

# ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ DE TRANSGLYCOSYLATION DE LA CYCLODEXTRINE GLYCOSYLTRANSFERASE DE *BACILLUS CIRCULANS* SUR L'HESPÉRIDINE EN MILIEUX DE SOLVANTS ORGANIQUES

OANA LAURA RADU\*, SYLVIE ARMAND\*, F. LENOUEVE\*, H. DRIGUEZ\*,  
DANA IORDĂCHESCU\*\*

\*Centre d'Études et de Recherches sur les Macromolécules Végétales, Domaine Universitaire 38401  
Grenoble CEDEX 9, France

\*\*Département de Biochimie et Biologie Moléculaire, Université de Bucarest, 93, Splaiul  
Independenței, Bucarest, Roumanie

*Abstract.* Cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase; EC 2.4.1.19) catalyzes the cyclodextrin formation starting from malto-oligosaccharides or starch as well as the transglycosylation reactions. In this paper, we described the glycosylation of the hesperidin by the CGTase from *Bacillus circulans* produced by *Bacillus subtilis* transformed with plasmid pDP66K. Glycosylation of the hesperidin was achieved in the organic solvents and validated using the reaction products analysis by thin-layer chromatography (TLC) on silica gel and fast atom bombardment/mass spectrometry (FAB-MS). By glycosylation, the hesperidin solubility increases. This latter aspect leads to enhancing of the hesperidin applications fields in the medical practice.

*Résumé.* Cyclodextrine glycosyltransferase (CGTase ; EC 2.4.1.19) catalyse la formation de cyclodextrines à partir de malto-oligosaccharides ou d'amidon mais également des réactions de transglycosylation. Dans le présent travail, on a décrit la glycosylation de l'héspéridine par la CGTase de *Bacillus circulans* produite chez *Bacillus subtilis* transformé avec le plasmide pDP66K. La glycosylation de l'héspéridine a été faite en solvants organiques et validée par l'analyse des produits de réaction par chromatographie sur couche mince (CCM) de gel de silice et par spectrométrie de masse (FAB-MS). Par glycosylation, la solubilité de l'héspéridine augmente, ce qui va grandir par conséquent leurs applications médicales.

*Mots clés:* héspéridine, transglycosylation enzymatique, solvants organiques, cyclodextrine glycosyltransferase, *Bacillus circulans*.

## INTRODUCTION

Les flavonoïdes sont des métabolites polyphénoliques végétaux qui interviennent dans les processus de pigmentation des fleurs, la protection de plantes contre les radiations UVAB et aussi dans leurs mécanismes de défense contre les herbivores et les attaques microbiennes. L'obtention de ces composés présente un intérêt clinique majeur concernant leur activité anti-athérosclérose, anti-inflammation, anti-thrombose, anti-ostéoporose, anti-tumorale.

---

Received November 2005.  
in final form January 2006.

Particulièrement l'héspéridine est reconnue pour sa capacité à inhiber des enzymes spécifiques, à stimuler certaines hormones et certains neurotransmetteurs [2].

Dans la classe des flavonoïdes il y a des représentants glycosylés (l'héspéridine, la neohéspéridine et la naringine) et des membres non glycosylés (la catéchine et la lutéoline) qui se différencie par leur solubilité en milieu aqueux. En fait, la solubilité de ces flavonoïdes est un facteur déterminant dans leurs applications thérapeutiques et peut être amélioré par réactions de condensation avec de donneurs hydrophiles.

La condensation peut être réalisée par glycosylation – par voie chimique ou enzymatique – avec un glucide au niveau des résidus hydroxyles libres. Les méthodes chimiques présentent certaines désavantages concernant le temps de réaction, et aussi la fréquence d'utilisations des solvants organiques chlorurés et des catalyseurs métalliques. Par ces raisons les méthodes de glycosylation par voie enzymatique ont commencé à être abordées récemment par de nombreuses équipes de recherche.

La nouvelle glycosylation des flavonoïdes natifs glycosylés va augmenter la solubilité en milieu aqueux de celles-ci. La littérature mentionne notamment la glycosylation de l'héspéridine, la neohéspéridine et la naringine par une cyclodextrine glycosyltransferase (CGTase) produite par une souche de *Bacillus alcalophilus* [3, 4].

Dans cette étude nous présentons la glycosylation de l'héspéridine en solvants organiques par l'action catalytique de la CGTase de *Bacillus circulans*. L'enzyme a été obtenue par techniques de biologie moléculaire et produite chez *Bacillus subtilis*.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

La cyclodextrine glycosyltransferase (CGTase) de *Bacillus circulans* a été obtenue en utilisant le vecteur d'expression : pDP66K [6]. Ce vecteur navette (Fig. 1) est employé pour l'expression de la CGTase sous le contrôle d'un promoteur p32 inducible par l'érythromycine. Il est introduit par transformation dans la souche de *Bacillus subtilis* sous sélection pour la résistance à la kanamycine et à l'érythromycine.

La souche utilisée pour l'expression de la CGTase de *Bacillus circulans* est : *Bacillus subtilis* DB104A déficiente en protéases et  $\alpha$ -amylase (*amy nprR2 nprE18 aprA3*) [5]. La souche et le vecteur d'expression nous ont été donnés par le Dr Hans LEEMHUIS (Groningen, Pays-Bas). La préparation des cellules compétentes, dans lesquelles l'enzyme a été exprimée et la transformation de *Bacillus subtilis* ont été réalisées d'après le protocole décrit par Bron [1]. La souche de *Bacillus subtilis* DB104A transformée avec le plasmide pDP66K est cultivée sur un milieu de culture Luria-Bertani. La CGTase présente dans le milieu de culture est purifiée par chromatographie d'affinité Sépharose 6B (Sigma) activée par l' $\alpha$ -cyclodextrine.

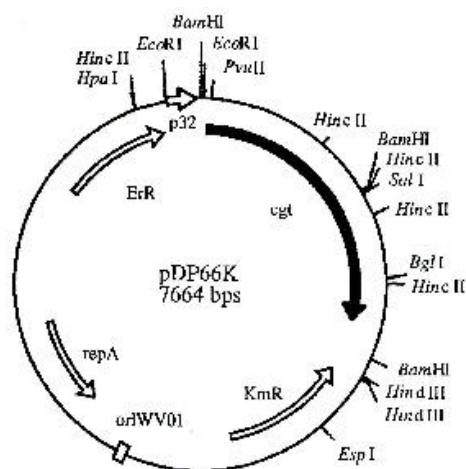


Fig. 1. Carte de restriction du plasmide pDP66K d'après Penninga [6].

L'accepteur flavonoïdique, l'hesperidine (Fig. 2) utilisée dans le présent travail est un préparé commercial produit de Sigma. La structure chimique de l'hesperidine est la suivante :

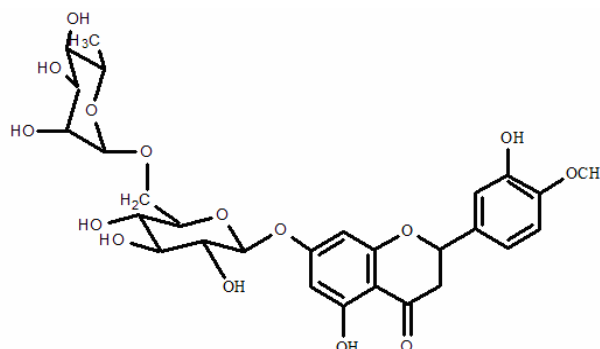


Fig. 2. L'hesperidine.

L' $\alpha$ -fluorure de 4'-tétra-hydropyrano-maltosyle a été synthétisé au CERMAV par le Dr Istvan Bajza.

Les solvants organiques testés comme milieu de réaction: DMSO (dimethylsulfoxyde), DMF (N, N'-diméthylformamide) et  $\text{CH}_3\text{CN}$  (acétonitrile)

#### TRANSGLYCOSYLATION HESPÉRIDE

Le donneur d'unités glucosyles, l' $\alpha$ -fluorure de 4'-tétra-hydropyrano-maltosyle (0.5 mg ; 1.17  $\mu\text{mol}$ ) a été incubé avec l'hesperidine (0.3 mg ; 1.05  $\mu\text{mol}$ ) en présence de la CGTase (6  $\mu\text{g}$ ) pendant 2h à 50 °C dans un volume

final de 250  $\mu$ L de tampon phosphate 10 mM, pH 7, contenant 23.5% CH<sub>3</sub>CN ou 30% DMSO ou 38% de DMF. Les produits de réaction sont analysés par chromatographie sur couche mince de gel de silice (Merk F254), élués avec un mélange acétonitrile/H<sub>2</sub>O (8/2 v/v) et révélés par trempage dans une solution d'Orcinol (725 mL d'éthanol + 225 mL d'eau + 30 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 1 g d'Orcinol), puis par chauffage à 300°C avec une étape préliminaire de révélation sous lumière UV.

Dans la Fig. 3 est présenté schématique le transfert d'unités glucosyles sur l'accepteur flavonoïdique.

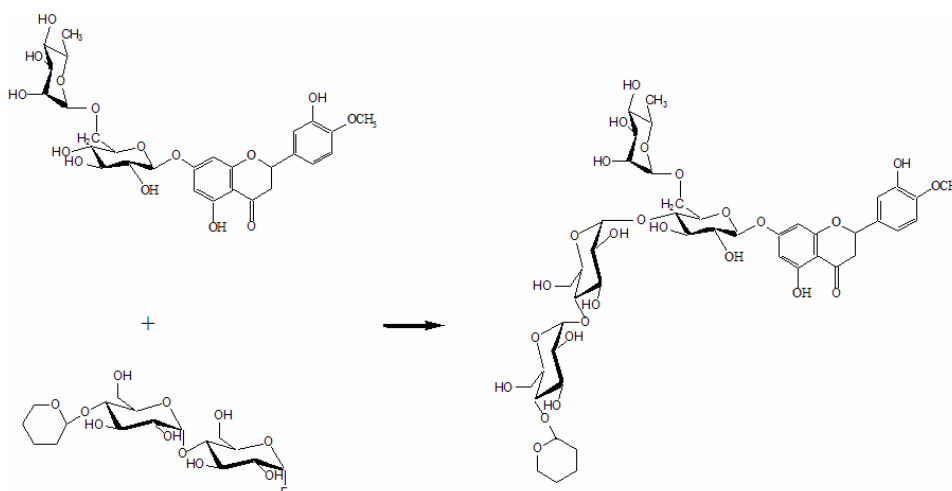


Fig. 3. Réaction de couplage entre l'hésperidine et l' $\alpha$ -fluorure de 4'-tétra-hydropyrano-maltosyle réalisée par l'action catalytique de la CGTase de *Bacillus circulans*.

#### ÉVALUATION DE L'ACTIVITE DE TRANSGLYCOSYLATION DE LA CGT DE *BACILLUS CIRCULANS* EN MILIEUX DE SOLVANTS ORGANIQUES

L'évaluation de l'activité de transglycosylation de la CGTase de *Bacillus circulans* en milieux de solvants organiques a été faite par une méthode originale, de dosage des cyclodextrines résiduelles en présence de phénolphtaléine.

La Fig. 4 présente schématique le principe de cette méthode, qui suit la réaction de couplage entre la  $\beta$ -cyclodextrine et le maltose. La quantité de  $\beta$ -cyclodextrine qui a été consommée pendant la réaction de couplage catalysée par la CGTase est quantifiée avec l'aide de la phénolphtaléine. La phénolphtaléine a la capacité de former avec la  $\beta$ -cyclodextrine un composé d'inclusion stable et coloré. La concentration de phénolphtaléine libre est déterminée par lecture de l'absorbance à 552 nm.

La  $\beta$ -cyclodextrine (0.567 mg ; 0.5  $\mu$ mol) a été incubé avec le maltose (0.18 mg ; 0.5  $\mu$ mol) en présence de la CGTase (1,5  $\mu$ g) pendant 60 minutes à 50°C dans un volume final de 500  $\mu$ l tampon phosphate 10 mM, pH 7, contenant 0–50% DMSO ou 0–70%  $\text{CH}_3\text{CN}$  ou 0–70% DMF. Après la période d'incubation 100  $\mu$ L de milieu réactionnel sont prélevés et ajoutés à 900  $\mu$ L d'une solution de phénolphthaléine (0.075 M) préparée dans le tampon carbonate de sodium 0.1 M pH 9.7.

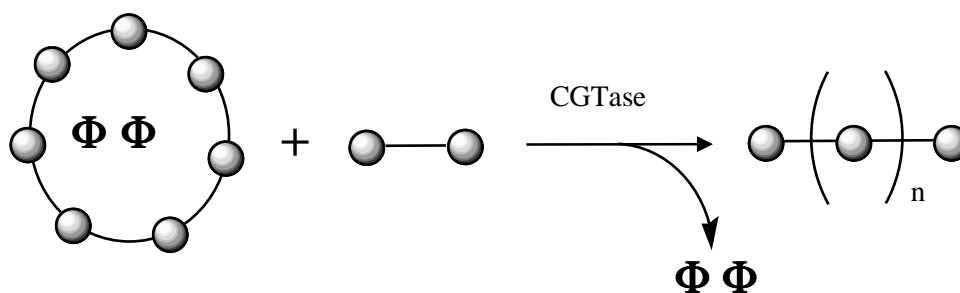


Fig. 4. Réaction de couplage entre la  $\beta$ -cyclodextrine et le maltose.  $\text{O}—\text{O}$ :  $\alpha$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Glcp ;  $\Phi\Phi$  : phénolphthaléine.

La concentration de phénolphthaléine libre est déterminée par lecture de l'absorbance à 552 nm, après 10 minutes à température ambiante.

Les spectres de masse sont réalisés sur un appareil Nermag 10-10 C. Le type d'ionisation utilisé est le bombardement par atomes accélérés (*fast atom bombardment* – FAB).

## RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

L'analyse des produits de réaction, obtenue pendant la transglycosylation enzymatique de l'hespéridine en milieux organiques (trois solvants testés), par chromatographie sur couche mince de gel de silice a permis l'identification d'un composé visible sous UV et révélé comme un glucide, par une réaction avec l'Orcinol. Fig. 5, piste C, le spot entouré présente l'hespéridine neo glycosylée.

Sur la plaque chromatographique (piste C) on a observé et d'autres produits secondaires qui proviennent probablement de la dégradation spontanée du donneur d'unités glucosyles, ce qui indique que pendant la réaction les deux substrats n'ont pas été utilisés en totalité. Dans cette modalité on peut expliquer le rendement de glycosylation faible, observé sur la plaque chromatographique.

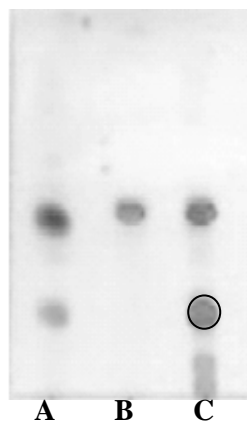


Fig. 5. Analyse par chromatographie sur couche mince de gel de silice de la glycosylation de l'hésperidine par la CGTase de *Bacillus circulans*. (A)  $\alpha$ -fluorure de 4-tétra-hydropyrano-maltosyle ; (B) l'hésperidine (C) réaction de transfert, réalisée en présence de la CGTase (6  $\mu$ g), pendant 2h à 50°C, en utilisant 1,17  $\mu$ mol (0,5 mg) de donneur et 1,14  $\mu$ mol (0,7 mg) d'accepteur.

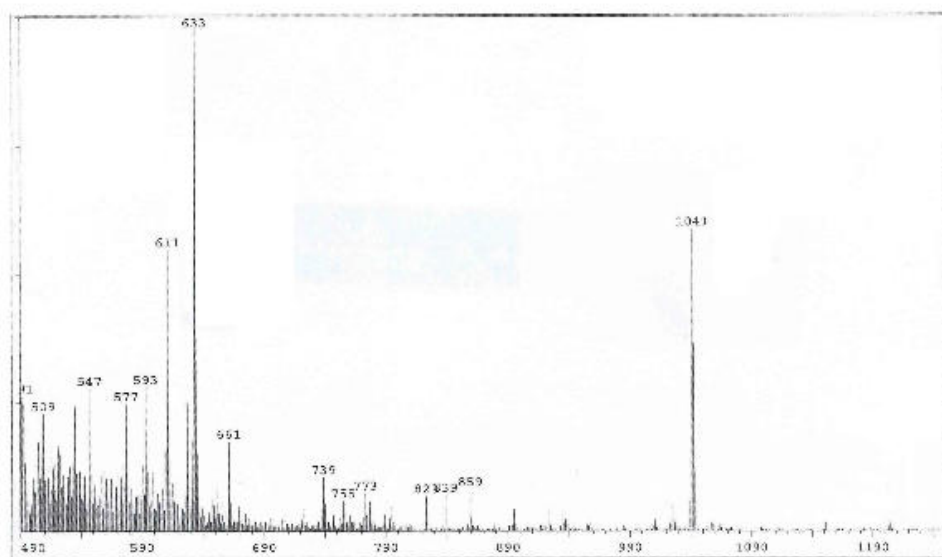


Fig. 6. L'analyse par la spectrométrie de masse de la réaction de transglycosylation de l'hésperidine par l'action catalytique de la CGTase de *Bacillus circulans*.

En réalisant l'analyse des milieux réactionnels par la spectrométrie de masse ont à vérifié que le produit de couplage obtenu est vraiment l'hésperidine glycosylée ( $[M+Na]^+ = 1041$ ). On a donc montré que la CGTase de *Bacillus circulans* accepte ce flavonoïde dans son site actif. Dans la Fig. 6 est présente le spectre de masse, qui a été réalisé sur un appareil Nermang 10-10 C.

Les testes de solubilité réalisés pour la l'hésperidine on a montré que ce flavonoïde présente la meilleure solubilité en DMSO (123 mg/ml), suivi de DMF (96.0 mg/ml) et de  $CH_3CN$  (0.90 mg/ml).

Dans le Tableau 1 sont présentés les résultats des cinétiques enzymatiques de couplage entre la  $\beta$ -cyclodextrine et le maltose par l'action catalytique de la CGTase de *Bacillus circulans* en milieux organiques testés. En absence de solvant organique l'activité enzymatique de la CGTase est égale à 6.38  $\mu\text{g}$   $\beta$ -CD couplée/ml/minute. Les activités enzymatiques résiduelles dans chaque milieu organique sont exprimées en pourcentage par rapport à cette valeur de référence.

Tous les tests réalisés pour trouver le meilleur solvant pour effectuer les réactions de transglycosylation en milieu organique nous ont montré que la CGTase garde une bonne activité résiduelle (57.3% et respectivement 50.6%) dans un milieu contenant 50%  $\text{CH}_3\text{CN}$  et respectivement 40% DMSO par comparaison au DMF dans lequel pour un pourcentage de 50% solvant en milieu l'activité enzymatique décroît rapidement (24.0%).

Les tests de solubilité de l'hespéridine avec les trois solvants nous ont démontré une meilleure solubilité de ce flavonoïde dans le DMSO (123 mg/ml), par rapport à DMF (96.0 mg/ml) ou  $\text{CH}_3\text{CN}$  (0.90 mg/ml).

Considérant que l'hespéridine, le flavonoïde que nous avons essayé le glycosyler présente la meilleure solubilité dans le DMSO et que la CGTase de *Bacillus circulans* garde une bonne activité résiduelle (50.6%) dans un milieu contenant 40% de celui-ci, on a démontré que le meilleur solvant pour effectuer la glycosylation de l'hespéridine est le DMSO.

Il nous reste à réussir d'améliorer le rendement de cette réaction. Ceci devrait être possible en jouant sur les conditions de réaction (quantité de donneur, quantité d'accepteur, quantité d'enzyme, temps de réaction).

Tableau 1

Les activités de transglycosylation de la CGTase de *Bacillus circulans*

DMSO			$\text{CH}_3\text{CN}$			DMF		
[DMSO] (%)	Activité enzymatique	Activité résiduelle (%)	[ $\text{CH}_3\text{CN}$ ] (%)	Activité enzymatique	Activité résiduelle (%)	[DMF] (%)	Activité enzymatique	Activité résiduelle (%)
0	6.38	100	0	6.38	100	0	6.38	100
10	3.96	62.2	10	5.7	89.3	10	3.75	58.8
20	3.78	59.2	20	4.7	74.0	20	3.63	56.9
30	3.61	56.9	30	4.2	66.0	30	2.89	46.8
40	3.23	50.6	40	3.75	58.9	40	2.67	41.9
50	1.74	27.2	50	3.65	57.3	50	1.53	24.0
60	ND	ND	60	2.10	33.0	60	0.96	15.2
70	ND	ND	70	1.39	21.9	70	0.95	15

## CONCLUSIONS

Les études effectuées pour l'obtention de glycoconjugués polyphénoliques ont montré que l'héspéridine est acceptée dans le site actif de la CGTase de *Bacillus circulans*, mais le rendement de la glycosylation reste encore faible.

Parmi tous les solvants testés, DMSO présente un intérêt particulier pour notre étude. Les tests de l'évaluation de l'activité de couplage entre la  $\beta$ -cyclodextrine et le maltose en présence de la CGTase de *Bacillus circulans* réalisés dans le DMSO, le DMF ou le CH<sub>3</sub>CN ont montré que l'enzyme conserve plus de 50% de son activité en milieux contenant 40% DMSO. En même temps l'héspéridine présente la meilleure solubilité dans le DMSO.

## RÉFÉRENCES

1. BRON, S., Plasmids, In : C.R. Harwood, S.M. Cutting, (Eds.) Modern Microbiological Methods for Bacillus, John Wiley & Sons, New York, Chichester, 1990, pp. 146–157.
2. HAVSTEEN, B.H., The biochemistry and biomedical significance of the flavonoids, Pharmacol. Therapeutics, 2002, **96**, 67–202.
3. KOMETANI, T., Y. TERADA, T. NISHIMURA, H. TAKII, S. OKADA, Transglycosylation to hesperidin by cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic Bacillus species in alkaline pH and properties of hesperidin glycosides, Biosci. Biotech. Biochem., 1994, **58**, 1990–1994.
4. KOMETANI, T., T. NISHIMURA, T. NAKAE, H. TAKII, S. OKADA, Synthesis of neohesperidin glycosides and naringin glycosides by cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic Bacillus species, Biosci. Biotech. Biochem., 1996, **60**, 645–649.
5. LEEMHUIS, H., J.H. ROZEBOOM, M. WILBRI, W. DIJKSTRA, L. DIJKHUIZEN, Conversion of cyclodextrin glucanotransferase into a starch hydrolase by directed evolution: the role of alanine 230 in acceptor subsite +1, Biochemistry, 2003, **42**, 7518–7526.
6. PENNINGA, D., J.H. ROZEBOOM, C. LAWSON, L. DIJKHUIZEN, W. DIJKSTRA, The raw starch binding domain of cyclodextrin glycosyltransferase from Bacillus circulans strain 251. J. Biol. Chem., 1996, **271**, 32777–32784.