activité chitinolytique de la souche, elle est mise en culture sur milieu pauvre solide (agar), avec comme source de carbone de la chitine colloïdale. Après 72 heures d'incubation à 45°C, une croissance de la bactérie *O. xanthineolytica* est observée avec un halo autour des colonies, traduisant très probablement une hydrolyse de chitine colloïdale, et démontrant ainsi que cet organisme possède bien une activité chitinolytique.

Il s'agit maintenant d'isoler la chitinase C2 de C1 et de confirmer son activité d'hydrolyse de la chitine colloïdale en chitintétraose. Le protocole de production s'inspire de celui utilisé lors de la description de l'enzyme⁸⁹.

Pour cela, la bactérie mésophile est placée durant trois jours en milieu liquide pauvre, à 45°C, et la production des chitinases est toujours induite grâce à de la chitine colloïdale, qui est dans cette culture, l'unique source de carbone disponible. Un suivi de densité optique (DO) à 600 nm confirme la croissance de la souche, et donc son activité chitinolytique, et, par conséquent la production et la sécrétion dans le milieu de culture de chitinases. Un protocole de purification de C2 est établi⁸⁹. Les protéines secrétées dans le milieu de culture sont précipitées au sulfate d'ammonium (75 %) puis resuspendues dans le tampon d'activité de l'enzyme (tampon phosphate de potassium 25 mM pH 7,5). Cet extrait est alors dialysé contre une membrane de 30 kDa afin de séparer C1 (23 kDa) de C2 (66 kDa). L'analyse par SDS-PAGE de la fraction purifiée révèle une très fine bande protéique légèrement en dessous de 66 kDa (Figure 37, piste 2), sans présence d'autres contaminants, particulièrement autour de 25 kDa, qui pourrait révéler la présence de C1.

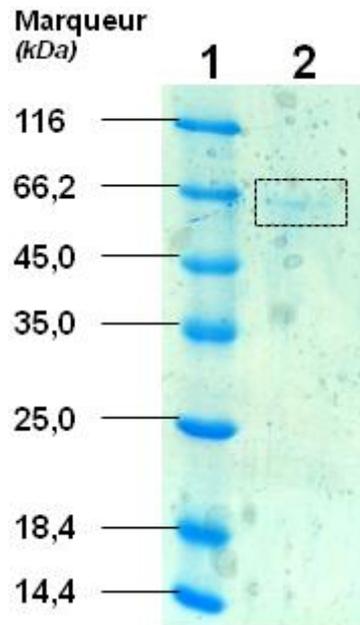


Figure 37. Analyse par SDS-PAGE à 10% de la chitinase C2 purifiée. (1) Marqueur de tailles. (2) Chitinase C2 purifiée.

II.1.2. Test d'activité

Un test d'activité est alors réalisé afin de vérifier l'activité chitinolytique de la protéine purifiée. L'enzyme C2 (50 µg, 0,8 nmol) est mise en présence de 0,5 % de chitine colloïdale dans 1 ml de son tampon d'activité (phosphate de potassium 25 mM pH 7,5) à 55°C pendant 20 heures. Le suivi de la réaction n'est pas possible par une analyse chromatographique sur couche mince (CCM) en raison d'une rafale d'oligomères de chitine, présents dès l'origine en solution dans la chitine colloïdale. Le suivi de la réaction a donc été réalisé par spectrométrie de masse.

Le brut réactionnel de l'action de C2 (*O. xanthineolytica*) sur la chitine colloïdale révèle la présence d'oligomères de chitine allant du CO-II au CO-V (Figure 38a). Le pic correspondant au CO-IV n'est pas majoritaire. L'analyse par spectrométrie de masse de la chitine colloïdale (avant addition d'enzyme) révèle un mélange d'oligomères similaire, du CO-II au CO-VI (Figure 38b). Les deux spectres de masse se ressemblant fortement, cela semble indiquer qu'aucune hydrolyse ne s'est produite en présence de C2.

Afin de compléter l'étude, une réaction est menée avec une chitinase vacuolaire de haricot⁹⁰ dans des conditions réactionnelles similaires (50 µg de chitinase). Le spectre de masse du mélange réactionnel brut révèle un pic intense correspondant au produit majoritaire attendu, le CO-II, ainsi qu'un pic de CO-III et de CO-IV (Figure 39). Ce résultat démontre que la chitine colloïdale préparée pour cette étude est sensible à l'action chitinolytique.

⁹⁰ Iseli, B., Armand, S., Boller, T., Neuhaus, J. M. and Henrissat, B., **1996**, *FEBS Lett.*, 382, (1-2), 186-188.

L'absence d'hydrolyse de ce substrat par la chitinase C2 (*O. xanthineolytica*) laisse supposer que cette enzyme n'est pas active dans les conditions expérimentales utilisées. Le très faible niveau d'expression de C2 ne permet peut être pas d'observer une activité.

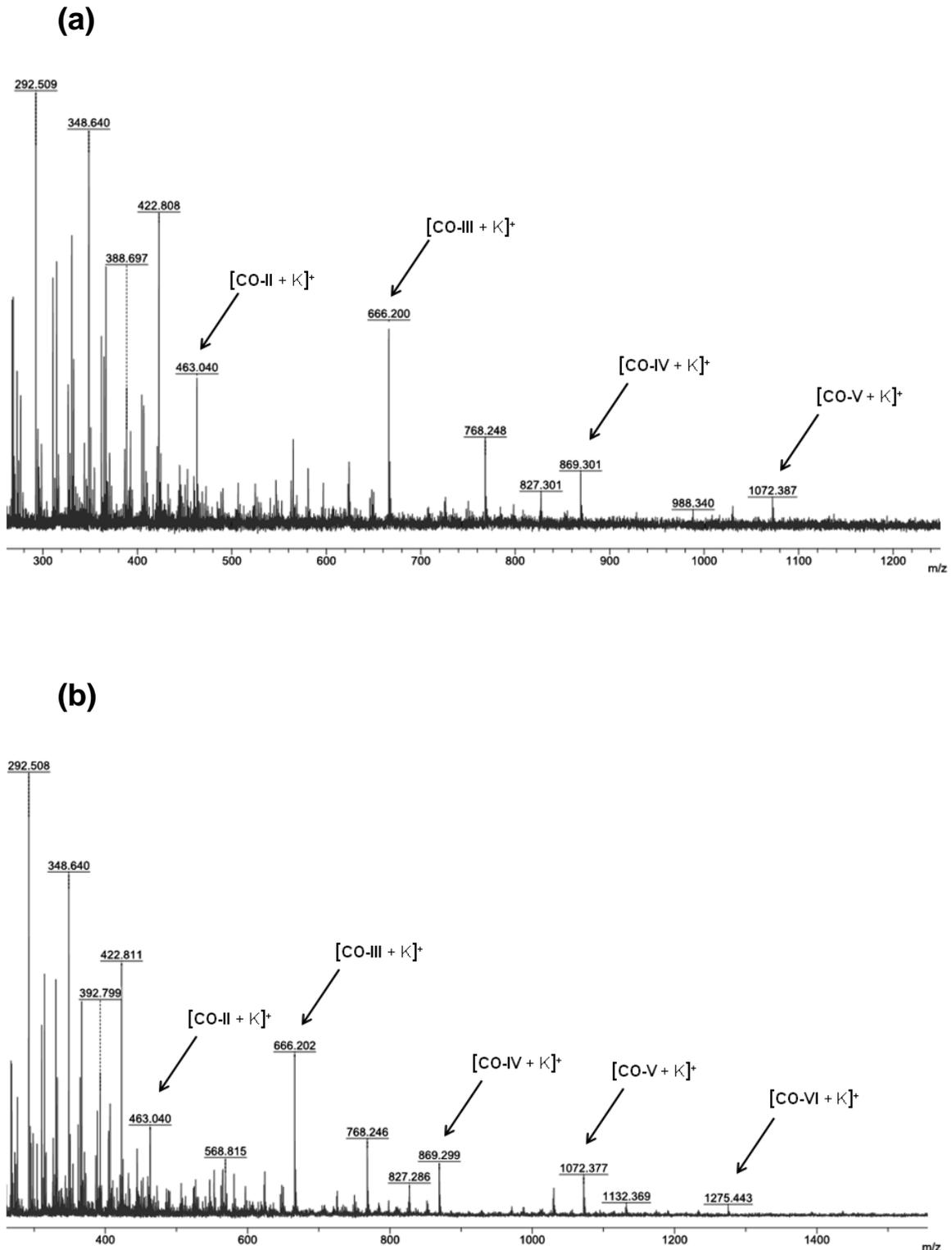


Figure 38. Spectres de masse MALDI-TOF (mode positif) (a) de l'action de C2 sur la chitine colloïdale, (b) de la chitine colloïdale avant addition de la chitinase C2 (bruts réactionnels).

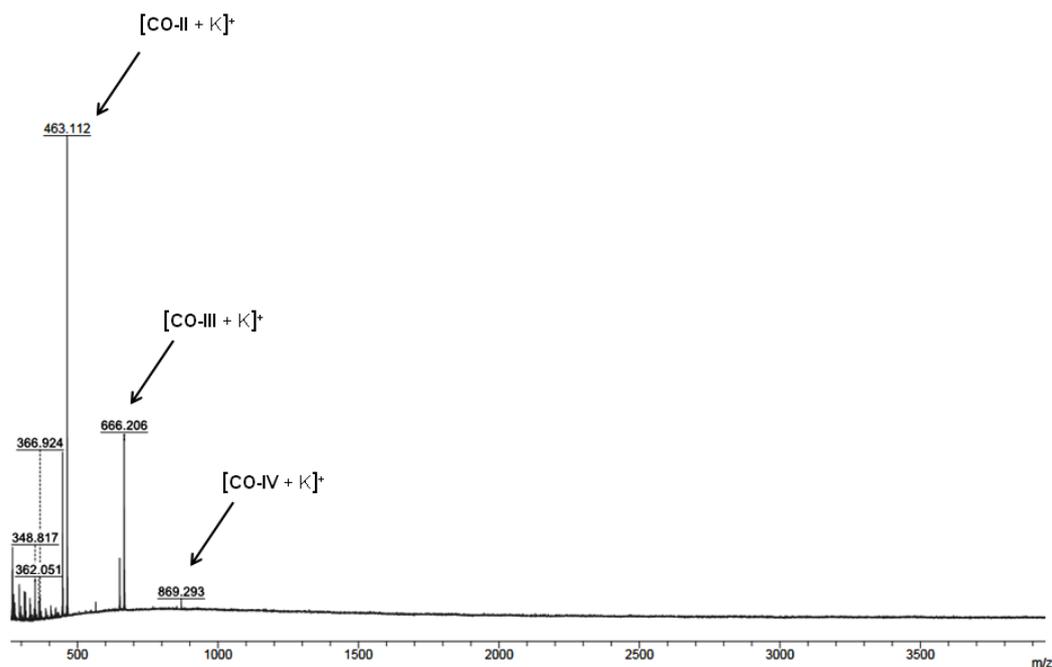


Figure 39. Spectre de masse MALDI-TOF (mode positif) de l'action de la chitinase de haricot sur la chitine colloïdale (brut réactionnel).

II.2. Les oligomères de chitosane

Afin de s'assurer un accès aux oligomères de chitine, la seconde voie explorée est l'utilisation d'un mélange commercial d'oligomères de chitosane. Ils sont issus de la dépolymérisation enzymatique du chitosane par la chitosanase BN-262 (*Bacillus pumilus*)⁷⁵. Au cours de l'hydrolyse, les oligomères sont purifiés en continu à travers une membrane d'ultrafiltration. Ce procédé a été adapté à l'échelle industrielle et le mélange obtenu commercialisé par Kitto Life Co. (Corée du Sud), sous le nom de FACOS. 80% du mélange est composé de CO-II au CO-VI.

Oligomère (CO)	Quantité (mg)	Rendement
CO-II	86,4	8,6 %
CO-III	157,2	15,7 %
CO-IV	196,4	19,6 %
CO-V	148,0	14,8 %
CO-VI	78,4	7,8 %
CO-VII + CO-VIII	81,2	8,1 %

Tableau 5. Bilan de purification des COs à partir d'un gramme de mélange de COs.

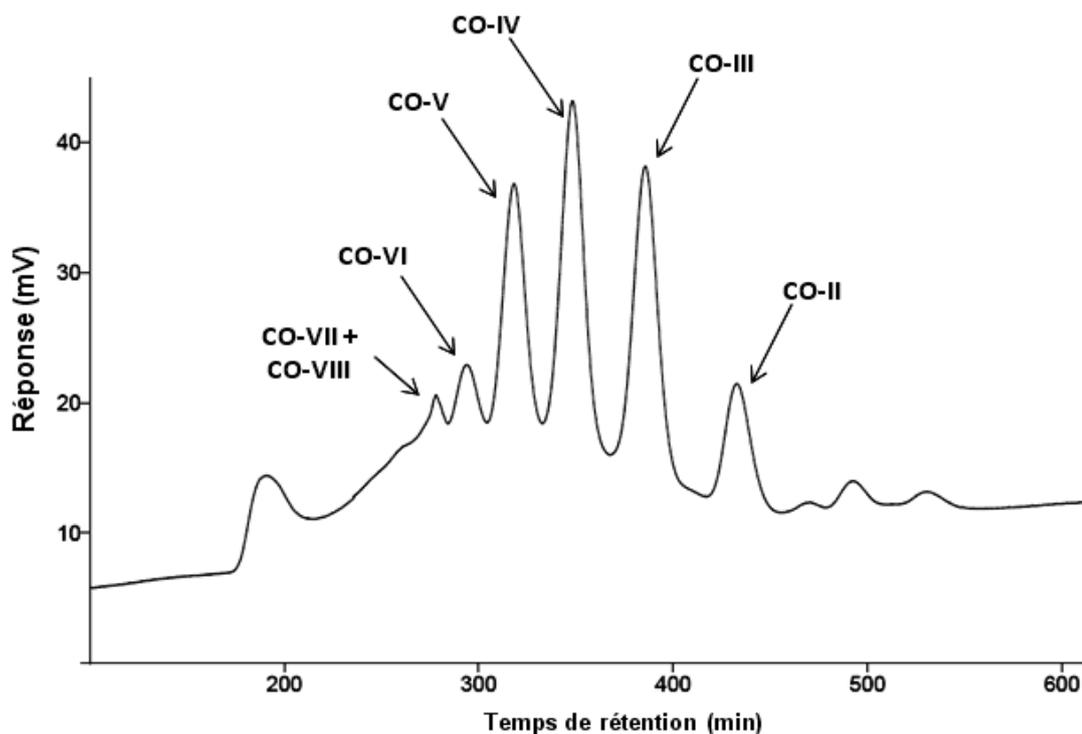


Figure 40. Chromatogramme SEC (Biogel P4, éluant eau) du FACOS *per N*-acétylé.

Le mélange commercial, comprenant approximativement 10% d'unités GlcNAc et 90% de GlcN, est d'abord *per N*-acétylé et purifié sur une résine échangeuse de cations, afin de s'assurer d'un degré d'acétylation total. Les chitinoligosaccharides sont ensuite séparés par chromatographie d'exclusion de tailles (Biogel P4, éluant eau) (Figure 40). Les fractions d'intérêt sont regroupées, concentrées et lyophilisées. Les oligomères sont ensuite conservés à 4°C. Les quantités de produits isolés atteignent l'échelle de la centaine de mg, en partant d'un gramme de mélange de COs (Tableau 5). Les rendements obtenus, particulièrement pour les oligomères chitintétraose et chitinpentaose, sont particulièrement intéressants pour notre application.

Les oligomères sont caractérisés par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Figure 41) et par chromatographie liquide haute performance (HPLC) (Figure 42). Les oligomères CO-IV, CO-V et CO-VI seront utilisés pour l'étude de remodelage enzymatique.

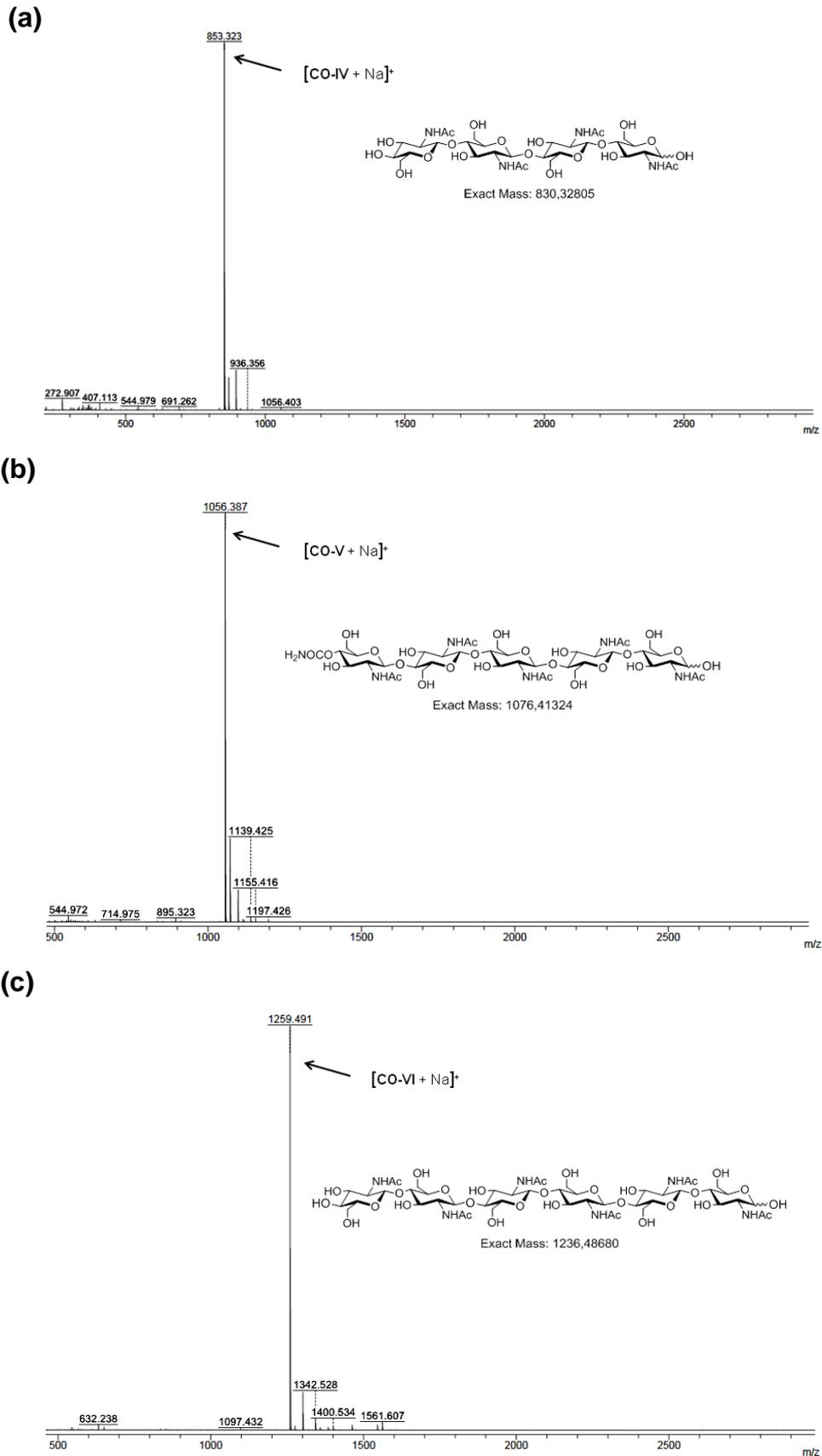


Figure 41. Spectres de masse MALDI-ToF (mode positif) des oligomères de chitine purifiés. (a) CO-IV (b) CO-V (c) CO-VI.

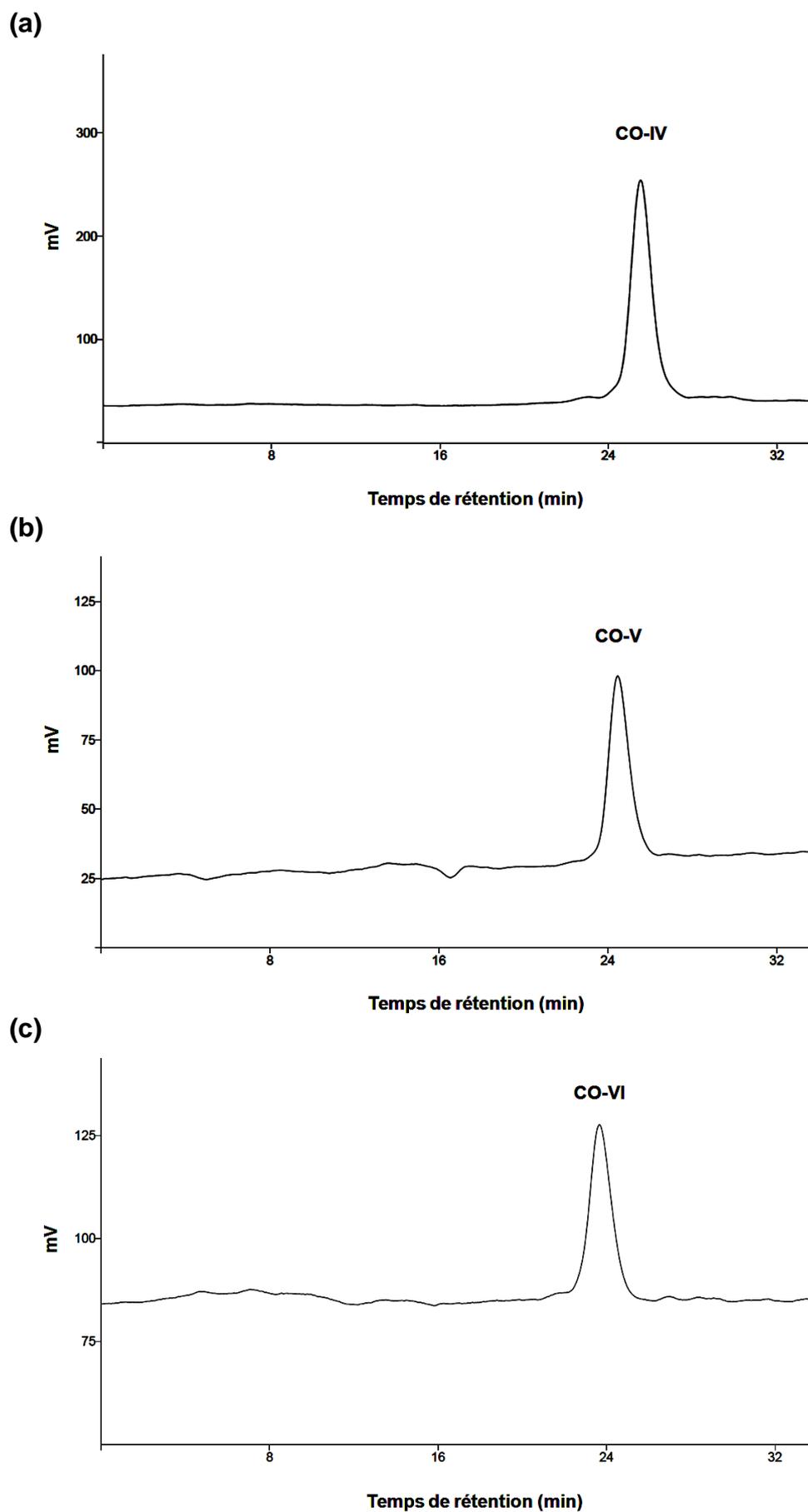


Figure 42. Analyses HPLC des oligomères de chitine purifiés (a) CO-IV (b) CO-V (c) CO-VI.

III. Conclusion

Dans ce travail, deux approches de dépolymérisation de la chitine par voie enzymatique ont été envisagées, afin d'avoir un accès facile à des chitinoligosaccharides, qui serviront de bases pour la construction de lipochitinoligosaccharides, ainsi que de leurs dérivés.

La première voie explorée est la dépolymérisation de la chitine par la chitinase C2 (*O. xanthineolytica*). L'activité chitinolytique de cette hydrolase est particulièrement intéressante, et ceci pour deux raisons ; (i) le produit de l'action de l'enzyme correspond aux squelettes saccharidiques communs aux facteurs de nodulation et de mycorhization ; (ii) son activité chitinolytique singulière, qui s'affranchit du motif répétitif de la chitine (chitinbiose), pour ne produire que du chitintétraose est unique. L'accès à cette enzyme aurait ainsi constitué un outil de synthèse extrêmement intéressant pour l'obtention de précurseurs de LCOs. Malheureusement, l'activité chitinolytique de C2 n'a pas été détectée au cours de ce travail. Il est fort probable que ceci soit dû à une très faible expression de l'enzyme⁸⁹.

Une approche génomique, avec l'identification du gène codant pour l'enzyme, permettrait d'envisager son expression recombinante. *Oerskovia xanthineolytica* est également connu sous les basonymes *Cellulomonas cellulans*⁹¹ et *Cellulosimicrobium cellulans*⁹². Très récemment, deux souches de cet organisme ont été séquencées (*C. cellulans* LMG16121 et *C. cellulans* J36), ouvrant la perspective de travailler directement avec les gènes identifiés comme étant des gènes codant pour des chitinases, afin de les exprimer par voie recombinante puis d'évaluer leurs activités. Dans ce sens, le protéome de la souche *C. cellulans* J36 est maintenant disponible et trois séquences de gènes codant pour des chitinases ont été identifiées (Tableau 6), confirmant le caractère chitinolytique de la souche *O. xanthineolytica*. L'approche recombinante est désormais envisageable.

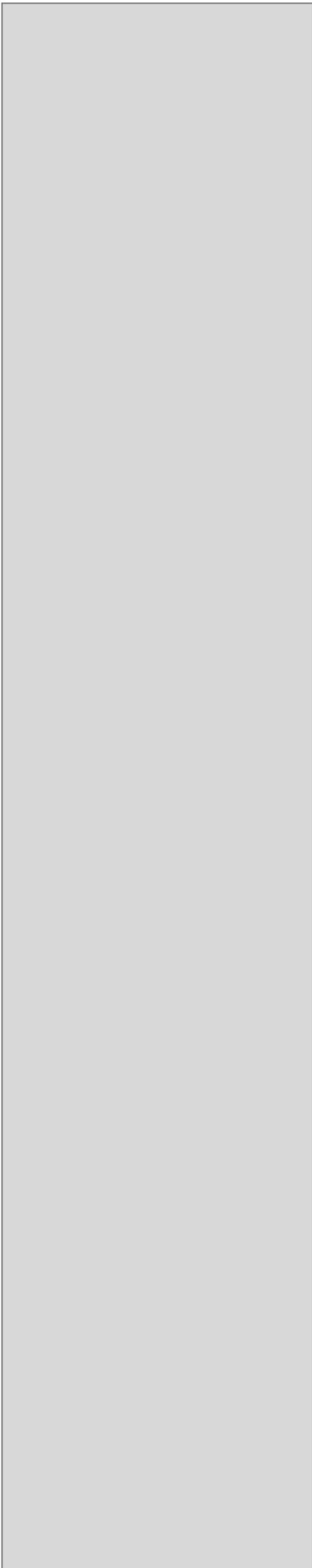
Entrée	Longueur (acide aminés)	Poids		N°accession
		moléculaire	Famille	
Chitinase 1	635	67,9	GH18	WP_02484227 / GI:640261642
Chitinase 2	301	31,4	GH19	WP_024841400.1 / GI:640259417
Chitinase 3 (partielle)	855	90,6	GH18	WP_024842039.1 / GI:640261024

Tableau 6. Identification des chitinases chez *C. cellulans* J36.

⁹¹ Stackebrandt, E., Seiler, H. and Schleifer, K. H., **1982**, *Zbl. Bakt. Mik. Hyg. I. C.*, 3, (3), 401-409.

⁹² Schumann, P., Weiss, N. and Stackebrandt, E., **2001**, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51, 1007-1010.

La seconde stratégie explorée utilise comme matériel de départ un mélange commercial d'oligomères de chitosane, obtenu par une hydrolyse enzymatique de la chitosanase BN-262 (*Bacillus pumilus*). La préparation des chitinoligosaccharides s'effectuent en deux étapes. Dans un premier temps, le mélange d'oligomères de chitosane est *per N*-acétylé pour obtenir un mélange d'oligomères de chitine. Dans un second temps, ces chitinoligosaccharides sont purifiés et séparés les uns des autres par chromatographie d'exclusion de tailles. Les rendements obtenus en produits isolés sont particulièrement intéressants pour notre application, spécialement ceux concernant les CO-IV, CO-V et CO-VI. C'est donc en utilisant cette voie d'accès aux chitinoligosaccharides que le remodelage enzymatique va pouvoir être réalisé.



CHAPITRE IV

DECORATION DES CHITINOLIGOSACCHARIDES

I.	Rappels bibliographiques : la décoration par carbamoylation	124
I.1.	La carbamoylation chez les lipochitinoligosaccharides	124
I.2.	Le carbamoyle phosphate.....	125
I.2.1.	Généralités	125
I.2.2.	Synthèse chez les procaryotes	125
I.3.	Les types de carbamoylation	126
I.3.1.	La N-carbamoylation	126
I.3.2.	La S-carbamoylation	128
I.3.3.	La O-carbamoylation.....	130
I.4.	Des caractéristiques biochimiques communes.....	131
II.	Résultats et discussion de la décoration par carbamoylation	132
II.1.	Expression de NoLO (<i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234A)	133
II.1.1.	Stratégie d'expression.....	133
II.1.2.	Etudes d'induction de l'expression de NoLO	133
II.1.3.	Production et purification de NoLO.....	135
II.2.	Etude de stabilité du carbamoyle phosphate	136
II.3.	Alignement de séquences d'O-carbamoyltransférases.....	138
II.4.	Tests d'activité de NoLO	141
II.5.	Perspectives.....	143
II.5.1.	Séquence primaire.....	143
II.5.2.	Stratégie d'expression.....	144
II.5.3.	Production de chitinoligosaccharides carbamoylés <i>in vivo</i>	144
III.	Rappels bibliographiques : la décoration par sulfatation	145
III.1.	La sulfatation chez les lipochitinoligosaccharides	145
III.2.	Le 3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate	147
III.3.	Voies d'accès au PAPS.....	148
III.3.1.	Synthèse	148
III.3.2.	Synthèse et régénération du PAPS.....	149
IV.	Résultats et discussion de la décoration par sulfatation	152
IV.1.	Stratégie	152
IV.2.	Expression de l'arylsulfotransférase IV (<i>Rattus norvegicus</i>).....	152

IV.2.1. Stratégie d'expression.....	152
IV.2.2. Etude d'induction de l'expression de l'AST-IV.....	153
IV.2.3. Production et purification de l'AST-IV.....	154
IV.3. Expression de NodH (<i>Sinorhizobium meliloti</i>).....	155
IV.3.1. Stratégie d'expression.....	155
IV.3.2. Etudes d'induction de l'expression de NodH.....	155
IV.3.3. Production et purification de NodH.....	157
IV.4. Synthèse préparative de chitinoligosaccharides sulfatés.....	157
V. Conclusion.....	160

Les symbioses sont réduites à des alliances particulières entre les plantes et les micro-organismes, et ces associations sont dépendantes de la reconnaissance des facteurs Nod et des facteurs Myc par des récepteurs situés sur les racines des plantes. En plus de la longueur variable de la charpente chitinoligosaccharidique, les décorations des lipochitinoligosaccharides jouent un rôle dans cette spécificité de reconnaissance entre partenaires²⁵. Les facteurs de nodulation présentent la plus grande diversité moléculaire, où l'essentiel des décorations se retrouve sur les hydroxyles des extrémités réductrices et non réductrices de la chaîne chitinoligosaccharidique. La mise au point de méthodologies de purification et de caractérisation par spectrométrie de masse des facteurs Nod⁸ a permis la résolution de plus d'une centaine de structures²⁴. Les facteurs Myc décrits à l'heure actuelle ne semblent posséder, quant à eux, qu'une seule et unique décoration en plus de la chaîne grasse, la sulfatation en *O*-6 sur le sucre réducteur¹².

Les LCOs peuvent être décorés sur six positions différentes (Figure 43). Parmi les motifs, on retrouve les groupements *O*-fucosyle, *O*-arabinosyle, *O*-acétyle, *N*-méthyle, ou bien encore *O*-sulfate et *O*-carbamoyle. Ce sont ces deux dernières modifications qui ont retenu notre attention pour décorer les oligomères de chitine précédemment obtenus. La première pour son rôle reconnu dans les spectres de reconnaissance entre plantes et micro-organismes, la seconde pour son étude encore incomplète à ce jour.

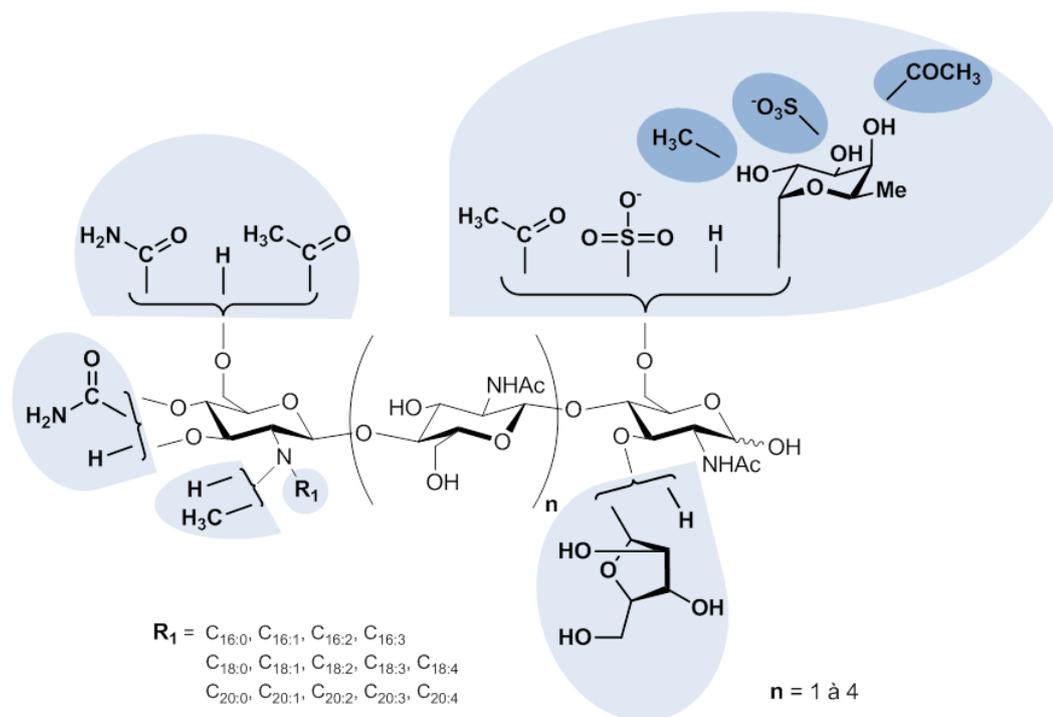


Figure 43. Décorations des lipochitinoligosaccharides.

I. Rappels bibliographiques : la décoration par carbamoylation

Les réactions de carbamoylation sont très présentes au sein du vivant et l'on distingue trois différents types. L'un d'eux, la *N*-carbamoylation, intervient au sein de voies métaboliques essentielles, comme la synthèse de bases pyrimidiques, ou bien dans celle de l'arginine, au sein du cycle de l'urée⁹³. Les deux autres types sont la *S*-carbamoylation et la *O*-carbamoylation, qui ont lieu sur des métabolites dits secondaires. Les enzymes impliquées dans le transfert du groupement carbamoylé sont appelées des carbamoyltransférases (EC 2.1.3.-).

I.1. La carbamoylation chez les lipochitinoligosaccharides

La décoration par carbamoylation n'a été décrite que chez les facteurs de nodulation parmi cinq genres de bactéries fixatrices d'azote (*Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* et *Sinorhizobium*) capables de sécréter des LCOs carbamoylés, au travers de 17 souches identifiées²⁴. La gamme d'hôtes sensibles à ces souches bactériennes est donc potentiellement étendue. Le haricot, le lotus, ou bien encore le soja sont décrits pour avoir une sensibilité à des rhizobiums produisant des LCOs carbamoylés²⁹. Cependant, ces derniers sécrètent leurs facteurs de nodulation sous forme de mélange, et le peu d'études à ce jour ne permet pas d'expliquer précisément le rôle de cette décoration dans la mise en place de la symbiose fixatrice d'azote.

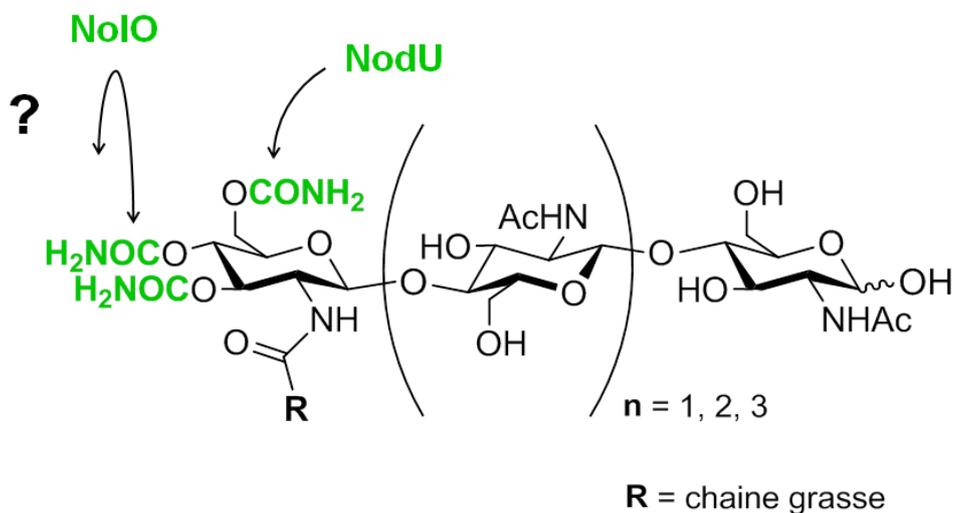


Figure 44. Carbamoylation des facteurs de nodulation.

⁹³ Morris, S. M., 2002, *Annu. Rev. Nutr.*, 22, 87-105.

Cette décoration par *O*-carbamoylation a lieu uniquement à l'extrémité non réductrice du chitinoligosaccharide, et sur au moins deux positions différentes par l'intermédiaire de deux carbamoyltransférases (CT) identifiées, NodU (*Azorhizobium caulinodans*)⁹⁴ et Nolo (*Sinorhizobium fredii* NGR234A)⁹⁵, qui ajoutent un groupement carbamoyle respectivement en *O*-6 et en *O*-3 (ou en *O*-4) (Figure 44). En effet, l'action de la CT Nolo n'est pas encore totalement connue, et la position modifiée par l'enzyme reste à définir. Il semble cependant que la carbamoylation ait lieu en *O*-3 et que le groupement présente une aptitude migratrice vers la position 4. L'identification des gènes responsables de la décoration a été réalisée par invalidation génique, et aucune activité *in vitro* de ces enzymes n'a encore été observée. De même, aucune synthèse chimique ou enzymatique de LCOs n'a jusqu'à ce jour été réalisée avec un groupement carbamoyle. Devant le peu d'informations concernant la biochimie de ces enzymes, nous avons considéré que le donneur est le carbamoyle phosphate, ce dernier étant le donneur de carbamoyle pour l'ensemble des carbamoyltransférases connues.

I.2. Le carbamoyle phosphate

I.2.1. Généralités

Le précurseur carbamoyle phosphate est un composé organophosphoré. L'enzyme responsable de sa biosynthèse, la carbamoyle phosphate synthétase (CPS), est ubiquitaire au sein du vivant. Cet hétérodimère se retrouve chez les virus, les archées, les bactéries, les protistes, les champignons, les plantes et les animaux. La CPS est donc également présente chez les rhizobiums (grande sous unité, GenBank N°ACP25341.1 / petite sous unité, GenBank N°ACP26033.1).

I.2.2. Synthèse chez les procaryotes

La structure tridimensionnelle de la CPS (*E. coli*) a été résolue⁹⁶. Cette enzyme présente un mécanisme moléculaire d'action particulièrement complexe. Trois sites actifs ont été identifiés, topologiquement éloignés mais reliés entre eux par un tunnel moléculaire. Dans un premier temps, une molécule de bicarbonate est activée par de l'adénosine-5'-triphosphate (ATP) pour former du carboxyphosphate, premier intermédiaire réactionnel instable (temps de ½ vie = 70 ms) (Figure 45).

⁹⁴ D'Haese, W., Van Montagu, M., Prome, J. C. and Holsters, M., **1999**, *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 12, (1), 68-73.

⁹⁵ Jabbouri, S., Relic, B., Hanin, M., Kamalaprija, P., Burger, U., Prome, D., Prome, J. C. and Broughton, W. J., **1998**, *J. Biol. Chem.*, 273, (20), 12047-12055.

⁹⁶ Thoden, J. B., Holden, H. M., Wesenberg, G., Raushel, F. M. and Rayment, I., **1997**, *Biochemistry*, 36, (21), 6305-6316.

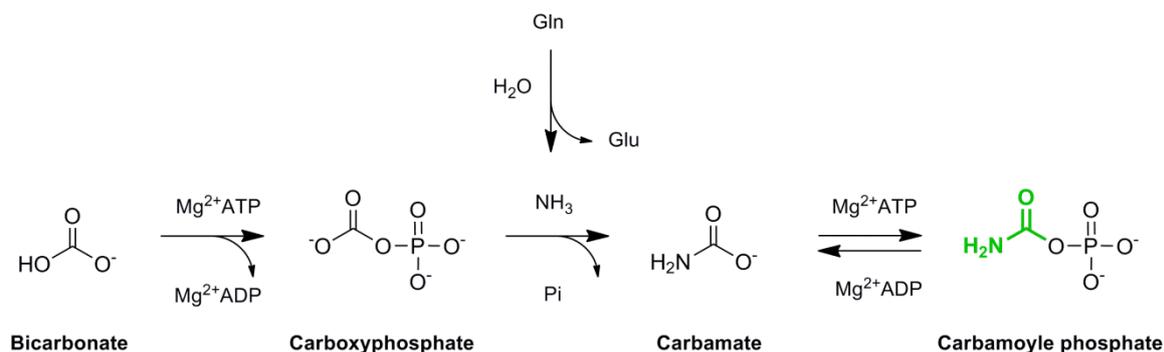


Figure 45. Réaction catalysée par la carbamoyl phosphate synthase.

Simultanément, la glutamine est hydrolysée en glutamate et libère une molécule d'ammoniaque. Cette dernière réagit avec le carboxyphosphate pour former un nouvel intermédiaire, lui-même également instable, le carbamate (temps de $\frac{1}{2}$ vie = 28 ms). Enfin, le carbamate attaque une seconde molécule d'ATP pour former le carbamoyl phosphate. Ce dernier, relativement plus stable, posséderait un temps de $\frac{1}{2}$ vie estimé à 5 minutes à 37°C⁹⁷. L'ensemble de ce processus de biosynthèse a lieu au sein d'un tunnel moléculaire. Cela faciliterait ainsi la translocation des intermédiaires instables d'un site à un autre, tout en les protégeant de la dégradation⁹⁸.

I.3. Les types de carbamoylation

I.3.1. La N-carbamoylation

Le processus de N-carbamoylation intervient sur des voies métaboliques importantes pour le vivant. Les types de N-carbamoylation les plus décrits sont ceux de l'aspartate carbamoyltransférase et de l'ornithine carbamoyltransférase. Ces enzymes sont impliquées respectivement dans les voies de biosynthèse de bases pyrimidiques et dans celle de l'arginine. Au sein du cycle de synthèse de l'arginine, le groupement carbamoyl est transféré sur l'ornithine, tandis que dans la voie de synthèse des pyrimidines, le groupement carbamoyl est condensé avec de l'aspartate (Figure 46).

La structure tridimensionnelle de l'aspartate carbamoyltransférase (*E. coli*) a été résolue⁹⁹, facilitant la compréhension des mécanismes biochimiques engagés. C'est une enzyme allostérique, inhibée par une combinaison uridine-5'-triphosphate (UTP) / cytidine-5'-triphosphate (CTP) / cation divalent et activée par l'ATP / guanosine-5'-triphosphate (GTP)

⁹⁷ Wang, Q., Xia, J. R., Guallar, V., Krilov, G. and Kantrowitz, E. R., **2008**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 105, (44), 16918-16923.

⁹⁸ Huang, X. Y., Holden, H. M. and Raushel, F. M., **2001**, *Annu. Rev. Biochem.*, 70, 149-180.

⁹⁹ Lipscomb, W. N. and Kantrowitz, E. R., **2012**, *Accounts Chem. Res.*, 45, (3), 444-453.

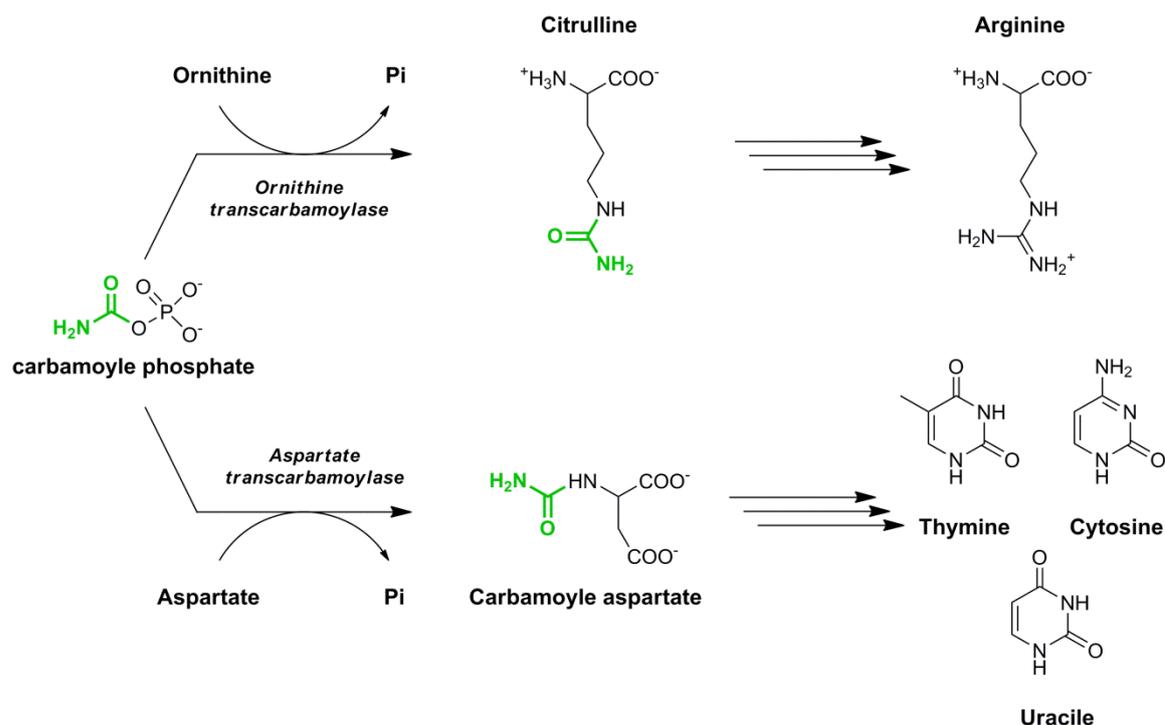


Figure 46. N-carbamoylation dans les voies de biosynthèse de l'arginine et des bases pyrimidiques.

/ cation divalent¹⁰⁰. Cela permet une régulation très fine de cette importante voie métabolique. Il s'agit d'un dodécamère, composé d'unités régulatrices (deux trimères) comprenant chacune un domaine de liaison allostérique et un domaine à zinc. Les unités catalytiques (deux trimères) présentent un site de liaison pour le carbamoyl phosphate et un site de liaison pour l'aspartate. Le carbamoyl phosphate réagit directement sur son substrat par une attaque nucléophile, et libère un phosphate inorganique. Le carbamoyl aspartate est ensuite utilisé dans la voie de biosynthèse des bases pyrimidiques.

L'ornithine carbamoyltransférase appartient à la même famille que l'aspartate carbamoyltransférase et présente des similarités avec cette dernière. C'est une enzyme trimérique (*E. coli*) qui comporte un site de fixation pour l'ornithine et un site de fixation pour le carbamoyl phosphate sur chaque chaîne polypeptidique¹⁰¹. La carbamoylation a lieu comme pour la première voie décrite ici, dans laquelle le carbamoyl phosphate réagit directement sur son substrat.

¹⁰⁰ Cockrell, G. M., Zheng, Y. N., Guo, W. Y., Peterson, A. W., Truong, J. K. and Kantrowitz, E. R., **2013**, *Biochemistry*, 52, (45), 8036-8047.

¹⁰¹ Ha, Y., McCann, M. T., Tuchman, M. and Allewell, N. M., **1997**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 94, (18), 9550-9555.

I.3.2. La S-carbamoylation

Le second type de carbamoylation décrit est la S-carbamoylation. Elle intervient dans le phénomène de maturation d'hydrogénases, nommées HypE et responsables du métabolisme du dihydrogène et de son oxydation en deux protons et deux électrons chez les archées, les bactéries anaérobies et quelques eucaryotes. Ces enzymes sont particulièrement bien étudiées, en raison de potentielles applications pour la production d'hydrogène *in vivo* au sein d'usines cellulaires¹⁰². Ces enzymes possèdent un métal au cœur de leur site actif (fer ou nickel), coordonné par deux ligands cyanure et un ligand carbonyle. La S-carbamoylation intervient dans une étape de maturation d'une cystéine du site actif, permettant de passer d'un groupement thiol au ligand cyanure¹⁰³.

La S-carbamoylation est différente de la N-carbamoylation, d'abord parce qu'elle n'intervient pas sur des voies métaboliques fondamentales, mais surtout par les processus biochimiques engagés. La S-carbamoylation s'effectue en trois étapes, par l'intermédiaire d'une seule enzyme, nommée HypF, dont la structure a été résolue, chez *E. coli*¹⁰⁴, chez *Thermococcus kodakarensis*¹⁰⁵ et chez *Thermoanaerobacter tengcongensis*¹⁰⁶.

La résolution de ces structures révèle que la réaction de carbamoylation passe par deux intermédiaires, le carbamate et le carbamoyladénylate, et utilise le carbamoyle phosphate et l'ATP comme substrats (Figure 47).

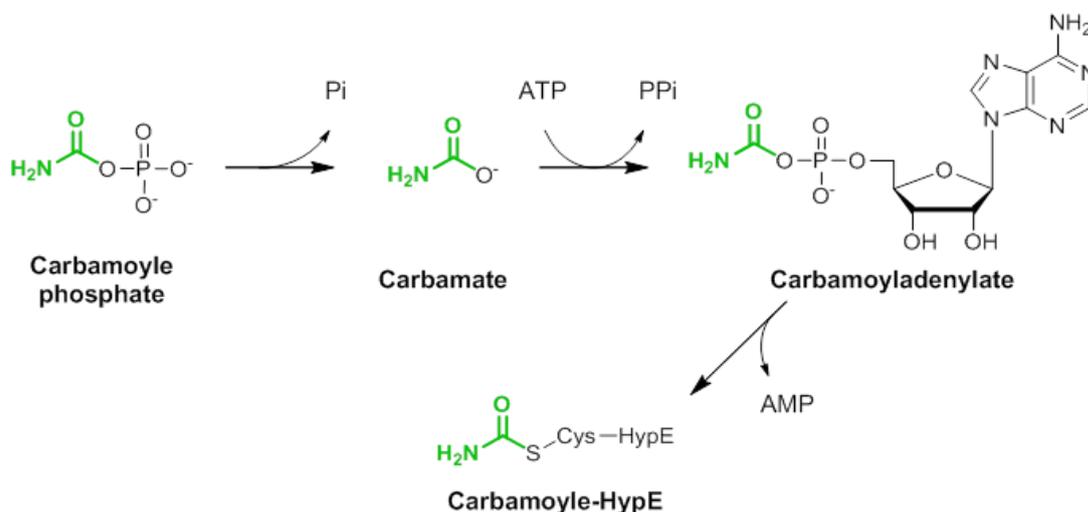


Figure 47. Mécanisme réactionnel de S-carbamoylation de HypE (*T. tengcongensis*), par la carbamoyltransférase HypF (*T. tengcongensis*).

¹⁰² Kruse, O. and Hankamer, B., **2010**, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 21, (3), 238-243.

¹⁰³ Reissmann, S., Hochleitner, E., Wang, H. F., Paschos, A., Lottspeich, F., Glass, R. S. and Bock, A., **2003**, *Science*, 299, (5609), 1067-1070.

¹⁰⁴ Petkun, S., Shi, R., Li, Y. G., Asinas, A., Munger, C., Zhang, L. H., Waclawek, M., Soboh, B., Sawers, R. G. and Cygler, M., **2011**, *Structure*, 19, (12), 1773-1783.

¹⁰⁵ Tominaga, T., Watanabe, S., Matsumi, R., Atomi, H., Imanaka, T. and Miki, K., **2012**, *Acta Crystallogr. F-Struct. Biol. Cryst. Commun.*, 68, 1153-1157.

¹⁰⁶ Shomura, Y. and Higuchi, Y., **2012**, *J. Biol. Chem.*, 287, (34), 28409-28419.

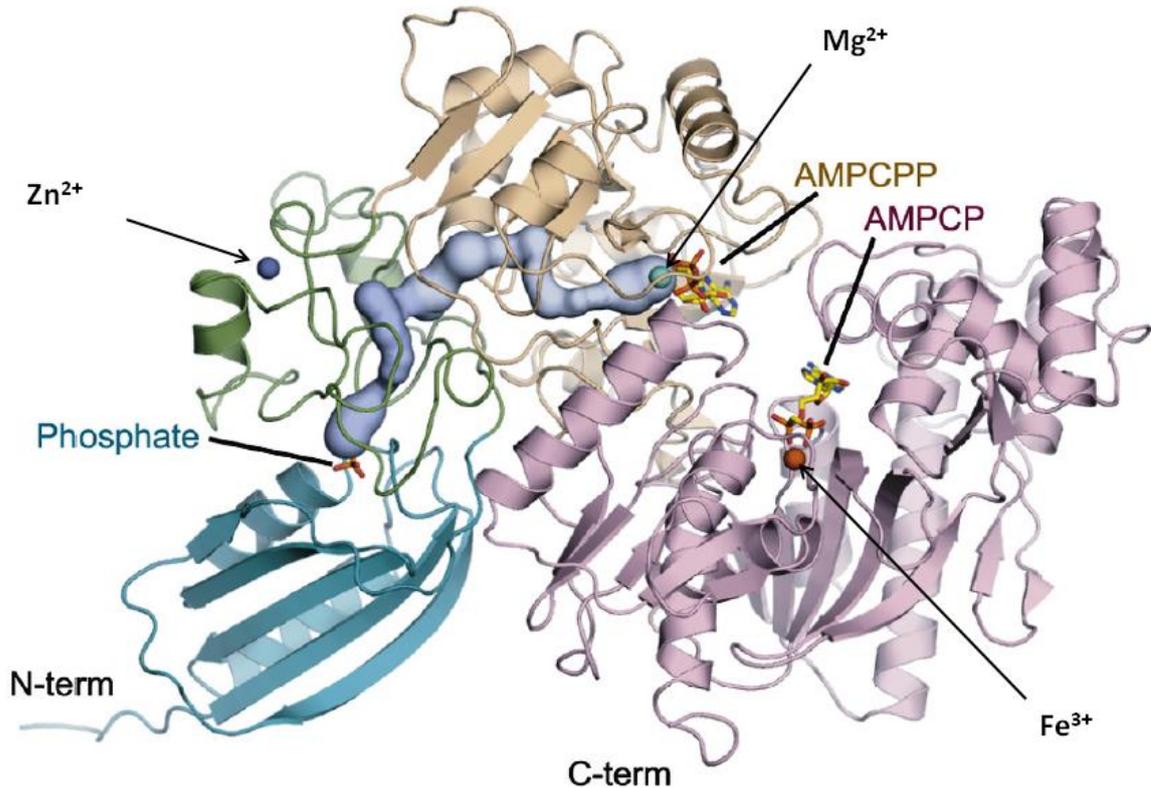


Figure 48. Structure de HypF (*T. tengcongensis*), adapté de Shomura et Higuchi¹⁰⁴.
(AMPCPP : analogue non métabolisable de l'ATP. AMPCP : analogue non métabolisable de l'ADP).

Les intermédiaires étant instables, les trois réactions sont consécutives, et sans relargage des substrats par l'enzyme. Deux cations Zn^{2+} , ainsi qu'un Mg^{2+} et un Fe^{3+} sont nécessaires au bon repliement de l'enzyme et à son fonctionnement (ou trois Zn^{2+} et un Mg^{2+} chez *E. coli* et chez *T. kodakarensis*).

On retrouve également un tunnel moléculaire, allant du site de fixation du carbamoyle phosphate au site de fixation de l'ATP (Figure 48). Il conduit l'intermédiaire carbamate jusqu'au nucléotide. Sur un troisième site actif, le carbamoyladénylate va permettre la carbamoylation de la cystéine, à l'aide de la coordination d'un atome de Fe^{3+} . Enfin, HypF présente des homologies de séquence avec la famille des *O*-carbamoyltransférases CmCH/NodU¹⁰⁷, à laquelle appartient également NodO.

¹⁰⁷ Coque, J. J. R., Perezllarena, F. J., Enguita, F. J., Fuente, J. L., Martin, J. F. and Liras, P., **1995**, *Gene*, 162, (1), 21-27.

I.3.3. La O-carbamoylation

La O-carbamoylation est observée sur des métabolites dits secondaires. Les cibles sont des antibiotiques comme la novobiocine¹⁰⁸ et le nebramycine¹⁰⁹. Dans un autre domaine, ce sont les facteurs de nodulation⁹⁵⁻¹¹⁰ et la saxitoxine¹¹¹ (un agent paralysant) qui peuvent être carbamoylés.

Il est acquis que le précurseur fournissant le groupement carbamoylé est également le carbamoylé phosphate. Des travaux¹⁰⁸⁻¹¹¹ ont révélé une dépendance pour ce type de carbamoylation au couple Mg^{2+} -ATP (Figure 49), confirmée au sein de cette famille de carbamoyltransférases par la résolution de la structure tridimensionnelle de TobZ (*Streptoalloteichus tenebrarius* DSM40770T)¹¹². La formation de carbamoyladénylate et le transfert du groupement carbamoylé sur le substrat (tobramycine) ont lieu sur deux sites distincts de la protéine, qui est composée de deux grands domaines, YrdC et Kae1 (Figure 50).

En présence d'un atome de Mg^{2+} (ou Mn^{2+}), le premier domaine (YrdC) hydrolyse le carbamoylé phosphate et libère une molécule de carbamate qui réagit avec l'ATP pour former le carbamoyladénylate. Le second domaine (Kae1) catalyse le transfert de carbamoylé du carbamoyladénylate vers l'accepteur final, avec l'assistance d'un cation métallique indéterminé dans cette structure (Zn^{2+} ou Fe).

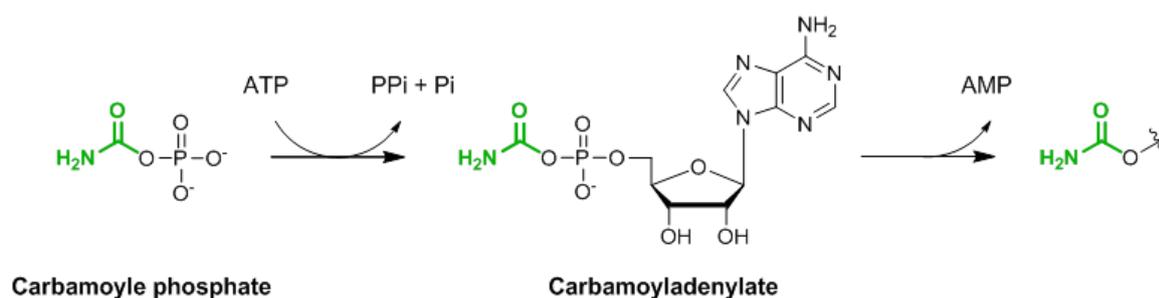


Figure 49. Mécanisme réactionnel proposé pour la O-carbamoylation.

¹⁰⁸ Meyers, C. L. F., Oberthur, M., Xu, H., Heide, L., Kahne, D. and Walsh, C. T., **2004**, *Angew. Chem.-Int. Edit.*, 43, (1), 67-70.

¹⁰⁹ Kharel, M. K., Basnet, D. B., Lee, H. C., Liou, K., Woo, J. S., Kim, B. G. and Sohng, J. K., **2004**, *FEMS Microbiol. Lett.*, 230, (2), 185-190.

¹¹⁰ Jabbouri, S., Fellay, R., Talmont, F., Kamalaprija, P., Burger, U., Relic, B., Prome, J. C. and Broughton, W. J., **1995**, *J. Biol. Chem.*, 270, (39), 22968-22973.

¹¹¹ Kellmann, R., Mihali, T. K. and Neilan, B. A., **2009**, *J. Mol. Evol.*, 68, (3), 292-292.

¹¹² Parthier, C., Gorlich, S., Jaenecke, F., Breithaupt, C., Brauer, U., Fandrich, U., Clausnitzer, D., Wehmeier, U. F., Bottcher, C., Scheel, D. and Stubbs, M. T., **2012**, *Angew. Chem. Int. Edit.*, 51, (17), 4046-4052.

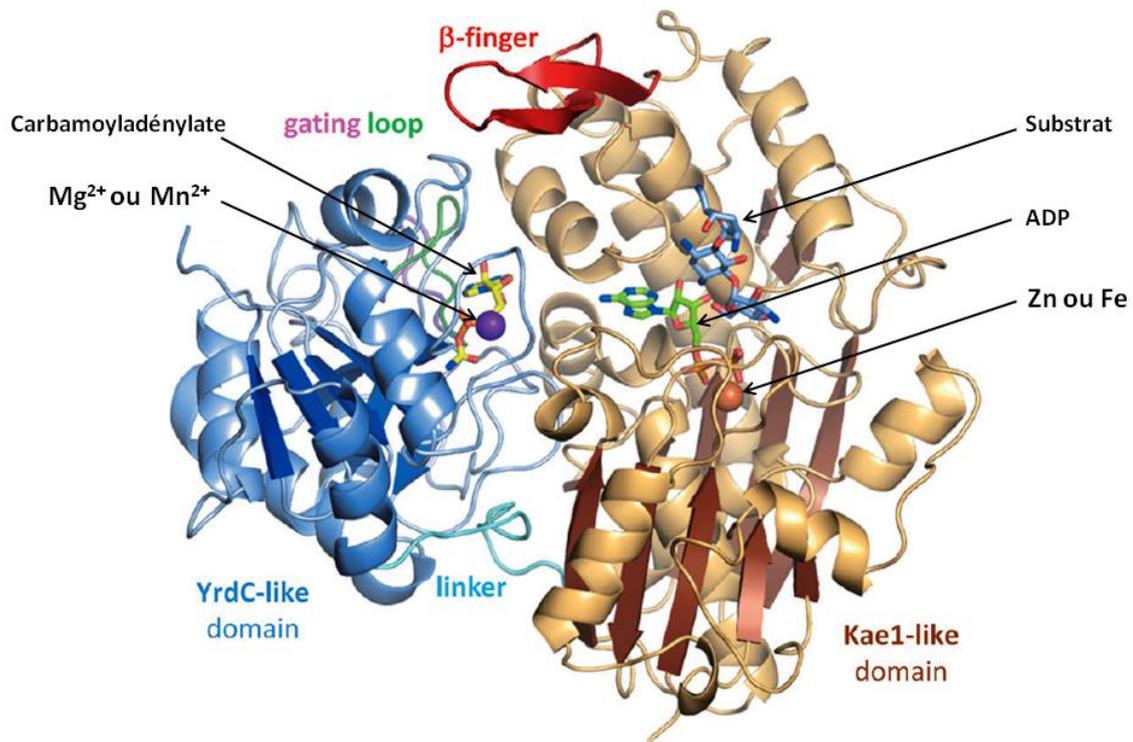


Figure 50. Structure de TobZ (*Streptoalloteichus tenebrarius* DSM40770T), adapté de Parthier *et al.*¹¹².

Il semble donc que les *O*-carbamoyltransférases travaillent également avec des intermédiaires réactionnels particulièrement instables, impliquant de l'ATP et l'assistance de cations.

I.4. Des caractéristiques biochimiques communes

Les caractéristiques biochimiques des enzymes décrites ci-dessus présentent des similitudes, que ce soit lors de la synthèse du carbamoyle phosphate, ou bien au cours des différents types de carbamoylation, particulièrement entre les processus de *S*-carbamoylation et d'*O*-carbamoylation. Bien que la nature des substrats et que les voies métaboliques impliquées soient variées, la synthèse d'intermédiaires instables, la dépendance à l'ATP pour observer une activité ainsi que l'utilisation de cations sont décrits de façon récurrente. Ces derniers sont impliqués tant au niveau du bon repliement de la structure (domaines à doigts de zinc), qu'au niveau du mécanisme réactionnel. Il est probable que les systèmes biochimiques impliqués dans la carbamoylation des chitinoligosaccharides soient analogues à ceux décrits, et cela constituera notre base de travail.

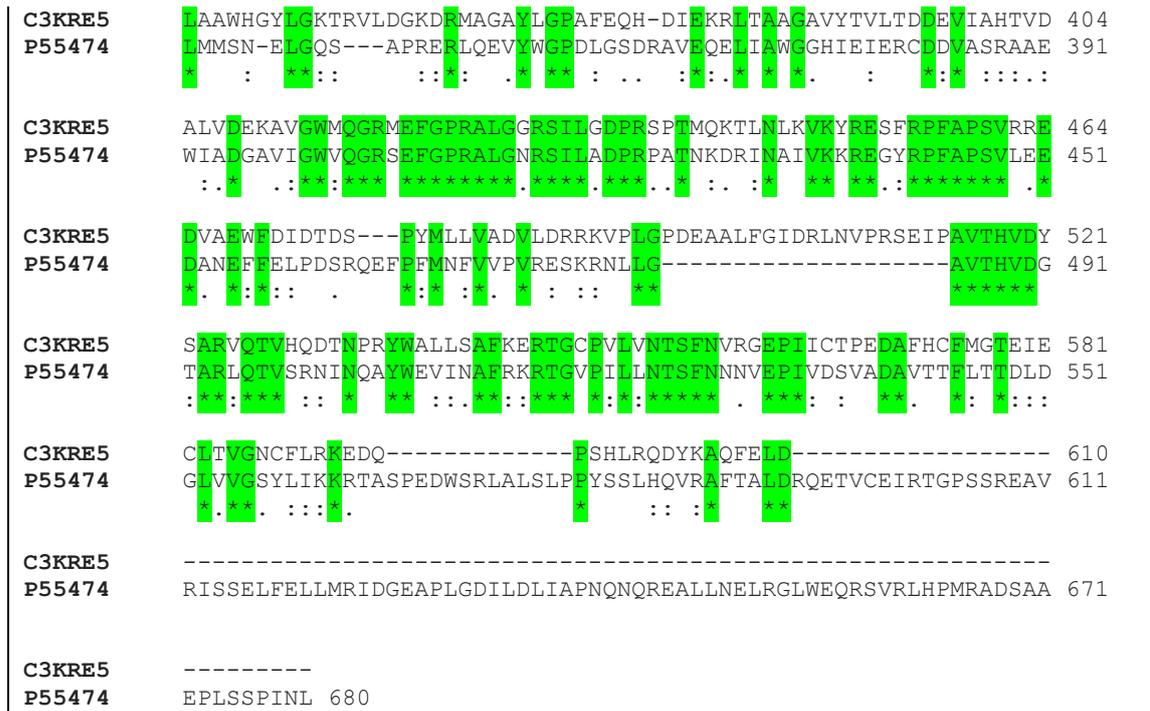


Figure 51. Alignement de séquences des deux *O*-carbamoyltransférases No10 (*S. fredii* NGR234A).

II.1. Expression de No10 (*Sinorhizobium fredii* NGR234A)

II.1.1. Stratégie d'expression

La voie envisagée afin de produire la CT No10 (*S. fredii* NGR234A), d'origine bactérienne, est une expression hétérologue chez *E. coli*. Cet organisme est simple à manipuler, les souches et les plasmides d'expressions disponibles offrent de nombreuses possibilités pour parvenir à exprimer la carbamoyltransférase. Le gène *nolO* (*Sinorhizobium fredii* NGR234A) a donc été synthétisé avec une séquence nucléotidique optimisée pour l'expression chez la bactérie *E. coli*, et cloné dans le plasmide pET20b dans lequel le peptide signal pelB a été éliminé, pour conduire au plasmide pET20b_nolO. L'expression de la protéine sera donc cytoplasmique. Le gène *nolO* est fusionné à une séquence poly-histidine à son extrémité C-terminale afin de purifier la protéine produite par chromatographie IMAC (« Immobilized Metal ion Affinity Chromatography ») sur résine de nickel.

II.1.2. Etudes d'induction de l'expression de No10

L'expression de No10 chez *E. coli* BL21 a nécessité une phase d'optimisation. Différentes conditions d'expression ont été testées (Tableau 7). La qualité de la surexpression est évaluée par SDS-PAGE, et la présence de la protéine d'intérêt est estimée, avant et au cours de l'induction, sous sa forme soluble.

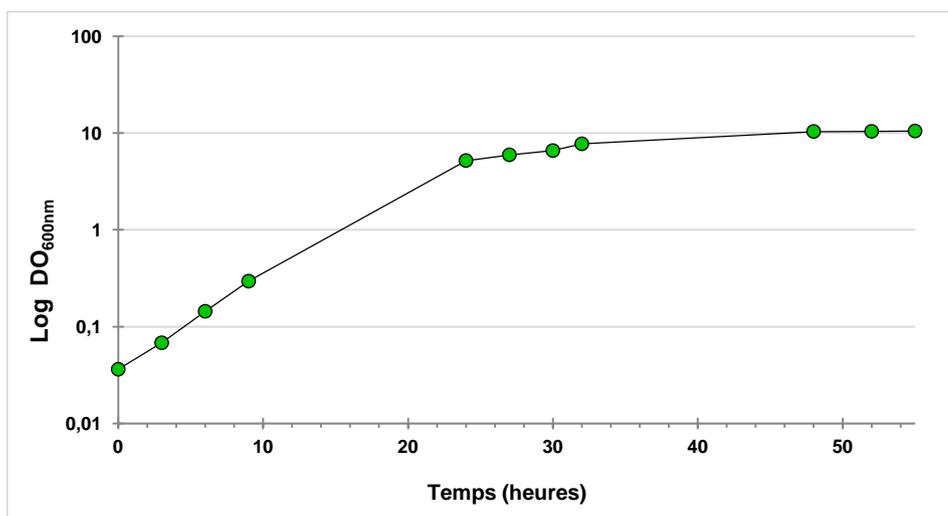
Souche	Construction	Température	Inducteur [IPTG]	Temps d'induction
BL21	pET20b_nolO	18°C	0,5 mM	2, 4 et 20 heures
			0,1 mM	
0,05 mM				
		20°C	Milieu auto-inductible	55 heures

Tableau 7. Etude d'expression de NolO (*Sinorhizobium fredii* NGR234A) chez *E. coli*.

Les premières études ont été réalisées suivant un protocole classique d'induction de l'expression par l'IPTG, en milieu LB et en abaissant la température des cultures à 18°C. Lors de l'analyse des extraits bactériens, aucune surexpression n'a été observée, ni au sein des fractions solubles cytoplasmiques, ni au sein des débris cellulaires, ce qui traduit une absence totale d'expression de l'enzyme, même sous forme de corps d'inclusion.

Ces conditions expérimentales d'expression cytoplasmique ne donnant pas de résultats, la stratégie d'expression est à repenser. Par un travail initial de clonage, il est possible de jouer sur la nature et la position des étiquettes qui peuvent influencer sur l'expression. Ce travail nécessitant plusieurs semaines, il a semblé intéressant de tester tout d'abord un autre protocole d'expression, utilisant un milieu de culture auto-inductible⁵⁹.

La bactérie *E. coli* BL21 transformée par le pET20b_nolO est cultivée en présence de glucose et de lactose comme sources principales de carbone. Dans un premier temps, celle-ci va utiliser le glucose pour croître de façon exponentielle. Alors que le monosaccharide se fera plus rare dans le milieu, la bactérie va ralentir sa croissance, et modifier son métabolisme pour assimiler le lactose, qui induira alors l'expression de la protéine.

Figure 52. Croissance d'*E. coli* BL21 transformée par pET20b_nolO, en milieu auto-inductible ZYP5052, à 20°C.

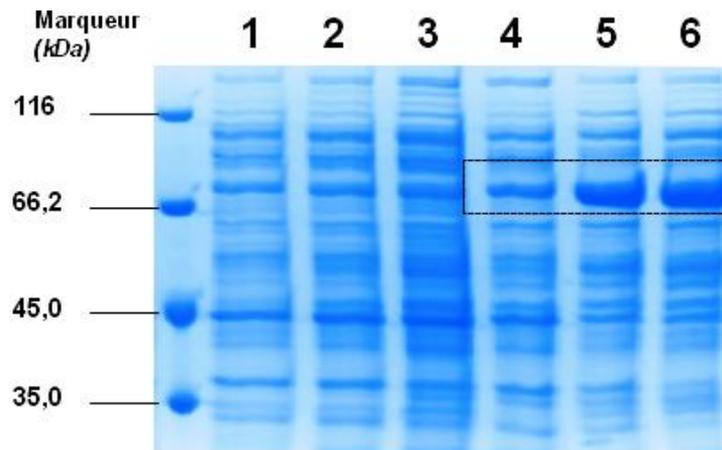


Figure 53. Analyse sur SDS-PAGE 8% de l'expression de NoIO (*S. fredii* NGR234A) chez *E. coli* BL21. (1-3) Protéines cytoplasmiques d'*E. coli* BL21 transformées par pET20b après 24, 48 et 55 heures de croissance à 20°C (4-6) Protéines cytoplasmiques d'*E. coli* BL21 transformées par pET20b_noIO après 24, 48 et 55 heures de croissance à 20°C (environ 20 µg de protéines déposés par piste).

La croissance de la culture est suivie par des mesures de la densité optique (DO) à 600 nm (Figure 52), afin d'identifier la durée d'induction. La culture présente un comportement classique, avec une phase exponentielle de croissance sur glucose puis une phase de latence qui débute après 24 heures de culture et pendant laquelle l'induction doit être optimale.

L'analyse des extraits cytoplasmiques sur un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes révèle une surexpression d'une protéine à 73,3 kDa, dans la zone de la taille attendue (78 kDa) (Figure 53, pistes 4 à 6). Un premier prélèvement réalisé 24 heures après le début de la culture révèle déjà une petite production de la protéine (Figure 53, piste 4). Il est décrit qu'une faible expression puisse se produire lors de la phase de croissance exponentielle, il n'est donc pas surprenant d'observer déjà une production alors que le plateau de croissance semble à peine atteint. Le taux d'expression est plus élevé après 48 heures de culture (Figure 53, piste 5), alors que l'induction dure depuis déjà 24 heures ; les sept heures d'induction supplémentaires augmentent encore la production (Figure 53, piste 6). Dans les mêmes conditions expérimentales, une culture de bactéries transformées par pET20b seul ne révèle pas de surexpression de protéines dans la zone attendue (Figure 53, pistes 1 à 3).

II.1.3. Production et purification de NoIO

Une culture à plus grande échelle est réalisée dans les conditions préalablement identifiées et la protéine surexprimée est purifiée sur résine de nickel (Figure 54). La fraction exclue (Figure 54, piste 2), ainsi que le lavage avec une solution d'imidazole à 20 mM (Figure 54, piste 3), ne révèlent qu'une légère élution de la protéine surexprimée.

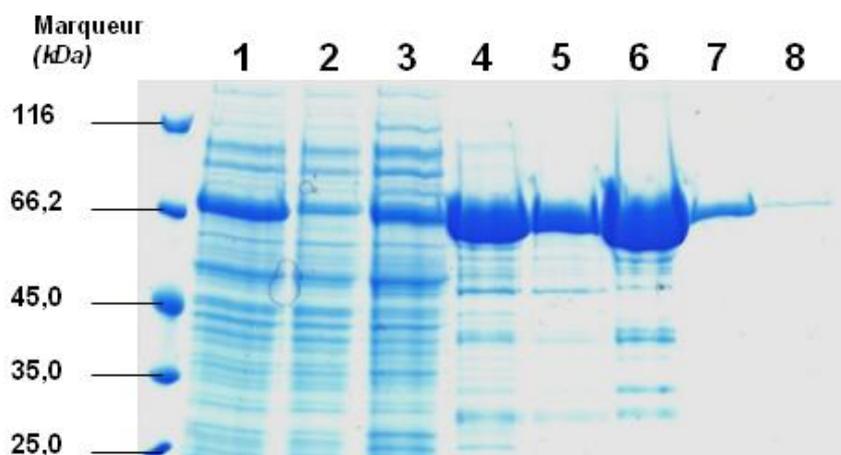


Figure 54. Analyse sur SDS-PAGE 8% de la purification de NoIO (*S. fredii* NGR234A).
 (1) Extrait cytoplasmique brut. (2) Fraction exclue (3) Lavage (20 mM d'imidazole).
 (4-5) Fractions d'élution (50 mM d'imidazole). (6) Fractions d'élution (100 mM d'imidazole).
 (7) Fractions d'élution (150 mM d'imidazole). (8) Fractions d'élution (300 mM d'imidazole).

Cela indique que cette dernière possède une bonne affinité avec la résine de nickel, et laisse donc supposer la probable présence d'acides aminés basiques, comme une séquence poly-histidine. A l'aide de solutions d'imidazole plus concentrées (Figure 54, piste 4 à 6), la protéine est totalement éluée. Cette dernière est alors dialysée contre du tampon Tris-HCl 50 mM pH 8, puis conservée à 4°C, sans ajout de sels ou de glycérol. Le dosage des protéines par la méthode de Bradford indique un rendement de purification de l'ordre de 200 mg de protéine par litre de culture d'*E. coli* transformée par le pET20b_noIO.

Le travail d'ingénierie engagé a donc permis (i) la surexpression d'une protéine présentant la taille attendue, (ii) la purification de cette dernière sur résine de nickel, et (iii) l'obtention d'un très bon rendement de purification. Tout cela va dans le sens d'une expression recombinante réussie de la carbamoyltransférase NoIO (*S. fredii* NGR234A) chez *E. coli*.

II.2. Etude de stabilité du carbamoyle phosphate

Avant d'envisager de mettre en place les tests d'activités, il paraît important de vérifier la nature du donneur carbamoyle phosphate. Etant connu pour être instable et se décomposer rapidement en libérant de l'anion phosphate (Figure 55), il est nécessaire de vérifier son état, et d'observer sa vitesse de dégradation à 30°C, température retenue pour évaluer l'activité de la CT NoIO. Le phosphore, présent au sein du carbamoyle phosphate, ne possède pas le même environnement que le phosphore présent dans le phosphate. Aussi, il est possible de les discriminer par résonance magnétique nucléaire (RMN) du ³¹P.

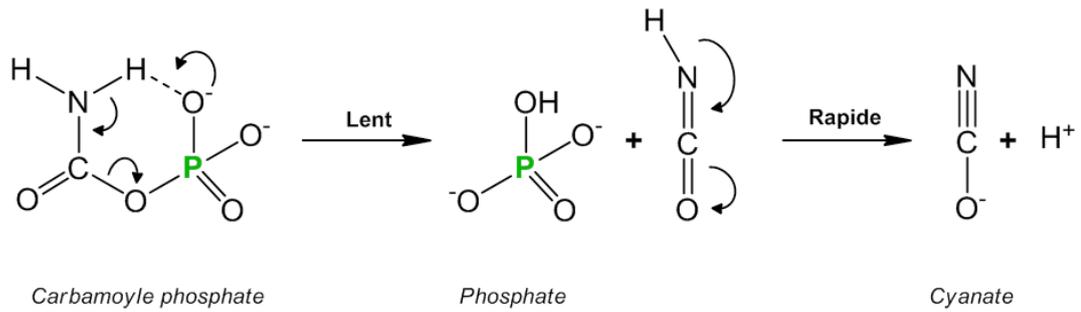


Figure 55. Réaction proposée de décomposition du carbamoyl phosphate, d'après Wang *et al.*⁹⁷.

Une cinétique de stabilité du carbamoyl phosphate est réalisée à 30°C, dans un tampon composé de diéthanoline 50 mM / MES 0,1 M / N-méthylmorpholine 50 mM, à pH 7 (Figure 56). Plus de 90% du phosphore présent dans l'échantillon se trouve intégré au carbamoyl phosphate au départ de l'étude. Cela permet de confirmer que le substrat est en bon état pour mener les tests d'activité. Puis on observe une dégradation relativement rapide du donneur de carbamoyl. En 140 minutes, plus de la moitié du carbamoyl phosphate s'est spontanément dégradé en phosphate. Après 160 minutes d'analyse, seulement 40% du phosphore est encore sous forme carbamoyl phosphate. (Figure 57).

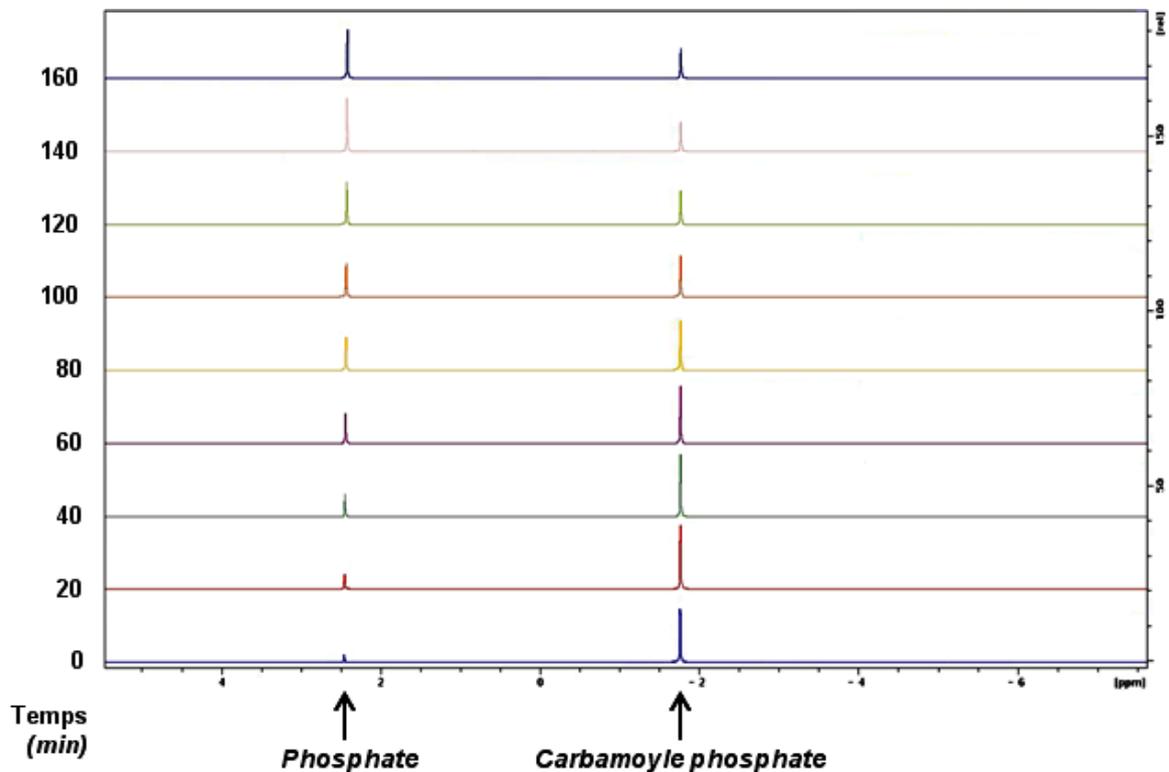


Figure 56. Analyse par RMN ³¹P de la cinétique de décomposition du carbamoyl phosphate à 30°C.

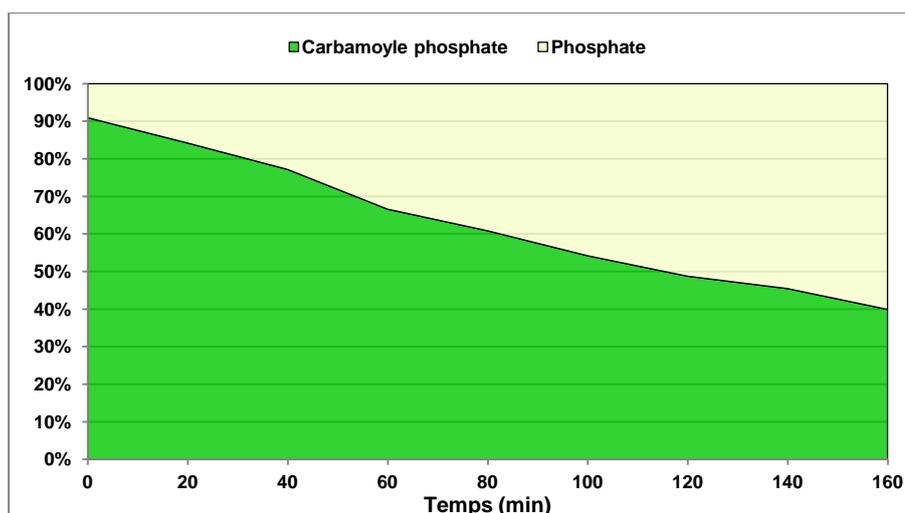


Figure 57. Cinétique de dégradation du carbamoyle phosphate, par analyse RMN ^{31}P à 30°C.

Ces analyses confirment l'instabilité décrite du donneur de carbamoyle. Les tests d'activité ne semblent pas avoir de sens au-delà de quatre à cinq heures de réactions. Il n'y aura alors probablement plus de donneur carbamoyle. Au final, le temps de demi-vie du substrat ainsi que son état initial paraissent tout à fait acceptable pour mener des tests d'activité avec la CT Nolo.

II.3. Alignement de séquences d'O-carbamoyltransférases

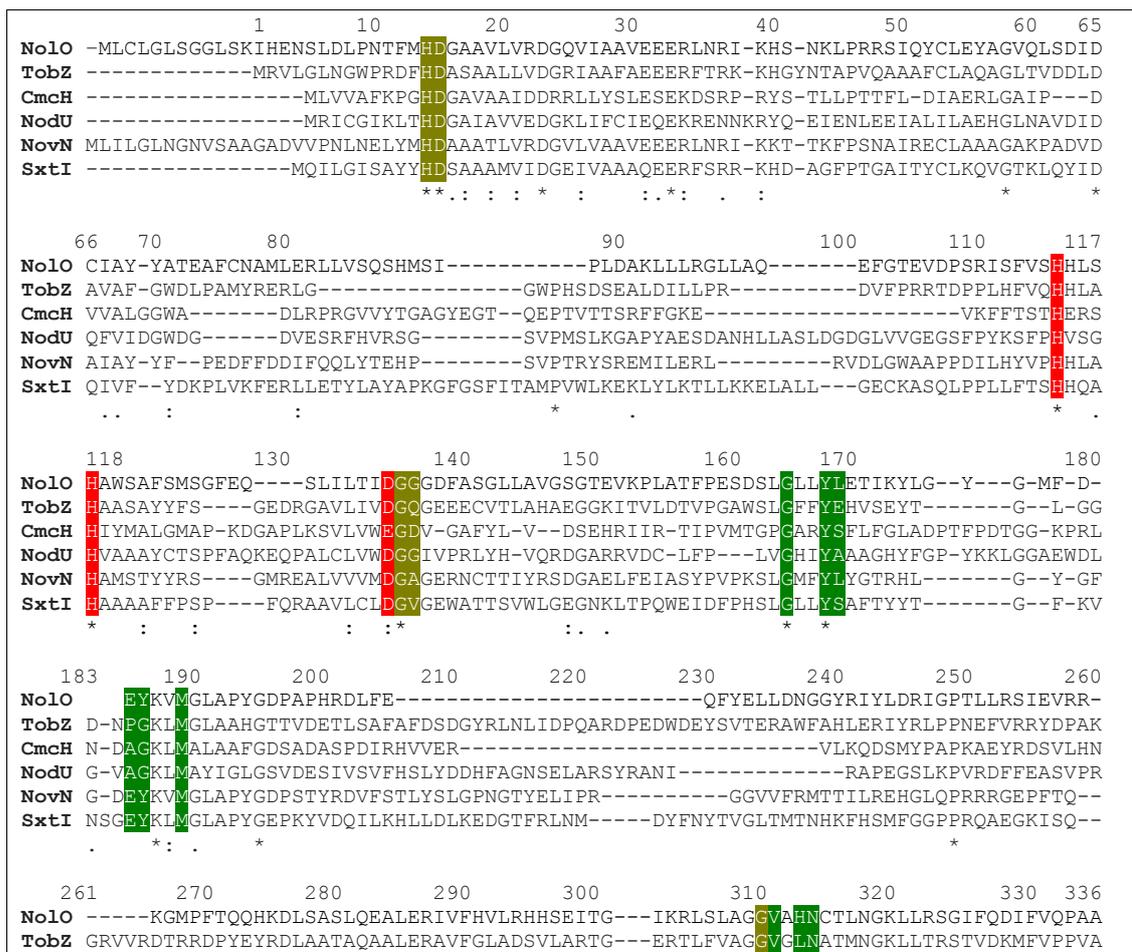
Dans le but de confirmer l'hypothèse de travail décrivant Nolo comme une métalloprotéine, et qui pourrait utiliser un intermédiaire réactionnel issu de l'ATP, sa séquence protéique a été alignée à celles de différentes O-carbamoyltransférases (Tableau 8).

O-carbamoyltransférase	N° Uniprot	Longueur (acides aminés)
Nolo (<i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234A)	P55474	680
TobZ (<i>Streptoalloteichus tenebrarius</i>)	Q70IY1	570
Cmch (<i>Streptomyces clavuligerus</i>)	O85728	521
NodU (<i>Cupriavidus taiwanensis</i>)	B2AIW1	573
NovN (<i>Streptomyces niveus</i>)	Q9L9F4	677
SxtI (<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> T3)	B3EYG4	612

Tableau 8. O-carbamoyltransférases comparées par alignement de séquences.

Ces cinq autres CTS ont déjà été comparées dans l'étude cristallographique de TobZ¹¹². L'alignement des séquences a été réalisé à l'aide du logiciel ClustalW2¹¹³, puis suivi d'un ajustement manuel (Figure 58). L'activité *in vitro* de ces *O*-carbamoyltransférases a été mise en évidence, exceptées pour Nolo et NodU, les deux CT ayant comme substrat un chitinoligosaccharide

D'après les études réalisées sur TobZ, les acides aminés en **vert olive** sont directement impliqués dans la carbamoylation du substrat, et les acides aminés qui coordonnent le métal dans ce centre catalytique sont en **rouge** (Fe ou Zn²⁺). Les acides aminés en **vert foncé** sont impliqués dans la liaison aux nucléosides, et les acides aminés en **vert clair** sont impliqués dans la fermeture d'une poche autour de la base adénine. Enfin, les acides aminés en **jaune** se lient au carbamoyle phosphate, et ceux **en bleu** sont responsables de la formation de l'adénylate.



¹¹³ Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J. and Higgins, D. G., 2007, *Bioinformatics*, 23, (21), 2947-2948.

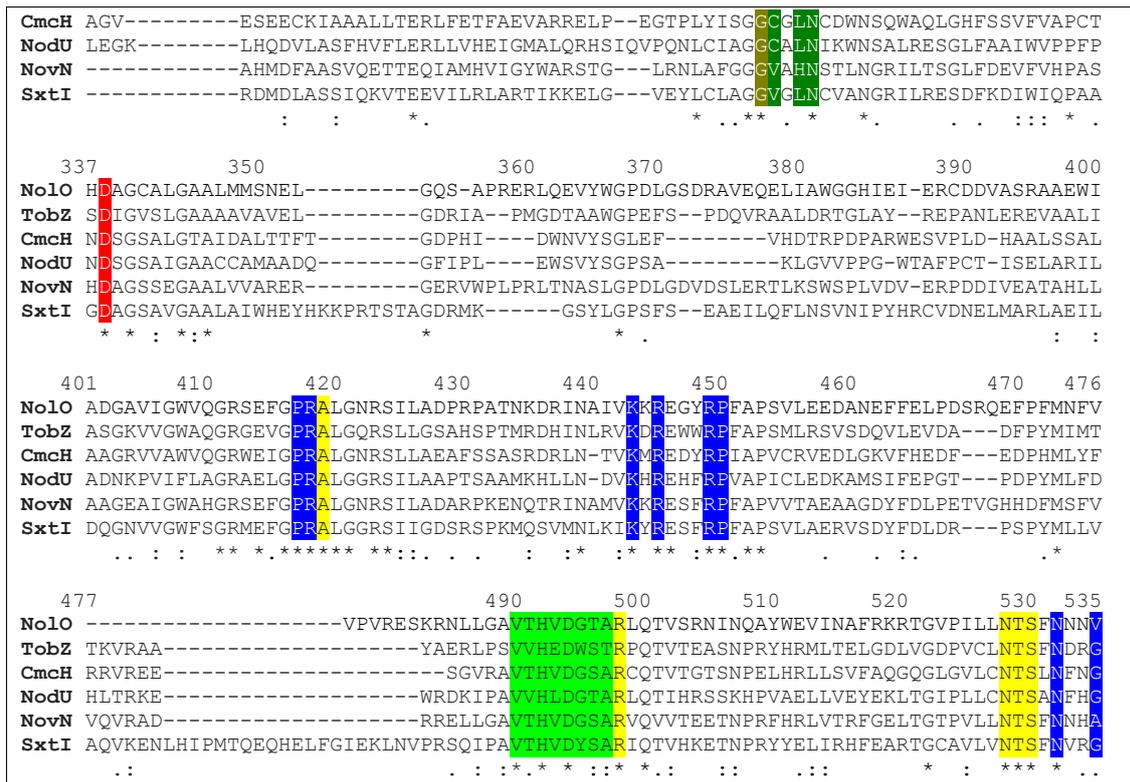


Figure 58. Alignement de séquences d'O-carbamoyltransférases.

Au sein de la séquence primaire de la CT NoI0, on retrouve bien tous les acides aminés identifiés dans l'étude de TobZ pour l'activité de carbamoylation, et ces mêmes acides aminés sont particulièrement bien conservés dans la famille d'O-carbamoyltransférases. Ainsi, la CT NoI0 semble posséder dans sa séquence les informations prouvant qu'elle utilise des cations métalliques et de l'ATP pour réaliser la décoration des COs, selon le mécanisme proposé pour la O-carbamoylation.

Les informations concernant l'activité *in vitro* et la structure tridimensionnelle de différentes O-carbamoyltransférases et S-carbamoyltransférases ont également été comparées (Tableau 9). Pour rappel, ces deux types de carbamoyltransférases présentent des similitudes, notamment par leur dépendance à l'ATP et aux cations. Des grandes lignes directrices ressortent avec une température d'activité autour de 30°C et un pH d'action autour de 8.

Enfin, il est à noter que le nombre de cations dans les structures résolues varie, et qu'il n'est pas forcément nécessaire de supplémenter les milieux réactionnels avec ces cations afin d'observer une activité. Cela laisse à penser que certains cations présents dans les enzymes sont labiles, et d'autres sont enchâssés au cœur des structures, et intégrés au moment du repliement de la protéine.

Carbamoyltransférase	Structure 3D	Cations identifiés	Milieu réactionnel	Référence
TobZ (<i>S. tenebrarius</i>)	résolue	Mg ²⁺ (ou Mn ²⁺) Zn ²⁺ (ou Fe)	Tris-HCl 50 mM pH 8 150 mM NaCl – 30°C 10 mM MgCl ₂	112
Cmch (<i>S. clavuligerus</i>)	nd	nd	MOPS 100 mM pH 7,5 1 mM DTT – 30°C 50 µM MgSO ₄ 50 µM MnCl ₂	107
NovN (<i>S. niveus</i>)	en cours	nd	Tris-HCl 75 mM pH 7,5 – 25°C 10 mM MgCl ₂	109-114
SxtI (<i>C. raciborskii T3</i>)	nd	nd	Tris-HCl 50 mM pH 8,5 200 mM NaCl – 35°C	111
HypF (<i>T. tengcongensis</i>)	résolue	Zn ²⁺ Mg ²⁺ Fe ³⁺		
HypF (<i>E. coli</i>)	résolue	3 x Zn ²⁺ Mg ²⁺	Tris-HCl 50 mM pH 7,5 100 mM KCl 0,1 mM DTT – 25°C	104-105-106
HypF (<i>T. kodakaraensis</i>)	résolue	3 x Zn ²⁺		

Tableau 9. Conditions d'activités *in vitro* d'O-carbamoyltransférases et de S-carbamoyltransférases.

nd = non déterminé.

Dans ce sens, l'utilisation du milieu auto-inductible est bien adaptée à la production de métalloprotéines, en raison de la présence de nombreux sels métalliques au sein du milieu de culture.

II.4. Tests d'activité de NoIO

L'état de conservation ainsi que la stabilité du carbamoyle phosphate ont été vérifiés. Les homologies de séquences avec les O-carbamoyltransférases désignent le mécanisme réactionnel supposé de la CT NoIO. Enfin des informations obtenues dans la littérature indiquent des conditions réactionnelles sur lesquelles s'appuyer (pH d'activité autour de 8, une probable dépendance au couple Mg²⁺-ATP, ainsi qu'une activité métallo-dépendante). A ces informations s'ajoutent le fait qu'une grande quantité d'enzyme est disponible, facilitant la mise en place des tests d'activité.

N'ayant que peu de recul pour détecter une décoration par carbamoylation, la stratégie

¹¹⁴ Garcia, I. G., Meyers, C. L. F., Walsh, C. T. and Lawson, D. M., **2008**, *Acta Crystallogr. F-Struct. Biol. Cryst. Commun.*, 64, 1000-1002.

retenue est d'essayer de suivre la réaction enzymatique par analyse chromatographique sur couche mince, et ensuite de confirmer cette analyse par spectrométrie de masse. Par défaut, les réactions seront menées à pH 8 et à une température de 30°C. Ces conditions ont été définies, notamment en fonction des autres enzymes identifiées responsables de la biosynthèse des LCOs, qui présentent toutes des activités autour de 30°C et de ce pH, mais également des carbamoyltransférases déjà décrites dans la littérature.

Un extrait cytoplasmique brut, contenant la CT No10 en solution dans du Tris HCl 50 mM pH 8 / 0,5 M NaCl, est mis en réaction avec du chitinpentaose (600 µM) et du carbamoyle phosphate en large excès (10 mM). Après une nuit à 30°C, l'analyse CCM ne révèle aucun produit formé, et la spectrométrie de masse confirme l'absence de réaction. L'expérience est reproduite en ajoutant à l'extrait brut de l'ATP également en excès (10 mM), ainsi que des cations métalliques (Zn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+}) seuls ou en combinaison à une concentration de 1 mM chacun. Aucune activité n'est observée.

L'absence de réaction sur un chitinoligosaccharide non modifié, comme le CO-V, peut laisser penser qu'il n'est pas substrat de la CT No10. D'ailleurs, le schéma biosynthétique des LCOs carbamoylés n'étant pas connu, il paraît important de tester plusieurs substrats potentiels comme des chitinoligosaccharides *N*-désacétylés, ou acylés sur l'extrémité non réductrice. Ces différents substrats (CO-IV(N), CO-V(N), et LCO-IV(C_{16:0}, S)) ont été mis en réaction dans un extrait cytoplasmique brut, en présence du donneur carbamoyle phosphate (10 mM). Là encore, aucune réaction n'a été observée, même en supplémentant la réaction avec de l'ATP et avec le mélange de trois cations décrits plus haut. Un autre tampon d'activité a été évalué avec l'extrait brut, sans succès, correspondant à celui utilisé pour observer l'activité d'une *N*-carbamoyltransférase (diéthanolamine 50 mM / MES 0,1 M / *N*-méthylmorpholine 50 mM pH 7)^{115, 116}.

Des tests réalisés avec la carbamoyltransférase purifiée (6 µM), en présence d'ATP et de cations (Zn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+}) seuls ou en combinaison, sur ces substrats non modifiés, *N*-désacétylés ou acylés, n'ont pas révélé d'activité.

Lors de l'attribution de la fonction carbamoyltransférase au gène *nol0*⁹⁵, les LCOs décrits dans cette étude sont *N*-méthylés sur le sucre non réducteur (Figure 59b). Un parallèle peut être fait avec la *O*-carbamoyltransférase NovN (*Streptomyces niveus*)¹⁰⁹. La carbamoylation par NovN est réalisée en *O*-3 d'un monosaccharide, et doit impérativement être précédée de l'action d'une méthyltransférase en *O*-4 (Figure 59a).

¹¹⁵ Bellocco, E., Di Salvo, C., Lagana, G., Leuzzi, U., Tellone, E., Kotyk, A. and Galtieri, A., **2002**, *Physiol. Res.*, 51, (2), 151-158.

¹¹⁶ Bellocco, E., Lagana, G., Barreca, D., Ficarra, S., Tellone, E., Magazu, S., Branca, C., Kotyk, A., Galtieri, A. and Leuzzi, U., **2005**, *Physiol. Res.*, 54, (4), 395-402.

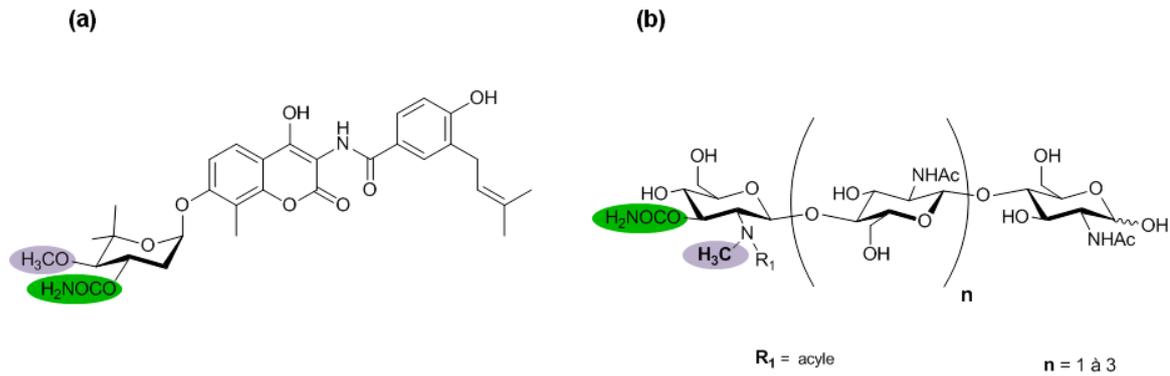


Figure 59. (a) Structure de la Novobiocine (en vert l'action de NovN) (b) Structure d'un LCO N-méthylé (en vert, l'action de Nolo).

Dans le cas contraire, NovN est inactive. L'influence du groupement méthyle est donc primordiale pour NovN. Dans ce sens, peut être que la CT Nolo nécessite également des COs N-méthylés pour être active. Différents substrats N-méthylés (CO-IV(N^{IV}, Me), CO-V(N^V, Me) et LCO(C_{18:1}, Me)) ont donc été synthétisés au laboratoire afin d'être testés. Malheureusement aucun de ces substrats n'a été modifié par la carbamoyltransférase Nolo présente dans un extrait brut, supplémenté ou non en ATP et cations.

II.5. Perspectives

Deux grandes hypothèses pourraient permettre d'expliquer l'absence d'activité *in vitro* de Nolo. Soit nous n'avons pas été capables d'identifier des conditions réactionnelles adéquates, soit l'enzyme produite est inactive dès sa synthèse.

Le repliement et l'activité d'une enzyme sont intimement liés. Etant donné le très haut niveau d'expression sous forme soluble de la CT Nolo, on peut penser que l'enzyme est correctement repliée, et qu'elle a probablement intégré, s'il y en a, des cations à sa structure. Pour rappel, il n'est pas nécessaire de supplémenter un milieu réactionnel avec les cations impliqués dans un site catalytique (Tableau 9). Cela est encore plus évident au sein d'un extrait cytoplasmique brut, véritable jus bactérien, ou une enzyme est en mesure de trouver les éléments nécessaires à son activité.

II.5.1. Séquence primaire

L'une des premières interrogations s'est portée sur la séquence du gène *nolo* synthétisé. Il a donc été vérifié par séquençage, afin de s'assurer de l'absence de mutation. Il paraît maintenant important de réaliser un séquençage N-terminale, afin de confirmer l'identité de la protéine surexprimée.

Il est possible que la présence de l'étiquette poly-histidine à l'extrémité C-Terminale puisse

gêner l'activité de la CT NolO. Il serait alors envisageable de produire une enzyme ne possédant aucune étiquette, pour se rapprocher le plus possible de la protéine native. Si des tests d'activité sur cette enzyme révélaient une activité, un nouveau travail de clonage permettrait de placer, par exemple une séquence poly-histidine à l'extrémité N-terminale de NolO puis de réévaluer l'activité. En effet, il est intéressant d'avoir accès à une enzyme pure afin de faciliter le travail de caractérisation biochimique, encore inconnu à ce jour.

Enfin, il existe deux séquences annotées *nolO* au sein de la bactérie *S. fredii* NGR234A. Il est possible que de meilleurs résultats puissent être obtenus avec la séquence courte, dans laquelle tous les acides aminés essentiels à l'activité des carbamoyltransférases sont conservés.

II.5.2. Stratégie d'expression

Une autre piste concerne la production de la CT NolO. La surexpression de la protéine est observée lorsque *E. coli* est cultivée en milieu auto-inductible supplémenté par un mélange de traces minérales complexes (onze cations différents). Il pourrait être intéressant de réaliser des productions recombinantes uniquement en présence de certains cations, comme les plus couramment identifiés dans les structures tridimensionnelles des carbamoyltransférases (Mg^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+}). Cela pourrait augmenter la probabilité que NolO puisse les incorporer au moment de son repliement.

II.5.3. Production de chitinoligosaccharides carbamoylés *in vivo*

Le laboratoire, par le procédé de l'usine cellulaire, est capable de synthétiser *in vivo* des précurseurs de LCOs⁴³. Le gène de la CT NolO pourrait être intégré à une souche d'*E. coli* modifiée, afin de synthétiser des COs carbamoylés en fermenteur. Cette stratégie pourrait être payante pour l'accès à des précurseurs de LCOs carbamoylés. En revanche, le problème de production de NolO fonctionnelle dans le but d'une caractérisation biochimique et structurale de l'enzyme resterait entier.

III. Rappels bibliographiques : la décoration par sulfatation

La réaction de sulfatation est catalysée par des sulfotransférases (EC 2.8.2.-) qui utilisent très généralement un donneur de sulfate activé, le 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate (PAPS)¹¹⁷. Cette sulfatation peut se réaliser sur des groupements amine ou hydroxyle portés par des protéines ou des oligosaccharides. Leur action s'oppose à celle des sulfatases (EC 3.1.6.-)¹¹⁸, qui hydrolysent l'ester de sulfate. La sulfatation intervient dans de nombreux processus biologiques, comme la communication et la croissance cellulaires, le développement et les mécanismes de défense, tant chez les procaryotes que chez les eucaryotes¹¹⁹.

III.1. La sulfatation chez les lipochitinoligosaccharides

La sulfatation est observée chez les lipochitinoligosaccharides sur l'extrémité réductrice uniquement (Figure 60). C'est la seule décoration décrite chez les facteurs Myc et de nombreuses espèces de rhizobiums sécrètent des LCOs sulfatés.

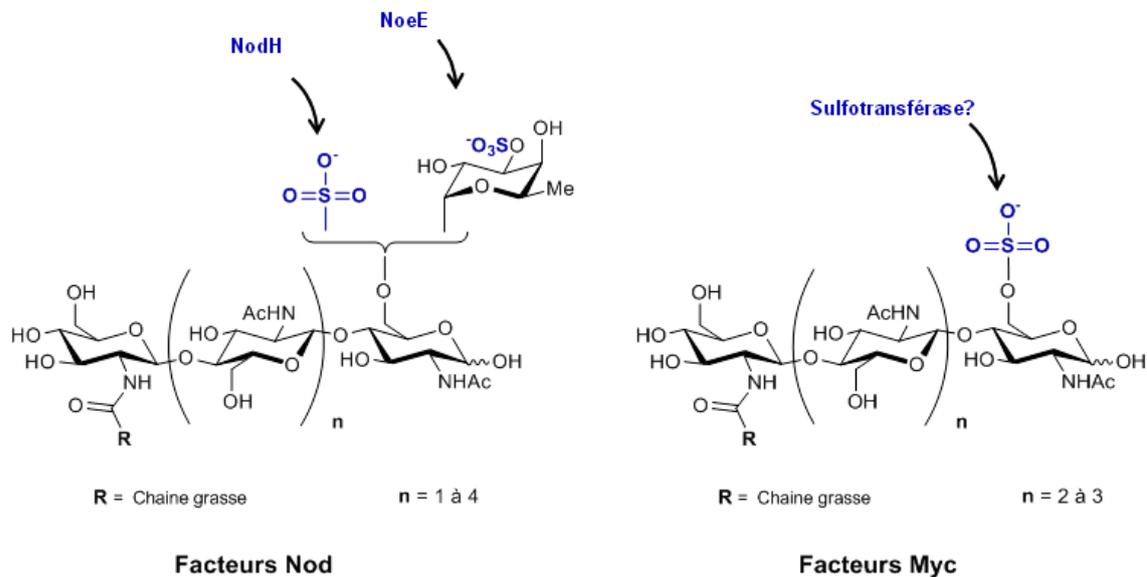


Figure 60 La sulfatation chez les lipochitinoligosaccharides.

¹¹⁷ Chapman, E., Best, M. D., Hanson, S. R. and Wong, C. H., **2004**, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 43, (27), 3526-3548.

¹¹⁸ Hanson, S. R., Best, M. D. and Wong, C. H., **2004**, *Angew. Chem. Int. Edit.*, 43, (43), 5736-5763.

¹¹⁹ Negishi, M., Pedersen, L. G., Petrotchenko, E., Shevtsov, S., Gorokhov, A., Kakuta, Y. and Pedersen, L. C., **2001**, *Arch. Biochem. Biophys.*, 390, (2), 149-157.

Contrairement à la décoration par carbamoylation, la sulfatation des LCOs est très bien étudiée et a été identifiée dès l'origine de la découverte des structures des facteurs de nodulation⁸ et de mycorhization¹². L'essentiel des connaissances biochimiques concernant la sulfatation est regroupé chez les rhizobiums et les facteurs de nodulation. Aucun gène impliqué dans cette modification n'a encore été identifié et caractérisé chez les champignons endomycorhiziens. NodH¹²⁰ et NoeE¹²¹ qui sont les deux sulfotransférases caractérisées, présentent deux activités différentes.

La sulfatation des facteurs de nodulation par NodH a lieu en O-6 de l'extrémité réductrice du squelette chitinoligosaccharidique. C'est un déterminant essentiel pour les plantes hôtes réceptives au symbiote *Sinorhizobium meliloti*. L'absence de cette décoration suffit à elle seule pour abolir totalement la capacité des partenaires *S. meliloti* et luzerne (*Medicago sativa*) à entrer en symbiose, mais permettra alors à la vesce de noduler avec le symbiote *Sinorhizobium meliloti*¹²².

NoeE¹²¹ est une sulfotransférase spécifique de la position O-3 du fucose. Peu d'informations sont connues quant au rôle qu'elle peut jouer dans la spécificité plantes-micro-organismes. Cette décoration intervient notamment au sein de la souche *Rhizobium* NGR234, qui possède un très large spectre d'action avec 110 genres de légumineuses pouvant répondre à 80 facteurs Nod produits par la bactérie¹²¹. L'absence de cette décoration diminue le spectre de reconnaissance d'une seule espèce de légumineuse (*Pachyrhizus tuberosus*), son rôle semble donc de moindre importance que celui de NodH. En revanche, une étude *in vitro* de la ST NoeE a révélé une activité exclusivement en présence d'un groupement acyle¹²³. Lorsque des chitinoligomères (CO-II à CO-VI) fucosylés servent de substrat, aucune sulfatation du fucose n'a lieu par NoeE. Cela laisse sous-entendre que dans la nature, l'acylation précède cette décoration. Dans la même idée, NodH présente une meilleure affinité pour un lipochitinoligosaccharide qu'un chitinoligosaccharide⁴².

Les premières synthèses de facteurs de nodulation ou de mycorhization par voie chimique concernaient déjà des LCOs sulfatés^{34, 35, 36, 39}. Des COs sulfatés ont également été synthétisés à l'échelle de la centaine de milligrammes par le biais de l'usine cellulaire, ou par une approche enzymatique *in vitro*¹²⁴. Seule la sulfatation en O-6 du GlcNAc réducteur est celle

¹²⁰ Ehrhardt, D. W., Atkinson, E. M., Faull, K. F., Freedberg, D. I., Sutherlin, D. P., Armstrong, R. and Long, S. R., **1995**, *J. Bacteriol.*, 177, (21), 6237-6245.

¹²¹ Hanin, M., Jabbouri, S., Quesada-Vincens, D., Freiberg, C., Perret, X., Prome, J. C., Broughton, W. J. and Fellay, R., **1997**, *Mol. Microbiol.*, 24, (6), 1119-1129.

¹²² Roche, P., Debelle, F., Maillet, F., Lerouge, P., Faucher, C., Truchet, G., Denarie, J. and Prome, J. C., **1991**, *Cell*, 67, (6), 1131-1143.

¹²³ Quesada-Vincens, D., Hanin, M., Broughton, W. J. and Jabbouri, S., **1998**, *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 11, (7), 592-600.

¹²⁴ Burkart, M. D., Izumi, M., Chapman, E., Lin, C. H. and Wong, C. H., **2000**, *J. Org. Chem.*, 65, (18), 5565-5574.

décrite lors de toutes ces synthèses.

III.2. Le 3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate

La sulfatation est régulée par l'intermédiaire d'enzymes (sulfotransférases et sulfatases) mais également par la disponibilité du donneur de sulfate, le 3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate (PAPS)¹²⁵. Le PAPS est la forme biologiquement active du sulfate inorganique (SO_4^{2-}). C'est un dérivé de l'adénosine 5'-phosphate (AMP), avec un groupement phosphate supplémentaire en *O*-3' du ribose et un groupement sulfate ajouté au phosphate en *O*-5' (Figure 61). La disponibilité du PAPS pour les sulfotransférases va dépendre de sa synthèse mais également de sa dégradation. A pH 8, son temps de demi-vie est estimé à 20 heures¹²⁴. La biosynthèse du PAPS est réalisée à partir de l'ATP, en deux réactions successives (Figure 61).

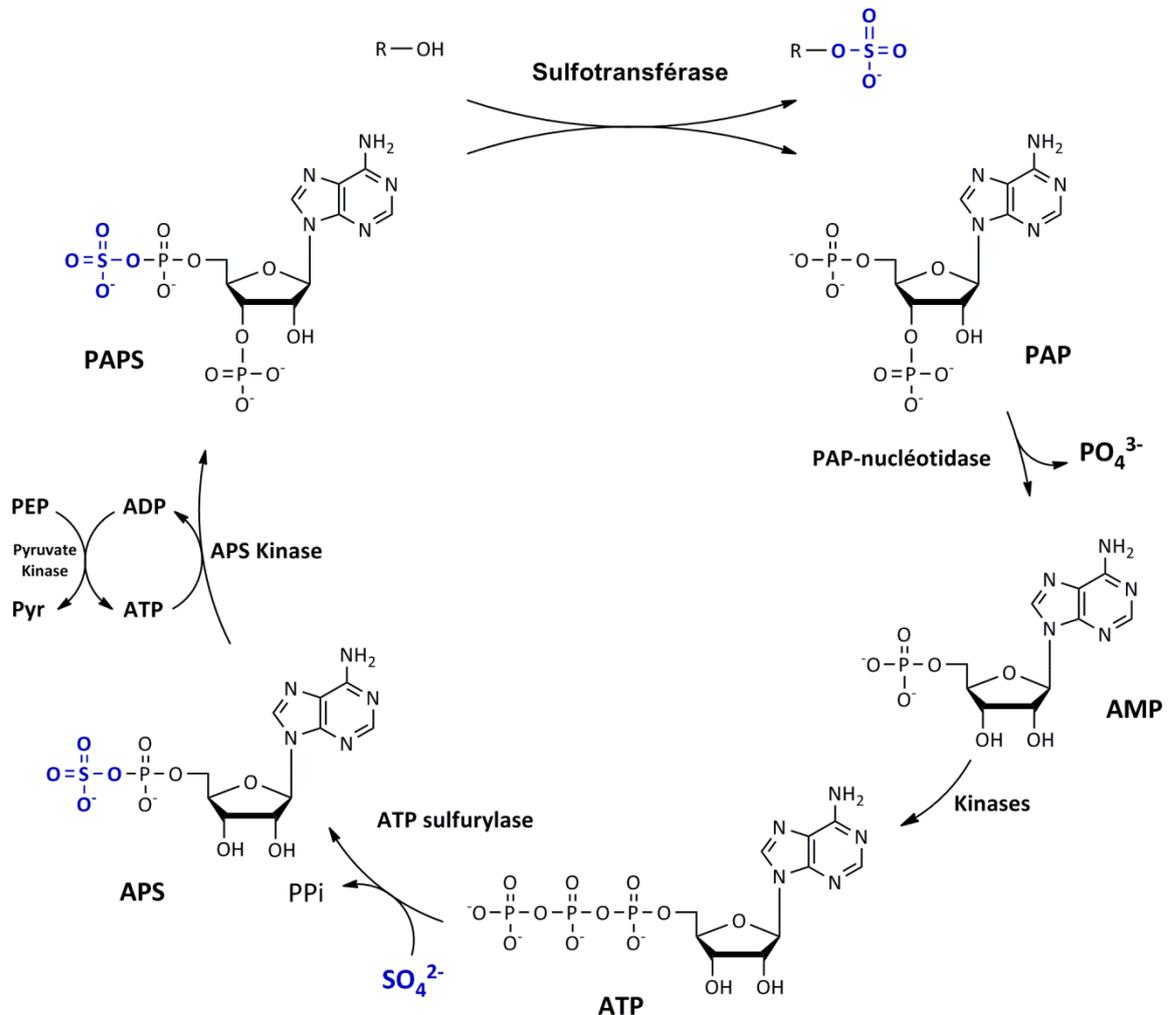


Figure 61 Métabolisme du PAPS chez *E. coli*.

¹²⁵ Klaassen, C. D. and Boles, J. W., 1997, *FASEB J.*, 11, (6), 404-418.

La première étape est la sulfatation d'une molécule d'ATP par un sulfate inorganique (SO_4^{2-}), pour former de l'adénosine 5'-phosphosulfate (APS) et un pyrophosphate (PPi). Cette réaction est catalysée par l'ATP-sulfurylase (EC 2.7.7.4). La seconde réaction est la phosphorylation de l'APS formé pour générer le PAPS. Cette étape est réalisée par l'APS-kinase (EC 2.7.1.25). Le PAPS est ensuite utilisé par des sulfotransférases comme donneur de sulfate. Enfin, par l'intermédiaire d'une PAP-nucléotidase, le PAP est déphosphorylé en AMP qui va servir à son tour de substrat pour la synthèse d'ATP.

III.3. Voies d'accès au PAPS

III.3.1. Synthèse

Lors d'une première description de synthèse du donneur de sulfate, le produit PAPS est obtenu en mélange avec l'APS, et son instabilité est déjà décrite comme étant à prendre en compte¹²⁶. En effet, dans cette étude, un laboratoire de l'université de Durham (Newcastle, Angleterre) synthétise chimiquement le PAPS, à destination d'un laboratoire new-yorkais pour des tests enzymatiques. Au cours du voyage, les deux groupes de recherches se sont rendu compte de la dégradation du produit au moment de la mise en place des tests enzymatiques.

D'autres groupes ont décrits des synthèses en combinant une approche chimique et l'utilisation de la ribonucléase T2 pour fournir le produit PAPS. Des rendements de 40 à 65 % sont décrits¹²⁷. Un isomère de position, possédant un groupement phosphate en 2' au lieu d'en 3' possède encore une activité, mais réduite à 30 % environ¹²⁸. Enfin, une synthèse à hauteur de 400 mg de produit PAPS, pur à 95 % a également été décrite¹²⁹.

Des approches de synthèses par voie enzymatique ont ensuite été décrites, d'abord à partir d'APS comme substrat de départ¹³⁰. Lors de la caractérisation de l'activité APS kinase, cette dernière, en combinaison avec l'action de l'ATP sulfurylase permet de synthétiser le PAPS en utilisant l'ATP comme substrat de départ (Figure 62), facilitant l'accès au cofacteur¹³¹. Utilisant cette approche, un autre groupe a décrit la synthèse de PAPS radiomarké au ^{35}S à l'échelle de la centaine de μmol ¹³².

¹²⁶ Baddiley, J., Buchanan, J. G., Letters, R. and Sanderson, A. R., **1959**, *J. Chem. Soc.*, (0), 1731-1734.

¹²⁷ Cherniak, R. and Davidson, E. A., **1964**, *J. Biol. Chem.*, 239, (9), 2986-2990.

¹²⁸ Horwitz, J. P., Neenan, J. P., Misra, R. S., Rozhin, J., Huo, A. and Philips, K. D., **1977**, 480, (2), 376-381.

¹²⁹ Sekura, R. D. and William, B. J., **1981**, *Methods Enzymol.*, 77, 413-415.

¹³⁰ Mukai, J. I., **1989**, *Agric. Biol. Chem.*, 53, (3), 883-884.

¹³¹ Satishchandran, C. and Markham, G. D., **1989**, *J. Biol. Chem.*, 264, (25), 15012-15021.

¹³² Hiram Prasantha Fernando, P., Karakawa, A., Sakakibara, Y., Ibuki, H., Nakajima, H., Liu, M.-C. and Suiko, M., **1993**, *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, 57, (11), 1974-1975.

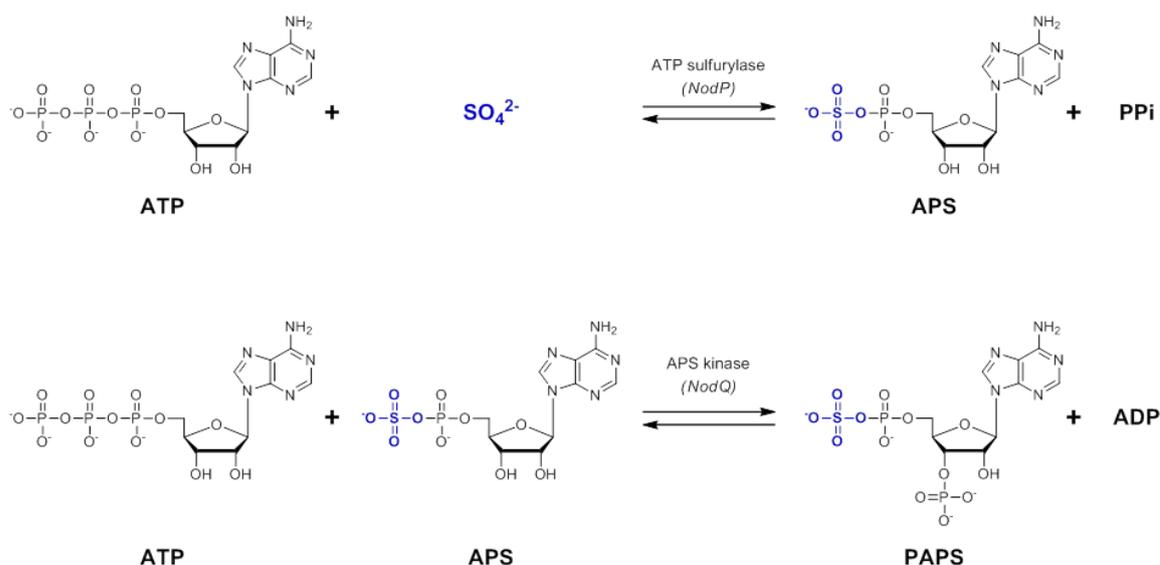


Figure 62. Synthèse enzymatique du PAPS en deux étapes.

III.3.2. Synthèse et régénération du PAPS

L'une des clés pour sulfater par voie enzymatique un chitinoligosaccharide, en plus de disposer de l'enzyme responsable de l'activité, est d'avoir le donneur de sulfate à disposition. Mais encore au-delà de sa synthèse, il faut tenir compte de deux contraintes. La première est le risque d'inhibition de la sulfotransférase par le PAP, produit de la réaction de sulfatation. En effet, une inhibition par le PAP a été démontrée sur NodH (*S. meliloti*), avec un K_i de l'ordre du micromolaire^{133, 134}. Il faut donc pouvoir l'éliminer du milieu réactionnel tout au long de sa formation si l'on désire s'assurer de bons rendements de synthèse.

La seconde difficulté reste l'instabilité du PAPS ($T_{1/2} = 20$ heures). Produire en avance ce substrat, c'est prendre un risque de travailler avec un produit dégradé au moment de son utilisation. Il est donc peu intéressant de synthétiser du PAPS, de le conserver, puis de l'utiliser ultérieurement. Une approche séduisante consiste à envisager à la fois une synthèse et une régénération du PAPS.

Les premiers travaux allant dans ce sens ont de nouveau utilisé les deux enzymes directement impliquées dans la biosynthèse du PAPS à partir d'ATP : l'ATP sulfurylase (*E. coli*) et l'APS kinase (*E. coli*). Il est à noter que ces enzymes ont été identifiées chez les

¹³³ Armstrong, J. I., Portley, A. R., Chang, Y. T., Nierengarten, D. M., Cook, B. N., Bowman, K. G., Bishop, A., Gray, N. S., Shokat, K. M., Schultz, P. G. and Bertozzi, C. R., **2000**, *Angew. Chem.-Int. Edit.*, 39, (7), 1303-+.

¹³⁴ Pi, N., Armstrong, J. I., Bertozzi, C. R. and Leary, J. A., **2002**, *Biochemistry*, 41, (44), 13283-13288.

rhizobiums comme étant respectivement NodP et NodQ¹³⁵. En associant leurs activités en conjonction avec celles d'enzymes responsables de la régénération d'ATP à partir d'ADP, une synthèse à l'échelle de la centaine de mg de PAPS (millimole) est possible¹³⁶. Au final, entre la réaction de synthèse du PAPS (ATP sulfurylase + APS kinase) ; la sulfatation (NodH par exemple) et la régénération du PAP (3'nucléotidase + deux kinases), un cocktail enzymatique de six enzymes est nécessaire (Figure 61).

Un second système de régénération, plus simple que le précédent implique uniquement deux enzymes, celle responsable de la sulfatation, comme NodH (*Sinorhizobium meliloti*) et l'arylsulfotransférase IV (AST-IV) (*Rattus norvegicus*) (Figure 63)¹³⁷. Cette dernière est capable de transférer directement un groupe sulfate, à partir de 4-nitrophényle sulfate (pNPS), sur le PAP. Cela génère une molécule de PAPS, utilisée dans la foulée par une sulfotransférase, qui génère à son tour une molécule de PAP, laquelle sera prise en charge par l'AST-IV. Le cycle est établi, et en une seule étape, le PAPS est synthétisé et régénéré. Les échelles de synthèse ne se comptent plus en quantité de PAPS synthétisé, car il n'est jamais isolé, mais en centaine de mg de produits finaux obtenus.

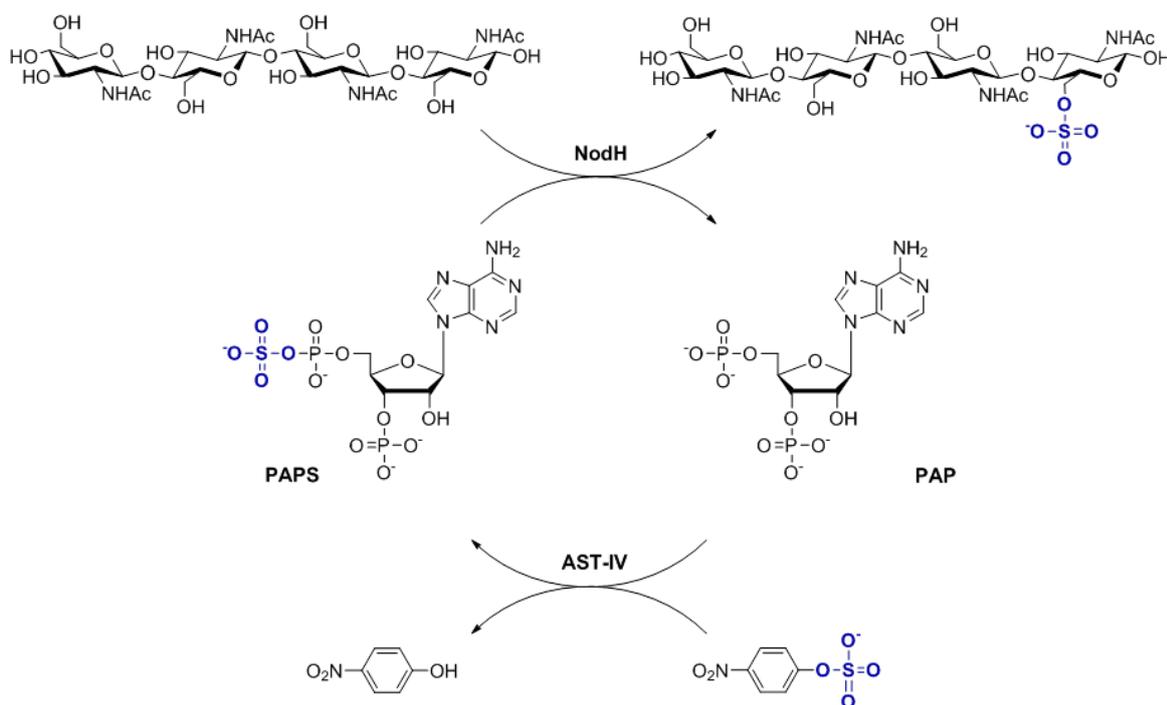


Figure 63. Synthèse de CO-IV sulfaté par couplage des activités enzymatiques de NodH (*S. meliloti*) et de l'AST-IV (*R. norvegicus*), adapté de Burkart *et al.*¹³⁷.

¹³⁵ Schwedock, J. S., Liu, C. X., Leyh, T. S. and Long, S. R., **1994**, *J. Bacteriol.*, 176, (22), 7055-7064.

¹³⁶ Lin, C. H., Shen, G. J., Garciajunceda, E. and Wong, C. H., **1995**, *J. Am. Chem. Soc.*, 117, (30), 8031-8032.

¹³⁷ Burkart, M. D., Izumi, M. and Wong, C. H., **1999**, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 38, (18), 2747-2750.

Dans le cadre des oligomères de chitine sulfatés par NodH les niveaux de synthèses sont particulièrement intéressants¹²⁴, de l'ordre de la centaine de mg du produits obtenus.

Enfin, ces deux sulfotransférases ont été caractérisés biochimiquement, à l'aide d'un test de dosage colorimétrique pour l'AST-IV, utilisant la formation de 4-nitrophénol (*p*NPOH), et par radioactivité pour NodH. Il est également possible d'utiliser l'aryl sulfotransférase IV pour doser indirectement une sulfotransférase, comme NodH par exemple¹³⁸.

¹³⁸ Burkart, M. D. and Wong, C. H., **1999**, *Anal. Biochem.*, 274, (1), 131-137.

IV. Résultats et discussion de la décoration par sulfatation

IV.1. Stratégie

L'objectif de ce travail est de sulfater à l'échelle préparative les chitinoligosaccharides obtenus précédemment (Chapitre III – Accès aux chitinoligosaccharides). La décoration par sulfatation en O-6 des COs est visée, notamment parce que c'est la décoration commune aux facteurs Nod et Myc. Pour cela, la voie retenue est le couplage de l'action de la sulfotransférase (ST) NodH (*Sinorhizobium meliloti*), identifiée comme responsable de la sulfatation en O-6 de l'extrémité réductrice des COs, avec l'action de l'arylsulfotransférase IV (*Rattus norvegicus*). Cela va permettre à la fois de décorer les COs et de synthétiser et régénérer le PAPS à partir du PAP. Cette stratégie permet donc de s'affranchir des deux contraintes principales de la sulfatation qui sont l'instabilité du PAPS et l'inhibition de la ST NodH par le PAP (Figure 63). Dans un premier temps, les STs NodH et AST-IV doivent être exprimées de façon recombinante. Par la suite, leurs actions seront couplées pour synthétiser des COs sulfatés.

IV.2. Expression de l'arylsulfotransférase IV (*Rattus norvegicus*)

IV.2.1. Stratégie d'expression

Différentes conditions d'expression sous forme soluble et active de l'arylsulfotransférase IV (*R. norvegicus*) chez la bactérie *E. coli* sont décrites. A partir d'une séquence nucléotidique proposée pour être une sulfotransférase¹³⁹, une première expression recombinante chez *E. coli* a permis de mettre en évidence l'activité de sulfatation de molécules aromatiques¹⁴⁰. D'autres études décrivent également l'expression de l'enzyme, notamment dans un milieu « Terrific Broth » (TB)¹⁴¹ qui a permis de doubler le niveau de production par rapport à l'utilisation du milieu LB. Dans ces études, l'AST-IV est produite avec une étiquette poly-histidine à l'extrémité N-Terminale. Devant ces descriptions d'expressions hétérologues sous forme soluble et active, c'est donc l'organisme *E. coli* qui est retenu afin de produire la sulfotransférase AST-IV. Ainsi, le gène *ast-IV* (*Rattus norvegicus*) a été spécialement synthétisé, avec une séquence nucléotidique optimisée pour l'expression chez la bactérie *E. coli*.

¹³⁹ Ozawa, S., Nagata, K., Gong, D. W., Yamazoe, Y. and Kato, R., **1990**, *Nucleic Acids Res.*, 18, (13), 4001-4001.

¹⁴⁰ Chen, X., Yang, Y. S., Zheng, Y. Q., Martin, B. M., Duffel, M. W. and Jakoby, W. B., **1992**, *Protein Express. Purif.*, 3, (5), 421-426.

¹⁴¹ Purchartova, K., Engels, L., Marhol, P., Sulc, M., Kuzma, M., Slamova, K., Elling, L. and Kren, V., **2013**, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97, (24), 10391-10398.

IV.2.2. Etude d'induction de l'expression de l'AST-IV

En s'inspirant de la littérature, des études d'induction ont été réalisées avec ce gène puis comparées afin d'identifier, parmi elles, la meilleure condition d'expression de la ST (Tableau 10). La souche *E. coli* BL21 est transformée par le plasmide pET28a_AST-IV, l'expression du gène est cytoplasmique, et la sulfotransférase AST-IV possède une séquence poly-histidine à son extrémité N-terminale, afin de la purifier sur résine de nickel.

La qualité de la surexpression est analysée sur gel de polyacrylamide 12% en conditions dénaturantes, d'après les protocoles décrits dans le chapitre II « Matériels et méthodes ». La présence de la protéine d'intérêt est estimée, avant et au cours de l'induction, sous sa forme soluble.

Au cours des trois études d'induction menées (Tableau 10), une surexpression de la sulfotransférase AST-IV a été observée. Lors de l'utilisation du protocole de production « classique », en milieu « Luria broth » (LB)⁵⁶, le meilleur niveau d'expression est observé après 5 heures d'induction à 25°C, en présence de 0,05 mM d'IPTG. Mais c'est avec l'utilisation du milieu de production TB⁵⁸ que la meilleure expression a été obtenue, après 20 heures d'induction à 16°C en présence de 0,1 mM d'IPTG (Figure 64, piste 8). La taille observée sur SDS-PAGE (33,6 kDa) est en accord avec la taille attendue (36 kDa). Une culture de bactérie *E. coli* BL21, transformée par le pET28a(+) est réalisée, et aucune protéine surexprimée dans les mêmes conditions n'est observée (Figure 64, pistes 1 à 4).

Souche	Construction	Température	Inducteur	Temps d'induction
BL21	pET28a_AST-IV (milieu LB)	25°C	0,1 mM [IPTG]	2, 5 et 22 heures
			0,05 mM [IPTG]	
			0,01 mM [IPTG]	
	pET28a_AST-IV (milieu TB)	16°C	0,1 mM [IPTG]	2, 5 et 22 heures
			0,05 mM [IPTG]	
			0,01 mM [IPTG]	
pET28a_AST-IV (milieu TB)	16°C	0,5 mM [IPTG]	2, 4 et 20 heures	
		0,1 mM [IPTG]		
		0,05 mM [IPTG]		

Tableau 10. Conditions d'expression de l'AST-IV (*R. norvegicus*) testées.

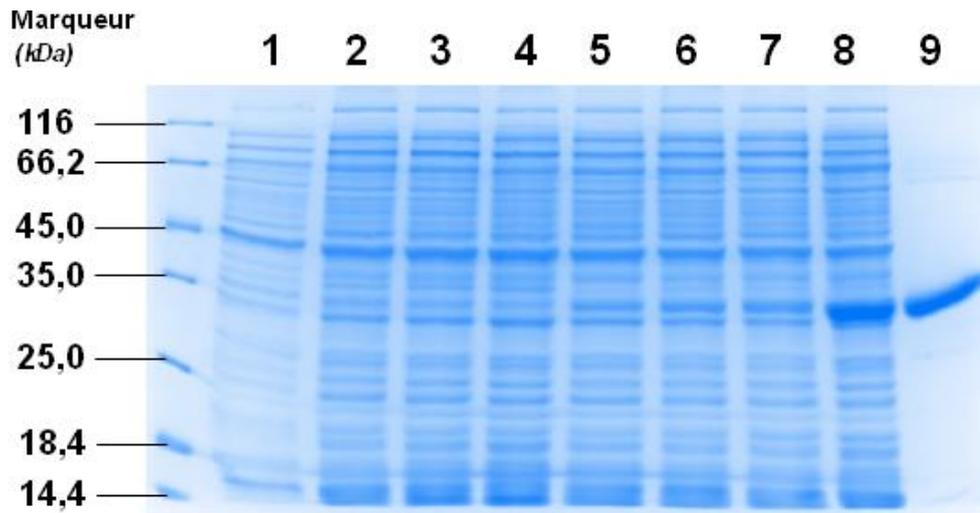


Figure 64. Analyse par SDS-PAGE 12% de l'expression de l'AST-IV (*R. norvegicus*) chez *E. coli* BL21. (1-4) Protéines cytoplasmiques d'*E. coli* BL21 transformées par le pET28a(+) après 0, 2, 4 et 20 heures de croissance, à 16°C, avec 0,1 mM d'IPTG. (5-8) Protéines cytoplasmiques d'*E. coli* BL21 transformées par le pET28a_AST-IV après 0, 2, 4 et 20 heures de croissance, à 16°C, avec 0,1 mM d'IPTG. (9) AST-IV purifiée sur résine de nickel (environ 20 µg de protéines déposés par piste).

IV.2.3. Production et purification de l'AST-IV

Deux cultures à plus grande échelle sont réalisées dans les conditions préalablement identifiées, l'une en milieu de production TB et l'autre en milieu LB. Les extraits cytoplasmiques sont passés sur résine de nickel afin de purifier l'AST-IV. Il est à noter qu'au cours de la purification, et ce quel que soit le protocole de production choisi, il est nécessaire de distinguer deux formes d'AST-IV. En effet, l'enzyme peut être produite sous la forme α (active) ou β (inactive)¹⁴². Il est donc nécessaire d'incuber en présence de phosphatase alcaline pendant 16 heures à 20°C l'enzyme fixée sur la résine de nickel. Cela va permettre de convertir l'enzyme sous sa forme active. La ST est ensuite éluée avec des solutions concentrées en imidazole (100 et 150 mM), puis dialysée et conservée à 4°C. L'enzyme est purifiée à homogénéité (Figure 64, piste 9). Le rendement de purification est de 180 mg d'AST-IV par litre de culture d'*E. coli* dans le milieu TB et de l'ordre de 65 mg d'AST-IV par litre de culture d'*E. coli* dans le milieu LB.

Ainsi, les protocoles de production de l'AST-IV ont été comparés, en utilisant des conditions d'induction similaires (Tableau 10). Un protocole est clairement identifié comme étant le plus efficace pour accéder en grande quantité à l'enzyme AST-IV. Selon les conditions décrites, trois fois plus d'AST-IV sont purifiées lors de l'utilisation du milieu de production

¹⁴² Yang, Y. S., Marshall, A. D., McPhie, P., Guo, W. X. A., Xie, X. F., Chen, X. and Jakoby, W. B., 1996, *Protein Express. Purif.*, 8, (4), 423-429.

TB par rapport au protocole utilisant du milieu LB. La composition du TB en fait un milieu encore plus riche que le LB, ce qui pourrait expliquer une meilleure production d'AST-IV.

IV.3. Expression de NodH (*Sinorhizobium meliloti*)

IV.3.1. Stratégie d'expression

Comme pour l'AST-IV, il existe différentes conditions d'expression de NodH (*S. meliloti*) sous forme soluble et active décrites chez la bactérie *E. coli*. Elle a été notamment utilisée pour le radiomarquage de LCOs, afin d'identifier des récepteurs chez les plantes^{143,144}. L'expression est également décrite au niveau du cytoplasme de la bactérie, avec une étiquette poly-histidine à l'extrémité C-terminale^{124,145}.

A l'aide de ces précédents travaux, c'est donc la bactérie *E. coli* qui est également retenue comme hôte afin de produire NodH (*S. meliloti*). L'enzyme sera produite au sein du cytoplasme de la bactérie et possèdera une séquence poly-histidine à son extrémité C-terminale afin de la purifier par chromatographie IMAC sur résine de nickel. Dans la littérature, la production de l'enzyme est réalisée à basse température afin d'éviter l'observation de corps d'inclusion. Pour cela, les températures d'induction testées ne dépasseront pas 20°C.

IV.3.2. Etudes d'induction de l'expression de NodH

En s'inspirant de la littérature, différentes conditions d'expression ont été testées (Tableau 11), et la qualité de la surexpression est évaluée par analyse sur SDS-PAGE. La présence de la protéine d'intérêt est estimée avant et au cours de l'induction, sous sa forme soluble.

Deux constructions pour l'expression de la ST NodH ont été utilisées dans cette étude. La première implique le plasmide d'expression pET20b, dont la séquence pelB leader est tronquée au cours du clonage, permettant une expression de la ST NodH au sein du cytoplasme, avec une séquence poly-histidine en C-Terminale. Les nombreuses conditions testées n'ont permis d'observer qu'une très faible surexpression de la ST NodH, uniquement après une purification sur résine de nickel qui permet de concentrer la protéine. En revanche, et malgré les précautions prises, elle se trouve majoritairement produite sous forme de corps d'inclusion, traduisant un bon niveau d'expression mais probablement un mauvais repliement de cette enzyme. Une co-expression a été réalisée avec des protéines chaperonnes GroES et GroEL, décrites pour aider au bon repliement¹⁴⁶.

¹⁴³ Bourdineaud, J. P., Bono, J. J., Ranjeva, R. and Cullimore, J. V., **1995**, *Biochem. J.*, 306, 259-264.

¹⁴⁴ Gressent, N., Cullimore, J., Ranjeva, R. and Bono, J. J., **2004**, *BMC Biochem.*, 5, (4).

¹⁴⁵ Pi, N. A., Yu, Y. H., Mougous, J. D. and Leary, J. A., **2004**, *Prot. Sci.*, 13, (4), 903-912.

¹⁴⁶ Cole, P. A., **1996**, *Structure*, 4, (3), 239-242.

Souche	Construction	Température	Inducteur	Temps d'induction
BL21	pET20b_nodH	15°C et 18°C	0,5 mM [IPTG] 0,1 mM [IPTG] 0,05 mM [IPTG] 0,01 mM [IPTG] 0,005 mM [IPTG]	2, 5, 22 et 44 heures
	pET20b_nodH + pREP4_GroESL	15°C et 18°C	0,5 mM [IPTG] 0,1 mM [IPTG] 0,05 mM [IPTG]	2, 5 et 22 heures
	pET20b_nodH	20°C	Auto-inductible	72 heures
BL21	pET21a_nodH	18°C	0,5 mM [IPTG] 0,3 mM [IPTG] 0,1 mM [IPTG]	3, 6 et 20 heures
BL21 STAR BL21 Rosetta	pET21a_nodH	18°C	0,3 mM [IPTG]	20 heures

Tableau 11. Conditions d'expression de la sulfotransférase NodH (*S. meliloti*) testées.

Cependant, aucune amélioration de production n'a été observée après analyse SDS-PAGE. Des essais d'expression utilisant le milieu auto-inductible ZYP5052 ont également été réalisés, sans amélioration du niveau de production. Le gène *nodH* a également été cloné dans le pET21a et en modifiant uniquement le plasmide pET d'expression, de meilleures conditions d'induction de la sulfotransférase NodH sont observées.

La souche *E. coli* BL21 est transformée par le plasmide pET21a_nodH, l'expression de la protéine recombinante est cytoplasmique avec une séquence poly-histidine à l'extrémité C-terminale. Le meilleur niveau d'expression est observé après 20 heures d'induction à 18°C en présence de 0,3 mM d'IPTG (Figure 65, piste 8). La taille observée sur SDS-PAGE (29,5 kDa) est en accord avec la taille attendue (31 kDa). Une culture contrôle est réalisée avec le pET21a, sans qu'aucune protéine surexprimée dans les mêmes conditions ne soit observée (Figure 65, pistes 1 à 4). Le niveau d'expression reste relativement faible. Aussi, d'autres souches ont alors été testées dans ces conditions d'expression (0,3 mM d'IPTG, 20 heures à 18°C).

La souche BL21 STAR offre une meilleure stabilité des ARNm, et donc potentiellement des rendements de production améliorés. Celle-ci a été testée sans succès, le niveau de surexpression ne semblant pas différent de celui obtenu avec la souche BL21.

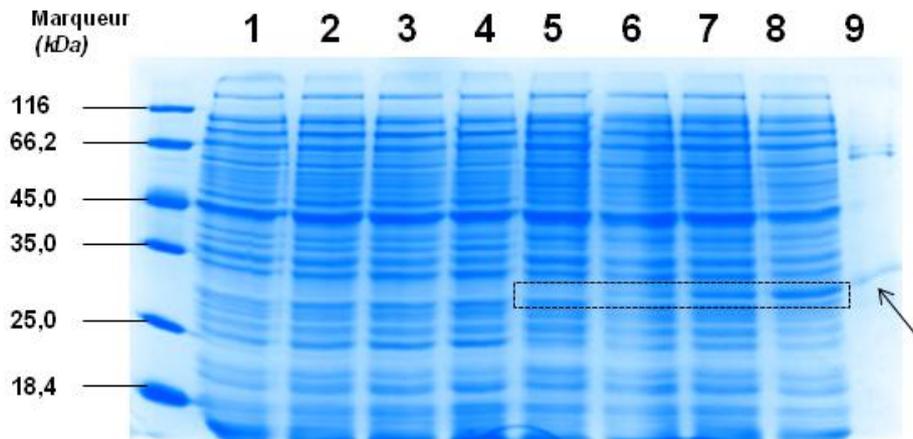


Figure 65. Analyse par SDS-PAGE 12% de l'expression de NodH (*S. meliloti*) chez *E. coli* BL21. (1-4) Protéines cytoplasmiques d'*E. coli* BL21 transformées par le pET21a(+) après 0, 3, 6 et 20 heures de croissance, à 18°C, avec 0,3 mM d'IPTG. (5-8) Protéines cytoplasmiques d'*E. coli* BL21 transformées par le pET21a_nodH après 0, 3, 6 et 20 heures de croissance, à 18°C, avec 0,3 mM d'IPTG. (9) NodH purifiée sur résine de nickel (environ 20 µg de protéines déposés par piste).

La séquence de NodH n'a pas été optimisée et possède dix codons rares différents chez *E. coli*, d'après le logiciel *rare codon caltor* (people.mbi.ucla.edu/sumchan/caltor.html). Ils apparaissent au total 27 fois dans la séquence dont deux fois de manière consécutive, et cela peut négativement influencer la qualité de la surexpression. La souche BL21 Rosetta surexprime des ARNt de codons rares chez *E. coli*, et donc des niveaux d'expression potentiellement supérieurs de la protéine hétérologue peuvent être attendus. Mais à nouveau celle-ci a été testée sans succès, le niveau de surexpression n'étant pas modifiée par rapport à la souche BL21.

IV.3.3. Production et purification de NodH

Une culture à plus grande échelle est réalisée dans les conditions préalablement identifiées. Les extraits cytoplasmiques sont passés sur résine de nickel afin de purifier la ST NodH. Elle est éluée avec des solutions concentrées en imidazole (100 et 150 mM), puis dialysée et conservée à 4°C. L'enzyme présente deux contaminants de plus haut poids moléculaires (Figure 65, piste 9). Le rendement de purification atteint 6 mg de ST NodH par litre de culture d'*E. coli* transformée par le pET21a_nodH.

IV.4. Synthèse préparative de chitinoligosaccharides sulfatés

L'objectif est maintenant d'utiliser les deux STs NodH et AST-IV pour une sulfatation à l'échelle préparative à partir d'oligomères de chitine précédemment obtenus (Chapitre III « Accès aux chitinoligosaccharides»). Cela permettra d'élargir la gamme de LCOs à des LCOs sulfatés par une séquence de sulfatation / *N*-désacétylation / acylation.

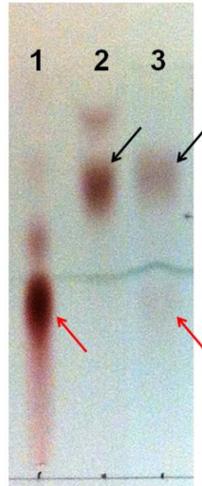


Figure 66. CCM de l'action de NodH sur le CO-V
(1) Standard CO-V (flèche rouge) (2) Standard CO-V(S) (flèche noire)
(3) Produit de l'action de la ST NodH (couplée à l'AST-IV) sur le CO-V (brut réactionnel).
Eluant propanol / eau / ammoniac 30 % (70/30/1)

Pour mettre en place ce remodelage enzymatique, un seul substrat est choisi, le chitinpentaose. La synthèse est réalisée sur 12 mg de CO-V. L'oligomère CO-V est mis en présence des sulfotransférases NodH (*S. meliloti*) et AST-IV (*R. norvegicus*) pendant 20 heures à 25°C. En utilisant des ratios AST-IV / substrat de 3 % (mol/mol) et NodH/ substrat de 0,15 % (mol/mol), on observe une réaction pratiquement quantitative à en juger par l'analyse CCM (Figure 66, piste 3). Le rapport frontal est équivalent au standard CO-V(S) (Figure 66, piste 2). L'analyse chromatographique indique également la présence de traces du produit de départ (Figure 66, piste 3, flèche rouge).

Afin de confirmer cette observation, des analyses par spectrométrie de masse sont réalisées sur les extraits réactionnels bruts. En analyse Maldi mode négatif, on observe uniquement le produit sulfaté, le substrat étant indétectable (Figure 67a). En analysant en mode positif, l'ensemble des COs sont détectés, c'est-à-dire le substrat et le produit de la réaction (Figure 67b).

La spectrométrie de masse n'étant pas quantitative, on ne peut se fier à l'intensité des pics pour avoir une idée de la proportion relative des espèces dans le mélange, même si celles-ci sont de nature proche. On constate en effet une différence importante entre l'intensité des tâches en CCM et celle des pics en spectrométrie de masse, avec une proportion apparente de substrat de départ plus faible par CCM. Il est également possible qu'une dé-sulfatation partielle se produise durant l'analyse par spectrométrie de masse.

Le milieu réactionnel brut, contenant les CO-V(S), n'est pas traité immédiatement, et le produit n'est donc pas purifié. Le remodelage de cet oligomère va se poursuivre par une étape de *N*-désacétylation, afin d'accéder à un précurseur de LCO sulfaté.

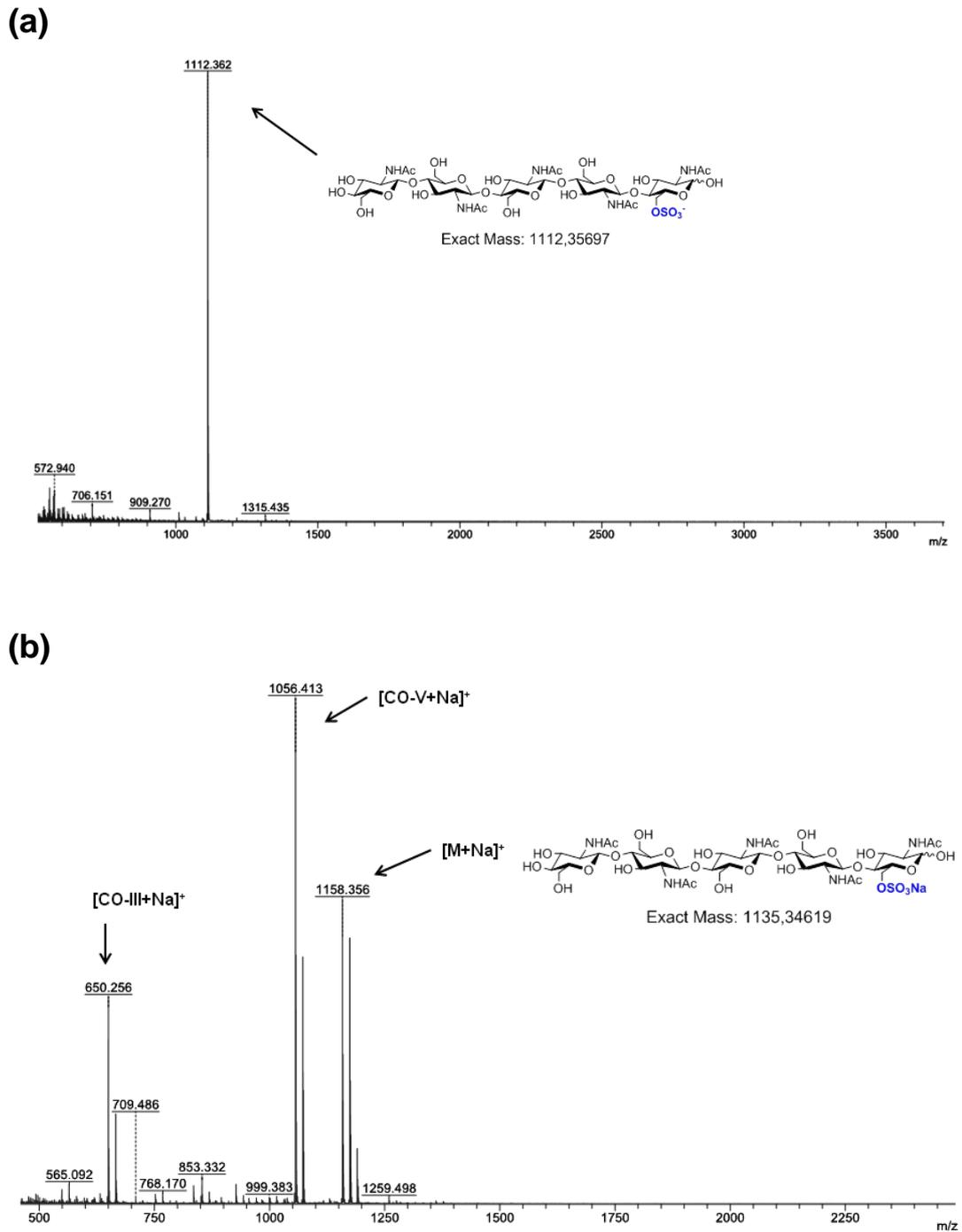


Figure 67. (a) Spectre de masse MALDI-TOF (mode négatif) du CO-V(S)
 (b) Spectre de masse MALDI-TOF (mode positif) du CO-V(S).

V. Conclusion

Dans ce travail, deux décorations de chitinoligosaccharides par voie enzymatique ont été envisagées.

La première est la décoration par *O*-carbamoylation de l'extrémité non-réductrice des COs. Cette étude a pour objectifs, d'une part de réaliser une étude biochimique de la CT No10, et d'autre part de produire à échelle préparative des COs carbamoylés. Ces derniers auraient constitué une base pour accéder à des LCOs carbamoylés. Le rôle de cette décoration aurait alors pû être étudié et mieux compris. Très peu connue et étudiée jusqu'à présent, la carbamoyltransférase No10 de *Sinorhizobium fredii* NR234A a été produite par voie recombinante chez *E. coli*. La mise au point de conditions d'expressions cytoplasmiques a permis une production élevée de la carbamoyltransférase avec un rendement de purification de 200 mg par litre de culture de bactérie transformée par le pET20b_no10. La protéine a été purifiée sur résine de nickel. Aucune activité n'a été observée par la suite, que ce soit en utilisant l'enzyme purifiée, ou celle présente dans les extraits bactériens bruts. Un séquençage N-Terminale est en cours afin de valider l'identité de la protéine surexprimée.

La seconde décoration est la sulfatation en *O*-6 de l'extrémité réductrice des COs, réalisée par la sulfotransférase NodH. La stratégie retenue implique l'utilisation couplée des sulfotransférases NodH (*S. meliloti*) et arylsulfotransférase IV (*R. norvegicus*), mettant en jeu un cycle de régénération du cofacteur PAPS. La comparaison de conditions d'expressions cytoplasmiques a permis une production élevée de la sulfotransférase de rat avec un rendement de purification de 180 mg par litre de culture de bactérie transformée par le pET28a_AST-IV. En revanche, concernant la ST NodH et malgré un travail conséquent d'expression, l'enzyme est produite plus difficilement chez *E. coli*. Seulement six mg d'enzyme sont purifiés par litre de culture de bactéries transformées par le pET21a_nodH. Il existe de très nombreuses possibilités afin d'améliorer le rendement de production de la ST NodH. Parmi les premières, l'utilisation d'une séquence génomique optimisée pour l'expression chez la bactérie *E. coli*. Des travaux plus élaborés sur le positionnement des étiquettes d'aide à la purification, voir l'expression de l'enzyme en fusion avec la thiorédoxine pourrait avoir une influence sur le niveau d'expression¹⁴⁷. Le milieu de production TB est également une voie envisageable, tout comme la possibilité d'utiliser d'autres organismes hôtes tels que les levures.

¹⁴⁷ Lavallie, E. R., Diblasio, E. A., Kovacic, S., Grant, K. L., Schendel, P. F. and McCoy, J. M., **1993**, *Bio-Technology*, 11, (2), 187-193.

Cependant, toutes ces voies proposées afin d'augmenter le niveau de production de la sulfotransférase NodH se rapproche plus du développement, que d'un travail de recherche. Il était important ici de mettre en place le cycle de sulfatation des COs, impliquant une régénération du PAPS à partir de PAP. En effet, un chitinpentaose sulfaté a été synthétisé à l'échelle de la dizaine de mg, sans être encore purifié. Le but de ce produit sulfaté est de l'utiliser comme substrat pour des enzymes de type chitine *N*-désacétylases, et même de réaliser en une seule étape de synthèse la formation d'un précurseur de LCOs sulfaté. Nous disposons donc avec ce produit de matériel suffisant pour développer notre approche d'accès à des précurseurs de LCOs.

CHAPITRE V

ACCES AUX LIPOCHITINOLIGOSACCHARIDES

I.	Rappels bibliographiques	170
I.1.	Les chitine <i>N</i> -désacétylases	170
I.1.1.	Généralités	170
I.1.2.	Répartition et rôles biologiques.....	171
I.1.2.1.	Chitine <i>N</i> -désacétylases de champignons.....	171
I.1.2.2.	Chitine <i>N</i> -désacétylases d'insectes.....	172
I.1.2.3.	Chitine <i>N</i> -désacétylases bactériennes.....	172
I.1.2.3.a.	<i>Escherichia coli</i>	173
I.1.2.3.b.	<i>Vibrio</i>	173
I.1.2.3.c.	Rhizobiums	175
I.1.2.1.	Chitine <i>N</i> -désacétylases archéobactériennes	175
I.2.	Modes d'action.....	175
I.2.1.	Schéma de <i>N</i> -désacétylation.....	176
I.2.1.1.	Attaques multiples	176
I.2.1.2.	Attaque unique	177
I.2.2.	Les cations métalliques.....	178
I.3.	L'acylation des lipochitinoligosaccharides chez les rhizobiums	179
I.4.	Acylation par couplage chimique	180
II.	Résultats.....	182
II.1.	Stratégie	182
II.2.	La chitine <i>N</i> -désacétylase VC1280 (<i>Vibrio cholerae</i>).....	184
II.2.1.	Expression et purification de VC1280	185
II.2.2.	Caractérisation biochimique	186
II.3.	Synthèses préparatives de COs-(N) par le procédé VC1280	188
II.3.1.	Précurseur d'analogues de LCOs	189
II.3.2.	Précurseurs de LCOs.....	191
II.3.3.	Précurseur de LCO sulfaté	192
II.4.	La chitine <i>N</i> -désacétylase NodB (<i>Sinorhizobium meliloti</i>)	194
II.4.1.	Expression et purification de NodB.....	194
II.4.1.1.	Tests d'expression chez la levure.....	195
II.4.1.1.a.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	195
II.4.1.1.b.	<i>Pichia pastoris</i>	195
II.4.1.2.	Tests d'expression chez <i>E. coli</i> BL21.....	196

II.4.1.2.a.	Dans le périplasme	196
II.4.1.2.b.	Dans le cytoplasme	197
II.4.2.	Caractérisation biochimique	201
II.5.	Synthèse préparative de COs-(N) par le procédé NodB	204
II.5.1.	Précurseurs de LCOs non fonctionnalisés	205
II.5.2.	Précurseurs de LCOs fonctionnalisés	206
II.5.2.1.	Précurseurs de LCOs sulfatés	206
II.5.2.1.a.	Approche par synthèse chimique totale	207
II.5.2.1.b.	Approche enzymatique (NodB / NodH / AST-IV)	208
II.5.2.2.	Précurseur de LCO fucosylé	210
II.5.2.3.	Précurseur de LCO propargylé.....	212
II.6.	Bilan de préparation des précurseur de LCOs	214
II.7.	Acylation des chitinoligomères <i>N</i> -désacétylés.....	215
III.	Conclusion.....	216

L'une des décorations les plus caractéristiques des facteurs Nod et Myc est la chaîne grasse fixée sur le sucre non réducteur. Elle apporte un caractère amphiphile à ces molécules signal. Les études physico-chimiques ont montré que les facteurs Nod forment des agrégats à des concentrations de l'ordre du millimolaire¹⁴⁸. Les LCOs présentent plutôt des réponses chez les plantes à des concentrations de l'ordre du nanomolaire²⁴. Cela semble indiquer que, malgré leur caractère amphiphile, les LCOs à l'état physiologique ne forment pas de micelles mais restent sous forme monomérique. D'infimes modifications sur la chaîne grasse, comme une insaturation supplémentaire, ainsi que la présence d'un groupement méthyle sur l'azote non-réducteur ont un impact sur la conformation de la molécule signal. En combinant des données expérimentales de mesures par RMN et de la modélisation moléculaire, des caractéristiques structurales importantes des LCOs ont été établies. Ils sont composés d'une partie plutôt rigide, le squelette saccharidique, couplée à une partie plus flexible, la chaîne lipidique¹⁴⁹. L'orientation entre le squelette saccharidique et la chaîne grasse peut ainsi être pratiquement parallèle (Figure 68a) ou orthogonale (Figure 68b). Cela va influencer le spectre de reconnaissance entre partenaires ; ce dernier est notamment dépendant de la longueur de la chaîne grasse (C₁₆ à C₂₀), ainsi que du nombre d'insaturations présentes (entre zéro et quatre)²⁹.

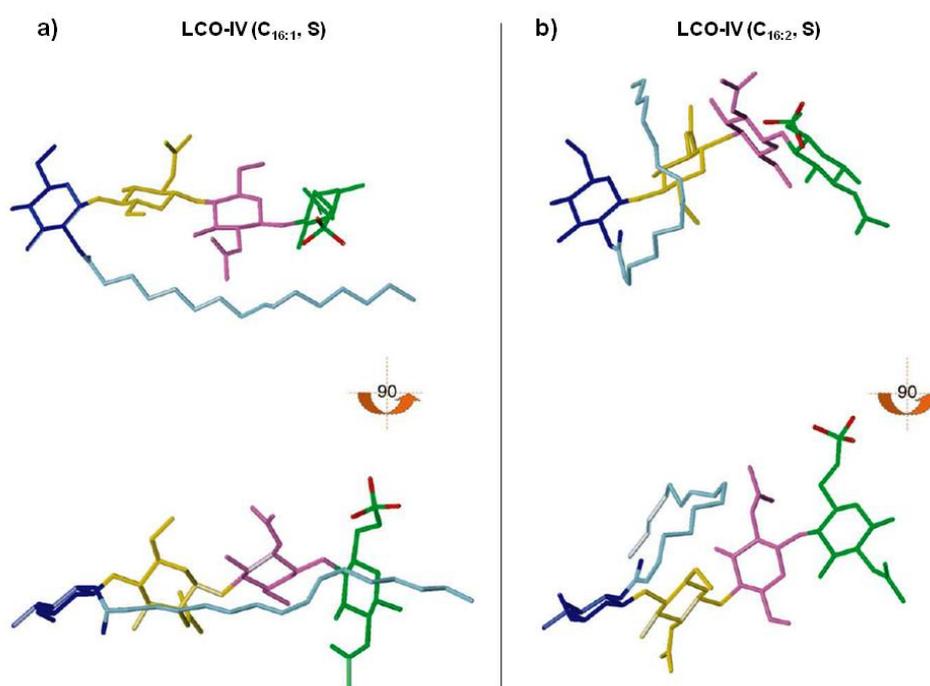


Figure 68. Conformations de plus faible énergie du (a) LCO-IV(C_{16:1} S) (b) LCO-IV(C_{16:2} S). Les résidus GlcNAc sont en bleu, jaune, rose et vert, et la chaîne grasse en bleu ciel, d'après Groves *et al.*¹⁴⁸.

¹⁴⁸ Groves, P., Offermann, S., Rasmussen, M. O., Canada, F. J., Bono, J. J., Driguez, H., Imberty, A. and Jimenez-Barbero, J., **2005**, *Org. Biomol. Chem.*, 3, (8), 1381-1386.

¹⁴⁹ Morando, M. A., Nurisso, A., Grenouillat, N., Vauzeilles, B., Beau, J. M., Canada, F. J., Jimenez-Barbero, J. and Imberty, A., **2011**, *Glycobiology*, 21, (6), 824-833.

I. Rappels bibliographiques

Après la synthèse du squelette saccharidique par la $\beta(1-4)$ -*N*-acétyl-D-glucosaminyltransférase NodC, une étape de *N*-désacétylation de l'extrémité non-réductrice par la carbohydre estérase NodB précède l'action de l'acyltransférase NodA. Cette dernière fixe la chaîne grasse sur le chitinoligosaccharide *N*-désacétylé pour produire un lipochitinoligosaccharide¹⁵⁰.

I.1. Les chitine *N*-désacétylases

L'activité enzymatique de *N*-désacétylation des chitinoligosaccharides est décrite dans la littérature, avec par exemple la chitine *N*-désacétylase (CD) NodB, impliquée dans la biosynthèse des facteurs de nodulation, mais également lors de processus de remodelage et/ou de dégradation de la chitine. L'objectif est de développer cette approche de remodelage enzymatique à l'échelle préparative, pour la synthèse de précurseurs de LCOs, en utilisant les propriétés spécifiques de chitine *N*-désacétylases.

I.1.1. Généralités

A ce jour, en regard de l'abondance naturelle de la chitine, relativement peu d'organismes ont été décrits possédant des activités de *N*-désacétylation de ce polymère, soit au travers d'identification de gènes codant pour des chitine *N*-désacétylases, soit par la mise en évidence d'activité *in vitro*.

La spécificité de substrats des CD est très variable, certaines utilisant la chitine plus ou moins acétylée ou ses oligomères, d'autres n'étant actives que sur les oligomères, voir seulement sur le chitinbiose. Les enzymes utilisant le monomère GlcNAc comme substrat sont nommées GlcNAc *N*-désacétylases (EC 3.5.1.33). Celles utilisant le dimère GlcNAc-GlcNAc comme substrat sont nommées chitine disaccharide *N*-désacétylases (ou chitinbiose *N*-désacétylases) (EC 3.5.1.105). Enfin, la dernière catégorie est active sur de la chitine, du chitosane et les oligomères de chitine (EC 3.5.1.41). Elles sont nommées chitine *N*-désacétylases (CDs), et nous nous sommes intéressés à cette classe d'enzyme dans ce travail. Il semblerait que certaines CD ne soient pas ou très peu actives sur substrat polymérique (NodB par exemple), et pourraient être considérées comme des chitine oligosaccharide *N*-désacétylases (CODs) (EC 3.5.1.-). Cette classe d'enzymes n'étant pas définie dans la nomenclature IUBMB, nous utiliserons le terme chitine désacétylase (CD) pour l'ensemble

¹⁵⁰ Spaink, H. P., Wijfjes, A. H. M., Vanderdrift, K., Haverkamp, J., Thomasoates, J. E. and Lugtenberg, B. J. J., 1994, *Mol. Microbiol.*, 13, (5), 821-831.

des activités décrites dans ce manuscrit. Dans la classification CAZY (www.cazy.org)⁷⁰, les CDs sont définies comme des carbohydre estérase (CE) de la famille 4. L'ensemble des membres de cette famille possède une région particulièrement conservée dans leur séquence primaire, notée comme le « domaine d'homologie NodB », en référence à la CD NodB, impliquée dans la biosynthèse des facteurs de nodulation¹⁵¹.

Les membres de cette famille possèdent également une activité métallo-dépendante, avec une triade de résidus conservée (Aspartate – Histidine – Histidine) jouant un rôle dans la coordination d'un cation divalent (Zn^{2+} ou Co^{2+}) impliqué dans la catalyse.

I.1.2. Répartition et rôles biologiques

Les CDs ne semblent pas ubiquitaires au sein du vivant. Certaines ont été identifiées chez des champignons, d'autres chez des insectes, chez des archées et enfin chez des bactéries¹⁵².

I.1.2.1. Chitine *N*-désacétylases de champignons

De nombreuses chitine *N*-désacétylases de champignons présentent des activités sur des COs, mais également sur de la chitine partiellement *N*-désacétylée, donc soluble alors qu'elles restent inactives sur de la chitine¹⁵³. Les chitine *N*-désacétylases de champignons sont répandues et bien étudiées. On les classe en deux grandes catégories, (i) les CDs intracellulaires qui sont impliquées dans la biosynthèse de chitosane¹⁵⁴ et dans la sporulation¹⁵⁵, (ii) les CDs extracellulaires qui sont sécrétées afin de modifier la paroi cellulaire du champignon, composée notamment de chitine¹⁵⁶, comme pour le champignon *Colletotrichum lindemuthianum*. Ce champignon est un organisme pathogène pour les plantes. Au cours de son processus d'infection, en sécrétant des CDs, il va modifier la composition de ses propres parois et contourner ainsi le système immunitaire de la plante infectée¹⁵⁷, laquelle synthétise notamment des chitinases pour détruire les cellules du parasite¹⁵⁸.

Les deux premières CDs mises à jour l'ont été à partir d'extraits de champignons *Mucor*

¹⁵¹ Kafetzopoulos, D., Thireos, G., Vournakis, J. N. and Bouriotis, V., **1993**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90, (17), 8005-8008.

¹⁵² Zhao, Y., Park, R.-D. and Muzzarelli, R. A. A., **2010**, *Mar. Drugs*, 8, (1), 24-46.

¹⁵³ Wang, Y., Song, J. Z., Yang, Q., Liu, Z. H., Huang, X. M. and Chen, Y., **2010**, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 162, (3), 843-854.

¹⁵⁴ Christodoulidou, A., Briza, P., Ellinger, A. and Bouriotis, V., **1999**, *FEBS Lett.*, 460, (2), 275-279.

¹⁵⁵ Matsuo, Y., Tanaka, K., Matsuda, H. and Kawamukai, M., **2005**, *FEBS Lett.*, 579, (12), 2737-2743.

¹⁵⁶ El Gueddari, N. E., Rauchhaus, U., Moerschbacher, B. M. and Deising, H. B., **2002**, *New Phytol.*, 156, (1), 103-112.

¹⁵⁷ Tsigos, I. and Bouriotis, V., **1995**, *J. Biol. Chem.*, 270, (44), 26286-26291.

¹⁵⁸ Collinge, D. B., Kragh, K. M., Mikkelsen, J. D., Nielsen, K. K., Rasmussen, U. and Vad, K., **1993**, *Plant J.*, 3, (1), 31-40.

*rouxi*¹⁵⁹ et *Colletotrichum lindemuthianum*¹⁶⁰. Une quinzaine d'autres chitine *N*-désacétylases de champignons ont par la suite été identifiées¹⁵². Celle de *Colletotrichum lindemuthianum* a été la plus étudiée avec des études mécanistiques¹⁶¹ et la première résolution de structure pour une enzyme de champignons de la famille CE-4¹⁶².

I.1.2.2. Chitine *N*-désacétylases d'insectes

Chez les insectes, la chitine fonctionne comme un matériau d'échafaudage, en soutenant les cuticules de l'épiderme et de la trachée, ainsi que les matrices péritrophiques bordant l'épithélium intestinal. La croissance des insectes et la morphogenèse sont strictement dépendantes de la capacité de remodelage de ces structures contenant de la chitine. A cet effet, les insectes produisent, de façon répétée, des chitine synthases et des enzymes chitinolytiques au sein de ces différents tissus¹⁶³.

Deux chitine *N*-désacétylases ont été décrites chez la drosophile comme étroitement associées à la membrane péritrophique¹⁶⁴. Le rôle et l'action de ces enzymes est encore mal défini, mais lorsqu'elles sont mutées, le développement du tube trachéal de la drosophile est anormalement long et tortueux. Il semble donc que, par leur action, ces enzymes modifient les propriétés physiques de la membrane péritrophique, avec pour conséquence le contrôle de la croissance du tube trachéal.

I.1.2.3. Chitine *N*-désacétylases bactériennes

Il existe trois grands systèmes bactériens décrits impliquant une expression de CDs, la bactérie *E. coli*, les bactéries marines du genre *Vibrio* et les bactéries rhizobiums. Pour les deux premiers systèmes, les CDs interviennent dans des processus de dégradation de la chitine et d'assimilation d'énergie alors que pour les rhizobiums, l'utilisation de CD entre en jeu pour la synthèse de molécules signal, les LCOs. Les CDs impliquées dans des processus de catabolisme ont essentiellement comme substrat le produit de dégradation majoritaire des chitinases, le chitinbiose (CO-II), qui correspond au motif structural de répétition de base de la chitine. Les CDs impliquées dans la biosynthèse des LCOs agissent quant à elles sur des DPs plus élevés (CO-III au CO-VI).

¹⁵⁹ Araki, Y. and Ito, E., **1975**, *Eur. J. Biochem.*, 55, (1), 71-78.

¹⁶⁰ Kauss, H., Jeblick, W. and Young, D. H., **1983**, 28, (2), 231-236.

¹⁶¹ Hekmat, O., Tokuyasu, K. and Withers, S. G., **2003**, *Biochem. J.*, 374, 369-380.

¹⁶² Blair, D. E., Hekmat, O., Schuttelkopf, A. W., Shrestha, B., Tokuyasu, K., Withers, S. G. and van Aalten, D. M. F., **2006**, *Biochemistry*, 45, (31), 9416-9426.

¹⁶³ Merzendorfer, H. and Zimoch, L., **2003**, *J. Exp. Biol.*, 206, (24), 4393-4412.

¹⁶⁴ Luschnig, S., Batz, T., Armbruster, K. and Krasnow, M. A., **2006**, *Curr. Biol.*, 16, (2), 186-194.

I.1.2.3.a. *Escherichia coli*

E. coli est susceptible d'utiliser de petits chitinoligosaccharides comme le chitinbiose (CO-II) ou le chitobiose (GlcN-GlcN) afin d'assurer sa croissance¹⁶⁵. Malgré la présence d'un gène de chitinase dans son génome, ce n'est cependant pas une bactérie chitinolytique¹⁶⁶. Le milieu naturel d'*E. coli* étant l'intestin des mammifères, il est supposé que de petits chitinoligosaccharides se retrouvent au niveau du tube digestif et servent de source d'énergie pour *E. coli*. Lors de l'internalisation du chitinbiose (Figure 69a), il est phosphorylé en passant la membrane interne de la bactérie puis une CD cytoplasmique *N*-désacétyle le dimère en position réductrice. Ce dernier est alors hydrolysé, l'unité GlcN libérée est phosphorylée, alors que l'unité GlcNAc-6-P est *N*-désacétylée pour donner un second GlcN-6-P.

Cette réaction est catalysée par une β -*N*-acétylglucosamine-6-phosphate *N*-désacétylase¹⁶⁷. Au final, les deux monomères GlcN-6-P sont convertis en fructose-6-P pour entrer dans le cycle de la glycolyse.

I.1.2.3.b. *Vibrio*

L'immense quantité de chitine produite chaque année est principalement recyclée par les bactéries marines chitinolytiques, notamment les bactéries du genre *Vibrio*. Cela peut être la seule source de carbone, d'azote et d'énergie pour ces micro-organismes. La dégradation de la chitine par ces bactéries est étudiée, mais sans être encore totalement comprise car particulièrement complexe. Des cascades chitinolytiques ont été développées afin de dégrader ce polymère insoluble en fructose-6-P, en acétate et en ammoniac¹⁶⁸. Ces dernières étapes de dégradation ont été rapidement identifiées¹⁶⁹, mais le processus complet pour y parvenir reste mal défini, et implique de nombreuses enzymes.

Après l'adhésion des bactéries à la chitine, des chitinases sont sécrétées et dégradent le polymère en oligomères, dont le produit final majoritaire est le chitinbiose. Ce dernier va induire l'expression de nombreux gènes impliqués dans le catabolisme de la chitine¹⁷⁰.

Une description récente de CD dans ce processus laisse à penser qu'elles sont sécrétées dans le milieu extracellulaire¹⁷¹, où elles *N*-désacétylent le chitinbiose sur la position réductrice.

¹⁶⁵ Verma, S. C. and Mahadevan, S., **2012**, *J. Bacteriol.*, 194, (18), 4959-4971.

¹⁶⁶ Francetic, O., Badaut, C., Rimsky, S. and Pugsley, A. P., **2000**, *Mol. Microbiol.*, 35, (6), 1506-1517.

¹⁶⁷ Souza, J. M., Plumbridge, J. A. and Calcagno, M. L., **1997**, *Arch. Biochem. Biophys.*, 340, (2), 338-346.

¹⁶⁸ Meibom, K. L., Li, X. B. B., Nielsen, A. T., Wu, C. Y., Roseman, S. and Schoolnik, G. K., **2004**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 101, (8), 2524-2529.

¹⁶⁹ Keyhani, N. O. and Roseman, S., **1999**, *Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subj.*, 1473, (1), 108-122.

¹⁷⁰ Li, X. B. and Roseman, S., **2004**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 101, (2), 627-631.

¹⁷¹ Hirano, T., Aoki, M., Kadokura, K., Kumaki, Y., Hakamata, W., Oku, T. and Nishio, T., **2011**, *Lett. Appl. Microbiol.*, 53, (2), 161-166.

Ce disaccharide (GlcNAc-GlcN) est alors internalisé et induit également la production d'enzymes chitinolytiques par des mécanismes encore à définir¹⁷². Il pourra alors être catabolisé (Figure 69b).

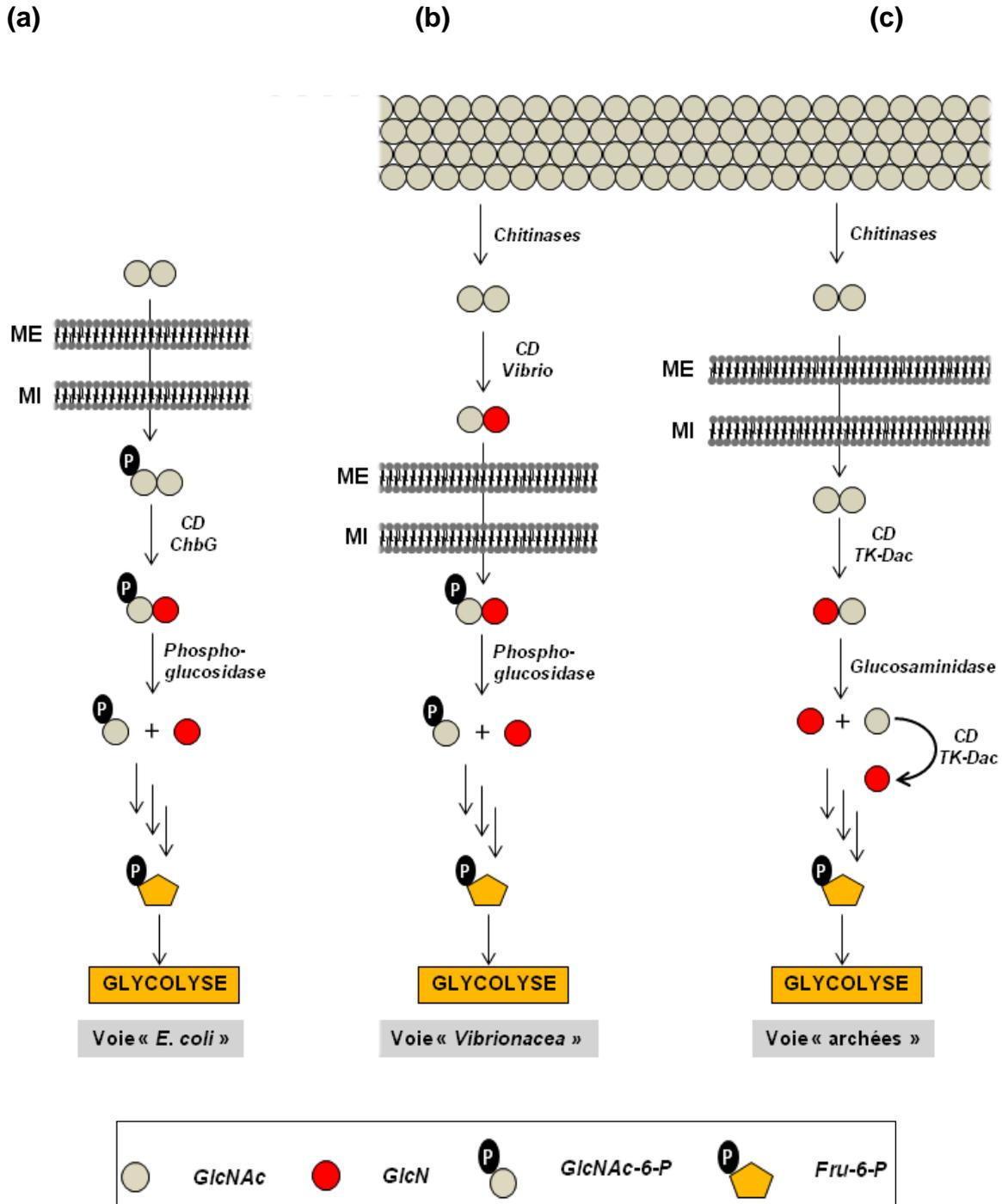


Figure 69. Voies bactériennes chitinolytiques impliquant des CDs (ME : membrane externe, MI : membrane interne).

¹⁷² Hirano, T., Kadokura, K., Ikegami, T., Shigeta, Y., Kumaki, Y., Hakamata, W., Oku, T. and Nishio, T., 2009, *Glycobiology*, 19, (9), 1046-1053.

Différentes CDs ont été identifiées chez les *Vibrio*^{172, 173} et certaines ont été exprimées par voie recombinante et caractérisées *in vitro*^{174, 175, 176}.

I.1.2.3.c. Rhizobiums

Les chitine *N*-désacétylases de rhizobiums participent à la voie de biosynthèse de molécules signal (LCOs) et non à des processus d'acquisition d'énergie. A ce jour, une seule CD de rhizobium est décrite, NodB (*Sinorhizobium meliloti*)²⁷. Sa caractérisation biochimique est partielle, avec une activité *in vitro* décrite sur du CO-II au CO-IV, alors que ce gène est présent dans des souches produisant des LCOs comportant cinq unités GlcNAc²⁴. Cette enzyme est spécifique de la position non-réductrice des chitinoligosaccharides.

I.1.2.1. Chitine *N*-désacétylases archéobactériennes

Chez les archées, très peu d'informations sont disponibles sur le mode de dégradation de la chitine. Il semble différent de ceux décrits chez les bactéries du genre *Vibrio* et *E. coli*. En effet, on ne retrouve aucune trace dans les génomes d'archées d'enzymes responsables des dernières étapes de dégradation de la chitine, telles que la phosphorylation du chitinbiose, son hydrolyse, puis la *N*-désacétylation d'un GlcNAc phosphorylé¹⁷⁷. Cette différence se retrouve dans l'activité des CDs décrites dans ces voies. Elles *N*-désacétylent la position réductrice d'un CO-II¹⁷⁸, qui est ensuite hydrolysé en GlcN et GlcNAc (Figure 69c). Ce dernier est substrat à son tour de la CD pour fournir un second GlcN. Ces deux unités GlcN sont alors phosphorylées¹⁷⁹ puis entrent dans le cycle de la glycolyse. L'activité de *N*-désacétylation d'un monomère GlcNAc est une caractéristique spécifique des CDs d'archées.

I.2. Modes d'action

Les CDs fongiques, bactériennes et d'archées présentent des modes d'action différents. Les degrés de *N*-désacétylation peuvent aller d'une seule hydrolyse sur une position spécifique de l'oligomère de chitine à des attaques multiples pour amener à la formation d'un

¹⁷³ Ohishi, K., Yamagishi, M., Ohta, T., Motosugi, M., Izumida, H., Sano, H., Adachi, K. and Miwa, T., **1997**, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 61, (7), 1113-1117.

¹⁷⁴ Li, X., Wang, L.-X., Wang, X. and Roseman, S., **2007**, *Glycobiology*, 17, (12), 1377-1387.

¹⁷⁵ Sakamoto, Y., Kuno, E., Tomiyama, A., Hirano, T., Kumaki, Y., Tanaka, A., Kanda, H., Furuya, K., Hakamata, W., Oku, T. and Nishio, T., **2009**, *J. Appl. Glycosci.*, 56, 273-276.

¹⁷⁶ Kadokura, K., Sakamoto, Y., Saito, K., Ikegami, T., Hirano, T., Hakamata, W., Oku, T. and Nishio, T., **2007**, *Biotechnol. Lett.*, 29, (8), 1209-1215.

¹⁷⁷ Tanaka, T., Fukui, T., Atomi, H. and Imanaka, T., **2003**, *J. Bacteriol.*, 185, (17), 5175-5181.

¹⁷⁸ Tanaka, T., Fukui, T., Fujiwara, S., Atomi, H. and Imanaka, T., **2004**, *J. Biol. Chem.*, 279, (29), 30021-30027.

¹⁷⁹ Koga, S., Yoshioka, I., Sakuraba, H., Takahashi, M., Sakasegawa, S., Shimizu, S. and Ohshima, T., **2000**, *J. Biochem.*, 128, (6), 1079-1085.

oligomère de chitosane composé uniquement d'unités β -D-glucosamines (GlcN).

I.2.1. Schéma de *N*-désacétylation

I.2.1.1. Attaques multiples

La CD CICDA (*C. lindemuthianum*) a une activité particulière, de type « endo », dépendant directement du degré de polymérisation du substrat CO¹⁸⁰. Par exemple, sur un CO-II, seule l'extrémité non-réductrice sera *N*-désacétylée, alors que sur un CO-IV, selon un schéma réactionnel défini, l'oligomère complet sera *N*-désacétylé après quatre attaques successives (Figure 70a). L'utilisation combinée de β -*N*-acétylhexosaminidase (EC 3.2.1.52) et de β -D-glucosaminidase (EC 3.2.1.165), qui hydrolysent respectivement des résidus β -*N*-acétylglucosaminyles et des résidus β -glucosaminyles à partir de l'extrémité non-réductrice du CO¹⁸¹, permet d'identifier sans ambiguïté les produits de réaction de la CD.

La chitine *N*-désacétylase de *M. rouxii*, a été testée sur des oligomères de chitine (CO-II à CO-VII) et est décrite comme étant de type « exo ». Ainsi, elle est capable de *N*-désacétyler un chitintétraose en partant de l'extrémité non réductrice pour aller jusqu'à l'extrémité réductrice, en présentant une activité « processive » (Figure 70b).

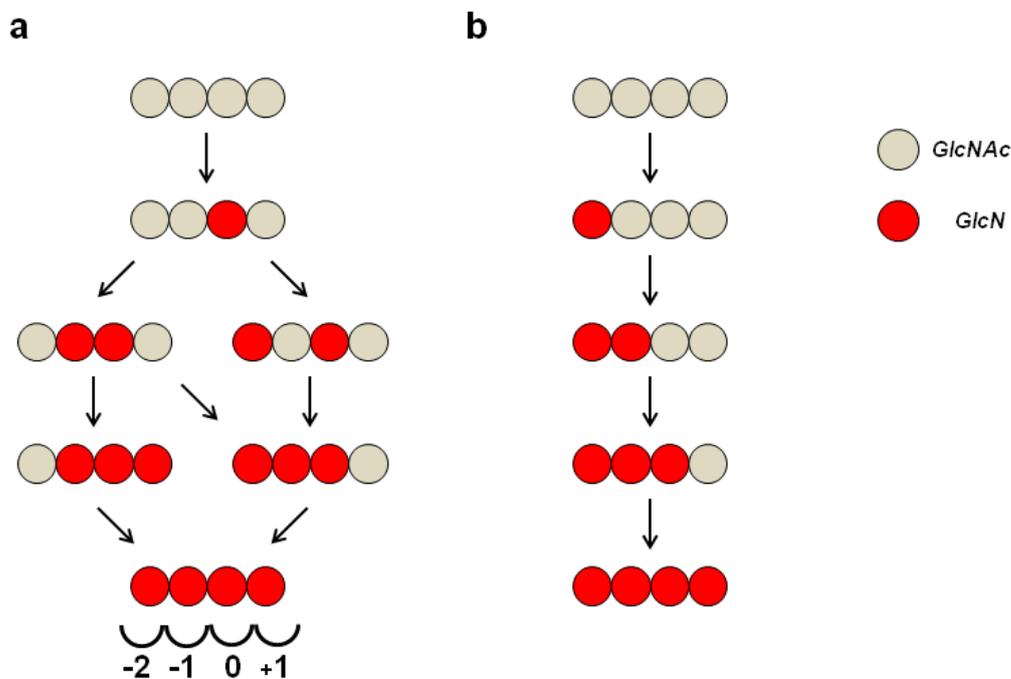


Figure 70. Mode de *N*-désacétylation d'un chitintétraose par (a) une « endo » CD (*C. lindemuthianum*) (b) une « exo » CD (*M. rouxii*), d'après Zhao *et al.*¹⁵².

¹⁸⁰ Tokuyasu, K., Mitsutomi, M., Yamaguchi, I., Hayashi, K. and Mori, Y., **2000**, *Biochemistry*, 39, (30), 8837-8843.

¹⁸¹ Hamer, S. N., Moerschbacher, B. M. and Kolkenbrock, S., **2014**, *Carbohydr. Res.*, 392, (0), 16-20.

Cependant selon le DP du substrat (CO-III, CO-VI et CO-VII), l'unité réductrice peut rester intacte¹⁸². Ce schéma d'attaque multiple se retrouve donc plutôt chez les enzymes de champignons et n'est pas adapté à des fins de synthèse de précurseurs de LCOs.

I.2.1.2. Attaque unique

Les enzymes identifiées comme des « mono-*N*-désacétylases » sont regroupées dans le Tableau 12. D'après la littérature, il y a trois enzymes candidates pour notre application de synthèse de précurseurs de LCOs, possédant un DP de quatre ou cinq. Parmi elles, on retrouve l'enzyme responsable de la *N*-désacétylation de l'oligomère de chitine lors de la biosynthèse des LCOs, NodB.

CD	Schéma de <i>N</i> -désacétylation	Substrats						Réf.
		GlcNAc	CO-II	CO-III	CO-IV	CO-V	CO-VI	
NodB (<i>S. melloti</i>)		✗	✓	✓	✓	nt	nt	27
Tk-Dac (<i>T. kodakaraensis</i>)		✓	✓	✓	✓	✓	nt	178
Pf-Dac (<i>P. furiosus</i>)		✓	✓	nt	nt	nt	nt	183
Ph-Dac (<i>P. horikoshii</i>)		✓	✓	nt	nt	nt	nt	183
ChbG (<i>E. coli</i>)		✗	✓	✓	nt	nt	nt	165
VC1280 (<i>V. cholerae</i>)		✗	✓	✓	✓	✓	✓	174
Pa-COD (<i>V. parahemolyticus</i>)		✗	✓	✓	✗	✗	✗	176
COD (<i>Vibrio</i> SN184)		✗	✓	✓	✗	✗	✗	175
DA1 (<i>V. alginolyticus</i>)		✗	✓	✗	✗	✗	✗	173
DA2 (<i>V. alginolyticus</i>)		✗	✓	✗	✗	✗	✗	173

Tableau 12. Schéma de *N*-désacétylation et substrats de CDs. nt : non testé.

¹⁸² Tsigos, I., Zydowicz, N., Martinou, A., Domard, A. and Bouriotis, V., **1999**, *Eur. J. Biochem.*, 261, (3), 698-705.

¹⁸³ Mine, S., Niiyama, M., Hashimoto, W., Ikegami, T., Koma, D., Ohmoto, T., Fukuda, Y., Inoue, T., Abe, Y., Ueda, T., Morita, J., Uegaki, K. and Nakamura, T., **2014**, *FEBS J.*, 281, (11), 2584-2596.

La nature et l'activité de cette enzyme en font le candidat naturel pour notre application. De même la Tk-Dac (*T. kodakaraensis*) présente une activité sur l'extrémité non-réductrice jusqu'au CO-V, ainsi que sur le monomère GlcNAc, au contraire de NodB. Enfin, parmi les CDs de *Vibrio*, seule la CD VC1280 (*V. cholerae*) a été décrite possédant une activité allant du chitinbiose (CO-II) au chitinhexaose (CO-VI), avec une efficacité dépendante de la longueur du substrat.

I.2.2. Les cations métalliques

L'influence des cations métalliques, notamment Zn^{2+} , sur l'activité des CDs a été mise en évidence dans de nombreuses études. Cependant, il est possible que des dications métalliques puissent selon la CD étudiée inhiber l'activité.

Les chitine *N*-désacétylases de champignons sont décrites comme étant des métalloprotéines¹⁸⁴. Dès la toute première description de chitine *N*-désacétylase¹⁵⁹, les effets des cations ont été étudiés et il a été observé que l'utilisation d'éthylène diaminetétraacétique (EDTA) à 10 mM réduit l'activité relative de l'enzyme à 14%. Lors de la résolution de la structure tridimensionnelle de la CD de *C. lindemuthinaum*, un atome de zinc a été identifié dans le site actif¹⁶².

Chez les archées, la résolution de la structure tridimensionnelle de la CD Pf-Dac (*Pyrococcus furiosus*) et de la CD Ph-Dac (*Pyrococcus horikoshii*) a révélé la présence d'un atome de zinc au cœur du site actif¹⁸³. Pour cette dernière, ainsi que pour la TK-Dac (*T. kodakaraensis*), il n'est fait état d'aucun ajout de zinc dans le milieu réactionnel pour observer une activité¹⁸⁵. Cela laisse à penser que le cation métallique s'intègre à la structure de l'enzyme lors de sa production et ne peut être extrait par la suite. Ainsi, il n'est pas nécessaire de supplémenter le milieu réactionnel pour observer une activité.

Alors que trois CDs de *Vibrio* ont été clonées et produites par voie recombinante chez *E. coli*, aucune d'entre elles ne nécessite l'addition de cations pour son activité C'est avec la résolution de la structure tridimensionnelle de la CD VC1280 (*V. cholerae*) qu'un atome de zinc a été observé, enchâssé dans le site actif¹⁸⁶. Etrangement, la première caractérisation biochimique de la CD VC1280 ne mentionne aucune influence de l'EDTA sur l'activité de

¹⁸⁴ Ghormade, V., Kulkarni, S., Doiphode, N., Rajamohanan, P. R. and Deshpande, M. V., **2010**, *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, A. Méndez-Vilas, Ed. 1054-1066.

¹⁸⁵ Mine, S., Ikegami, T., Kawasaki, K., Nakamura, T. and Uegaki, K., **2012**, *Protein Expr. Purif.*, 84, (2), 265-269.

¹⁸⁶ Andres, E., Albesa-Jove, D., Biarnes, X., Moerschbacher, B. M., Guerin, M. E. and Planas, A., **2014**, *Angew. Chem. Int. Edit.*, 53, (27), 6882-6887.

l'enzyme, et une sensibilité marquée aux cations métalliques¹⁷⁴.

Enfin, concernant NodB (*S. meliloti*), l'unique étude *in vitro* de l'enzyme décrit une forte inhibition par les cations métalliques²⁷. En s'intéressant aux autres CDs décrites, mais également aux autres enzymes de la famille CE-4 dont plusieurs structures ont été résolues, de nombreux indices laissent à penser que cette enzyme possède une activité cation dépendante. Il est possible que le métal soit enchâssé dans la structure, et donc non-labile, comme pour la CD VC1280.

I.3. L'acylation des lipochitinoligosaccharides chez les rhizobiums

L'acylation est ubiquitaire chez les facteurs Nod et Myc, et les gènes identifiés responsables de cette réaction ne sont connus que chez les rhizobiums. Il existe relativement peu d'information sur la biochimie de ces enzymes. Une étude *in vitro* de l'activité de NodA a révélé qu'elle est incapable d'utiliser un acide gras libre comme substrat¹⁸⁷. En revanche, lorsque l'acide gras est activé par une protéine porteuse d'acyl (« *acyl carrier protein* » (ACP)), il peut être couplé aux COs (Figure 71). Les ACPs portent une modification post-traductionnelle par l'ajout d'un groupe prosthétique, la 4'-phosphopantéthéine. Il est lié de façon covalente à une sérine de l'ACP, et permet de former une liaison thioester, riche en énergie, avec l'acide gras¹⁸⁸. Ces protéines sont déterminantes dans la biosynthèse des acides gras. La protéine NodF est décrite pour être une ACP, et son action est couplée à celle de NodE, qui est une β -cétoacyl synthase. Ces enzymes sont impliquées dans la synthèse d'acides gras de longueur et d'insaturations variables, influençant la reconnaissance entre partenaires¹⁸⁹.

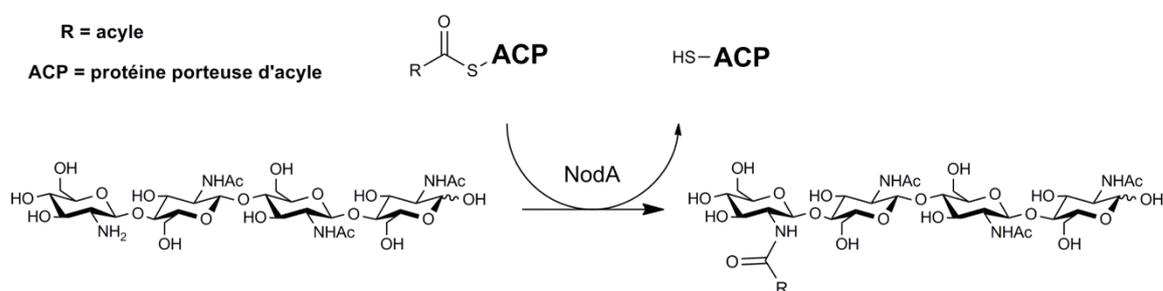


Figure 71. Acylation de COs par l'acyltransférase NodA.

¹⁸⁷ Ritsema, T., Lugtenberg, B. J. J. and Spaink, H. P., **1997**, *J. Bacteriol.*, 179, (12), 4053-4055.

¹⁸⁸ Lopez-Lara, I. M. and Geiger, O., **2000**, *Microbiology*, 146, 839-849.

¹⁸⁹ Demont, N., Debelle, F., Aurelle, H., Denarie, J. and Prome, J. C., **1993**, *J. Biol. Chem.*, 268, (27), 20134-20142.

Dans certaines souches de rhizobiums, NodA utilisera préférentiellement des acides gras synthétisés et activés par le tandem NodE / NodF, pour fournir des LCOs portant des chaînes grasses complexes et insaturées. Afin de comprendre l'acylation des LCOs par un certain type d'acyles selon les souches de rhizobiums, il est possible que NodA interagisse soit avec l'ACP, soit avec l'acide gras activé, présentant alors des affinités différentes selon les substrats à disposition. Dans le cas de la synthèse de chitinoligosaccharides (COs) par l'usine cellulaire, envisager une acylation *in vivo* peut présenter un risque de toxicité important pour la bactérie car les produits amphiphiles s'accumuleront dans le cytoplasme. L'ACP d'*E. coli* est un partenaire endogène pour NodA¹⁸⁷, mais dans le cas d'acylations de chaînes grasses complexes, il faudra également associer l'expression de NodE et de NodF, complexifiant d'autant l'approche.

Dans le cas de synthèses enzymatiques *in vitro*, il faudra donc également associer l'expression des protéines porteuses d'acyle à l'expression sous forme active et soluble de la protéine transmembranaire NodA. Enfin l'identification de conditions d'activité satisfaisantes pour la synthèse préparative de lipochitinoligosaccharides (LCOs) en font un véritable challenge.

I.4. Acylation par couplage chimique

L'acylation par couplage enzymatique, *in vivo* ou *in vitro*, nécessite donc d'associer l'action de plusieurs enzymes. La complexité du donneur ne rend pas cette approche attractive. En revanche, l'acylation par voie chimique offre une simplicité d'utilisation sans égale. Le coût, la flexibilité et la mise place de cette approche en font la voie de choix pour obtenir des LCOs.

L'acylation d'un chitinoligosaccharide est la formation d'une liaison amide (C-N) entre l'amine libre de l'oligomère de chitine et la fonction acide carboxylique de l'acide gras. Ces liaisons amides sont ubiquitaires au sein du vivant, de par leur présence au sein des protéines, et jouent donc un rôle central dans les processus biologiques. De ce fait, de très nombreuses approches chimiques ont été développées pour réaliser le plus efficacement possible le couplage d'un acide et d'une amine¹⁹⁰.

Il existe ainsi plusieurs approches pour l'acylation des oligomères de chitine afin de les transformer en LCOs. La première acylation par couplage chimique afin d'obtenir un facteur de nodulation a été décrite par Nicolaou *et al.*³⁴, à l'aide d'iodure de 2-chloro-1-méthylpyridinium lors de la première synthèse totale de LCOs décrites.

¹⁹⁰ Montalbetti, C. and Falque, V., **2005**, *Tetrahedron*, 61, (46), 10827-10852.

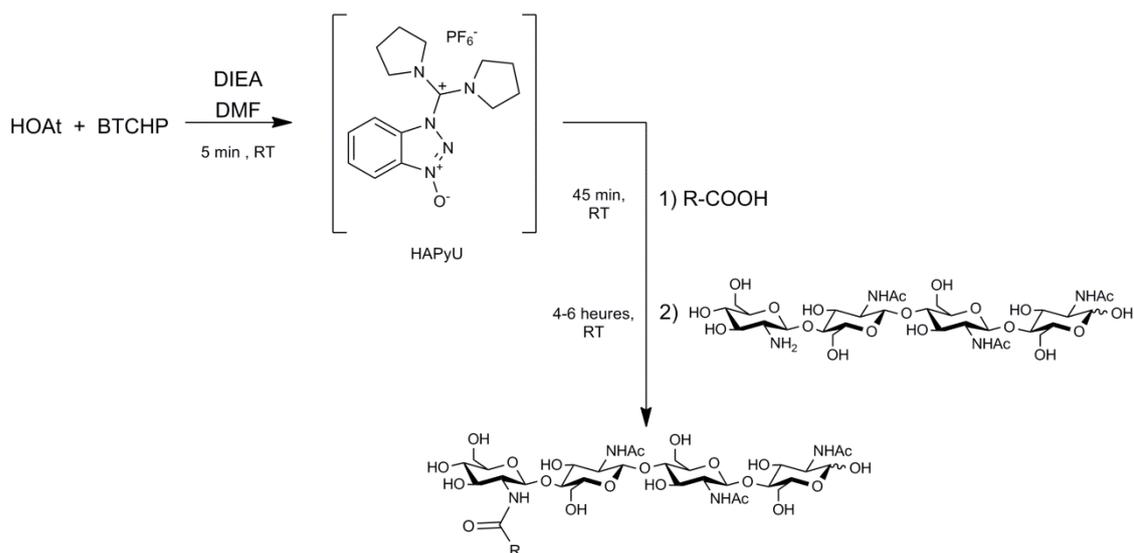


Figure 72. Acylation chimique des LCOs d'après Rasmussen *et al.*⁴⁴.

Lors de l'identification des fonctions des gènes responsables de la biosynthèse des facteurs Nod, le groupe qui a étudié l'activité de *N*-désacétylation par NodB a, par la suite, décrit la première acylation d'un chitintétraose *N*-désacétylé, à l'échelle du milligramme¹⁹¹. Associé à la synthèse *in vivo* de précurseurs de LCOs par le procédé de l'usine cellulaire⁴⁴, l'utilisation du réactif 1H-1,2,3-Triazolo[4,5-B]pyridine 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole (HAPyU) permet d'activer un acide gras puis de former une liaison amide sur un CO possédant une amine libre à son extrémité non-réductrice (Figure 72). Il s'agit de la méthode utilisée au laboratoire, les LCOs sont synthétisés avec des rendements allant de 32 à 51 %.

Nos collaborateurs de l'Université d'Orsay ont développé un protocole d'acylation nécessitant l'activation de l'acide gras en chlorure d'acyle, ensuite couplé à l'oligosaccharide en milieu basique avec des rendements allant de 33 à 48%⁴⁹.

Plus récemment, lors de la description de la première synthèse d'un facteur Myc, les mêmes conditions ont permis d'atteindre un rendement en produit isolé de 44 %³⁹.

¹⁹¹ Rohrig, H., Schmidt, J., Walden, R., Czaja, I., Miklasevics, E., Wieneke, U., Schell, J. and John, M., **1995**, *Science*, 269, (5225), 841-843.

II. Résultats

II.1. Stratégie

Afin d'obtenir des précurseurs de LCOs prêts à être acylés, deux voies sont envisagées dans cette étude, à l'aide de deux enzymes différentes qui *N*-désacétylent régiosélectivement un oligomère de chitine. Les CDs retenues, parmi celles décrites pour posséder une activité de mono *N*-désacétylation (Tableau 12) sont la CD NodB (*Sinorhizobium meliloti*) et la CD VC1280 (*Vibrio cholerae*).

La CD NodB *N*-désacétyle spécifiquement la position non-réductrice d'oligomères de chitine, ce qui en fait à ce titre, la voie la plus directe pour la synthèse des précurseurs de LCOs. Cette enzyme est responsable d'une étape essentielle de la biosynthèse des facteurs Nod (Chapitre I « Les facteurs de nodulation et de mycorhization »), et reste encore mal définie biochimiquement.

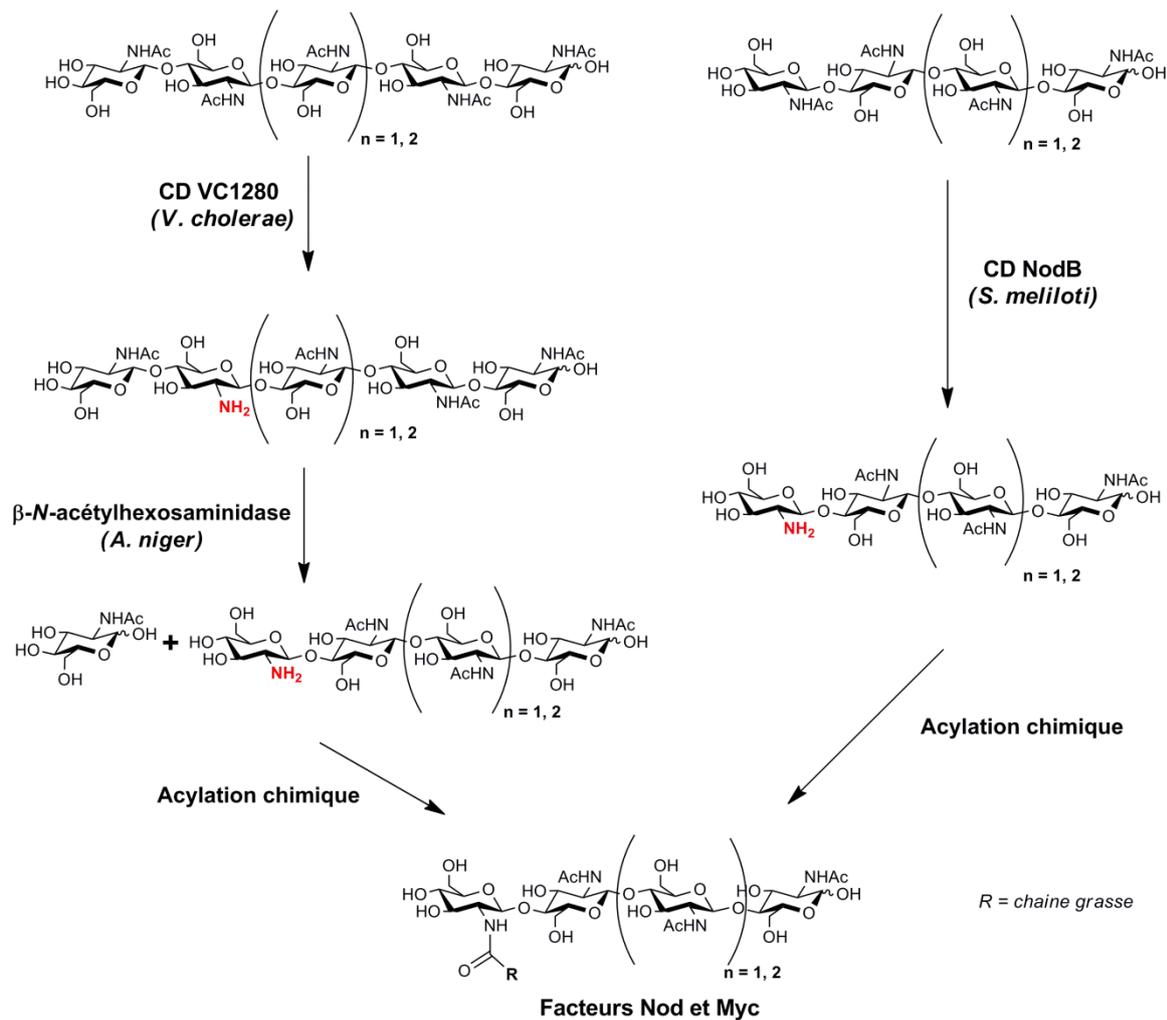


Figure 73. Stratégies d'accès aux LCOs par les CDs.

De ce fait, l'intérêt pour cette CD est multiple. Au-delà de son activité catalytique utilisée à des fins de synthèse, c'est également la compréhension de son mécanisme d'action, spécifique de l'extrémité non-réductrice des COs, qui est en jeu.

Les schémas biosynthétiques des LCOs sont mal connus à ce jour. L'étude de la CD NodB pourrait alors fournir de précieux indices à ce sujet. Ensuite, dans un domaine plus large, la CD NodB pourrait s'inscrire dans la compréhension du remodelage des COs par les CDs, très différent selon les enzymes considérées. Cela s'illustre par le travail récent de la résolution de la structure tridimensionnelle de la CD VC1280, résolvant le mécanisme réactionnel de *N*-désacétylation en pénultième position de l'extrémité non-réductrice d'oligomères de chitine. Au début de ce travail, le seul exemple d'expression hétérologue de NodB (*S. meliloti*) dans la littérature décrit la formation de corps d'inclusions chez *E. coli*²⁷. L'obtention de cette enzyme sous forme soluble et active est un critère important dans ce projet. En effet, la production sous forme de corps d'inclusion nécessite des étapes supplémentaires pour dénaturer puis replier correctement la protéine, afin d'observer l'activité. L'efficacité de ces étapes peut être aléatoire et les rendements de production sont négativement influencés par la multiplication de ces manipulations. Au-delà de l'observation d'une activité de *N*-désacétylation, il est important d'y accéder le plus facilement possible, afin de pouvoir envisager de modifier les COs à grande échelle. L'expression sous forme soluble des CDs est donc un critère important.

A ce titre, la CD VC1280 (*V. cholerae*) est une excellente candidate. L'expression hétérologue de cette enzyme, directement sous forme soluble et active chez *E. coli* a été décrite¹⁷⁴. Son activité est différente de celle de la CD NodB. Elle *N*-désacétyle un oligomère de chitine en pénultième position, à partir de l'extrémité non-réductrice. Il faut donc utiliser un substrat dont le degré de polymérisation (DP) est égal à six ou cinq pour obtenir respectivement un produit de DP5 ou 4. Un des nombreux leviers à la synthèse de facteurs Nod est l'accessibilité, à partir de la biomasse, aux oligomères de chitine. Plus le DP est élevé, moins le rendement de purification sera intéressant. Cette voie d'obtention de précurseurs de LCOs implique également une seconde enzyme, commerciale, la β -*N*-acétylhexosaminidase capable, à partir du côté non réducteur, d'hydrolyser uniquement les unités *N*-acétyl-D-glucosaminyles.

Malgré l'étape supplémentaire d'hydrolyse par la β -*N*-acétylhexosaminidase nécessaire pour obtenir un précurseur naturel de LCO, et le besoin d'accéder à des COs aux DP supérieurs, cette voie d'accès paraît la plus accessible, et donc a été la première à être explorée.

II.2. La chitine *N*-désacétylase VC1280 (*Vibrio cholerae*)

En plus d'un accès aux précurseurs naturels des LCOs, l'utilisation de l'activité de la CD VC1280 (*V. cholerae*) permettrait d'obtenir également des analogues de précurseurs de LCOs. Ces derniers posséderaient en effet une amine libre en pénultième position à partir de l'extrémité non-réductrice, permettant d'y fixer une chaîne grasse (Figure 74). Cela pourrait fournir des indications sur l'importance de la position de la chaîne grasse sur le squelette chitinosaccharidique, quant à l'activité biologique de ces analogues non-naturels.

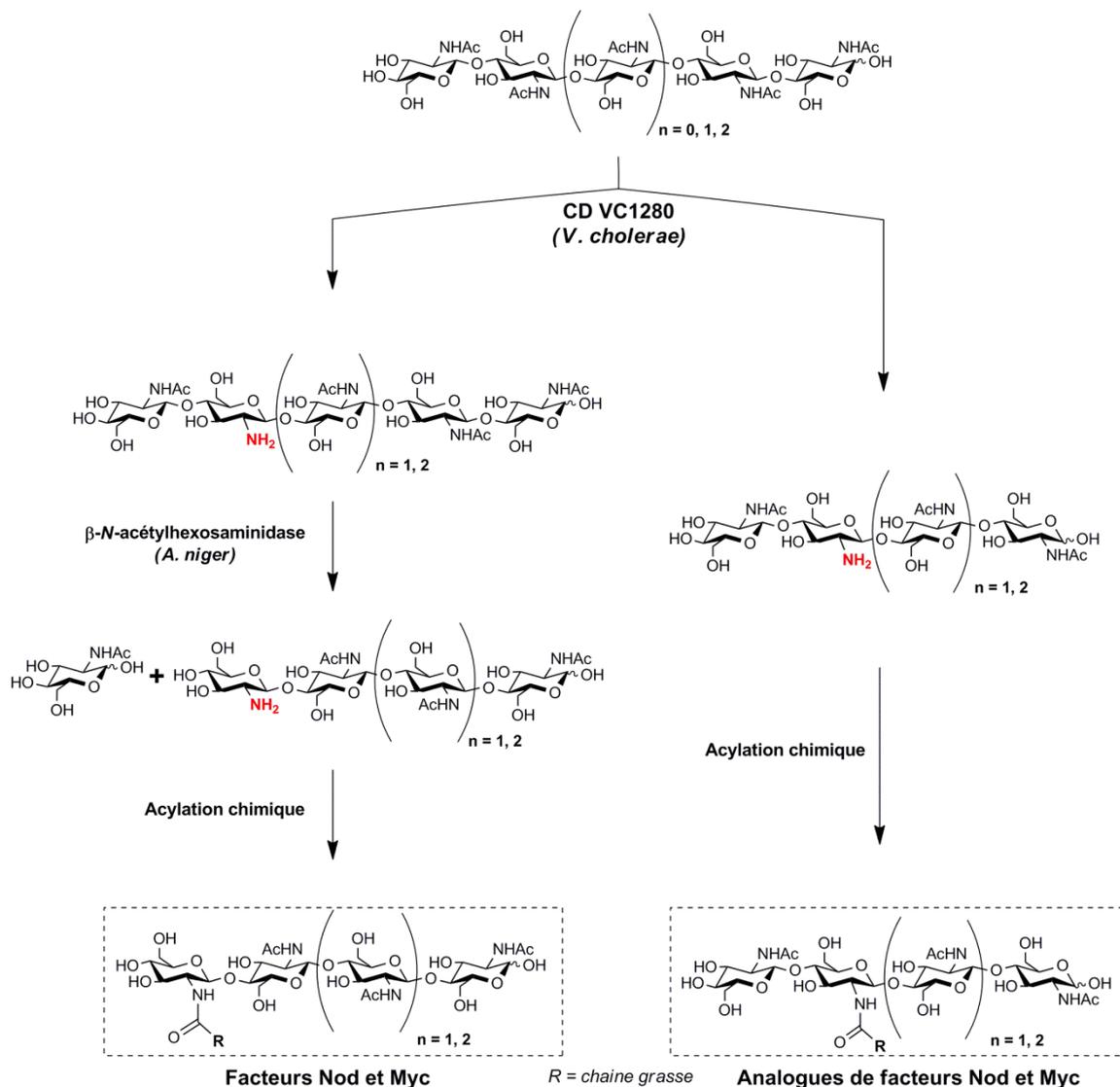


Figure 74. Stratégie de voies d'accès aux LCOs et analogues de LCOs par la CD VC1280 (*V. cholerae*).

II.2.1. Expression et purification de VC1280

L'expression de la CD VC1280 chez *E. coli* BL21 a été décrite¹⁷⁴, et l'enzyme recombinante possède une étiquette poly-histidine à son extrémité C-terminale, qui a permis sa purification sur résine de nickel. Ce travail sert de base pour l'étude. Différentes conditions d'expression chez la bactérie *E. coli* BL21 ont donc été testées (Tableau 13), et la qualité de la surexpression est évaluée par analyse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes. La présence de la protéine d'intérêt est estimée avant et au cours de l'induction, sous sa forme soluble.

La souche *E. coli* BL21 est transformée par le plasmide pET26b_VC1280, contenant le gène *vc1280* fusionné au peptide signal *pelB* qui permet d'exporter la protéine au sein du périplasme de la bactérie lors de sa production. Avec cette construction, la CD VC1280 (*V. cholerae*) possède également une séquence poly-histidine à son extrémité C-terminale afin de la purifier par chromatographie IMAC sur résine de nickel.

L'analyse des extraits cytoplasmiques sur SDS-PAGE révèle la surexpression d'une protéine à une taille observée (46,1 kDa) en accord avec la taille attendue de la CD VC1280 (48 kDa) (Figure 75, pistes 5 à 8). La meilleure condition d'expression à 20°C nécessite 22 heures d'induction, et 0,05 mM d'IPTG (Figure 75, piste 8). Une culture de bactérie *E. coli* BL21, transformée par le pET26b(+) est réalisée, et aucune protéine surexprimée dans les mêmes conditions n'est observée (Figure 75, pistes 1 à 4).

Malgré son expression périplasmique, la purification de la CD VC1280 (*V. cholerae*) n'utilise pas un protocole pour extraire uniquement les protéines de ce compartiment cellulaire. En effet, au cours de la préparation de ces fractions, une perte significative de CD a été observée. Ainsi, il nous est paru préférable de casser les bactéries à l'aide d'un disrupteur de cellules pour extraire la CD en une seule étape, afin d'augmenter le rendement de production.

Souche	Plasmide d'expression	Température	Inducteur (IPTG)	Temps d'induction
BL21 (DE3)	pET26b(+)	30 °C	0,5 mM	2, 5 et 22 heures
			0,5 mM	
		20°C	0,1 mM	2, 4 et 22 heures
			0,05 mM	

Tableau 13. Conditions d'expression de VC1280 (*V. cholerae*) testées chez *E. coli* BL21.

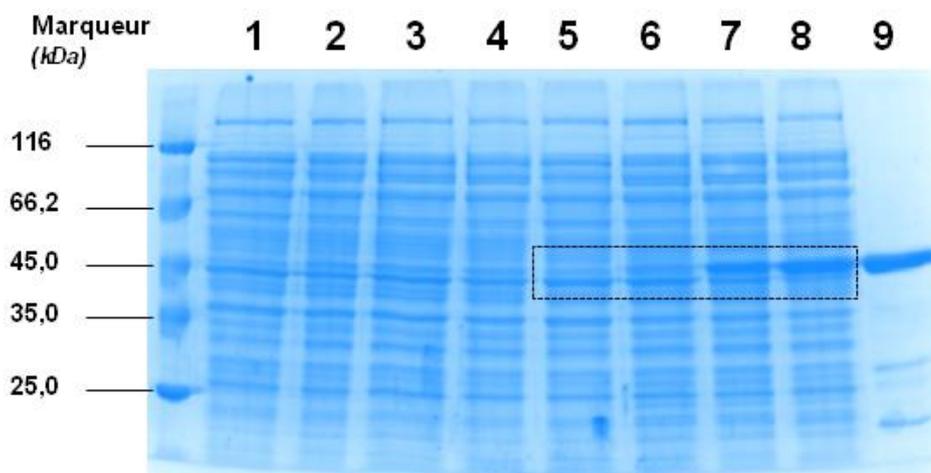


Figure 75. Analyse par SDS-PAGE 10% de l'expression de la CD VC1280 (*V. cholerae*) chez *E. coli* BL21. (1-4) Protéines cytoplasmiques d'*E. coli* BL21 transformées par le pET26b(+) après 0, 2, 4 et 22 heures de croissance à 20°C, avec 0,05 mM d'IPTG. (5-8) Protéines cytoplasmiques d'*E. coli* BL21 transformées par le pET26b_VC1280 après 0, 2, 4 et 22 heures de croissance à 20°C, avec 0,05 mM d'IPTG. (9) CD VC1280 purifiée sur résine de nickel. (environ 20 µg de protéines déposés par piste).

La protéine surexprimée est fixée sur résine de nickel, puis éluée avec des solutions concentrées en imidazole (50 à 150 mM). La protéine purifiée présente quelques contaminants de masses moléculaires inférieures à celle-ci, mais elle reste majoritaire à 77% (Figure 75, piste 9).

Le rendement moyen de purification est de 120 mg de CD VC1280 par litre de culture d'*E. coli* transformée par le pET26b_VC1280. La protéine purifiée est dialysée contre du tampon phosphate de potassium 20 mM pH 8 et stockée à -80°C sans ajout de glycérol ou de sels. Dans ces conditions, l'enzyme est stable plusieurs mois.

II.2.2. Caractérisation biochimique

Avant d'envisager des études de synthèse de précurseurs de LCOs, une caractérisation biochimique de la CD VC1280 (*V. cholerae*) est menée. Cette étude est réalisée à travers un test de dosage des amines libres au 3-méthyl-2-benzothiazolinone hydrazone (MBTH)⁶¹. Ce dosage en point final fait intervenir au total cinq réactifs afin de former un complexe avec une glucosamine possédant un maximum d'absorbance à 655 nm. Le mécanisme probable de cette réaction de coloration a été proposé¹⁹².

Lors de chaque mesure d'activité, une gamme étalon est réalisée. Pour des raisons d'accessibilité des substrats, l'action de la CD VC1280 (*V. cholerae*) sur un oligomère de chitine sera dosée avec de la β-N-acétyl-D-glucosamine (GlcN) comme référence pour la gamme étalon.

¹⁹² Tsuji, A., Kinoshita, T. and Hoshino, M., 1969, *Chem. Pharm. Bull.*, 17, (1), 217-8.

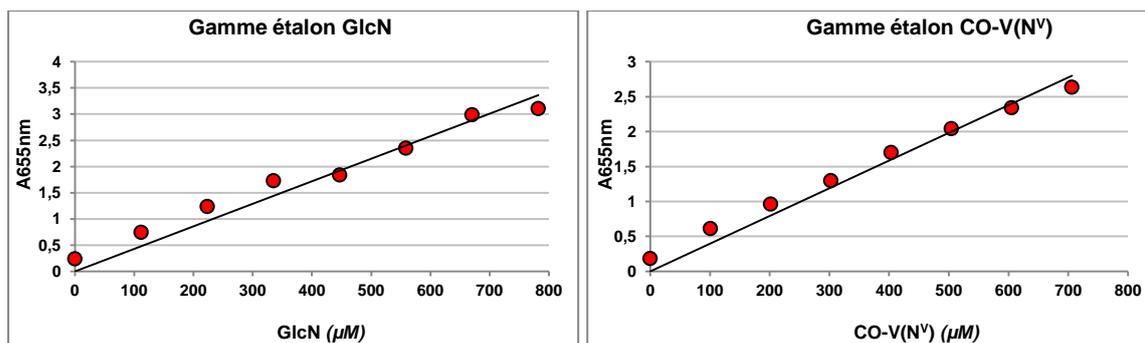
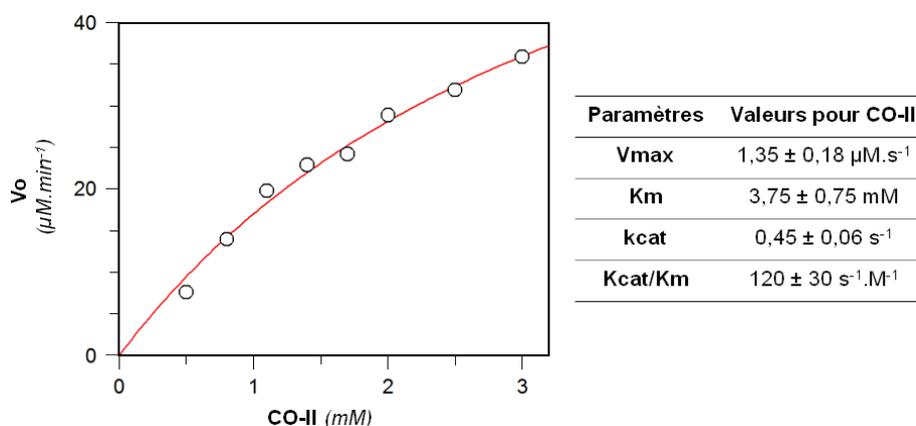


Figure 76. Gammes étalon du dosage de la GlcN et du CO-V(N) par le MBTH.

Il peut exister un biais lors du dosage d'une activité de *N*-désacétylation d'oligomères de chitine si la gamme étalon est faite avec le monomère GlcN. Il est donc nécessaire de s'assurer d'avoir une réponse identique du dosage lorsqu'on utilise un monomère ou un oligomère.

Deux gammes étalons sont ainsi réalisées en parallèle, l'une avec de la GlcN et l'autre avec du CO-V(N^v) (Figure 76). Respectivement, les valeurs de pente calculées sont $0,00412 \mu\text{M}^{-1}$ et $0,00396 \mu\text{M}^{-1}$, traduisant un écart de seulement 4 % entre le monomère et le pentamère. Les réponses au dosage sont donc équivalentes, et l'utilisation de la glucosamine pour doser l'activité de la CD sur un oligomère ne présente pas de biais, au moins jusqu'au substrat chitinpentaose.

La caractérisation biochimique de l'enzyme a été réalisée sur du chitinbiose et les valeurs retenues ont été mesurée au moins trois fois (Figure 77). La CD VC1280 (*V. cholerae*) présente un K_m de l'ordre du mM, ce qui traduit une affinité assez moyenne pour le chitinbiose qui est son meilleur substrat. L'erreur standard concernant la détermination du K_m n'est pas négligeable (20%).


 Figure 77. Représentation de Michaelis-Menten et paramètres biochimiques de la CD VC1280 (*V. cholerae*) sur le CO-II, déterminés par le dosage des amines libres au MBTH. (Concentration en enzyme = 0,39 nM)

Le substrat utilisé, probablement contaminé par des espèces contenant déjà des amines libres, provoque un bruit de fond conséquent. Les limites de sensibilité du test ont été atteintes et de ce fait, il n'a pas été possible d'augmenter la concentration en substrat initial au-delà de 3 mM. Cela aurait permis de réduire l'erreur standard sur la valeur du Km.

L'efficacité catalytique (kcat/Km) de la CD VC1280 (*V. cholerae*) sur le CO-II est relativement faible et il faudra probablement utiliser une grande quantité d'enzyme afin d'obtenir des conditions de synthèse satisfaisantes. Cependant, au regard de la grande quantité d'enzyme disponible lors de son expression recombinante chez *E. coli*, son utilisation reste néanmoins prometteuse.

Les constantes catalytiques calculées ici par le dosage des amines libres diffèrent de celles déjà décrites. Lors de la première caractérisation biochimique de la CD VC1280¹⁷⁴, l'affinité présentée pour le CO-II est de l'ordre du μM , et le kcat atteint presque une valeur de 30 s^{-1} . Au final, l'efficacité catalytique est 10000 fois plus importante que la nôtre. Lors de la résolution de la structure tridimensionnelle de VC1280¹⁸⁶, un troisième jeu de données indique une affinité pour le chitinbiose plutôt de l'ordre du mM (0,69 mM), et une constante catalytique autour de 4 s^{-1} . Ainsi, l'efficacité catalytique est 50 fois supérieure à la valeur de l'étude.

Pour chaque cas, la méthode choisie pour détecter l'activité de *N*-désacétylation diffère. La première caractérisation¹⁷⁴ dose l'activité par radioactivité à l'aide de CO-II comportant du tritium. Dans le travail décrivant l'étude cristallographique¹⁸⁶, la formation de CO-II(N¹) est quantifiée par HPLC-MS. Enfin, notre étude quantifie la formation des amines libres, par dosage colorimétrique. Ces techniques de détection d'activité peuvent expliquer les différences observées entre les constantes catalytiques décrites. Nos valeurs obtenues par dosage colorimétrique se rapprochent cependant des valeurs de l'étude cristallographique. Enfin, il est à noter que les deux autres études confirment une diminution de l'efficacité catalytique lorsque le DP du substrat augmente, jusqu'au CO-VI pour Li *et al*¹⁷⁴ et jusqu'au CO-IV pour Martinez *et al*¹⁸⁶.

II.3. Synthèses préparatives de COs-(N) par le procédé VC1280

Les oligomères CO-IV, CO-V et CO-VI obtenus à partir du mélange commercial de chitosane (Chapitre III « Accès aux chitinoligosaccharides »), sont traités par la CD VC1280 pour obtenir des précurseurs d'analogues de LCOs puis par une β -*N*-acétylhexosaminidase (*Aspergillus oryzae*) afin de fournir les précurseurs naturels de LCOs. Au total, quatre oligomères sont ciblés au cours de cette synthèse par le « procédé VC1280 » (Figure 78).

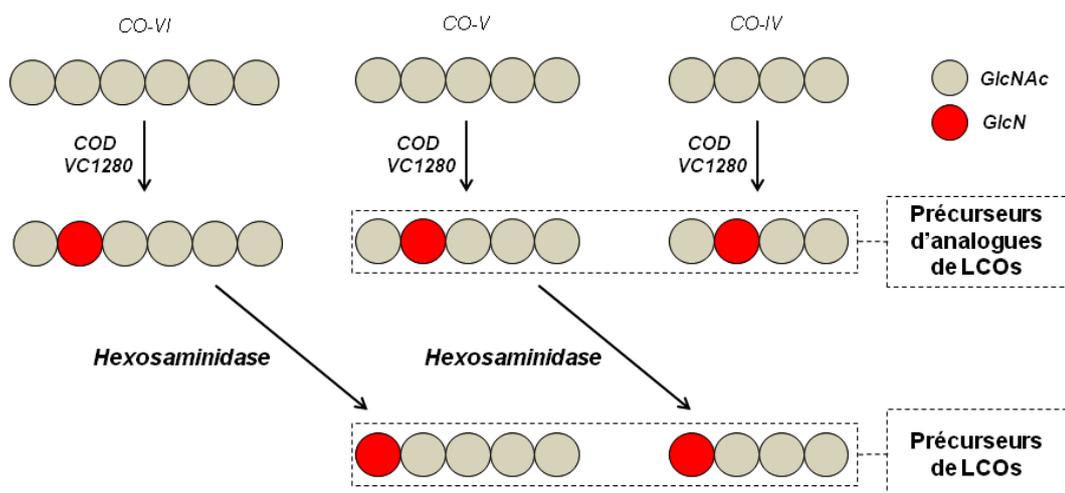


Figure 78. Obtention des précurseurs de LCOs et de leurs analogues par le procédé VC1280.

Les chitinpentaose et chitintétraose *N*-désacétylés en position non-réductrice sont deux molécules correspondant aux squelettes saccharidiques de l'immense majorité des facteurs Myc et des facteurs Nod. Leur synthèse est réalisée en deux étapes, par l'action séquentielle de la CD et de l'hexosaminidase. Enfin, leurs équivalents *N*-désacétylés en pénultième position à partir de l'extrémité non-réductrice seront des précurseurs d'analogues de LCOs, et leur synthèse fait intervenir uniquement la CD VC1280.

II.3.1. Précurseur d'analogues de LCOs

Les oligomères sont mis en solution dans du carbonate d'ammonium 10 mM pH 7,9, en présence de VC1280 (*V. cholerae*). L'enzyme, stockée dans du tampon phosphate de potassium 20 mM pH 8, est préalablement dialysée contre ce même carbonate d'ammonium 10 mM pH 7,9. Ce sel est volatil, au contraire du tampon utilisé pour son stockage, et cela va faciliter les étapes de purification des oligosaccharides.

Le milieu réactionnel est placé à 37°C pendant 20 heures, sans agitation. En utilisant un ratio enzyme / substrat égal à 0,2 % (mol/mol), on obtient des réactions totales comme l'indique l'analyse par CCM en fin de réaction (Figure 79), et cela sans problème de dénaturation ou d'inhibition de l'enzyme par l'acide acétique co-produit de la réaction. Une inhibition compétitive par ce produit a déjà été observée chez une CD de champignon ($K_i = 0,3 \text{ mM}$)¹⁹³. Une autre étude a même montré qu'en présence d'une très forte concentration en acétate de sodium (3 M), une réaction inverse peut se réaliser grâce à la CD *C. lindemuthianum*, et un oligomère de chitosane peut être partiellement *N*-acétylé¹⁹⁴.

¹⁹³ Jaworska, M. M., 2011, *Biotechnol. J.*, 6, (2), 244-247.

¹⁹⁴ Tokuyasu, K., Ono, H., Mitsutomi, M., Hayashi, K. and Mori, Y., 2000, *Carbohydr. Res.*, 325, (3), 211-215.

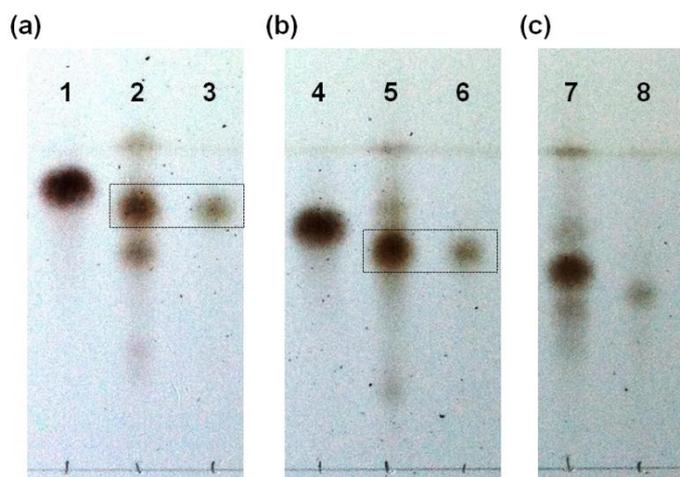


Figure 79. Analyse par CCM de la *N*-désacétylation des COs par la CD VC1280.

(a) Chitintétraose (1) Standard CO-IV (2) Standard CO-IV(N^{IV}) (3) Produit de l'action de VC1280 sur CO-IV (brut réactionnel) (b) Chitinpentaose (4) Standard CO-V (5) Standard CO-V(N^V) (6) Produit de l'action de VC1280 sur CO-V (brut réactionnel) (c) Chitinhexaose (7) Standard CO-VI (8) Produit de l'action de VC1280 sur CO-VI (brut réactionnel). *Eluant* : butanol / éthanol / eau (4/3/3).

Ces études pouvaient laisser penser que des conditions de synthèses quantitatives ne soient pas forcément accessibles. Il semble au contraire que la CD VC1280 ne soit pas gênée ici par les 2 mM d'acide acétique, présents au maximum en fin de réaction.

Les standards utilisés pour suivre les réactions ne sont pas *N*-désacétylés sur la même position que les produits de la CD VC1280. Cela n'influence par la mobilité des COs-(N) dans les systèmes d'éluants décrits ici.

Le standard CO-VI(N^V) n'est pas disponible au laboratoire, mais néanmoins, on observe une différence de migration entre le produit de la réaction et le standard CO-VI (Figure 79c) équivalente aux différences de migration observées sur le chitintétraose et le chitinpentaose (Figure 79a et Figure 79b), laissant supposer que la réaction de *N*-désacétylation a bien eu lieu. Le milieu réactionnel est ensuite placé à 100°C pendant 10 min afin de dénaturer l'enzyme qui est ensuite éliminée par centrifugation.

Substrat	Quantité (mg)	Produit	Quantité (mg)	Rendement (%)
CO-VI	5,1	CO-VI(N ^V)	3,9	79
CO-V	19,1	CO-V(N ^{IV})	16,6	91
CO-IV	18,7	CO-IV(N ^{III})	17,3	97

Tableau 14. Bilan de synthèse des précurseurs d'analogues de LCOs obtenus par le « procédé VC1280 ».

L'oligomère *N*-désacétylé est alors en solution dans du carbonate d'ammonium, et par lyophilisation, le sel s'évapore, laissant un produit purifié. Ce protocole limite au maximum les manipulations, ce qui permet d'obtenir de très bons rendements en produits isolés (Tableau 14). Le produit purifié est alors caractérisé par spectrométrie de masse haute résolution, ainsi que par HPLC, afin de s'assurer de sa pureté et de l'absence de sels. Ces précurseurs d'analogues de LCOs sont obtenus en une seule étape.

II.3.2. Précurseurs de LCOs

Après action de la CD VC1280 (*V. cholerae*), celle de la β -*N*-acétylhexosaminidase (*A. oryzae*) va permettre d'accéder aux précurseurs naturels de LCOs (Figure 78). Cette enzyme est un contaminant mineur de la β -galactosidase (*A. oryzae*) commerciale¹⁹⁵.

Une solution enzymatique commerciale est préparée puis dialysée à travers une membrane de 10 kDa. La taille de la β -*N*-acétylhexosaminidase étant de 67,5 kDa, cela doit permettre d'éliminer des sels et autres petits contaminants présents dans le mélange commercial, et donc de faciliter la purification du produit final. L'oligomère *N*-désacétylé en pénultième position est alors placé en réaction. Par une analyse CCM, le suivi de la réaction semble indiquer une conversion quantitative (Figure 80). L'unité GlcNAc libérée n'est pas identifiable sur la CCM, mais la réaction s'observe facilement par la différence de migration entre substrats et produits. Le CO-IV(N^{IV}) généré (Figure 80, piste 4) possède bien le même facteur de rétention (RF) que le standard CO-IV(N^{IV}) (Figure 80, piste 2, flèche noire).

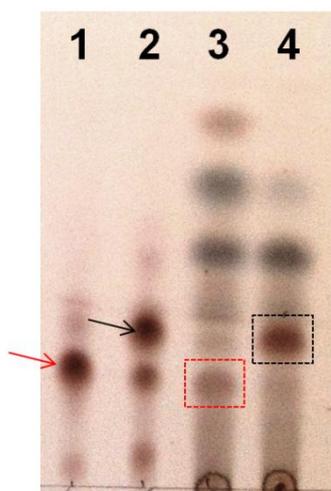


Figure 80. Analyse par CCM de l'action de la β -*N*-acétylhexosaminidase (*A. oryzae*) sur des COs-(N). (1) Standard CO-V(N^V). (2) Standard CO-IV(N^{IV}). (3) Produit de l'hexosaminidase sur CO-VI(N^V) (brut réactionnel). (4) Produit de l'hexosaminidase sur CO-V(N^V) (brut réactionnel). Eluant : *propanol / eau / ammoniacque 27% (70/30/1)*.

¹⁹⁵ Singh, S., Scigelova, M., Critchley, P. and Crout, D. H. G., 1997, *Carbohydr. Res.*, 305, (3-4), 363-370.

Substrat	Quantité (mg)	Produit	Quantité (mg)	Rendement (%)
CO-VI(N ^V)	4	CO-V(N ^V)	2,1	66
CO-V(N ^{IV})	3,9	CO-IV(N ^{IV})	1,4	43

Tableau 15. Bilan de synthèse des précurseurs de LCOs obtenus par le « procédé VC1280 ».

Le même raisonnement s'applique pour le CO-V(N^V) (Figure 80, piste 3), qui présente le même RF que le standard CO-V(N^V) (Figure 80, piste 1, flèche rouge). Les bruts réactionnels révèlent de nombreux contaminants, malgré la dialyse de l'extrait protéique. L'efficacité de cette dernière paraît donc limitée, perturbant l'analyse par CCM. La conversion des substrats en produits semble totale, mais des traces de substrat de départ ne permettent pas de l'affirmer totalement.

La purification du précurseur de LCO s'effectue en deux étapes. Premièrement, le milieu réactionnel est de nouveau dialysé contre une membrane de 10 kDa afin d'isoler le CO(N) des protéines. Ensuite, afin de séparer le précurseur de LCOs du GlcNAc libéré, le CO(N) est précipité dans l'acétone, puis resuspendu dans de l'eau et lyophilisé. Le produit purifié est alors caractérisé par spectrométrie de masse haute résolution, ainsi que par HPLC, afin de s'assurer de sa pureté et de l'absence de sels. Les différentes analyses confirment la réaction de l'hexosaminidase et la formation de précurseurs de LCOs. Les COs-(N) sont purs à homogénéité. Ces derniers sont obtenus avec de bons rendements en produits isolés (Tableau 15).

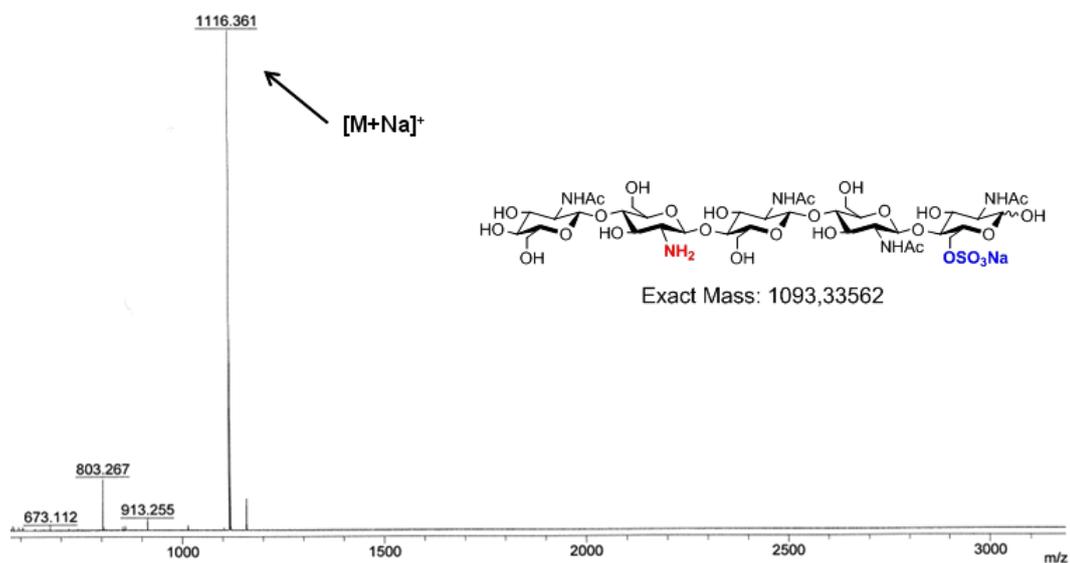
II.3.3. Précurseur de LCO sulfaté

La CD VC1280 n'est pas décrite pour être active sur des COs fonctionnalisés à l'extrémité réductrice. Ayant à disposition des COs sulfatés sur le sucre réducteur par l'action couplée des sulfotransférases NodH (*S. meliloti*) et AST-IV (*R. norvegicus*) (Chapitre IV « Décoration des chitinoligosaccharides »), des tests d'activité à échelle analytique ont été réalisés. En suivant le protocole défini pour les oligomères non fonctionnalisés, la CD VC1280 présente une activité similaire sur un CO-V(S). L'analyse par spectrométrie de masse (Figure 81a) confirme la formation d'un précurseur d'analogue de LCO sulfaté.

Ce précurseur analogue est ensuite placée en réaction avec la β -N-acétylhexosaminidase (*A. oryzae*) afin d'accéder à un précurseur naturel de LCOs. L'hydrolyse du résidu non-réducteur est réalisée dans les mêmes conditions que pour les oligomères non fonctionnalisés. L'analyse par spectrométrie de masse confirme la formation du CO-IV(N^{IV},

S) (Figure 81b). Le procédé VC1280 est donc également opérationnel sur des précurseurs fonctionnalisés par un groupement sulfate sur le sucre réducteur.

(a)



(b)

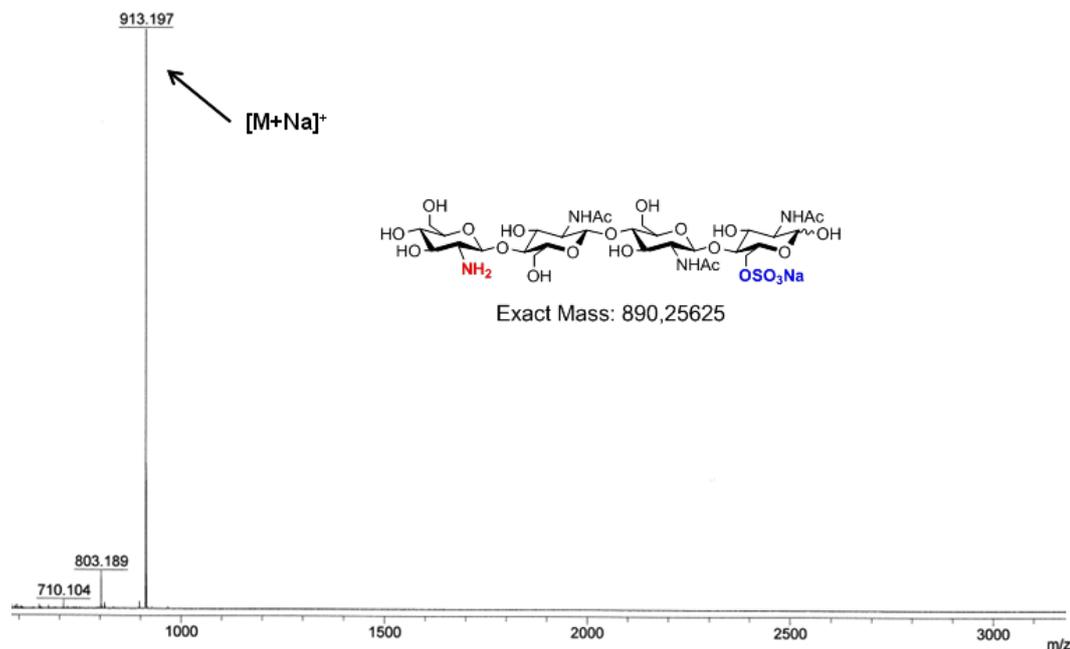


Figure 81. (a) Spectre de masse MALDI-ToF (mode positif) de N -désacétylation du CO-V(S) par la CD VC1280. (b) Spectre de masse MALDI-ToF (mode positif) de l'action de la β - N -acétylhexosaminidase (*A. oryzae*) sur le CO-V(N^IV , S).

II.4. La chitine *N*-désacétylase NodB (*Sinorhizobium meliloti*)

II.4.1. Expression et purification de NodB

La seule étude concernant l'expression de NodB (*S. meliloti*) indique la formation de corps d'inclusion chez *E. coli*. Aussi, les études d'expression ont été menées chez différents organismes, afin d'éviter cette forme de production. Les levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Pichia pastoris*, puis la bactérie *E. coli* ont été testées. L'ensemble des conditions évaluées pour l'expression de NodB (*S. meliloti*) est regroupé dans le Tableau 16.

Comme pour la CD VC1280, le niveau de surexpression est évalué par analyse sur SDS-PAGE. La présence de la CD NodB sous sa forme soluble est estimée avant et au cours de l'induction.

Souche	Plasmide d'expression	Température	Inducteur	Temps d'induction
<i>S. cerevisiae</i> EBY100	pESC-Leu	25°C	0,5 %, 1% et 2% Gal	6, 24, 30 et 48 heures
<i>P. pastoris</i> GS115	pPICZαA	28°C	0,5% méthanol	6, 24 et 45 heures
			1,0 mM [IPTG]	
	pET26b(+)	20°C et 24°C	0,5 mM [IPTG] 0,1 mM [IPTG]	2, 5, 22 et 46 heures
			0,5 mM [IPTG]	
<i>E. coli</i> BL21	pET21d(+)	16°C	0,1 mM [IPTG] 0,05 mM [IPTG]	2, 6 et 22 heures
			0,5 mM [IPTG]	
	pET32a(+)	16°C	0,1 mM [IPTG] 0,05 mM [IPTG]	2, 6 et 22 heures

Tableau 16. Conditions d'expression de la CD NodB (*S. meliloti*) testées.

II.4.1.1. Tests d'expression chez la levure

II.4.1.1.a. *Saccharomyces cerevisiae*

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est un organisme eucaryote, capable de produire des protéines recombinantes et d'introduire des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation, la *N* et *O*-glycosylation ou bien de former des ponts disulfures.

Ces éléments peuvent aider au repliement et à la stabilité des protéines qui ne sont pas correctement surexprimées chez *E. coli*¹⁹⁶. Des souches et des séries de plasmides d'expression commerciaux sont disponibles pour cela. La CD NodB est une enzyme bactérienne, ne nécessitant pas à priori de modifications post-traductionnelles. De même, elle n'est pas décrite pour posséder des ponts disulfures. Cependant, *S. cerevisiae* offre un environnement de production différent de celui d'*E. coli*, et à ce titre, il mérite d'être évalué.

Dans la souche *S. cerevisiae* EBY100 transformée par le plasmide pESC-Leu-nodB, l'expression du gène est sous le contrôle d'un promoteur inductible au galactose (Gal). Avec cette construction, la CD NodB (*S. meliloti*) ne possède aucune étiquette, et le compartiment cellulaire d'expression sera le cytoplasme.

Le premier objectif de cette étude est d'identifier des conditions d'expression de la CD NodB sous sa forme soluble. L'induction a lieu à 25°C (30°C étant la température optimale de croissance pour la levure *S. cerevisiae*), et ceci afin d'éviter l'éventuelle apparition de corps d'inclusion. Différentes concentrations en galactose (Gal) sont testées (Tableau 16). L'analyse des extraits cytoplasmiques par SDS-PAGE de la levure transformée à différents temps d'induction n'a pas révélé de surexpression de protéines.

Même si la surexpression n'est pas visible, cela n'indique pas forcément que l'enzyme n'est pas produite ; il est possible que la CD NodB soit faiblement présente dans les extraits cytoplasmiques. Ainsi, des tests d'activité ont été réalisés sur ces extraits bruts cytoplasmiques, en présence de CO-V, substrat de la CD NodB. L'analyse par CCM n'a pas révélé d'activité de *N*-désacétylation. Devant ces résultats, les essais d'expression hétérologue chez cette levure ont été arrêtés, au profit d'essais chez une autre levure, *Pichia pastoris*.

II.4.1.1.b. *Pichia pastoris*

La bactérie méthylotrophique *Pichia pastoris* est un puissant outil pour l'expression hétérologue de protéines recombinantes. C'est une alternative aux hôtes *E. coli* et *S. cerevisiae* lorsque l'expression n'est pas ou peu satisfaisante, et de hauts niveaux

¹⁹⁶ Holz, C., Hesse, O., Bolotina, N., Stahl, U. and Lang, C., **2002**, *Protein Express. Purif.*, 25, (3), 372-378.

d'expression sont décrits dans cet hôte¹⁹⁷. La biologie moléculaire est simple et s'appuie sur celle bien établie de *S. cerevisiae*, avec des modifications post-traductionnelles similaires notamment la glycosylation et la formation de ponts disulfures. Des kits commerciaux complets sont également disponibles. Tout comme *S. cerevisiae*, cette levure offre un environnement de production différent qui mérite lui aussi d'être évalué.

La souche *P. pastoris* GS115 est transformée par le plasmide pPICZ α A-nodB. La CD NodB sera sécrétée au sein du milieu de culture, grâce à la fusion du gène au facteur α . Avec cette construction, la CD NodB est aussi fusionnée à l'épitope *c-myc* et à une séquence poly-histidine à son extrémité C-terminale. L'étude d'induction a été menée à la température optimale de croissance de la levure (30°C) pendant 48 heures. *Pichia pastoris* est une levure méthylotrophique, c'est-à-dire capable d'utiliser le méthanol comme source de carbone. pPICZ α A-nodB possédant également un promoteur inductible au méthanol (AOX1), la culture a donc été induite à 0,5% de méthanol (v/v).

Comme pour *S. cerevisiae*, l'analyse sur SDS-PAGE des milieux de culture aux différents temps d'induction ne révèle pas de surexpression de la CD NodB. Il n'y a aucune trace de cette dernière dans les débris cellulaires, ce qui aurait traduit une production sous forme de corps d'inclusion. Les milieux de culture ont été purifiés sur résine de nickel, afin de concentrer la CD NodB, mais là encore, aucune protéine n'a été observée par analyse sur SDS-PAGE. Ce système d'expression a été mis de côté, au profit de nouveaux tests d'expression chez la bactérie *E. coli*.

II.4.1.2. Tests d'expression chez *E. coli* BL21

II.4.1.2.a. Dans le périplasme

L'expression en corps d'inclusion de la CD NodB est décrite au niveau du cytoplasme de la bactérie. Il paraît alors intéressant d'essayer l'expression recombinante de la CD NodB (*S. meliloti*) au sein du périplasme. L'exportation de la protéine recombinante au sein de cet environnement différent pourrait permettre une expression sous forme soluble.

La souche *E. coli* BL21(DE3) est transformée avec le plasmide d'expression pET26b_nodB contenant le gène *nodB* en fusion avec la séquence signal *pelB*. La CD NodB (*S. meliloti*) possède aussi une séquence poly-histidine à l'extrémité C-terminale qui permettra une purification sur résine de nickel. Dans le but d'éviter la formation de corps d'inclusion, différentes concentrations en IPTG et différentes températures d'induction (20°C et 24°C) sont testées, et ce jusqu'à 46 heures d'induction. Cependant, des problèmes importants de croissance des bactéries transformées ont été observés, avec de la lyse cellulaire, ainsi que

¹⁹⁷ Cereghino, J. L. and Cregg, J. M., **2000**, *FEMS Microbiol. Rev.*, 24, (1), 45-66.

des difficultés pour culoter les cultures. Il n'y a pas de corrélation entre la concentration en IPTG et la lyse observée, il semble que le simple fait d'induire la production de la CD NodB déstabilise les bactéries et empêche ainsi les essais d'expression. Il est possible que la CD NodB lors de son exportation au sein du périplasma soit active sur le peptidoglycane composant les membranes, pouvant les déstabiliser et provoquer une lyse cellulaire. Cette stratégie d'expression a ainsi été abandonnée.

II.4.1.2.b. Dans le cytoplasme

La seule description d'expression recombinante de la CD NodB chez *E. coli* est une surexpression de l'enzyme sans aucune étiquette. L'objectif est de se rapprocher de cette étude, et de jouer sur les conditions d'induction comme la température ou la concentration en IPTG, dans l'espoir d'observer une expression sous forme soluble.

La souche *E. coli* BL21 est transformée par le plasmide pET21d_nodB, contenant le gène *nodB*. L'expression de la protéine sera cytoplasmique, sans étiquette poly-histidine. Les cultures sont placées à 16°C en présence de différentes concentrations en IPTG (Tableau 16). L'analyse des extraits cytoplasmiques sur SDS-PAGE révèle une surexpression de protéine dans la zone de taille attendue (28,5 kDa). Le niveau de surexpression est optimal après 22 heures d'induction à 16°C en présence de 0,5 mM d'IPTG. L'analyse des débris cellulaires révèle aussi la présence de corps d'inclusion.

Lorsque ces extraits cytoplasmiques bruts ont été incubés en présence de COs, une activité de *N*-désacétylation a été observée. Ainsi, des conditions d'expression de la CD NodB directement sous forme soluble et active viennent d'être identifiées. Devant ces résultats encourageants, des perspectives de synthèses de précurseurs de LCOs à l'aide de la CD NodB sont envisageables, de même qu'une caractérisation biochimique, encore inédite à ce jour.

Pour cela, l'accès à une enzyme purifiée serait plus intéressant encore. Mais purifier la CD NodB sans étiquette implique de faibles rendements de purification. Ainsi, avant d'envisager cette stratégie, une nouvelle construction est créée afin de rajouter une séquence poly-histidine.

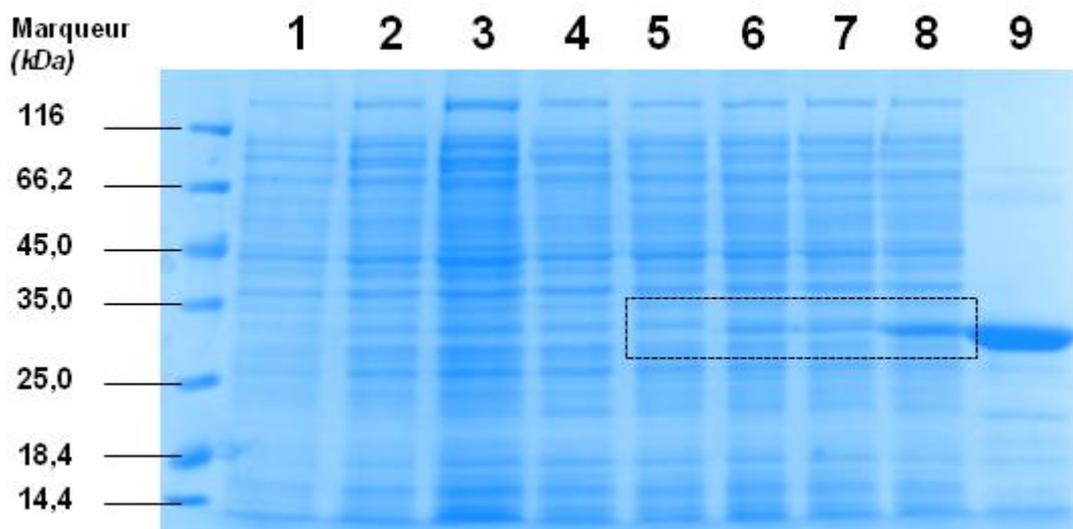


Figure 82. Analyse par SDS-PAGE 12% de l'expression de la CD NodB (*S. meliloti*) chez *E. coli* BL21. (1-4) Protéines cytoplasmiques d'*E. coli* BL21 transformées par le pET21d(+) après 0, 2, 6 et 22 heures de croissance à 16°C, avec 0,5 mM d'IPTG. (5-8) Protéines cytoplasmiques d'*E. coli* BL21 transformées par le pET21d_nodB-His après 0, 2, 6 et 22 heures de croissance à 16°C, avec 0,5 mM d'IPTG. (9) CD NodB purifiée sur résine de nickel. (environ 20 µg de protéines déposés par piste).

La souche *E. coli* BL21 est transformée par le plasmide pET21d_nodB-His, contenant le gène *nodB*. L'expression de l'enzyme sera toujours cytoplasmique, mais avec une étiquette poly-histidine à l'extrémité C-terminale. Des conditions d'induction similaires à la première construction sont évaluées (Tableau 16), dans l'espoir de retrouver l'expression soluble.

L'analyse des extraits cytoplasmiques sur SDS-PAGE révèle une surexpression de protéine à une taille observée (30,1 kDa) en accord avec la taille attendue de la CD NodB (28,5 kDa) (Figure 82, pistes 5 à 8). La meilleure condition d'expression à 16°C nécessite 22 heures d'induction, et 0,5 mM d'IPTG (Figure 82, piste 8). Une culture de bactérie *E. coli* BL21, transformée par le pET21d(+) est réalisée, et aucune protéine surexprimée dans les mêmes conditions n'est observée (Figure 82, pistes 1 à 4). Il est à noter, que comme lors de l'expression de la CD NodB sans étiquettes, celle-ci se trouve aussi produite sous forme de corps d'inclusion.

La protéine surexprimée est purifiée sur résine de nickel et éluée avec des solutions concentrées en imidazole (150 à 300 mM). Elle présente quelques contaminants de masses moléculaires inférieures à celle-ci, mais elle reste majoritaire à 85% (Figure 82, piste 9).

Le rendement moyen de purification est de 20 mg de CD NodB par litre de culture d'*E. coli* transformée par le pET21d_nodB. La protéine purifiée est dialysée contre du MOPS 20 mM pH 7,2 et stockée à -80°C sans ajout de glycérol ou de sels. Dans ces conditions, l'enzyme est stable plusieurs mois.

La CD NodB purifiée est maintenant à disposition. Trois grandes voies de travail se présentent. La première concerne des études biochimiques et la détermination de ses constantes catalytiques ; la seconde concerne la préparation de précurseurs de LCOs, c'est à dire l'utilisation de l'activité catalytique de l'enzyme à des fins de synthèse. Enfin, la troisième concerne des essais de cristallogenèse. En collaboration avec une équipe de l'Université de Barcelone, dirigée par le Pr Planas, la CD NodB peut leur être fournie à un bon niveau de pureté, et en quantité suffisante. Elle ne présente qu'une petite séquence poly-histidine supplémentaire, ne devant à priori pas gêner l'étude cristallographique.

En revanche, concernant les autres voies de travail, il serait encore plus intéressant d'avoir à disposition une quantité plus importante d'enzyme. Pour cela, les études d'induction se sont poursuivies, dans l'objectif d'augmenter encore le niveau de production de cette enzyme. Une troisième construction a été évaluée, dans laquelle la CD NodB se trouve en fusion avec la thiorédoxine.

Cette petite protéine intervient naturellement dans des processus d'oxydoréduction. Elle est ubiquitaire chez les organismes vivant, et joue un rôle crucial d'antioxydant, à travers notamment la formation de ponts disulfures au sein des protéines. En fusion avec une protéine recombinante, son utilisation trouve une autre application. En effet, la thiorédoxine est produite naturellement à des taux élevés chez *E. coli*. Fusionnée à l'extrémité N-terminale des protéines, elle peut faciliter leur production¹⁴⁷, et ainsi augmenter les niveaux de protéine sous forme soluble, au détriment des corps d'inclusions déjà observés.

La souche *E. coli* BL21 est transformée par le plasmide pET32a_nodB, contenant le gène *nodB* en fusion avec la thiorédoxine à l'extrémité N-terminale. Une séquence poly-histidine relie les deux protéines en fusion, et une seconde séquence poly-histidine, potentiellement plus accessible, se trouve à l'extrémité C-terminale.

L'expression de la CD NodB-thiorédoxine sera toujours cytoplasmique. Des conditions d'induction similaires à la première construction sont évaluées (Tableau 16). L'analyse des extraits cytoplasmiques sur SDS-PAGE révèle une surexpression de protéine à une taille observée (41,7 kDa) en accord avec la taille attendue de la CD NodB-thiorédoxine (41,95 kDa) (Figure 83, pistes 5 à 8). La meilleure condition d'expression à 16°C nécessite 22 heures d'induction, et 0,5 mM d'IPTG (Figure 83, piste 8). Une culture de bactérie *E. coli* BL21, transformée par le pET32a(+) est réalisée, et une surexpression d'une protéine autour de 20 kDa est observée, correspondant à la thiorédoxine. (Figure 83, pistes 1 à 4).

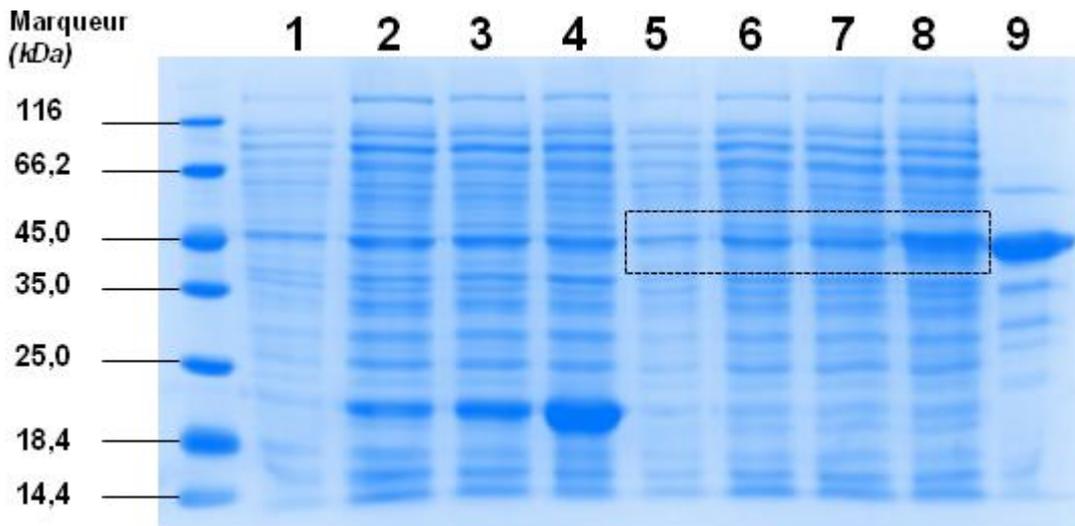


Figure 83. Analyse par SDS-PAGE 12% de l'expression de la CD NodB (*S. meliloti*) en fusion avec la thiorédoxine chez *E. coli* BL21. (1-4) Protéines cytoplasmiques d'*E. coli* BL21 transformées par le pET32a(+) après 0, 2, 6 et 22 heures de croissance à 16°C, avec 0,5 mM d'IPTG. (5-8) Protéines cytoplasmiques d'*E. coli* BL21 transformées par le pET32a_nodB après 0, 2, 6 et 22 heures de croissance à 16°C, avec 0,5 mM d'IPTG. (9) CD NodB-thioredoxine purifiée sur résine de nickel (Taille attendue 42 kDa). (environ 20 µg de protéines déposés par piste).

La protéine surexprimée est purifiée sur résine de nickel et éluée avec des solutions concentrées en imidazole (150 à 300 mM). Elle présente aussi des contaminants, plutôt de masses moléculaires inférieures à celle-ci, mais elle reste majoritaire à 73% (Figure 83, piste 9). Le rendement moyen de purification est de 100 mg de CD NodB par litre de culture d'*E. coli* transformée par le pET32a_nodB. La protéine purifiée est dialysée contre du MOPS 20 mM pH 7,2 et stockée à -80°C sans ajout de glycérol ou de sels. Dans ces conditions, l'enzyme est stable plusieurs mois.

Il est à noter que des corps d'inclusions de la CD NodB-thioredoxine sont encore visibles dans les débris cellulaires. Des essais de co-expression à l'aide de protéines chaperonnes GroES et GroEL ont également été réalisés¹⁴⁶. Le but était de limiter au maximum la formation de ces corps d'inclusion. Cependant, après analyse sur SDS-PAGE des fractions cytoplasmiques puis des débris cellulaires, aucune différence d'expression de la CD NodB n'a été observée. L'influence de ces protéines chaperonnes n'est pas significative, elles n'ont pas été utilisées par la suite.

L'expression de la CD NodB en fusion avec la thiorédoxine a permis d'améliorer considérablement les rendements de production. Au moins trois fois plus d'enzyme est ainsi purifiée lorsqu'elle est en fusion avec la thiorédoxine. Etant accessible en plus grande quantité, cette CD sera utilisée pour mener les études biochimiques mais également pour synthétiser différents précurseurs de LCOs.

II.4.2. Caractérisation biochimique

Des tests d'activité de la CD NodB ont été réalisés sur les extraits bruts des trois constructions à disposition (NodB « sans étiquettes », NodB avec une séquence poly-histidine, et NodB en fusion avec la thioredoxine). L'enzyme présente à chaque fois une activité de *N*-désacétylation d'oligomères de chitine, suivie par analyse CCM et vérifiée par spectrométrie de masse. Cependant, après la purification sur résine de nickel de la CD NodB, on observe une perte d'activité. Les enzymes de cette famille étant connues pour être des métalloprotéines, le milieu réactionnel est supplémenté avec différents dications métalliques, afin d'identifier le meilleur candidat possible. Plusieurs d'entre eux semblent activer la CD NodB, comme Mg^{2+} , Mn^{2+} ou Ca^{2+} . Au contraire, Co^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} et Zn^{2+} ne restaurent pas l'activité de la CD NodB une fois purifiée. Le dication qui semble le plus adapté est le Mn^{2+} (Figure 84, piste 3), utilisé à une concentration de 1 mM dans le milieu réactionnel.

Enfin, en plus de la présence indispensable de ces cations, il est nécessaire d'avoir un milieu réactionnel réducteur afin de s'assurer de l'activité de l'enzyme. Du dithiothréitol (DTT) est donc ajouté au milieu réactionnel. Lorsqu'est présent soit le Mn^{2+} (Figure 84, piste 4), soit le DTT (Figure 84, piste 5), une très faible activité est observée. Cela confirme le rôle de chacun de ces deux composants dans l'activité de la CD NodB. Lorsque le Mg^{2+} remplace le Mn^{2+} (Figure 84, piste 6), la CD NodB présente une activité de *N*-désacétylation, mais incomplète. Enfin en présence de Zn^{2+} (Figure 84, piste 7), cation souvent décrit dans cette famille, la CD est également très peu active.

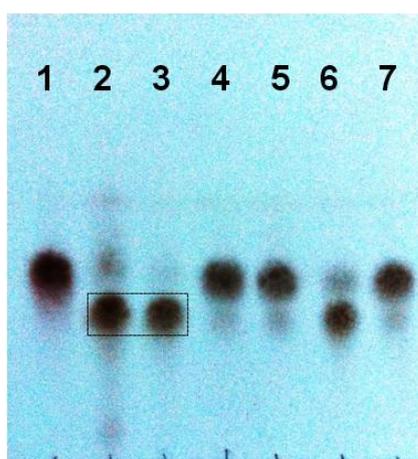


Figure 84. Analyse par CCM de l'influence de cations métalliques et du DTT sur l'activité de NodB.
 (1) Standard CO-V (2) Standard CO-V(N^V). Produit de l'action de la CD NodB sur CO-V en présence (3) de DTT et de Mn^{2+} , (4) de Mn^{2+} , (5) de DTT, (6) de DTT et de Mg^{2+} , (7) de DTT et de Zn^{2+} .

Les milieux réactionnels bruts ont été déposés.

Eluant : butanol / éthanol / eau (4/3/3)

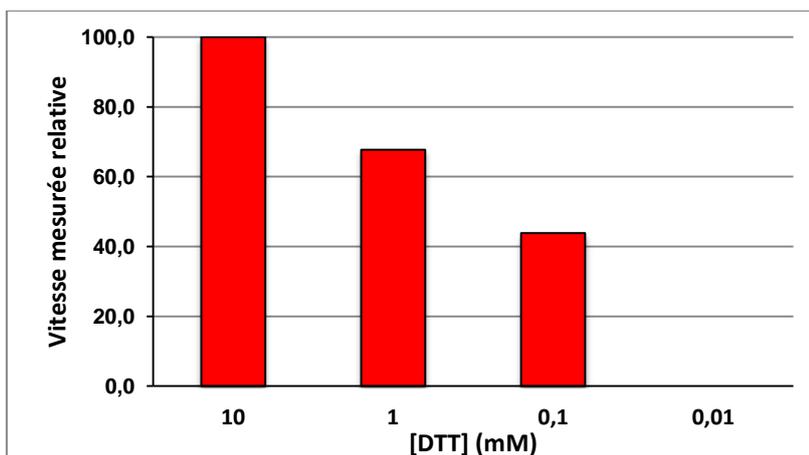


Figure 85. Etude de l'influence de la concentration en DTT sur l'activité de NodB.

L'influence de la concentration en DTT a également été étudiée, à travers des cinétiques mesurées par le test de dosage des amines libres (MBTH) (Figure 85), en présence de 1 mM de $MnSO_4$. La vitesse la plus élevée est mesurée avec une concentration en DTT de 10 mM dans le milieu réactionnel. Puis lorsque l'on abaisse d'un facteur dix la concentration en DTT, la vitesse de réaction est réduite d'environ 30 %, de même pour 0,1 mM de DTT jusqu'à une vitesse nulle relevée pour 0,01 mM de DTT.

Après avoir identifié ces conditions réactionnelles, une caractérisation biochimique de l'enzyme est alors menée, en présence de 10 mM de DTT et de 1 mM de Mn^{2+} , à travers le test de dosage des amines (MBTH). Au contraire de la CD VC1280, il n'existe encore aucune constante catalytique connue de la CD NodB.

Paramètres	Substrats	
	CO-II	CO-V
Vmax	$0,57 \pm 0,05 \mu M \cdot s^{-1}$	$0,16 \pm 0,02 \mu M \cdot s^{-1}$
Km	$1530 \pm 200 \mu M$	$379 \pm 23 \mu M$
kcat	$0,38 \pm 0,03 s^{-1}$	$0,45 \pm 0,05 s^{-1}$
kcat/Km	$248,6 \pm 17,2 s^{-1} \cdot M^{-1}$	$1172 \pm 48 s^{-1} \cdot M^{-1}$

Tableau 17. Paramètres cinétiques de la CD NodB (*S. meliloti*)
(Concentration en enzyme = 0,11 nM).

L'étude biochimique a été réalisée sur les substrats chitinbiose et chitinpentaose, les mesures ont été réalisées en triplicata (Tableau 17). La CD NodB présente une efficacité catalytique (kcat/Km) environ 5 fois plus élevée pour le CO-V qui est son substrat naturel, par rapport au CO-II. C'est l'inverse de la CD VC1280, plus efficace sur le CO-II que sur les oligomères de plus haut DP.

L'efficacité catalytique (kcat/Km) de la CD NodB sur le CO-II est également meilleure que celle de la CD VC1280 (Figure 77) mais reste encore relativement faible. Ainsi, il faudra probablement utiliser de nouveau une grande quantité d'enzyme afin d'obtenir des conditions de synthèse de précurseur de LCOs satisfaisantes. Cependant, le haut niveau d'expression de la CD NodB, rend son utilisation particulièrement intéressante.

II.5. Synthèse préparative de COs-(N) par le procédé NodB

Ayant mis au point des conditions très intéressantes de production de la CD NodB, le but est maintenant d'identifier des conditions réactionnelles satisfaisantes pour une application en synthèse de précurseurs de LCOs. Des substrats naturels non décorés (COs), mais également des molécules fonctionnalisées vont servir de substrat afin d'accéder à un panel varié de molécules précurseurs de LCOs.

Dans un premier temps, des chitinoligomères non décorés (COs) ont été employés pour l'optimisation des conditions de synthèse préparative (Figure 86a). Ils proviennent, comme pour les synthèses catalysées par la CD VC1280, du mélange d'oligomères de chitine commercial (Chapitre III « Accès aux chitinoligosaccharides»). Les deux substrats choisis sont le CO-IV et le CO-V, c'est-à-dire les mêmes molécules que pour le « procédé VC1280 », correspondant à la majorité des squelettes saccharidiques des facteurs Nod et Myc.

Dans un second temps, des COs fonctionnalisés à l'extrémité réductrice ont été évalués pour leur aptitude à servir de substrats et conduire à des précurseurs de LCOs décorés, après action de la CD NodB (Figure 86b). Les oligomères fonctionnalisés comportent trois décorations différentes, (i) un sulfate en *O*-6 du GlcNAc réducteur (ii), un résidu 2-OMe fucosyle en *O*-6 du GlcNAc réducteur et (iii), un groupement propargyle sur la position anomère.

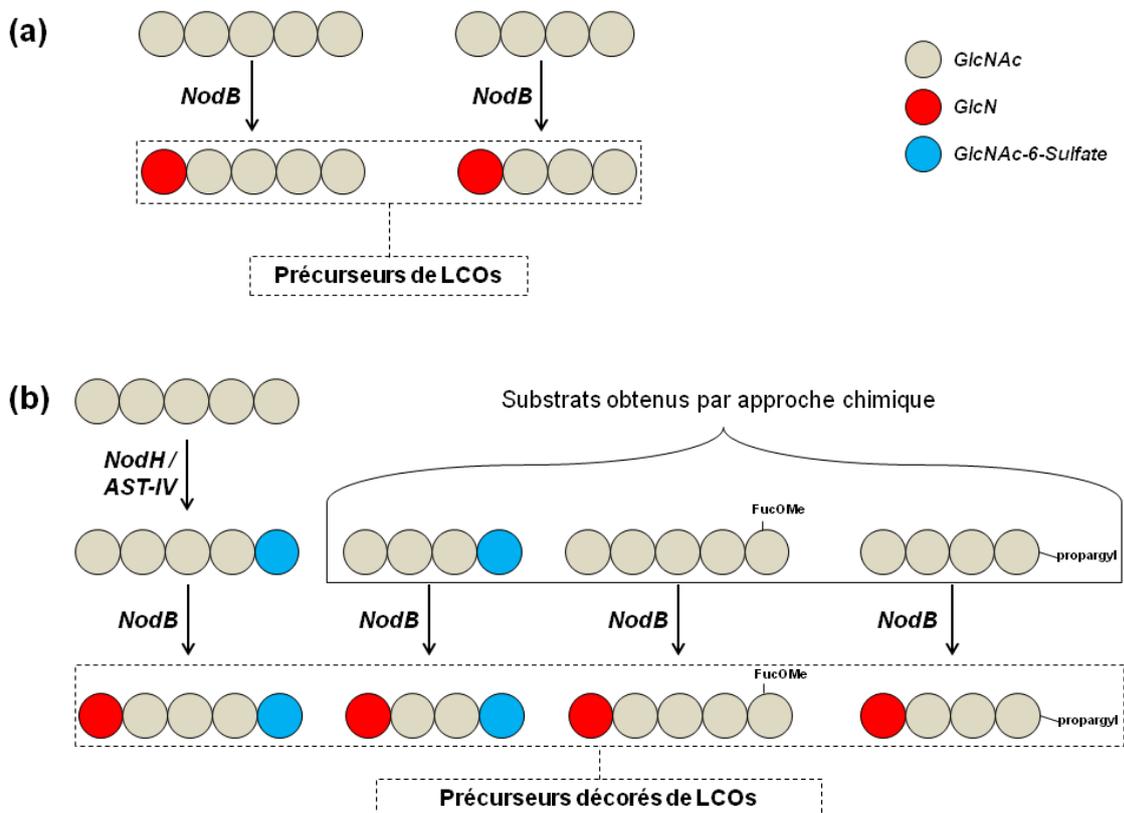


Figure 86. Cibles des synthèses de précurseurs de LCOs par le procédé NodB.

Ces substrats ont été synthétisés par différentes approches ; soit par sulfatation enzymatique par l'action combinée de NodH (*S. meliloti*) et de l'AST-IV (*R. norvegicus*) (Chapitre IV « Décorations des chitinoligosaccharides) ; soit par une approche de synthèse chimique totale élaborée par nos partenaires d'Orsay dans le cadre du projet ANR "BioCOS".

II.5.1. Précurseurs de LCOs non fonctionnalisés

Les oligomères CO-IV ou CO-V sont mis en réaction avec la CD NodB pendant 20 heures à 30°C. En utilisant un ratio enzyme / substrat de 0,3 % (mol/mol), on obtient des réactions totales à en juger par l'analyse CCM (Figure 87). La CD NodB est ainsi capable de convertir quantitativement du CO-IV en CO-IV(N^{IV}) (Figure 87a), et du CO-V en CO-V(N^V) (Figure 87b), également sans rencontrer de problèmes de dénaturation ou d'inhibition par l'acide acétique co-produit de la réaction. Après dénaturation et élimination de la CD NodB, le milieu réactionnel est additionné d'acétone afin de précipiter le CO(N). Le précurseur de LCO est alors caractérisé par spectrométrie de masse et par HPLC afin de vérifier l'absence de sels et sa pureté. Ce protocole limite au maximum les manipulations des produits, ce qui garantit de très bons rendements en produits isolés (Tableau 18). Il est à noter que le CO-IV(N^{IV}) a été plus délicat à précipiter que le CO-V(N^V), et il est probable que ce protocole de purification ne soit pas adaptable pour des oligomères de taille inférieure.

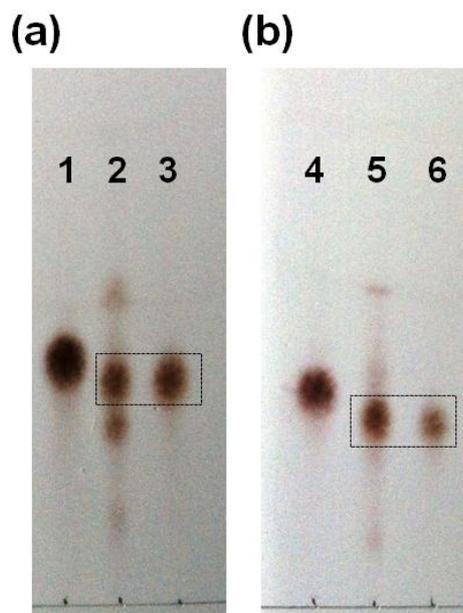


Figure 87. Analyse par CCM de la N-désacétylation (a) du chitintétraose et (b) du chitinpentaose par NodB.

(1) Standard CO-IV (2) Standard CO-IV(N^{IV}) (3) Produit de NodB sur CO-IV (brut réactionnel).

(4) Standard CO-V (5) Standard CO-V(N^V) (6) Produit de NodB sur CO-V (brut réactionnel).

Eluant : butanol / éthanol / eau (4/3/3).

Substrat	Quantité (mg)	Produit	Quantité (mg)	Rendement (%)
CO-IV	15	CO-IV(N ^{IV})	12	84
CO-V	15	CO-V(N ^V)	13	90
CO-V (Bayer CropScience)	1150	CO-V(N ^V)	926	84

Tableau 18. Bilan de synthèse des précurseurs de LCOs non fonctionnalisés obtenus par le procédé NodB.

En collaboration avec le partenaire industriel Bayer CropScience, toujours dans le cadre de l'ANR BioCOS, il a été possible d'avoir accès à plus d'un gramme de CO-V. Afin de faciliter la manipulation de cette grande quantité de substrat puis sa purification, le CO-V a été séparé en lots d'une centaine de milligrammes chacun. Après action de la CD NodB-thiorédoxine, près d'un gramme du précurseur CO-V(N^V) a été obtenu (Tableau 18).

Cela démontre la portée de l'approche du remodelage enzymatique des COS par la CD NodB. Seulement 81 mg d'enzyme en fusion avec la thiorédoxine ont été nécessaires pour cela, c'est moins que ce qui est purifié à partir d'un seul litre de culture d'*E. coli*. L'échelle du gramme de ce précurseur de LCOs (1 mmol) est à mettre en regard des concentrations des facteurs Nod et Myc induisant des réponses chez les plantes (du nM au pM).

II.5.2. Précurseurs de LCOs fonctionnalisés

II.5.2.1. Précurseurs de LCOs sulfatés

Le schéma de biosynthèse des facteurs de nodulation (et des facteurs de mycorhization) n'est pas encore clairement établi, en particulier au niveau de la séquence de réactions impliquées dans la modification de l'oligomère de chitine initialement synthétisé par la chitine synthase (NodC), comme la *N*-désacétylation et la sulfatation. Des informations biochimiques sur les enzymes responsables de la biosynthèse peuvent donc apporter des indications. Par exemple, NodH présente une meilleure affinité pour un LCO que pour un CO⁴², laissant penser que l'acylation précède la sulfatation. Dans notre cas, la sulfatation *in vitro* des COs est décrite¹²⁴, mais celle de COs-(N) ne l'est pas.

Des tests à l'échelle analytique ont révélé que la CD NodB est capable de *N*-désacétyler des COs déjà sulfatés mais également que des COs *N*-désacétylés peuvent être sulfatés par NodH. Pour ces étapes de synthèse, il ne semble donc pas y avoir d'ordre établi.

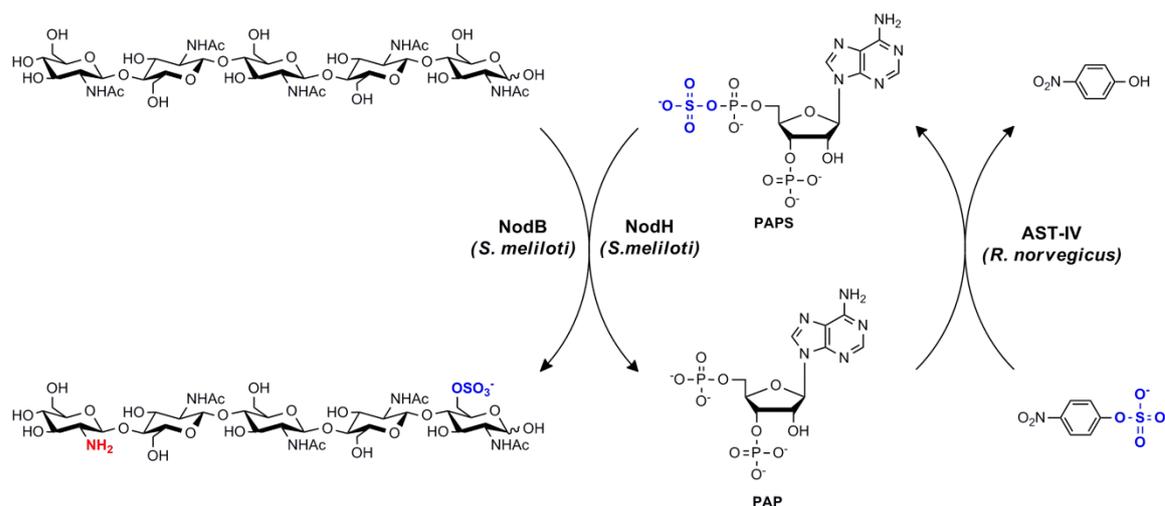


Figure 88. Couplage « one pot » de l'action des sulfotransférases NodH (*S. meliloti*) et AST-IV (*R. norvegicus*) avec NodB (*S. meliloti*) sur du CO-V.

Un des objectifs de l'étude est de réaliser la sulfatation du squelette saccharidique par voie enzymatique puis de coupler cette activité sulfotransférase avec celle de la CD NodB, afin d'obtenir en une étape et dans le même milieu réactionnel, un précurseur de LCO sulfaté à partir d'un CO (Figure 88). La description de ces produits n'a jamais été réalisée par une approche *in vitro*.

II.5.2.1.a. Approche par synthèse chimique totale

Auparavant, les partenaires de l'université de Paris nous ont fourni un précurseur de CO-IV(S), obtenu par une approche de synthèse chimique totale. Selon le procédé établi, la réaction de la CD NodB sur ce substrat est quantitative. Après dénaturation et élimination de l'enzyme, le surnageant est alors lyophilisé, et le précurseur de LCO est purifié par SEC (HW40 : éluant carbonate d'ammonium 50 mM), en raison de la présence d'espèces comme le CO-IV(N^{IV}) qui contaminent le produit d'intérêt. L'utilisation de carbonate d'ammonium permet d'écranter les charges que portent les COs-(N, S), et ainsi d'obtenir une meilleure résolution lors de l'élution des produits.

La purification par SEC indique une légère contamination attribuée à la présence de CO-IV(N^{IV}), non résolu du produit d'intérêt. En effet, lors de la purification par SEC du CO-IV(N^{IV}, S), les temps de rétention entre les deux COs modifiés sont trop proches (Figure 89). La trop faible résolution des espèces empêche d'isoler le produit d'intérêt.

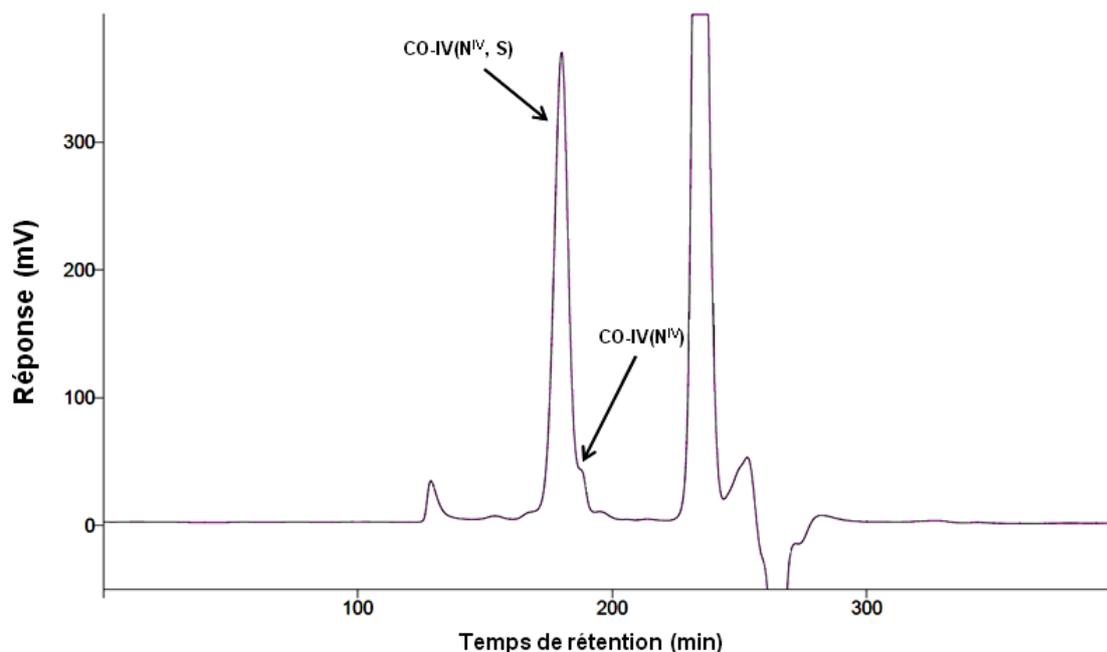


Figure 89. Chromatogramme SEC HW40 du mélange réactionnel de *N*-désacétylation du CO-IV(S) par la CD NodB.

Un essai d'optimisation a été réalisé en montant en série une seconde colonne HW40, sans réussir pour autant à améliorer de façon satisfaisante la résolution des pics. L'augmentation de la force ionique de l'éluant n'influe pas non plus sur la résolution. L'emploi d'autres supports chromatographiques a été étudié avec des gels superdex à base de dextran et d'agarose. Là encore, le substrat et le produit ne se séparent pas. L'utilisation de colonnes échangeuses d'ions pourrait permettre d'isoler un CO sulfaté *N*-désacétylé (chargé négativement et positivement), d'un CO *N*-désacétylé (chargé positivement).

Ce précurseur de LCO a été caractérisé par spectrométrie de masse haute résolution, et par HPLC, confirmant l'absence de sels. La contamination par le CO-IV(N^{IV}) est estimée à 7 % d'après la purification par HPLC. Un protocole de purification de CO-(N, S) à échelle préparative a été mis au point, fournissant un précurseur de LCOs pour la synthèse de facteurs de mycorhization ou de nodulation. Le travail réalisé pour la synthèse du CO-IV(N^{IV},S) a validé l'activité de la CD sur des oligomères sulfatés.

II.5.2.1.b. Approche enzymatique (NodB / NodH / AST-IV)

Il était intéressant de tester une approche "one-pot" pour la synthèse de précurseurs de LCOs sulfatés à partir de COs. Cela nécessite de vérifier que l'activité CD est compatible avec les conditions de sulfatation. Après l'action des sulfotransférases NodH (*S. meliloti*) et AST-IV (*R. norvegicus*) sur le CO-V (Chapitre IV « décoration des chitinoligosaccharides »), la CD NodB est rajoutée directement au sein du milieu réactionnel, selon les conditions pré-définies.

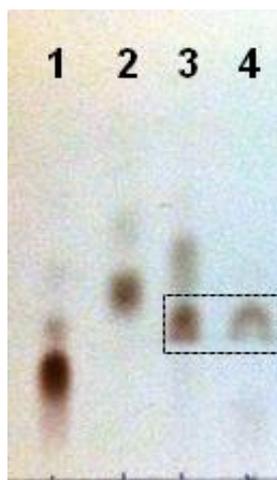


Figure 90. Analyse par CCM de la *N*-désacétylation des CO-S par NodB. (1) Standard CO-V (2) Standard CO-V(S) (3) Standard CO-V(N,S). (4) Produit de NodB sur CO-V(S) (brut réactionnel).
Eluant : Propanol / eau / ammoniac 30 % (70/30/1).

Les concentrations en DTT et MnSO_4 sont ajustées pour l'activité de la CD NodB à respectivement 10 mM et 1 mM, et le milieu réactionnel est placé 20 heures à 30°C sans agitation. Le suivi de la réaction par analyse CCM traduit une *N*-désacétylation complète (Figure 90). Le produit de NodB sur le CO-V(S) (Figure 90, piste 4), présente le même rapport frontal que le standard CO-V(N^v, S) (Figure 90, piste 3) et aucune tâche correspondant au rapport frontal du CO-V(S) n'est visible (Figure 90, piste 2). Cela traduit une réaction quantitative de la CD NodB (*S. meliloti*).

On observe cependant une fine tâche sous le produit, avec un plus petit rapport frontal, traduisant possiblement des traces de COs *N*-désacétylés mais non sulfatés. Pourtant, lors de l'analyse de l'action des sulfotransférases sur le CO-V par CCM, la réaction de sulfatation paraissait quantitative. Ainsi, en raison de la présence de ces COs-(N)-désacétylés qui contaminent les produits d'intérêt, la purification va se réaliser non pas par précipitation, mais par chromatographie d'exclusion de tailles (SEC).

Après dénaturation par chauffage et élimination des enzymes par centrifugation, le surnageant est alors lyophilisé, et le précurseur de LCO est purifié par SEC (HW40 : éluant carbonate d'ammonium 50 mM). Sur le chromatogramme du CO-V(N^v, S), la résolution entre les précurseurs de LCO sulfatés et non sulfatés est satisfaisante (Figure 91). Le précurseur CO-V(N^v, S) est isolé avec un rendement de 59 %. Cette approche permet de synthétiser un précurseur de LCO sulfaté en ne mettant en jeu qu'une seule étape de purification, et sera intéressante dans l'optique d'une synthèse de ce type à l'échelle préparative.

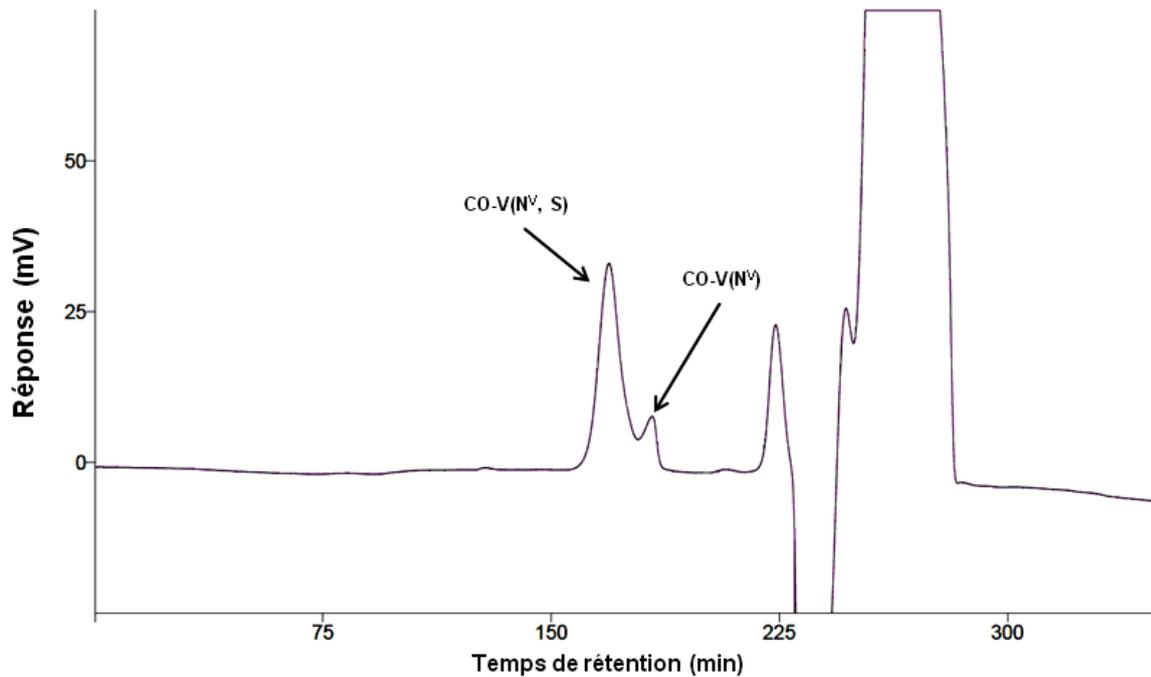


Figure 91. Chromatogramme SEC HW40 du mélange réactionnel de *N*-désacétylation et de sulfatation du CO-V par NodB (*S. meliloti*), NodH (*S. meliloti*) et l'AST-IV (*R. norvegicus*).

II.5.2.2. Précurseur de LCO fucosylé

Par une approche de synthèse chimique totale, nos partenaires de l'ICMMO d'Orsay (Dr. Guillaume Despras, Dr. Dominique Urban, Pr. Jean-Marie Beau et Dr. Boris Vauzeilles) nous ont également fourni un chitinpentaose possédant un résidu fucosyle méthylé, en position 6 du résidu *N*-acétylglucosaminyle réducteur. Avec la sulfatation, la fucosylation des LCOs est une décoration très fréquente chez les facteurs de nodulation, concernant cinq genres de bactéries fixatrices d'azote (*Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* et *Sinorhizobium*), mais en revanche absente chez les facteurs de mycorhization. Le résidu fucosyle peut lui même être substitué par un sulfate en position 3 (Figure 43), ou bien par un méthyle en *O*-2 comme dans le cas présent. NodZ est l'enzyme identifiée responsable de cette décoration¹⁹⁸. Particulièrement bien décrite, elle utilise un GDP-fucose comme donneur¹⁹⁹. Sa structure a également été résolue²⁰⁰.

Comme pour la sulfatation, il n'existe pas d'information quant à l'activité de NodB sur un substrat fucosylé. Cependant, cette décoration occupant la même position que le sulfate, il est probable que celui-ci soit reconnu comme substrat par la CD.

¹⁹⁸ Stacey, G., Luka, S., Sanjuan, J., Banfalvi, Z., Nieuwkoop, A. J., Chun, J. Y., Forsberg, L. S. and Carlson, R., **1994**, *J. Bacteriol.*, 176, (3), 620-633.

¹⁹⁹ Chazalet, V., Uehara, K., Geremia, R. A. and Breton, C., **2001**, *J. Bacteriol.*, 183, (24), 7067-7075.

²⁰⁰ Brzezinski, K., Dauter, Z. and Jaskolski, M., **2012**, *Acta Crystallogr. Sect. D*, 68, 160-168.

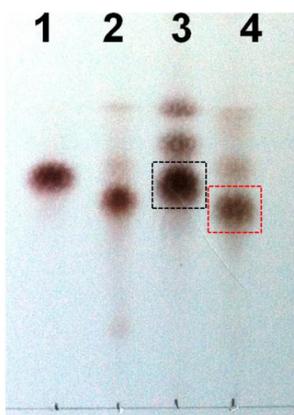


Figure 92. Analyse par CCM de la *N*-désacétylation du CO-V(MeFuc) par NodB. (1) Standard CO-V (2) Standard CO-V(N) (3) Standard CO-V(MeFuc) (4) Produit de NodB sur CO-V(MeFuc)(brut réactionnel).

Eluant : butanol / éthanol / eau (4/3/3).

Après des tests à l'échelle analytique, confirmant l'activité de la CD NodB, une synthèse à l'échelle préparative est réalisée, toujours selon les conditions établies pour les COs non fonctionnalisés.

Le suivi CCM révèle une réaction de la CD quantitative (Figure 92). Ne possédant pas de standard du produit d'arrivée au laboratoire, l'analyse CCM est également réalisée avec du CO-V et CO-V(N^v) (Figure 92, piste 1 et 2). Entre le substrat (encadré noir) (Figure 92, piste 3), et le produit (encadré rouge) (Figure 92, piste 4), la même différence de rapport frontal est observée qu'entre le CO-V et le CO-V(N^v).

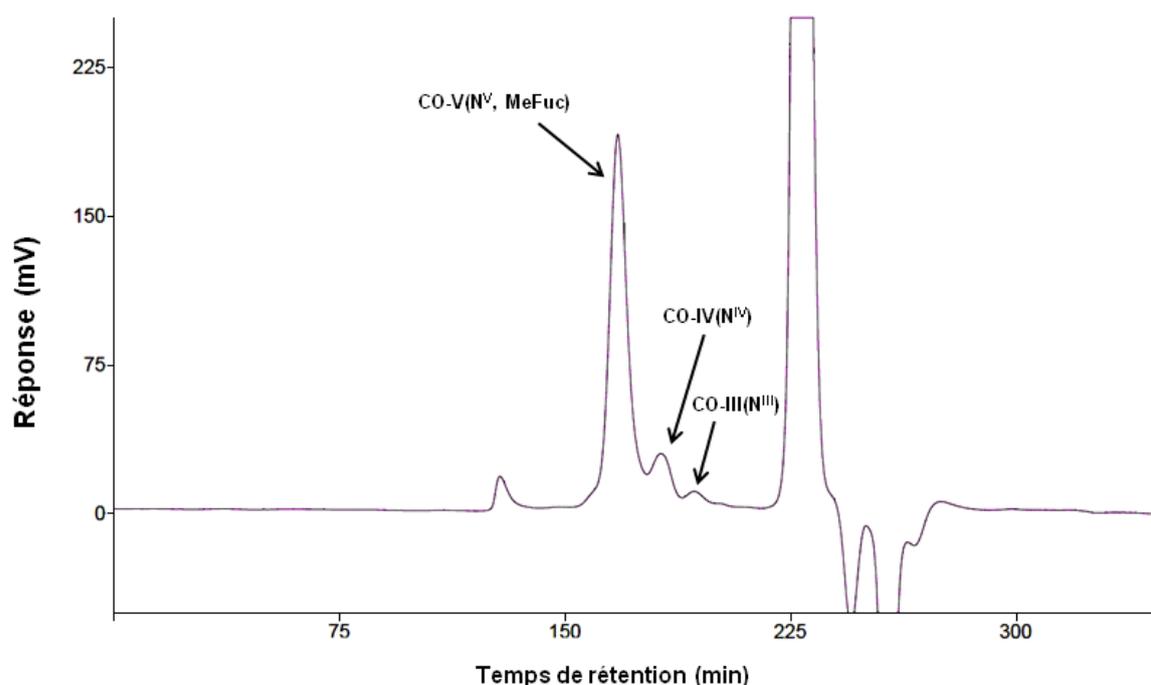


Figure 93. Chromatogramme SEC HW40 du mélange réactionnel de *N*-désacétylation du CO-V(MeFuc) par la CD NodB.

Après élimination de l'enzyme par une séquence de dénaturation par chauffage puis centrifugation, le produit est purifié par SEC, et non par précipitation. En effet, on observe des produits contaminants lors de l'analyse CCM, confirmé par spectrométrie de masse comme étant du CO-IV(N^{IV}) et du CO-III(N^{III}). Le chromatogramme SEC (Figure 93) révèle une bonne résolution entre le produit d'intérêt et les contaminants. Le précurseur de LCOs est ensuite caractérisé par spectrométrie de masse et HPLC. Le rendement en produit isolé est de 63 %.

II.5.2.3. Précurseur de LCO propargylé

Le dernier substrat présenté dans cette étude est un CO-IV possédant un groupement propargyle sur la position anomère. Le but est de réaliser un LCO bi-fonctionnalisé pour réaliser un marquage bio-orthogonal, afin d'isoler directement à partir d'un extrait brut complexe une cible biologique²⁰¹. La cible visée est la famille de récepteurs LysM identifiés comme protéines de reconnaissance des LCOs chez la plante hôte.

Une chaîne grasse photoactivable va permettre au LCO de venir se fixer de façon covalente à sa cible biologique. Par l'intermédiaire d'un groupement propargyle présent sur la position anomère (Figure 94), un second groupement fonctionnel portant un azide est fixé par chimie « click ».

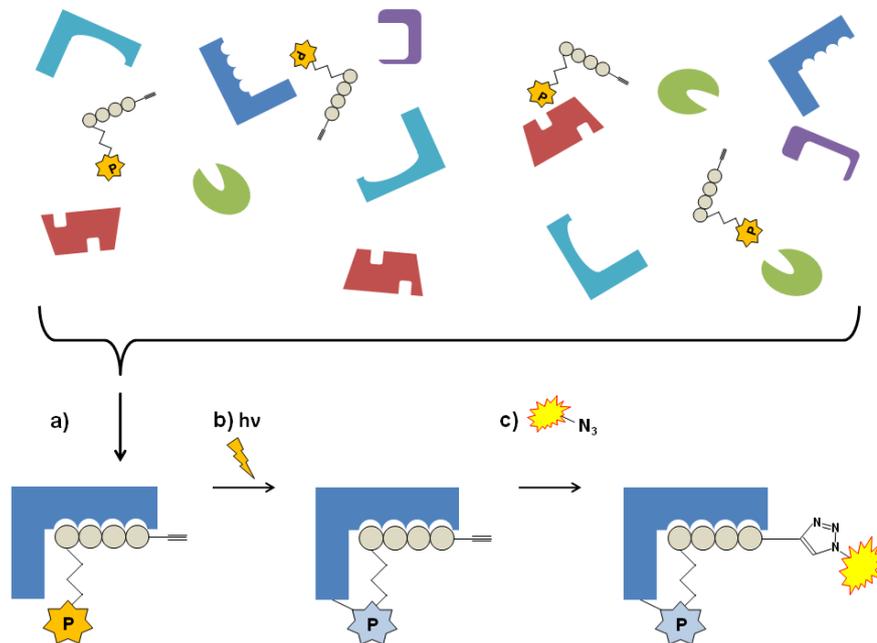


Figure 94. Stratégie de sonde bifonctionnelle pour l'identification et la caractérisation de récepteurs apparentés. (a) Reconnaissance de la cible biologique par le LCO. (b) Photoactivation de la chaîne grasse qui se fixe de façon covalente au récepteur. (c) Ajout d'un groupement détectable par « chimie click » permettant l'identification de la cible.

²⁰¹ Best, M. D., 2009, *Biochemistry*, 48, (28), 6571-6584.

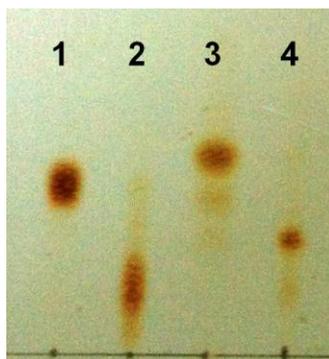


Figure 95. Analyse par CCM de la *N*-désacétylation du propargyl CO-IV par NodB. (1) Standard CO-IV (2) Standard CO-IV(N) (3) Substrat de départ propargyl CO-IV (4) Produit de NodB sur le propargyl CO-IV (brut réactionnel).

Ce groupement peut être radiomarqué, fluorescent ou biotinylé. Il va permettre d'isoler le couple cible-LCO, et d'identifier de nouveaux récepteurs chez la plante. Ce précurseur est réalisé en collaboration avec l'équipe de Boris Vauzeilles de l'ICMMO (Orsay), et à destination de collaborateurs de l'INRA de Toulouse (Jean-Jacques Bono, Clare Gough, Julie Cullimore), membres de l'équipe « Signaux symbiotiques et leur perception transduction ». Le chitintétraose propargylé, obtenu par alkylation directe du CO-IV par l'équipe d'Orsay²⁰³, est mis en présence de la CD NodB pendant 20 heures, selon les conditions définies précédemment. L'analyse de la réaction par CCM indique une réaction quantitative (Figure 95). Le produit de la réaction (Figure 95, piste 4) présente la même différence de rapport frontal avec le substrat de départ (Figure 95, piste 3), que celle que l'on peut observer entre le CO-IV et le CO-IV(N) (Figure 95, piste 1 et 2).

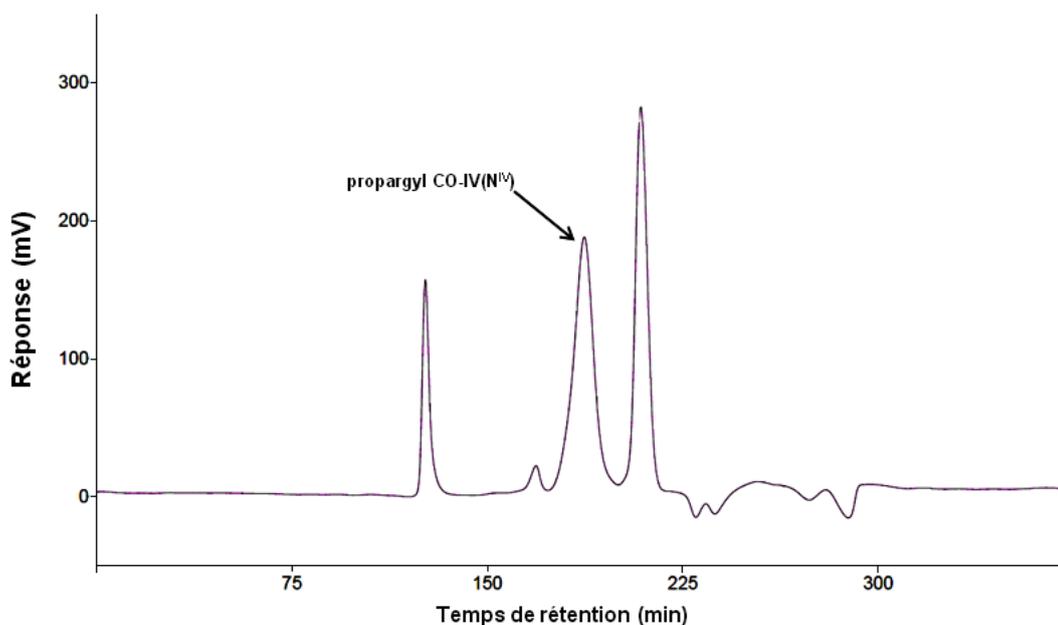


Figure 96. Chromatogramme SEC HW40 du mélange réactionnel de *N*-désacétylation du propargyl CO-IV par NodB.

Un contaminant attribué au CO-IV(N), est également visible. Le produit est purifié par SEC (HW40, éluant carbonate d'ammonium 50 mM) (Figure 96), puis caractérisé par spectrométrie de masse basse résolution. Le rendement en produit isolé est de 65%.

II.6. Bilan de préparation des précurseur de LCOs

Grâce à deux procédés enzymatiques (« procédé VC1280 » et « procédé NodB »), onze précurseurs de LCOs ont été synthétisés à l'échelle préparative, purifiés et caractérisés (Tableau 19). En utilisant les protocoles mis au point sur des oligomères de chitine non fonctionnalisés, des synthèses de précurseurs de LCO décorés ont été réalisées par la CD NodB. Cette CD n'est pas affectée par la fonctionnalisation de l'extrémité réductrice des COs, ce qui laisse penser que l'unité *N*-acétylglucosaminyle (ou à minima l'hydroxyméthyle) du côté réducteur n'est pas mise en jeu lors de la reconnaissance du substrat. Selon les enzymes utilisées, le type de composés obtenus et la présence ou non de contaminants, trois protocoles de purification différents ont été établis.

Procédé	Substrat	Quantité (mg)	Produit	Quantité (mg)	Rendement (%)	Purification
VC1280	CO-VI	5,1	CO-VI(N ^V)	3,9	79	Evaporation
	CO-V	19,1	CO-V(N ^{IV})	16,6	91	Evaporation
	CO-IV	18,7	CO-IV(N ^{III})	17,3	97	Evaporation
	CO-VI(N) ^V	3,9	CO-V(N ^V)	2,1	66	Précipitation
	CO-V(N) ^{IV}	4	CO-IV(N ^{IV})	1,4	43	Précipitation
NodB	CO-IV	15	CO-IV(N ^{IV})	12	84	Précipitation
	CO-V	15	CO-V(N ^V)	13	90	Précipitation
	CO-V	1150	CO-V(N ^V)	926	84	Précipitation
	CO-IV(S)	24,2	CO-IV(N ^{IV} , S)	11,4	49	SEC
	CO-V(S)	12	CO-V(N ^V , S)	7,3	59	SEC
	CO-V(MeFuc)	11,6	CO-V(N ^V , MeFuc)	7	63	SEC
	Propargyl CO-IV	6	Propargyl CO-IV(N ^{IV})	3,7	65	SEC

Tableau 19. Bilan de synthèse des précurseurs de LCOs.

En limitant au maximum la manipulation des produits, d'excellents rendements peuvent être obtenus, comme illustré par la purification par simple évaporation du tampon après élimination de l'enzyme. La purification par précipitation permet de traiter facilement une quantité importante de produit, tout en garantissant de très bons rendements en produits isolés. Enfin, la purification par exclusion de tailles permet d'isoler le produit d'éventuels contaminants de nature proche, comme des substrats n'ayant pas réagi avec les enzymes.

II.7. Acylation des chitinoligomères *N*-désacétylés

Les précurseurs obtenus au cours de ce travail vont être acylés par les collaborateurs de l'Université d'Orsay. Selon le protocole d'acylation défini, l'acide gras (acide palmitique (C_{16:0}) ou oléique (C_{18:1})) est activé en ester par le *N*-hydroxysuccinimide (NHS), et ensuite couplé à l'oligosaccharide en milieu basique. L'utilisation des ces deux chaînes grasses va permettre d'accéder à une bibliothèque de LCOs de 14 molécules (Figure 97). Elle comporte quatre analogues de LCOs issus de l'action de VC1280, et dix LCOs issus de l'action de NodB. Enfin, la quinzième molécule synthétisée est le LCO-IV propargylé avec une chaîne grasse photoactivable.

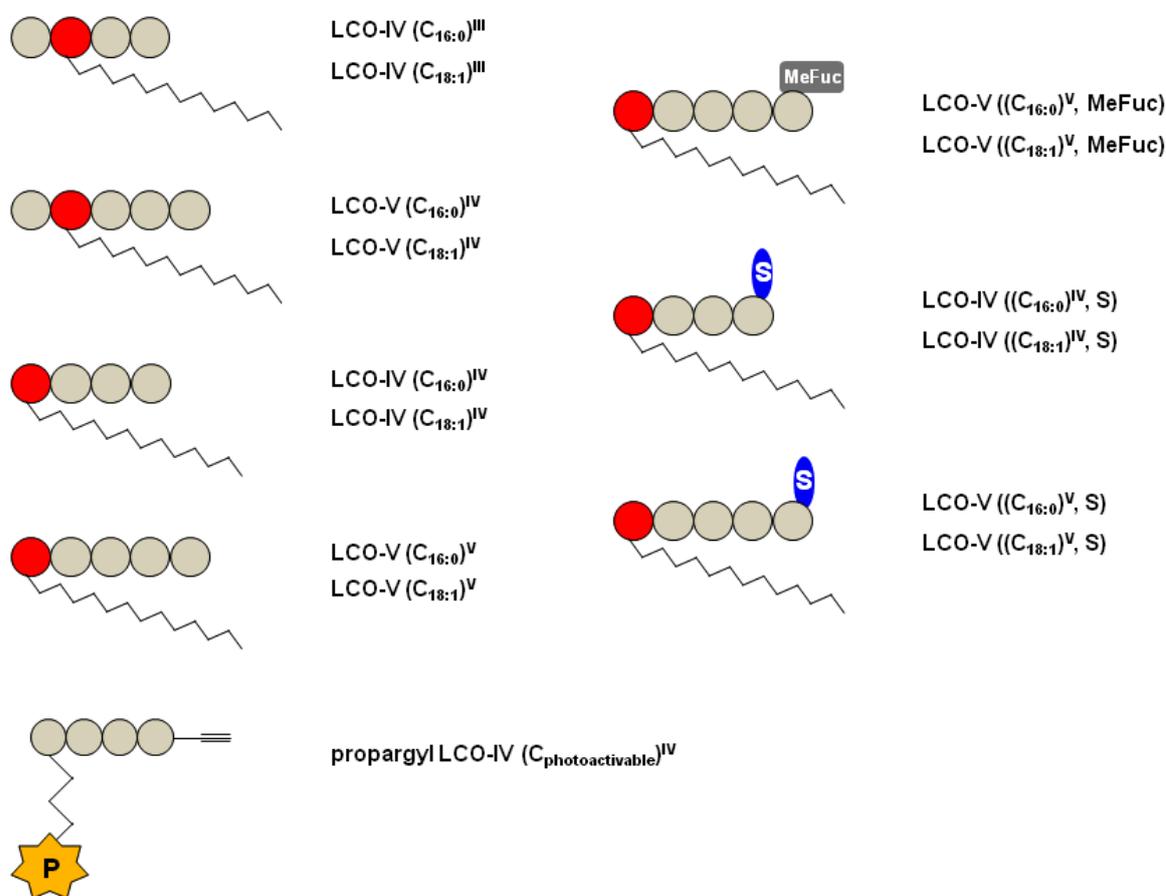


Figure 97. Acylations en cours des analogues de précurseurs de LCOs et des précurseurs de LCOs.

III. Conclusion

Dans ce travail, deux approches de *N*-désacétylation de COs par voie enzymatique ont été développées, afin de préparer des précurseurs de LCOs.

La première approche utilise la CD VC1280 (*Vibrio cholerae*), décrite pour posséder une activité de *N*-désacétylation en pénultième position d'un CO à partir de l'extrémité non-réductrice. La mise au point de conditions d'expression périplasmique chez la bactérie *E. coli* a permis une production élevée de la CD, de l'ordre de 120 mg par litre de culture de bactéries transformées par le pET26b_VC1280. L'utilisation de cette enzyme comme outil de synthèse a permis, dans un premier temps, d'obtenir à l'échelle préparative deux précurseurs analogues de LCOs, le CO-IV(N^{III}) et le CO-V(N^{IV}). Les protocoles de purification établis permettent d'isoler ces COs-(N) avec de très bons rendements, ainsi qu'une très bonne pureté. Le très haut niveau d'expression de la CD VC1280, associé à sa simplicité d'utilisation, en fait un outil de synthèse particulièrement puissant, et adaptable à la synthèse d'analogues de précurseurs de LCOs à l'échelle du gramme, si tant est que le substrat de départ soit facilement disponible.

En couplant l'action de la CD VC1280 avec celle de la β -*N*-acétylhexosaminidase (*Aspergillus oryzae*) commerciale, des précurseurs naturels de LCOs sont ciblés. Deux précurseurs ont été synthétisés à échelle préparative, le CO-IV(N^{IV}) et le CO-V(N^V), avec de bons rendements en produits isolés, ainsi qu'une excellente pureté à l'aide d'un protocole de purification très simple.

Ce « procédé VC1280 », qui permet d'accéder à des précurseurs de LCOs, est également applicable à des COs sulfatés à l'extrémité non-réductrice. Des essais de synthèse à l'échelle analytique, en utilisant les conditions réactionnelles mises au point sur les COs non fonctionnalisés, démontre les actions catalytiques de la CD VC1280 puis de l'hexosaminidase sur ces substrats. Des tests de synthèse à l'échelle préparative pourront donner les rendements en produits isolés et le niveau de pureté obtenus par cette approche sur ces substrats. Ce procédé, d'action séquentielle de la CD VC1280 et de l'hexosaminidase, a été breveté par le CNRS et l'Université Joseph Fourier (UJF)²⁰².

La seconde approche utilise la CD NodB (*Sinorhizobium meliloti*), décrite pour posséder une activité de *N*-désacétylation à l'extrémité non-réductrice de COs. Après un travail d'ingénierie, des conditions d'expression chez la bactérie *E. coli*, de l'enzyme sous forme

²⁰² Fort, S., Chambon, R., Armand, S. and Cottaz, S. FR1255498, **2012**.

soluble ont été mises au point. Une première construction permet d'atteindre un rendement de purification de la CD NodB, de l'ordre de 20 mg par litre de culture de bactéries transformées par le pET21d_nodB-His. L'enzyme purifiée est actuellement utilisée pour des essais de cristallogénèse. La résolution de sa structure tridimensionnelle permettrait de mieux comprendre son activité de *N*-désacétylation de l'extrémité non-réductrice de COs et apporterait des informations importantes pour la compréhension du chemin biosynthétique des facteurs de nodulation. La collaboration en cours implique l'équipe du Pr. Antoni Planas à Barcelone.

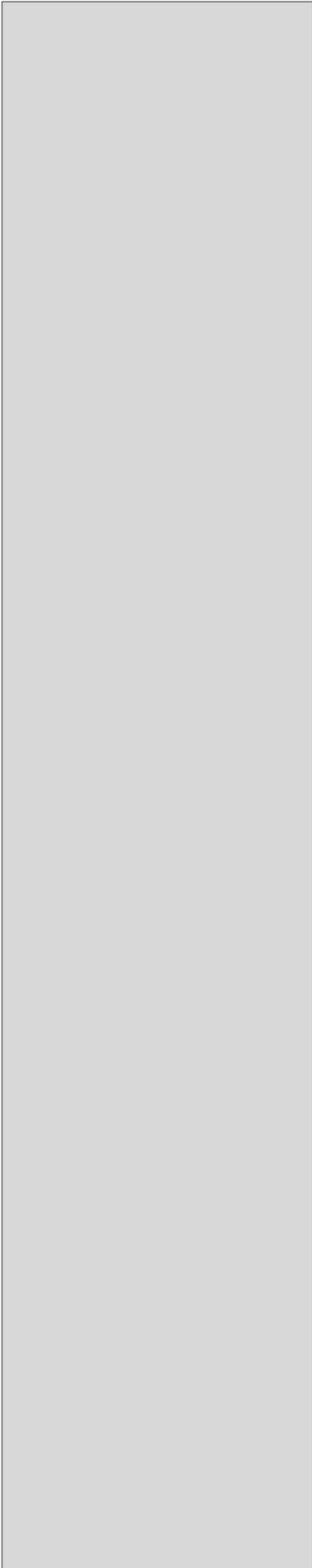
La CD NodB est également produite en fusion avec la thioredoxine, ce qui a permis d'améliorer le niveau de production pour atteindre un rendement moyen de 100 mg par litre de culture de bactéries transformées par le pET32a_nodB. La CD NodB-thiorédoxine est utilisée pour la caractérisation biochimique et comme outil de synthèse. Au cours de son étude biochimique, deux caractéristiques indispensables à son activité ont été mises en évidence. C'est une enzyme métallo-dépendante, et contrairement à la bibliographie décrivant une influence forte de cations comme le zinc ou le cobalt, l'étude biochimique révèle une dépendance au manganèse, et dans une moindre mesure au magnésium. L'observation de l'activité de cette enzyme doit également se faire en présence d'un milieu réducteur, traduisant une sensibilité à l'oxydation.

L'utilisation de la CD NodB-thiorédoxine comme outil de synthèse a permis d'obtenir à l'échelle préparative deux séries de précurseurs de LCOs. La première série est composée de précurseurs non fonctionnalisés, le CO-IV(N^{IV}) et le CO-V(N^V). Des conditions de réactions quantitatives, associées à la mise au point d'un protocole de purification par précipitation ont permis d'isoler ces précurseurs naturels avec de très bons rendements, et une très bonne pureté. Comme pour la CD VC1280, la CD NodB-thiorédoxine est un outil de synthèse particulièrement puissant. Dans son cas, la synthèse de précurseurs de LCOs a été réalisée à l'échelle du gramme. En collaboration avec le partenaire industriel BayerCropscience, la synthèse du précurseur CO-V(N^V) a atteint l'échelle du gramme, en utilisant 81 mg de CD, c'est-à-dire moins qu'il n'en est produit à partir d'un litre de culture de bactéries transformées par le pET32a_nodB. L'efficacité de ce procédé de préparation de précurseurs est ainsi démontrée.

La seconde catégorie de précurseurs synthétisés concerne des oligomères de chitine fonctionnalisés à leur extrémité réductrice. Différentes approches ont été combinées ici. La première concerne un remodelage purement enzymatique des COs, avec les actions couplées de NodH (*S. meliloti*) et de l'AST-IV (*R. norvegicus*) avec la CD NodB-thiorédoxine. La description de *N*-désacétylation de COs sulfatés n'avait pas encore été faite. La seconde approche combine la synthèse chimique de COs décorés, réalisés par les partenaires de

l'université de Paris-Sud, et la *N*-désacétylation enzymatique. Des précurseurs sulfatés ou portant un résidu 2-OMe fucosyle ont été synthétisés. Un protocole de purification de ces précurseurs par chromatographie d'exclusion de tailles permet de les isoler avec de bons rendements et une très bonne pureté.

Enfin, un dernier précurseur de LCOs, non naturel, a été obtenu par l'action de la CD NodB-thiorédoxine. Un groupement propargyle sur la position anomère a été fixé par une approche chimique, et le précurseur résultant de l'action de la CD NodB a été acylé par une chaîne photoactivable. Cette molécule sera utile au Dr. Jean-Jacques Bono, membre de l'équipe « Signaux symbiotiques et leur perception transduction », de l'INRA de Toulouse, à des fins d'identification des récepteurs membranaires chez la plante.



CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Cette thèse de doctorat décrit des outils pour le remodelage enzymatique de COs, ayant des applications importantes en matière d'agrochimie, en associant un remodelage enzymatique de squelettes chitinoligosaccharidiques et un couplage chimique de la chaîne grasse. Elle s'inscrit dans la thématique de l'équipe Chimie et Biotechnologie des Oligosaccharides qui développe de nouveaux procédés chimiques et enzymatiques afin d'obtenir des oligosaccharides naturels ou modifiés ainsi que des glycoconjugués.

Ces travaux de thèse se répartissent selon deux axes de travail. Le premier axe est un travail d'ingénierie des protéines, impliquées ou non dans la biosynthèse des facteurs de nodulation, et le second axe est un travail de modification de chitinoligosaccharides, avec la mise au point de protocoles de synthèse et de purification et la caractérisation d'un panel de dix précurseurs de lipochitinoligosaccharides. Pour mener à bien ce projet, des techniques pluridisciplinaires ont été utilisées comme la biologie moléculaire, l'expression recombinante de protéines, la caractérisation biochimique d'activités enzymatiques, la synthèse enzymatique, la purification de chitinoligosaccharides et leur caractérisation.

La première étape dans ces travaux est de s'assurer d'un accès facile aux COs, mis au point au travers d'un protocole simple et efficace d'acétylation et de purification par SEC d'un mélange d'oligomères de chitosane commercial. Les très bons rendements obtenus par cette approche ont permis de mener les études biochimiques des enzymes et le remodelage des COs par les différentes enzymes obtenues précédemment.

L'activité chitinolytique de la chitinase C2 (*Oerskovia xanthineolytica*) n'a pas été mise en évidence. Une expression de l'enzyme par voie recombinante permettra d'évaluer l'activité et éventuellement de l'utiliser comme outil pour accéder à un squelette saccharidiques de LCOs, majoritairement constitué de chitintétraose comme c'est le cas chez les facteurs Myc. Une étude cristallographique pourrait permettre de comprendre le mode d'action original de cette chitinase, décrite pour ne produire que du chitintétraose sous contrôle cinétique.

La décoration *in vitro* de COs par carbamoylation catalysée de la CT No10 (*Sinorhizobium fredii* NGR234A) n'a pu être réalisée malgré une très bonne expression de cette enzyme associée à une étiquette histidine chez *E. coli*. Une expression de l'enzyme sans étiquette d'aide à la purification pourrait permettre d'observer une activité *in vitro*. L'utilisation d'une seconde séquence codant pour une carbamoyltransférase est également une perspective envisagée. En cas de succès, la disposition d'une activité *in vitro* permettrait d'envisager la caractérisation biochimique de cette enzyme ainsi que le rôle qu'elle peut jouer dans

l'établissement de la symbiose fixatrice d'azote, au travers de la synthèse de LCOs carbamoylés.

La sulfatation des COs a été réalisée par l'intermédiaire de l'action couplée de deux sulfotransférases, NodH (*Sinorhizobium meliloti*) et l'AST-IV (*Rattus norvegicus*), en s'appuyant sur une méthodologie décrite dans la littérature. Cette approche par régénération du cofacteur PAPS permet de sulfater en O-6 l'extrémité réductrice d'un COs. Les STs ont été exprimées sous forme recombinante. Ces outils sont maintenant à disposition pour tester des analogues de donneur de sulfate. Egalement, l'utilisation d'une séquence optimisée pour l'expression chez *E. coli* de la ST NodH permettrait peut-être d'augmenter le niveau de production de l'enzyme.

La CD VC1280 (*Vibrio cholerae*) a été produite en quantité importante au sein du périplasme de *E. coli*. Elle a ainsi pu être utilisée comme outil de synthèse pour ouvrir un premier accès aux précurseurs de LCOs. La CD NodB (*Sinorhizobium meliloti*) a également été produite sous forme soluble et active chez *E. coli*. C'est la première fois que cette enzyme est produite directement sous cette forme. Des études biochimiques inédites ont montré qu'elle présentait une activité métallo-dépendante et qu'elle nécessitait un milieu réactionnel réducteur afin de conserver son activité une fois purifiée. Des études de cristallogénèse sont en cours, ce qui permettra de mieux comprendre son mode d'action. Lorsqu'elle est exprimée en fusion avec la thiorédoxine, les rendements de production et de purification permettent d'envisager des synthèses de précurseurs de LCOs à grande échelle.

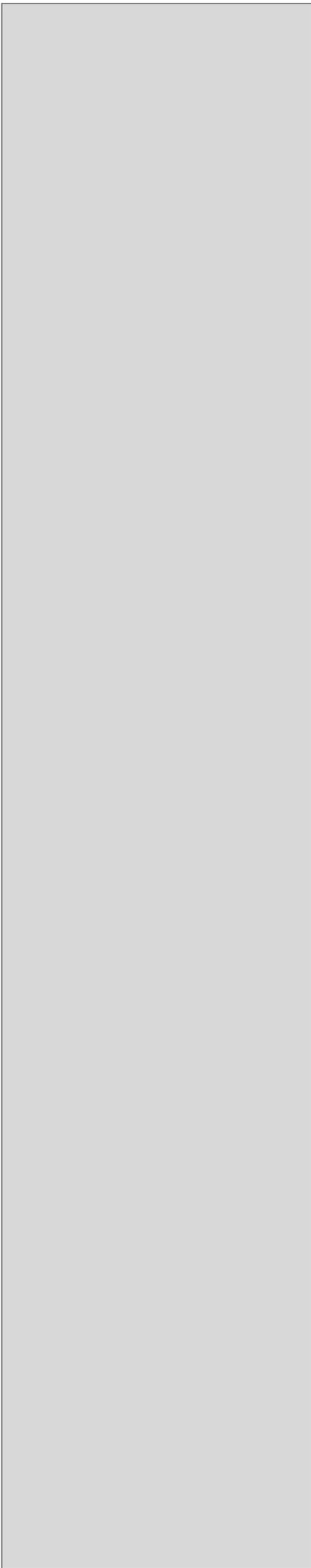
Au travers de l'utilisation de la CD VC1280, deux analogues de précurseurs de LCOs (CO-V(N^{IV}) et CO-IV(N^{III})) ont été synthétisés à l'échelle préparative. Après acylation, ces derniers vont pouvoir subir des tests biologique afin d'évaluer leurs activités potentielles, ce qui fournira de précieuses informations quant au rôle de la position de la chaîne grasse sur le squelette saccharidique. Ces tests pourront être menés avec un partenaire industriel (Bayer CropScience). En couplant cette activité de N-désacétylation avec une β -N-acétylhexosaminidase (*A. oryzae*) commerciale, deux précurseurs de LCOs (CO-V(N^V) et CO-IV(N^{IV})) ont également été isolés, à échelle préparative. La production en grande quantité de la CD VC1280 laisse à penser que ces protocoles de synthèse de précurseurs et d'analogues de précurseurs puissent atteindre l'échelle du gramme de COs-(N), à condition d'avoir à disposition une quantité suffisante de substrat. Enfin, ce protocole a été testé à échelle analytique sur du CO-V(S). En respectant les conditions établies sur les COs non-décorés, le procédé VC1280 paraît transposable sur des COs-(S), pour fournir soit des analogues de

précurseurs de LCOs (CO-V(N^{IV}, S)), soit des précurseurs de LCOs (CO-IV(N^{IV}, S)). Des synthèses à échelle préparative doivent confirmer ces résultats. Le panel de molécules synthétisables par ce procédé inclut potentiellement les COs sulfatés.

Avec la CD NodB, six précurseurs de LCOs ont été obtenus. Les CO-IV(N^{IV}) et CO-V(N^V) ont été synthétisés avec d'excellents rendements en produits isolés. En collaboration avec le partenaire industriel, près d'un gramme de CO-V(N^V) a été obtenu par l'action de la CD NodB, démontrant l'efficacité de cet approche. Par la suite, trois précurseurs de LCOs fonctionnalisés à l'extrémité réductrice ont été synthétisés. Deux l'ont été en combinaison d'une synthèse chimique totale, réalisée par le partenaire de l'université de Paris, le CO-IV(N^{IV}, S) et le CO-V(N^V, MeFuc).

En combinant l'action des sulfotransférases NodH/ AST-IV et de la CD NodB, un précurseur CO-V(N^V, S) a été obtenu en réaction « one pot ». Le cycle de régénération du PAPS, et de sulfatation de COs a été associé avec l'action de la CD NodB, afin d'envisager des synthèses efficaces de précurseurs de LCOs sulfatés, comportant une unique étape de purification du produit final.

Enfin, la CD NodB a été utilisée dans la synthèse d'une sonde photoactivable, destinée à l'identification de nouveaux récepteurs chez les plantes. Des COs modifiés chimio-sélectivement à l'extrémité réductrice peuvent être substrats de la CD NodB, ce qui permet d'envisager des synthèses efficaces de sondes bi-fonctionnelles qui permettront de mieux comprendre les processus biologiques lors de l'établissement des symbioses.

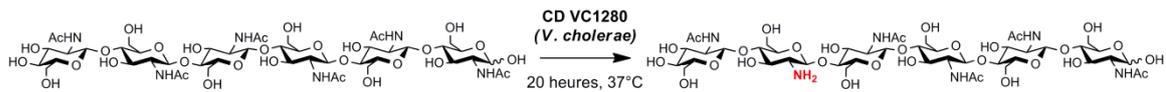


**SYNTHESES DE PRECURSEURS DE
LIPOCHITINOLIGOSACCHARIDES**

I. Préparation de précurseurs de LCOs : procédé VC1280

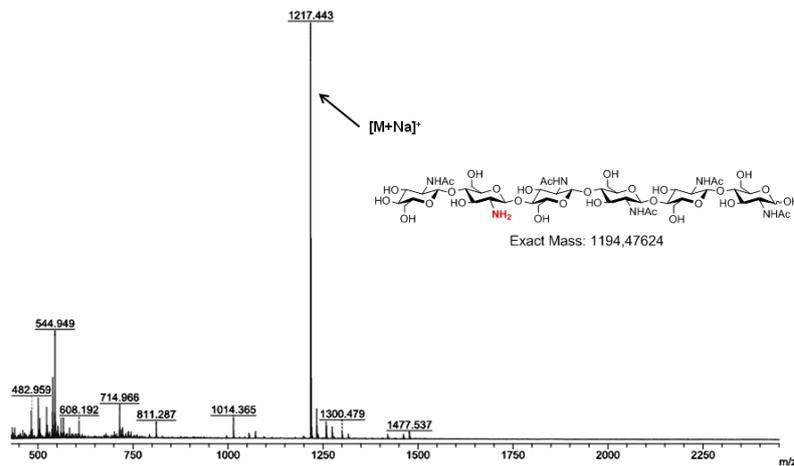
I.1. Synthèse du CO-VI(N^V)

Le CO-VI (5,1 mg, 4,1 μmol) est mis en solution dans 2,5 mL de tampon carbonate d'ammonium 10 mM pH 7,9 en présence de la CD VC1280 (0,5 mg, 0,1 nmol).



Le CO-VI(N^V) est purifié selon le protocole standard (3,9 mg, 79 %). SM MALDI-ToF : $m/z = 1217$ [M+Na]⁺; trouvé $m/z = 1217,443$

(a)



(b)

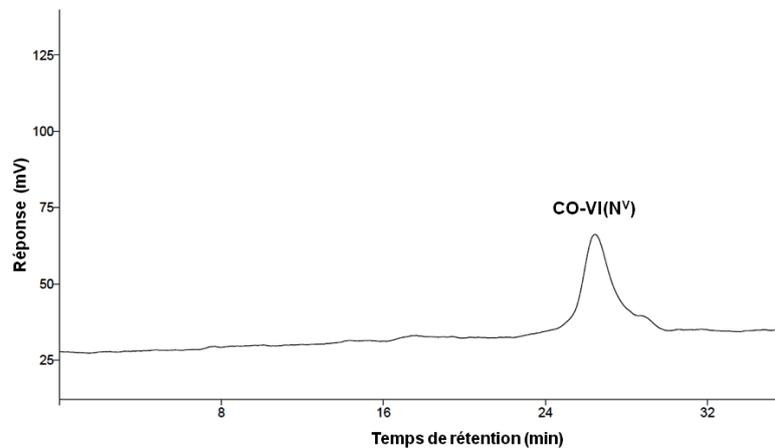
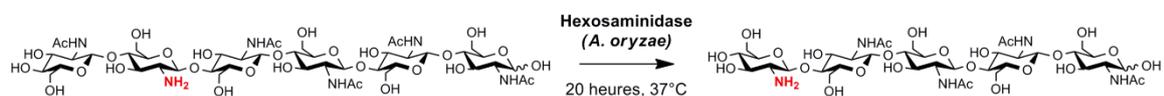


Figure 98. (a) Spectre de masse MALDI-ToF (mode positif) du CO-VI(N^V) ; (b) Chromatogramme HPLC du CO-VI(N^V).

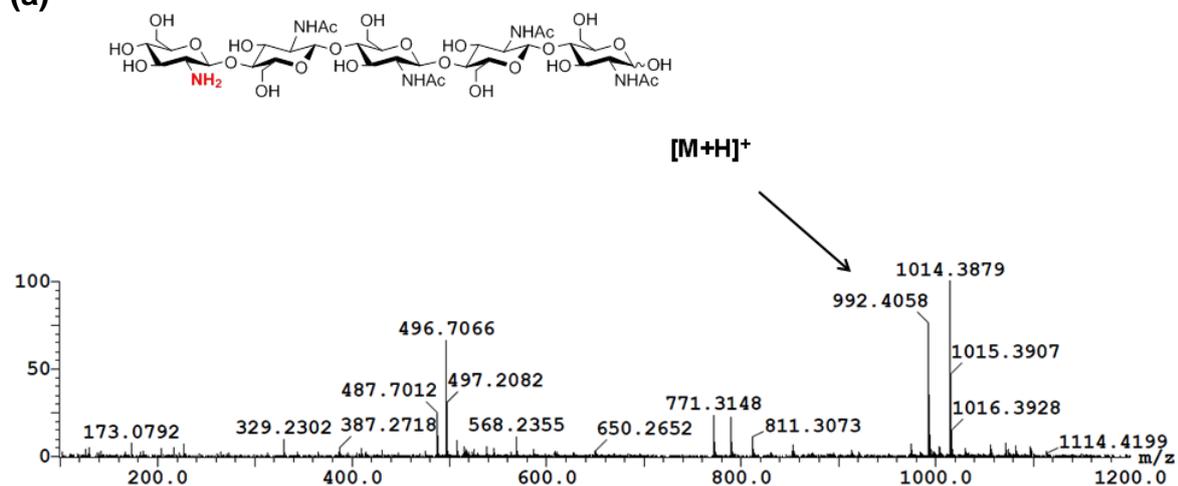
I.2. Synthèse du CO-V(N^V)

Le CO-VI(N^V) (3,9 mg, 3,3 μmol) est ajouté à 400 μL de rétentat de β-galactosidase (*A. oryzae*).



Le CO-V(N^V) est purifié selon le protocole standard (1,4 mg, 43 %). SM MALDI-ToF : $m/z = 992$ [M+H]⁺. HR ESISM calc. pour C₃₈H₆₅N₅O₂₅ [M+H]⁺ $m/z = 992,4047$; trouvé $m/z = 992,4058$.

(a)



(b)

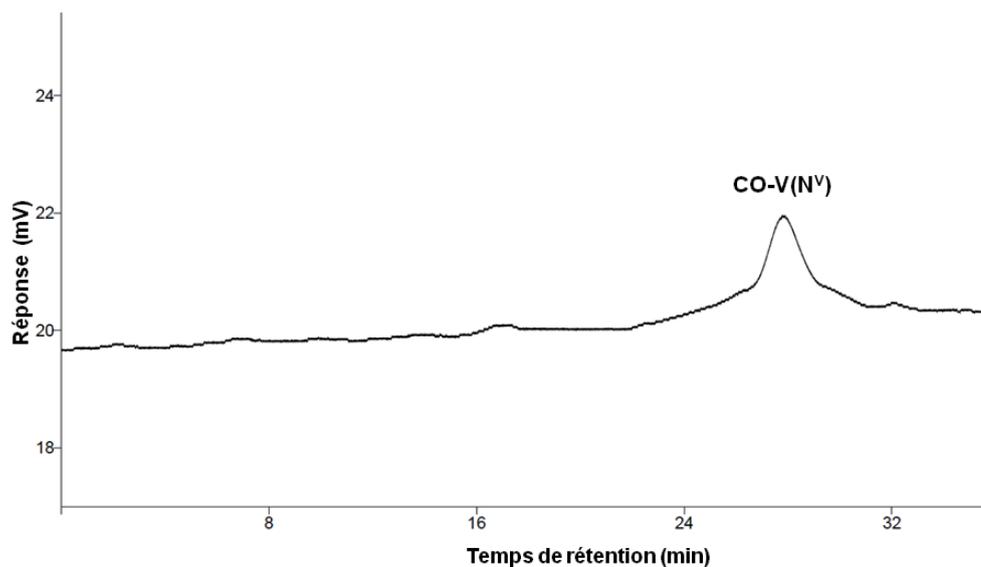
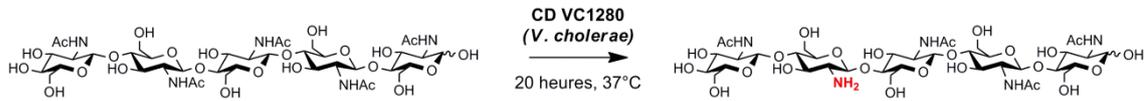


Figure 99. (a) Spectre de masse HRESI Q-ToF (mode positif) du CO-V(N^V) ; (b) Chromatogramme HPLC du CO-V(N^V).

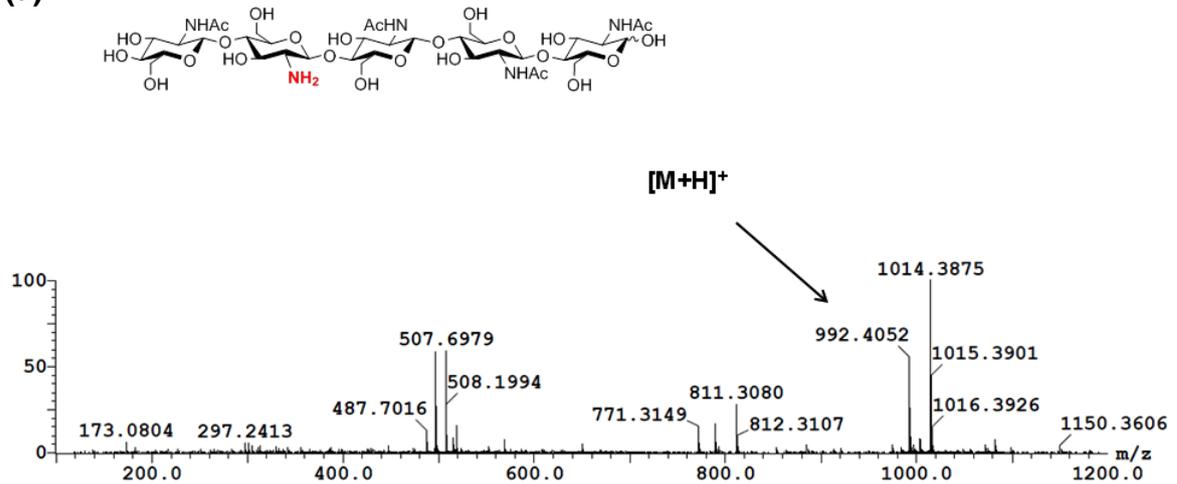
I.3. Synthèse du CO-V(N^{IV})

Le CO-V (19 mg, 19,3 μmol) est mis en solution dans 9,5 mL de tampon carbonate d'ammonium 10 mM pH 7,9 en présence de CD VC1280 (2 mg, 0,42 nmol).



Le CO-V(N^{IV}) est purifié selon le protocole standard (16,6 mg, 91 %). SM MALDI-ToF : $m/z = 992$ [M+H]⁺. HR ESISM calc. pour C₃₈H₆₅N₅O₂₅ [M+H]⁺ $m/z = 992,4047$; trouvé $m/z = 992,4052$.

(a)



(b)

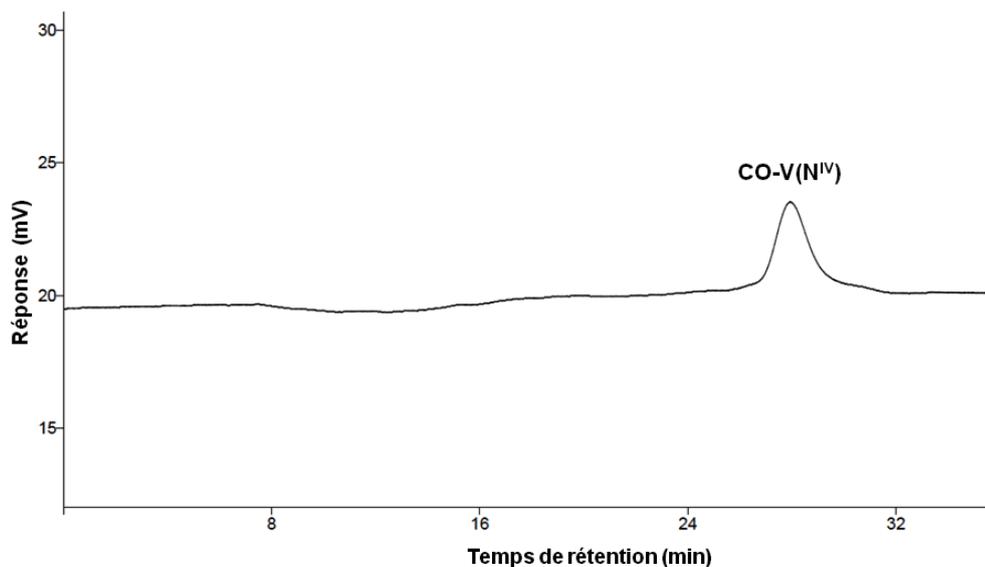
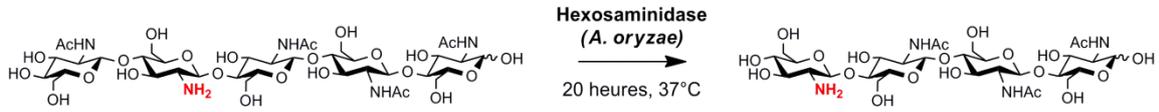


Figure 100. (a) Spectre de masse HRESI Q-ToF (mode positif) du CO-V(N^{IV}) ; (b) Chromatogramme HPLC du CO-V(N^{IV}).

I.4. Synthèse du CO-IV(N^{IV})

Le CO-V(N^{IV}) (4 mg, 4 μmol) est ajouté à 400 μL de rétentat de β-galactosidase (*A. oryzae*).



Le CO-IV(N^{IV}) est purifié selon le protocole standard (2,1 mg, 66 %). SM MALDI-ToF : $m/z = 788$ [M+H]⁺. HR ESISM calc. pour C₃₀H₅₂N₄O₂₀ [M+H]⁺ $m/z = 789,3253$; trouvé $m/z = 789,3250$.

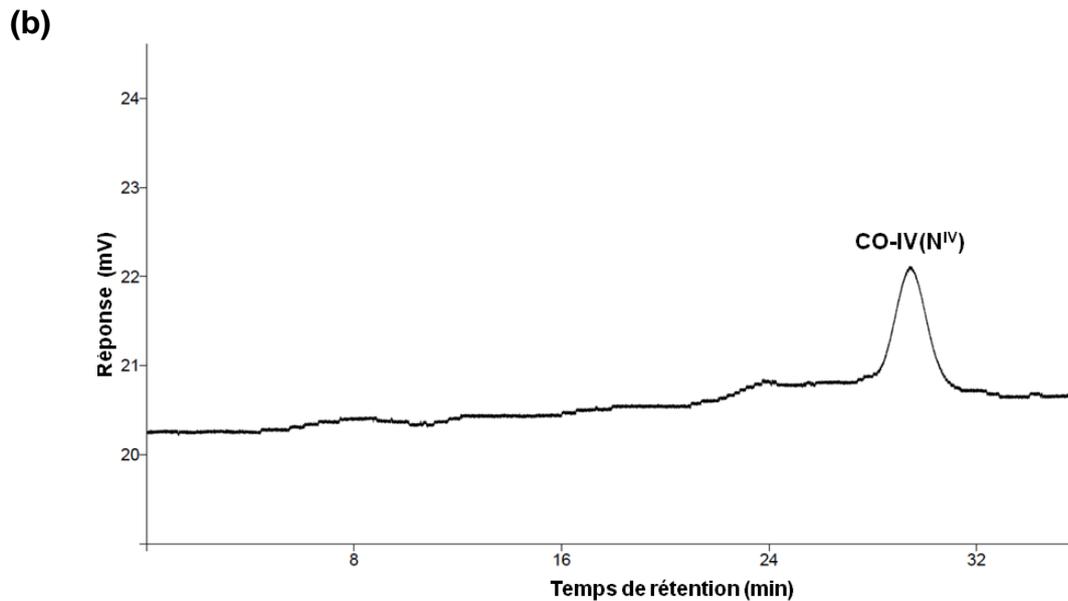
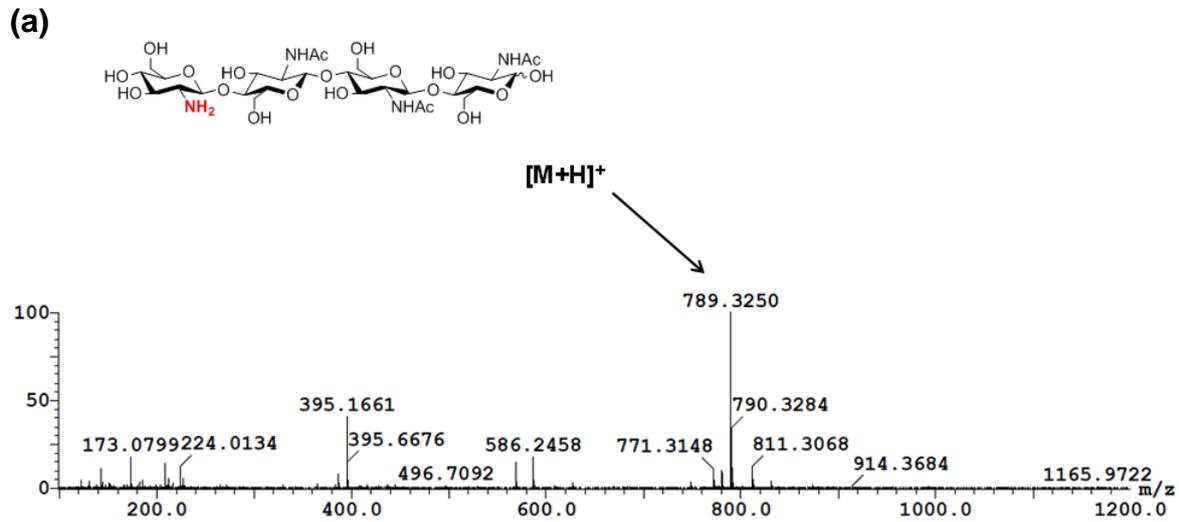
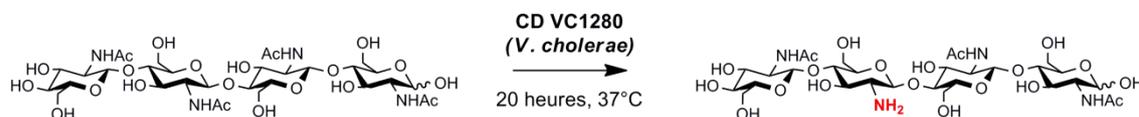


Figure 101. (a) Spectre de masse HRESI Q-ToF (mode positif) du CO-IV(N^{IV}) ; (b) Chromatogramme HPLC du CO-IV(N^{IV}).

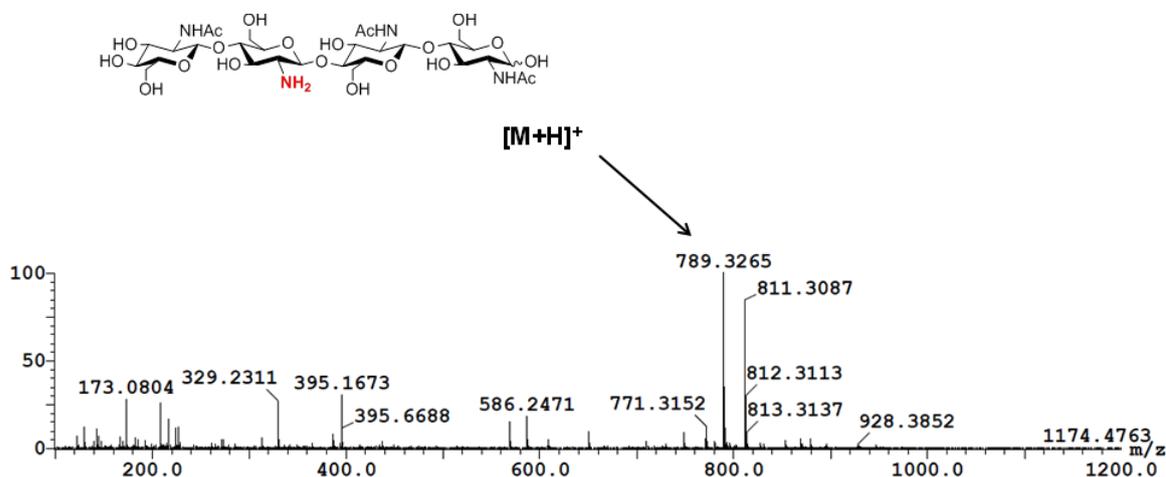
I.5. Synthèse du CO-IV(N^{III})

Le chitintétraose (18,7 mg, 22,5 μmol) est mis en solution dans 9,35 mL de tampon carbonate d'ammonium 10 mM pH 7,9, puis additionné de la CD VC1280 (2 mg, 0,42 nmol).



Le CO-IV(N^{III}) est purifié selon le protocole standard (17,3 mg, 97 %). SM MALDI-ToF : $m/z = 789$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. HR ESISM calc. pour $\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{N}_4\text{O}_{20}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 789,3253$; trouvé $m/z = 789,3265$.

(a)



(b)

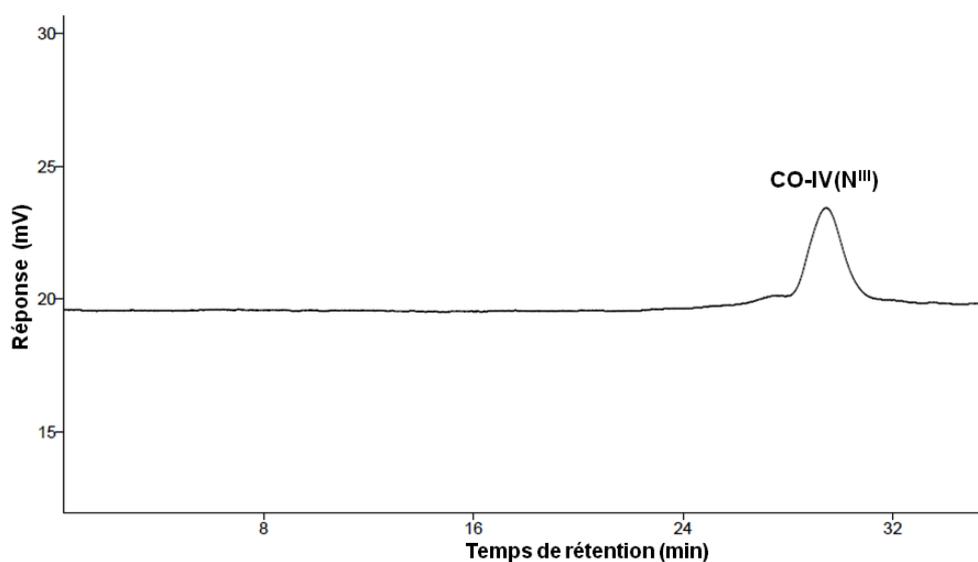
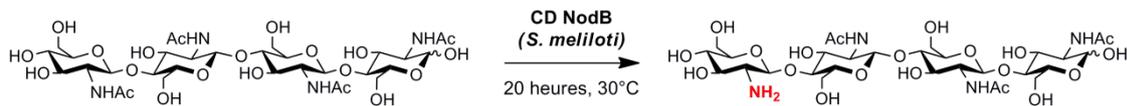


Figure 102. (a) Spectre de masse HRESI Q-ToF (mode positif) du CO-IV(N^{III}) ; (b) Chromatogramme HPLC du CO-IV(N^{III}).

II. Préparation de précurseurs de LCOs : procédé NodB

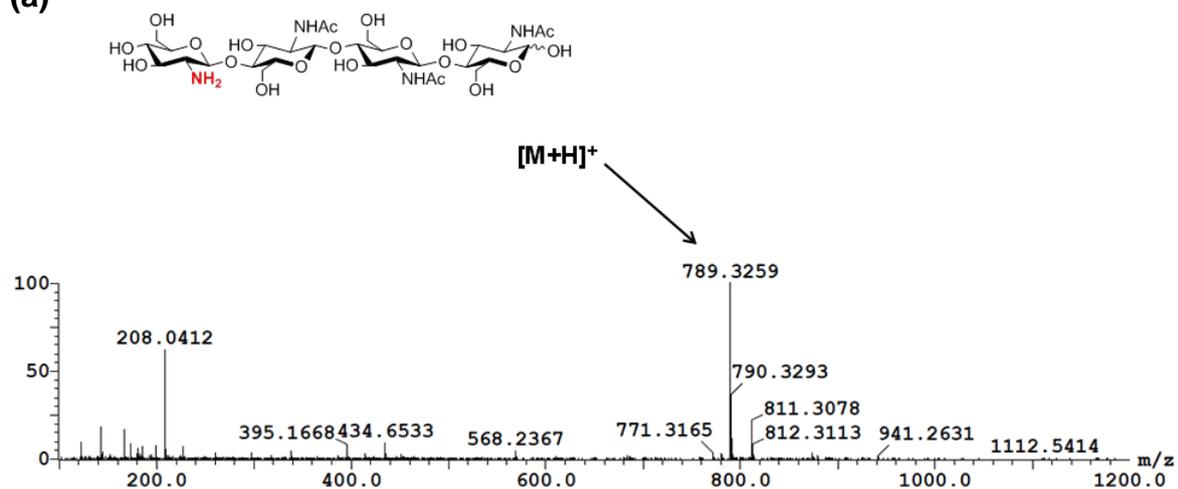
II.1. Synthèse du CO-IV(N^{IV})

Le chitintétraose (15 mg, 18,1 μmol) est mis en réaction dans un volume final de 5 mL de tampon, en présence de l'enzyme NodB-thioredoxine (0,75 mg, 0,18 nmol).



Le CO-IV(N^{IV}) est purifié selon le protocole standard (12 mg, 84 %). SM MALDI-ToF : $m/z = 789$ [M+H]⁺. HR ESISM calc. pour C₃₀H₅₂N₄O₂₀ [M+H]⁺ $m/z = 789,3253$; trouvé $m/z = 789,3259$.

(a)



(b)

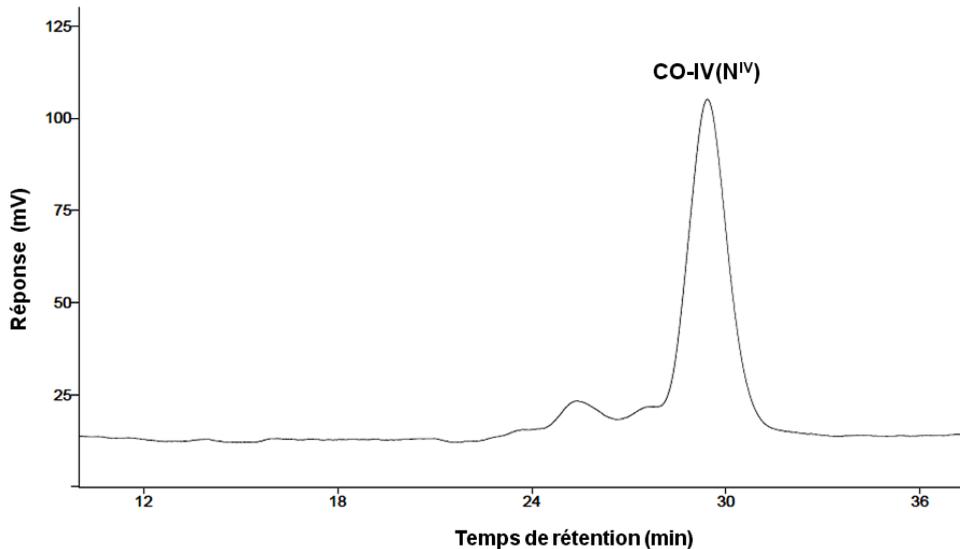
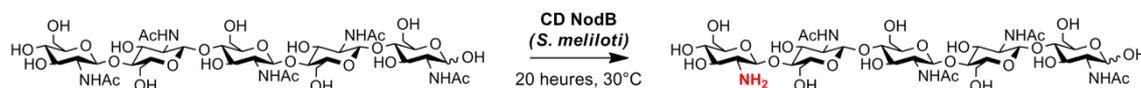


Figure 103. (a) Spectre de masse HRESI Q-ToF (mode positif) du CO-IV(N^{IV}) ; (b) Chromatogramme HPLC du CO-IV(N^{IV}).

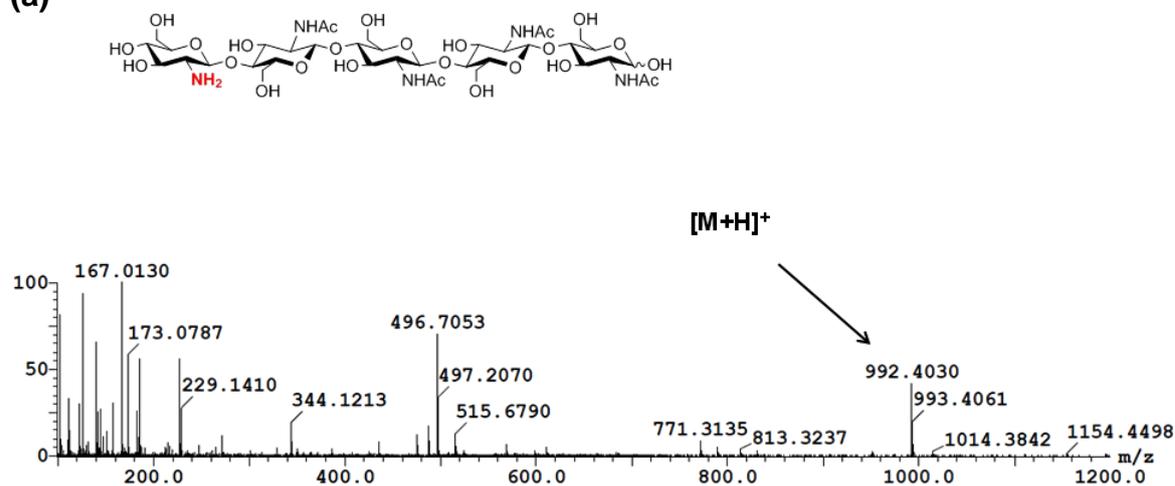
II.2. Synthèse du CO-V(N^V)

Le chitinpentaose (15 mg, 14,5 μ mol) est mis en réaction dans un volume final de 5 mL de tampon, en présence de l'enzyme NodB-thioredoxine (0,75 mg, 0,18 nmol).



Le CO-V(N^V) est purifié selon le protocole standard (13 mg, 90 %). SM MALDI-ToF : m/z = 991 [M+H]⁺. HR ESISM calc. pour C₃₈H₆₅N₅O₂₅ [M+H]⁺ m/z = 992,4047; trouvé m/z = 992,4030.

(a)



(b)

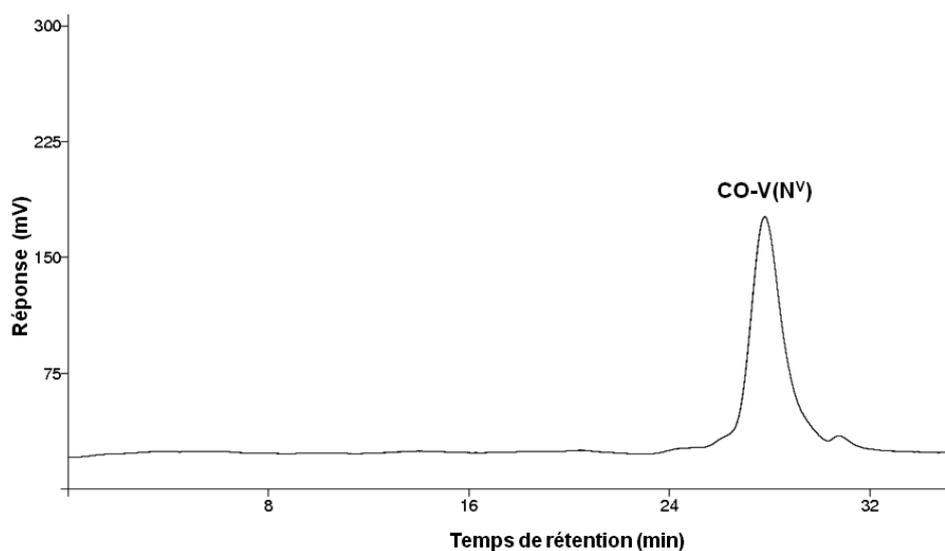
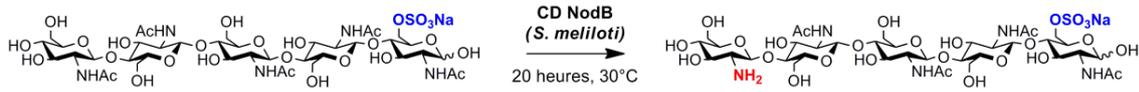


Figure 104. (a) Spectre de masse HRESI Q-ToF (mode positif) du CO-V(N^V) ; (b) Chromatogramme HPLC du CO-V(N^V).

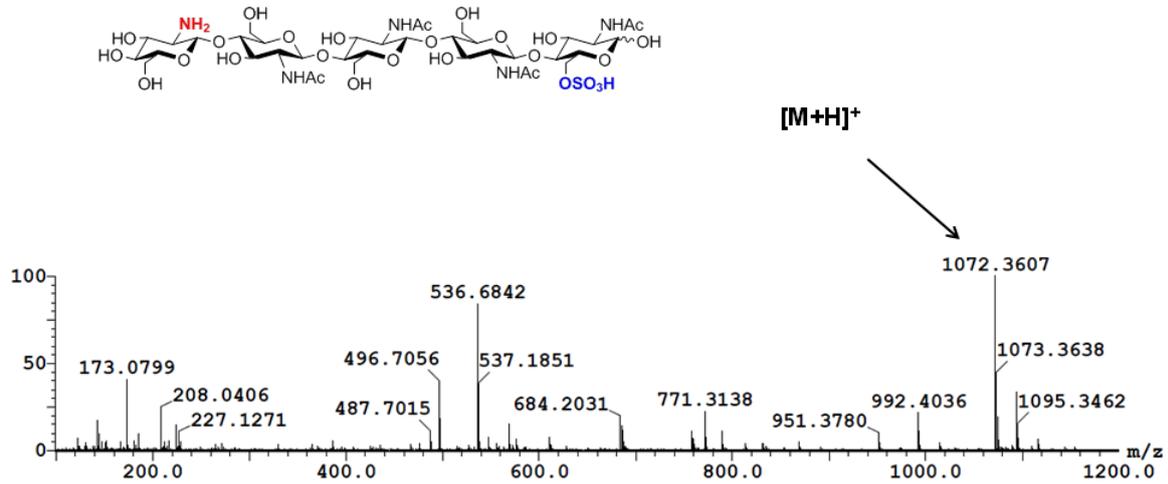
II.3. Synthèse du CO-V(N^V, S)

Le CO-V(S) (12 mg, 10,8 μmol) est mis en réaction dans un volume final de 15 mL de tampon, en présence de l'enzyme NodB-thioredoxine (0,6 mg, 0,14 nmol).



Le CO-V(N^V, S) est purifié selon le protocole standard (7,3 mg, 59 %). SM MALDI-ToF : $m/z = 1072$ $[M+H]^+$. HR ESISM calc. pour C₃₈H₆₄N₅O₂₈S $[M+H]^+$ $m/z = 1072,3615$; trouvé $m/z = 1072,3607$.

(a)



(b)

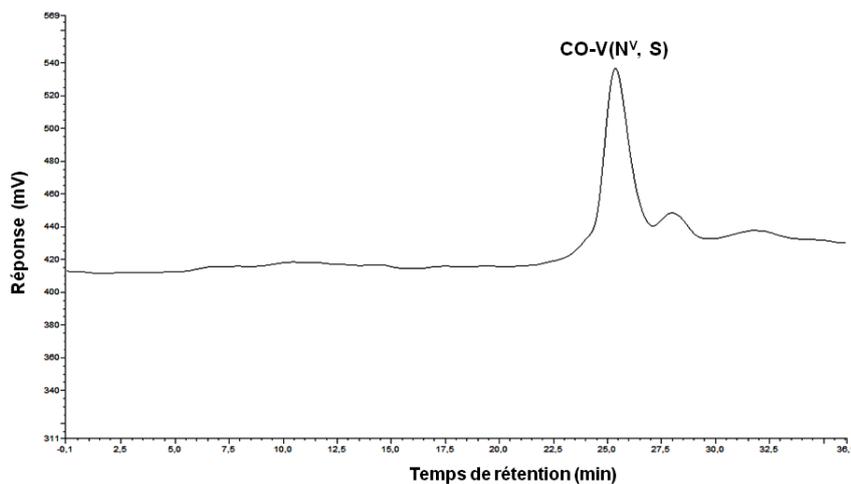
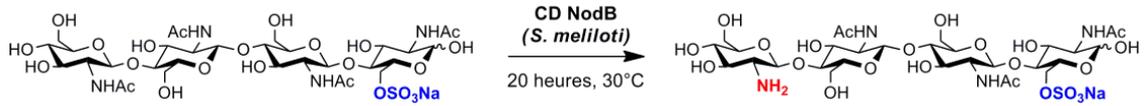


Figure 105. (a) Spectre de masse HRESI Q-ToF (mode positif) du CO-V(N^V, S) ; (b) Chromatogramme HPLC du CO-V(N^V, S).

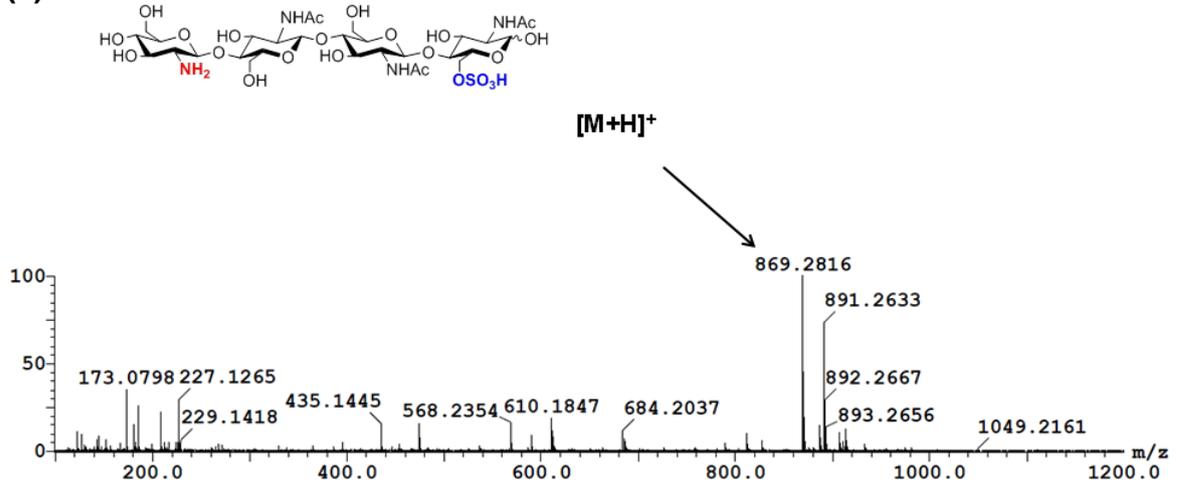
II.4. Synthèse du CO-IV(N^{IV}, S)

Le CO-IV(S) (24,2 mg, 26 μ mol) est mis en réaction dans un volume final de 15 mL de tampon, en présence de l'enzyme NodB-thioredoxine (2 mg, 0,47 nmol).



Le CO-IV(N^{IV}, S) est purifié selon le protocole standard (11,4 mg, 49 %). SM MALDI-ToF : $m/z = 869$ [M+H]⁺. HR ESISM calc. pour C₃₀H₅₁N₄O₂₃S [M+H]⁺ $m/z = 869,2821$; trouvé $m/z = 869,2816$.

(a)



(b)

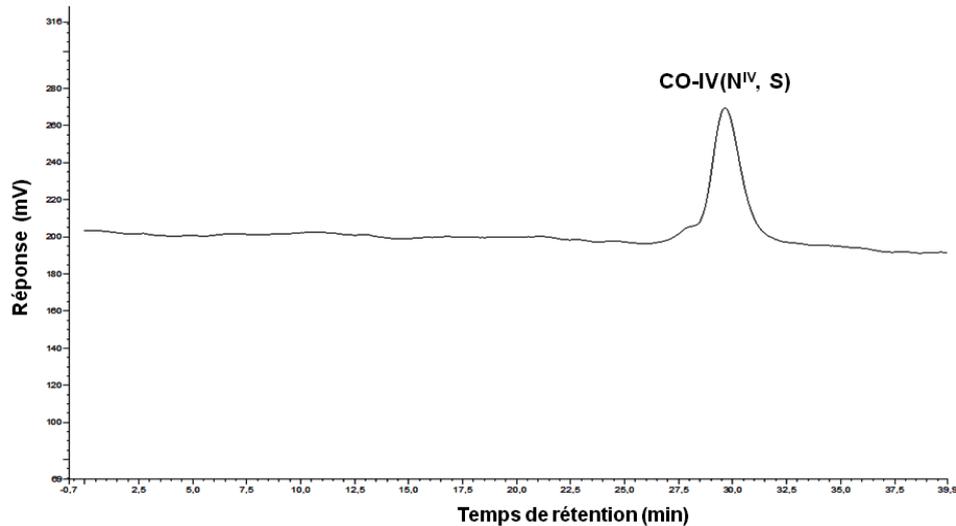
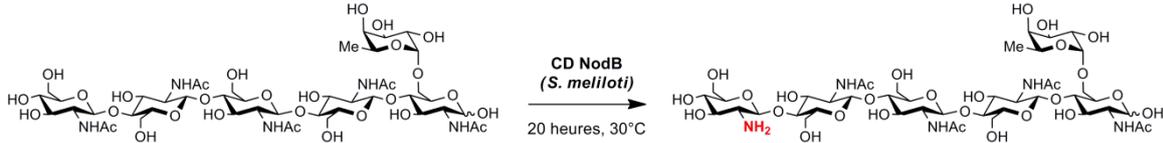


Figure 106. (a) Spectre de masse HRESI Q-ToF (mode négatif) du CO-IV(N^{IV}, S) ; (b) Chromatogramme HPLC du CO-IV(N^{IV}, S).

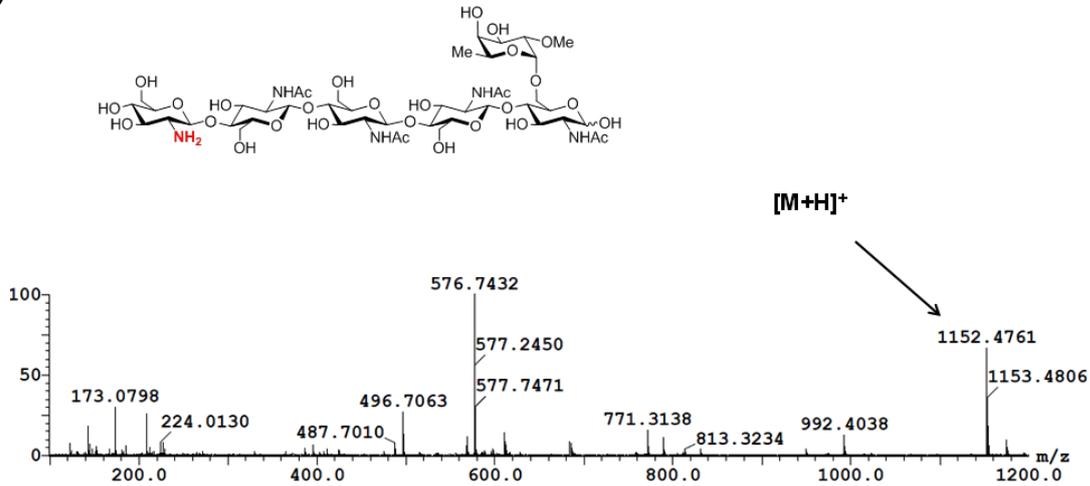
II.5. Synthèse du CO-V(N^V, MeFuc)

Le CO-V(MeFuc) (11,6 mg, 9,7 μmol) est mis en réaction dans un volume final de 10 mL de tampon, en présence de l'enzyme NodB-thioredoxine (1,5 mg, 0,35 nmol).



Le CO-V(N^V, MeFuc) est purifié selon le protocole standard (7 mg, 63 %). SM MALDI-ToF : $m/z = 1152 [M+H]^+$. HR ESISM calc. pour C₄₅H₇₇N₅O₂₉ [M+H]⁺ $m/z = 1152,4783$; trouvé $m/z = 1152,4761$.

(a)



(b)

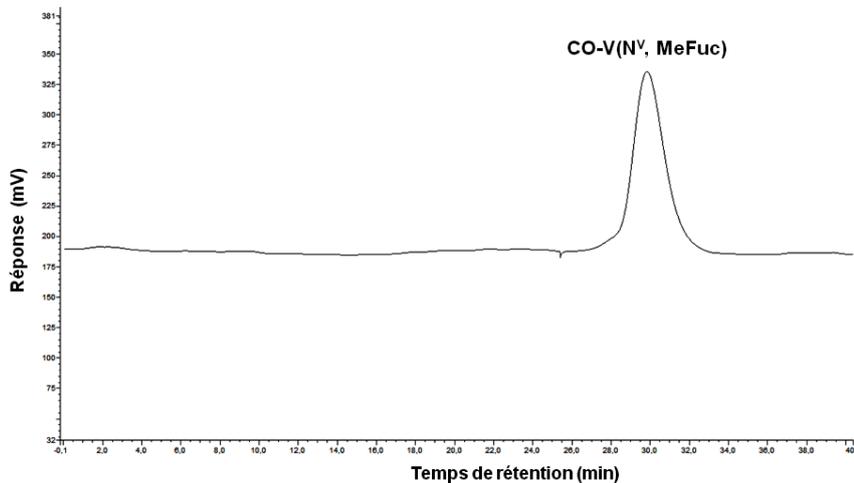
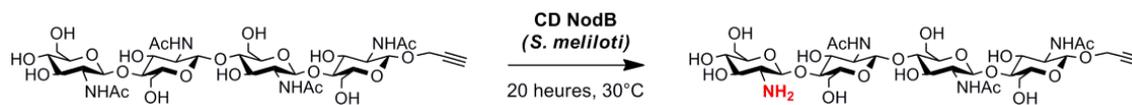


Figure 107. (a) Spectre de masse HRESI Q-ToF (mode positif) du CO-V(N^V, MeFuc) ; (b) Chromatogramme HPLC du CO-V(N^V, MeFuc).

II.6. Synthèse du propargyl CO-IV(N^{IV})

Le chitintétraoside de propargyle²⁰³ (6 mg, 6,9 μmol) est mis en réaction dans un volume final de 1,5 mL de tampon, en présence de l'enzyme NodB-thioredoxine (1 mg, 0,24 nmol).



Le chitintétraoside de propargyle *N*-désacétylé est purifié selon le protocole standard (3,7 mg, 65 %). SM MALDI-ToF : $m/z = 849$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$; trouvé $m/z = 849,292$.

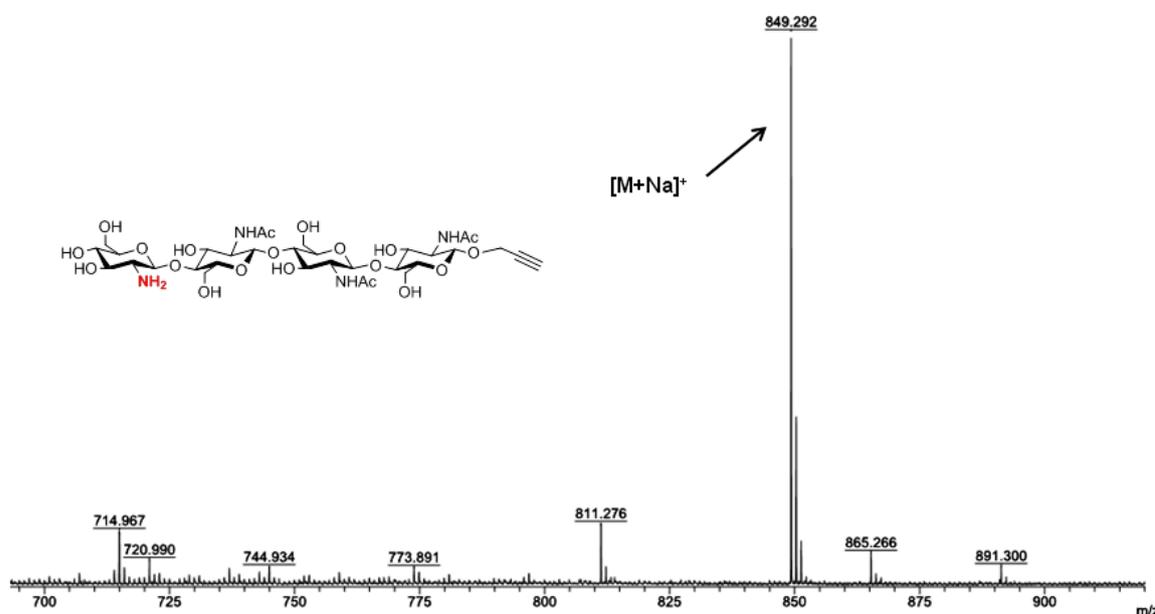


Figure 108. Spectre de masse MALDI-ToF (mode positif) du chitintétraoside de propargyle CO-IV(N^{IV}).

²⁰³ Vauzeilles, B., Dausse, B., Palmier, S. and Beau, J.-M., **2001**, *Tetrahedron Lett.*, 42, (43), 7567-7570.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 Van Vuuren, D. P.; Bouwman, A. F.; Beusen, A. H. W., *Phosphorus demand for the 1970-2100 period: A scenario analysis of resource depletion*. **2010**, *Global Environmental Change - Human And Policy Dimensions*, 20, (3), 428-439.
- 2 Bonfante, P.; Anca, I. A., *Plants, Mycorrhizal Fungi, and Bacteria: A Network of Interactions*. **2009**, *Annual Review of Microbiology*, 63, 363-383.
- 3 Jayaraman, D.; Forshey, K.; Grimsrud, P.; Ané, J. M., *Leveraging proteomics to understand plant-microbe interactions*. **2012**, *Plant Proteomics*, 3, 1-6.
- 4 Garrocho-Villegas, V.; Gopalasubramaniam, S. K.; Arredondo-Peter, R., *Plant hemoglobins: What we know six decades after their discovery*. **2007**, *Gene*, 398, (1-2), 78-85.
- 5 Freiberg, C.; Fellay, R.; Bairoch, A.; Broughton, W. J.; Rosenthal, A.; Perret, X., *Molecular basis of symbiosis between Rhizobium and legumes*. **1997**, *Nature*, 387, (6631), 394-401.
- 6 Oldroyd, G. E. D.; Downie, J. A., *Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes*. **2004**, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5, (7), 566-576.
- 7 Howard, J. B.; Rees, D. C., *Structural basis of biological nitrogen fixation*. **1996**, *Chemical Reviews*, 96, (7), 2965-2982.
- 8 Lerouge, P.; Roche, P.; Faucher, C.; Maillet, F.; Truchet, G.; Prome, J. C.; Dénarié, J., *Symbiotic Host-Specificity of Rhizobium-Meliloti Is Determined by a Sulfated and Acylated Glucosamine Oligosaccharide Signal*. **1990**, *Nature*, 344, (6268), 781-784.
- 9 Goormachtig, S.; Capoen, W.; Holsters, M., *Rhizobium infection: lessons from the versatile nodulation behaviour of water-tolerant legumes*. **2004**, *Trends in Plant Science*, 9, (11), 518-522.
- 10 Oldroyd, G. E. D., *Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants*. **2013**, *Nature Reviews Microbiology*, 11, (4), 252-263.
- 11 Akiyama, K.; Matsuzaki, K.; Hayashi, H., *Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi*. **2005**, *Nature*, 435, (7043), 824-827.
- 12 Maillet, F.; Poinot, V.; Andre, O.; Puech-Pages, V.; Haouy, A.; Gueunier, M.; Cromer, L.; Giraudet, D.; Formey, D.; Niebel, A.; Martinez, E. A.; Driguez, H.; Bécard, G.; Dénarié, J., *Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza*. **2011**, *Nature*, 469, (7328), 58-63.
- 13 Genre, A.; Chabaud, M.; Timmers, T.; Bonfante, P.; Barker, D. G., *Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in Medicago truncatula root epidermal cells before infection*. **2005**, *Plant Cell*, 17, (12), 3489-3499.
- 14 Pampolina, N. M.; Dell, B.; Malajczuk, N., *Dynamics of ectomycorrhizal fungi in an Eucalyptus globulus plantation: effect of phosphorus fertilization*. **2002**, *Forest Ecology and Management*, 158, (1-3), 291-304.
- 15 Young, N. D.; Debelle, F.; Oldroyd, G. E. D.; Geurts, R.; Cannon, S. B.; Udvardi, M. K.; Benedito, V. A.; Mayer, K. F. X.; Gouzy, J.; Schoof, H.; Van de Peer, Y.; Proost, S.; Cook, D. R.; Meyers, B. C.; Spannagl, M.; Cheung, F.; De Mita, S.; Krishnakumar, V.; Gundlach,

- H.; Zhou, S. G.; Mudge, J.; Bharti, A. K.; Murray, J. D.; Naoumkina, M. A.; Rosen, B.; Silverstein, K. A. T.; Tang, H. B.; Rombauts, S.; Zhao, P. X.; Zhou, P.; Barbe, V.; Bardou, P.; Bechner, M.; Bellec, A.; Berger, A.; Berges, H.; Bidwell, S.; Bisseling, T.; Choisne, N.; Couloux, A.; Denny, R.; Deshpande, S.; Dai, X. B.; Doyle, J. J.; Dudez, A. M.; Farmer, A. D.; Fouteau, S.; Franken, C.; Gibelin, C.; Gish, J.; Goldstein, S.; Gonzalez, A. J.; Green, P. J.; Hallab, A.; Hartog, M.; Hua, A.; Humphray, S. J.; Jeong, D. H.; Jing, Y.; Jocker, A.; Kenton, S. M.; Kim, D. J.; Klee, K.; Lai, H. S.; Lang, C. T.; Lin, S. P.; Macmil, S. L.; Magdelenat, G.; Matthews, L.; McCorrison, J.; Monaghan, E. L.; Mun, J. H.; Najar, F. Z.; Nicholson, C.; Noirot, C.; O'Bleness, M.; Paule, C. R.; Poulain, J.; Prion, F.; Qin, B. F.; Qu, C. M.; Retzel, E. F.; Riddle, C.; Sallet, E.; Samain, S.; Samson, N.; Sanders, I.; Saurat, O.; Scarpelli, C.; Schiex, T.; Segurens, B.; Severin, A. J.; Sherrier, D. J.; Shi, R. H.; Sims, S.; Singer, S. R.; Sinharoy, S.; Sterck, L.; Viollet, A.; Wang, B. B.; Wang, K. Q.; Wang, M. Y.; Wang, X. H.; Warfsmann, J.; Weissenbach, J.; White, D. D.; White, J. D.; Wiley, G. B.; Wincker, P.; Xing, Y. B.; Yang, L. M.; Yao, Z. Y.; Ying, F.; Zhai, J. X.; Zhou, L. P.; Zuber, A.; Denarie, J.; Dixon, R. A.; May, G. D.; Schwartz, D. C.; Rogers, J.; Quetier, F.; Town, C. D.; Roe, B. A., *The Medicago genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses*. **2011**, *Nature*, 480, (7378), 520-524.
- 16 Galibert, F.; Finan, T. M.; Long, S. R.; Puhler, A.; Abola, P.; Ampe, F.; Barloy-Hubler, F.; Barnett, M. J.; Becker, A.; Boistard, P.; Bothe, G.; Boutry, M.; Bowser, L.; Buhrmester, J.; Cadieu, E.; Capela, D.; Chain, P.; Cowie, A.; Davis, R. W.; Dreano, S.; Federspiel, N. A.; Fisher, R. F.; Gloux, S.; Godrie, T.; Goffeau, A.; Golding, B.; Gouzy, J.; Gurjal, M.; Hernandez-Lucas, I.; Hong, A.; Huizar, L.; Hyman, R. W.; Jones, T.; Kahn, D.; Kahn, M. L.; Kalman, S.; Keating, D. H.; Kiss, E.; Komp, C.; Lalaure, V.; Masuy, D.; Palm, C.; Peck, M. C.; Pohl, T. M.; Portetelle, D.; Purnelle, B.; Ramsperger, U.; Surzycki, R.; Thebault, P.; Vandenbol, M.; Vorholter, F. J.; Weidner, S.; Wells, D. H.; Wong, K.; Yeh, K. C.; Batut, J., *The composite genome of the legume symbiont Sinorhizobium meliloti*. **2001**, *Science*, 293, (5530), 668-672.
- 17 Oldroyd, G. E. D.; Downie, J. M., *Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes*. **2008**, *Annual Review of Plant Biology*, 59, 519-546.
- 18 Radutoiu, S.; Madsen, L. H.; Madsen, E. B.; Felle, H. H.; Umehara, Y.; Gronlund, M.; Sato, S.; Nakamura, Y.; Tabata, S.; Sandal, N.; Stougaard, J., *Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases*. **2003**, *Nature*, 425, (6958), 585-592.
- 19 Gough, C.; Cullimore, J., *Lipo-chitooligosaccharide Signaling in Endosymbiotic Plant-Microbe Interactions*. **2011**, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24, (8), 867-878.
- 20 Parniske, M., *Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses*. **2008**, *Nature Reviews Microbiology*, 6, (10), 763-775.
- 21 Broghammer, A.; Krusell, L.; Blaise, M.; Sauer, J.; Sullivan, J. T.; Maolanon, N.; Vinther, M.; Lorentzen, A.; Madsen, E. B.; Jensen, K. J.; Roepstorff, P.; Thirup, S.; Ronson, C. W.; Thygesen, M. B.; Stougaard, J., *Legume receptors perceive the rhizobial lipochitin oligosaccharide signal molecules by direct binding*. **2012**, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, (34), 13859-13864.
- 22 Boller, T.; Felix, G., *A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors*. **2009**, *Annual Review of Plant Biology*, 60, 379-406.
- 23 Genre, A.; Chabaud, M.; Balzergue, C.; Puech-Pages, V.; Novero, M.; Rey, T.; Fournier,

- J.; Rochange, S.; Becard, G.; Bonfante, P.; Barker, D. G., *Short-chain chitin oligomers from arbuscular mycorrhizal fungi trigger nuclear Ca²⁺ spiking in Medicago truncatula roots and their production is enhanced by strigolactone*. **2013**, *New Phytologist*, 198, (1), 179-189.
- 24 D'Haese, W.; Holsters, M., *Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development*. **2002**, *Glycobiology*, 12, (6), 79R-105R.
- 25 Dénarié, J.; Debelle, F.; Promé, J. C., *Rhizobium lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: Signaling molecules mediating recognition and morphogenesis*. **1996**, *Annual Review of Biochemistry*, 65, 503-535.
- 26 Geremia, R. A.; Mergaert, P.; Geelen, D.; Vanmontagu, M.; Holsters, M., *The NodC Protein of Azorhizobium-Caulinodans Is an N-Acetylglucosaminyltransferase*. **1994**, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, (7), 2669-2673.
- 27 John, M.; Rohrig, H.; Schmidt, J.; Wieneke, U.; Schell, J., *Rhizobium NodB Protein Involved in Nodulation Signal Synthesis Is a Chitooligosaccharide Deacetylase*. **1993**, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, (2), 625-629.
- 28 Rohrig, H.; Schmidt, J.; Wieneke, U.; Kondorosi, E.; Barlier, I.; Schell, J.; John, M., *Biosynthesis of Lipooligosaccharide Nodulation Factors - Rhizobium-Noda Protein Is Involved in N-Acylation of the Chitooligosaccharide Backbone*. **1994**, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, (8), 3122-3126.
- 29 Perret, X.; Staehelin, C.; Broughton, W. J., *Molecular basis of symbiotic promiscuity*. **2000**, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, (1), 180-201.
- 30 Beatty, P. H.; Good, A. G., *Future Prospects for Cereals That Fix Nitrogen*. **2011**, *Science*, 333, (6041), 416-417.
- 31 Graham, P. H.; Vance, C. P., *Legumes: Importance and constraints to greater use*. **2003**, *Plant Physiology*, 131, (3), 872-877.
- 32 Oldroyd, G. E. D.; Dixon, R., *Biotechnological solutions to the nitrogen problem*. **2014**, *Current Opinion in Biotechnology*, 26, 19-24.
- 33 Liang, Y.; Cao, Y. R.; Tanaka, K.; Thibivilliers, S.; Wan, J. R.; Choi, J.; Kang, C. H.; Qiu, J.; Stacey, G., *Nonlegumes Respond to Rhizobial Nod Factors by Suppressing the Innate Immune Response*. **2013**, *Science*, 341, (6152), 1384-1387.
- 34 Nicolaou, K. C.; Bockovich, N. J.; Carcanague, D. R.; Hummel, C. W.; Even, L. F., *Total Synthesis of the Nodrm-Iv Factors, the Rhizobium Nodulation Signals*. **1992**, *Journal of the American Chemical Society*, 114, (22), 8701-8702.
- 35 Wang, L. X.; Li, C.; Wang, Q. W.; Hui, Y. Z., *Total Synthesis of the Sulfated Lipooligosaccharide Signal Involved in Rhizobium-Meliloti Alfalfa Symbiosis*. **1993**, *Tetrahedron Letters*, 34, (48), 7763-7766.
- 36 Tailler, D.; Jacquinet, J. C.; Beau, J. M., *Total Synthesis of Nodrm(Iv) (S) - a Sulfated Lipotetrasaccharide Symbiotic Signal from Rhizobium-Meliloti*. **1994**, *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications*, (16), 1827-1828.

- 37 Ikeshita, S.; Nakahara, Y.; Ogawa, T., *Synthesis of Lipooligosaccharide Nodulation Signals Nodbj-V(Rco, Mefuc) and Nodbj-Iv(Rco, Mefuc) of Bradyrhizobium-Japonicum*. **1994**, *Glycoconjugate Journal*, 11, (3), 257-261.
- 38 Debenham, J. S.; Rodebaugh, R.; FraserReid, B., *Nodulation factors: A strategy for convergent assembly of a late-stage key intermediate illustrated by the total synthesis of NodRf-III (C18:1) (MeFuc)*. **1996**, *Journal of Organic Chemistry*, 61, (19), 6478-6479.
- 39 Gillard, L.; Stevenin, A.; Schmitz-Afonso, I.; Vauzeilles, B.; Boyer, F. D.; Beau, J. M., *Synthesis of the Fungal Lipo-Chitooligosaccharide Myc-IV (C16:0, S), Symbiotic Signal of Arbuscular Mycorrhiza*. **2013**, *European Journal of Organic Chemistry*, 2013, (32), 7382-7390.
- 40 Schultze, M.; Quicletsire, B.; Kondorosi, E.; Virelizier, H.; Glushka, J. N.; Endre, G.; Gero, S. D.; Kondorosi, A., *Rhizobium-Meliloti Produces a Family of Sulfated Lipooligosaccharides Exhibiting Different Degrees of Plant Host Specificity*. **1992**, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, (1), 192-196.
- 41 Samain, E.; Drouillard, S.; Heyraud, A.; Driguez, H.; Geremia, R. A., *Gram-scale synthesis of recombinant chitooligosaccharides in Escherichia coli*. **1997**, *Carbohydrate Research*, 302, (1-2), 35-42.
- 42 Schultze, M.; Staehelin, C.; Rohrig, H.; John, M.; Schmidt, J.; Kondorosi, E.; Schell, J.; Kondorosi, A., *In-Vitro Sulfotransferase Activity of Rhizobium-Meliloti Nodh Protein - Lipochitooligosaccharide Nodulation Signals Are Sulfated after Synthesis of the Core Structure*. **1995**, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, (7), 2706-2709.
- 43 Geremia, R. A.; Samain, E.; Ernst, B.; Hart, G. W.; Sinaý, P., *Production of Heterologous Oligosaccharides by Recombinant Bacteria (Recombinant Oligosaccharides)*. In *Carbohydrates in Chemistry and Biology*, Wiley-VCH Verlag GmbH: **2008**; pp 845-860.
- 44 Rasmussen, M. O.; Hogg, B.; Bono, J. J.; Samain, E.; Driguez, H., *New access to lipochitooligosaccharide nodulation factors*. **2004**, *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2, (13), 1908-1910.
- 45 Bec-Ferté, M.-P.; Krishnan, H. B.; Savagnac, A.; Pueppke, S. G.; Promé, J. C., *Rhizobium fredii synthesizes an array of lipooligosaccharides, including a novel compound with glucose inserted into the backbone of the molecule*. **1996**, *FEBS Letters*, 393, (2-3), 273-279.
- 46 Robina, I.; Gomez-Bujedo, S.; Fernandez-Bolanos, J. G.; Fuentes, J.; Spaink, H. P., *Synthesis and biological evaluation of oligosaccharides related to the molecule signals in plant defence and the Rhizobium-legume symbiosis*. **2002**, *Tetrahedron*, 58, (3), 521-530.
- 47 Claisse, N. *Préparation et modification d'oligosaccharides de cellulose par chimie douce bio-inspirée*. Fort, S., Université Joseph Fourier, Grenoble, **2012**.
- 48 Shibuya, N.; Minami, E., *Oligosaccharide signalling for defence responses in plant*.

- 2001**, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 59, (5), 223-233.
- 49 Grenouillat, N.; Vauzeilles, B.; Bono, J. J.; Samain, E.; Beau, J. M., *Simple synthesis of nodulation-factor analogues exhibiting high affinity towards a specific binding protein. 2004*, *Angewandte Chemie-International Edition*, 43, (35), 4644-4646.
- 50 Fliegmann, J.; Canova, S.; Lachaud, C.; Uhlenbroich, S.; Gascioli, V.; Pichereaux, C.; Rossignol, M.; Rosenberg, C.; Cumener, M.; Pitorre, D.; Lefebvre, B.; Gough, C.; Samain, E.; Fort, S.; Driguez, H.; Vauzeilles, B.; Beau, J. M.; Nurisso, A.; Imberty, A.; Cullimore, J.; Bono, J. J., *Lipo-chitooligosaccharidic Symbiotic Signals Are Recognized by LysM Receptor-Like Kinase LYR3 in the Legume Medicago truncatula. 2013*, *Acs Chemical Biology*, 8, (9), 1900-1906.
- 51 Beau, J. M.; Denarie, J.; Greiner, A.; Grenouillat, N.; Maillet, F.; Vauzeilles, B. *Synthetic compounds useful as nodulation agents of leguminous plants and preparation processes thereof*. CT/EP Patent Appl. No. PCT/EP2004/014909, **2004** ; WO Patent Appl. No. WO2005/063784, **2005**.
- 52 Beau, J. M., *Lipo-Chitooligosaccharidic Nodulation Factors: Synthesis and Agricultural Perspectives. 2011*, *Chimia*, 65, (1-2), 45-48.
- 53 Wang, L. X.; Lee, Y. C., *Stereoselective synthesis of N-acetyl thiochitooligosaccharides. Different behaviours of methyl N-acetyl-alpha- and -beta-thiochitobiosides during acetolysis. 1996*, *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1*, (6), 581-591.
- 54 Southwick, A. M.; Wang, L. X.; Long, S. R.; Lee, Y. C., *Activity of Sinorhizobium meliloti NodAB and NodH enzymes on thiochitooligosaccharides. 2002*, *Journal of Bacteriology*, 184, (14), 4039-4043.
- 55 Studier, F. W.; Moffatt, B. A., *Use of Bacteriophage-T7 Rna-Polymerase to Direct Selective High-Level Expression of Cloned Genes. 1986*, *Journal of Molecular Biology*, 189, (1), 113-130.
- 56 Bertani, G., *Studies On Lysogenesis I.: The Mode of Phage Liberation by Lysogenic Escherichia coli. 1951*, *Journal of Bacteriology*, 62, (3), 293-300.
- 57 Graslund, S.; Nordlund, P.; Weigelt, J.; Bray, J.; Hallberg, B. M.; Gileadi, O.; Knapp, S.; Oppermann, U.; Arrowsmith, C.; Hui, R.; Ming, J.; Dhe-Paganon, S.; Park, H. W.; Savchenko, A.; Yee, A.; Edwards, A.; Vincentelli, R.; Cambillau, C.; Kim, R.; Kim, S. H.; Rao, Z.; Shi, Y.; Terwilliger, T. C.; Kim, C. Y.; Hung, L. W.; Waldo, G. S.; Peleg, Y.; Albeck, S.; Unger, T.; Dym, O.; Prilusky, J.; Sussman, J. L.; Stevens, R. C.; Lesley, S. A.; Wilson, I. A.; Joachimiak, A.; Collart, F.; Dementieva, I.; Donnelly, M. I.; Eschenfeldt, W. H.; Kim, Y.; Stols, L.; Wu, R.; Zhou, M.; Burley, S. K.; Emtage, J. S.; Sauder, J. M.; Thompson, D.; Bain, K.; Luz, J.; Gheyi, T.; Zhang, F.; Atwell, S.; Almo, S. C.; Bonanno, J. B.; Fiser, A.; Swaminathan, S.; Studier, F. W.; Chance, M. R.; Sali, A.; Acton, T. B.; Xiao, R.; Zhao, L.; Ma, L. C.; Hunt, J. F.; Tong, L.; Cunningham, K.; Inouye, M.; Anderson, S.; Janjua, H.; Shastry, R.; Ho, C. K.; Wang, D. Y.; Wang, H.; Jiang, M.; Montelione, G. T.; Stuart, D. I.; Owens, R. J.; Daenke, S.; Schutz, A.; Heinemann, U.; Yokoyama, S.; Bussow, K.; Gunsalus, K. C., *Protein production and purification. 2008*, *Nature Methods*, 5, (2), 135-146.
- 58 Tartof, K. D.; Hobbs, C. A., *Improved Media for Growing Plasmid and Cosmid Clones*. In Bethesda Res. Lab. Focus: **1987**.

- 59 Studier, F. W., *Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures*. **2005**, *Protein Expression and Purification*, 41, (1), 207-234.
- 60 Bradford, M. M., *Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding*. **1976**, *Analytical Biochemistry*, 72, (1-2), 248-254.
- 61 Tsuji, A.; Kinoshita, T.; Hoshino, M., *Analytical chemical studies on amino sugars. II. Determination of hexosamines using 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone hydrochloride*. **1969**, *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 17, (7), 1505-10.
- 62 Murthy, N. K. S.; Bleakley, B. H., *Simplified Method of Preparing Colloidal Chitin Used for Screening of Chitinase-Producing Microorganisms*. **2012**, *The Internet Journal of Microbiology*, 10, (2).
- 63 Walkley, J. M.; Tillman, J., *A simple-thinlayer chromatographic technique for the separation of mono and oligosaccharides*. **1977**, *Journal of Chromatography*, (132), 172-174.
- 64 Souza, C. P.; Almeida, B. C.; Colwell, R. R.; Rivera, I. N. G., *The Importance of Chitin in the Marine Environment*. **2011**, *Marine Biotechnology*, 13, (5), 823-830.
- 65 Aranaz, I.; Mengibar, M.; Harris, R.; Panos, I.; Miralles, B.; Acosta, N.; Galed, G.; Heras, A., *Functional Characterization of Chitin and Chitosan*. **2009**, *Current Chemical Biology*, 3, (2), 203-230.
- 66 Kaur, S.; Dhillon, G. S., *The versatile biopolymer chitosan: potential sources, evaluation of extraction methods and applications*. **2014**, *Critical Reviews in Microbiology*, 40, (2), 155-175.
- 67 Rinaudo, M., *Chitin and chitosan: Properties and applications*. **2006**, *Progress in Polymer Science*, 31, (7), 603-632.
- 68 Lodhi, G.; Kim, Y. S.; Hwang, J. W.; Kim, S. K.; Jeon, Y. J.; Je, J. Y.; Ahn, C. B.; Moon, S. H.; Jeon, B. T.; Park, P. J., *Chitooligosaccharide and Its Derivatives: Preparation and Biological Applications*. **2014**, *Biomed Research International*, 13.
- 69 Trombotto, S.; Ladaviere, C.; Delolme, F.; Domard, A., *Chemical preparation and structural characterization of a homogeneous series of chitin/chitosan oligomers*. **2008**, *Biomacromolecules*, 9, (7), 1731-1738.
- 70 Lombard, V.; Ramulu, H. G.; Drula, E.; Coutinho, P. M.; Henrissat, B., *The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013*. **2013**, *Nucleic Acids Research*, 42, (D1), D490-D495.
- 71 van Aalten, D. M. F.; Komander, D.; Synstad, B.; Gaseidnes, S.; Peter, M. G.; Eijsink, V. G. H., *Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exo-chitinase*. **2001**, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, (16), 8979-8984.
- 72 Vaaje-Kolstad, G.; Horn, S. J.; Sorlie, M.; Eijsink, V. G. H., *The chitinolytic machinery of *Serratiamarcescens* - a model system for enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides*. **2013**, *FEBS Journal*, 280, (13), 3028-3049.

- 73 Hoell, I. A.; Vaaje-Kolstad, G.; Eijsink, V. G. H., *Structure and function of enzymes acting on chitin and chitosan*. **2010**, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 27, 331-366.
- 74 Cheng, C. Y.; Li, Y. K., *An Aspergillus chitosanase with potential for large-scale preparation of chitosan oligosaccharides*. **2000**, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 32, 197-203.
- 75 Jeon, Y. J.; Kim, S. K., *Production of chitooligosaccharides using an ultrafiltration membrane reactor and their antibacterial activity*. **2000**, *Carbohydrate Polymers*, 41, (2), 133-141.
- 76 Kim, S. K.; Rajapakse, N., *Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review*. **2005**, *Carbohydrate Polymers*, 62, (4), 357-368.
- 77 Yang, Y.; Yu, B., *Recent advances in the synthesis of chitooligosaccharides and congeners*. **2014**, *Tetrahedron*, 70, (5), 1023-1046.
- 78 Barroca-Aubry, N.; Pernet-Poil-Chevrier, A.; Domard, A.; Trombotto, S., *Towards a modular synthesis of well-defined chitooligosaccharides: synthesis of the four chitodisaccharides*. **2010**, *Carbohydrate Research*, 345, (12), 1685-1697.
- 79 Aly, M. R. E.; Ibrahim, E. S. I.; El Ashry, E. S. H.; Schmidt, R. R., *Synthesis of chitotetraose and chitohexaose based on dimethylmaleoyl protection*. **2001**, *Carbohydrate Research*, 331, (2), 129-142.
- 80 Zhao, G. H.; Guan, W. Y.; Cai, L.; Wang, P. G., *Enzymatic route to preparative-scale synthesis of UDP-GlcNAc/GalNAc, their analogues and GDP-fucose*. **2010**, *Nature Protocols*, 5, (4), 636-646.
- 81 Zakariassen, H.; Hansen, M. C.; Joranli, M.; Eijsink, V. G. H.; Sorlie, M., *Mutational Effects on Transglycosylating Activity of Family 18 Chitinases and Construction of a Hypertransglycosylating Mutant*. **2011**, *Biochemistry*, 50, (25), 5693-5703.
- 82 Kohri, M.; Kobayashi, A.; Shoda, S.-i., *Design and Utilization of Chitinases with Low Hydrolytic Activities*. **2007**, *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 19, (107), 165-180.
- 83 Martinez, E. A.; Boer, H.; Koivula, A.; Samain, E.; Driguez, H.; Armand, S.; Cottaz, S., *Engineering chitinases for the synthesis of chitin oligosaccharides: Catalytic amino acid mutations convert the GH-18 family glycoside hydrolases into transglycosylases*. **2012**, *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 74, (1-2), 89-96.
- 84 Staehelin, C.; Granado, J.; Müller, J.; Wiemken, A.; Mellor, R. B.; Felix, G.; Regenass, M.; Broughton, W. J.; Boller, T., *Perception of Rhizobium nodulation factors by tomato cells and inactivation by root chitinases*. **1994**, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, (6), 2196-2200.
- 85 Tian, Y.; Liu, W.; Cai, J.; Zhang, L. Y.; Wong, K. B.; Feddermann, N.; Boller, T.; Xie, Z. P.; Staehelin, C., *The Nodulation Factor Hydrolase of Medicago truncatula: Characterization of an Enzyme Specifically Cleaving Rhizobial Nodulation Signals*. **2013**, *Plant Physiology*, 163, (3), 1179-1190.
- 86 Nakabayashi, M.; Nishijima, T.; Ehara, G.; Nikaidou, N.; Nishihashi, H.; Watanabe, T.,

- Structure of the gene encoding laminaripentaose-producing beta-1,3-glucanase (LPHase) of Streptomyces matensis DIC-108.* **1998**, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 85, (5), 459-464.
- 87 Liu, C. L.; Shen, C. R.; Hsu, F. F.; Chen, J. K.; Wu, P. T.; Guo, S. H.; Lee, W. C.; Yu, F. W.; Mackey, Z. B.; Turk, J.; Gross, M. L., *Isolation and Identification of Two Novel SDS-Resistant Secreted Chitinases from Aeromonas schubertii.* **2009**, *Biotechnology Progress*, 25, (1), 124-131.
- 88 Liu, C. L.; Lin, T. H.; Juang, R. S., *Optimization of recombinant hexaoligochitin-producing chitinase production with response surface methodology.* **2013**, *International Journal of Biological Macromolecules*, 62, 518-522.
- 89 Waghmare, S. R.; Ghosh, J. S., *Study of thermostable chitinases from Oerskovia xanthineolytica NCIM 2839.* **2010**, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86, (6), 1849-1856.
- 90 Iseli, B.; Armand, S.; Boller, T.; Neuhaus, J. M.; Henrissat, B., *Plant chitinases use two different hydrolytic mechanisms.* **1996**, *FEBS Letters*, 382, (1-2), 186-188.
- 91 Stackebrandt, E.; Seiler, H.; Schleifer, K. H., *Union of the genera Cellulomonas Bergey et al. and Oerskovia Prauser et al. in a redefined genus Cellulomonas.* **1982**, *Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene: I. Abt. Originale C: Allgemeine, angewandte und ökologische Mikrobiologie*, 3, (3), 401-409.
- 92 Schumann, P.; Weiss, N.; Stackebrandt, E., *Reclassification of Cellulomonas cellulans (Stackebrandt and Keddie 1986) as Cellulosimicrobium cellulans gen. nov., comb. nov.* **2001**, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 1007-1010.
- 93 Morris, S. M., *Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism.* **2002**, *Annual Review of Nutrition*, 22, 87-105.
- 94 D'Haese, W.; Van Montagu, M.; Prome, J. C.; Holsters, M., *Carbamoylation of azorhizobial nod factors is mediated by NodU.* **1999**, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12, (1), 68-73.
- 95 Jabbouri, S.; Relic, B.; Hanin, M.; Kamalaprija, P.; Burger, U.; Prome, D.; Prome, J. C.; Broughton, W. J., *nolO and noel (HsnIII) of Rhizobium sp. NGR234 are involved in 3-O-carbamoylation and 2-O-methylation of Nod factors.* **1998**, *Journal of Biological Chemistry*, 273, (20), 12047-12055.
- 96 Thoden, J. B.; Holden, H. M.; Wesenberg, G.; Raushel, F. M.; Rayment, I., *Structure of carbamoyl phosphate synthetase: A journey of 96 angstrom from substrate to product.* **1997**, *Biochemistry*, 36, (21), 6305-6316.
- 97 Wang, Q.; Xia, J. R.; Guallar, V.; Krilov, G.; Kantrowitz, E. R., *Mechanism of thermal decomposition of carbamoyl phosphate and its stabilization by aspartate and ornithine transcarbamoylases.* **2008**, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, (44), 16918-16923.
- 98 Huang, X. Y.; Holden, H. M.; Raushel, F. M., *Channeling of substrates and intermediates in enzyme-catalyzed reactions.* **2001**, *Annual Review of Biochemistry*, 70, 149-180.

- 99 Lipscomb, W. N.; Kantrowitz, E. R., *Structure and Mechanisms of Escherichia coli Aspartate Transcarbamoylase*. **2012**, *Accounts of Chemical Research*, 45, (3), 444-453.
- 100 Cockrell, G. M.; Zheng, Y. N.; Guo, W. Y.; Peterson, A. W.; Truong, J. K.; Kantrowitz, E. R., *New Paradigm for Allosteric Regulation of Escherichia coli Aspartate Transcarbamoylase*. **2013**, *Biochemistry*, 52, (45), 8036-8047.
- 101 Ha, Y.; McCann, M. T.; Tuchman, M.; Allewell, N. M., *Substrate-induced conformational change in a trimeric ornithine transcarbamoylase*. **1997**, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, (18), 9550-9555.
- 102 Kruse, O.; Hankamer, B., *Microalgal hydrogen production*. **2010**, *Current Opinion in Biotechnology*, 21, (3), 238-243.
- 103 Reissmann, S.; Hochleitner, E.; Wang, H. F.; Paschos, A.; Lottspeich, F.; Glass, R. S.; Bock, A., *Taming of a poison: Biosynthesis of the NiFe-hydrogenase cyanide ligands*. **2003**, *Science*, 299, (5609), 1067-1070.
- 104 Petkun, S.; Shi, R.; Li, Y. G.; Asinas, A.; Munger, C.; Zhang, L. H.; Waclawek, M.; Soboh, B.; Sawers, R. G.; Cygler, M., *Structure of Hydrogenase Maturation Protein HypF with Reaction Intermediates Shows Two Active Sites*. **2011**, *Structure*, 19, (12), 1773-1783.
- 105 Tominaga, T.; Watanabe, S.; Matsumi, R.; Atomi, H.; Imanaka, T.; Miki, K., *Structure of the [NiFe]-hydrogenase maturation protein HypF from Thermococcus kodakarensis KOD1*. **2012**, *Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications*, 68, 1153-1157.
- 106 Shomura, Y.; Higuchi, Y., *Structural Basis for the Reaction Mechanism of S-Carbamoylation of HypE by HypF in the Maturation of [NiFe]-Hydrogenases*. **2012**, *Journal of Biological Chemistry*, 287, (34), 28409-28419.
- 107 Coque, J. J. R.; Perezllarena, F. J.; Enguita, F. J.; Fuente, J. L.; Martin, J. F.; Liras, P., *Characterization of the Cmch Genes of Nocardia Lactamdurans and Streptomyces-Clavuligerus Encoding a Functional 3'-Hydroxymethylcephem O-Carbamoyltransferase for Cephamycin Biosynthesis*. **1995**, *Gene*, 162, (1), 21-27.
- 108 Meyers, C. L. F.; Oberthur, M.; Xu, H.; Heide, L.; Kahne, D.; Walsh, C. T., *Characterization of NovP and NovN: Completion of novobiocin biosynthesis by sequential tailoring of the noviosyl ring*. **2004**, *Angewandte Chemie-International Edition*, 43, (1), 67-70.
- 109 Kharel, M. K.; Basnet, D. B.; Lee, H. C.; Liou, K.; Woo, J. S.; Kim, B. G.; Sohng, J. K., *Isolation and characterization of the tobramycin biosynthetic gene cluster from Streptomyces tenebrarius*. **2004**, *Fems Microbiology Letters*, 230, (2), 185-190.
- 110 Jabbouri, S.; Fellay, R.; Talmont, F.; Kamalaprija, P.; Burger, U.; Relic, B.; Prome, J. C.; Broughton, W. J., *Involvement of Nods in N-Methylation and Nodu in 6-O-Carbamoylation of Rhizobium Sp Ngr234 Nod Factors*. **1995**, *Journal of Biological Chemistry*, 270, (39), 22968-22973.
- 111 Kellmann, R.; Mihali, T. K.; Neilan, B. A., *Identification of a Saxitoxin Biosynthesis Gene with a History of Frequent Horizontal Gene Transfers (vol 67, pg 526, 2008)*. **2009**, *Journal of Molecular Evolution*, 68, (3), 292-292.

- 112 Parthier, C.; Gorlich, S.; Jaenecke, F.; Breithaupt, C.; Brauer, U.; Fandrich, U.; Clausnitzer, D.; Wehmeier, U. F.; Bottcher, C.; Scheel, D.; Stubbs, M. T., *The O-Carbamoyltransferase TobZ Catalyzes an Ancient Enzymatic Reaction*. **2012**, *Angewandte Chemie-International Edition*, 51, (17), 4046-4052.
- 113 Larkin, M. A.; Blackshields, G.; Brown, N. P.; Chenna, R.; McGettigan, P. A.; McWilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, I. M.; Wilm, A.; Lopez, R.; Thompson, J. D.; Gibson, T. J.; Higgins, D. G., *Clustal W and clustal X version 2.0*. **2007**, *Bioinformatics*, 23, (21), 2947-2948.
- 114 Garcia, I. G.; Meyers, C. L. F.; Walsh, C. T.; Lawson, D. M., *Crystallization and preliminary X-ray analysis of the O-carbamoyltransferase NovN from the novobiocin-biosynthetic cluster of Streptomyces spheroides*. **2008**, *Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications*, 64, 1000-1002.
- 115 Bellocco, E.; Di Salvo, C.; Lagana, G.; Leuzzi, U.; Tellone, E.; Kotyk, A.; Galtieri, A., *Purification and properties of ornithine carbamoyltransferase from loggerhead turtle liver*. **2002**, *Physiological Research*, 51, (2), 151-158.
- 116 Bellocco, E.; Lagana, G.; Barreca, D.; Ficarra, S.; Tellone, E.; Magazu, S.; Branca, C.; Kotyk, A.; Galtieri, A.; Leuzzi, U., *Role of polyols in thermal inactivation of shark ornithine transcarbamoylase*. **2005**, *Physiological Research*, 54, (4), 395-402.
- 117 Chapman, E.; Best, M. D.; Hanson, S. R.; Wong, C. H., *Sulfotransferases: Structure, mechanism, biological activity, inhibition, and synthetic utility*. **2004**, *Angewandte Chemie-International Edition*, 43, (27), 3526-3548.
- 118 Hanson, S. R.; Best, M. D.; Wong, C. H., *Sulfatases: Structure, mechanism, biological activity, inhibition, and synthetic utility*. **2004**, *Angewandte Chemie-International Edition*, 43, (43), 5736-5763.
- 119 Negishi, M.; Pedersen, L. G.; Petrotchenko, E.; Shevtsov, S.; Gorokhov, A.; Kakuta, Y.; Pedersen, L. C., *Structure and Function of Sulfotransferases*. **2001**, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 390, (2), 149-157.
- 120 Ehrhardt, D. W.; Atkinson, E. M.; Faull, K. F.; Freedberg, D. I.; Sutherlin, D. P.; Armstrong, R.; Long, S. R., *In-Vitro Sulfotransferase Activity of Nodh, a Nodulation Protein of Rhizobium-Meliloti Required for Host-Specific Nodulation*. **1995**, *Journal of Bacteriology*, 177, (21), 6237-6245.
- 121 Hanin, M.; Jabbouri, S.; Quesada-Vincens, D.; Freiberg, C.; Perret, X.; Prome, J. C.; Broughton, W. J.; Fellay, R., *Sulphation of Rhizobium sp. NGR234 Nod factors is dependent on noeE, a new host-specificity gene*. **1997**, *Molecular Microbiology*, 24, (6), 1119-1129.
- 122 Roche, P.; Debelle, F.; Maillet, F.; Lerouge, P.; Faucher, C.; Truchet, G.; Denarie, J.; Prome, J. C., *Molecular-Basis of Symbiotic Host Specificity in Rhizobium-Meliloti - Nodh and Nodpq Genes Encode the Sulfation of Lipo-Oligosaccharide Signals*. **1991**, *Cell*, 67, (6), 1131-1143.
- 123 Quesada-Vincens, D.; Hanin, M.; Broughton, W. J.; Jabbouri, S., *In vitro sulfotransferase activity of NoeE, a nodulation protein of Rhizobium sp. NGR234*. **1998**, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11, (7), 592-600.

- 124 Burkart, M. D.; Izumi, M.; Chapman, E.; Lin, C. H.; Wong, C. H., *Regeneration of PAPS for the enzymatic synthesis of sulfated oligosaccharides*. **2000**, *Journal of Organic Chemistry*, 65, (18), 5565-5574.
- 125 Klaassen, C. D.; Boles, J. W., *Sulfation and sulfotransferases .5. The importance of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) in the regulation of sulfation*. **1997**, *FASEB Journal*, 11, (6), 404-418.
- 126 Baddiley, J.; Buchanan, J. G.; Letters, R.; Sanderson, A. R., *Synthesis of "active sulphate"(adenosine 3'-phosphate 5'-sulphatophosphate)*. **1959**, *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, (0), 1731-1734.
- 127 Cherniak, R.; Davidson, E. A., *Synthesis of Adenylyl Sulfate and Adenylyl Sulfate 3'-Phosphate*. **1964**, *Journal of Biological Chemistry*, 239, (9), 2986-2990.
- 128 Horwitz, J. P.; Neenan, J. P.; Misra, R. S.; Rozhin, J.; Huo, A.; Philips, K. D., *Studies on Bovine Adrenal Estrogen Sulfotransferase-iii Facile Synthesis of 3'-Phosphoadenosine and 2'-Phosphoadenosine 5'-Phosphosulfate*. **1977**, *Biochimica Et Biophysica Acta*, 480, (2), 376-381.
- 129 Sekura, R. D.; William, B. J., *Adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate*. **1981**, *Methods in Enzymology*, 77, 413-415.
- 130 Mukai, J. I., *An in-One-Bottle Enzymic Preparation of 3'-Phosphoadenosine 5'-Phosphosulfate*. **1989**, *Agricultural and Biological Chemistry*, 53, (3), 883-884.
- 131 Satishchandran, C.; Markham, G. D., *Adenosine-5'-Phosphosulfate Kinase from Escherichia-Coli-K12 - Purification, Characterization, and Identification of a Phosphorylated Enzyme Intermediate*. **1989**, *Journal of Biological Chemistry*, 264, (25), 15012-15021.
- 132 Hiram Prasantha Fernando, P.; Karakawa, A.; Sakakibara, Y.; Ibuki, H.; Nakajima, H.; Liu, M.-C.; Suiko, M., *Preparation of 3'-Phosphoadenosine 5'-Phospho35S-sulfate Using ATP Sulfurylase and APS Kinase from Bacillus stearothermophilus: Enzymatic Synthesis and Purification*. **1993**, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 57, (11), 1974-1975.
- 133 Armstrong, J. I.; Portley, A. R.; Chang, Y. T.; Nierengarten, D. M.; Cook, B. N.; Bowman, K. G.; Bishop, A.; Gray, N. S.; Shokat, K. M.; Schultz, P. G.; Bertozzi, C. R., *Discovery of carbohydrate sulfotransferase inhibitors from a kinase-directed library*. **2000**, *Angewandte Chemie-International Edition*, 39, (7), 1303-+.
- 134 Pi, N.; Armstrong, J. I.; Bertozzi, C. R.; Leary, J. A., *Kinetic analysis of NodST sulfotransferase using an electrospray ionization mass spectrometry assay*. **2002**, *Biochemistry*, 41, (44), 13283-13288.
- 135 Schwedock, J. S.; Liu, C. X.; Leyh, T. S.; Long, S. R., *Rhizobium-Meliloti NodP and NodQ Form a Multifunctional Sulfate-Activating Complex Requiring GTP for Activity*. **1994**, *Journal of Bacteriology*, 176, (22), 7055-7064.
- 136 Lin, C. H.; Shen, G. J.; Garciajunceda, E.; Wong, C. H., *Enzymatic-Synthesis and Regeneration of 3'-Phosphoadenosine 5'-Phosphosulfate (Paps) for Regioselective Sulfation of Oligosaccharides*. **1995**, *Journal of the American Chemical Society*, 117,

- (30), 8031-8032.
- 137 Burkart, M. D.; Izumi, M.; Wong, C. H., *Enzymatic regeneration of 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate using aryl sulfotransferase for the preparative enzymatic synthesis of sulfated carbohydrates*. **1999**, *Angewandte Chemie-International Edition*, 38, (18), 2747-2750.
- 138 Burkart, M. D.; Wong, C. H., *A continuous assay for the spectrophotometric analysis of sulfotransferases using aryl sulfotransferase IV*. **1999**, *Analytical Biochemistry*, 274, (1), 131-137.
- 139 Ozawa, S.; Nagata, K.; Gong, D. W.; Yamazoe, Y.; Kato, R., *Nucleotide-Sequence of a Full-Length Cdna (Pst-1) for Aryl Sulfotransferase from Rat-Liver*. **1990**, *Nucleic Acids Research*, 18, (13), 4001-4001.
- 140 Chen, X.; Yang, Y. S.; Zheng, Y. Q.; Martin, B. M.; Duffel, M. W.; Jakoby, W. B., *Tyrosine-Ester Sulfotransferase from Rat-Liver - Bacterial Expression and Identification*. **1992**, *Protein Expression and Purification*, 3, (5), 421-426.
- 141 Purchartova, K.; Engels, L.; Marhol, P.; Sulc, M.; Kuzma, M.; Slamova, K.; Elling, L.; Kren, V., *Enzymatic preparation of silybin phase II metabolites: sulfation using aryl sulfotransferase from rat liver*. **2013**, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, (24), 10391-10398.
- 142 Yang, Y. S.; Marshall, A. D.; McPhie, P.; Guo, W. X. A.; Xie, X. F.; Chen, X.; Jakoby, W. B., *Two phenol sulfotransferase species from one cDNA: Nature of the differences*. **1996**, *Protein Expression and Purification*, 8, (4), 423-429.
- 143 Bourdineaud, J. P.; Bono, J. J.; Ranjeva, R.; Cullimore, J. V., *Enzymatic Radiolabeling to a High Specific Activity of Legume Lipo-Oligosaccharidic Nodulation Factors from Rhizobium-Meliloti*. **1995**, *Biochemical Journal*, 306, 259-264.
- 144 Gressent, N.; Cullimore, J.; Ranjeva, R.; Bono, J. J., *Radiolabeling of lipo-chitooligosaccharides using the NodH sulfotransferase a two-step enzymatic procedure*. **2004**, *BMC Biochemistry*, 5, (4).
- 145 Pi, N. A.; Yu, Y. H.; Mougous, J. D.; Leary, J. A., *Observation of a hybrid random ping-pong mechanism of catalysis for NodST: A mass spectrometry approach*. **2004**, *Protein Science*, 13, (4), 903-912.
- 146 Cole, P. A., *Chaperone-assisted protein expression*. **1996**, *Structure*, 4, (3), 239-242.
- 147 Lavallie, E. R.; Diblasio, E. A.; Kovacic, S.; Grant, K. L.; Schendel, P. F.; McCoy, J. M., *A Thioredoxin Gene Fusion Expression System That Circumvents Inclusion Body Formation in the Escherichia-Coli Cytoplasm*. **1993**, *Bio-Technology*, 11, (2), 187-193.
- 148 Groves, P.; Offermann, S.; Rasmussen, M. O.; Canada, F. J.; Bono, J. J.; Driguez, H.; Imberty, A.; Jimenez-Barbero, J., *The relative orientation of the lipid and carbohydrate moieties of lipochitooligosaccharides related to nodulation factors depends on lipid chain saturation*. **2005**, *Organic & Biomolecular Chemistry*, 3, (8), 1381-1386.
- 149 Morando, M. A.; Nurisso, A.; Grenouillat, N.; Vauzeilles, B.; Beau, J. M.; Canada, F. J.; Jimenez-Barbero, J.; Imberty, A., *NMR and molecular modeling reveal key structural features of synthetic nodulation factors*. **2011**, *Glycobiology*, 21, (6), 824-833.

- 150 Spaink, H. P.; Wijfjes, A. H. M.; Vanderdrift, K.; Haverkamp, J.; Thomasoates, J. E.; Lugtenberg, B. J. J., *Structural Identification of Metabolites Produced by the NodB and NodC Proteins of Rhizobium-Leguminosarum*. **1994**, *Molecular Microbiology*, 13, (5), 821-831.
- 151 Kafetzopoulos, D.; Thireos, G.; Vournakis, J. N.; Bouriotis, V., *The Primary Structure of a Fungal Chitin Deacetylase Reveals the Function for 2 Bacterial Gene-Products*. **1993**, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, (17), 8005-8008.
- 152 Zhao, Y.; Park, R.-D.; Muzzarelli, R. A. A., *Chitin Deacetylases: Properties and Applications*. **2010**, *Marine Drugs*, 8, (1), 24-46.
- 153 Wang, Y.; Song, J. Z.; Yang, Q.; Liu, Z. H.; Huang, X. M.; Chen, Y., *Cloning of a Heat-Stable Chitin Deacetylase Gene from Aspergillus nidulans and its Functional Expression in Escherichia coli*. **2010**, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162, (3), 843-854.
- 154 Christodoulidou, A.; Briza, P.; Ellinger, A.; Bouriotis, V., *Yeast ascospore wall assembly requires two chitin deacetylase isozymes*. **1999**, *FEBS Letters*, 460, (2), 275-279.
- 155 Matsuo, Y.; Tanaka, K.; Matsuda, H.; Kawamukai, M., *cda1(+), encoding chitin deacetylase is required for proper spore formation in Schizosaccharomyces pombe*. **2005**, *FEBS Letters*, 579, (12), 2737-2743.
- 156 El Gueddari, N. E.; Rauchhaus, U.; Moerschbacher, B. M.; Deising, H. B., *Developmentally regulated conversion of surface-exposed chitin to chitosan in cell walls of plant pathogenic fungi*. **2002**, *New Phytologist*, 156, (1), 103-112.
- 157 Tsigos, I.; Bouriotis, V., *Purification and Characterization of Chitin Deacetylase from Colletotrichum-Lindemuthianum*. **1995**, *Journal of Biological Chemistry*, 270, (44), 26286-26291.
- 158 Collinge, D. B.; Kragh, K. M.; Mikkelsen, J. D.; Nielsen, K. K.; Rasmussen, U.; Vad, K., *Plant Chitinases*. **1993**, *Plant Journal*, 3, (1), 31-40.
- 159 Araki, Y.; Ito, E., *Pathway of Chitosan Formation in Mucor-Rouxii - Enzymatic Deacetylation of Chitin*. **1975**, *European Journal of Biochemistry*, 55, (1), 71-78.
- 160 Kauss, H.; Jeblick, W.; Young, D. H., *Chitin Deacetylase from the Plant Pathogen Colletotrichum-Lindemuthianum*. **1983**, *Plant Science Letters*, 28, (2), 231-236.
- 161 Hekmat, O.; Tokuyasu, K.; Withers, S. G., *Subsite structure of the endo-type chitin deacetylase from a Deuteromycete, Colletotrichum lindemuthianum: an investigation using steady-state kinetic analysis and MS*. **2003**, *Biochemical Journal*, 374, 369-380.
- 162 Blair, D. E.; Hekmat, O.; Schuttelkopf, A. W.; Shrestha, B.; Tokuyasu, K.; Withers, S. G.; van Aalten, D. M. F., *Structure and mechanism of chitin deacetylase from the fungal pathogen Colletotrichum lindemuthianum*. **2006**, *Biochemistry*, 45, (31), 9416-9426.
- 163 Merzendorfer, H.; Zimoch, L., *Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases*. **2003**, *Journal of Experimental Biology*, 206, (24), 4393-4412.

- 164 Luschnig, S.; Batz, T.; Armbruster, K.; Krasnow, M. A., *serpentine and vermiform encode matrix proteins with chitin binding and deacetylation domains that limit tracheal tube length in Drosophila*. **2006**, *Current Biology*, 16, (2), 186-194.
- 165 Verma, S. C.; Mahadevan, S., *The chbG Gene of the Chitobiose (chb) Operon of Escherichia coli Encodes a Chitooligosaccharide Deacetylase*. **2012**, *Journal of Bacteriology*, 194, (18), 4959-4971.
- 166 Francetic, O.; Badaut, C.; Rimsky, S.; Pugsley, A. P., *The ChiA (YheB) protein of Escherichia coli K-12 is an endochitinase whose gene is negatively controlled by the nucleoid-structuring protein H-NS*. **2000**, *Molecular Microbiology*, 35, (6), 1506-1517.
- 167 Souza, J. M.; Plumbridge, J. A.; Calcagno, M. L., *N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase from Escherichia coli: Purification and molecular and kinetic characterization*. **1997**, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 340, (2), 338-346.
- 168 Meibom, K. L.; Li, X. B. B.; Nielsen, A. T.; Wu, C. Y.; Roseman, S.; Schoolnik, G. K., *The Vibrio cholerae chitin utilization program*. **2004**, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, (8), 2524-2529.
- 169 Keyhani, N. O.; Roseman, S., *Physiological aspects of chitin catabolism in marine bacteria*. **1999**, *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*, 1473, (1), 108-122.
- 170 Li, X. B.; Roseman, S., *The chitinolytic cascade in Vibrios is regulated by chitin oligosaccharides and a two-component chitin catabolic sensor/kinase*. **2004**, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, (2), 627-631.
- 171 Hirano, T.; Aoki, M.; Kadokura, K.; Kumaki, Y.; Hakamata, W.; Oku, T.; Nishio, T., *Heterodisaccharide 4-O-(N-acetyl-beta-D-glucosaminyl)-D-glucosamine is an effective chemotactic attractant for Vibrio bacteria that produce chitin oligosaccharide deacetylase*. **2011**, *Letters in Applied Microbiology*, 53, (2), 161-166.
- 172 Hirano, T.; Kadokura, K.; Ikegami, T.; Shigeta, Y.; Kumaki, Y.; Hakamata, W.; Oku, T.; Nishio, T., *Heterodisaccharide 4-O-(N-acetyl-beta-d-glucosaminyl)-d-glucosamine is a specific inducer of chitinolytic enzyme production in Vibrios harboring chitin oligosaccharide deacetylase genes*. **2009**, *Glycobiology*, 19, (9), 1046-1053.
- 173 Ohishi, K.; Yamagishi, M.; Ohta, T.; Motosugi, M.; Izumida, H.; Sano, H.; Adachi, K.; Miwa, T., *Purification and properties of two deacetylases produced by Vibrio alginolyticus H-8*. **1997**, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 61, (7), 1113-1117.
- 174 Li, X.; Wang, L.-X.; Wang, X.; Roseman, S., *The chitin catabolic cascade in the marine bacterium Vibrio cholerae: Characterization of a unique chitin oligosaccharide deacetylase*. **2007**, *Glycobiology*, 17, (12), 1377-1387.
- 175 Sakamoto, Y.; Kuno, E.; Tomiyama, A.; Hirano, T.; Kumaki, Y.; Tanaka, A.; Kanda, H.; Furuya, K.; Hakamata, W.; Oku, T.; Nishio, T., *A ChitinOligosaccharide deacetylase from Vibrio sp. SN184: Gene Cloning, Overexpression, Purification and Characterization*. **2009**, *Journal of Applied Glycoscience*, 56, 273-276.
- 176 Kadokura, K.; Sakamoto, Y.; Saito, K.; Ikegami, T.; Hirano, T.; Hakamata, W.; Oku, T.; Nishio, T., *Production of a recombinant chitin oligosaccharide deacetylase from Vibrio*

- parahaemolyticus* in the culture medium of *Escherichia coli* cells. **2007**, *Biotechnology Letters*, 29, (8), 1209-1215.
- 177 Tanaka, T.; Fukui, T.; Atomi, H.; Imanaka, T., *Characterization of an exo-beta-D-glucosaminidase involved in a novel chitinolytic pathway from the hyperthermophilic archaeon Thermococcus kodakaraensis KOD1*. **2003**, *Journal of Bacteriology*, 185, (17), 5175-5181.
- 178 Tanaka, T.; Fukui, T.; Fujiwara, S.; Atomi, H.; Imanaka, T., *Concerted action of diacetylchitobiose deacetylase and exo-beta-D-glucosaminidase in a novel chitinolytic pathway in the hyperthermophilic archaeon Thermococcus kodakaraensis KOD1*. **2004**, *Journal of Biological Chemistry*, 279, (29), 30021-30027.
- 179 Koga, S.; Yoshioka, I.; Sakuraba, H.; Takahashi, M.; Sakasegawa, S.; Shimizu, S.; Ohshima, T., *Biochemical characterization, cloning, and sequencing of ADP-dependent (AMP-forming) glucokinase from two hyperthermophilic archaea, Pyrococcus furiosus and Thermococcus litoralis*. **2000**, *Journal of Biochemistry*, 128, (6), 1079-1085.
- 180 Tokuyasu, K.; Mitsutomi, M.; Yamaguchi, I.; Hayashi, K.; Mori, Y., *Recognition of chitooligosaccharides and their N-acetyl groups by putative subsites of chitin deacetylase from a deuteromycete, Colletotrichum lindemuthianum*. **2000**, *Biochemistry*, 39, (30), 8837-8843.
- 181 Hamer, S. N.; Moerschbacher, B. M.; Kolkenbrock, S., *Enzymatic sequencing of partially acetylated chitosan oligomers*. **2014**, *Carbohydrate Research*, 392, (0), 16-20.
- 182 Tsigos, I.; Zydowicz, N.; Martinou, A.; Domard, A.; Bouriotis, V., *Mode of action of chitin deacetylase from Mucor rouxii on N-acetylchitooligosaccharides*. **1999**, *European Journal of Biochemistry*, 261, (3), 698-705.
- 183 Mine, S.; Niiyama, M.; Hashimoto, W.; Ikegami, T.; Koma, D.; Ohmoto, T.; Fukuda, Y.; Inoue, T.; Abe, Y.; Ueda, T.; Morita, J.; Uegaki, K.; Nakamura, T., *Expression from engineered Escherichia coli chromosome and crystallographic study of archaeal N,N'-diacetylchitobiose deacetylase*. **2014**, *FEBS Journal*, 281, (11), 2584-2596.
- 184 Ghormade, V.; Kulkarni, S.; Doiphode, N.; Rajamohan, P. R.; Deshpande, M. V., *Chitin deacetylase: A comprehensive account on its role in nature and its biotechnological applications*. In *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, A. Méndez-Vilas, E., Ed. **2010**; pp 1054-1066.
- 185 Mine, S.; Ikegami, T.; Kawasaki, K.; Nakamura, T.; Uegaki, K., *Expression, refolding, and purification of active diacetylchitobiose deacetylase from Pyrococcus horikoshii*. **2012**, *Protein Expression and Purification*, 84, (2), 265-269.
- 186 Andres, E.; Albesa-Jove, D.; Biarnes, X.; Moerschbacher, B. M.; Guerin, M. E.; Planas, A., *Structural Basis of Chitin Oligosaccharide Deacetylation*. **2014**, *Angewandte Chemie-International Edition*, 53, (27), 6882-6887.
- 187 Ritsema, T.; Lugtenberg, B. J. J.; Spaink, H. P., *Acyl-acyl carrier protein is a donor of fatty acids in the NodA-dependent step in biosynthesis of lipochitin oligosaccharides by rhizobia*. **1997**, *Journal of Bacteriology*, 179, (12), 4053-4055.

- 188 Lopez-Lara, I. M.; Geiger, O., *Expression and purification of four different rhizobial acyl carrier proteins*. **2000**, *Microbiology*, 146, 839-849.
- 189 Demont, N.; Debelle, F.; Aurelle, H.; Denarie, J.; Prome, J. C., *Role of the Rhizobium-Meliloti-Nodf and Node Genes in the Biosynthesis of Lipo-Oligosaccharidic Nodulation Factors*. **1993**, *Journal of Biological Chemistry*, 268, (27), 20134-20142.
- 190 Montalbetti, C.; Falque, V., *Amide bond formation and peptide coupling*. **2005**, *Tetrahedron*, 61, (46), 10827-10852.
- 191 Rohrig, H.; Schmidt, J.; Walden, R.; Czaja, I.; Miklasevics, E.; Wieneke, U.; Schell, J.; John, M., *Growth of Tobacco Protoplasts Stimulated by Synthetic Lipo-Chitooligosaccharides*. **1995**, *Science*, 269, (5225), 841-843.
- 192 Tsuji, A.; Kinoshita, T.; Hoshino, M., *Microdetermination of hexosamines*. **1969**, *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 17, (1), 217-8.
- 193 Jaworska, M. M., *Chitin deacetylase product inhibition*. **2011**, *Biotechnology Journal*, 6, (2), 244-247.
- 194 Tokuyasu, K.; Ono, H.; Mitsutomi, M.; Hayashi, K.; Mori, Y., *Synthesis of a chitosan tetramer derivative, beta-D-GlcNAc-(1 -> 4)-beta-D-GlcNAc-(1 -> 4)-beta-D-GlcNAc-(1 -> 4)-D-GlcN through a partial N-acetylation reaction by chitin deacetylase*. **2000**, *Carbohydrate Research*, 325, (3), 211-215.
- 195 Singh, S.; Scigelova, M.; Critchley, P.; Crout, D. H. G., *Trisaccharide synthesis by glycosyl transfer from p-nitrophenyl beta-D-N-acetylgalactosaminide on to disaccharide acceptors catalysed by the beta-N-acetylhexosaminidase from Aspergillus oryzae*. **1997**, *Carbohydrate Research*, 305, (3-4), 363-370.
- 196 Holz, C.; Hesse, O.; Bolotina, N.; Stahl, U.; Lang, C., *A micro-scale process for high-throughput expression of cDNAs in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. **2002**, *Protein Expression and Purification*, 25, (3), 372-378.
- 197 Cereghino, J. L.; Cregg, J. M., *Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast Pichia pastoris*. **2000**, *FEMS Microbiology Reviews*, 24, (1), 45-66.
- 198 Stacey, G.; Luka, S.; Sanjuan, J.; Banfalvi, Z.; Nieuwkoop, A. J.; Chun, J. Y.; Forsberg, L. S.; Carlson, R., *Nodz, a Unique Host-Specific Nodulation Gene, Is Involved in the Fucosylation of the Lipooligosaccharide Nodulation Signal of Bradyrhizobium-Japonicum*. **1994**, *Journal of Bacteriology*, 176, (3), 620-633.
- 199 Chazalet, V.; Uehara, K.; Geremia, R. A.; Breton, C., *Identification of essential amino acids in the Azorhizobium caulinodans fucosyltransferase NodZ*. **2001**, *Journal of Bacteriology*, 183, (24), 7067-7075.
- 200 Brzezinski, K.; Dauter, Z.; Jaskolski, M., *Structures of NodZ a1,6-fucosyltransferase in complex with GDP and GDP-fucose*. **2012**, *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, 68, 160-168.
- 201 Best, M. D., *Click Chemistry and Bioorthogonal Reactions: Unprecedented Selectivity in the Labeling of Biological Molecules*. **2009**, *Biochemistry*, 48, (28), 6571-6584.
- 202 Fort, S.; Chambon, R.; Armand, S.; Cottaz, S. *Procédés de préparation de lipochito-*

oligosaccharides et de leurs précurseurs. FR1255498, 12.06.12, **2012**.

- 203 Vauzeilles, B.; Dausse, B.; Palmier, S.; Beau, J.-M., *A one-step β -selective glycosylation of N-acetyl glucosamine and recombinant chitooligosaccharides*. **2001**, *Tetrahedron Letters*, 42, (43), 7567-7570.



ANNEXES

Liste des figures

Figure 1	Mise en place des symbioses plantes – micro-organismes, adaptée de Jayarama <i>et al.</i>	37
Figure 2	Nodosité du symbiote <i>Rhizobium-leguminosarum</i> chez <i>Vicia hirsuta</i> , adapté d'Oldroyd et Downie.....	39
Figure 3	Etablissement de la symbiose <i>Rhizobium</i> -légumineuses, d'après Oldroyd <i>et al.</i>	40
Figure 4	Endomycorhizes à arbuscule de <i>G. intraradices</i> et <i>M. truncatula</i> , adapté de Maillet <i>et al.</i> ¹²	41
Figure 5	Etablissement de la symbiose endomycorhizienne à arbuscule, d'après Oldroyd <i>et al.</i> ¹⁰	42
Figure 6	Schéma de la voie commune de signalisation des LCOs, adapté de Maillet <i>et al.</i> ¹²	43
Figure 7	Structures de CO et LCOs. (a) Chitintétraose (b) Facteurs Myc de <i>Glomus intraradices</i> Myc-LCO (C _{16:0}) (c) Facteur Nod de <i>Sinorhizobium meliloti</i> NodSm-IV (C _{16:2} , Ac; S).....	45
Figure 8	Structure générale des facteurs de nodulation, d'après D'Haese et Holsters ²⁴	47
Figure 9	Gènes impliqués dans la biosynthèse de facteurs Nod chez <i>S. meliloti</i>	48
Figure 10	Structure générale des facteurs de mycorhization, d'après Maillet <i>et al.</i> ¹²	49
Figure 11	Hypothèses étudiées pour fixer l'azote chez les non-légumineuses.	51
Figure 12	Facteurs de nodulation ciblés lors des synthèses chimiques totales. (a) NodSm-IV (C _{16:2} , Ac, S) (b) NodBj-V (C _{18:1} , Fuc).....	54
Figure 13	Synthèse de NodSm-IV (C _{16:2} , S).....	55
Figure 14	Principe de l'usine cellulaire pour la synthèse de précurseurs de LCOs.	56
Figure 15	Structure du facteur Nod de <i>Rhizobium fredii</i> NodRf-V-Glc (C _{18:1} , MeFuc) ⁴⁵	57
Figure 16	Structures des analogues de COs possédant des unités D-glucosyles, d'après Robina <i>et al.</i> ⁴⁶	58
Figure 17	Analogue de LCO GlcNH(C _{18:1}) – (Glc) ₃ , d'après Claisse et Fort ⁴⁷	58
Figure 18	Facteurs NodSm-IV (S) comportant des chaînes grasses non naturelles, adapté de Beau <i>et al.</i>	59

Figure 19	Structure d'un thiochitintétraose, d'après Southwick <i>et al.</i> ⁵⁴	60
Figure 20	Stratégie de voie d'accès aux lipochitinoligosaccharides.	61
Figure 21	Schéma du vecteur pCR4Blunt-TOPO et carte de restriction du site de clonage multiple.	73
Figure 22	Schéma du vecteur pESC-LEU et carte de restriction du site de clonage multiple.....	73
Figure 23	Schéma du vecteur pPICZαA et carte de restriction du site de clonage multiple.....	73
Figure 24	Schéma du vecteur pET20b(+) et carte de restriction du site de clonage multiple.	74
Figure 25	Schéma du vecteur pET21a-d(+) et carte de restriction du site de clonage multiple.	74
Figure 26	Schéma du vecteur pET26b(+) et carte de restriction du site de clonage multiple.	75
Figure 27	Schéma du vecteur pET28a-c(+) et carte de restriction du site de clonage multiple.	75
Figure 28	Schéma du vecteur pET32a-c(+) et carte de restriction du site de clonage multiple.	76
Figure 29	Spectre de masse MALDI-ToF (mode positif) du FACOS.....	86
Figure 30	Spectre de masse MALFI-ToF du FACOS per <i>N</i> -acétylé.	87
Figure 31	Structure de la chitine et de son dérivé <i>N</i> -désacétylé, le chitosane.....	97
Figure 32	Préparation de chitine et de chitosane à partir de carapaces de crustacés, adapté de Kaur et Dhillon.....	98
Figure 33	Modes d'action des chitinases, adapté de Vaaje-Kolastad <i>et al.</i> ⁷²	101
Figure 34	Production d'oligomères de chitosane en réacteur, couplée à une cellule d'ultrafiltration, d'après Jeon et Kim ⁷⁵	102
Figure 35	Mode d'action d'une glycosyltransférase de Leloir, NodC (<i>A. caulidonans</i>) ²⁶	104
Figure 36	Mode d'action des chitinases C2 et C1 (<i>O. xanthineolytica</i>).	106
Figure 37	Analyse par SDS-PAGE à 10% de la chitinase C2 purifiée. (1) Marqueur de tailles. (2) Chitinase C2 purifiée.	108
Figure 38	Spectres de masse MALDI-TOF (mode positif) (a) de l'action de C2 sur la chitine colloïdale, (b) de la chitine colloïdale avant addition de la chitinase C2 (bruts réactionnels).	109

Figure 39	Spectre de masse MALDI-TOF (mode positif) de l'action de la chitinase de haricot sur la chitine colloïdale (brut réactionnel).....	110
Figure 40	Chromatogramme SEC (Biogel P4, éluant eau) du FACOS <i>per N</i> -acétylé.....	111
Figure 41	Spectres de masse MALDI-ToF (mode positif) des oligomères de chitine purifiés. (a) CO-IV (b) CO-V (c) CO-VI.....	112
Figure 42	Analyses HPLC des oligomères de chitine purifiés (a) CO-IV (b) CO-V (c) CO-VI.....	113
Figure 43	Décorations des lipochitinoligosaccharides.....	123
Figure 44	Carbamoylation des facteurs de nodulation.....	124
Figure 45	Réaction catalysée par la carbamoyl phosphate synthase.....	126
Figure 46	<i>N</i> -carbamoylation dans les voies de biosynthèse de l'arginine et des bases pyrimidiques.....	127
Figure 47	Mécanisme réactionnel de <i>S</i> -carbamoylation de HypE (<i>T. tengcongensis</i>), par la carbamoyltransférase HypF (<i>T. tengcongensis</i>).....	128
Figure 48	Structure de HypF (<i>T. tengcongensis</i>), adapté de Shomura et Higuchi ¹⁰⁴ . (AMPCPP : analogue non métabolisable de l'ATP. AMPCP : analogue non métabolisable de l'ADP).....	129
Figure 49	Mécanisme réactionnel proposé pour la <i>O</i> -carbamoylation.....	130
Figure 50	Structure de TobZ (<i>Streptoalloteichus tenebrarius</i> DSM40770T), adapté de Parthier <i>et al.</i> ¹¹²	131
Figure 51	Alignement de séquences des deux <i>O</i> -carbamoyltransférases NoI0 (<i>S. fredii</i> NGR234A).....	133
Figure 52	Croissance d' <i>E. coli</i> BL21 transformée par pET20b_nol0, en milieu auto-inductible ZYP5052, à 20°C.....	134
Figure 53	Analyse sur SDS-PAGE 8% de l'expression de NoI0 (<i>S. fredii</i> NGR234A) chez <i>E. coli</i> BL21. (1-3) Protéines cytoplasmiques d' <i>E. coli</i> BL21 transformées par pET20b après 24, 48 et 55 heures de croissance à 20°C (4-6) Protéines cytoplasmiques d' <i>E. coli</i> BL21 transformées par pET20b_nol0 après 24, 48 et 55 heures de croissance à 20°C (environ 20 µg de protéines déposés par piste).....	135
Figure 54	Analyse sur SDS-PAGE 8% de la purification de NoI0 (<i>S. fredii</i> NGR234A). (1) Extrait cytoplasmique brut. (2) Fraction exclue (3) Lavage (20 mM d'imidazole). (4-5) Fractions d'élution (50 mM d'imidazole). (6) Fractions d'élution (100 mM d'imidazole). (7) Fractions d'élution (150 mM d'imidazole). (8) Fractions d'élution (300 mM d'imidazole).....	136

Figure 55	Réaction proposée de décomposition du carbamoyle phosphate, d'après Wang <i>et al.</i> ⁹⁷	137
Figure 56	Analyse par RMN ³¹ P de la cinétique de décomposition du carbamoyle phosphate à 30°C.....	137
Figure 57	Cinétique de dégradation du carbamoyle phosphate, par analyse RMN ³¹ P à 30°C.....	138
Figure 58	Alignement de séquences d' <i>O</i> -carbamoyltransférases.....	140
Figure 59	(a) Structure de la Novobiocine (en vert l'action de NovN) (b) Structure d'un LCO N-méthylé (en vert, l'action de NoI0).....	143
Figure 60	La sulfatation chez les lipochitinoligosaccharides.....	145
Figure 61	Métabolisme du PAPS chez <i>E. coli</i>	147
Figure 62	Synthèse enzymatique du PAPS en deux étapes.....	149
Figure 63	Synthèse de CO-IV sulfaté par couplage des activités enzymatiques de NodH (<i>S. meliloti</i>) et de l'AST-IV (<i>R. norvegicus</i>), adapté de Burkart <i>et al.</i> ¹³⁷	150
Figure 64	Analyse par SDS-PAGE 12% de l'expression de l'AST-IV (<i>R. norvegicus</i>) chez <i>E. coli</i> BL21. (1-4) Protéines cytoplasmiques d' <i>E. coli</i> BL21 transformées par le pET28a(+) après 0, 2, 4 et 20 heures de croissance, à 16°C, avec 0,1 mM d'IPTG. (5-8) Protéines cytoplasmiques d' <i>E. coli</i> BL21 transformées par le pET28a_AST-IV après 0, 2, 4 et 20 heures de croissance, à 16°C, avec 0,1 mM d'IPTG. (9) AST-IV purifiée sur résine de nickel (environ 20 µg de protéines déposés par piste).....	154
Figure 65	Analyse par SDS-PAGE 12% de l'expression de NodH (<i>S. meliloti</i>) chez <i>E. coli</i> BL21. (1-4) Protéines cytoplasmiques d' <i>E. coli</i> BL21 transformées par le pET21a(+) après 0, 3, 6 et 20 heures de croissance, à 18°C, avec 0,3 mM d'IPTG. (5-8) Protéines cytoplasmiques d' <i>E. coli</i> BL21 transformées par le pET21a_nodH après 0, 3, 6 et 20 heures de croissance, à 18°C, avec 0,3 mM d'IPTG. (9) NodH purifiée sur résine de nickel (environ 20 µg de protéines déposés par piste).....	157
Figure 66	CCM de l'action de NodH sur le CO-V (1) Standard CO-V (flèche rouge) (2) Standard CO-V(S) (flèche noire) (3) Produit de l'action de la ST NodH (couplée à l'AST-IV) sur le CO-V (brut réactionnel). <i>Eluant propanol / eau / ammoniacque 30 % (70/30/1)</i>	158
Figure 67	(a) Spectre de masse MALDI-TOF (mode négatif) du CO-V(S) (b) Spectre de masse MALDI-TOF (mode positif) du CO-V(S).....	159
Figure 68	Conformations de plus faible énergie du (a) LCO-IV(C _{16:1} , S) (b) LCO-IV(C _{16:2} , S).	

	Les résidus GlcNAc sont en bleu, jaune, rose et vert, et la chaîne grasse en bleu ciel, d'après Groves <i>et al.</i> ¹⁴⁸	169
Figure 69	Voies bactériennes chitinolytiques impliquant des CDs (ME : membrane externe, MI : membrane interne).....	174
Figure 70	Mode de <i>N</i> -désacétylation d'un chitintétraose par (a) une « endo » CD (<i>C. lindemuthianum</i>) (b) une « exo » CD (<i>M. rouxii</i>), d'après Zhao <i>et al.</i> ¹⁵²	176
Figure 71	Acylation de COs par l'acyltransférase NodA.	179
Figure 72	Acylation chimique des LCOs d'après Rasmussen <i>et al.</i> ⁴⁴	181
Figure 73	Stratégies d'accès aux LCOs par les CDs.....	182
Figure 74	Stratégie de voies d'accès aux LCOs et analogues de LCOs par la CD VC1280 (<i>V. cholerae</i>).	184
Figure 75	Analyse par SDS-PAGE 10% de l'expression de la CD VC1280 (<i>V. cholerae</i>) chez <i>E. coli</i> BL21. (1-4) Protéines cytoplasmiques d' <i>E. coli</i> BL21 transformées par le pET26b(+) après 0, 2, 4 et 22 heures de croissance à 20°C, avec 0,05 mM d'IPTG. (5-8) Protéines cytoplasmiques d' <i>E. coli</i> BL21 transformées par le pET26b_VC1280 après 0, 2, 4 et 22 heures de croissance à 20°C, avec 0,05 mM d'IPTG. (9) CD VC1280 purifiée sur résine de nickel. (environ 20 µg de protéines déposés par piste).	186
Figure 76	Gammes étalon du dosage de la GlcN et du CO-V(N) par le MBTH.	187
Figure 77	Représentation de Michaelis-Menten et paramètres biochimiques de la CD VC1280 (<i>V. cholerae</i>) sur le CO-II, déterminés par le dosage des amines libres au MBTH. (Concentration en enzyme = 0,39 nM).....	187
Figure 78	Obtention des précurseurs de LCOs et de leurs analogues par le procédé VC1280.	189
Figure 79	Analyse par CCM de la <i>N</i> -désacétylation des COs par la CD VC1280. (a) Chitintétraose (1) Standard CO-IV (2) Standard CO-IV(N ^{IV}) (3) Produit de l'action de VC1280 sur CO-IV (brut réactionnel) (b) Chitinpentaose (4) Standard CO-V (5) Standard CO-V(N ^V) (6) Produit de l'action de VC1280 sur CO-V (brut réactionnel) (c) Chitinhexaose (7) Standard CO-VI (8) Produit de l'action de VC1280 sur CO-VI (brut réactionnel). <i>Eluant</i> : butanol / éthanol / eau (4/3/3).....	190
Figure 80	Analyse par CCM de l'action de la β- <i>N</i> -acétylhexosaminidase (<i>A. niger</i>) sur des COs-(N). (1) Standard CO-V(N ^V). (2) Standard CO-IV(N ^{IV}). (3) Produit de l'hexosaminidase sur CO-VI(N ^V) (brut réactionnel). (4) Produit de	

	l'hexosaminidase sur CO-V(N ^{IV}) (brut réactionnel). <i>Eluant : propanol / eau / ammoniacque 27% (70/30/1)</i>	191
Figure 81	(a) Spectre de masse MALDI-ToF (mode positif) de <i>N</i> -désacétylation du CO-V(S) par la CD VC1280. (b) Spectre de masse MALDI-ToF (mode positif) de l'action de la β - <i>N</i> -acétylhexosaminidase (<i>A. niger</i>) sur le CO-V(N ^{IV} , S).	193
Figure 82	Analyse par SDS-PAGE 12% de l'expression de la CD NodB (<i>S. meliloti</i>) chez <i>E. coli</i> BL21. (1-4) Protéines cytoplasmiques d' <i>E. coli</i> BL21 transformées par le pET21d(+) après 0, 2, 6 et 22 heures de croissance à 16°C, avec 0,5 mM d'IPTG. (5-8) Protéines cytoplasmiques d' <i>E. coli</i> BL21 transformées par le pET21d_nodB-His après 0, 2, 6 et 22 heures de croissance à 16°C, avec 0,5 mM d'IPTG. (9) CD NodB purifiée sur résine de nickel. (environ 20 μ g de protéines déposés par piste).	198
Figure 83	Analyse par SDS-PAGE 12% de l'expression de la CD NodB (<i>S. meliloti</i>) en fusion avec la thiorédoxine chez <i>E. coli</i> BL21. (1-4) Protéines cytoplasmiques d' <i>E. coli</i> BL21 transformées par le pET32a(+) après 0, 2, 6 et 22 heures de croissance à 16°C, avec 0,5 mM d'IPTG. (5-8) Protéines cytoplasmiques d' <i>E. coli</i> BL21 transformées par le pET32a_nodB après 0, 2, 6 et 22 heures de croissance à 16°C, avec 0,5 mM d'IPTG. (9) CD NodB-thioredoxine purifiée sur résine de nickel (Taille attendue 42 kDa). (environ 20 μ g de protéines déposés par piste).	200
Figure 84	Analyse par CCM de l'influence de cations métalliques et du DTT sur l'activité de NodB. (1) Standard CO-V (2) Standard CO-V(N ^V). Produit de l'action de la CD NodB sur CO-V en présence (3) de DTT et de Mn ²⁺ , (4) de Mn ²⁺ , (5) de DTT, (6) de DTT et de Mg ²⁺ , (7) de DTT et de Zn ²⁺ . Les milieux réactionnels bruts ont été déposés. <i>Eluant : butanol / éthanol / eau (4/3/3)</i>	201
Figure 85	Etude de l'influence de la concentration en DTT sur l'activité de NodB.	202
Figure 86	Cibles des synthèses de précurseurs de LCOs par le procédé NodB.	204
Figure 87	Analyse par CCM de la <i>N</i> -désacétylation (a) du chitintétraose et (b) du chitinpentaose par NodB. (1) Standard CO-IV (2) Standard CO-IV(N ^{IV}) (3) Produit de NodB sur CO-IV (brut réactionnel). (4) Standard CO-V (5) Standard CO-V(N ^V) (6) Produit de NodB sur CO-V (brut réactionnel). <i>Eluant : butanol / éthanol / eau (4/3/3)</i>	205
Figure 88	Couplage « one pot » de l'action des sulfotransférases NodH (<i>S. meliloti</i>) et AST-IV (<i>R. norvegicus</i>) avec NodB (<i>S. meliloti</i>) sur du CO-V.	207
Figure 89	Chromatogramme SEC HW40 du mélange réactionnel de <i>N</i> -désacétylation du CO-IV(S) par la CD NodB.	208
Figure 90	Analyse par CCM de la <i>N</i> -désacétylation des CO-S par NodB. (1) Standard CO-V	

	(2) Standard CO-V(S) (3) Standard CO-V(N,S). (4) Produit de NodB sur CO-V(S) (brut réactionnel). <i>Eluant : Propanol / eau / ammoniacque 30 % (70/30/1)</i>	209
Figure 91	Chromatogramme SEC HW40 du mélange réactionnel de <i>N</i> -désacétylation et de sulfatation du CO-V par NodB (<i>S. meliloti</i>), NodH (<i>S. meliloti</i>) et l'AST-IV (<i>R. norvegicus</i>).....	210
Figure 92	Analyse par CCM de la <i>N</i> -désacétylation du CO-V(MeFuc) par NodB. (1) Standard CO-V (2) Standard CO-V(N) (3) Standard CO-V(MeFuc) (4) Produit de NodB sur CO-V(MeFuc)(brut réactionnel). <i>Eluant : butanol / éthanol / eau (4/3/3)</i>	211
Figure 93	Chromatogramme SEC HW40 du mélange réactionnel de <i>N</i> -désacétylation du CO-V(MeFuc) par la CD NodB.....	211
Figure 94	Stratégie de sonde bifonctionnelle pour l'identification et la caractérisation de récepteurs apparentés. (a) Reconnaissance de la cible biologique par le LCO. (b) Photoactivation de la chaîne grasse qui se fixe de façon covalente au récepteur. (c) Ajout d'un groupement détectable par « chimie click » permettant l'identification de la cible.....	212
Figure 95	Analyse par CCM de la <i>N</i> -désacétylation du propargyl CO-IV par NodB. (1) Standard CO-IV (2) Standard CO-IV(N) (3) Substrat de départ propargyl CO-IV (4) Produit de NodB sur le propargyl CO-IV (brut réactionnel).....	213
Figure 96	Chromatogramme SEC HW40 du mélange réactionnel de <i>N</i> -désacétylation du propargyl CO-IV par NodB.....	213
Figure 97	Acylation en cours des analogues de précurseurs de LCOs et des précurseurs de LCOs.....	215
Figure 98	(a) Spectre de masse MALDI-ToF (mode positif) du CO-VI(N ^V); (b) Chromatogramme HPLC du CO-VI(N ^V).....	229
Figure 99	(a) Spectre de masse HRESI Q-ToF (mode positif) du CO-V(N ^V); (b) Chromatogramme HPLC du CO-V(N ^V).....	230
Figure 100	(a) Spectre de masse HRESI Q-ToF (mode positif) du CO-V(N ^{IV}); (b) Chromatogramme HPLC du CO-V(N ^{IV}).....	231
Figure 101	(a) Spectre de masse HRESI Q-ToF (mode positif) du CO-IV(N ^{IV}); (b) Chromatogramme HPLC du CO-IV(N ^{IV}).....	232
Figure 102	(a) Spectre de masse HRESI Q-ToF (mode positif) du CO-IV(N ^{III}); (b) Chromatogramme HPLC du CO-IV(N ^{III}).....	233
Figure 103	(a) Spectre de masse HRESI Q-ToF (mode positif) du CO-IV(N ^{IV}); (b)	

	Chromatogramme HPLC du CO-IV(N ^{IV}).....	234
Figure 104	(a) Spectre de masse HRESI Q-ToF (mode positif) du CO-V(N ^V); (b) Chromatogramme HPLC du CO-V(N ^V).....	235
Figure 105	(a) Spectre de masse HRESI Q-ToF (mode positif) du CO-V(N ^V , S ^I); (b) Chromatogramme HPLC du CO-V(N ^V , S ^I).....	236
Figure 106	(a) Spectre de masse HRESI Q-ToF (mode négatif) du CO-IV(N ^{IV} , S ^I); (b) Chromatogramme HPLC du CO-IV(N ^{IV} , S ^I).....	237
Figure 107	(a) Spectre de masse HRESI Q-ToF (mode positif) du CO-V(N ^V , MeFuc); (b) Chromatogramme HPLC du CO-V(N ^V , MeFuc).....	238
Figure 108	Spectre de masse MALDI-ToF (mode positif) du chitintétraoside de propargyle CO-IV(N ^{IV}).	239

Liste des tableaux

Tableau 1	Caractéristiques des souches utilisées dans l'étude.....	71
Tableau 2	Caractéristiques des plasmides utilisés dans l'étude.....	72
Tableau 3	Amorces de clonage de NodH (<i>S. meliloti</i>).....	77
Tableau 4	Amorces de clonage de la CD NodB.....	78
Tableau 5	Bilan de purification des COs à partir d'un gramme de mélange de COs.....	110
Tableau 6	Identification des chitinases chez <i>C. cellulans</i> J36.....	114
Tableau 7	Etude d'expression de Nolo (<i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234A) chez <i>E. coli</i>	134
Tableau 8	O-carbamoyltransférases comparées par alignement de séquences.....	138
Tableau 9	Conditions d'activités <i>in vitro</i> d'O-carbamoyltransférases et de S-carbamoyltransférases. <i>nd</i> = non déterminé.....	141
Tableau 10	Conditions d'expression de l'AST-IV (<i>R. norvegicus</i>) testées.....	153
Tableau 11	Conditions d'expression de la sulfotransférase NodH (<i>S. meliloti</i>) testées.....	156
Tableau 12	Schéma de N-désacétylation et substrats de CDs. <i>nt</i> : non testé.....	177
Tableau 13	Conditions d'expression de VC1280 (<i>V. cholerae</i>) testées chez <i>E. coli</i> BL21.....	185
Tableau 14	Bilan de synthèse des précurseurs d'analogues de LCOs obtenus par le « procédé VC1280 ».....	190
Tableau 15	Bilan de synthèse des précurseurs de LCOs obtenus par le « procédé VC1280 ».....	192
Tableau 16	Conditions d'expression de la CD NodB (<i>S. meliloti</i>) testées.....	194
Tableau 17	Paramètres cinétiques de la CD NodB (<i>S. meliloti</i>) (Concentration en enzyme = 0,11 nM).....	202
Tableau 18	Bilan de synthèse des précurseurs de LCOs non fonctionnalisés obtenus par le procédé NodB.....	206
Tableau 19	Bilan de synthèse des précurseurs de LCOs.....	214

Brevet

« Procédé de préparation de lipochito-oligosaccharides et de leurs précurseurs ».

<p>①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE</p> <p>INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE</p> <p>PARIS</p>	<p>①① N° de publication : 2 991 682 (à utiliser que pour les commandes de reproduction)</p> <p>②① N° d'enregistrement national : 12 55498</p> <p>⑤① Int Cl^B : C 07 H 5/04 (2013.01), C 05 C 11/00, A 01 N 25/00</p>
<p>①② DEMANDE DE BREVET D'INVENTION A1</p>	
<p>②② Date de dépôt : 12.06.12.</p> <p>③① Priorité :</p> <p>④③ Date de mise à la disposition du public de la demande : 13.12.13 Bulletin 13/50.</p> <p>⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : <i>Se reporter à la fin du présent fascicule</i></p> <p>⑥① Références à d'autres documents nationaux apparentés :</p>	<p>⑦① Demandeur(s) : <i>CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE Etablissement public — FR et UNIVERSITE JOSEPH FOURIER Etablissement public — FR.</i></p> <p>⑦② Inventeur(s) : FORT SEBASTIEN, CHAMBON REMI, ARMAND SYLVIE et COTTAZ SYLVAIN.</p> <p>⑦③ Titulaire(s) : CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE Etablissement public, UNIVERSITE JOSEPH FOURIER Etablissement public.</p> <p>⑦④ Mandataire(s) : CABINET NONY.</p>
<p>⑤④ PROCEDES DE PREPARATION DE LIPOCHITO-OLIGOSACCHARIDES ET DE LEURS PRECURSEURS.</p> <p>⑤⑦ La présente invention concerne des procédés multi-étapes d'obtention de dérivés de chito-oligosaccharides, lesdits procédés comprenant la mise en oeuvre d'une N-dé-sacétylase recombinante de <i>Vibrio cholerae</i>.</p>	
<p>FR 2 991 682 - A1</p>	

INGENIERIE DES PROTEINES POUR LA SYNTHÈSE D'OLIGOSACCHARIDES D'INTERETS BIOLOGIQUE ET INDUSTRIEL

Le but du projet est de mettre au point de nouveaux outils enzymatiques permettant la production de chitino-oligosaccharides de taille et de degré d'acétylation parfaitement contrôlés pour l'étude d'enzymes impliquées dans la biosynthèse, la biodégradation et la modification de la chitine, et pour l'étude de récepteurs protéiques d'origine animale ou végétale. Des études récentes ont montré que les oligomères de la chitine et leurs dérivés sont des molécules qui interviennent dans les phénomènes symbiotiques et de reconnaissance hôte-pathogène dans le règne végétal. Ces molécules sont utilisées en agrochimie comme biofertilisants, et potentiellement en phytosanitaire. Ils sont connus également pour posséder de nombreuses activités biologiques dans le domaine de la santé (effets antimicrobiens, anticancéreux, anti-inflammatoires, immunostimulants...). Si les activités de cette classe d'oligosaccharides sont parfaitement reconnues, leurs modes d'actions restent encore à éclaircir, ce qui nécessite de disposer de molécules pures aux structures chimiques parfaitement contrôlées. La production d'oligomères de la chitine nécessite traditionnellement la mise en œuvre d'une chimie fastidieuse, qui peut être facilitée par une approche chimio-enzymatique.

Dans le cadre de cette thèse, des outils enzymatiques ont été développés permettant la synthèse d'une bibliothèque de molécules de taille et de degré d'acétylation contrôlés en vue d'études structure-activité biologique. Pour cela, des *N*-désacétylases et des chitinases seront produites dans différents systèmes d'expression et caractérisées afin de générer une panoplie de molécules de structure moléculaire parfaitement définie à partir de fragments saccharidiques issus de la biomasse. Les molécules ainsi préparées pourront ensuite être modifiées de façon chimio-sélective afin d'obtenir des sondes photoactivables et/ou biotinylées pour la caractérisation de récepteurs, des substrats fluoro- ou chromogéniques pour le dosage spécifique d'activités enzymatiques ou encore des lipochitino-oligosaccharides capables de favoriser la croissance des plantes. Les approches utilisées pour mener à bien ce projet pluridisciplinaire sont : l'ingénierie et la production de protéines recombinantes, la caractérisation biochimique d'activités enzymatiques ainsi que la synthèse chimio-enzymatique et la modification chimique d'oligosaccharides qui devront être caractérisés d'un point de vue physicochimique. Il s'agit d'un projet intégré dans une collaboration nationale financée par l'ANR réunissant des équipes de l'Université de Grenoble, de Lyon, d'Orsay, et l'entreprise Bayer CropScience.

Mots clé : ingénierie des protéines, oligosaccharides, facteurs de nodulation, facteurs de mycorhization, synthèse chimio-enzymatique

PROTEIN ENGINEERING FOR THE SYNTHESIS OF OLIGOSACCHARIDES WITH BIOLOGICAL AND INDUSTRIAL INTERESTS

The aim of the project is to develop new tools for enzymatic production of chitooligosaccharides size and degree of acetylation perfectly controlled for the study of enzymes involved in biosynthesis, biodegradation and modification of chitin and for the study of protein receptors of animal or vegetable origin. Recent studies have shown that oligomers of chitin and its derivatives are molecules involved in the phenomena of symbiotic and host-pathogen recognition in plants. These molecules are used as agrochemicals biofertilizers. They are also known to possess numerous biological activities in the field of health (anti-microbial, anti-cancer, anti-inflammatory, immunostimulant...). If the activities of this class of oligosaccharides are well recognized, their modes of action remain to be clarified, which requires having pure molecules with chemical structures perfectly controlled. The production of chitin oligomers traditionally requires the implementation of a tedious chemistry, which can be facilitated by a chemoenzymatic approach.

As part of this thesis, we want to develop enzymatic tools for the synthesis of a library of molecules of size and degree of acetylation controlled studies for structure-biological activity. For this, we will seek to produce *N*-deacetylase and chitinases in different expression systems and characterize their activity to generate a variety of molecules well-defined molecular structure from saccharide fragments derived from biomass. The molecules thus prepared can then be modified so as to achieve chemoselective photoactivatable probes and / or biotinylated for the characterization of receptors, substrates or fluoro-chromogenic assay for specific enzyme activities or lipo-chitooligosaccharides can promote plant growth. The approaches used to complete this multidisciplinary project are: engineering and production of recombinant proteins, the biochemical characterization of enzymatic activities and chemoenzymatic synthesis and chemical modification of oligosaccharides to be characterized from the point of physicochemical view. This is an integrated project in a national collaboration funded by the ANR with teams from the University of Grenoble, Lyon, Orsay, and Bayer CropScience.

Key words: protein engineering, oligosaccharides, nodulation factors, mycorhization factors, chemo-enzymatic synthesis.