

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
4 février 2016 (04.02.2016)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2016/016544 A1

(51) Classification internationale des brevets :
C12N 9/10 (2006.01) C12P 19/08 (2006.01)
A23L 1/308 (2006.01) C12P 19/18 (2006.01)

de Gasogne, F-31820 Pibrac (FR). FONTAGNE-FAUCHER, Catherine; L'Haouré, Chemin de Beaupuy, F-32600 L'Isle Jourdain (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2015/052002

(74) Mandataire : CABINET PLASSERAUD; 52 rue de la Victoire, F-75440 Paris Cedex 09 (FR).

(22) Date de dépôt international :
21 juillet 2015 (21.07.2015)

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
14 57264 28 juillet 2014 (28.07.2014) FR

(71) Déposants : INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUÉES DE TOULOUSE [FR/FR]; 135 avenue de Ranguéil, F-31077 Toulouse Cedex 4 (FR). INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE [FR/FR]; 147 rue de l'Université, F-75007 Paris (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3 rue Michel Ange, F-75016 Paris (FR). UNIVERSITE PAUL SABATIER TOULOUSE III [FR/FR]; 118 route de Narbonne, F-31400 Toulouse (FR).

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasiatique (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventeurs : VUILLEMIN, Marlène; Domaine de la Cheneraie, 12 avenue Latecoere, F-31520 Ramonville-Saint-Agne (FR). CLAVERIE, Marion; 4 rue Sully, F-64800 Benejacq (FR). MOULIS, Claire; Lazières, F-31290 Vielleveigne (FR). REMAUD-SIMEON, Magali; 1 rue Benjamin Charrié, F-31520 Ramonville-Saint-Agne (FR). MONSAN, Pierre; 22 chemin de la Gravette, F-31700 Mondonville (FR). SEVERAC, Etienne; 13 avenue

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))
- avec la partie de la description réservée au listage des séquences (règle 5.2.a))



WO 2016/016544 A1

(54) Title : PROTEIN WITH DEXTRAN-SACCHARASE ACTIVITY, AND USES

(54) Titre : PROTEINE A ACTIVITE DEXTRANE-SACCHARASE ET APPLICATIONS

(57) Abstract : The invention relates to: - a protein having dextran-saccharase activity and the sequence SEQ ID NO : 1 for an amino acid sequence; - a protein having dextran-saccharase activity and the sequence SEQ ID NO : 2 for an amino acid sequence; - a complex containing a substrate and a protein with dextran-saccharase activity - a method for synthesizing dextrans; and - dextrans. The invention also relates to a method for synthesizing gluco-oligosaccharides and gluco-conjugates and to the resulting products.

(57) Abrégé : L'invention concerne une protéine à activité dextrane-saccharase ayant pour séquence d'acides aminés la séquence SEQ ID NO : 1, une protéine à activité dextrane-saccharase ayant pour séquence d'acides aminés la séquence SEQ ID NO : 2, un complexe comprenant un support et une protéine à activité dextrane-saccharase, un procédé de synthèse de dextrans, ainsi que des dextrans. L'invention concerne également un procédé de synthèse de gluco-oligosaccharides et de gluco-conjugués, et les produits obtenus.

PROTEINE A ACTIVITE DEXTRANE-SACCHARASE ET APPLICATIONS

L'invention a pour objet une protéine à activité dextrane-saccharase issue de la souche *Leuconostoc citreum* NRRL B-1299, notamment une protéine à activité dextrane-saccharase tronquée. L'invention concerne également un procédé de synthèse de dextrans au moyen
5 d'une telle protéine à activité dextrane-saccharase, ainsi que les dextrans synthétisés.

Par la suite, pour plus de clarté le terme « dextrane-saccharase » pourra parfois être utilisé pour désigner une protéine à activité dextrane-saccharase.

10

Les glucane-saccharases d'origine bactérienne sont des α -transglucosylases appartenant aux familles 13 et 70 des glycoside-hydrolases. A partir de saccharose, ces enzymes catalysent généralement la synthèse d' α -glucanes de haute masse molaire (10^6 - 10^9 g.mol⁻¹). Elles peuvent également synthétiser des oligosaccharides ou glucoconjugués par réaction de
15 transglucosylation sur des accepteurs exogènes de natures variées. Les glucanes-saccharases présentent des spécificités de produits différentes, tant au niveau de la nature des liaisons osidiques synthétisées (α -1,2 ; α -1,3 ; α -1,4 ou α -1,6) et leur organisation, que de la taille des produits formés.

De manière générale, les glucanes-saccharases sont naturellement produites par des
20 bactéries lactiques, par exemple des genres *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* ou *Weissela* sp.

Parmi les glucane-saccharases, les dextrane-saccharases produisent du dextrane,
25 présentant de manière générale au moins 50% de liaisons osidiques α -1,6 dans la chaîne principale, et éventuellement des ramifications en α -1,2, α -1,3 et/ou α -1,4. Le taux de ramifications ainsi que leur arrangement spatial varient suivant l'enzyme productrice.

Les dextrans et les dérivés de dextrans ont un nombre d'applications industrielles
30 croissant, souvent dépendant de leurs masses molaires.

Sauf indication contraire, on entend par « *masse molaire* » ou « *masse molaire moyenne* », dans la présente invention, la masse molaire moyenne en poids, exprimée indépendamment en g.mol⁻¹ ou Da.

Les dextrans de masse molaire faible ou moyenne (allant généralement de 10^3 à 7.10^4 g.mol⁻¹) sont notamment utilisés pour des applications analytiques, dans le domaine médical, par exemple en tant qu'extenseur du plasma sanguin grâce à leur faible caractère antigénique et leur faible viscosité en solution saline, pour des solutions ophtalmiques, transporteur de fer ou anticoagulant (après fonctionnalisation), dans la prévention des chocs post-opératoires, dans le traitement des brûlures ou dans la réduction de risques de thrombose ou d'embolies, etc.

Ces dextrans de masse molaire faible ou moyenne sont en général produits par hydrolyse acide, suivi d'un fractionnement à l'aide de solvants organiques. Cependant, ces procédés chimiques sont souvent coûteux, peu rentables et polluants.

Des procédés alternatifs ont donc été développés afin d'améliorer la production de dextrans de masse molaire faible ou moyenne.

Ainsi, le brevet US 5,229,277 décrit un procédé de synthèse de dextrans de faible masse molaire en mettant en œuvre l'utilisation de *Leuconostoc mesenteroides* et une souche mutante de *Lipomyces starkeyi* ATCC 74054. Ce procédé, en plus de requérir l'utilisation de deux microorganismes, nécessite des conditions de culture particulières et des durées et températures précises pour que l'activité dextranase identifiée chez *Lipomyces starkeyi* ATCC 74054 réduise la masse molaire des dextrans synthétisés par *Leuconostoc mesenteroides*. Les polymères de dextrane produits ont une masse molaire comprise entre 4.10^4 et $1,5.10^5$ Da.

La demande de brevet EP2365084 décrit un procédé de synthèse de dextrans de masse molaire contrôlée. Ces α -glucanes sont produits directement par des formes tronquées de la glucane-saccharase DsrS, issue de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F, à partir de saccharose, avec l'ajout optionnel d'un accepteur exogène. Un variant DsrS Core ΔA est particulièrement intéressant pour la production de dextrane de masse molaire moyenne de 1.10^4 Da.

Cependant la synthèse doit se faire à des températures faibles (préférentiellement à 10 °C) afin de maximiser les rendements. De plus l'enzyme ne présente pas une grande efficacité catalytique, et environ 48 heures de synthèse sont nécessaires pour atteindre la consommation totale du saccharose.

Il est aussi possible de favoriser la production de dextranses de faible masse molaire en augmentant la concentration initiale en substrat. Cependant, il a été souvent démontré avec cette méthode que le dextrane produit était bien souvent polydispersé, et que la synthèse de polymères de haute masse molaire n'était pas complètement annihilée.

5

Il existe donc toujours un besoin pour la production de dextranses ayant une faible masse molaire, notamment des dextranses peu polydispersés.

Un objectif de l'invention était également de fournir des dextranses linéaires. De tels dextranses sont en effet utiles dans de nombreux domaines, notamment pour des applications médicales. En effet, il a été montré que les dextranses présentant une forte teneur en liaisons α -1,6 (et donc les plus linéaires) sont ceux qui entraînent le moins de réactions allergènes (1, 2).

Un autre objectif de l'invention était également de fournir un procédé de production de tels dextranses de manière enzymatique, et non chimique, et de manière simple, rapide et précise, ne nécessitant l'utilisation que d'un unique microorganisme.

Un autre objectif de l'invention était de pouvoir maîtriser la masse molaire d'un dextrane synthétisé de manière très précise, notamment au moyen de paramètre(s) de réaction aisément contrôlable(s).

Les inventeurs ont ainsi le mérite d'avoir découvert qu'une protéine à activité dextrane-saccharase issue de la souche *Leuconostoc citreum* NRRL B-1299 permet la synthèse de dextranses de masse molaire contrôlable de manière très précise, et ceci, sans nécessiter de réactions enzymatiques contraignantes, directement à partir de saccharose et sans ajout d'accepteur exogène ou d'autre(s) enzyme(s).

Une telle protéine a pour séquence d'acides aminés la séquence SEQ ID NO : 1. La protéine ne possède qu'un maximum d'identité de 62% sur 100% de sa séquence avec l'alternane-saccharase de *Leuconostoc mesenteroides* LBAE C11 dont la séquence est disponible dans les bases de données sous le numéro d'accès Genbank WP_004904957.1. Comparé à d'autres séquences putatives de glucane-saccharases pouvant être identifiées suite à des campagnes de séquençage de génomes bactériens, ce pourcentage d'identité est plutôt faible.

La protéine à activité dextrane-saccharase de séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 1, appelée DsrM, de masse molaire 229 kDa, est composée de 2065 acides aminés, possédant la triade catalytique DED et les 4 motifs conservés décrits habituellement chez les enzymes de la famille 70 des glycoside-hydrolases. Les motifs protéiques conservés du cœur catalytique (I à IV) ont ainsi été identifiés de la position 1177 à la position 1183 pour le motif I, de la position 673 à la position 683 pour le motif II, de la position 710 à la position 721 pour le motif III et de la position 785 à la position 799 pour le motif IV. En comparaison avec la séquence protéique de la glucane-saccharase GTF-180, les cinq domaines structuraux classiquement décrits pour les glucane-saccharases (A, B, C, IV et V) (3) peuvent être identifiés dans la structure primaire de la protéine à activité dextrane-saccharase de séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 1 (figure 1).

Les variants conservateurs de fonction de la protéine à activité dextrane-saccharase de séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 1 sont également compris dans la présente demande.

On appelle « *variant conservateur de fonction* », un variant dans lequel un ou plusieurs résidu(s) d'acide aminé donné(s) dans une protéine a (ont) été modifié(s) ou supprimé(s) ou inséré(s) sans pour autant altérer la conformation globale et l'activité enzymatique de la protéine à activité dextrane-saccharase. L'activité enzymatique d'un variant de dextrane-saccharase peut être testée selon des techniques connues de l'homme du métier, par exemple par la méthode à l'acide dinitrosalicylique (DNS) de Sumner et Howell (4) ou par analyse HPLC.

De préférence, un tel variant conservateur de fonction est une protéine à activité dextrane-saccharase dont la séquence d'acides aminés a au moins 80%, de préférence 85%, de préférence encore 90%, de préférence encore 95%, de préférence encore 98% d'identité sur la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 1.

De manière avantageuse, la ou les modification(s) concernent des parties non sensibles de l'enzyme, et ne concernent donc notamment pas la zone allant de la position 563 à la position 1282 de la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 1, correspondant à la triade catalytique et aux domaines A, B, C.

De préférence, la ou les modifications ne concernent notamment pas la zone allant de la position 563 à la position 1282 de la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 1 ainsi que les zones allant de la position 1316 à 1433 (partie du domaine V en C-terminal) de la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 1.

5 De préférence encore, la ou les modifications ne concernent notamment pas la zone allant de la position 563 à la position 1282 de la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 1, les zones allant de la position 1316 à 1433 de la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 1 ainsi que les zones allant de la position 174 à 421 de la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 1.

10 Les séquences allant des positions 174 à 421, puis de 1316 à 1433 comportent en effet des unités répétées (YG repeats) généralement décrites dans cette famille pour avoir une affinité pour le glucane et donc jouer un rôle sur la taille des produits formés, ainsi que sur l'activité catalytique de l'enzyme (3).

De préférence encore, la ou les modifications ne concernent notamment pas la zone allant de la position 563 à la position 1282 de la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 1, les zones allant de la position 1316 à 1433 de la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 1 ainsi que les zones allant de la position 42 à 421 de la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 1.

20 Ainsi, il a été mis en évidence lors d'essais de troncature de la dextrane-saccharase de séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 1 que la suppression des acides aminés de la position 1434 à 2065 du domaine V à l'extrémité C-terminale, dont notamment la totalité des « motifs APY », n'impactait pas l'activité et la spécificité de l'enzyme (cf. figure 2, dextrane-saccharase tronquée DsrM Δ PS Δ C-APY).

25 En revanche, il a été mis en évidence que la suppression des acides aminés de la position 1 à 174 et de la position 1317 à 2065 de la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 1 (domaine V à l'extrémité C-terminale), faisait perdre à l'enzyme son activité (cf. figure 2, dextrane-saccharase tronquée DsrM Δ 174-1317).

30 L'homme du métier est capable de déterminer les variants conservateurs de fonction, notamment au regard de ces éléments.

Ainsi, un objet de l'invention est une protéine à activité dextrane-saccharase ayant pour séquence d'acides aminés la séquence SEQ ID NO : 1, ou comprenant au moins 80%, de préférence 85%, de préférence encore 90%, de préférence encore 95%, de préférence encore

98% d'identité sur les positions 563 à 1282 de la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 1, de préférence sur les positions 563 à 1282 et 1316 à 1433 de la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 1, de préférence encore sur les positions 563 à 1282, 1316 à 1433 et 174 à 421 de la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 1, de préférence encore sur les positions 563 à 1282, 1316 à 1433 et 42 à 421 de la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 1.

Selon un mode de réalisation particulier, un variant conservateur de fonction consiste en une forme tronquée d'une protéine à activité dextrane-saccharase telle que définie précédemment et qui conserve l'activité enzymatique dextrane-saccharase.

10

De préférence, une telle forme tronquée comprend moins de 2065 acides aminés, de préférence moins de 1600 acides aminés, de préférence encore moins de 1450 acides aminés. Très préférentiellement, une telle forme tronquée comprend 1392 acides aminés.

15

Selon un mode de réalisation particulier, une telle forme tronquée de la protéine à activité dextrane-saccharase de séquences d'acides aminés SEQ ID NO : 1 a pour séquence d'acides aminés la séquence SEQ ID NO : 2. Cette forme tronquée particulière est appelée DsrM Δ PS Δ C-APY.

20

La séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 2 est identique à la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 1 de la position 42 à la position 1433, et a été déléetée des positions 1 à 41 et 1434 à 2065 de la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 1. Comme mentionné précédemment, il a ainsi été mis en évidence que la suppression de ces acides aminés, dont notamment la totalité des « motifs APY », n'impacte pas l'activité et la spécificité de l'enzyme.

25

Par ailleurs, la protéine à activité dextrane-saccharase de séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 2 ne dépasse pas 54% d'identité, et 68% de similarité, avec les séquences protéiques de DsrS et ses variants DsrS vardel Δ 3, DsrS vardel Core et DsrS Core Δ A (cf. la demande de brevet EP2365084).

30

Les variants conservateurs de fonction de la protéine à activité dextrane-saccharase de séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 2 sont également compris dans la présente demande et sont définis de la même façon que précédemment.

Ainsi, de préférence, la ou les modifications peuvent concerner des parties non sensibles de l'enzyme, et ne concernent donc notamment pas la zone allant de la position 522 à la position 1241 de la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 2, correspondant à la triade catalytique et aux domaines A, B, C.

5 De préférence, la ou les modifications ne concernent notamment pas la zone allant de la position 522 à la position 1241 de la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 2 ainsi que les zones allant de la position 1275 à 1392 (partie du domaine V en C-terminal) de la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 2.

10 De préférence encore, la ou les modifications ne concernent notamment pas la zone allant de la position 522 à la position 1241 de la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 2, les zones allant de la position 1275 à 1392 de la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 2 ainsi que les zones allant de la position 133 à 380 de la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 2.

15 De préférence encore, la ou les modifications ne concernent notamment pas la zone allant de la position 522 à la position 1241 de la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 2, les zones allant de la position 1275 à 1392 de la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 2 ainsi que les zones allant de la position 1 à 380 de la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 2.

Ainsi, un objet de l'invention concerne une protéine à activité dextrane-saccharase ayant pour séquence d'acides aminés la séquence SEQ ID NO : 2, ou comprenant au moins
20 80%, de préférence 85%, de préférence encore 90%, de préférence encore 95%, de préférence encore 98% d'identité sur les positions 522 à 1241 sur la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 2, de préférence sur les positions 522 à 1241 et 1275 à 1392 sur la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 2, de préférence encore sur les positions 522 à 1241, 1275 à 1392 et 133 à 380 sur la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 2, de préférence encore sur les positions
25 522 à 1241, 1275 à 1392 et 1 à 380 sur la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 2.

Par la suite, le terme « protéine à activité dextrane-saccharase de séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 2 » (ou « dextrane-saccharase de séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 2 ») se rapporte aussi bien à la protéine à activité dextrane-saccharase de séquence
30 d'acides aminés SEQ ID NO : 2 qu'à ses variants conservateurs de fonction. Selon un mode de réalisation particulier, il s'agit uniquement de la protéine à activité dextrane-saccharase de séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 2.

Les propriétés fonctionnelles exceptionnelles d'une dextrane-saccharase selon l'invention ont été mises en évidence par les inventeurs.

5 Une protéine à activité dextrane-saccharase selon l'invention est exclusivement spécifique de la polymérisation par liaisons osidiques de type α -1,6, et de surcoût est une excellente polymérase. En effet, comme mis en évidence dans la partie expérimentale, les analyses chromatographiques réalisées suite à une synthèse de dextrane à partir de 100 g.L⁻¹ de saccharose montrent qu'environ 85% et 81% des unités glucosyle issues du saccharose sont utilisées pour la production du polymère lors de l'utilisation respective d'une dextrane-
10 saccharase de séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 2 et d'une dextrane-saccharase de séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 1.

En outre, une protéine à activité dextrane-saccharase selon l'invention a une température optimale de fonctionnement comprise entre 30 °C et 45 °C, et a un pH optimal
15 compris entre 4 et 7, plus précisément entre 4,5 et 5,75 pour une protéine à activité dextrane-saccharase de séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 2, et entre 5 et 7 pour une protéine à activité dextrane-saccharase de séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 1.

Une dextrane-saccharase selon l'invention offre ainsi une large gamme d'utilisation en termes de pH et de températures. Notamment, l'enzyme conserve plus de 80% de son activité
20 sur une large gamme de températures, notamment jusqu'à 45 °C, ce qui est très rare chez les enzymes de la famille 70 des glycoside-hydrolases. Or, la mise en œuvre de la synthèse de dextrans à des températures élevées, par exemple environ 45 °C, permet de limiter certaines contaminations microbiennes. Cette large gamme d'utilisation rend par conséquent la dextrane-saccharase selon l'invention très attractive pour des utilisations industrielles.

25 Selon un mode de réalisation particulier, une protéine à activité dextrane-saccharase selon l'invention peut être préparée par des techniques connues de recombinaison génétique.

L'homme du métier saura utiliser les technologies de biologie moléculaire et saura
30 choisir un système d'expression adapté selon les techniques qui lui sont connues. On peut ici se référer aux résultats expérimentaux ci-après.

Le terme "*système d'expression*" comprend une cellule hôte et un vecteur compatible dans des conditions appropriées, c'est-à-dire des conditions permettant l'expression du gène

codant pour la protéine d'intérêt, porté par le vecteur et introduit dans la cellule hôte. Typiquement, la séquence d'acides nucléiques codant une protéine à activité dextrane-saccharase selon l'invention, peut être insérée dans un vecteur d'expression approprié qui sera alors introduit dans une cellule hôte procaryote ou eucaryote adéquate.

5

Tout vecteur d'expression approprié et connu de l'homme du métier peut être utilisé selon l'invention. Un vecteur d'expression est typiquement un plasmide, un cosmide, un épisome, un chromosome artificiel, un phage ou un vecteur viral. De manière avantageuse, le vecteur d'expression utilisé est pET-53-DEST, pET-55-DEST, pET-60-DEST ou pBAD-
10 DEST49.

Typiquement, l'expression des acides nucléiques de la présente invention peut être réalisée dans des cellules hôtes procaryotes ou eucaryotes. Comme exemples non limitatifs de souches de cellule hôte procaryotes, on peut citer des souches telles que *Escherichia coli*,
15 *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* ou des souches du genre *Pseudomonas*, *Streptomyces* et *Staphylococcus*. Comme exemples non limitatifs de souches de cellules hôtes eucaryotes, on peut citer des souches telles que des parasites *Apicomplexan* (*Plasmodia*, *Toxoplasma*, *Cryptosporidia*) *Leishmania* ou *Trypanosoma*, ou des cellules de levure telles que *Saccharomyces sp.* comme *Saccharomyces cerevisiae* ou *pombe*, *Pichia pastoris* etc.

20

De manière préférentielle, des cellules hôtes procaryotes sont utilisées. Selon un mode de réalisation avantageux, les cellules utilisées pour l'expression des acides nucléiques de la présente invention sont *Escherichia coli* et de manière encore préférentielle, les souches sont choisies parmi TOP10, BL21-AI, BL21 Star DE3, Arctic Express DE3.

25

Selon un mode de réalisation particulier dans lequel la dextrane-saccharase selon l'invention est une dextrane-saccharase tronquée telle que précédemment définie, la séquence d'acides nucléiques codant une dextrane-saccharase de séquence d'acides aminés SEQ ID
30 NO : 2 telle que précédemment décrite, est insérée dans un vecteur d'expression pET-55-DEST, alors introduit dans une cellule hôte procaryote de type *Escherichia coli* BL21 Star DE3. Ce mode de réalisation permet de produire la dextrane-saccharase, et permet d'obtenir environ 10 000 Unités d'activité enzymatique par litre de culture.

Une dextrane-saccharase selon l'invention peut être préparée par culture de cellules hôtes contenant une séquence d'acide nucléique codant une dextrane-saccharase selon l'invention, dans des conditions permettant l'expression d'une dextrane-saccharase, et par isolement de ladite dextrane-saccharase du milieu de culture selon les techniques connues de l'homme du métier.

De telles dextrane-saccharases peuvent ensuite être purifiées par toute technique de purification connue de l'homme du métier, par exemple par précipitation, chromatographie par échange d'ions, chromatographie d'affinité, chromatographie d'échange hydrophobe, filtration sur gel, chromatographie HPLC en phase inverse, etc. Selon un mode de réalisation préférentiel, la dextrane-saccharase obtenue par culture de cellules hôtes est purifiée par chromatographie d'affinité.

De manière avantageuse, une dextrane-saccharase selon l'invention peut également être immobilisée par des techniques connues de l'homme du métier, par exemple, par formation de liaisons ioniques et/ou hydrophobes entre le support et la protéine (adsorption), formation de liaisons covalentes entre le support et la protéine, inclusion de la protéine dans le support ou encapsulation de la protéine dans le support. L'immobilisation d'une dextrane-saccharase selon l'invention constitue un mode de réalisation particulièrement avantageux selon l'invention, comme il sera vu ci-après.

En raison de leurs propriétés dextrane-saccharase remarquables, les protéines à activité dextrane-saccharase selon l'invention permettent en outre la synthèse de dextrans. L'homme du métier saura adapter les conditions expérimentales à appliquer pour avoir une production optimisée de dextrane. D'une manière générale, la dextrane-saccharase doit être incubée dans un milieu de synthèse contenant du saccharose.

Par conséquent, un objet de l'invention se rapporte à un procédé de synthèse de dextrans, dans lequel :

- on fournit du saccharose dans un milieu de synthèse,
- on met en contact une dextrane-saccharase selon l'invention avec ledit saccharose dans ledit milieu de synthèse pour former des dextrans,
- on isole optionnellement les dextrans obtenus.

De manière avantageuse, le pH utilisé pour le procédé de synthèse est compris entre 4 et 7, de préférence entre 4,5 et 5,75 pour une dextrane-saccharase de séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 2, et entre 5 et 7 pour une dextrane-saccharase de séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 1. Typiquement, le pH utilisé pour le procédé de fabrication est d'environ 5,75.

5

Le milieu de synthèse peut être tout milieu connu de l'homme du métier et adapté à la synthèse de dextrans selon l'invention. De préférence, le milieu de synthèse est un milieu liquide comprenant un solvant. L'homme pourra notamment utiliser tout solvant permettant d'atteindre le pH souhaité pour la synthèse. Ainsi, ledit solvant pourra, de manière illustrative, être choisi parmi l'eau, ou une solution tampon appropriée (par exemple l'acétate de sodium).

10

L'homme du métier saura adapter la durée de la synthèse, en particulier en fonction de la quantité de protéine à activité dextrane-saccharase ajoutée dans le milieu de synthèse et en fonction de la température. Ainsi, une durée de synthèse plus longue sera nécessaire lorsque de fortes concentrations de saccharose dans le milieu de synthèse seront utilisées, par exemple de l'ordre de 400 g.L⁻¹ à 600 g.L⁻¹. Typiquement, à une concentration enzymatique de 1 U.mL⁻¹, la synthèse est conduite pendant une durée comprise entre 4 heures et 24 heures, de préférence comprise entre 8 heures et 16 heures, de préférence pendant une durée d'environ 14 heures.

20

De manière particulièrement avantageuse, de larges gammes de température et de concentrations initiales en substrat peuvent être utilisées, celles-ci permettant en outre le contrôle précis de la masse molaire des dextrans obtenus.

De manière générale, la concentration en saccharose dans le milieu de synthèse peut être comprise entre 50 et 600 g.L⁻¹, de préférence entre 50 et 400 g.L⁻¹. Typiquement, on utilisera des concentrations en saccharose dans le milieu de synthèse entre 50 et 200 g.L⁻¹ pour des dextrans à masse molaire plus élevée, et on utilisera des concentrations en saccharose dans le milieu de synthèse entre 200 et 600 g.L⁻¹, de préférence entre 200 et 400 g.L⁻¹ pour des dextrans à masse molaire plus faible. Il est en effet déjà connu que la masse molaire moyenne du dextrane synthétisé sera susceptible d'être plus élevée en utilisant une concentration initiale en saccharose faible dans le milieu de synthèse.

30

Par ailleurs, de manière générale, la synthèse peut être conduite à une température comprise entre 20 °C et 50 °C, de préférence comprise entre 25 °C et 45 °C. Comme mentionné précédemment, une utilisation de l'enzyme sur une large gamme de températures, notamment jusqu'à 45 °C, est très rare chez les enzymes de la famille 70 des glycoside-
5 hydrolases. Or, la mise en œuvre de la synthèse de dextranses à des températures élevées, par exemple environ 45 °C, permet de limiter certaines contaminations microbiennes.

Par ailleurs, il a été montré dans de précédents travaux qu'une augmentation de la température permettait l'obtention de dextranses de masses molaires plus élevées (5,6). Or, il a
10 ici été mis en évidence de manière surprenante que, au contraire, lors de la synthèse de dextranses au moyen d'une dextransaccharase selon l'invention, une diminution de la température induisait des dextranses de masses molaires plus élevées.

Typiquement, on utilisera des températures entre 20 °C et 35 °C, de préférence entre 25 °C et 35 °C, pour des dextranses à masse molaire plus élevée, et on utilisera des températures entre 35 °C et 50 °C, de préférence entre 35 °C et 45 °C pour des dextranses à
15 masse molaire plus faible. La température de la réaction a ainsi une grande influence sur la masse molaire des produits formés par l'enzyme de la présente invention.

Par ailleurs, on utilisera de préférence des concentrations en saccharose élevées, notamment de 200 à 600 g.L⁻¹, de préférence entre 200 et 400 g.L⁻¹, pour des réactions
20 conduites à des températures élevées, notamment supérieures ou égales à 45 °C.

La masse molaire d'un dextranses synthétisé peut être très précisément contrôlée par le choix de la température et de la concentration en saccharose, ce qui est particulièrement
avantageux car ceci permet de fournir de manière précise une large gamme de dextranses en termes de masse molaire.

En effet, comme mis en évidence dans la partie expérimentale, il a ici été observé de
25 manière surprenante une variation linéaire de la masse molaire des dextranses obtenus lorsqu'on fixe la température de la synthèse (ou la concentration en saccharose), et qu'on fait varier la concentration en saccharose (ou la température de la synthèse). Ce résultat très surprenant et, à la connaissance des inventeurs, jamais observé auparavant, est une
30 caractéristique particulièrement avantageuse de l'invention en ce qu'elle permet d'obtenir, via des températures allant de 20 °C à 50 °C et des concentrations initiales en saccharose allant de 50 g.L⁻¹ à 600 g.L⁻¹, des dextranses de masse molaire allant de 2.10³ à 40.10³ g.mol⁻¹.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention selon lequel on utilise une dextrane-saccharase de séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 2, les dextrans ont une masse molaire allant de 7.10^3 à 25.10^3 g.mol⁻¹.

5 Ainsi, à titre d'exemple, en fixant la température à 25 °C, le procédé de synthèse de dextrans selon l'invention permet d'obtenir, à partir d'une dextrane-saccharase de séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 2, un dextrane de masse molaire moyenne de 25.10^3 g.mol⁻¹ à partir de 50 g.L⁻¹ de saccharose et un dextrane de masse molaire moyenne de 8.10^3 g.mol⁻¹ à partir de 400 g.L⁻¹ de saccharose. De la même façon, à une concentration initiale en
10 saccharose fixée à 200 g.L⁻¹, il est possible d'obtenir un dextrane dont la masse molaire moyenne est de 17.10^3 g.mol⁻¹ à 25 °C et un dextrane dont la masse molaire moyenne est de $8,5.10^3$ g.mol⁻¹ à 45 °C.

 Un objet de l'invention concerne donc un dextrane susceptible d'être obtenu par le
15 procédé tel que précédemment décrit.

 Typiquement, un dextrane selon l'invention est caractérisé en ce qu'il présente 100% de liaisons glucosidiques α -1,6, une masse molaire moyenne en poids Mw comprise entre 2.10^3 et 40.10^3 g.mol⁻¹, de préférence entre $6,5.10^3$ et 32.10^3 g.mol⁻¹, de préférence encore entre
20 7.10^3 et 25.10^3 g.mol⁻¹ et un indice de dispersité Di inférieur à 1,5. Un mode de réalisation particulier concerne un tel dextrane susceptible d'être obtenu par le procédé conforme à l'invention et décrit tel que précédemment.

 Ainsi, les dextrans conformes à l'invention sont parfaitement linéaires, en ce qu'ils ne
25 présentent aucune ramification, comme on peut le mettre en évidence avec une méthode de mesure par RMN du proton avec le spectromètre Bruker Avance (500 MHz) (cf. résultats expérimentaux). Par ailleurs, les dextrans conformes à l'invention présentent typiquement une faible masse molaire moyenne (2.10^3 à 40.10^3 g.mol⁻¹, de préférence entre $6,5.10^3$ et 32.10^3 g.mol⁻¹, de préférence entre 7.10^3 à 25.10^3 g.mol⁻¹), déterminée par analyse HPSEC, et
30 sont peu polydisperses. Ce résultat est très surprenant lorsqu'il est obtenu par une dextrane-saccharase selon l'invention, les glucane-saccharases de la famille GH-70 étant connues pour synthétiser généralement des α -glucanes de très hautes masses molaires, de 10^6 à 10^8 Da (7-11).

Un mode de réalisation particulier de l'invention concerne également une dextrane-saccharase ayant été immobilisée.

5 Un objet de l'invention se rapporte donc à un complexe comprenant un support et une protéine à activité dextrane-saccharase selon l'invention, caractérisé en ce que ladite protéine à activité dextrane-saccharase a été immobilisée sur ledit support.

Par la suite, ledit complexe obtenu pourra parfois être appelé « protéine à activité dextrane-saccharase immobilisée » ou « dextrane-saccharase immobilisée ».

10

Comme précédemment mentionné, une dextrane-saccharase selon l'invention peut être immobilisée sur le support par des techniques connues de l'homme du métier, par exemple, par formation de liaisons ioniques et/ou hydrophobes entre le support et la protéine (adsorption), formation de liaisons covalentes entre le support et la protéine, inclusion de la protéine dans le support ou encapsulation de la protéine dans le support. Une dextrane-saccharase selon l'invention ayant été immobilisée sur un support présentera plusieurs avantages, dont ceux d'augmenter la stabilité de ladite dextrane-saccharase immobilisée vis-à-vis de la température, du pH etc., de permettre la réutilisation de la dite dextrane-saccharase lors de plusieurs synthèses successives, de permettre le développement de procédés semi-continus et/ou continus etc.

20

De préférence, une méthode d'immobilisation par adsorption ou par formation de liaisons covalentes entre le support et la protéine pourra être utilisée.

25

Un mode de réalisation particulier de l'invention concerne donc un complexe tel que précédemment défini, caractérisé en ce que ladite dextrane-saccharase a été immobilisée sur ledit support par formation de liaisons covalentes, ioniques et/ou hydrophobes entre le support et la protéine.

30

L'homme du métier saura déterminer le support le plus adapté suivant la méthode d'immobilisation utilisée, permettant notamment d'obtenir de bons rendements d'immobilisation ainsi qu'une activité de l'enzyme immobilisée élevée.

On peut par exemple utiliser comme support pour une méthode d'immobilisation par adsorption, du polyméthacrylate haute porosité avec comme groupement fonctionnel un

groupement amino à espaceur court (par exemple Sprinbeads AA130® commercialisé par Sprin Technologies), du polyméthacrylate avec comme groupement fonctionnel un groupement octadécyl (par exemple Sprinbeads AO110® commercialisé par Sprin Technologies), du polystyrène – DVB (DiVinyl-Benzène) (par exemple Sprinbeads SN110® commercialisé par Sprin Technologies) ou du méthacrylate d'époxy avec comme groupement fonctionnel un groupement époxy (par exemple Purolite ECR8214® commercialisé par Purolite).

On peut par exemple utiliser comme support pour une méthode d'immobilisation par de liaisons ioniques entre le support et la protéine, du polyméthacrylate avec comme groupement fonctionnel un groupement amine quaternaire (par exemple Sepabeads ECQ1A® commercialisé par Resindion) ou du styrène avec comme groupement fonctionnel un groupement amine quaternaire (par exemple Purolite ECR1604® commercialisé par Purolite).

De préférence, une telle immobilisation est effectuée avec du méthacrylate d'époxy avec comme groupement fonctionnel un groupement époxy, notamment du Purolite ECR8214® commercialisé par Purolite.

De manière particulièrement avantageuse, la masse molaire d'un dextrane synthétisé à partir d'une dextrane-saccharase immobilisée selon l'invention peut, tout comme une dextrane-saccharase selon l'invention non immobilisée, être très précisément contrôlée par le choix de la température et de la concentration en saccharose. Ceci permet de fournir de manière précise une plus large gamme de dextrans en termes de masse molaire, une dextrane-saccharase immobilisée selon l'invention produisant avantageusement des dextrans de masses plus faibles que ceux produits par une dextrane-saccharase selon l'invention non immobilisée dans des conditions identiques (cf. résultats expérimentaux).

Ainsi, un mode de réalisation particulier de l'invention concerne un procédé de synthèse de dextrans, dans lequel :

- on fournit du saccharose dans un milieu de synthèse,
- on met en contact un complexe selon l'invention avec ledit saccharose dans ledit milieu de synthèse pour former des dextrans,
- on isole optionnellement les dextrans obtenus.

Un objet de l'invention concerne également un dextrane susceptible d'être obtenu par ledit procédé de synthèse de dextrans.

De préférence, un dextrane ainsi obtenu est caractérisé en ce qu'il présente 100% de liaisons glucosidiques α -1,6, une masse molaire moyenne en poids M_w comprise entre $3 \cdot 10^3$ et $10 \cdot 10^3$ g.mol⁻¹, de préférence entre $4,2 \cdot 10^3$ et $7,3 \cdot 10^3$ g.mol⁻¹, et un indice de dispersité D_i inférieur à 1,5.

5

Typiquement, à une température fixée à 30 °C, une dextrane-saccharase de séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 2 immobilisée sur support Purolite ECR8214® produit un dextrane de masse molaire de $7,3 \cdot 10^3$ g.mol⁻¹ à partir de 50 g.L⁻¹ de saccharose et un dextrane de masse molaire moyenne de $4,2 \cdot 10^3$ g.mol⁻¹ à partir de 450 g.L⁻¹ de saccharose.

10

L'invention concerne aussi la synthèse de gluco-oligosaccharides. Les gluco-oligosaccharides sont des oligosaccharides constitués d'un enchaînement d'unités glucosyle associées par des liaisons osidiques (par exemple en α -1,6, α -1,2, α -1,3 et/ou α -1,4). Les réactions d'accepteur réalisées consistent en un transfert de résidus glucosyle à partir de saccharose sur d'autres molécules acceptrices glucidiques ajoutées au milieu de synthèse.

15

Un objet de l'invention concerne ainsi un procédé de synthèse de gluco-oligosaccharides, dans lequel :

- on fournit du saccharose et au moins un accepteur glucidique dans un milieu de
- 20 synthèse,
- on met en contact une dextrane-saccharase ou un complexe selon l'invention avec ledit saccharose et ledit au moins un accepteur glucidique dans ledit milieu de synthèse pour former des gluco-oligosaccharides,
- on isole optionnellement les gluco-oligosaccharides obtenus.

25

L'homme du métier sait quel accepteur glucidique utiliser en fonction du type de gluco-oligosaccharide qu'il souhaite obtenir.

30

Par exemple, ledit au moins un accepteur glucidique est choisi entre le glucose, le maltose, l'isomaltose, les maltooligosaccharides et les gluco-oligosaccharides, et de préférence, choisi entre le glucose, le maltose et/ou l'isomaltose.

Les mêmes conditions de synthèse que décrites précédemment (milieu de synthèse, température, pH, concentrations initiales en saccharose etc.) sont applicables au présent procédé de synthèse de gluco-oligosaccharides.

5 Un objet de l'invention concerne également un gluco-oligosaccharide susceptible d'être obtenu par le procédé de synthèse de gluco-oligosaccharides précédemment décrit.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, les gluco-oligosaccharides obtenus sont des isomaltooligosaccharides. On entend par « isomaltooligosaccharides » des
10 oligomères de glucoses liés uniquement par des liaisons α -1,6. De tels isomaltooligosaccharides peuvent être obtenus par un procédé de synthèse de gluco-oligosaccharides tel que défini précédemment, dans lequel ledit au moins un accepteur glucidique est par exemple le glucose ou l'isomaltose, de préférence le glucose.

15 Un gluco-oligosaccharide selon l'invention a en général une masse molaire comprise entre $0,4 \cdot 10^3$ et $5 \cdot 10^3$ g.mol⁻¹, de préférence entre $0,7 \cdot 10^3$ et $3,4 \cdot 10^3$ g.mol⁻¹.

Typiquement, à une température fixée à 30 °C, le procédé de synthèse de gluco-oligosaccharides selon l'invention permet d'obtenir, à partir d'une protéine à activité
20 dextrane-saccharase de séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 2, un gluco-oligosaccharide de masse molaire moyenne de $6,8 \cdot 10^2$ g.mol⁻¹ à partir de 315 g.L⁻¹ de glucose et de 60 g.L⁻¹ de saccharose et un gluco-oligosaccharide de masse molaire moyenne de $3,4 \cdot 10^3$ g.mol⁻¹ à partir de 88 g.L⁻¹ de glucose et 110 g.L⁻¹ de saccharose.

Typiquement, à une température fixée à 30 °C, le procédé de synthèse de gluco-oligosaccharides selon l'invention permet d'obtenir, à partir d'une protéine à activité
25 dextrane-saccharase de séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 2 immobilisée sur support Purolite ECR8214 ®, un gluco-oligosaccharide de masse molaire moyenne de $7 \cdot 10^2$ g.mol⁻¹ à partir de 333 g.L⁻¹ de glucose et de 166 g.L⁻¹ de saccharose et un gluco-oligosaccharide de masse molaire moyenne de $2,4 \cdot 10^3$ g.mol⁻¹ à partir de 88 g.L⁻¹ de glucose et 110 g.L⁻¹ de saccharose.

30

L'invention concerne aussi la synthèse de gluco-conjugués. Les glucane-saccharases peuvent en effet être utilisées pour la synthèse de gluco-conjugués par réaction d'accepteur, en introduisant en plus du saccharose, une molécule hydroxylée dans le milieu de synthèse.

La glycosylation de molécules hydroxylées peut être intéressante pour la synthèse de nouveaux composés, ou pour une modification de propriétés physico-chimiques telles que la solubilité par exemple.

On entend par « molécule hydroxylée » tout type de molécule non glucidique contenant au moins un groupement hydroxyle libre. Typiquement, une molécule hydroxylée est un flavonoïde, polyol, acide aminé. On peut par exemple glycosyler des catéchines, polyphénols ou des alkyl-polyglucosides.

Un objet de l'invention concerne donc un procédé de synthèse de composés gluco-conjugués, dans lequel :

- on fournit du saccharose et au moins une molécule hydroxylée dans un milieu de synthèse,
- on met en contact une dextrane-saccharase ou un complexe selon l'invention avec ledit saccharose et ladite au moins une molécule hydroxylée dans ledit milieu de synthèse pour former des composés gluco-conjugués,
- on isole optionnellement les composés gluco-conjugués obtenus.

Les mêmes conditions de synthèse que décrites précédemment (milieu de synthèse, température, pH, concentrations initiales en saccharose etc.) sont applicables au présent procédé de synthèse de gluco-conjugués.

Un objet de l'invention concerne un gluco-conjugué susceptible d'être obtenu par le procédé de synthèse de gluco-conjugués précédemment décrit.

Des produits selon l'invention, notamment des dextrans, gluco-oligosaccharides ou gluco-conjugués conformes à l'invention, pourront être utilisés dans tout type d'applications pour lesquelles leurs caractéristiques fonctionnelles, notamment leur taille et leur type de liaisons osidiques, sont adaptées.

Un dextrane, gluco-oligosaccharide ou gluco-conjugué selon l'invention peut par exemple être utilisé dans des applications pharmaceutique, cosmétique ou alimentaire. On peut, pour les applications possibles, se référer à la publication Vettori et al. (12). De manière illustrative mais non limitative, un dextrane selon l'invention peut être utilisé comme support ou base (par exemple dans un vaccin ou dans une composition pharmaceutique) (13) comme agent nutraceutique (13,14), comme agent stabilisant (par exemple stabilisant d'un antigène

dans un vaccin, ou stabilisant de protéines ou de produits lyophilisés), comme agent immuno-stimulant ou prébiotique (15), comme agent en prévention de la cristallisation des sucres, comme substitut de plasma sanguin, comme transporteur de fer dans le traitement des anémies importantes (14), comme anti-coagulant, comme extenseur du plasma sanguin, dans la
5 prévention des chocs post-opératoires, dans le traitement des brûlures, et dans la réduction de risques de thrombose ou d'embolies, comme ingrédient actif ou excipient dans les solutions ophtalmiques, comme excipient lors d'une lyophilisation en tant que diluant et/ou modificateur de la température de collapse, comme cryoprotecteur, comme agent pour le stockage d'organes pour la transplantation.

10

Un objet de l'invention concerne une composition pharmaceutique, cosmétique ou alimentaire comprenant un dextrane selon l'invention, un gluco-oligosaccharide selon l'invention ou un gluco-conjugué selon l'invention à titre de principe actif ou à titre d'excipient acceptable.

15

L'invention concerne enfin des dérivés de dextranses de l'invention. On entend ici par « *dérivé de dextrane* », un dextrane de l'invention et subissant une ou plusieurs étapes de modifications chimiques connues, notamment choisies parmi une éthérification, une estérification ou une réticulation. On peut ainsi obtenir un dérivé de dextrane tel qu'un
20 dextrane réticulé, un ester de dextrane, par exemple un ester inorganique de dextrane (phosphate de dextrane, sulfate de dextrane) ou un ester organique de dextrane, un éther de dextrane, par exemple un éther de dextrane non-ionique (dextrane alkylé, éther d'hydroxyalkyle ou éther hydroxyalkyle aryle de dextrane, éther de dextrane poly(éthylène-glycol)-alkyle) ou un éther de dextrane ionique (dextrane sulfopropylé, dextrane
25 carboxyméthylé, dextrane 2-(Diéthylamino)éthyl). De telles techniques de modification chimiques, ainsi que les applications pour lesquelles les dextranses ainsi obtenus sont adaptés, sont bien connues de l'homme du métier. On peut par exemple se référer au document Heinze et al (16) et à la thèse de Ndegwa Henry Maina (17).

30

Un objet de l'invention se rapporte donc à un procédé de modification d'un dextrane conforme à l'invention, dans lequel le dextrane subit une ou plusieurs étapes de modification chimique.

De manière avantageuse, une étape de modification chimique est choisie parmi une éthérification, une estérification et une réticulation.

FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique de la structure primaire de DsrM (basée sur l'alignement protéique avec l'enzyme GFT180 de *Lactobacillus reuteri* 180). Cinq domaines sont distincts : domaine V en blanc, domaine IV en gris clair, domaine B en rayé, domaine A à bulles et domaine C en noir. Les motifs répétés YG selon la définition de Giffard et Jacques sont représentés par des motifs à carreaux.

Figure 2 : Représentation schématique des structures primaires de DsrM, DsrM Δ PS Δ C-APY et DsrM Δ 174-1317. Cinq domaines sont distincts : domaine V en blanc, domaine IV en gris clair, domaine B en rayé, domaine A à bulles et domaine C en noir. Les motifs répétés YG selon la définition de Giffard et Jacques sont représentés par des motifs à carreaux.

15

Figure 3 : Caractéristiques des supports d'immobilisation issus du commerce et utilisés pour l'immobilisation de l'enzyme DsrM Δ PS Δ C-APY.

Figure 4 : Représentation graphique de l'activité enzymatique de la dextrane-saccharase tronquée DsrM Δ PS Δ C-APY en fonction de la température dans des conditions standards, à partir de 100g.L⁻¹ de saccharose dans 50 mM d'acétate de sodium, pH 5,75.

20

Figure 5 : Représentation graphique de l'activité enzymatique de la dextrane-saccharase entière DsrM en fonction de la température dans des conditions standards, à partir de 100g.L⁻¹ de saccharose dans 50 mM d'acétate de sodium, pH 5,75.

25

Figure 6 : Représentation graphique de l'activité enzymatique de la dextrane-saccharase tronquée DsrM Δ PS Δ C-APY en fonction du pH dans des conditions standards, à partir de 100g.L⁻¹ de saccharose, à 30 °C.

30

Figure 7 : Représentation graphique de l'activité enzymatique de la dextrane-saccharase entière DsrM en fonction du pH dans des conditions standards, à partir de 100g.L⁻¹ de saccharose, à 30 °C.

Figure 8 : Représentation de la masse molaire des dextrans synthétisés par DsrM à 25 °C, pH 5,75 en fonction de la concentration initiale en saccharose.

Figure 9 : Profil HPSEC-RI des produits synthétisés par DsrM (forme entière), après 24 h de réaction à partir de 100 g.L⁻¹ de saccharose à 30 °C, pH 5,75.

Figure 10 : Graphiques de droite : Contrôle de la masse moléculaire des dextrans synthétisés par l'enzyme DsrM ΔPS ΔC-APY à température fixée : 25°C (A), 30°C (B), 35°C (C), 40 °C (D), en faisant varier la concentration initiale du substrat (saccharose).

10 Graphiques de gauche : Profils HPSEC-RI des réactions enzymatiques à t=24h à partir de 50 g.L⁻¹, 100 g.L⁻¹, 200 g.L⁻¹, 300 g.L⁻¹ et 400 g.L⁻¹ de saccharose (respectivement, courbes du bas vers le haut) avec température fixée : 25°C (A), 30°C (B), 35°C (C), 40 °C (D).

15 **Figure 11 :** Graphiques de droite : Contrôle de la masse moléculaire des dextrans synthétisés par l'enzyme DsrM ΔPS ΔC-APY à concentration initiale en saccharose fixée : 50 g.L⁻¹ (A), 100 g.L⁻¹(B), 200 g.L⁻¹(C), 300 g.L⁻¹ (D) et 400 g.L⁻¹(E), en faisant varier la température.

20 Graphiques de gauche : Profils HPSEC-RI des réactions enzymatique à t=24h à 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C et 45 °C (respectivement, courbes du bas vers le haut) avec concentration initiale en saccharose fixée : 50 g.L⁻¹ (A), 100 g.L⁻¹ (B), 200 g.L⁻¹ (C), 300 g.L⁻¹ (D) et 400 g.L⁻¹ (E).

25 **Figure 12 :** Profil HPSEC-RI des dextrans synthétisés par DsrM ΔPS ΔC-APY en fin de réaction à partir de 100 g.L⁻¹ de saccharose à 30 °C, pH 5.75, avec a : polymère de masse moléculaire moyenne de 17,5 kDa, b : disaccharides (leucrose présent dans le mix de synthèse final) et c : mono-saccharides (fructose et glucose).

30 **Figure 13 :** A : Comparaison de la masse molaire moyenne des dextrans synthétisés par l'enzyme DsrM ΔPS ΔC-APY libre (marqueur noir) et immobilisée sur support Purolite ECR8214® (marqueur blanc) à 30 °C et en fonction de concentrations initiales en saccharose croissantes (50 g.L⁻¹, 100 g.L⁻¹, 200 g.L⁻¹, 300 g.L⁻¹ et 400 g.L⁻¹)

B : Profils HPSEC-RI des réactions enzymatiques catalysées par DsrM Δ PS Δ C-APY immobilisée à t=24 h à partir de 50 g.L⁻¹, de 100 g.L⁻¹, de 200 g.L⁻¹, de 300 g.L⁻¹ et de 400 g.L⁻¹ de saccharose (respectivement, courbes du bas vers le haut).

5 **Figure 14** : Spectre H¹ RMN des produits synthétisés par DsrM après 24 h de réaction à partir de 100 g.L⁻¹ de saccharose à 30 °C, pH 5.75 avec a) liaisons α -1,6, b) leucrose.

Figure 15 : Spectre H¹ RMN des produits synthétisés par DsrM Δ PS Δ C-APY en fin de réaction à partir de 100 g.L⁻¹ de saccharose à 30 °C, pH 5.75 avec a) leucrose, b) liaisons α -1,6.

10

EXEMPLES

Exemple 1 : Identification du gène *dsrm* dans le génome *Leuconostoc citreum* NRRL B-1299 et analyse de la structure primaire de la protéine correspondante.

15

Le gène *dsrm* a été identifié au sein du génome de *Leuconostoc citreum* NRRL B-1299 par blast nucléotidique contre une base de données constituée de séquences nucléotidiques de glucane-saccharases répertoriées dans la famille 70 des glycoside-hydrolases selon la classification CAZY (Carbohydrate Active enZYme database, www.cazy.org/GH70_all.html).

20

Le gène a été traduit en séquence protéique grâce au logiciel Transeq d'EMBOSS (www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/).

Une séquence codant pour un peptide signal a été identifiée par le logiciel SignalP server 4.1 (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/).

25

Des alignements protéiques multiples (avec le logiciel d'alignement global, ClustalW2, disponible en ligne, www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/) avec d'autres glucane-saccharases caractérisées ont permis d'identifier les motifs conservés du cœur catalytique de DsrM, et de découper l'enzyme en différents domaines protéiques (A, B, C, IV et V).

Les différents pourcentages d'identité et de similarité entre séquences protéiques, indiqués dans la fiche préliminaire d'invention, ont été calculés avec l'outil BlastP (protein-protein Blast) du NCBI, disponible en ligne ([blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_L
OC=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)) et en utilisant les paramètres par défaut proposés par le site.

30

Exemple 2 : Clonage du gène *dsrm*

Le gène *dsrm* a été amplifié par PCR à partir de l'ADN génomique de *Leuconostoc*
 5 *citreum* NRRL B-1299 et en utilisant les deux amorces présentées dans le tableau 1.

Tableau 1

Amorce	Séquence (5' à 3')
Amorce Forward	<u>CACCATGAAAATAAAAGAAACAATTACCCGAAA</u> (SEQ ID NO :3)
Amorce Reverse	AAGCTTGCAAAGCACGCTTATCAATC (SEQ ID NO :4)

L'addition des 4 bases « CACC » en 5' de l'amorce forward (soulignées dans le tableau
 10 1) a permis l'insertion correcte du fragment PCR dans le vecteur d'entrée pENTR/D/TOPO
 (Life Technologies), afin de procéder par la suite à un clonage utilisant la technologie
 Gateway. Un clone d'entrée positif (vecteur d'entrée contenant le fragment PCR dans le sens
 désiré) a été sélectionné et recombiné avec le vecteur de destination pET-55-DEST (Novagen)
 à l'aide de la LR clonase enzyme mix II (Life technologies). Les clones recombinants positifs
 15 ont été sélectionnés et analysés par restriction. L'absence de mutation au sein des plasmides a
 été confirmée par séquençage (GATC).

Exemple 3: Clonage du gène *dsrm Δps Δc-apy*.

Le gène *dsrm Δps Δc-apy* été amplifié par PCR à partir du plasmide pET-55/DsrM
 20 précédemment construit à l'exemple 2 et en utilisant les deux amorces présentées dans le
 tableau 2.

Tableau 2

Amorce	Séquence (5' à 3')
Amorce Forward	<u>CACCCAAACGCCGGTTGGTACAACACAG</u> (SEQ ID NO :5)
Amorce Reverse	TTTGGCCATCGTACCATCGTTATT (SEQ ID NO :6)

L'addition des 4 bases « CACC » en 5' de l'amorce forward (soulignées dans le tableau 2) a permis l'insertion correcte du fragment PCR dans le vecteur d'entrée pENTR/D/TOPO (Life Technologies), afin de procéder par la suite à un clonage utilisant la technologie Gateway. Un clone d'entrée positif (vecteur d'entrée contenant le fragment PCR dans le sens 5 désiré) a été sélectionné et recombinaison avec le vecteur de destination pET-55-DEST (Novagen) à l'aide de la LR clonase enzyme mix II (Life technologies). Les clones recombinants positifs ont été sélectionnés et analysés par restriction. L'absence de mutation au sein des plasmides a été confirmée par séquençage (GATC).

10 **Exemple 4 : Expression hétérologue de *dsrm* et *dsrm Δps Δc-apy* chez *Escherichia coli***

Pour la production des enzymes recombinantes, des cellules d'*Escherichia coli* BL21 star DE3 ont été transformées avec les plasmides correspondants (pET-55/*dsrm* ou pET-55/*dsrm Δps Δc-apy*) construits selon les exemples 2 et 3. 300 µL du mix de transformation ont 15 été ensemencés dans 30 mL de milieu LB (Lysogeny Broth), supplémenté avec 100 µg.mL⁻¹ d'ampicilline, et mis à incuber sur la nuit à 37 °C afin de préparer une préculture.

Des cultures d'1L en milieu ZYM5052 modifié (1% glycérol, 0% glucose, 0.1% lactose, Studier, 2005) ont ainsi été ensemencées à une DO_{600 nm} initiale de 0,05 à partir de la 20 pré-culture de la veille, puis mises à incuber 26 heures à 21 °C et à 150 rpm. En fin de fermentation, les milieux de culture sont centrifugés (15 min, 6500 rpm, 4 °C) et les culots sont concentrés à une DO de 80 dans 50 mM de tampon acétate de sodium, pH 5,75.

Afin d'obtenir l'enzyme recombinante (produite par *Escherichia coli* de manière intracellulaire), les cellules sont cassées aux ultrasons selon le protocole suivant : 5 cycles de 25 20 secondes à 30% de la puissance maximale de la sonde, à froid, espacés de 4 minutes de repos dans la glace. Le surnageant de sonication (contenant l'enzyme recombinante soluble) est ensuite récupéré après 30 minutes de centrifugation (10000 rpm, 10 °C) et conservé à 4°C.

30 **Exemple 5 : Méthode de détermination de l'activité enzymatique par la méthode du DNS.**

Une unité enzymatique glucane-saccharase représente la quantité d'enzyme qui libère une µmole de fructose par minute, à 30 °C, à partir de 100 g.L⁻¹ de saccharose dans 50mM acétate de sodium, pH 5,75.

L'activité est déterminée par mesure de la vitesse initiale de production des sucres réducteurs à l'aide de la méthode à l'acide dinitrosalicilique (DNS). Au cours d'une cinétique, 100 µL de milieu réactionnel sont prélevés et la réaction est stoppée par ajout d'un volume équivalent de DNS. Les échantillons sont ensuite chauffés 5 min à 95 °C, refroidis dans la
5 glace, dilués au demi dans de l'eau, et l'absorbance est lue à 540 nm. Une gamme étalon de 0 à 2 g.L⁻¹ de fructose permet d'établir le lien entre valeur d'absorbance et concentration en sucres réducteurs.

10 **Exemple 6 : Immobilisation de la dextrane-saccharase tronquée DsrM ΔPS ΔC-APY**

Une immobilisation a été réalisée en faisant réagir des masses variant entre 0,1 g et 0,6 g de différents supports commerciaux avec 2,5 mL de surnageant de sonication contenant l'enzyme recombinante DsrM ΔPS ΔC-APY. Le pH de cette solution enzymatique est
15 contrôlé et doit être compris entre 5,75 et 7,5. La réaction est menée à 4 °C sous agitation douce (100 rpm). L'immobilisation est stoppée après 16 heures de réaction par filtration et lavage avec trois volumes successifs (10 mL) de tampon acétate de sodium, pH 5,75 à 50 mM. L'enzyme immobilisée est conservée à 4 °C avant utilisation.

Les caractéristiques des supports testés sont données à la figure 3.

20 Par la suite, une telle enzyme immobilisée est appelée « DsrM ΔPS ΔC-APY immobilisée ».

Les différents supports d'immobilisation ont été testés pour leur capacité à fixer
25 l'enzyme DsrM ΔPS ΔC-APY. Le crible a consisté à mettre en contact des masses de 250 mg de chaque support avec 2,5 mL de surnageant de sonication (activité libre initiale : 16,5 U/mL).

30 L'activité fixée après réaction et lavage sur les différents supports a été mesurée sur des aliquots issus de chaque lot d'enzyme produit et de masse contrôlée. Le volume réactionnel a également été adapté à l'activité de chaque lot, de plus gros volumes permettant la mesure des enzymes les plus actives. Les résultats du criblage sont présentés dans le tableau 3 suivant.

Tableau 3

Support	Masse d'enzyme			Activité (U/g)
	immobilisée en réaction (mg)	Volume réactionnel (ml)	Production de sucres réducteurs (μmol/min/réaction)	
Purolite ECR8214®	39,5	3	1,03	77,94
Sprinbeads AO110®	35,8	3	0,93	77,77
Sepabeads ECQ1A®	36,7	3	0,43	35,34
Purolite ECR1604®	44,4	3	0,46	31,19
Purolite ECR4204®	56,5	1	1,71	30,27
Sprinbeads AA130®	54,4	1	1,32	24,26
Sprinbeads SN110®	43,4	3	0,32	21,88

Les différents supports en fonction de l'activité mesurée peuvent être regroupés en deux catégories :

- 5 - les 2 supports Purolite ECR8214® et Sprinbeads AO110® qui présentent les meilleures activités, de l'ordre de 78 U/g ;
- 5 supports ayant des activités moyennes mais bonnes, comprises entre 22 et 35 U/g ;

10 Seul le support Purolite ECR8214® a ensuite été utilisé afin d'optimiser l'immobilisation, notamment par une optimisation des rendements d'immobilisation, des activités fixées etc.

15 L'optimisation de l'immobilisation de DsrM ΔPS ΔC-APY sur Purolite ECR8214® a consisté à faire varier la masse de support entre 100 mg et 600 mg mise au contact d'une quantité d'enzyme libre fixe (2,5 mL de surnageant de sonication présentant une activité initiale de 45 U/mL).

Le calcul de trois différents rendements permettent de caractériser l'immobilisation :

- le rendement de fixation R_{fixation} , qui quantifie la part totale d'enzyme fixée sur les supports

$$R_{\text{fixation}}(\%) = \left(1 - \frac{\text{Activité libre initiale}}{\text{Activité libre finale}}\right) \times 100$$

20 - le rendement d'immobilisation $R_{\text{immobilisation}}$, qui quantifie l'enzyme immobilisée active en fonction de la quantité totale d'enzyme utilisée pour l'immobilisation

$$R_{\text{immobilisation}} (\%) = \frac{\text{Activité immobilisée}}{\text{Activité libre introduite}} \times 100$$

- l'efficacité d'immobilisation, qui quantifie la quantité d'enzyme immobilisée active en fonction de la quantité totale d'enzyme effectivement immobilisée

$$\text{Efficacité} (\%) = \frac{\text{Activité immobilisée}}{(\text{Activité libre initiale} - \text{Activité libre finale})} \times 100$$

5 Les résultats d'immobilisation sont présentés dans le tableau 4 suivant.

Tableau 4

masse pour immobilisation (mg)	Activité immobilisée U/g	Rendement de fixation %	Rendement d'immobilisation %	Efficacité %
105,5	144,3	44	14	31
248,7	147,2	58	33	56
355,6	146,0	80	46	58
456,7	148,2	92	60	66
604,0	132,3	97	71	73

10 La meilleure condition d'immobilisation est définie comme étant le résultat d'un compromis entre ces différents rendements et l'activité du biocatalyseur immobilisé obtenu.

15 Il est tout d'abord observé que l'utilisation d'une solution de DsrM Δ PS Δ C-APY libre d'activité plus élevée (45 U/mL vs 16U/mL utilisé lors du criblage des supports) permet d'augmenter significativement l'activité fixée sur le support. En effet, les activités mesurées sont augmentées d'un facteur 2 (cf tableau 4, activités de l'ordre de 140 U/mL).

20 Par ailleurs, des masses de support Purolite ECR8214® comprises entre 100 et 450 mg permettent l'obtention d'une activité fixée autour de 140 U/g. Sans vouloir être liés par une quelconque théorie, les inventeurs pensent que dans ces conditions, le support est totalement saturé de protéine. Cela est d'ailleurs confirmé par les rendements de fixation et d'immobilisation obtenus qui ont tendance à augmenter avec la masse de support utilisé.

Au-delà de 600 mg mis au contact avec 2,5 mL de surnageant de sonication, l'activité commence à diminuer (environ 132 U/g).

La meilleure condition d’immobilisation pour le support Purolite ECR8214® est donc la mise en contact d’une quantité comprise entre 450 et 600 mg de support, typiquement d’environ 500mg, avec 2,5 mL de surnageant de sonication. Ces conditions permettent l’obtention de la meilleure activité (environ 140 U/g) tout en limitant les pertes d’enzymes (rendements élevés).

Par la suite, « DsrM ΔPS ΔC-APY immobilisée » est une dextrane-saccharase DsrM ΔPS ΔC-APY immobilisée sur support Purolite ECR8214®.

10

Exemple 7 : Détermination des rendements de production de la dextrane-saccharase entière DsrM et de la dextrane-saccharase tronquée DsrM ΔPS ΔC-APY

Les rendements de production sont déterminés par chromatographie d’échange d’anion (HPAEC-PAD, High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection) et par chromatographie d’exclusion de taille (HPSEC, High Performance Size Exclusion Chromatography).

Analyse HPAEC-PAD

Les sucres, glucose, fructose, leucrose et saccharose sont séparés sur colonne Dionex CarboPac PA-100 par un gradient d’acétate de sodium de 6 à 500 mM en 36 min, contenant 150 mM de soude. Des gammes étalons de 5, 10, 15 et 20 mg.kg⁻¹ de ces sucres sont réalisées et permettent leur quantification.

Les rendements de production, soit la part de glucose issu du saccharose incorporée dans la formation de glucose libre, de leucrose et de dextrane sont calculés comme suit :

$$\%G_{\text{glucose}} = \frac{([Glucose]_{tf} - [Glucose]_{t0}) \times 342}{([Sucrose]_{t0} - [Sucrose]_{tf}) \times 180} \times 100$$

$$\%G_{\text{leucrose}} = \frac{([Leucrose]_{tf} - [Leucrose]_{t0})}{([Sucrose]_{t0} - [Sucrose]_{tf})} \times 100$$

30

Analyse HPSEC

Les sucres sont séparés en fonction de leur taille sur deux colonnes de perméation de gel placées en série (Shodex OH Pack 805 et 802.5) dans un four dont la température est maintenue à 70 °C. Le débit de la phase mobile (0.45 M NaNO₃, 1% ethylene glycol) est de 0.3 mL.min⁻¹. Les échantillons sont dilués dans le même solvant que l'éluant à 10 g.L⁻¹ maximum de sucres totaux.

L'analyse des produits de la réaction par chromatographie d'exclusion de taille permet de calculer la part d'unités glucosyle issues du saccharose, utilisées dans la production de dextrane :

$$\%G \text{ dextrane} = \frac{\text{Aire}_{\text{dextrane}}}{\text{Aire}_{\text{saccharose}} \times \frac{162}{342}}$$

Dextrane-saccharase entière DsrM

Il a ici été mis en évidence que l'enzyme DsrM est une très bonne polymérase. En effet, les analyses chromatographiques (HPAEC-PAD et HPSEC-RI) réalisées suite à une synthèse de dextrane à partir de 100 g.L⁻¹ de saccharose, à 30°C, pH 5,75, montrent que 81% des unités glucosyle issues du substrat sont utilisées pour la production de dextrane. Seuls 4% et 15% de ces unités sont incorporés dans la synthèse de glucose libre et de leucrose, respectivement.

Dextrane-saccharase tronquée DsrM ΔPS ΔC-APY

Il a ici été mis en évidence que la dextrane-saccharase tronquée DsrM ΔPS ΔC-APY est aussi une excellente polymérase. En effet, les analyses chromatographiques (HPAEC-PAD et HPSEC-RI) réalisées suite à une synthèse de dextrane à partir de 100 g.L⁻¹ de saccharose, à 30°C, pH 5.75, montrent que 85% des unités glucosyle issues du substrat sont utilisées pour la production du polymère. Seuls 3% et 12% de ces unités sont perdus par incorporation dans la synthèse de glucose libre et de leucrose, respectivement.

Exemple 8 : Méthode de détermination de la masse molaire des dextrans par analyse HPSEC

Une gamme étalon réalisée avec des dextrans commerciaux de 503000, 68400, 34100, 11300 g.mol⁻¹, ainsi que du maltopheptose, du saccharose et du fructose a permis de

déterminer la masse molaire des dextrans synthétisés par DsrM, DsrM Δ PS Δ C-APY ou DsrM Δ PS Δ C-APY immobilisée.

Exemple 9 : Détermination des conditions optimales de travail de la dextrane-saccharase entière DsrM et de la dextrane-saccharase tronquée DsrM Δ PS Δ C-APY

Effet de la température

La valeur de la température optimale est déterminée en mesurant l'activité de l'extrait enzymatique brut, à différentes températures (entre 23 et 50 °C) à partir de 100 g.L⁻¹ de saccharose dans 50 mM de tampon acétate de sodium, pH 5,75.

Comme visible aux figure 4 et 5, la dextrane-saccharase tronquée DsrM Δ PS Δ C-APY et la dextrane-saccharase DsrM ont une température optimale comprise 30 et 45°C, offrant la possibilité de travailler sur de larges gammes de températures, et notamment des températures élevées.

Effet du pH

L'effet du pH sur l'activité enzymatique de l'extrait brut est mesuré à 30 °C à partir de 100 g.L⁻¹ de saccharose, dans 50 mM de tampon citrate phosphate, pour des valeurs de pH comprises entre 3,5 et 8 (intervalle de 0,5).

Comme visible à la figure 6, la dextrane-saccharase tronquée DsrM Δ PS Δ C-APY a un pH optimal compris entre 4,5 et 5,5.

Comme visible à la figure 7, la dextrane-saccharase DsrM a un pH optimal compris entre 5 et 7.

Exemple 10 : Production de dextrans de différentes masses molaires

Des réactions enzymatiques avec DsrM, DsrM Δ PS Δ C-APY et DsrM Δ PS Δ C-APY immobilisée ont été mises en œuvre à 1 U/mL, à partir de différentes concentrations initiales en saccharose (50, 100, 200, 300 et 400 g.L⁻¹) et éventuellement à différentes températures (25, 30, 35, 40 et 45 °C), dans du tampon acétate de sodium, 50 mM, pH 5.75.

Des prélèvements aux temps initiaux et finaux (24 h) ont été réalisés (la réaction enzymatique a été stoppée par chauffage à 95 °C pendant 5 minutes) et conservés à -20°C avant d'être analysés par HPAEC-PAD, comme expliqué à l'exemple 7, afin de contrôler les rendements de production, et par chromatographie d'exclusion de taille (HPSEC), comme
5 expliqué à l'exemple 8, afin de déterminer la masse moléculaire des dextrans synthétisés.

En ce qui concerne les essais sur DsrM Δ PS Δ C-APY immobilisée, les milieux réactionnels sont centrifugés afin d'éliminer les résidus solides d'enzyme immobilisée.

Dextrane-saccharase entière DsrM

10 On observe une variation linéaire de la taille des produits en fonction de la concentration initiale en saccharose (fixation de la température).

Il est ainsi possible de contrôler la masse molaire du dextrane synthétisé par la forme entière de DsrM en faisant varier la concentration initiale en substrat, à température fixée.

15 Ainsi, par exemple à 25 °C, il est possible d'obtenir un panel de dextrans dont la masse molaire moyenne varie entre 32.10^3 et $6,5.10^3$ g.mol⁻¹ sur une gamme de concentration initiale en substrat allant de 100 à 500 g.L⁻¹ (Figure 8).

La figure 9 met en évidence qu'un dextrane, synthétisé à partir de 100 g.L⁻¹ de saccharose seul, à 30°C et pH 5.75, présente une faible masse molaire moyenne de 27.10^3 Da, et est peu polydisperse.

20

Dextrane-saccharase tronquée DsrM Δ PS Δ C-APY

Comme visible aux figures 10 et 11, on observe une variation linéaire de la taille des produits en fonction de la température (fixation de la concentration initiale en saccharose) ou de la concentration initiale en saccharose (fixation de la température).

25 Il est ainsi également possible de contrôler de manière très précise la masse molaire du dextrane synthétisé par la dextrane-saccharase tronquée DsrM Δ PS Δ C-APY en faisant varier la concentration initiale en substrat, à température fixée (ou inverse).

30 Ainsi, à titre d'exemple, en fixant la température à 25 °C, la dextrane-saccharase tronquée DsrM Δ PS Δ C-APY produit un dextrane de masse molaire moyenne de 25.10^3 g.mol⁻¹ à partir de 50 g.L⁻¹ de saccharose et un dextrane de masse molaire moyenne de 8.10^3 g.mol⁻¹ à partir de 400 g.L⁻¹ de saccharose.

Par ailleurs, on remarque que les dextrans synthétisés sont peu polydisperses, à l'exception des polymères produits à partir de fortes concentrations en saccharose (400 g.L⁻¹).

On remarque aussi, qu'il est possible de balayer un plus large spectre de produits, en termes de masses moléculaires, à faibles températures ou à partir de petites concentrations en saccharose.

De la même façon, à une concentration initiale en saccharose fixée à 50 g.L⁻¹, il est possible d'obtenir des dextrans dont la masse molaire moyenne est comprise entre 25.10³ g.mol⁻¹ et 7.10³ g.mol⁻¹ sur une gamme de température allant de 25 à 45 °C.

De plus, les bilans de production varient peu en fonction des conditions expérimentales. Les analyses HPAEC-PAD effectuées montrent que pour toutes les réactions testées, plus de 81% des unités glucosyle issues du substrat sont utilisées pour la production du polymère lors de l'utilisation de dextrane-saccharase tronquée DsrM ΔPS ΔC-APY.

La figure 12 met en évidence qu'un dextrane, synthétisé à partir de 100 g.L⁻¹ de saccharose seul, à 30 °C et pH 5.75, présente une faible masse molaire moyenne de 17,5.10³ Da, et est peu polydisperse.

Dextrane-saccharase DsrM ΔPS ΔC-APY immobilisée

Comme visible à la figure 13, l'enzyme immobilisée conserve sa capacité à produire des dextrans de masses molaires différentes selon la concentration initiale en saccharose. La variation linéaire de la masse molaire des dextrans produits est également conservée.

Par ailleurs, la dispersité des dextrans obtenus est similaire entre les deux formes d'enzyme (dextrane-saccharase DsrM ΔPS ΔC-APY et dextrane-saccharase DsrM ΔPS ΔC-APY immobilisée) (figure 13).

Enfin, la dextrane-saccharase DsrM ΔPS ΔC-APY immobilisée sur support Purolite ECR8214® présente la particularité de produire des dextrans de masses molaires plus faibles que ceux produits par la dextrane-saccharase DsrM ΔPS ΔC-APY dans des conditions identiques. Par exemple, pour une concentration initiale de 100 g.L⁻¹ de saccharose, un dextrane de masse molaire 9,4.10³ g.mol⁻¹ est obtenu avec la dextrane-saccharase DsrM ΔPS ΔC-APY non immobilisée tandis qu'un dextrane de masse molaire 4,7.10³ g.mol⁻¹ est obtenu avec la dextrane-saccharase DsrM ΔPS ΔC-APY immobilisée (figure 13). L'immobilisation

d'une dextrane-saccharase selon l'invention présente donc l'avantage d'élargir la gamme de dextrans produits.

Exemple 11 : Analyse de la nature des liaisons des dextrans produits par la dextrane-saccharase entière DsrM et par la dextrane-saccharase tronquée DsrM Δ PS Δ C-APY

Après lyophilisation, 20 mg de milieu réactionnel brut (après consommation totale du saccharose) sont dilués dans 0,5 mL d'eau deutérée et analysés par RMN du proton avec le spectromètre Bruker Avance (500 MHz). Les spectres sont ensuite traités et interprétés avec le logiciel TOPSPIN 3.0.

Dextrane-saccharase entière DsrM

Il a été mis en évidence par les analyses RMN que le produit synthétisé à partir de DsrM et 100 g.L⁻¹ de saccharose seul, à 30 °C dans 50 mM d'acétate de sodium, pH 5,75, est un polymère d'unités glucosyle liées exclusivement (100%) en α -1,6 (Figure 14).

Le produit synthétisé à partir de DsrM est donc un dextrane parfaitement linéaire, et DsrM est une dextrane-saccharase très spécifique de la polymérisation par liaisons osidiques de type α -1,6.

Dextrane-saccharase tronquée DsrM Δ PS Δ C-APY

Il a été mis en évidence par les analyses RMN que, tout comme pour la dextrane-saccharase DsrM, le produit synthétisé à partir de la forme tronquée DsrM Δ PS Δ C-APY et 100 g.L⁻¹ de saccharose seul, à 30 °C et pH 5,75 est un polymère d'unités glucosyle liées exclusivement (100%) en α -1,6 (Figure 15).

Le produit synthétisé à partir de la forme tronquée DsrM Δ PS Δ C-APY est donc également un dextrane parfaitement linéaire, et DsrM Δ PS Δ C-APY est une dextrane-saccharase très spécifique de la polymérisation par liaisons osidiques de type α -1,6.

Exemple 12 : Production de gluco-oligosaccharides par réaction d'accepteur

Des réactions d'accepteur ont été mises en œuvre en utilisant 1 U.mL⁻¹ de DsrM ΔPS ΔC-APY et DsrM ΔPS ΔC-APY immobilisée, à partir de concentrations initiales en saccharose variant de 60 à 333 g.L⁻¹ et de concentrations en glucose (jouant le rôle d'accepteur glucidique) variant de 83 à 333 g.L⁻¹. Les synthèses ont eu lieu à une température de 30 °C et dans du tampon acétate de sodium, 50 mM, pH 5,75. Les réactions enzymatiques ont été stoppées par chauffage à 95 °C pendant 5 minutes après 24 heures.

Les différents échantillons ont ensuite été analysés par HPSEC comme expliqué à l'exemple 8 afin de déterminer la masse molaire moyenne des produits synthétisés.

Les résultats obtenus pour DsrM ΔPS ΔC-APY, i.e. la protéine à activité dextransaccharase ayant pour séquence d'acides aminés la séquence SEQ ID NO : 2, à partir de différentes concentrations en saccharose et en glucose accepteur sont présentés dans le tableau 5 suivant :

15

Tableau 5

Ratio [Glucose]/ [Saccharose] ^a	Masse Sèche Totale (g.L ⁻¹)	Glucose (g.L ⁻¹)	Saccharose (g.L ⁻¹)	Masse molaire glucooligosaccharides (g.mol ⁻¹)
1,25	375	167	208	1,9.10 ³
2,31	375	113	262	2,7.10 ³
1,25	198	88	110	3,4.10 ³
0,50	500	333	167	0,8.10 ³
1,25	375	167	208	1,9.10 ³
0,19	375	315	60	0,7.10 ³
1,25	552	245	307	1,1.10 ³
2,00	500	167	333	1,6.10 ³
1,25	375	167	208	1,9.10 ³
0,50	250	167	83	1,6.10 ³
2,00	250	83	167	1,6.10 ³
1,25	375	167	208	1,9.10 ³

^a Ratio calculé à partir de concentrations massiques

Les résultats obtenus pour DsrM Δ PS Δ C-APY immobilisée, i.e. la protéine à activité dextrane-saccharase ayant pour séquence d'acides aminés la séquence SEQ ID NO :2 immobilisée sur support ECR8214® comme décrit à l'exemple 6, à partir de différentes concentrations en saccharose et en glucose accepteur sont présentés dans le tableau 6 suivant :

5

Tableau 6

Ratio [Glc]/[Saccharose] ^a	Masse Sèche Totale (g.L ⁻¹)	[Glucose] (g.L ⁻¹)	[Saccharose] (g.L ⁻¹)	Masse molaire glucooligosaccharides (g.mol ⁻¹)
1,25	375	167	208	1,5.10 ³
2,31	375	113	262	2,0.10 ³
1,25	198	88	110	2,4.10 ³
0,50	500	333	167	0,7.10 ³
1,25	375	167	208	1,6.10 ³
0,19	375	315	60	0,7.10 ³
1,25	552	245	307	1,0.10 ³
2,00	500	167	333	1,4.10 ³
1,25	375	167	208	1,6.10 ³
1,25	375	167	208	1,5.10 ³
0,50	250	167	83	1,5.10 ³
2,00	250	83	167	2,3.10 ³
1,25	375	167	208	1,6.10 ³

^a Ratio calculé à partir de concentrations massiques

10 Il a donc ici été démontré que, avec les conditions de synthèse mises en œuvre, l'utilisation de dextrane-saccharases selon l'invention permet au moins de synthétiser des glucooligosaccharides de masse molaire moyenne allant de 0,7.10³ à 3,4.10³ g.mol⁻¹.

Exemple 13 :

15 Le dextrane commercial de 11 300 g/mol fourni par Sigma (ref D-9260 lot 74H0764) a été comparé au dextrane synthétisé par le procédé de l'invention à partir de saccharose 300 g/l dans du tampon acétate de sodium à pH 5.75 et une température de 30°C afin d'obtenir une masse molaire de 11 300 g/mol. Une analyse par chromatographie d'exclusion sur colonnes

Shodex SB-805 et SB-802.5 en série montre que la population de dextrans obtenue grâce au procédé de l'invention est nettement moins polydisperse que le dextrane commercial.

REFERENCES

- 5 (1) Mage and Kabat, *Immunochemical studies on dextrans; III. The specificities of rabbit antidextrans. Further findings on antidextrans with 1,2- and 1,6-specificities*; 1963; Vol. 91, p. 634-640
- (2) De Belder, *Dextran*; Amersham Biosciences; 2003
- (3) Glucansucrases: Three-dimensional structures, reactions, mechanism, alpha-glucan analysis and their implications in biotechnology and food applications Lemhuis et al., *Journal of Biotechnology*, January 2013, vol 163, Issue 2, 250-272
- 10 (4) A method for determination of invertase activity, Sumner & Howell, *Journal of biological chemistry*, 1935, vol 108, Issue 51
- (5) Moulis C, Vaca Medina G, Suwannarangsee S, Monsan P, Remaud-Simeon M, Potocki-Veronese G (2008) One-step synthesis of isomalto-oligosaccharide syrups and dextrans of controlled size using engineered dextransucrase. *Biocatal. Biotransformation*. Taylor & Francis, pp 141–151
- 15 (6) Kim et al., Dextran molecular size and degree of branching as a function of sucrose concentration, pH, and temperature of reaction of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMCM dextransucrase; *Carbohydrate Research* 338 (2003) 1183–1189
- 20 (7) High-level production and purification of a fully active recombinant dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F, Moulis et al, *FEMS Microbiology Letters*, August 2006, vol 261, Issue 2, 203-210
- (8) Kothari et al, Structural Characterization of Enzymatically Synthesized Dextran and Oligosaccharides from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1426 Dextransucrase. ISSN 0006-2979, *Biochemistry (Moscow)*, 2013, Vol. 78, No. 10, pp. 1164-1170.
- 25 (9) Amari et al, Characterization of a novel dextransucrase from *Weissella confusa* isolated from sourdough. *Appl Microbiol Biotechnol* (2013) 97:5413–5422
- 30 (10) Kralj et al, Glucan synthesis in the genus *Lactobacillus*: isolation and characterization of glucansucrase genes, enzymes and glucan products from six different strains; *Microbiology* (2004), 150, 3681–3690.
- (11) Striegel et al, An SEC/MALS study of alternan degradation during size-exclusion chromatographic analysis; *Anal Bioanal Chem* (2009) 394:1887–1893

- (12) Dextran: effect of process parameters on production, purification and molecular weight and recent applications, Vettori et al., *Diálogos & Ciência*, ISSN 1678-0493, no 31, septembre 2012
- (13) GOULAS, A. K. et al. Synthesis of isomaltoligosaccharides and oligodextrans by the combined use of dextransucrase and dextransase. *Enzyme Microb. Technol.*, 35, 2004. 327-338.
- (14) Naessens et al., M. et al. Leuconostoc dextransucrase and dextran: production, properties and applications. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 80, 2005. 845-860.
- (15) EGGLESTON AND COTE, G. L. Oligosaccharides in food and agriculture. Washington, DC: ACS symposium series 849, 2003. p. 1-15.
- (16) Functional Polymers Based on Dextran, Thomas Heinze, Tim Liebert, Brigitte Heublein, Stephanie Hornig, *Adv Polym Sci* (2006) 205: 199–291, DOI 10.1007/12_100.
- (17) Structure and macromolecular properties of *Weissella confusa* and *Leuconostoc citreum* dextrans with a potential application in sourdough, Ndegwa Henry Maina, 1st June 2012, University of Helsinki, Department of Food and Environmental Sciences, Chemistry and Biochemistry Division.

REVENDICATIONS

1. Protéine à activité dextrane-saccharase ayant pour séquence d'acides aminés la séquence SEQ ID NO : 1, ou comprenant au moins 80%, de préférence 85%, de préférence encore 90%, de préférence encore 95%, de préférence encore 98% d'identité sur les positions 563 à 1282 de la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 1, de préférence sur les positions 563 à 1282 et 1316 à 1433 de la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 1, de préférence encore sur les positions 563 à 1282, 1316 à 1433 et 174 à 421 de la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 1, de préférence encore sur les positions 563 à 1282, 1316 à 1433 et 42 à 421 de la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 1.
2. Protéine à activité dextrane-saccharase ayant pour séquence d'acides aminés la séquence SEQ ID NO : 2, ou comprenant au moins 80%, de préférence 85%, de préférence encore 90%, de préférence encore 95%, de préférence encore 98% d'identité sur les positions 522 à 1241 sur la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 2, de préférence sur les positions 522 à 1241 et 1275 à 1392 sur la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 2, de préférence encore sur les positions 522 à 1241, 1275 à 1392 et 133 à 380 sur la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 2, de préférence encore sur les positions 522 à 1241, 1275 à 1392 et 1 à 380 sur la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 2
3. Protéine à activité dextrane-saccharase selon la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle a pour séquence d'acides aminés la séquence SEQ ID NO : 2.
4. Complexe comprenant un support et une protéine à activité dextrane-saccharase telle que définie selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que ladite protéine à activité dextrane-saccharase a été immobilisée sur ledit support.
5. Procédé de synthèse de dextrans, dans lequel :
- on fournit du saccharose dans un milieu de synthèse,

- on met en contact une dextrane-saccharase telle que définie selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 avec ledit saccharose dans ledit milieu de synthèse pour former des dextranses,
- on isole optionnellement les dextranses obtenus.

5

6. Procédé de synthèse de dextranses, dans lequel :

- on fournit du saccharose dans un milieu de synthèse,
- on met en contact un complexe tel que défini selon la revendication 4 avec ledit saccharose dans ledit milieu de synthèse pour former des dextranses,
- on isole optionnellement les dextranses obtenus.

10

7. Procédé de synthèse selon les revendications 5 ou 6, caractérisé en ce que la synthèse est conduite à une température comprise entre 20 °C et 50 °C, de préférence comprise entre 25 °C et 45 °C.

15

8. Procédé de synthèse selon l'une quelconque des revendications 5 à 7, caractérisé en ce que la concentration en saccharose dans le milieu de synthèse est comprise entre 50 et 600 g.L⁻¹, de préférence comprise entre 50 et 400 g.L⁻¹.

20

9. Procédé de synthèse selon l'une quelconque des revendications 5 à 8, caractérisé en ce que le pH lors de la réaction est compris entre 4 et 7, de préférence d'environ 5,75.

25

10. Dextrane caractérisé en ce qu'il présente 100% de liaisons glucosidiques α -1,6, une masse molaire moyenne en poids M_w comprise entre $2 \cdot 10^3$ et $40 \cdot 10^3$ g.mol⁻¹, de préférence entre $3 \cdot 10^3$ g.mol⁻¹ et $32 \cdot 10^3$ g.mol⁻¹, de préférence entre $7 \cdot 10^3$ et $25 \cdot 10^3$ g.mol⁻¹, et un indice de dispersité D_i inférieur à 1,5.

30

11. Procédé de synthèse de gluco-oligosaccharides dans lequel :

- on fournit du saccharose et au moins un accepteur glucidique dans un milieu de synthèse,
 - on met en contact une dextrane-saccharase telle que définie selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou un complexe tel que défini selon la revendication 4 avec ledit saccharose et ledit au moins un accepteur glucidique dans ledit milieu de
- synthèse pour former des gluco-oligosaccharides,

35

- on isole optionnellement les gluco-oligosaccharides obtenus.

12. Procédé de synthèse de composés gluco-conjugués, dans lequel :

- 5 - on fournit du saccharose et au moins une molécule hydroxylée dans un milieu de synthèse,
- on met en contact une dextrane-saccharase telle que définie selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou un complexe tel que défini selon la revendication 4 avec
10 ledit saccharose et ladite au moins une molécule hydroxylée dans ledit milieu de synthèse pour former des composés gluco-conjugués,
- on isole optionnellement les composés gluco-conjugués obtenus.

- 13. Composition pharmaceutique, cosmétique ou alimentaire comprenant un dextrane
15 selon la revendication 10, à titre de principe actif ou à titre d'excipient acceptable.

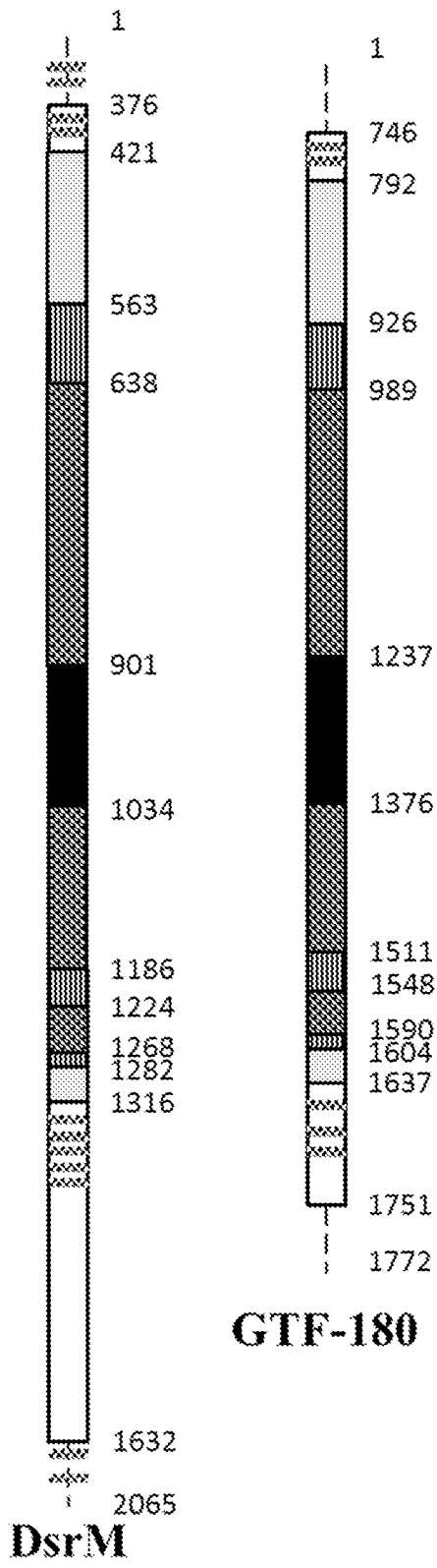


Figure 1

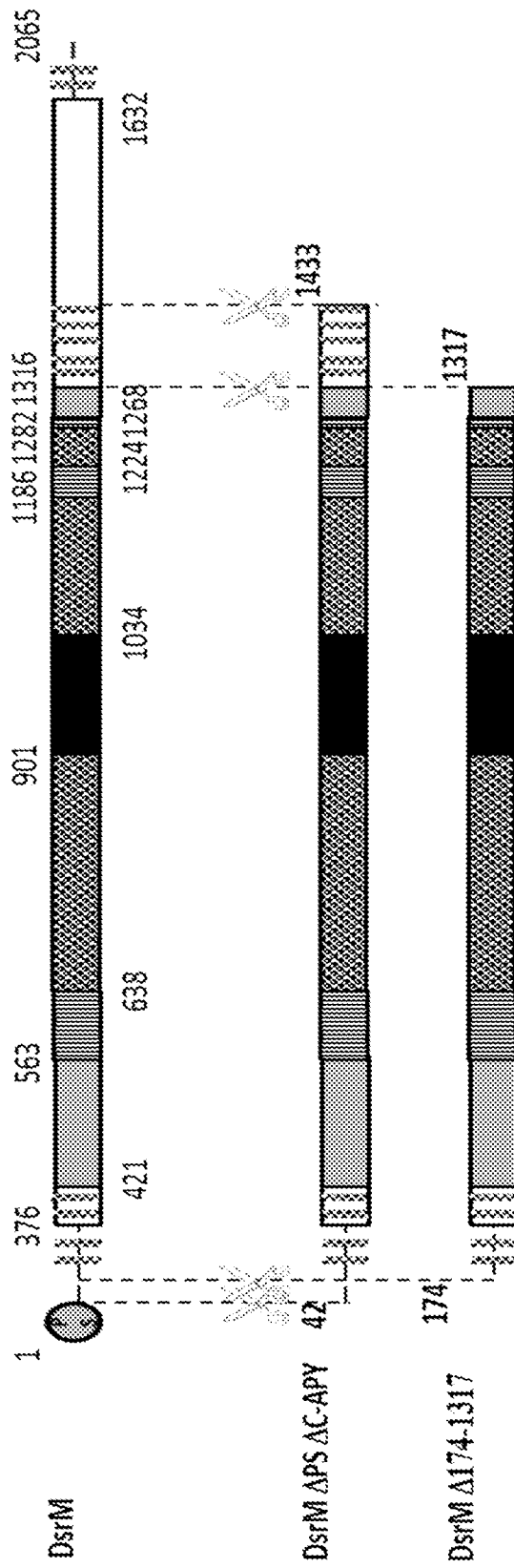


Figure 2

Support	Fournisseur	nature support	groupement fonctionnel	Type de liaison
Spinbeads AA130	Spin Technologies	Polyméthacrylate haute porosité	Groupement Amino- (espaceur court)	Liaisons ioniques
Spinbeads AO110	Spin Technologies	Polyméthacrylate	Groupement Octadécyl-	Liaisons hydrophobes
Spinbeads SN110	Spin Technologies	Polystyrène – DiVinyl-Benzène	--	Liaisons hydrophobes
Spinbeads ECQ1A	Resindion	Polyméthacrylate	Groupement Amine Quaternaire -NR ²⁺	Liaisons ioniques
Purollite ECR1604	Purollite	Styrène	Groupement Amine Quaternaire -NR ³⁺	Liaisons ioniques
Purollite ECR8214	Purollite	Epoxy méthacrylate	Groupement Epoxy-	Liaisons covalentes
Purollite ECR4204	Purollite	Epoxy méthacrylic/Styrène	Groupement Epoxy-	Liaisons covalentes

Figure 3

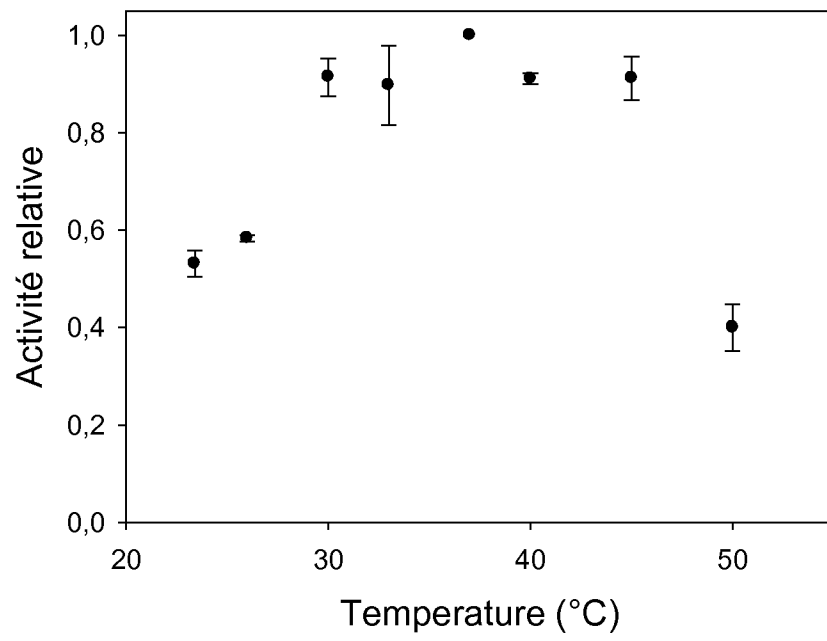


Figure 4

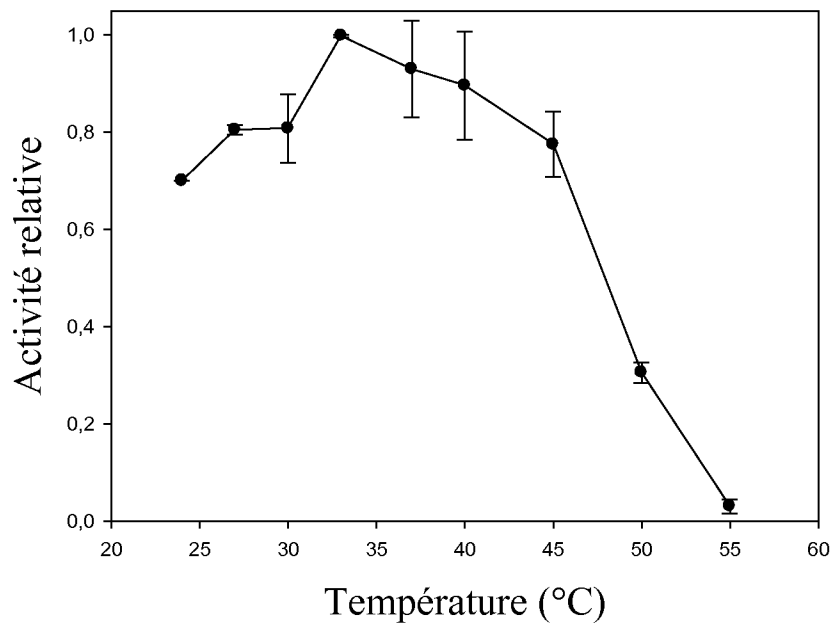


Figure 5

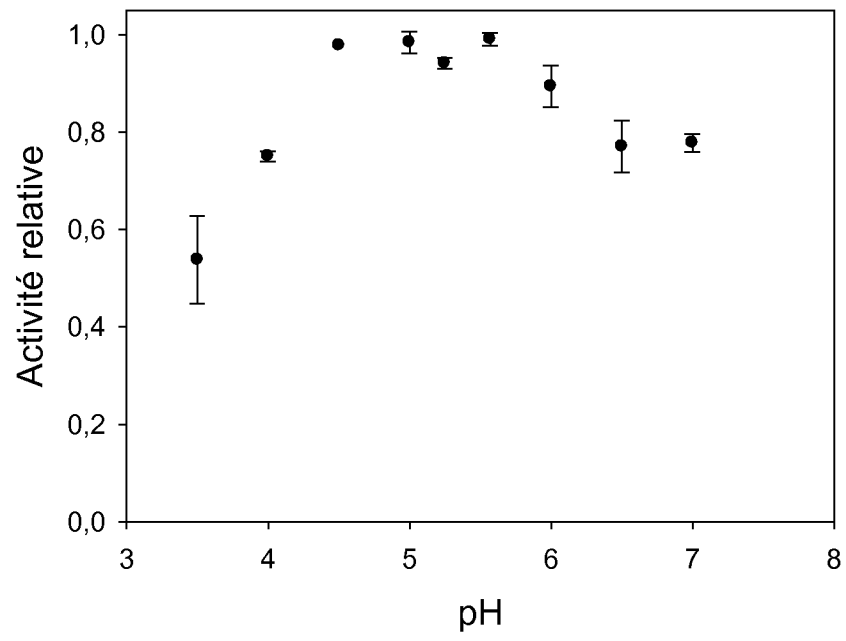


Figure 6

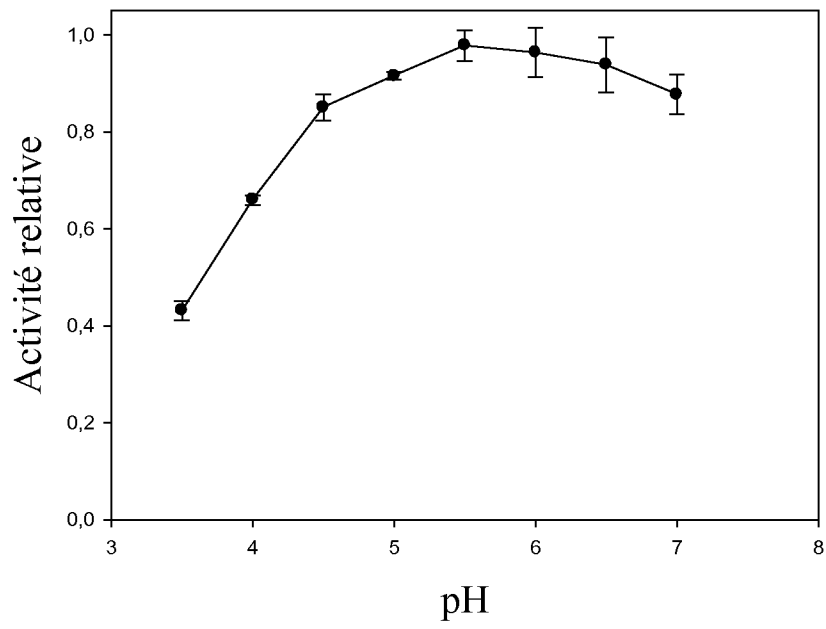


Figure 7

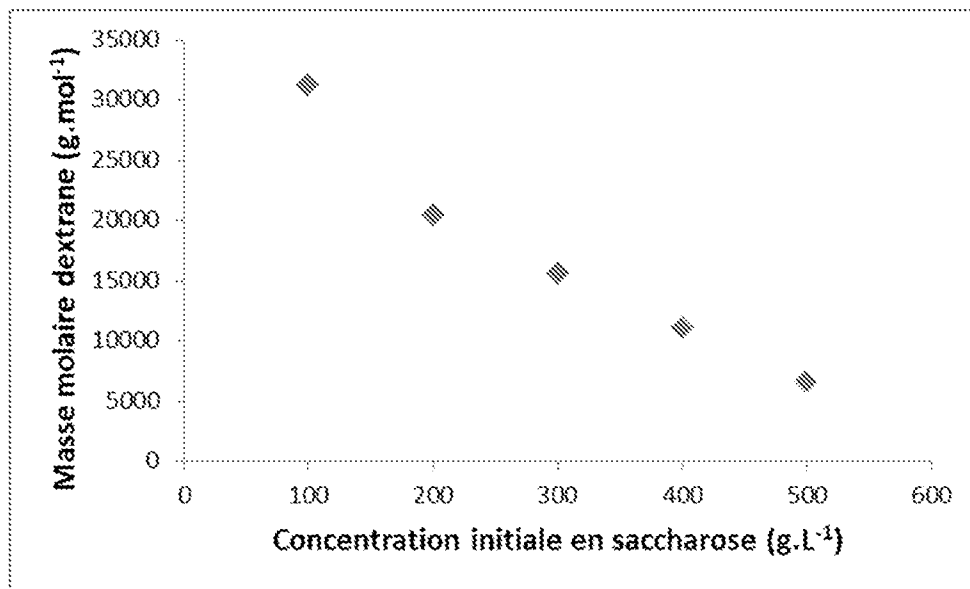


Figure 8

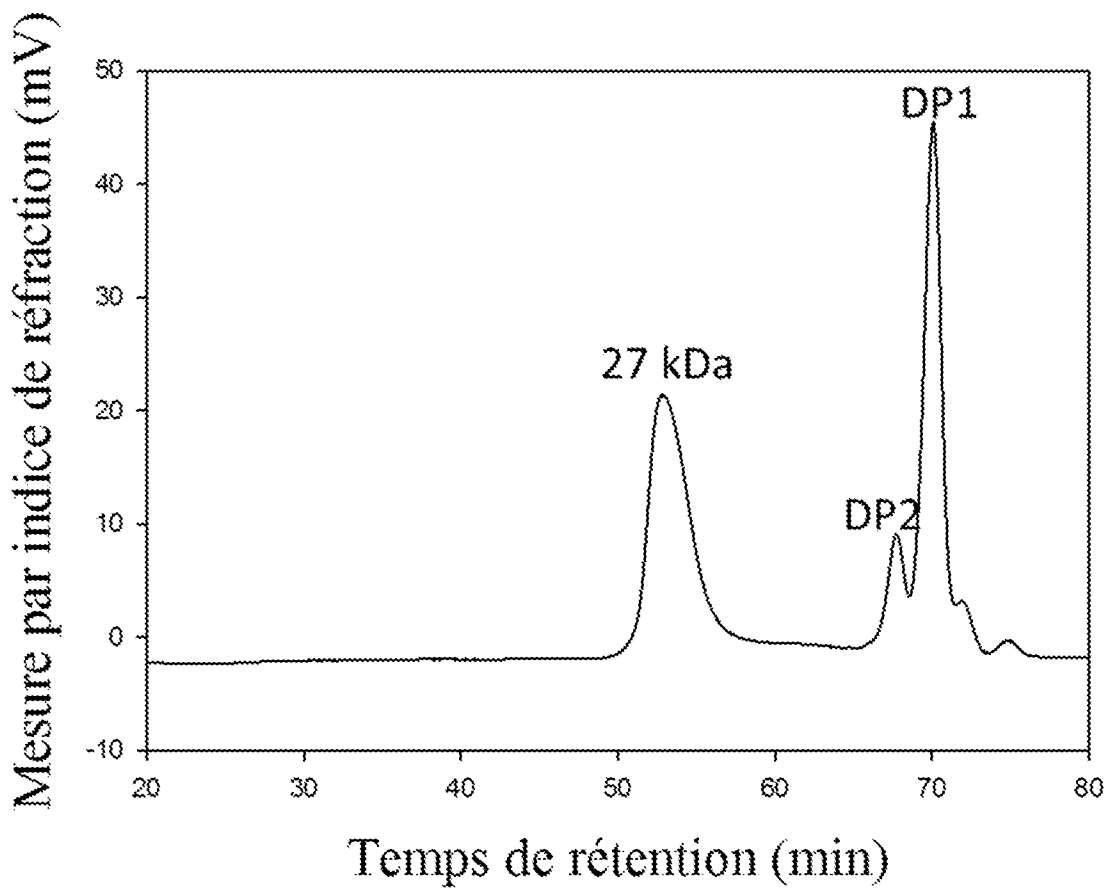


Figure 9

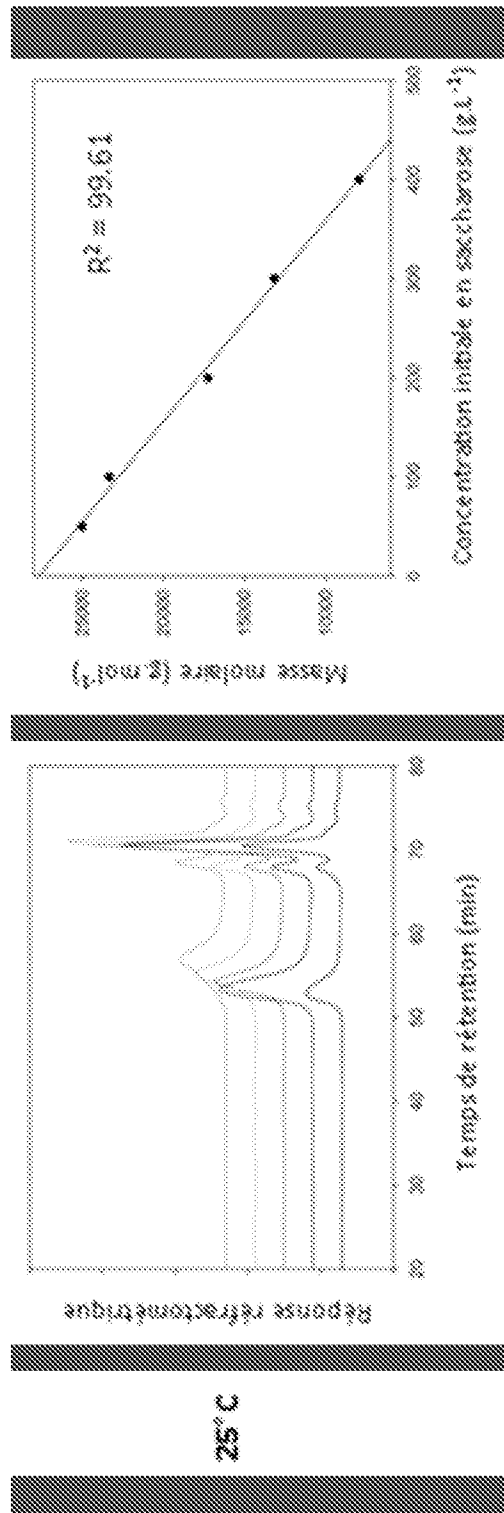


Figure 10 A

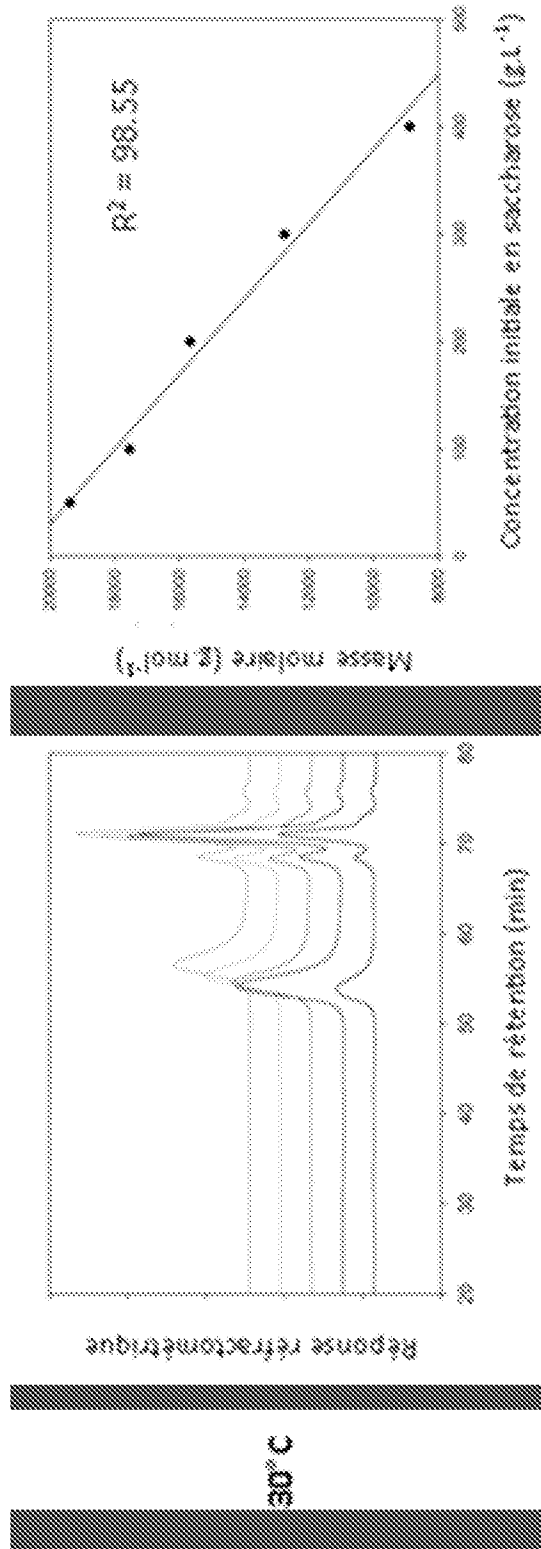


Figure 10 B

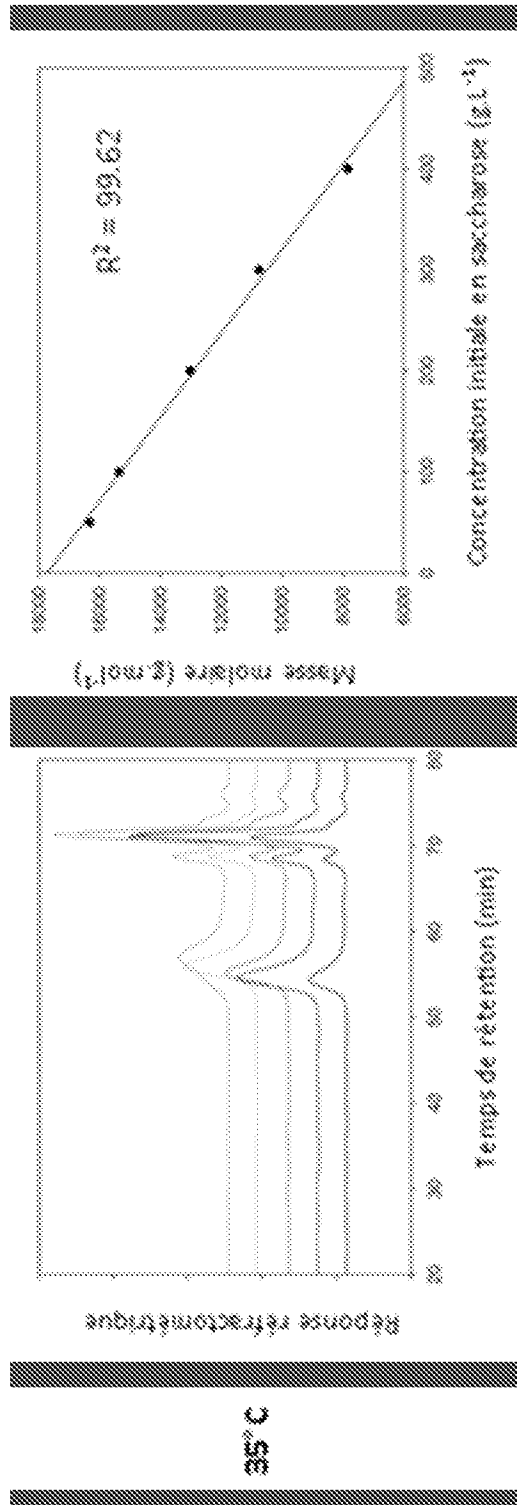


Figure 10 C

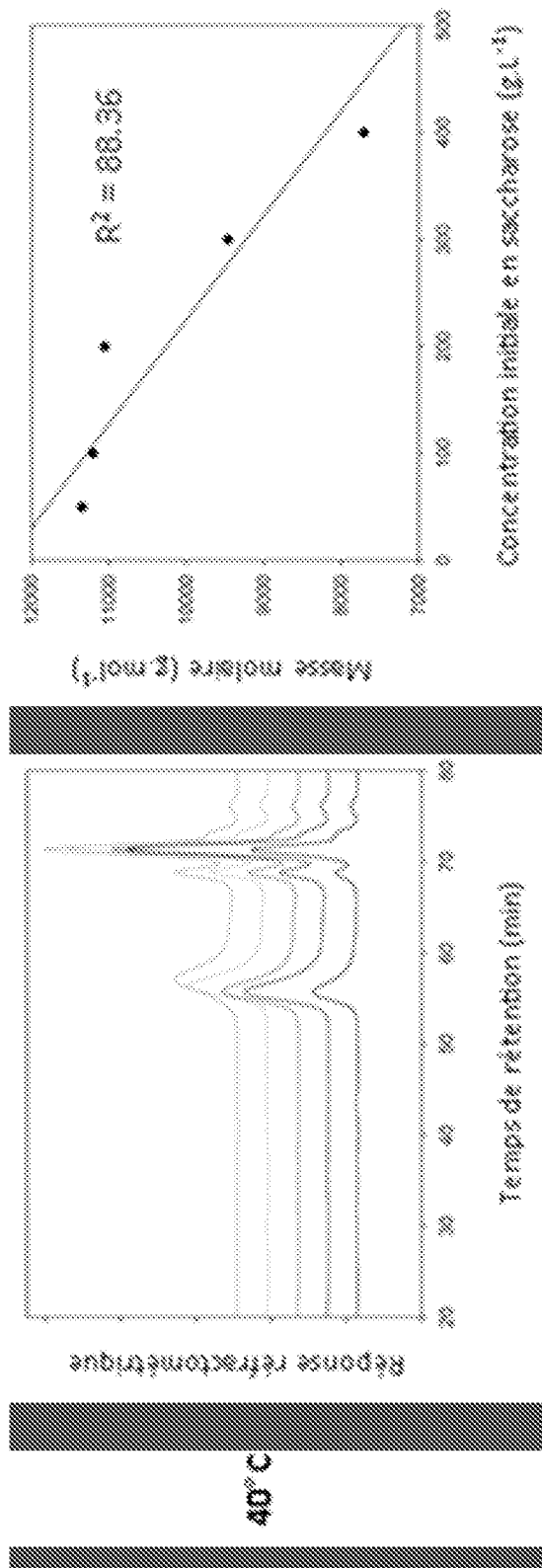


Figure 10 D

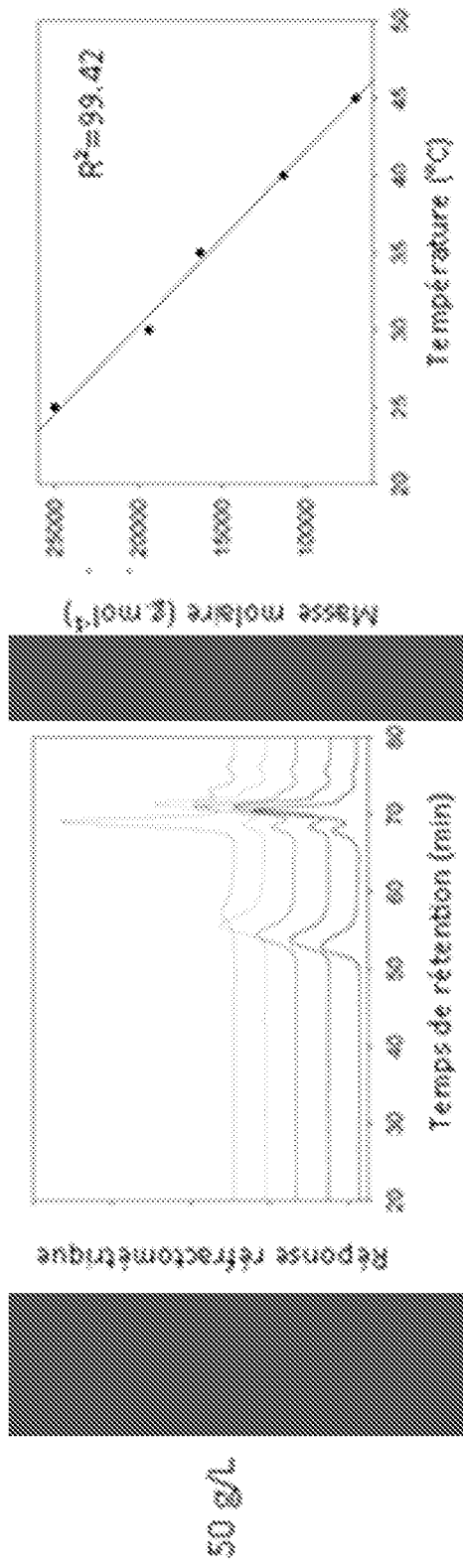


Figure 11 A

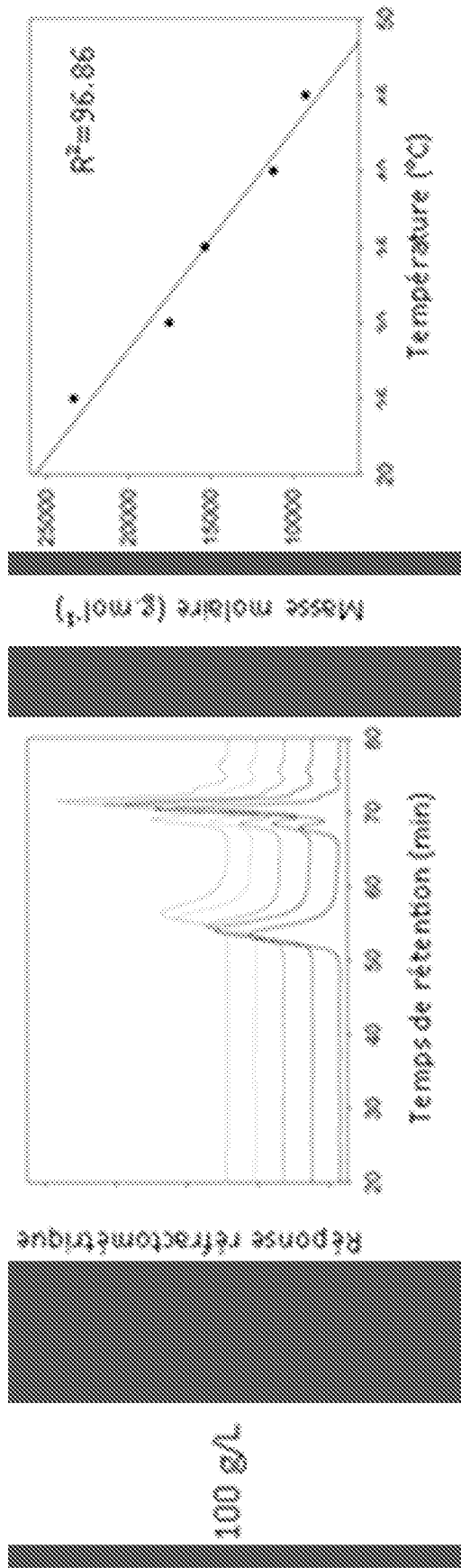


Figure 11 B

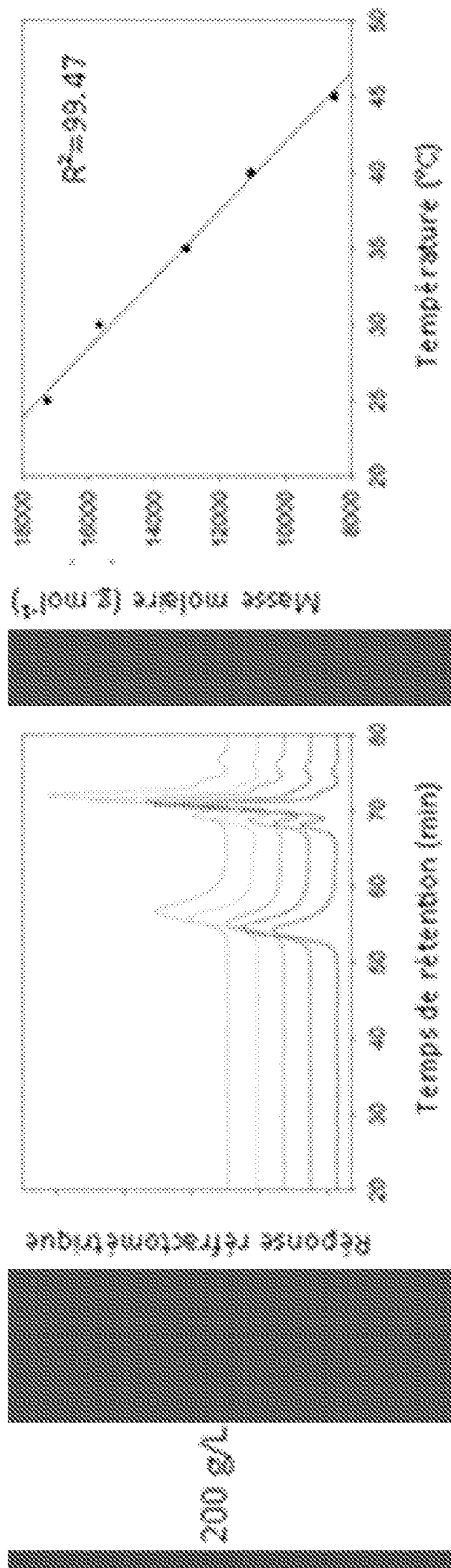


Figure 11 C

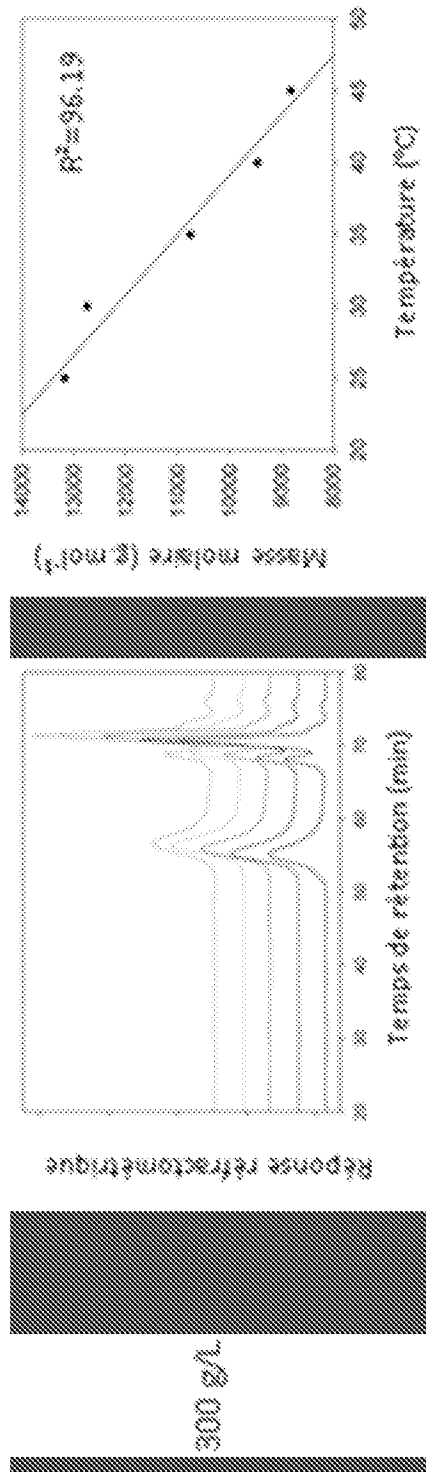


Figure 11 D

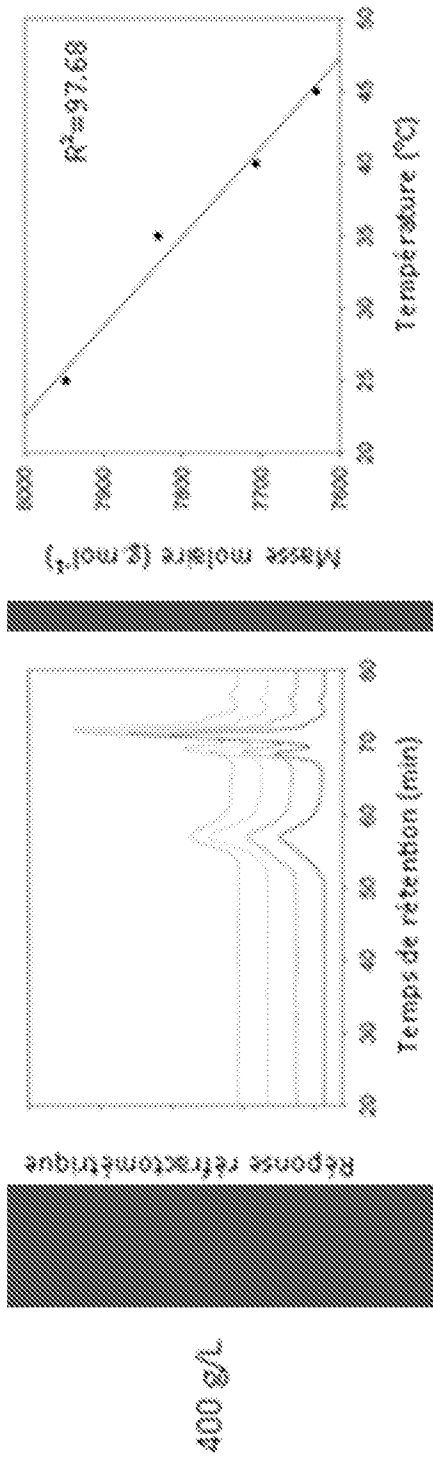


Figure 11 E

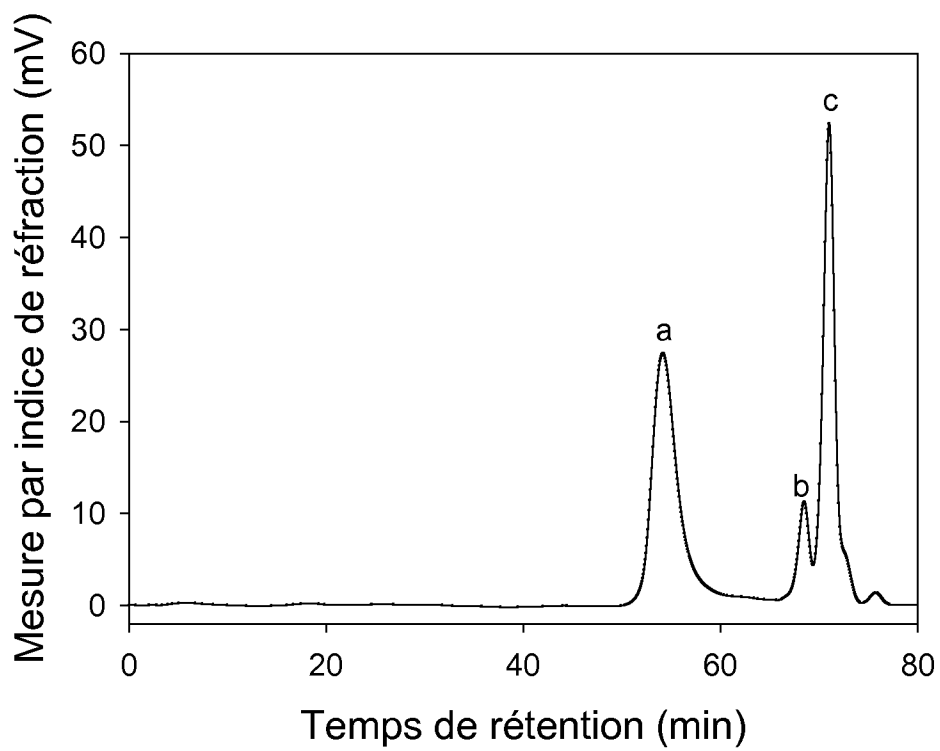


Figure 12

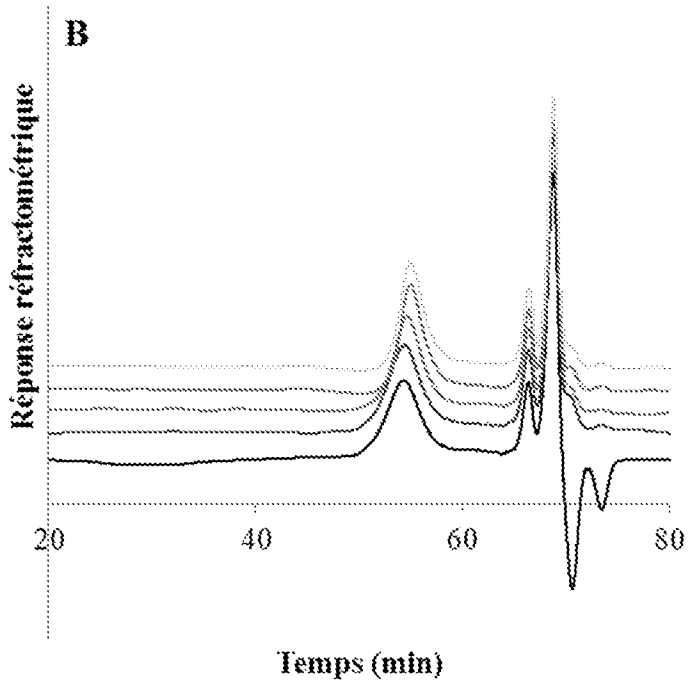
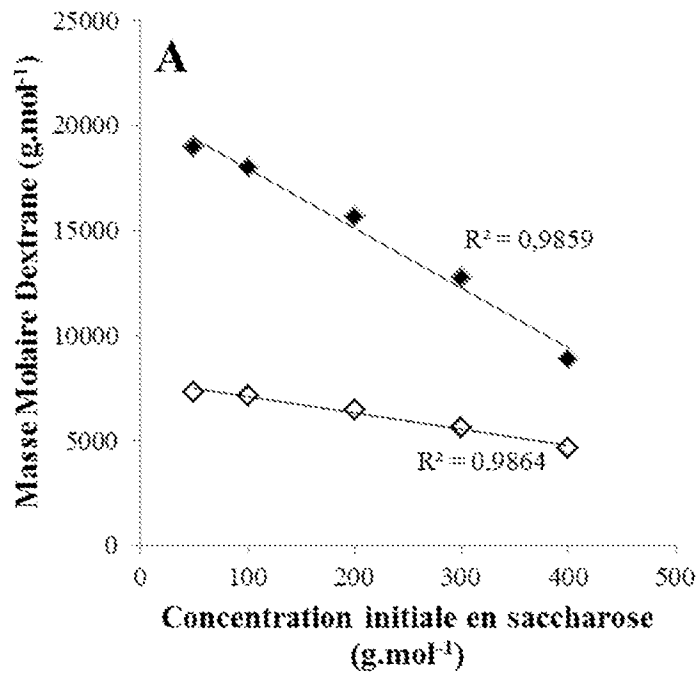


Figure 13

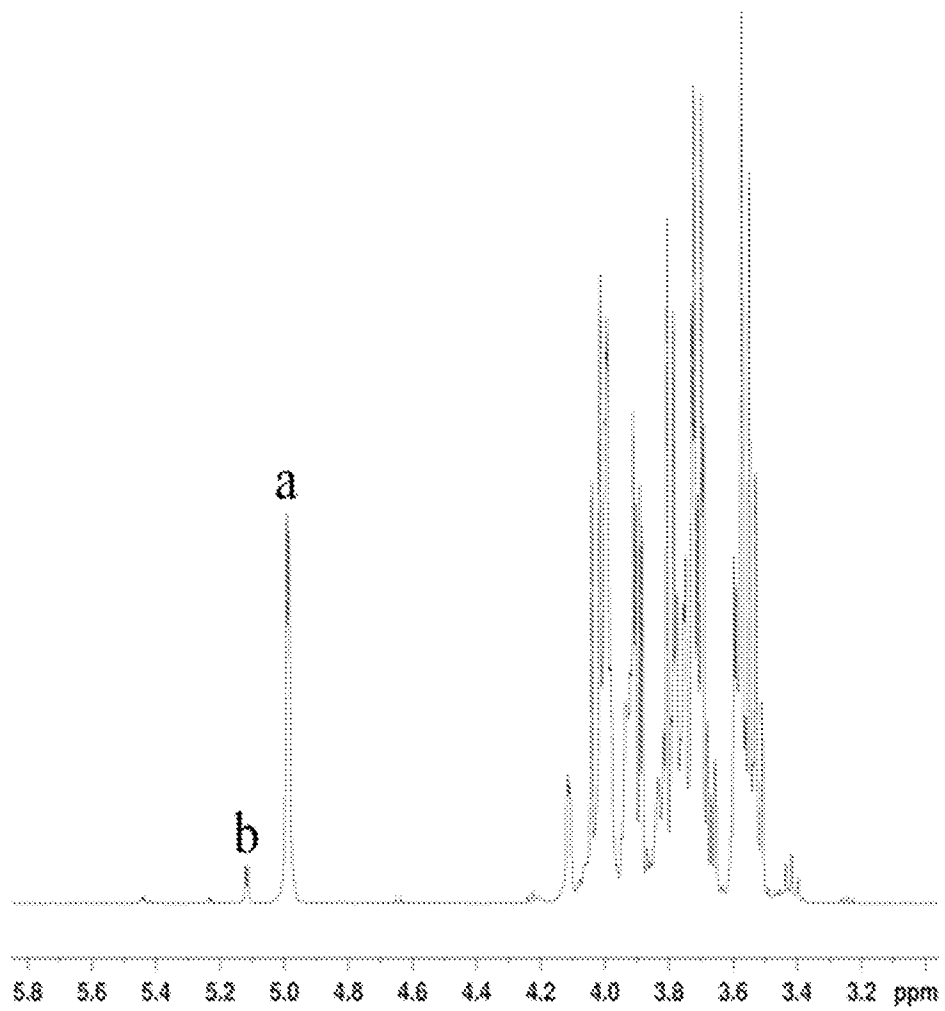


Figure 14

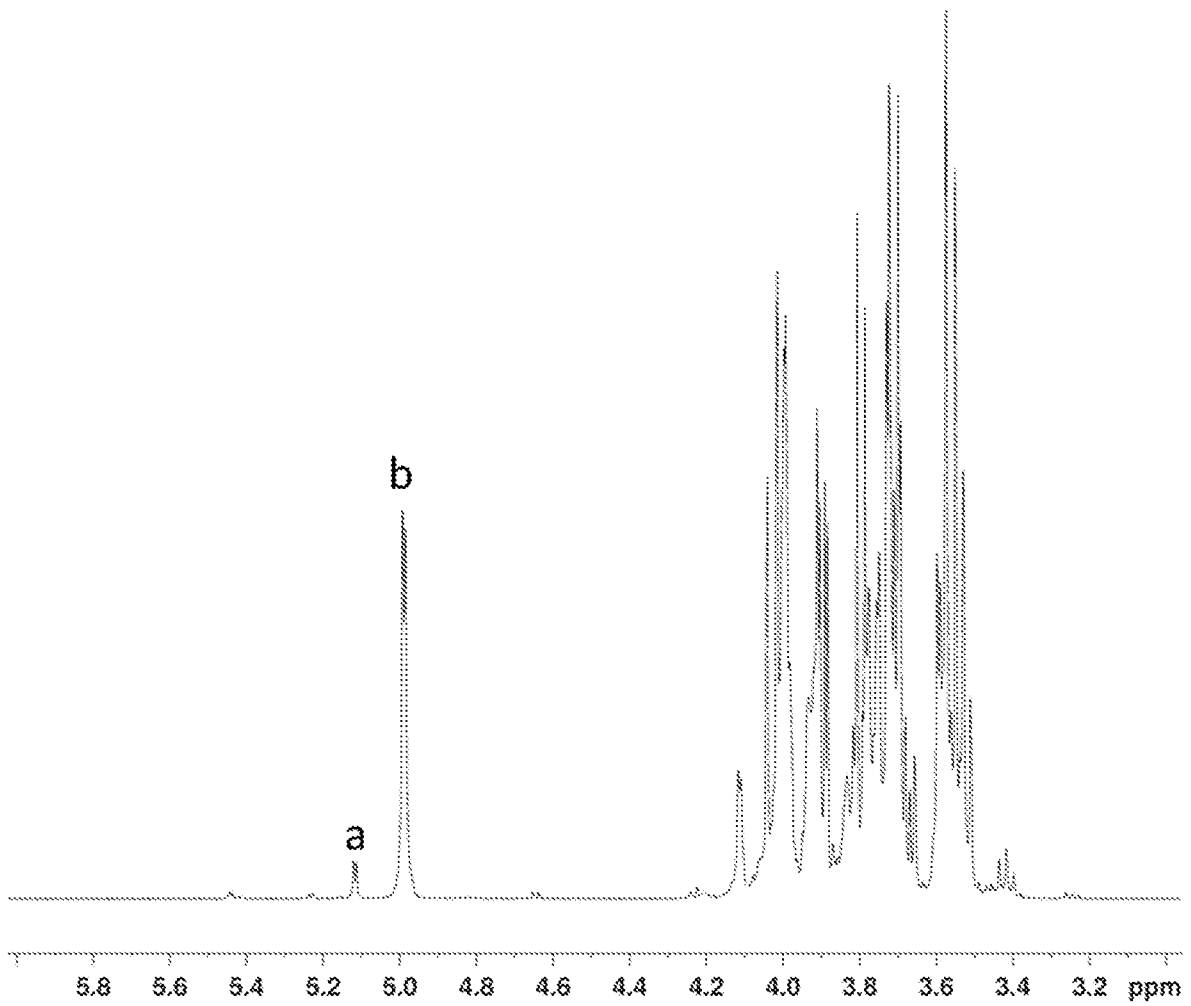


Figure 15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2015/052002

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 INV. C12N9/10 A23L1/308 C12P19/08 C12P19/18
 ADD.
 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
 Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 C12N A23L C12P
 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DOLS M ET AL: "Characterization of the different dextransucrase activities excreted in glucose, fructose, or sucrose medium by Leuconostoc mesenteroides NRRL B-1299", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 64, no. 4, April 1998 (1998-04), pages 1298-1302, XP002360116, ISSN: 0099-2240 page 1299 - page 1301 ----- -/--	10,13

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search 5 October 2015	Date of mailing of the international search report 21/10/2015
--	---

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Deleu, Laurent
--	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2015/052002

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SIMPSON C ET AL: "Four glucosyltransferases, GtfJ, GtfK, GtfL, and GtfM from Streptococcus salivarius ATCC 25975", MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY, CENTER FOR ACADEMIC PUBLICATIONS JAPAN ¹ , JP, vol. 141, no. 6, June 1995 (1995-06), pages 1451-1460, XP002082272, ISSN: 0385-5600 table 2	10,13
Y	----- US 4 767 614 A (SCARPA IOANNIS S [US] ET AL) 30 August 1988 (1988-08-30) example 1	10,13
Y	----- WO 2010/129839 A1 (TATE & LYLE INGREDIENTS FRANCE [FR]; NAEYE THIERRY [FR]; EINERHAND ALE) 11 November 2010 (2010-11-11) example 4	10,13
Y	----- Anonymous: "Dextrans", 20 January 2014 (2014-01-20), XP055218107, Retrieved from the Internet: URL:https://web.archive.org/web/20140120040848/http://www.sigmaaldrich.com/life-science/biochemicals/biochemical-products.html?TablePage=22696471 [retrieved on 2015-10-05] page 1 - page 2	10,13
Y	----- Vicki Caligur: "Dextran and Related Polysaccharides", BioFiles, 2008, XP055218106, Retrieved from the Internet: URL:http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/articles/biofiles/volume3.10a17/Dextran-and-Related-Polysaccharides.pdf [retrieved on 2015-10-05] page 1 - page 2	10,13
Y	----- ELVIRA KHALIKOVA ET AL: "Microbial Dextran-Hydrolyzing Enzymes: Fundamentals and Applications", MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS, vol. 69, no. 2, June 2005 (2005-06), pages 306-325306, XP055218315, DOI: 10.1128/JMBR.69.2.306-325.2005 page 307	10,13
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2015/052002

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 164 656 A2 (PFEIFER & LANGEN [DE]) 18 December 1985 (1985-12-18) claims 1-19	11,12
A	----- WO 2010/128859 A2 (UNIV GRONINGEN [NL]; DIJKHUIZEN LUBBERT [NL]; VAN DER MAAREL MARC JOS) 11 November 2010 (2010-11-11) page 9 - page 12	11,12
A	----- S. A. F. T. VAN HIJUM ET AL: "Structure-Function Relationships of Glucansucrase and Fructansucrase Enzymes from Lactic Acid Bacteria", MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS, vol. 70, no. 1, March 2006 (2006-03), pages 157-176, XP055179067, ISSN: 1092-2172, DOI: 10.1128/MMBR.70.1.157-176.2006 the whole document	1-13
A	----- US 5 229 277 A (DAY DONAL F [US] ET AL) 20 July 1993 (1993-07-20) the whole document	10,13
X,P	----- DATABASE UniProt [Online] 4 February 2015 (2015-02-04), "SubName: Full=Alternansucrase {ECO:0000313 EMBL:CDX66895.1}; EC=2.4.1.140 {ECO:0000313 EMBL:CDX66895.1}"; XP002745403, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:A0A0A1IPZ8 Database accession no. A0A0A1IPZ8 sequence -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No PCT/FR2015/052002

Patent document cited in search report	Publication date	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4767614	A	30-08-1988	NONE	

WO 2010129839	A1	11-11-2010	AU 2010245761 A1	01-12-2011
			CA 2761150 A1	11-11-2010
			CN 102439048 A	02-05-2012
			EP 2427499 A1	14-03-2012
			IL 215936 A	31-12-2014
			JP 2012526145 A	25-10-2012
			KR 20120027314 A	21-03-2012
			US 2010284972 A1	11-11-2010
			US 2015004140 A1	01-01-2015
			WO 2010129839 A1	11-11-2010

EP 0164656	A2	18-12-1985	CA 1256391 A1	27-06-1989
			DE 3422247 A1	19-12-1985
			DK 227785 A	16-12-1985
			EP 0164656 A2	18-12-1985
			US 4649058 A	10-03-1987

WO 2010128859	A2	11-11-2010	AU 2010245378 A1	01-12-2011
			BR PI1011572 A2	01-09-2015
			CA 2761257 A1	11-11-2010
			CN 102459624 A	16-05-2012
			EP 2248907 A1	10-11-2010
			EP 2427565 A2	14-03-2012
			ES 2444947 T3	27-02-2014
			JP 2012525840 A	25-10-2012
			RU 2011149793 A	20-06-2013
			US 2012165290 A1	28-06-2012
			WO 2010128859 A2	11-11-2010

US 5229277	A	20-07-1993	NONE	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2015/052002

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. C12N9/10 A23L1/308 C12P19/08 C12P19/18 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) C12N A23L C12P		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	DOLS M ET AL: "Characterization of the different dextransucrase activities excreted in glucose, fructose, or sucrose medium by Leuconostoc mesenteroides NRRL B-1299", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 64, no. 4, avril 1998 (1998-04), pages 1298-1302, XP002360116, ISSN: 0099-2240 page 1299 - page 1301 ----- -/--	10,13
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents		
<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités:		
"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée	"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets	
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 5 octobre 2015		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 21/10/2015
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Deleu, Laurent

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2015/052002

Cadre N° I Séquence(s) de nucléotides ou d'acides aminés (suite du point 1.c de la première feuille)

1. En ce qui concerne la ou les séquences de nucléotides ou d'acides aminés divulguées dans la demande internationale, la recherche internationale a été effectuée sur la base d'un listage des séquences :
- a. faisant partie de la demande internationale telle que déposée :
- sous forme d'un fichier texte selon la norme de l'annexe C/ST.25.
- sur papier ou sous forme d'un fichier image.
- b. remis avec la demande internationale, exclusivement aux fins de la recherche internationale en vertu de la règle 13ter.1.a), sous forme d'un fichier texte selon la norme de l'annexe C/ST.25.
- c. remis postérieurement à la date de dépôt international exclusivement aux fins de la recherche internationale :
- sous forme d'un fichier texte selon la norme de l'annexe C/ST.25 (règle 13ter.1.a)).
- sur papier ou sous forme d'un fichier image (règle 13ter.1.b) et instruction administrative 713).
2. De plus, lorsque plus d'une version ou d'une copie d'un listage des séquences a été déposée ou remise, les déclarations requises selon lesquelles les informations fournies ultérieurement ou au titre de copies supplémentaires sont identiques à celles faisant partie de la demande telle que déposée et ne vont pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, selon le cas, ont été remises.
3. Commentaire complémentaires:

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	SIMPSON C ET AL: "Four glucosyltransferases, GtfJ, GtfK, GtfL, and GtfM from Streptococcus salivarius ATCC 25975", MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY, CENTER FOR ACADEMIC PUBLICATIONS JAPAN ¹ , JP, vol. 141, no. 6, juin 1995 (1995-06), pages 1451-1460, XP002082272, ISSN: 0385-5600 tableau 2	10,13
Y	----- US 4 767 614 A (SCARPA IOANNIS S [US] ET AL) 30 août 1988 (1988-08-30) exemple 1	10,13
Y	----- WO 2010/129839 A1 (TATE & LYLE INGREDIENTS FRANCE [FR]; NAEYE THIERRY [FR]; EINERHAND ALE) 11 novembre 2010 (2010-11-11) exemple 4	10,13
Y	----- Anonymous: "Dextrans", 20 janvier 2014 (2014-01-20), XP055218107, Extrait de l'Internet: URL:https://web.archive.org/web/20140120040848/http://www.sigmaaldrich.com/life-science/biochemicals/biochemical-products.html?TablePage=22696471 [extrait le 2015-10-05] page 1 - page 2	10,13
Y	----- Vicki Caligur: "Dextran and Related Polysaccharides", BioFiles, 2008, XP055218106, Extrait de l'Internet: URL:http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/articles/biofiles/volume3.10a17/Dextran-and-Related-Polysaccharides.pdf [extrait le 2015-10-05] page 1 - page 2	10,13
Y	----- ELVIRA KHALIKOVA ET AL: "Microbial Dextran-Hydrolyzing Enzymes: Fundamentals and Applications", MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS, vol. 69, no. 2, juin 2005 (2005-06), pages 306-325306, XP055218315, DOI: 10.1128/JMBR.69.2.306-325.2005 page 307	10,13
	----- -/--	

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP 0 164 656 A2 (PFEIFER & LANGEN [DE]) 18 décembre 1985 (1985-12-18) revendications 1-19 -----	11,12
A	WO 2010/128859 A2 (UNIV GRONINGEN [NL]; DIJKHUIZEN LUBBERT [NL]; VAN DER MAAREL MARC JOS) 11 novembre 2010 (2010-11-11) page 9 - page 12 -----	11,12
A	S. A. F. T. VAN HIJUM ET AL: "Structure-Function Relationships of Glucansucrase and Fructansucrase Enzymes from Lactic Acid Bacteria", MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS, vol. 70, no. 1, mars 2006 (2006-03), pages 157-176, XP055179067, ISSN: 1092-2172, DOI: 10.1128/MMBR.70.1.157-176.2006 le document en entier -----	1-13
A	US 5 229 277 A (DAY DONAL F [US] ET AL) 20 juillet 1993 (1993-07-20) le document en entier -----	10,13
X,P	DATABASE UniProt [Online] 4 février 2015 (2015-02-04), "SubName: Full=Alternansucrase {ECO:0000313 EMBL:CDX66895.1}; EC=2.4.1.140 {ECO:0000313 EMBL:CDX66895.1}"; XP002745403, extrait de EBI accession no. UNIPROT:A0A0A1IPZ8 Database accession no. A0A0A1IPZ8 séquence -----	1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2015/052002

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 4767614	A	30-08-1988	AUCUN	

WO 2010129839	A1	11-11-2010	AU 2010245761 A1	01-12-2011
			CA 2761150 A1	11-11-2010
			CN 102439048 A	02-05-2012
			EP 2427499 A1	14-03-2012
			IL 215936 A	31-12-2014
			JP 2012526145 A	25-10-2012
			KR 20120027314 A	21-03-2012
			US 2010284972 A1	11-11-2010
			US 2015004140 A1	01-01-2015
			WO 2010129839 A1	11-11-2010

EP 0164656	A2	18-12-1985	CA 1256391 A1	27-06-1989
			DE 3422247 A1	19-12-1985
			DK 227785 A	16-12-1985
			EP 0164656 A2	18-12-1985
			US 4649058 A	10-03-1987

WO 2010128859	A2	11-11-2010	AU 2010245378 A1	01-12-2011
			BR PI1011572 A2	01-09-2015
			CA 2761257 A1	11-11-2010
			CN 102459624 A	16-05-2012
			EP 2248907 A1	10-11-2010
			EP 2427565 A2	14-03-2012
			ES 2444947 T3	27-02-2014
			JP 2012525840 A	25-10-2012
			RU 2011149793 A	20-06-2013
			US 2012165290 A1	28-06-2012
			WO 2010128859 A2	11-11-2010

US 5229277	A	20-07-1993	AUCUN	
