

## Double publication

# LA GLYCOSYLATION DE LA LUTÉOLINE, EN MILIEUX DE SOLVANTES ORGANIQUES, PAR L'ACTION CATALYTIQUE DE LA CYCLODEXTRINE GLYCOSYLTRANSFERASE DE *BACILLUS CIRCULANS*

## LUTEOLIN GLYCOSYLATION IN ORGANIC SOLVENTS UNDER CATALYTIC ACTION OF CYCLODEXTRIN GLYCOSYLTRANSFERASE FROM *BACILLUS CIRCULANS*

Oana Laura RADU,<sup>a</sup> Sylvie ARMAND,<sup>a</sup> François LENOUEVEL,<sup>a</sup> Hugues DRIGUEZ,<sup>a</sup>  
Anișoara CÎMPEAN<sup>b</sup> et Dana IORDĂCHESCU<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Centre d'Etudes et de Recherches sur les Macromolécules Végétales, Domaine Universitaires 38401 Grenoble CEDEX 9, France

<sup>b</sup> Université Bucarest, Département de Biochimie, Spl. Independentei, Bucarest, Roumanie

Reçu le 22 septembre 2005

Cyclodextrine glycosyltransférase (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 la lutéoline par la CGTase de *Bacillus circulans* produite chez *Bacillus subtilis* transformé avec le plasmide pDP66K. La glycosylation de la lutéoline 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 la lutéoline augmente, ce qui va grandir par conséquent ses applications médicales.

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

## INTRODUCTION

Les flavonoïdes sont des métabolites polyphénoliques végétaux qui interviennent dans les processus de pigmentation des fleurs, la protection des 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 vu leur activité anti-athérosclérose, anti-inflammation, anti-thrombose, anti-ostéoporose, anti-tumorale. Particulièrement la lutéoline est reconnue pour sa capacité de stimuler certaines hormones estrogènes,<sup>1</sup> d'inhiber la croissance des cellules cancéreuses<sup>2</sup> et la tumorigénèse<sup>3</sup> et également de piéger l'action nocive des radicaux libres au niveau de l'ADN.<sup>4</sup>

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 différencient par leur solubilité en milieu aqueux. En fait, la solubilité des ces flavonoïdes est un facteur déterminant dans leurs applications thérapeutiques et peut être améliorée par des réactions de condensation avec des 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 certains désavantages quant au temps de réaction et la fréquence d'utilisation des solvants organiques chlorurés et des catalyseurs

\* Corresponding author : E-mail : oanalauraradu@yahoo.fr

métalliques. Pour ces raisons les méthodes de glycosylation par voie enzymatique ont commencé à être abordés ce dernier temps par de nombreuses équipes de recherche.

La nouvelle glycosylation des flavonoïdes natif-glycosylés augmenter a leur solubilité en milieu aqueux. La littérature mentionne notamment la glycosylation de l'héspéridine, de la neohéspéridine et de la naringine par une cyclodextrine glycosyltransférase (CGTase) produite par une souche de *Bacillus alcalophile*<sup>5</sup>.

La lutéoline est un flavonoïde ayant une faible solubilité en milieu aqueux qui, en plus des propriétés thérapeutiques mentionnées plus haut, a une action de baisse de l'hyperglycémie en diabète et aussi du poids en obésité.<sup>6</sup> Pourtant, la synthèse enzymatique des produits de glycosylation de la lutéoline n'a jamais, à ce jour, été décrite.

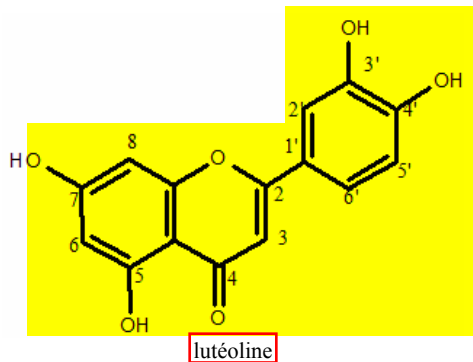
Dans cette étude nous présentons la glycosylation de la lutéoline en solvants organiques par l'action catalytique de la CGTase de *Bacillus circulans*. L'enzyme a été obtenue par techniques de biologie moléculaire et produite chez *Bacillus subtilis*.

## PARTIE EXPÉRIMENTALE

### Matériel

La cyclodextrine glycosyltransférase (CGTase) de *Bacillus circulans* a été obtenue en utilisant le vecteur d'expression le plasmide pDP66K.<sup>7</sup> Ce vecteur navette 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*)<sup>8</sup>. 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.<sup>9</sup> 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 sur Sépharose 6B (Sigma) activée par l' $\alpha$ -cyclodextrine.

L'accepteur flavonoïdique, la lutéoline utilisée dans le présent travail, est un préparé commercial produit par Sigma. La structure chimique de la lutéoline est la suivante :



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 sont : DMSO (Diméthylsulfoxyde), DMF (N, N'-Diméthylformamide) et CH<sub>3</sub>CN (Acétonitrile).

### Méthodes

Evaluation de l'activité de transglycosylation de la CGTase de *Bacillus circulans* en milieu de solvants organiques

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

Fig. 1 présente schématiquement le principe de cette méthode, qui suit la réaction de couplage entre  $\beta$ -cyclodextrine et maltose. La quantité de  $\beta$ -cyclodextrine qui a été consommée pendant la réaction de couplage catalysée par la CGTase est quantifiée à 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 incubée avec la 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% CH<sub>3</sub>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 phénolphtaléine (0,075 M) préparée dans le tampon carbonate de sodium 0,1 M pH 9,7.

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

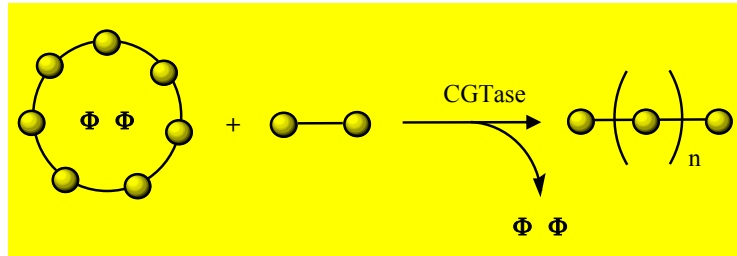


Fig. 1 – Réaction de couplage entre la  $\beta$ -cyclodextrine et le maltose.  $\text{O}-\text{O}$  :  $\alpha$ -D-Glc $p$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-Glc $p$  ;  $\Phi\Phi$  : phénolphtaléine.

#### Transglycosylation de la lutéoline

Le donneur d'unités glycosyles, l' $\alpha$ -fluorure de 4'-tétra-hydropyrano-maltosyle (0,5 mg ; 1,17  $\mu\text{mol}$ ) a été incubé avec la lutéoline (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  $\mu\text{L}$  de tampon phosphate 10 mM, pH 7, contenant 23,5%  $\text{CH}_3\text{CN}$  ou 20% DMSO ou 18% de DMF. Les produits de réaction sont analysés par chromatographie sur couche mince de gel de silice (Merk F<sub>254</sub>), élués avec un mélange acétonitrile/ $\text{H}_2\text{O}$  (8/2 v/v) et révélés par trempage dans une solution d'Orcinol (725 mL d'éthanol + 225 mL d'eau + 30 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  + 1 g d'Orcinol), puis par chauffage à 300°C avec une étape préliminaire de révélation sous lumière UV.

En Fig. 2 est présenté schématiquement le transfert d'unités glycosyles sur l'accepteur flavonoïdique.

#### Appareils

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).

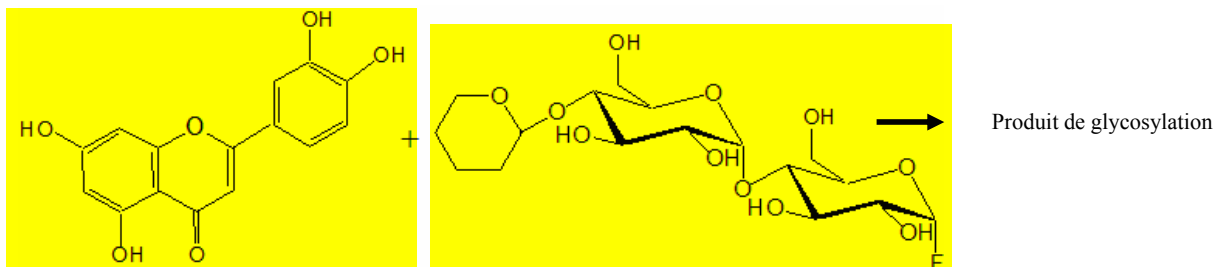


Fig. 2 – Réaction de couplage entre la lutéoline et l' $\alpha$ -fluorure de 4'-tétra-hydropyrano-maltosyle réalisée par l'action catalytique de la CGTase de *Bacillus circulans*.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

Avant de réaliser la glycosylation de la lutéoline en milieu de solvants organiques (DMSO, DMF et  $\text{CH}_3\text{CN}$ ), on a tout d'abord testé la solubilité de ce flavonoïde dans les trois solvants. Dans le même temps on a évalué l'activité de la CGTase de *Bacillus circulans* en milieu qui contient DMSO, DMF ou  $\text{CH}_3\text{CN}$ .

Les tests de solubilité réalisés pour la lutéoline ont montré que ce flavonoïde présente la meilleure solubilité en DMF (24,6  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), suivi par DMSO (2,7  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) et par  $\text{CH}_3\text{CN}$  (0,71  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

Dans le Tableau 1 sont présentés les résultats des cinétiques enzymatiques de couplage entre  $\beta$ -cyclodextrine et maltose par l'action catalytique de la CGTase de *Bacillus circulans* dans milieux organiques testés. En l'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%).

*Tableau 1*

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

DMSO			CH <sub>3</sub> CN			DMF		
[DMSO] (%)	Activité enzymatique	Activité résiduelle (%)	[CH <sub>3</sub> 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
<b>40</b>	<b>3,23</b>	<b>50,6</b>	40	3,75	58,9	40	2,67	41,9
50	1,74	27,2	<b>50</b>	3,65	<b>57,3</b>	<b>50</b>	1,53	<b>24,0</b>
60	ND	ND	60	2,10	33,0	60	0,96	15,2
70	ND	ND	70	1,39	21,9	70	0,95	15,0

Au contraire, les tests de solubilité de la lutéoline avec les trois solvants nous ont démontré une meilleure solubilité de la lutéoline dans le DMF (24,6 mg·mL<sup>-1</sup>) par rapport à DMSO (2,7 mg·mL<sup>-1</sup>) ou à l'acétonitrile (0,71 mg·mL<sup>-1</sup>).

L'analyse des produits de réaction, obtenue pendant la transglycosylation enzymatique de la lutéoline en milieux organiques 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. En Fig. 3, piste C, le spot entouré présente la lutéoline glycosylée. Sur la plaque chromatographique (piste C) on a observé aussi d'autres produits secondaires qui proviennent probablement de la dégradation spontanée du donneur d'unités glycosyles, 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 faible de glycosylation, observé sur la plaque chromatographique.

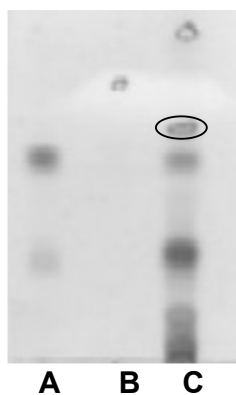


Fig. 3 – Analyse par chromatographie sur couche mince de gel de silice de la glycosylation de la lutéoline par la CGTase de *Bacillus circulans*.

(A)  $\alpha$ -fluorure de 4'-tétrahydropyrano-maltosyle ; (B) lutéoline non révélée par l'Orcinol; (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 1,05  $\mu$ mol (0,3 mg) d'accepteur.

La plaque contient un indicateur de fluorescence (la lutéoline est fluorescente), la révélation à l'Orcinol étant précédée d'une étape préliminaire de révélation sous UV.

En réalisant l'analyse des milieux réactionnels par la spectrométrie de masse on a vérifié que le produit de couplage obtenu est vraiment la lutéoline glycosylée (présence du 4'-tétrahydropyrano-maltosyle sur la molécule) ( $[M+Na]^+ = 717$ ). On a donc montré que la CGTase de *Bacillus circulans* accepte ce flavonoïde dans son site actif.

En Fig. 4 est présenté le spectre de masse, qui a été réalisé sur un appareil Nermang 10-10 C.

En même temps on a effectué une réaction témoin entre  $\alpha$ -fluorure de 4'-tétrahydropyrano-maltosyle et la lutéoline en l'absence de la CGTase. L'analyse de milieu du réaction par chromatographie sur couche mince de gel de silice n'a pas mis en évidence la formation d'un produit de réaction. En réalisant l'analyse du milieu réactionnel par la spectrométrie de masse on n'a obtenu aucun signal pour une valeur qui corresponde à la lutéoline glycosylée ( $[M+Na]^+ = 717$ ), ce qui démontre que le transfert d'un résidu glucidique sur le flavonoïde a été réalisé par voie enzymatique.

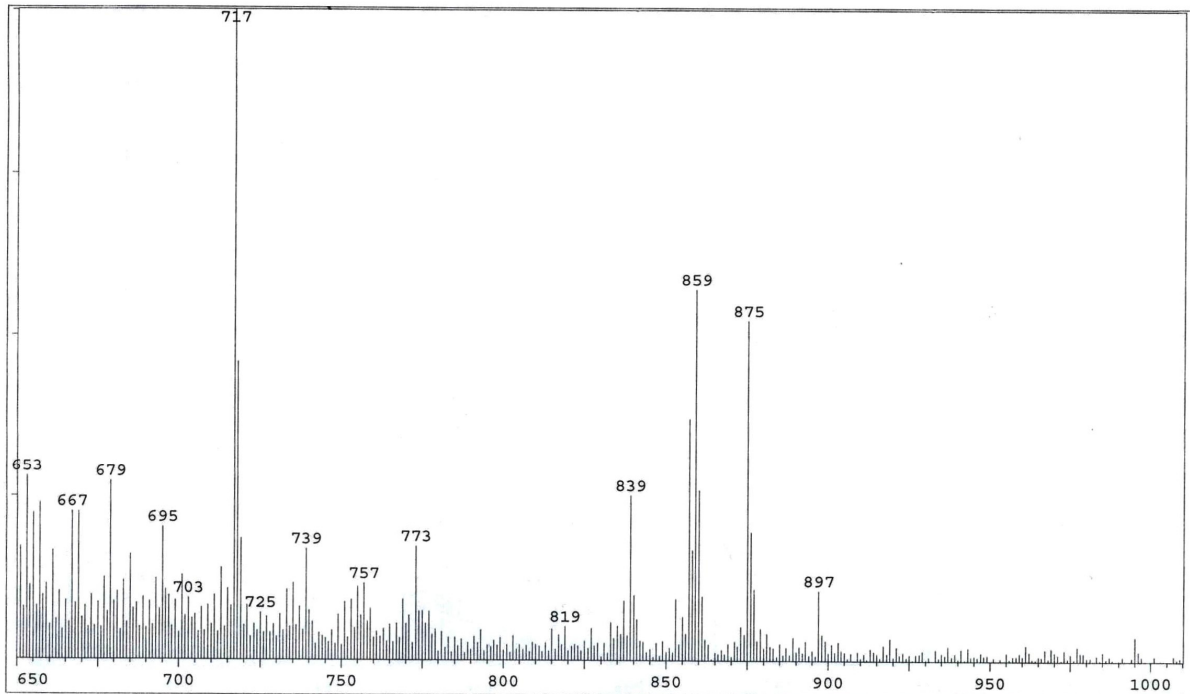


Fig. 4 – L'analyse par la spectrométrie de masse de la réaction de transglycosylation de la lutéoline par l'action catalytique de la CGTase de *Bacillus circulans*.

Sur la base de l'hypothèse que la solubilité d'un flavonoïde en milieu aqueux est d'autant plus grande que le taux de glycosylation est élevé, nous avons tenté de coupler la lutéoline à l' $\alpha$ -cyclodextrine, le substrat naturel de la CGTase, connu pour être le meilleur donneur dans une telle réaction de transglycosylation. Fig. 5 présente la réaction de la transglycosylation de la lutéoline quand le donneur est l' $\alpha$ -cyclodextrine.

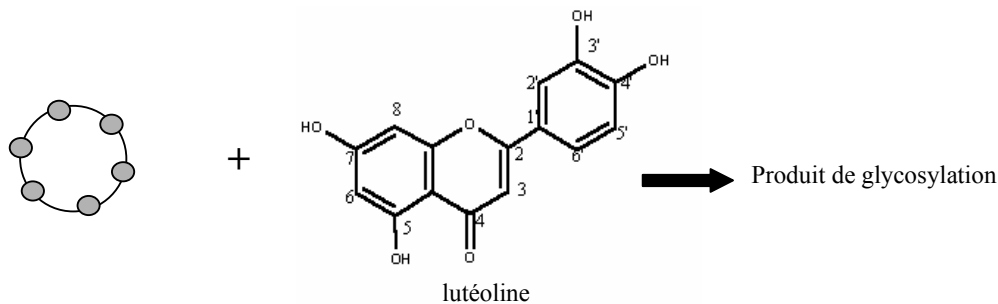



Fig. 5 – Réaction de couplage entre la lutéoline et l' $\alpha$  cyclodextrine réalisée par la CGTase de *Bacillus circulans*.  :  $\alpha$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Glcp.

Nous espérons ainsi pouvoir transférer jusqu'à 6 résidus glycosyle sur la lutéoline. L'analyse par spectrométrie de masse a malheureusement révélé la présence d'un glycoconjugué polyphénolique ne possédant qu'un glucose ( $[M+Na]^+ = 417$ ). Ce résultat peut être expliqué par l'activité d'hydrolyse de la CGTase, qui après avoir couplé l' $\alpha$ -cyclodextrine sur la lutéoline est capable d'hydrolyser la chaîne malto-oligosaccharidique. Les données de la littérature<sup>10</sup> mentionnent que l'enzyme est capable de catalyser plusieurs types de réactions : cyclisation, couplage, transfert et hydrolyse.

A ce jour, le meilleur résultat obtenu est donc le couplage de la lutéoline à un résidu maltosyle, c'est-à-dire à un disaccharide.

Il serait maintenant intéressant d'isoler le produit de couplage afin de caractériser la liaison entre la structure glucidique et le flavonoïde. En effet, la lutéoline possède 4 hydroxyles libres qui représentent tous des sites potentiels de glycosylation.

## CONCLUSIONS

L'évaluation de l'activité de couplage entre  $\beta$ -cyclodextrine et maltose en présence de la CGTase de *Bacillus circulans* dans les trois solvants testés a montré que l'enzyme conserve plus de 50% de son activité en milieu contenant jusqu'à 40% DMSO ou 50% CH<sub>3</sub>CN. Par contre, la CGTase est moins stable en DMF, conservant environ 24% de son activité lorsque la réaction de transglycosylation est réalisée en milieu contenant 50% de ce solvant. Considérant que la lutéoline, le flavonoïde que nous avons essayé de glycosyler, présente la meilleure solubilité dans le DMF, idéalement il aurait été que la CGTase garde une bonne activité catalytique dans ce solvant. Une alternative consiste à générer, par évolution moléculaire, un mutant de la cyclodextrine glycosyltransférase plus stable en milieu organique (DMF) afin d'accroître la solubilité du flavonoïde lors de la réaction de glycosylation catalysée par l'enzyme et donc avec un rendement accru de la réaction.

Les études effectuées pour l'obtention de glycoconjugués polyphénoliques ont montré que la lutéoline est acceptée dans le site actif de la CGTase de *Bacillus circulans*. A ce jour, le meilleur résultat obtenu est donc le couplage de la lutéoline à un résidu maltosyle, c'est-à-dire à un disaccharide, mais la quantité de produit formé est faible.

## RÉFÉRENCES

1. R.S. Zand, D.J.A. Jenkins and E. Diamandis, *Breast Cancer Res. Treat.*, **2000**, *62*, 35- 49.
2. Y. Matsukawa, N. Marui, T. Sakai, Y. Satomi, M. Yoshida and K. Matsumoto, *Cancer Res.*, **1993**, *53*, 1328-1331.
3. V. Elangovan, N. Sekar and S.Govindasamy, *Cancer Lett.*, **1994**, *87*, 107-113.
4. C. Qiuyin, O.R.Ronald and Z.Ruiwen, *Cancer Lett.*, **1997**, *119*, 99-107.
5. T. Kometani, T. Nishimura, T. Nakae, H. Takii and S. Okada, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **1996a**, *60*, 645-649.
6. J.B.Harborne and C.A. Williamns, *Phytochemistry*, **2000**, *55*, 481- 504.
7. D. Penninga, J. Henriette Rozeboom, C. Lawson, L. Dijkhuizen and W. Dijkstra, *J. Biol. Chem.*, **1996**, *271*, 32777-32784.
8. H. Leemhuis, J. Rozeboom, M. Wilbri, W. Dijkstra and L. Dijkhuizen, *Biochemistry*, **2003**, *42*, 7518-7526.
9. S. Bron, *Modern Microbiological Methods for Bacillus*, **1990**, 146-147.
10. A. van der Veen, J.C.M. Uitdehaag, D. Penninga, W. M. van Alebeek, L.M. Smith, W. Dijkstra and L. Dijkhuizen, *J. Mol. Biol.*, **2000**, *296*, 1027-1038.