



HAL
open science

Modélisation moléculaire et expérimentation en réacteur solide/gaz pour la compréhension de la sélectivité de la lipase B de *Candida antarctica*

Zsuzsanna Marton

► **To cite this version:**

Zsuzsanna Marton. Modélisation moléculaire et expérimentation en réacteur solide/gaz pour la compréhension de la sélectivité de la lipase B de *Candida antarctica*. Sciences agricoles. Université de La Rochelle, 2010. Français. NNT : 2010LAROS298 . tel-00541104

HAL Id: tel-00541104

<https://theses.hal.science/tel-00541104>

Submitted on 29 Nov 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITÉ DE LA ROCHELLE

ÉCOLE DOCTORALE
Science pour l'Environnement Gay-Lussac

Laboratoire Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs) UMR CNRS 6250

THÈSE

présentée par :

Zsuzsanna MARTON

soutenue le 22 juillet 2010

pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de La Rochelle

Discipline : Biochimie

**Modélisation moléculaire et expérimentation en réacteur solide/gaz
pour la compréhension de la sélectivité de la lipase B de *Candida antarctica***

JURY :

Sylvain LAMARE
Krystyna ZAKRZEWSKA
Alain MARTY
Marianne GRABER
Vinh TRAN
Gwénaëlle ANDRÉ-LEROUX

Professeur, Université de la Rochelle, Président du jury
Directeur de recherche CNRS, Université de Lyon, Rapporteur
Professeur, INSA de Toulouse, Rapporteur
Professeur, Université de La Rochelle, Directeur de thèse
Professeur, Université de Nantes, Co-directeur de thèse
Chargée de recherche INRA, Institut Pasteur de Paris, Examineur

Modélisation moléculaire et expérimentation en réacteur solide/gaz pour la compréhension de la sélectivité de la lipase B de *Candida antarctica*

Résumé :

L'objectif de cette thèse était de mieux comprendre les paramètres structuraux et environnementaux gouvernant l'énantiosélectivité de la lipase B de *Candida antarctica* (CALB), lors de la résolution des alcools secondaires linéaires chiraux. Ces composés sont notamment utilisés comme synthons chiraux dans l'industrie pharmaceutique. Dans un premier temps, une étude systématique des orientations du butan-2-ol et du pentan-2-ol au sein du site actif a été réalisée par modélisation moléculaire. Les résultats suggèrent l'existence de modes d'arrimages supplémentaires à ceux mentionnés dans la littérature. La comparaison selon l'énergie potentielle du substrat des structures les plus stables, combinée à la prise en compte de modes de fixation non productifs, nous a permis d'expliquer qualitativement l'énantiopréférence de la CALB pour la forme *R*. A l'aide du réacteur solide/gaz, nous avons montré que les résidus hydrophobes formant le canal d'accès du substrat au site actif (Ile189, Leu278 et Ala282), jouaient un rôle significatif dans l'énantiosélectivité de la CALB vis-à-vis des alcools secondaires. L'influence de la partie alkoxy du donneur d'acyle sur le ratio énantiomérique a également pu être mise en évidence. Par ailleurs, nous avons montré que des mutations isostériques de la poche stéréosélective conduisaient à des variations des paramètres thermodynamiques d'activation de l'acylation du pentan-2-ol, probablement suite à des modifications du réseau de liaisons hydrogène formé entre les résidus de la poche. Les études d'adsorption de l'eau et des substrats sur l'enzyme immobilisée nous ont permis de relier l'état d'hydratation de la CALB avec les effets particuliers de l'eau sur l'activité et la sélectivité de l'enzyme.

Mots clés : Lipase B de *Candida antarctica*, énantiosélectivité, réacteur solide/gaz, modélisation moléculaire chromatographie gazeuse en phase inverse, alcoolyse, activité thermodynamique

Molecular modeling and experimentation in solid / gas reactor for understanding the selectivity of lipase B from *Candida antarctica*

Summary :

The aim of this thesis was to understand more precisely the structural and environmental parameters governing the enantioselectivity of lipase B from *Candida antarctica* (CALB), involved in the discrimination of chiral secondary alcohols enantiomers. These compounds are used in particular for the synthesis of enantiomerically pure pharmaceutical molecules. Initially a systematic study of the orientation of butan-2-ol and pentan-2-ol in the active site was performed by molecular modeling. The results suggest the existence of additional binding modes to those mentioned in the literature. The potential energy comparison of the most stable conformations of the substrate, combined with the existence of non productive binding modes, allowed us to explain qualitatively the enantiopreference of CALB for the *R* form. Using the solid/gas reactor, we have shown that hydrophobic residues forming the access channel of substrate to the active site (Ile189, Leu278 and Ala282), played a significant role in the enantioselectivity of CALB towards secondary alcohols. The influence of the alkoxy part of the acyl donor on the enantiomeric ratio *E* has also been highlighted. Furthermore, we showed that isosteric mutations of the stereoselective pocket led to changes in pentan-2-ol activation thermodynamic parameters of acylation, probably due to changes in the hydrogen bonds network formed between residues of the pocket. Studies of water and substrates adsorption on the immobilized enzyme allowed us to relate the hydration status of CALB with specific effects of water on the enzyme activity and selectivity.

Keywords : *Candida antarctica* lipase B, enantioselectivity, solid/gas reactor, molecular modeling, inverse gas chromatography, alcoholysis, thermodynamic activity

Littoral ENvironnement Sociétés (LIENSs) Equipe Biotechnologie Environnementale (BIEN)
UMR 6250, Université de La Rochelle, 2, Rue Olympe de Gouges, 17042 LA ROCHELLE



Je tiens à remercier en premier lieu le Professeur Sylvain Lamare pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, de m'avoir fait confiance tout au long de ces années et enfin, d'avoir accepté de présider mon jury de thèse.

Je voudrais adresser mes remerciements les plus chaleureux au Professeur Marianne Graber pour la direction scientifique de ces travaux de thèse, pour sa disponibilité, son écoute et d'avoir participé à l'écriture de mon manuscrit de thèse. Je tiens à la remercier sincèrement pour m'avoir permis d'évoluer dans des domaines variés, à l'interface de l'enzymologie, des biotechnologies, de la chimie et de la bio-informatique, ainsi que pour les conditions dans lesquelles ces travaux ont pu être réalisés. Par ailleurs je tiens également à la remercier de m'avoir permis de collaborer avec des laboratoires extérieurs et m'avoir ainsi permis de rencontrer Per-Olof et Camille.

Je remercie également le Professeur Vinh Tran, de l'Université de Nantes, pour m'avoir encadré et participé activement à ce travail de recherche. Je le remercie sincèrement de m'avoir initié à la modélisation moléculaire et de m'avoir transmis une petite partie de ses compétences en ce domaine.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance au Docteur Krystyna Zakrzewska, Directeur de recherche CNRS, et au Professeur Alain Marty pour avoir fait l'honneur de juger mon travail et d'en être les rapporteurs. J'associe à ces remerciements Gwénaëlle André-Leroux pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie tous les membres du laboratoire, collègues et parfois bien plus que ça ! Guillaume et Mika pour les nombreux bons moments passés ensemble, Manu pour nos discussions en fin journées et ses conseils de chimiste, Hélène et Andrea pour nos petites virées nocturnes, Pierre et Matthieu pour les goûters mémorables, Nico et Romain pour les séances de piscine, Virginie, Delphine, Vaness, Hervé, Valérie L., Valérie S. ... Et aussi Isabelle Goubet pour sa grande disponibilité et ses nombreux conseils et Eric pour ses cours de « moonwalk ». Je remercie également les stagiaires ayant contribué à ces travaux de thèse, Claire, Cédric, Mickaël et Sylvain, mais aussi à tous les autres stagiaires qui ont contribué à la bonne ambiance au sein du labo : Azza, Amira, Beby, Romain, Nico, Vincianne, Sofia... Enfin, tous mes remerciements à tous ceux que je n'ai pas nommés mais qui ont été présents pour moi pendant ces années.

Evidemment, je remercie chaleureusement et sans compter mes parents sans qui mes années universitaires auraient été beaucoup plus ardues et plus particulièrement, ma mère pour tous ses petits plats ! Köszönöm. Je remercie également mon chéri pour avoir su s'adapter à mon rythme de vie et de travail et de m'avoir réconfortée aux moments difficiles.

Publications

Publications en lien direct avec les résultats de la thèse (jointes à la fin de ce manuscrit)

Valérie LEONARD-NEVERS, **Zsuzsanna MARTON**, Sylvain LAMARE, Karl HULT, Marianne GRABER. Understanding water effect on *Candida antarctica* lipase B activity and enantioselectivity towards secondary alcohols (2009) *Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 59 (1-3), p. 90-95, IF (2008): 2,015

Zsuzsanna MARTON, Valérie LEONARD-NEVERS, Per-Olof SYRÉN, Cédric BAUER, Karl HULT, Vinh TRAN, Marianne GRABER. Mutations in the stereospecificity pocket and at the entrance of the active site of *Candida antarctica* lipase B enhancing enzyme enantioselectivity. (2010) *Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 65 (1-4), p. 11-17, IF (2008): 2,015

Publications en lien direct avec les résultats de la thèse en cours de rédaction

Zsuzsanna MARTON, Ludovic CHAPUT, Marianne GRABER. Evaluation of lipase hydration state in the gas phase, by sorption isotherm measurements and inverse gas chromatography; Relation with activity and selectivity of the lipase in solid/gas reactor.

Publications sur des thématiques proches de celle de la thèse

Marianne GRABER, Valérie LEONARD, **Zsuzsanna MARTON**, Claire CUSATIS, Sylvain LAMARE. Exploring the possibility of predicting CALB activity in liquid organic medium, with the aid of intrinsic kinetic parameters and intrinsic solvent effect data obtained in solid/gaz reactor (2008) *Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 52-53 (1-4), p. 121-127, IF (2008): 2,015

Camille OGER, **Zsuzsanna MARTON**, Yasmin BRINKMANN, Valérie BULTEL-PONCE, Thierry DURAND, Marianne GRABER, Jean-Marie GALANO. Lipase-catalyzed regioselective monoacetylation of unsymmetrical 1,5-primary diols. (2010) *Journal of Organic Chemistry* 75, p. 1892–1897, IF (2008): 3,952

Communications orales

Marianne GRABER*, **Zsuzsanna MARTON**, Valérie LEONARD, Karl HULT, Sylvain LAMARE, Innovative experimental approaches for understanding molecular basis of enantioselectivity. International congress on Biocatalysis, Biocat 2008, Hamburg, Allemagne, 31 août-4 septembre 2008.

Zsuzsanna MARTON, SEMINAIRE, L'énantiosélectivité de la lipase B de *Candida antarctica* : Etude par modélisation moléculaire, 17 octobre 2008, LA ROCHELLE

Posters

Zsuzsanna MARTON, Valérie LEONARD, Sylvain LAMARE, Marianne GRABER*. Inverse Gas Chromatography (IGC): a useful tool to understand solvent effect on enzyme selectivity. International congress on Biocatalysis, Biocat 2008, Hambourg, ALLEMAGNE 31 août-4 Septembre 2008

Zsuzsanna MARTON. Des enzymes pour des médicaments. Doctoriales Poitou-Charante/Limousin, 1^{er}-6 juin 2009, La Rochelle

Zsuzsanna MARTON, Per-Olof SYREN, Cédric BAUER, Sylvain LAMARE, Marianne GRABER. Differential accessibility of enantiomers to the active site as a cause of enantioselectivity of lipase B from *Candida antarctica* (CALB). 9th International Symposium on Biocatalysis, Biotrans 2009, Berne, SUISSE, 5-9 juillet 2009

Valérie LEONARD-NEVERS*, **Zsuzsanna MARTON**, Vinh TRAN, Sylvain LAMARE, Marianne GRABER, Mutation enhancing lipase B from *Candida antarctica* (CALB) enantioselectivity. 9th International Symposium on Biocatalysis, Biotrans 2009, Berne, SUISSE, 5-9 juillet 2009

Sommaire

SOMMAIRE	1
INTRODUCTION.....	6
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	12
<i>I. La lipase B de Candida antarctica</i>	<i>13</i>
I.1. Structure et site-actif de la CALB	13
I.2. Mécanisme d'action catalytique de la CALB	19
I.3. Spécificité de la CALB	21
I.3.a Chimiosélectivité	23
I.3.b Régiosélectivité	25
I.3.c Diastéréosélectivité	27
I.3.d Enantiosélectivité	27
<i>II. Dédoublment des mélanges racémique catalysé par la CALB.....</i>	<i>29</i>
II.1. Quantification de l'énantiosélectivité.....	30
II.2. Dédoublment des alcools secondaires catalysée par la CALB.....	34
II.3. Influence des paramètres réactionnels sur l'énantiosélectivité de la CALB	40
II.3.a Influence du donneur d'acyle	40
II.3.b Influence de l'eau	42
II.3.c Influence du solvant	47
II.3.d Influence de la température.....	49
II.3.e Influence des additifs	50
II.4. Influence des mutations sur l'énantiosélectivité de la CALB	51
II.4.a L'évolution moléculaire dirigée	51
II.4.b La mutagénèse dirigée	56
<i>III. Etude des enzymes en milieux gazeux.....</i>	<i>59</i>
III.1. Le réacteur solide/gaz en flux continu.....	61
III.1.a Avantages de la biocatalyse solide/gaz	61
III.1.b Principe de fonctionnement d'un réacteur solide/gaz en flux continu	62
III.1.c Calcul des activités thermodynamiques.....	63
III.1.d Applications	65
III.2. Etude de l'hydratation des enzymes par isotherme d'adsorption.....	67
III.2.a L'adsorption.....	67
III.2.b Interactions non covalentes impliquées dans l'adsorption	68
III.2.c Les isothermes d'adsorption	69
III.2.d Interprétation des isothermes d'adsorption : le modèle Brunauer-Emmett-Teller (BET)	72
III.2.e Applications	73
III.3. Etude de l'hydratation par la chromatographie gazeuse en phase inverse (IGC)	75
III.3.a Principe et fonctionnement de la chromatographie gazeuse en phase inverse (IGC).....	75
III.3.b Principales grandeurs expérimentales utilisées en IGC	78
III.3.c Applications.....	80

MATERIELS ET METHODES.....	84
I. <i>Matériel biologique</i>	85
I.1. Préparation de l'enzyme de type sauvage et des variants de la poche stéréospécifique.....	86
I.2. Préparation des variants du canal d'accès au site actif de la CALB.....	86
II. <i>Produits chimiques</i>	87
II.1. Synthèse des esters à partir de l'acide propionique.....	89
II.2. Synthèse des esters à partir de l'anhydride propionique.....	89
II.3. Synthèse du (R)-1-méthylpentyl propionate.....	90
II.4. Synthèse du (S)-1-méthylpentyl propionate.....	91
III. <i>Expériences en réacteur solide/gaz</i>	91
III.1. Etude de l'influence des mutations au niveau du canal d'accès au site actif.....	93
III.2. Etude de l'influence du donneur d'acyle (ester 1).....	94
III.3. Détermination des paramètres thermodynamiques.....	94
IV. <i>Analyses par chromatographie en phase gazeuse (CG)</i>	94
V. <i>Traitement des données</i>	97
V.1. Détermination des excès énantiomérique.....	97
V.2. Détermination du ratio énantiomérique.....	97
V.3. Calcul des activités.....	98
V.4. Traitement statistique des données.....	98
V.4.a Analyse de régression par la méthode des moindres carrés.....	98
V.4.b Notion d'écart type et d'intervalle de confiance.....	100
VI. <i>Détermination des isothermes de sorption</i>	101
VII. <i>Expériences en chromatographie en phase inverse (IGC)</i>	102
VII.1. Détermination des énergies de surfaces spécifiques et dispersives.....	104
VII.2. Détermination de l'enthalpie d'adsorption.....	104
VIII. <i>Etude par modélisation moléculaire</i>	105
VIII.1. Construction de l'intermédiaire tétraédrique.....	106
VIII.2. Optimisation des structures.....	107
VIII.3. Etude <i>in silico</i> des résidus bordant l'entrée du site actif.....	107
VIII.4. Structure de la deuxième intermédiaire tétraédrique formé (R)-heptan-3-ol.....	108
RESULTATS ET DISCUSSION	109
CHAPITRE A. EXPLICATIONS STRUCTURALES DE L'ENANTIOSELECTIVITE.....	110
A.I. <i>Construction des complexes enzyme-substrats</i>	116
A.II. <i>Modes de fixation des alcools secondaires</i>	126
A.II.1. Description des modes de fixation.....	126
A.II.1.a Description générale.....	126
A.II.1.b Description énergétique.....	128
A.II.2. Modes de fixation du pentan-2-ol.....	129
A.II.3. Modes de fixation du butan-2-ol.....	134
A.II.4. Conclusions.....	140

<i>A.III. Rôle de la coexistence de modes de fixation productifs et non productifs sur l'énantiosélectivité</i>	141
A.III.1. Critères à respecter par une structure productive	141
A.III.2. Corrélation structure-énantiosélectivité	144
A.III.2.a Corrélation structure-énantiosélectivité dans le cas du pentan-2-ol	144
A.III.2.b Corrélation structure-énantiosélectivité dans le cas du butan-2-ol	147
A.III.3. Détermination du mode de fixation privilégié	149
A.III.4. Conclusions	152
<i>A.IV. Tentatives de Corrélation de l'énantiosélectivité avec des critères structuraux et énergétiques</i>	154
A.IV.1. Etude des distances caractérisant les des liaisons hydrogènes indispensables à la catalyse enzymatique	154
A.IV.1.a Cas du pentan-2-ol	155
A.IV.1.b Cas du butan-2-ol	155
A.IV.2. Détermination de l'énantiosélectivité par de critères énergétiques	156
A.IV.2.a Cas du (±)-pentan-2-ol	158
A.IV.2.b Cas du (±)-butan-2-ol	159
A.IV.2.c Déformations du substrat dans le site catalytique	160
A.IV.3. Conclusions	162
<i>A.V. Conclusions et perspectives du chapitre A</i>	163
CHAPITRE B. EXPLICATIONS NON CONVENTIONNELLES DE L'ENANTIOSELECTIVITE	167
<i>B.I. Implication des résidus situés sur le chemin d'accès du substrat au site catalytique</i>	169
B.I.1. Etude <i>in silico</i> des résidus bordant l'entrée du site actif	171
B.I.1.a Les résidus bordant le chemin d'accès au site actif	172
B.I.1.b Mutations élargissant le chemin d'accès	175
B.I.1.c Mutations encombrant le chemin d'accès	176
B.I.2. Etude expérimentale des effets des mutations des résidus constituant le tunnel d'accès de l'alcool au site actif	178
B.I.2.a Effets des mutations sur l'activité enzymatique	180
B.I.2.b Effets des mutations sur l'énantiosélectivité	182
B.I.3. Conclusions et perspectives	186
<i>B.II. Influence sur l'énantiosélectivité de la partie alkoxy du donneur d'acyle</i>	188
B.II.1. Influence de l'élongation de la chaîne alkyle du donneur d'acyle	199
B.II.2. Influence des esters avec des chaînes alkyles chirales	200
B.II.3. Influence des esters enantiopures	202
B.II.4. Conclusions et perspectives	204
<i>B.III. Rôle de l'entropie d'activation pour la définition de l'énantiosélectivité de la CALB et ses variants</i>	206
B.III.1. Théorie	207
B.III.2. Exemples d'études des paramètres d'activation de la CALB et ses variants, issues de la littérature	209
B.III.2.a Influence du substrat	209
B.III.2.b Influence de la protéine	211

B.III.2.c	Influence de l'eau	213
B.III.3.	Etude des paramètres thermodynamiques d'activation pour les réactions catalysées par différentes formes de la CALB obtenues par mutation au niveau de la poche stéréospécifique	216
B.III.4.	Etude des paramètres thermodynamiques d'activation pour les réactions catalysées par différentes formes de la CALB obtenues par mutation du canal d'accès au site actif	220
B.III.5.	Conclusions et perspectives.....	223
B.IV.	Conclusion du chapitre B	226
CHAPITRE C.	ETUDE DE L'HYDRATATION DE LA LIPASE B DE <i>CANDIDA ANTARCTICA</i> EN FONCTION DE L' a_w ET RELATION AVEC L'EFFET DE L'EAU SUR L'ACTIVITE ET LA SELECTIVITE DE L'ENZYME	228
C.I.	<i>Théorie</i>	230
C.II.	<i>Etude de l'hydratation de la CALB par mesure d'isothermes d'adsorption de l'eau</i>	236
C.III.	<i>Etude de l'hydratation de la CALB par IGC</i>	241
C.III.1.	Influence de l' a_w sur l'adsorption des molécules apolaires sur la CALB immobilisée	241
C.III.2.	Détermination du caractère acide-base au sens de Lewis de la surface de la CALB immobilisée	243
C.III.3.	Influence de l' a_w sur l'adsorption de molécules polaires amphotères sur la surface de la CALB.....	245
C.III.4.	Evolution des constantes d'acidité (K_A) et de basicité (K_B) de l'enzyme avec l' a_w	246
C.IV.	<i>Etude de l'adsorption compétitive des substrats et de l'eau sur la surface de la CALB par IGC..</i>	247
C.V.	<i>Conclusions et perspectives du chapitre C.....</i>	251
CONCLUSIONS GENERALES.....		253
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		260
ANNEXE.....		287
ANNEXE 1 : NOTATIONS ET SYMBOLES.....		289
ANNEXE 2 : TABLE DE LOI DE STUDENT		293
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....		295
<i>Figures</i>		296
<i>Schémas.....</i>		303
<i>Tableaux</i>		305
<i>Photographies.....</i>		307
PUBLICATIONS		308

Introduction

La chiralité, propriété caractérisant tout objet qui n'est pas superposable à son image dans un miroir plan, est omniprésente dans la nature. Ainsi, on peut la retrouver à l'échelle macroscopique (nos mains, la coquille des gastéropodes...) mais également à l'échelle microscopique, par exemple pour les acides aminés constitutifs des protéines (série L) ou pour les sucres des nucléotides (série D). La chiralité trouve sa source dans l'existence d'un centre de chiralité dans la structure de certaines molécules. Un élément de chiralité fréquemment rencontré est le carbone asymétrique (C*), atome de carbone avec quatre substituants différents. La disposition de ces quatre substituants autour du carbone asymétrique est à l'origine de deux molécules différentes, appelées énantiomères ou inverses optiques. Ces énantiomères présentent des propriétés physiques et chimiques très proches, ce qui rend leur séparation très difficile, mais présentent des propriétés biologiques souvent très différentes (Patel, 2001). Par exemple le (*R*)-limonène a une odeur d'orange, alors que la forme *S* a une odeur de citron, la (*R*)-asparagine a un goût sucré et la forme *S* un goût amer (tableau 1). Cette différence est essentielle pour des nombreux processus biologiques, comme les phénomènes de reconnaissance moléculaire, la transmission de signal biologique, les réactions métaboliques....

De nombreuses molécules thérapeutiques sont chirales. Le plus souvent seul l'un des énantiomères est responsable de l'activité thérapeutique recherchée, l'autre énantiomère étant moins actif (Warfarine) ou inactif (Chloramphénicol) (tableau 1). Mais parfois l'autre énantiomère présente une activité différente (Albutérol, Fluoxétine) et malheureusement, il arrive même qu'il soit toxique. Un des exemples les plus tragiquement connus reste celui de la thalidomide (Ditaval® ou Contergan®). Ce médicament a été commercialisé entre 1958 et 1963 dans plusieurs pays du monde, sous forme racémique, c'est-à-dire sous forme de mélange des deux énantiomères, afin d'éviter les nausées matinales pendant la grossesse. Mais alors que la forme *R* présentait des propriétés sédatives chez la mère, la forme *S* s'est révélée tératogène provoquant de très graves malformations chez le fœtus (phocomélie). Suite à cette découverte de nombreuses équipes dans le monde se sont intéressées à la stéréochimie des molécules et à la séparation des énantiomères.

Tableau 1 : Exemples de l'activité biologique de différents composés en fonction de leur configuration absolue.

Composé	Forme S	Forme R
Limonène	Odeur de citron	Odeur d'orange
Asparagine	Goût amer	Goût sucré
Chloramphénicol	Inactif	Antibactérien
Warfarine	Anticoagulant	5 fois moins actif
Fluoxétine (Prozac®)	Anti-migraine prophylactique	Antidépresseur
Albutérol	Spasmogène	Bronchodilatateur (Asthme)
Pénicillamine	Antiarthrique	Toxique
Thalidomide	Térotogène	Sédatif; hypnotique léger

L'inactivité des énantiomères des principes actifs et leurs éventuels effets secondaires gênants ou toxiques justifient en terme de coût de production et de sécurité le développement extraordinaire des synthèses de composés énantiomériquement purs ou enrichis. La commercialisation de médicaments sous forme du seul énantiomère utile est d'ailleurs fortement encouragée par les autorités en matière de développement pharmaceutique et en particulier par la Food and Drug Administration (FDA) des Etats-Unis et par son équivalent en Europe, l'Agence Européenne pour l'Evaluation des Médicaments (EMA). La loi établie par ces autorités en 1992 stipule, que la composition stéréoisomérique d'un médicament comportant un centre chiral doit être connue, de même que la composition isomérique quantitative utilisée pour les études pharmacologiques et cliniques. Pour estimer la pharmacocinétique d'un énantiomère pur ou d'un mélange d'énantiomères, des essais quantitatifs pour chaque énantiomère doivent être réalisés tôt dans l'étape de développement. Si le racémique est utilisé, la pharmacocinétique des deux isomères doit être étudiée en phase clinique, et le racémique ne peut être développé que si les deux énantiomères présentent des différences d'activité faibles.

Il existe quatre types de procédés couramment utilisés pour accéder à des molécules optiquement pures : la synthèse chimique asymétrique, la cristallisation diastéréoisomérique, la chromatographie préparative chirale et les procédés de biocatalyse.

Comparé aux trois autres méthodes, le dédoublement de mélanges racémiques à l'aide des enzymes est de plus en plus apprécié par les industriels du fait de la spécificité et de la sélectivité des enzymes et des conditions douces de mises en œuvre. Parmi les enzymes, les

hydrolases, et plus particulièrement les lipases (EC 3.1.1.3) sont les biocatalyseurs les plus utilisés pour le dédoublement de mélanges racémiques d'alcools, d'acides, d'amines.... En effet, elles sont capables de catalyser l'hydrolyse et la synthèse stéréosélective d'une très grande variété de substrats naturels et non naturels. Par ailleurs, elles sont très stables, elles peuvent être actives dans des conditions de température relativement élevée et en milieu organique liquide, ce qui favorise les réactions de synthèse, au détriment de l'hydrolyse. De plus, elles ne nécessitent pas de cofacteur et sont disponibles commercialement à faible coût.

Malgré de nombreux travaux portant sur le dédoublement de mélanges racémiques catalysé par les lipases, le dédoublement cinétique rendu possible par le fait que les lipases réagissent parfois plus rapidement avec l'un des énantiomères qu'avec l'autre n'est pas encore parfaitement compris. Mieux appréhender ces phénomènes et comprendre quels sont les facteurs réactionnels et moléculaires qui gouvernent la stéréosélectivité des lipases devient crucial pour étendre les applications de ces enzymes et faciliter leur usage. En particulier, l'industrie pharmaceutique est très demandeuse de méthodes et techniques qui pourraient être employées à des fins prédictives pour séparer deux énantiomères donnés. Cela permettrait, à terme, de diminuer les coûts de développement de nouvelles molécules pharmaceutiques. Par ailleurs, une meilleure compréhension de l'énantiosélectivité permettrait une optimisation plus rationnelle et donc plus rapide des procédés de fabrication, avec une réduction des quantités de réactifs et de solvants, ce qui s'inscrit dans les principes de la chimie verte et du développement durable.

C'est dans ce cadre que s'inscrivent nos travaux, portant sur la compréhension de l'énantiosélectivité de la lipase B de *Candida antarctica* (CALB) lors de la résolution des alcools secondaires linéaires chiraux. En effet, ces derniers sont des synthons extrêmement intéressants pour la synthèse asymétrique, car ils permettent d'introduire un carbone chiral dans la molécule cible, soit par réactivité de la fonction hydroxyle, soit en conservant la fonction alcool dans la molécule synthétisée. Par exemple, le (*S*)-pentan-2-ol est un intermédiaire important dans la synthèse de médicaments inhibant la libération et/ou la synthèse de peptides β -amyloïdes impliqués dans la maladie d'Alzheimer (Patel et coll., 2000).

Notre manuscrit débute par une synthèse bibliographique constituée de trois parties. La première présente la lipase B de *Candida antarctica* (CALB), enzyme sélectionnée pour notre étude. Lors de cette partie, la structure, le mécanisme d'action catalytique et la spécificité de la CALB seront présentés. La deuxième partie est consacrée au dédoublement des mélanges racémiques catalysés par la CALB, plus particulièrement au dédoublement des mélanges racémiques d'alcools secondaires, et aux différents paramètres environnementaux et structuraux pouvant influencer l'énantiosélectivité de cette lipase. Puis, dans la troisième partie, nous allons présenter le réacteur solide/gaz, bioréacteur en milieu non conventionnel utilisé lors de nos travaux pour étudier les paramètres influençant l'énantiosélectivité de la CALB. Par ailleurs, dans cette partie deux techniques permettant de déterminer l'état d'hydratation des enzymes, les isothermes d'adsorption et la chromatographie en phase gazeuse inverse (IGC), seront présentées.

Dans la partie "Matériels et Méthodes" sont exposés les différents matériaux et les protocoles utilisés. Les méthodes d'analyse et de traitement des résultats sont également décrites.

La partie "Résultats et Discussion" s'articule autour de trois chapitres distincts. Dans un premier chapitre, l'énantiosélectivité de la CALB est abordée par le biais de la modélisation moléculaire. Une approche classique a été utilisée. Elle consiste à modéliser l'intermédiaire tétraédrique de la réaction dans le but de déterminer l'énergie potentielle des intermédiaires formés et d'analyser les interactions enzyme/substrat résultantes pour chacun des modèles. L'originalité de nos travaux réside dans le fait que nous ne sommes pas contents des deux orientations décrits dans la littérature pour les substrats (Orrenius et coll., 1998 ; Hæffner et coll., 1998), mais nous avons réalisé une étude systématique afin d'explorer toutes les orientations envisageables pour les deux alcools secondaires étudiés, le butan-2-ol et le pentan-2-ol.

Un deuxième chapitre est consacré à l'étude expérimentale, à l'aide du réacteur solide/gaz, des paramètres rarement pris en compte, pouvant influencer l'énantiosélectivité de la CALB lors de la résolution des alcools secondaires chiraux par transestérification : l'influence des résidus situés sur le chemin d'accès du substrat au site catalytique et l'influence de la partie alkyle du donneur d'acyle (premier substrat à se fixer). Dans ce chapitre, le rôle de l'entropie d'activation pour la définition de l'énantiosélectivité de la CALB et ses variants lors de la réaction d'acylation du pentan-2-ol avec le méthyl propionate, est également examiné.

Enfin, dans le troisième chapitre, les résultats de l'étude de l'hydratation de la lipase B de *Candida antarctica* en fonction de l' a_w , obtenus à l'aide de deux techniques (les isothermes d'adsorption et la chromatographie en phase gazeuse inverse), sont présentés. Ces résultats, sont utilisés pour tenter d'expliquer l'effet de l'eau sur l'activité et la sélectivité de la CALB.

Etude bibliographique

I. La lipase B de *Candida antarctica*

Les lipases (EC 3.1.1.3) ou triacylglycérol-acylhydrolases appartiennent à la famille des hydrolases. Elles jouent un rôle important dans le métabolisme des graisses et sont présentes dans la plupart des tissus animaux et végétaux, mais aussi dans de nombreux microorganismes (Pandey et coll., 1999 ; Schmidt-Dannert, 1999). Leur fonction naturelle est de catalyser l'hydrolyse d'esters comme les triglycérides en di-, monoglycérides, acides gras et glycérol. Elles sont également capables d'hydrolyser une très grande variété de substrats naturels et non-naturels. Lorsque la quantité d'eau du milieu est faible ou même lorsque le milieu est totalement anhydre, comme en milieu organique par exemple, les lipases peuvent également catalyser des réactions de synthèse.

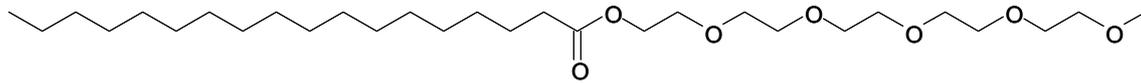
Pour notre étude nous avons choisi de travailler avec la lipase B de *Candida antarctica* (CALB). Cette lipase offre quelques particularités par rapport aux autres lipases : elle possède une faible activité vis-à-vis des triglycérides à longues chaînes et elle n'est pas soumise au phénomène d'activation interfaciale, elle est donc considérée comme une enzyme intermédiaire entre une lipase et une estérase (Uppenberg et coll., 1994 ; Verger, 1997).

Lors de cette étude bibliographique, la structure, le mécanisme d'action catalytique et la spécificité de la CALB seront présentés.

I.1. Structure et site-actif de la CALB

La levure *Candida antarctica* a été isolée pour la première fois en Antarctique, dans le but de trouver des enzymes ayant la capacité de travailler dans des conditions extrêmes (Anderson et coll., 1998). Ce microorganisme produit deux types de lipases nommées A et B. La forme B est une protéine globulaire d'un poids moléculaire de 33 kDa, constituée de 317 acides aminés, avec un pH isoélectrique de 6. Sa structure a été déterminée par cristallographie aux rayons X en 1994 (code PDB : 1TCA, 1TCB et 1TCC, disponibles à partir de la "Proteine Data Bank" au <http://www.pdb.org/pdb>) (Uppenberg et coll., 1994). Un an plus tard, sa structure co-cristallisée avec le détergent Tween 80 et avec un inhibiteur irréversible de type phosphonate, le *n*-hexylchlorophosphonate éthyl ester, a été publié (code PDB : 1LBT et 1LBS respectivement) (Uppenberg et coll., 1995) (schéma 1). Cette lipase appartient, comme

les autres lipases, à la famille des α/β -hydrolases (Ollis et coll., 1992; Schmid et Verger, 1998). En effet, sa structure présente, comme pour les autres lipases, un repliement α/β constitué d'un corps central de 8 feuillets β , généralement parallèles entre eux, autour duquel se répartissent au moins 6 hélices α (Ollis et coll., 1992). D'après sa structure cristallographique, la CALB possède 10 hélices α (figure 1 et 2).



Tween 80 ou 2-[2-[2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethyl octadecanoate



n-hexylchlorophosphate éthyl ester
ou 1-(chloro(éthoxy)phosphoryl)hexane

1-phényléthyl octanoate

Schéma 1 : Structure du détergent Tween 80 et de l'inhibiteur phosphonate co-cristallisés avec la CALB et structure de l'ester utilisé pour l'étude par modélisation moléculaire (d'après Uppenberg et coll., 1995).

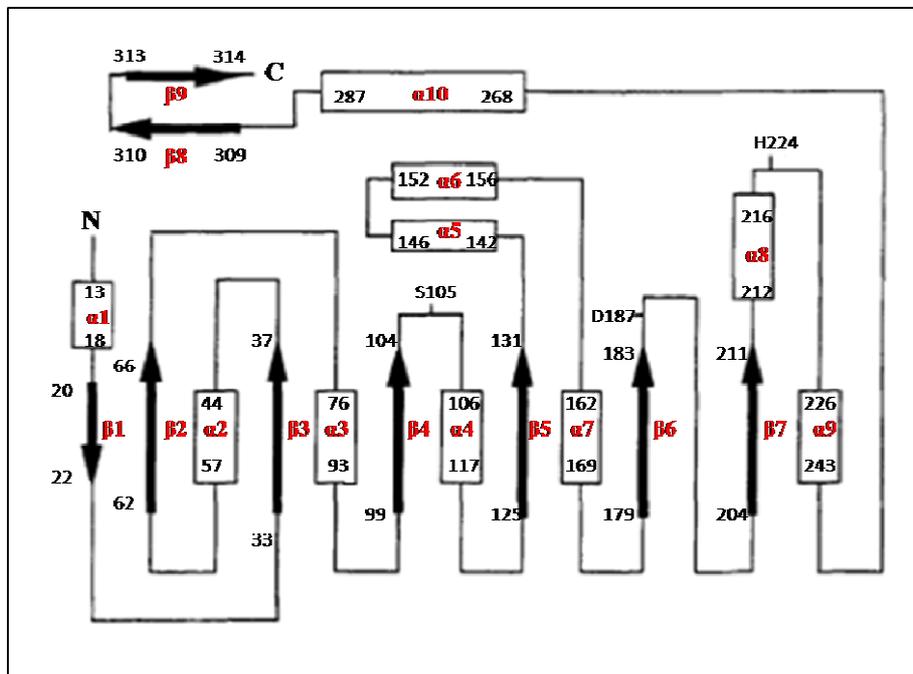
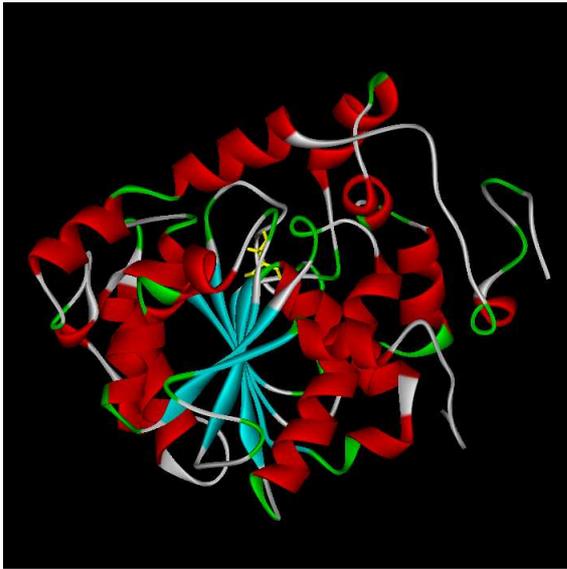


Figure 1: Diagramme de la structure secondaire de la CALB. Les hélices α_2 , α_9 et α_{10} ont toutes des régions courtes où le réseau de liaisons hydrogène des hélices est brisé, introduisant ainsi un changement de direction de l'hélice (d'après Uppenberg et coll., 1994).

A.



B.

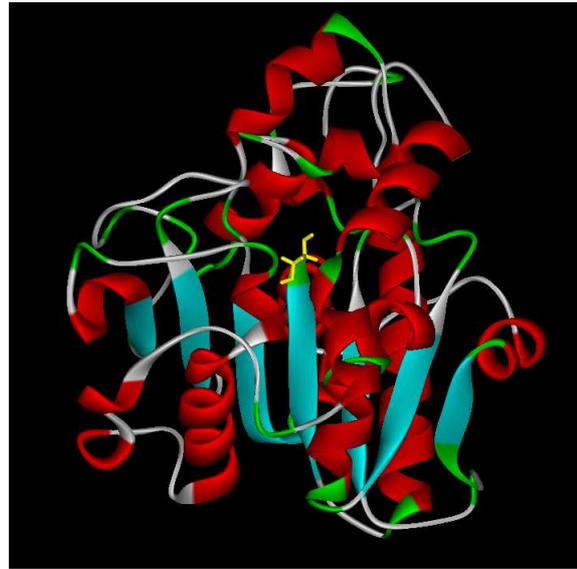


Figure 2 A et B : Deux vues différentes de la structure tridimensionnelle de la CALB (code PDB : 1TCA). Sont représentés en rouge les hélices α , en bleu les feuillets β , en vert les coudes, en blanc les boucles et en jaune la sérine catalytique.

Les structures des lipases cristallisées en présence et en absence d'analogues de substrats ont permis d'identifier la topologie générale de leur site de fixation (Uppenberg et coll., 1994 ; 1995) et, selon les auteurs (Pleiss et coll., 1998), la CALB présente une cavité elliptique et profonde, en forme d'entonnoir ($9,5 \times 4,5 \text{ \AA}$), en opposition à d'autres morphologies de sites actifs, en forme de tunnel (lipase de *Candida rugosa*) ou moins profonds localisés près de la surface de la protéine (lipases de *Rhizomucor* et *Rhizopus*) (figure 3).

La constitution de la cavité est similaire à d'autres lipases avec un fond hydrophile, formé par la Ser105 catalytique et les résidus du trou oxyanionique (Pleiss et coll., 1998). L'accès à ce site actif se fait par un passage étroit hydrophobe. Le site de fixation peut être divisé en deux parties (ou sous-sites) séparés par les résidus Ile189 et Ile285 : un côté correspondant au site de fixation de l'acyle, cerné par les résidus hydrophobes Ile189, Val192, Leu140, Ala141, Leu144, Val154 et Ile285, et un côté correspondant au site de fixation de l'alcool, délimité par les résidus Ile189, Leu278, Ala281 et Ile285 (Uppenberg et coll., 1995) (figure 3 et 4).

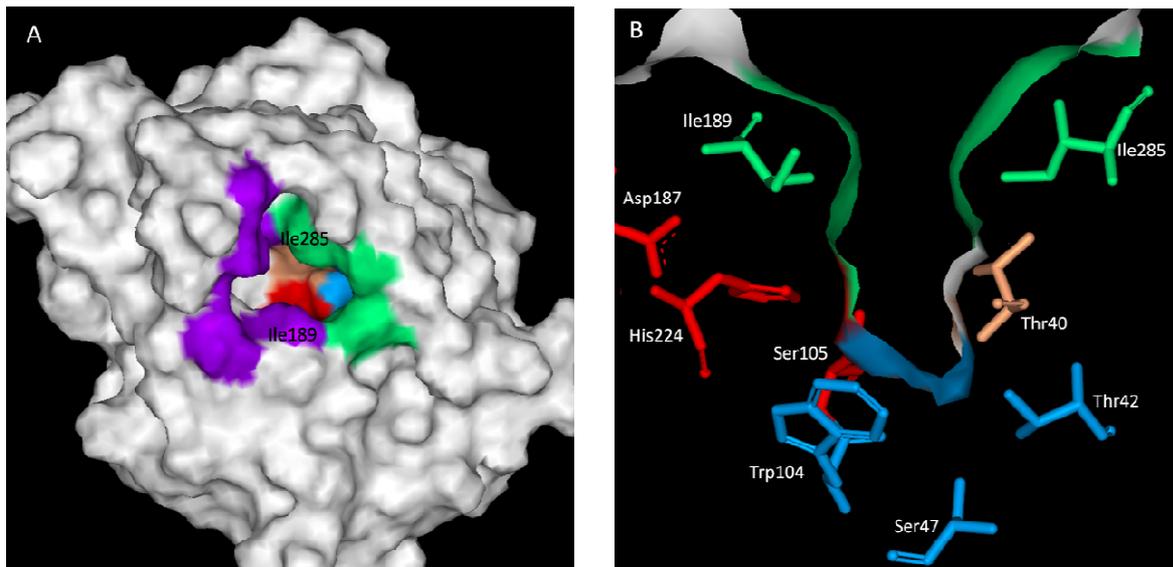


Figure 3 : A. Surface de la CALB avec son site actif. B. Coupe du site actif. Sont représentés en rouge les résidus de la triade catalytique, en bleu les résidus de la poche énantiosélective, en saumon les résidus du trou oxyanionique, en violet les résidus hydrophobes délimitant le sous-site de fixation acyle et en vert les résidus hydrophobes délimitant le sous-site de fixation alcool. Ces deux sous-sites sont séparés par les résidus Ile189 et Ile285, qui peuvent ainsi interagir avec les deux chaînes acyle et alcool. Pour plus de clarté les atomes d'hydrogène n'ont pas été représentés.

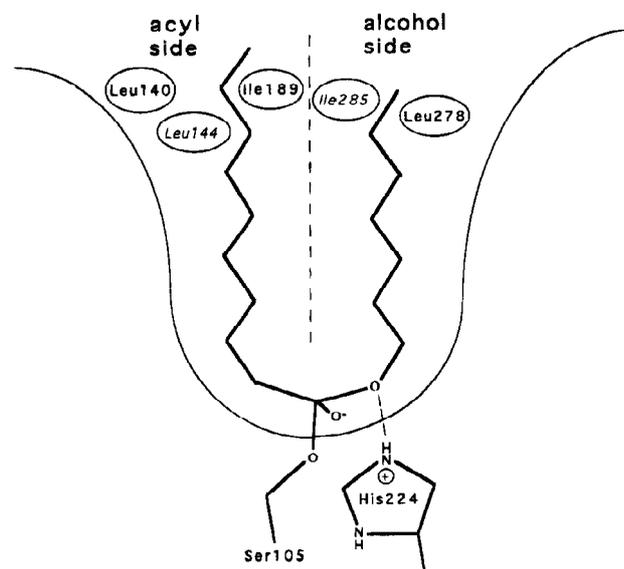


Figure 4 : Représentation schématique de la cavité du site actif de la CALB. Ce dernier peut être divisé en deux parties, un côté acyle et un côté alcool, correspondant respectivement au site de fixation de la partie acyle et alcool du substrat durant la catalyse (d'après Uppenberg et coll., 1995).

La triade catalytique comporte les résidus Ser105, His224 et Asp187 (figure 5). Comme pour les autres lipases, la sérine catalytique constitue le coude nucléophile appelé " γ turn" positionné entre un feuillet β (β_4) et une hélice α (α_4) (figure 1 et 2). Généralement les lipases possèdent une séquence consensus (Gly-X-Ser-X-Gly) qui permet d'identifier la sérine catalytique, mais chez la CALB une séquence différente a été trouvée dans laquelle la première glycine est remplacée par une thréonine : (Thr103-Trp104-Ser105-Gln106-Gly107) (Uppenberg et coll., 1994).

Chez la CALB, le trou oxyanionique, intervenant dans la stabilisation de l'intermédiaire tétraédrique établi avec le substrat, est préformé. Là encore c'est une particularité de cette enzyme, car pour les autres lipases, ce trou se forme lors de l'étape d'activation interfaciale. Il est constitué de deux résidus : comme pour toutes les lipases, on retrouve le résidu adjacent à la sérine catalytique du côté C-terminale, Gln106, et le résidu Thr40. Ce dernier fait partie d'une séquence consensus de type Gly-X et est stabilisé par le résidu Gln157 (Pleiss et coll., 2000) (figure 5).

La structure cristallographique de la CALB, obtenue avec le *n*-hexylchlorophosphonate éthyl ester, a permis d'identifier une petite poche au fond de la cavité et à proximité de la sérine catalytique, délimitée par deux résidus polaires, Thr40 et Ser47, et le résidu adjacent à la sérine catalytique du côté N-terminale, Trp104 (Uppenberg et coll., 1995). Ce dernier résidu est également appelé "floor", car il constitue le fond de la cavité (figure 3 et 5). L'étude par modélisation moléculaire réalisée à partir de cette structure avec le 1-phényléthyl octanoate (schéma 1) a suggéré que cette poche ne pouvait pas accepter des groupements plus grands que le groupement éthyle et par conséquent, qu'elle devait être responsable de la spécificité de la CALB vis-à-vis des alcools secondaires. Ainsi, cette poche est appelée poche stéréospécifique ou poche énantiosélective (Uppenberg et coll., 1995). Son implication dans la résolution des alcools secondaires sera expliquée plus amplement par la suite.

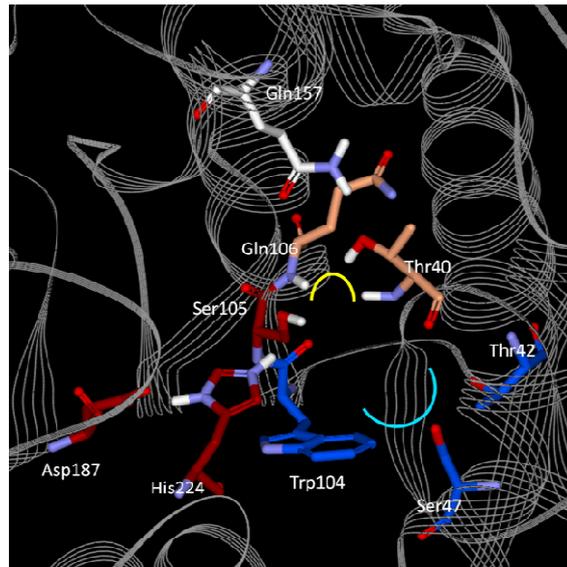


Figure 5 : Site actif de la lipase. Le trou oxyanionique et la poche stéréospécifique sont visualisés respectivement par des arcs de couleur jaune et cyan. Sont représentés en rouge les résidus de la triade catalytique, en bleu les résidus de la poche énantiométrique, en saumon les résidus du trou oxyanionique et en blanc le résidu stabilisant le trou oxyanionique, Gln 157. Les lignes grises schématisent la structure secondaire de l'enzyme. Ces deux sous-sites sont séparés par les résidus Ile189 et Ile285, qui peuvent ainsi interagir avec les deux chaînes acyle et alcool. Pour plus de clarté les atomes d'hydrogène n'ont pas été représentés.

Nous avons évoqué précédemment que, contrairement à la majorité des autres lipases, la CALB n'est pas soumise au phénomène d'activation interfaciale. Ce dernier peut être défini par l'augmentation de l'activité enzymatique lorsque l'enzyme se trouve au contact d'une interface eau-lipides (Martinelle et coll. 1995a). Ce phénomène s'explique par la présence, chez de nombreuses lipases, d'un volet amphiphile qui couvre le site actif par le biais d'interactions hydrophobes (Derewenda et coll., 1992a,b). Lorsque la concentration en substrat est supérieure à la concentration micellaire critique (CMC), une interface entre l'eau et les molécules apolaires se forme, le volet amphiphile interagit avec cette interface, ce qui provoque son ouverture, et par conséquent, rend le site actif accessible au substrat. La CALB ne présente qu'un très petit volet amphiphile, probablement l'hélice $\alpha 5$. En effet, en absence de molécule détergente à l'entrée de la cavité, la structure de cette hélice est désordonnée, comme en témoigne la densité électronique de la zone correspondante, suggérant que cette partie est plus mobile (Uppenberg et coll., 1994). Cette hypothèse a été confirmée très récemment par des très longues simulations de modélisation moléculaire (Skjot et coll., 2009).

I.2. Mécanisme d'action catalytique de la CALB

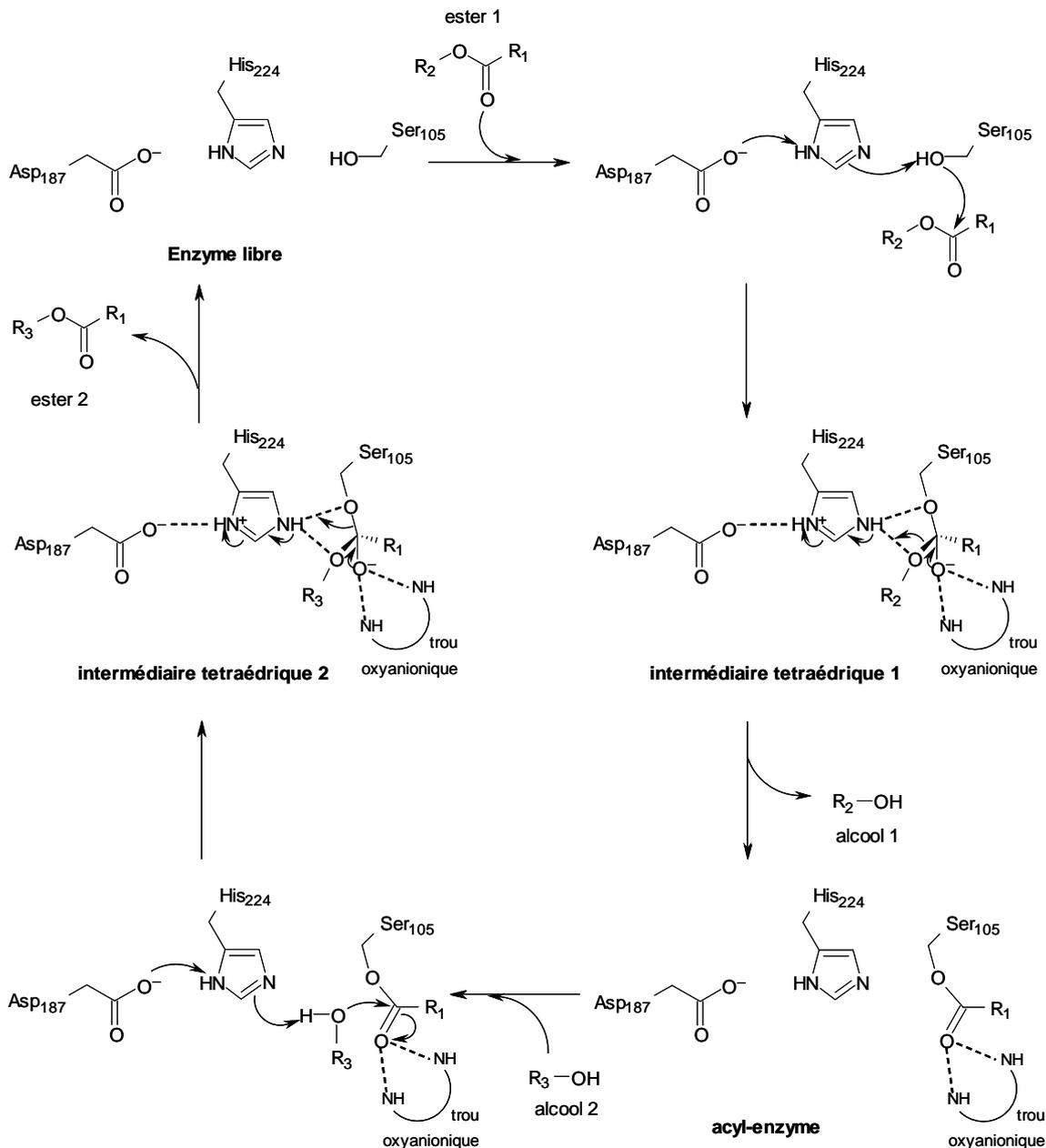


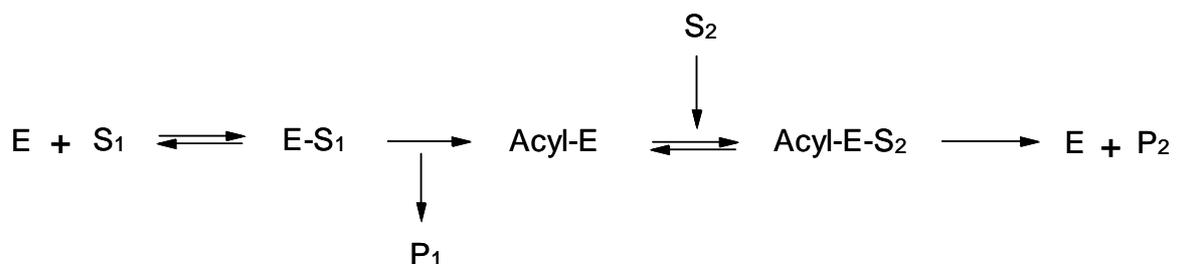
Figure 6 : Mécanisme réactionnel de la CALB lors de la catalyse d'une réaction de transestérification. R₁, R₂ et R₃ = chaînes alkyle. (Si R₃ = H, c'est une réaction d'hydrolyse)

Similairement aux autres lipases, la CALB catalyse les réactions via un mécanisme **Bi-Bi Ping-Pong**. Ce mécanisme, proposé par Cygler et coll. (1994), est basé sur un système de relais des charges entre l'acide carboxylique du résidu acide aspartique ou acide glutamique, l'histidine et la sérine (figure 6).

La réaction se fait en deux étapes. La première est l'étape d'acylation, correspondant à la formation du complexe covalent entre l'enzyme et le substrat, l'acyl-enzyme. Le réseau de liaisons hydrogène formé entre l'acide aspartique 187, l'histidine 224 et la sérine 105 permet d'activer la fonction hydroxyle de ce dernier, rendant ainsi possible l'**attaque nucléophile** de cet hydroxyle sur la fonction carbonyle du donneur d'acyle conduisant à la formation d'une liaison covalente entre le premier substrat et la Ser105. Le **premier intermédiaire tétraédrique** ainsi formé, est stabilisé par au moins cinq liaisons hydrogène possibles dont au moins deux entre l'oxygène du substrat chargé négativement (oxyanion) et les acides aminés du trou oxyanionique (Thr40 et Gln106) (Ottosson et coll., 2002a). Par retour du doublet de l'oxygène et transfert d'un proton de l'His224, il y a libération du premier produit de la réaction : soit une molécule d'eau soit une molécule d'alcool, en fonction du substrat mis en jeu (acide ou ester). La seconde étape est l'étape de désacylation du complexe **acyl-enzyme**. Le second substrat, une molécule d'eau (réaction d'hydrolyse) ou une molécule d'alcool (réaction d'alcoolyse), activé par les résidus His224 et Asp187, exerce une **attaque nucléophile** sur le carbonyle de l'acyl-enzyme pour former le **second intermédiaire tétraédrique**. Suite à un réarrangement analogue à celui de l'étape d'acylation, le second produit de la réaction (acide carboxylique ou ester) est libéré, et l'**enzyme native** régénérée.

Par ailleurs, des études réalisées avec la CALB en milieu gazeux, ont montré que l'eau et l'alcool peuvent agir comme des inhibiteurs compétitifs du premier substrat, le donneur d'acyle (Bousquet-Dubouch et coll., 2001 ; Graber et coll., 2003a). La réaction se déroule alors selon un mécanisme **Bi-Bi Ping-Pong avec inhibition compétitive par l'eau et par le second substrat** (figure 7).

A.



B.

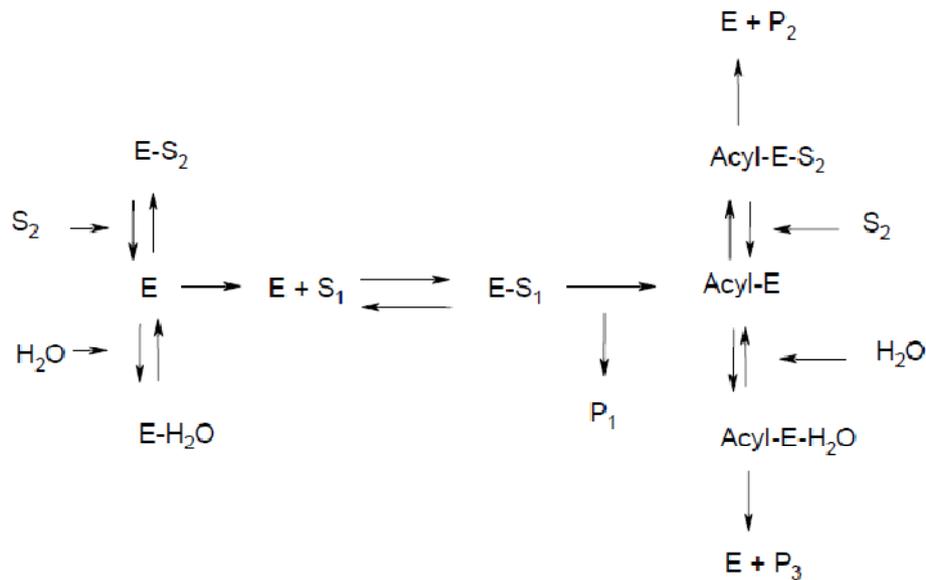
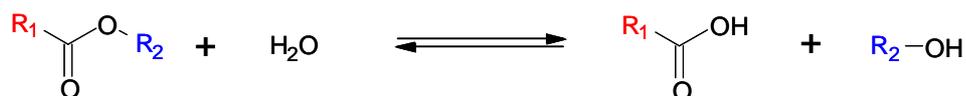
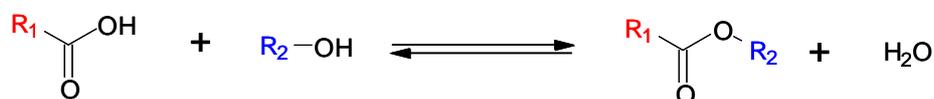


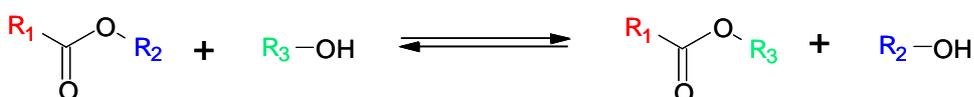
Figure 7 : A. Schéma du mécanisme de la réaction de type Bi-Bi Ping-Pong simple. B. Schéma du mécanisme de la réaction de type Bi-Bi Ping-Pong avec inhibition compétitive par l'eau (H₂O) et par le second substrat (S₂). L'eau peut constituer également un second substrat pour la réaction.

I.3. Spécificité de la CALB

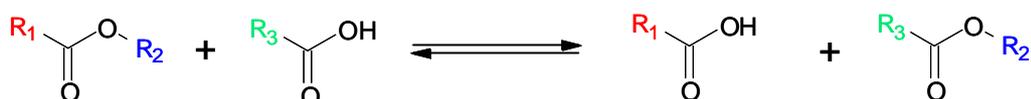
La CALB hydrolyse spécifiquement les positions 1 et 3 des triglycérides d'acides gras à chaîne courte et moyenne. Elle est également capable d'hydrolyser une très grande variété de substrats naturels et non naturels. Les réactions d'hydrolyse s'effectuent à l'interface entre les substrats hydrophobes (purs ou dissous dans un solvant non miscible à l'eau) et le milieu aqueux (contenant l'enzyme), formant ainsi un système réactionnel biphasique. Lorsque la CALB est en présence des substrats appropriés dans des conditions adaptées, elle est capable de catalyser une grande variété de réactions de synthèse : l'estérification, la transestérification, la thio transestérification, l'aminolyse et l'amidation (schéma 2). Lors de ces réactions elle présente une très grande chimio-, régio-, diastéréo- et énantiosélectivité (schéma 3). Grâce à cette grande spécificité, la CALB est l'une des lipases les plus utilisées industriellement (Anderson et coll., 1998). Parmi ses diverses applications, on peut citer son usage dans la résolution d'alcools secondaires chiraux (Ohtani et coll., 1998; Rotticci et coll., 2001a), la production de polylactones (Uyama et coll., 1997; Córdova et coll., 1998) et la production de polyesters (Binns et coll., 1998).

Réaction d'hydrolyse**Réaction d'estérification****Réaction de transestérification**

- **Alcoolyse** (par échange du groupement alkyle)



- **Acidolyse** (par échange du groupement acyle)



- **Interestéarification** (par échange du groupement acyl et alkyle)

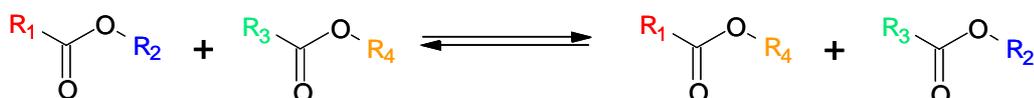
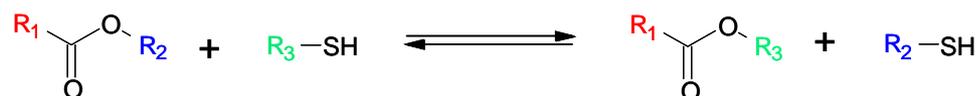
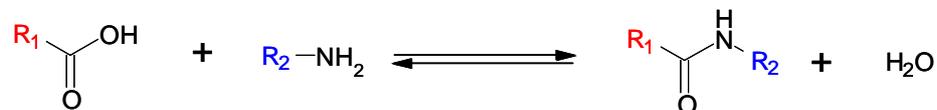
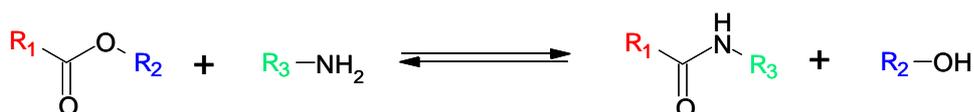
**Réaction de thio-transestérification** (exemple)**Réaction d'amidation****Réaction d'aminolyse**

Schéma 2 : Réactions catalysées par la CALB.

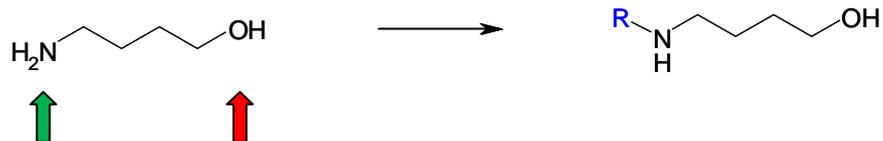
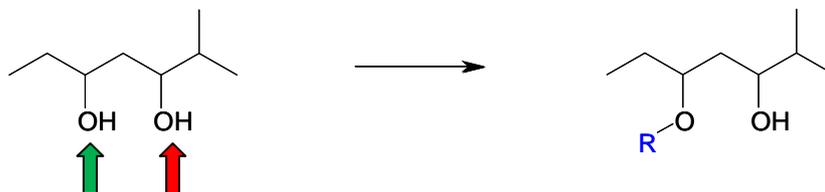
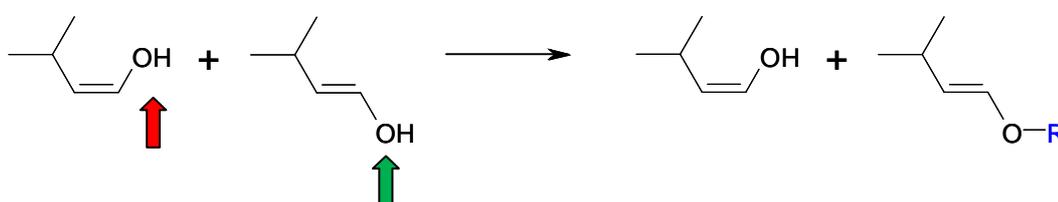
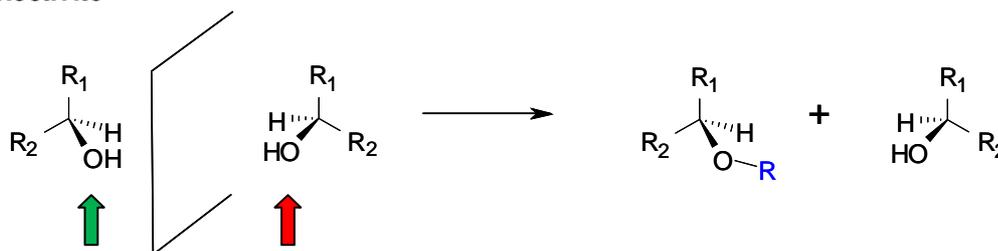
Chimiosélectivité**Régiosélectivité****Diastéréosélectivité****Enantiosélectivité**

Schéma 3 : Modèles de réactions chimio-, régio-, diastéreo- et énantiosélectives.

1.3.a Chimiosélectivité

La CALB peut catalyser spécifiquement la transformation d'une fonction donnée, lorsqu'un substrat présente plusieurs fonctions de natures différentes susceptibles de réagir (NH, OH, SH...).

Maugard et coll. ont montré que la CALB est chimiosélective lors de la synthèse de N-oléyl-N-méthyl-glucamine, un tensioactif biodégradable. La chimiosélectivité et la cinétique de réaction sont considérablement influencées par les conditions acido-basiques du milieu réactionnel. En présence d'un forte excès de N-méthyl-glucanamine dans le 2-méthyl-butan-

2-ol, la CALB catalyse préférentiellement l'acylation de la fonction amine (schéma 4) (Maugard et coll., 1997).

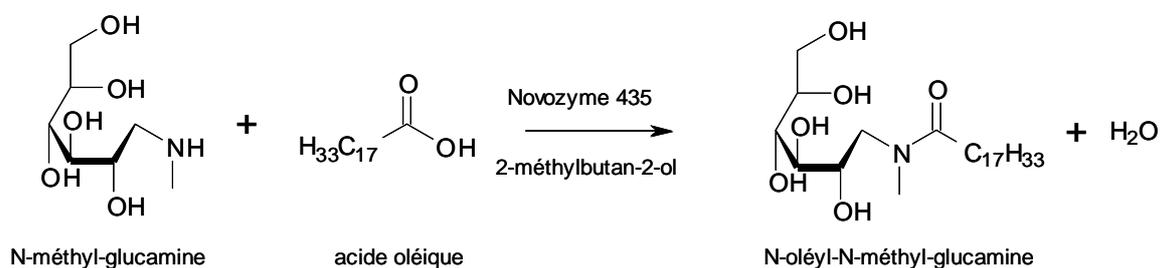


Schéma 4 : Acylation chimiosélective de la N-méthyl-glucamine avec l'acide oléique catalysée par la CALB (Maugard et coll., 1997).

L'importance du milieu réactionnel a également été montrée lors de l'acylation du 6-aminohexan-1-ol. Le produit diacylé a été obtenu en solvant organique et dans des liquides ioniques, mais en milieu sans solvant (le donneur d'acyle joue le rôle du solvant), suite à une modification de l'état d'ionisation du groupement amine, la CALB catalyse l'O-acylation exclusivement (schéma 5) (Husson et coll., 2008).

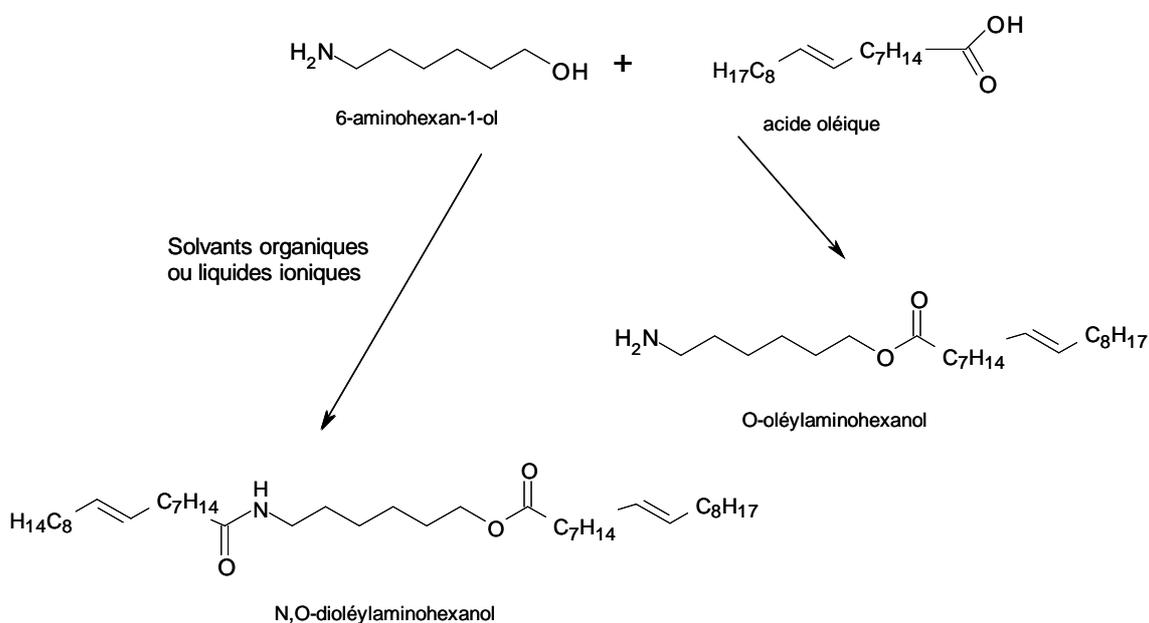


Schéma 5 : Acylation chimiosélective du 6-aminohexan-1-ol avec l'acide oléique catalysée par la CALB (Husson et coll., 2008).

I.3.b Régiosélectivité

Il s'agit d'une spécificité de position. La CALB hydrolyse préférentiellement les acides gras en position 1 ou 3 des triacylglycérols.

La CALB permet ainsi de différencier deux alcools primaires très réactifs présents sur la même molécule en fonction de leurs environnements respectifs. Ainsi, lors de l'acylation des isoprostanes 1,5-diols protégés en position 2 (schéma 6, composé 5a, ent-5a et 6a), seul l'alcool primaire du groupement en 5 (OHa) est acylé (Oger et coll., 2010).

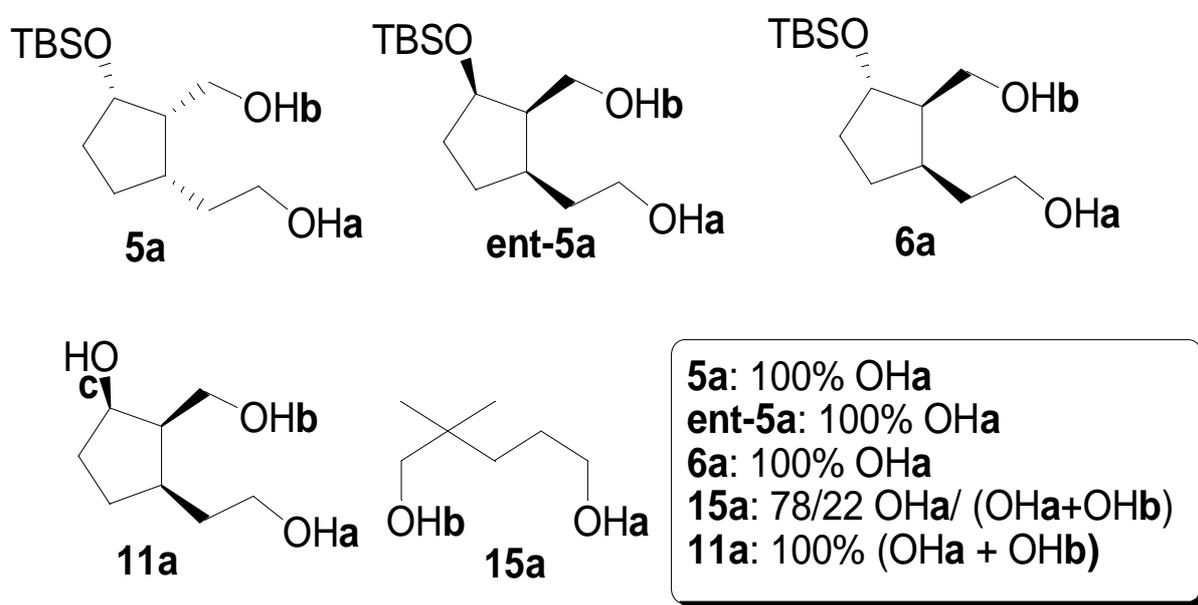


Schéma 6 : Structure de quelques isoprostanes 1,5-diols asymétriques, et résultats de la régiosélectivité observée (Oger et coll., 2010)

La CALB peut également faire la différence entre plusieurs alcools secondaires. Ainsi la rutine (quercetin-3-O-glucose-rhamnose), un flavonoïde diglycosylé, présente dix groupements de type alcools secondaires, et en milieu non-aqueux la CALB catalyse l'acylation du groupement hydroxyle 4'''-OH exclusivement (schéma 7) (De Oliveira et coll., 2009). Cette acylation confère à la rutine une meilleure lipophilisation, facilitant ainsi son incorporation dans des produits cosmétiques, pharmaceutiques et alimentaires.

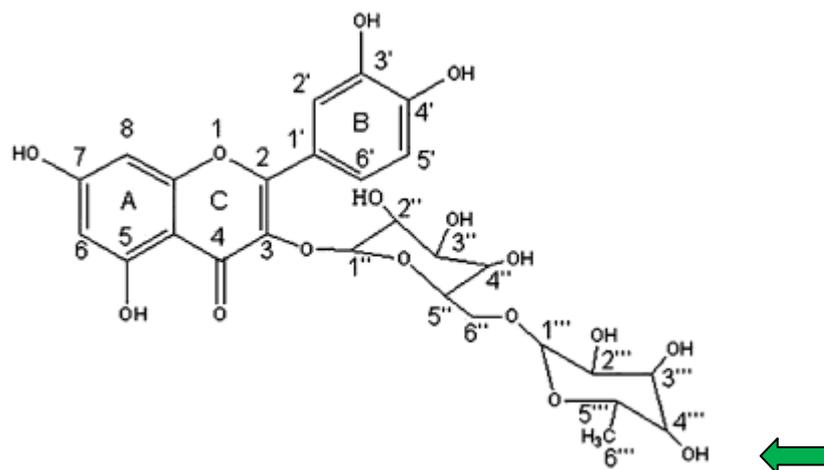


Schéma 7 : Structure de la rutine. La flèche verte indique la fonction attaquée sélectivement par la CALB (De Oliveira et coll., 2009).

Par ailleurs, la CALB a une plus grande affinité pour les alcools primaires que secondaires. Cette propriété de la CALB a été utilisée pour acyler la 5-azacytidine, un analogue synthétique de la cytidine, en position 5'O préférentiellement. La 5'-O-lauryl-5-azacytidine est plus liposoluble et plus stable dans l'organisme que la 5-azacytidine, permettant ainsi un meilleur usage pour le traitement du syndrome myelodysplasique (Chen et coll., 2008) (schéma 8).

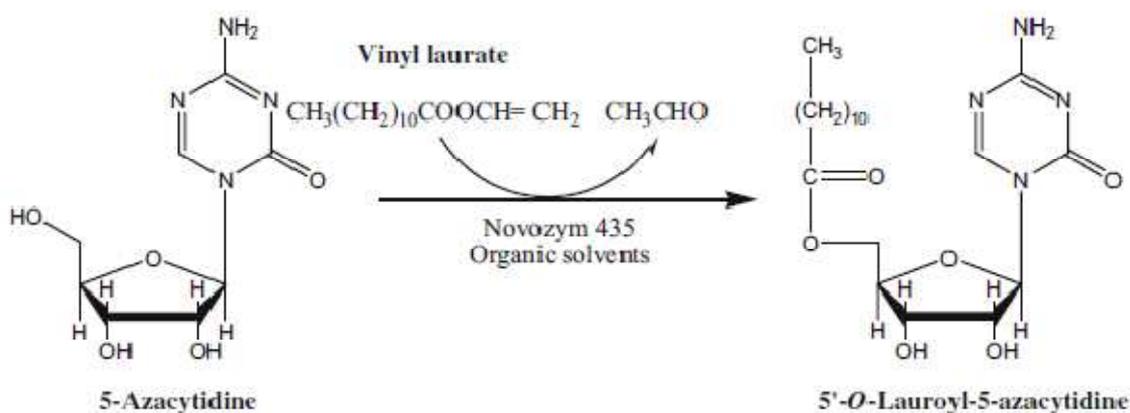


Schéma 8: Acylation régiosélective de la 5-azacytidine avec le vinyl laurate e catalysée par la CALB en solvants organiques.

L'absence de réaction avec les alcools tertiaire permet d'utiliser ces derniers comme solvants réactionnels (Chen et coll., 2008).

1.3.c Diastéréosélectivité

La CALB est diastéréosélective, c'est-à-dire qu'elle est capable de différencier deux diastéréoisomères. La diastéréoisomérisation des molécules peut être due à une double liaison (isomérisation *Z/E*), à la présence d'un cycle (isomérisation *cis/trans*) ou à la présence de plusieurs centres chiraux.

La *cis*-pellitorine ou (2*E*,4*Z*)-*N*-isobutyldeca-2,4-dienamide est produite naturellement dans l'estragon, cette molécule procure des sensations piquantes et peut donc être utilisée comme un composé aromatique, épicé, pour des applications alimentaires par exemple. Elle a pu être synthétisée par réaction d'aminolyse catalysée par la CALB à partir d'un mélange de diastéréoisomères (2*E*,4*E*), (2*E*,4*Z*) et (2*Z*,4*E*) de l'éthyl déca-2,4-diénoate et l'isobutylamine avec un rendement de 80% (Ley et coll., 2004) (schéma 9).

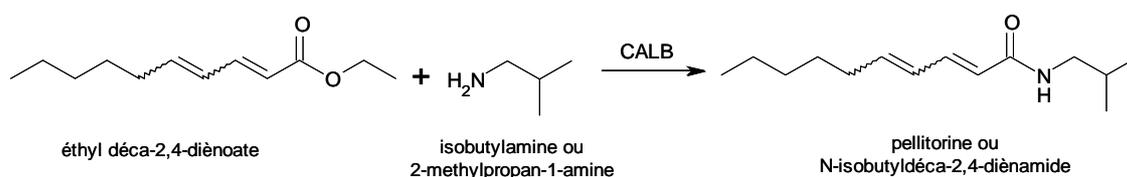


Schéma 9: Réaction d'aminolyse catalysée par la CALB du mélange de diastéréoisomères de l'éthyl déca-2,4-diénoate en vue de la production de la *cis*-pellitorine (Ley et coll., 2004).

1.3.d Enantiosélectivité

La CALB est capable de faire la différence entre deux molécules énantiomères. Elle est largement employée pour la résolution des mélanges racémiques d'alcools et d'amines secondaires ou des esters chiraux.

Ainsi, l'octan-2-amine et la 1-phényléthyl amine ont pu être résolues à l'aide de la CALB (schéma 10). Les amines énantiopures ainsi produites constituent des synthons importants pour l'industrie pharmaceutique (Ohrner et coll., 1996).

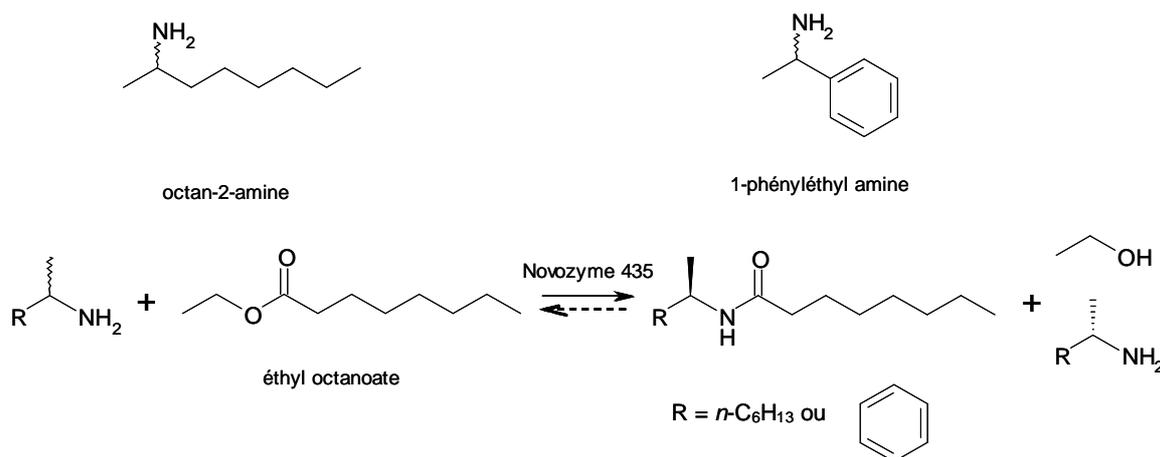


Schéma 10 : Résolution des amines secondaires avec l'éthyl octanoate catalysée par la CALB (Ohrner et coll., 1996).

Ci-dessus, des exemples d'applications faisant appel à une des propriétés de chimio-, régio-, diastéréo- ou énantiosélectivité de la CALB ont été cités. Or, les composés comportent souvent des fonctions multiples, de natures identiques ou différentes, et de nombreux centres chiraux. Dans ce cas, le groupement transformé par la CALB est sélectionné selon plusieurs de ces propriétés simultanément. Par exemple, la CALB est capable de catalyser des réactions de façon à la fois chimiosélective et régiosélective : lors de l'acylation du dipeptide Lys-Ser, en milieu organique, la CALB catalyse exclusivement l'acylation de l'amine de la chaîne latérale de la lysine (Husson et coll., 2009) (schéma 11).

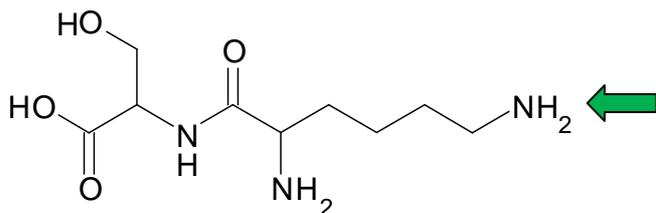


Schéma 11 : Structure du dipeptide Lys-Ser. La flèche verte indique la fonction attaquée sélectivement par la CALB (Husson et coll., 2009).

II. Dédoublément des mélanges racémique catalysé par la CALB

Dans la précédente partie, nous avons vu que la CALB était capable de catalyser de nombreuses réactions chimiques avec une très grande sélectivité. Son énantiosélectivité, c'est-à-dire sa capacité de différencier deux énantiomères, fait qu'elle est capable de résoudre des mélanges racémiques d'alcools, d'amines, de thiols, d'esters et d'acides. Contrairement aux méthodes de dédoublement chimiques multi-étapes et souvent contraignantes, la résolution enzymatique de ces mélanges se fait généralement en une seule étape.

Cette énantiosélectivité de la CALB, mais également des autres enzymes, est due à une différence d'énergie d'activation de la réaction entre des deux énantiomères : l'énantiomère présentant une analogie structurale avec l'enzyme sera transformé rapidement, en revanche l'autre énantiomère aura plus de difficulté pour se lier à l'enzyme et nécessitera un apport d'énergie initiale plus important pour pouvoir réagir, par conséquent il sera transformé plus lentement. Ainsi, l'énantiosélectivité peut être reliée à la différence d'énergie libre entre les états de transition formés avec les deux énantiomères (figure 8).

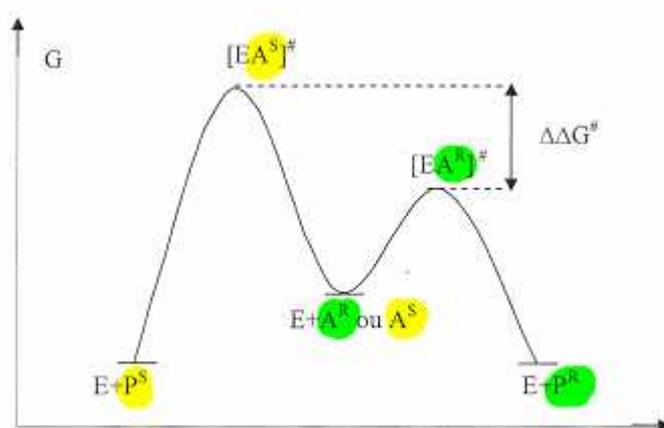


Figure 8 : Diagramme d'énergie de Gibbs ou d'énergie libre d'activation d'une réaction énantiosélective catalysée par une enzyme. A^S et A^R sont les énantiomères substrats, P^S et P^R les énantiomères produits de la réaction ; $[EA^S]^\ddagger$ et $[EA^R]^\ddagger$ les états de transition, dans notre cas A^R est préférentiellement transformé par l'enzyme (Faber, 2000).

L'utilisation massive des enzymes pour la résolution des mélanges racémiques, a nécessité l'élaboration de méthodes permettant de décrire quantitativement la discrimination entre deux énantiomères, rendant ainsi leur comparaison possible.

Dans cette partie, les méthodes de quantification de l'énantiosélectivité ont été présentées. Ensuite, l'état de l'art des réactions de dédoublement d'alcools secondaires a été exposé et pour finir, nous nous sommes intéressés aux paramètres pouvant influencer cette réaction, ainsi qu'à l'influence des modifications de la structure de l'enzyme sur son énantiosélectivité.

II.1. Quantification de l'énantiosélectivité

Dans le cas d'un dédoublement cinétique d'un mélange racémique (schéma 12) la stéréosélectivité peut être caractérisée par la détermination des **excès énantiomériques du substrat (ee_s) ou du produit (ee_p)** (équations 1 et 2). Cependant, du fait de la variation des excès énantiomériques en fonction du **taux de conversion (c)** (équation 3) (figure 9), Chen et coll. ont proposé d'autres formules permettant de calculer l'énantiosélectivité (Chen et coll., 1982).

$$\% ee_s = \frac{R-S}{R+S} \times 100 \quad (\text{Eq. 1}) \qquad \% ee_p = \frac{P-Q}{P+Q} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

$$\% c = \left(1 - \frac{R+S}{R_0+S_0}\right) \times 100 = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p} \times 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

(Avec R₀ et S₀ correspondant aux concentrations initiales des énantiomères R et S respectivement, R et S correspondant aux concentrations des énantiomères substrat, P et Q correspondant aux concentrations des énantiomères produit ; l'énantiomère R est transformé préférentiellement)

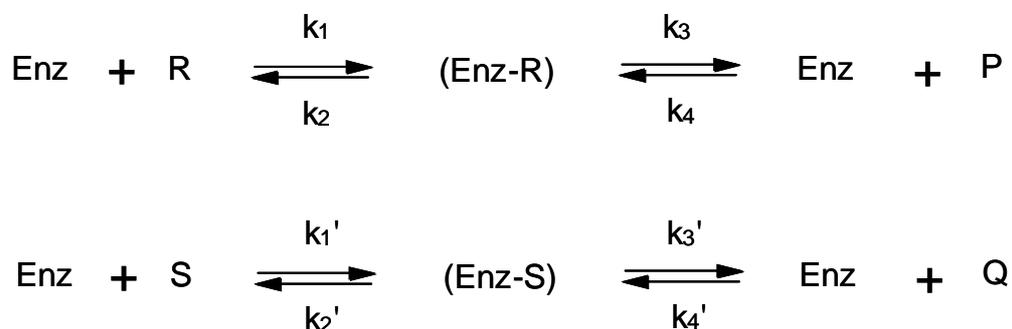


Schéma 12 : Dédoublement enzymatique. R et S représentent les énantiomères substrat, P et Q représentent les énantiomères produit.

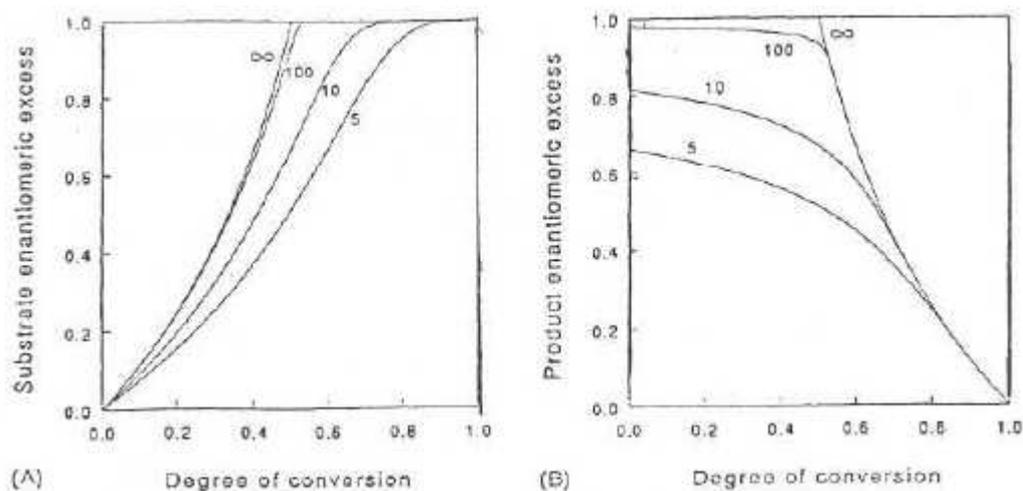


Figure 9 : Variation de l'excès énantiomérique du substrat (ee_s) (A), et de l'excès énantiomérique du produit (ee_p) (B), en fonction du degré de conversion ($= c / 100$), pour différentes valeurs du ratio énantiomérique, E (chiffres sur les courbes) (Straathof et Jongejan, 1997).

Le **ratio énantiomérique E** est une propriété intrinsèque de l'enzyme qui décrit quantitativement sa stéréosélectivité.

Dans le cas d'une réaction d'hydrolyse sans inhibition, E est égal au rapport des constantes de spécificité pour chaque énantiomère pur (Chen et coll., 1982) (équation 4, avec k_{cat} = constante catalytique et K_M = constante de Michaelis-Menten)

$$E = \frac{(k_{cat}/K_M)_R}{(k_{cat}/K_M)_S} \quad (\text{Eq. 4})$$

La constante E , indépendante de la concentration du substrat et du degré de conversion, permet de décrire la qualité de la résolution enzymatique (Figure 9) :

- **$E = 1$** : pas de discrimination entre les énantiomères, l'enzyme est non énantiosélective ;
- **$E < 10$** : la discrimination entre les énantiomères est faible, mais au delà de 50% de conversion, la purification de l'énantiomère de substrat n'ayant pas réagi ($ee_s > 99\%$) est possible au dépend de celle du produit ;
- **$10 < E < 100$** : décrit un système énantiosélectif permettant l'obtention d'un énantiomère de substrat pur ou d'un énantiomère de produit d'une pureté allant de 80 à 98%, en fonction du degré d'avancement de la réaction ;

- **E > 100** et E tendant vers l'**infini** : rendent compte respectivement de la sélectivité excellente et absolue du catalyseur. Ces valeurs de E conduisent à l'obtention d'un énantiomère de substrat et d'un énantiomère de produit purs à 50% de conversion du mélange racémique.

➤ **Cas des réactions enzymatiques irréversibles :**

Ce sont les réactions où $k_4 = k_4' = 0$ (schéma 12). Pour des réactions enzymatiques irréversibles de type michaélien à partir d'un mélange racémique de substrats purs, lorsque le système est considéré comme homogène, le volume est constant, et qu'il y a absence d'inhibition et de racémisation, E peut être calculé à partir des excès énantiomériques du substrat (ee_s), du produit (ee_p) et du taux de conversion (c) directement issus de mesures expérimentales (Chen et coll., 1982) (équations 5 et 6).

$$E = \frac{\ln[(1-c)(1-ee_s)]}{\ln[(1-c)(1+ee_s)]} \quad (\text{Eq. 5})$$

$$E = \frac{\ln[1-c(1+ee_p)]}{\ln[1-c(1-ee_p)]} \quad (\text{Eq. 6})$$

➤ **Cas des réactions enzymatiques réversibles :**

La détermination de l'énantiosélectivité devient plus complexe lorsque la réaction est réversible : k_4 et $k_4' \neq 0$ (schéma 12). C'est généralement le cas des réactions de synthèse en milieu organique, lorsque la concentration du nucléophile qui réagit sur le complexe acyl-enzyme n'est pas en excès. La réversibilité de la réaction s'exprime par une diminution de l'excès énantiomérique du substrat, alors que le taux de conversion augmente (Chen et coll., 1987 ; Sih et Wu, 1989 ; Rakels et coll., 1993) (figure 10). Pour calculer E, on doit alors impérativement tenir compte de la constante d'équilibre de la réaction (K_{eq}) (Straathof et coll., 1992 ; Straathof et Jongejean, 1997) (équations 7 et 8)

$$E = \frac{\ln[1-(1+K_{eq})(c+ee_s(1-c))]}{\ln[1-(1+K_{eq})(c-ee_s(1-c))]} \quad (\text{Eq. 7})$$

$$E = \frac{\ln[1-(1+K_{eq})c(1+ee_p)]}{\ln[1-(1+K_{eq})c(1-ee_p)]} \quad (\text{Eq. 8})$$

La réversibilité de la réaction n'intervient généralement qu'au-delà de 40% de conversion. Il est ainsi possible de calculer E en utilisant les équations 5 et 6 (Chen et Sih, 1989) pour des taux de conversions inférieurs à 20%, même dans le cas de réactions réversibles.

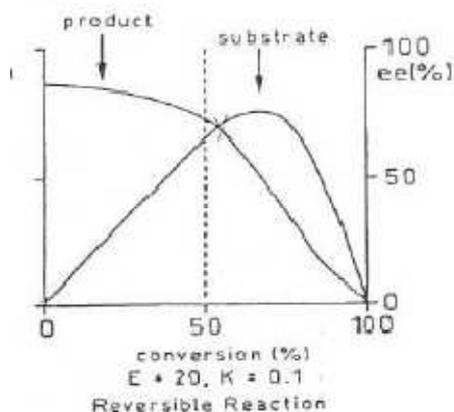


Figure 10 : Evolution des excès énantiomériques du substrat et du produit (ee_s et ee_p) dans le cas d'une réaction réversible (avec $E = 20$ et $K = 0,1$) (Faber K et Riva S 1992).

➤ Cas particuliers :

Les **réactions parasites** (lors de l'utilisation de systèmes multienzymatiques, avec des enzymes présentant une sélectivité opposée, ou lors de l'utilisation des substrats contaminés ou instables), conduisent à des résultats erronés du degré de conversion et donc de E. Une autre méthode de calcul du ratio énantiomérique permet de ne pas prendre en compte le degré de conversion (Straathof et Jongejan, 1997) (équation 9). Par ailleurs, même en absence de réactions parasites, cette équation est souvent préférée aux équations 5 et 6, en raison des erreurs importantes souvent constatées pour la mesure des taux de conversion.

$$E = \frac{\ln[(1-ee_s)/(1+ee_s/ee_p)]}{\ln[(1+ee_s)/(1+ee_s/ee_p)]} \quad (\text{Eq. 9})$$

L'**inhibition** de la réaction par le substrat ou le produit de la réaction entraîne également une variation de l'énantiosélectivité. Cependant, dans le cas de mélanges réactionnels très dilués, l'inhibition peut être négligée (Straathof et Jongejan, 1997).

L'utilisation de **milieux réactionnels hétérogènes** (enzyme insoluble en milieu organique, enzyme immobilisée sur un support,...), peut également entraîner des problèmes de

limitations diffusionnelles et fausser la mesure de l'énantiosélectivité. Une agitation vigoureuse permet généralement de limiter les problèmes diffusionnels.

Dans certains cas (premier substrat en large excès), l'équation 10, qui définit l'énantiosélectivité comme le rapport des vitesses initiales de la réaction, est préférée car elle est beaucoup moins complexe, plus rapide à estimer au niveau expérimental et est une bonne mesure de l'énantiosélectivité (Wescott et Klivanov, 1993 ; Ducret et coll., 1998; Wu et Liu, 2000).

$$E = V_{iR} / V_{iS} \quad (\text{Eq. 10})$$

II.2. Dédoublément des alcools secondaires catalysée par la CALB

La CALB est une enzyme présentant une grande stéréospécificité pour les énantiomères d'alcools secondaires. Elle a été utilisée pour la résolution d'une très grande variété d'alcools secondaires : des **alcools secondaires à chaîne principale linéaire** avec des groupements alkyles linéaires, ramifiés, insaturés (Orrenius et coll., 1995b ; Orrenius et coll., 1998 a; Patel et coll., 2000 ; Léonard et coll., 2007), cycliques (Frykman et coll., 1993 ; Chua et Sarmidi, 2005 ; Brossat et coll., 2009 ; Vallin et coll., 2010), hétérocycliques (Orrenius et coll., 1994 ; Vallin et coll., 2009) ou portant un substituant halogéné (Rotticci et coll., 1997 ; Rotticci et coll., 2001b) et des **alcools secondaires cycliques** (groupe hydroxyle situé sur un cycle) (Frykman et coll., 1993 ; Nicolosi et coll., 1995 ; Tomin et coll., 2010) ou cycliques portant un substituant halogéné (Johnson et Sakagushi, 1992 ; Tomin et coll., 2010).

La sélectivité de la CALB est très variable en fonction de l'alcool utilisé. En particulier, selon la taille des substituants et le positionnement des fonctions autour du carbone chiral, l'enzyme sera plus ou moins active avec l'une ou l'autre forme énantiomérique. Un modèle de prédiction de E basé sur la taille des substituants a été établi par Kazlauskas et coll., puis vérifié sur les lipases de *Burkholderia cepacia* et de *Candida rugosa* avec une cinquantaine d'alcools secondaires linéaires et cycliques (Kazlauskas et coll., 1991; Kazlauskas 1994). Les substituants du carbone asymétrique du plus au moins volumineux ont été appelés L, M et S respectivement pour "large", "medium" et "small", ici le substituant S est un atome

d'hydrogène (Figure 11). En règle générale, plus la différence de taille entre les substituants M et L est importante, plus la sélectivité est importante.

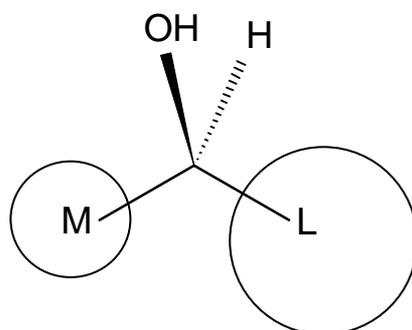
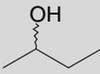
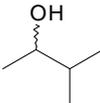
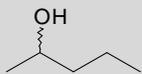
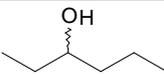


Figure 11 : Représentation schématique d'un alcool secondaire selon Kazlauskas. M pour le substituant de taille moyenne et L pour le substituant le plus gros. La figure montre l'énantiomère préféré par les lipases de *Pseudomonas cepacia* et *Candida rugosa* (Kazlauskas et coll., 1991).

Une étude similaire a été réalisée avec la CALB portant sur une quarantaine d'alcools secondaires linéaires et cycliques (Brunet, 2000). D'après les résultats de E reportés dans la littérature, il a été noté que : pour les alcools secondaires avec un substituant M à chaîne linéaire saturée ou insaturée, comportant au plus 2 atomes de carbone et un substituant L plus long que 2 atomes de carbone, à chaîne ramifié ou cyclique ou ayant un substituant halogéné, E était supérieur à 100 ; pour les alcools secondaires avec un substituant M à chaîne ramifiée ou ayant un substituant halogéné ou un substituant L comportant 1 ou 2 atomes de carbone, la valeur de E était faible (< 15) (Brunet, 2000). Par ailleurs, il apparaît que la CALB, catalyse préférentiellement la conversion des énantiomères R des alcools secondaires.

Afin de mieux se rendre compte des variations de E en fonction du substrat, on peut citer les travaux d'Orrenius et coll. (1998a). Lors de cette étude, la résolution d'une quinzaine d'alcools secondaires avec le S-éthyl thiooctanoate comme donneur d'acyle catalysée par la CALB a été réalisée. Les résultats montrent que plus la différence de taille entre les substituants M et L est importante, plus l'énantiosélectivité augmente. Ainsi, l'énantiosélectivité est élevée lorsque, pour un alcool secondaire, le substituant M est plus petit qu'un groupement propyle et le substituant L est un groupement propyle ou est plus grand qu'un groupement propyle (Orrenius et coll., 1998a). Les résultats les plus pertinents ont été reportés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Résolution d'alcools secondaires par la lipase B de *Candida antarctica* (Orrenius et coll., 1998a). Le donneur d'acyle est le S-éthyl thiooctanoate. La température est fixée à 40°C. La réaction a lieu sans solvant. Le ratio énantiomérique (E) a été déterminé d'après la méthode de Rakels et coll. (1993).

Alcool secondaire	Structure	Ratio énantiomérique (E)	Taux de conversion (en %)
butan-2-ol		9,1	13,8
3-méthylbutan-2-ol		705	46,2
pentan-2-ol		390	49
hexan-3-ol		97	50

Il a été suggéré que les variations de E observées avec le substrat étaient liées à l'existence de la poche stéréosélective (Uppenberg et coll., 1995). Selon Orrenius et coll. les substituants (M ou L) plus longs qu'un groupement propyle (branché ou non) logent difficilement dans la poche stéréosélective. Or, pour être transformé, l'énantiomère *R* doit positionner son substituant M dans cette poche et l'énantiomère *S*, son substituant L. Ainsi, l'énantiomère *R* pouvant le plus facilement se loger dans le site actif de l'enzyme sera transformé avec une vitesse élevée, l'autre énantiomère étant lentement, voire pas du tout transformé (Orrenius et coll., 1998a).

L'origine de l'énantiosélectivité, en fonction des connaissances sur la structure de l'enzyme, peut être attribuée à la restriction physique du site actif, à l'existence de la poche stéréospécifique, au long tunnel étroit et hydrophobe conduisant au site actif et aux liaisons intervenant dans la stabilisation des intermédiaires tétraédriques (Uppenberg et coll., 1994; Anderson et coll., 1998). De nombreuses études de modélisation moléculaire ont été menées, afin de mieux comprendre les phénomènes mis en jeu lors de la reconnaissance et la fixation des substrats par la CALB. Les résultats de ces études seront discutés ultérieurement.

Par ailleurs, plusieurs études ont révélé que l'entropie est également un paramètre fondamental pour définir l'énantiosélectivité (Phillips, 1992, 1996; Overbeeke, et coll., 1998; Overbeeke et coll., 1999; Ottosson, 2001; Ottosson et coll., 2001; Phillips, 2002; Ottosson et

coll., 2002a). Cette notion d'entropie sera plus amplement discutée dans le chapitre B des "Résultats et Discussion".

Bien que, la CALB permette d'obtenir des énantiomères purs pour de nombreux alcools secondaires et que les origines de son énantiosélectivité commencent à être comprises, son étude suscite toujours beaucoup d'intérêt. Les études les plus récentes cherchent à :

- **Mieux comprendre** son énantiosélectivité, et notamment à mieux comprendre l'implication de la structure protéinique dans la reconnaissance des substrats et l'influence de certains paramètres réactionnels (donneur d'acyle, température, présence d'eau, type de solvant...). L'étude de ces paramètres sera présentée dans les paragraphes suivants (§ II.3. et II.4).
- Trouver des méthodes adaptées pour la **synthèse de nouveaux synthons** pour l'industrie pharmaceutique et cosmétique (Fuglseth et coll., 2006 ; Vallin et coll., 2009).
- **Améliorer le taux de conversion**. En effet, avec les méthodes traditionnelles de résolutions cinétiques des alcools secondaires, le rendement maximum théorique est de 50% (la totalité d'un des énantiomères est alors transformé). Une méthode appelée résolution cinétique dynamique (DKR) combinant des enzymes avec catalyseurs de transition métallique a été développée par Williams (Dinh et coll., 1996) et Bäckvall (Persson et coll., 1999). Dans de tels procédés, l'énantiomère qui réagit lentement avec l'enzyme est racémisé *in-situ* par un catalyseur métallique, permettant ainsi d'atteindre des rendements théoriques de 100%. Des complexes métalliques (généralement le ruthénium) avec des structures variées sont utilisés pour la racémisation des alcools (schéma 13). Des recherches sont menées pour trouver des catalyseurs plus stables et avec une bonne compatibilité avec les enzymes. En utilisant des tels complexes le (*R*)-1-phényléthyl acétate et le (*R*)-1-(furan-2-yl)éthyl acétate ont pu être obtenus à partir des mélanges racémiques de l'alcool correspondant avec des rendements de 90-95% et un $ee_p \geq 97\%$ (Mavrynsky et coll., 2009) (schéma 14). Avec des 1-hétéroaryl éthanol, le rendement 100% a été atteint (Vallin et coll., 2009) (schéma 15).

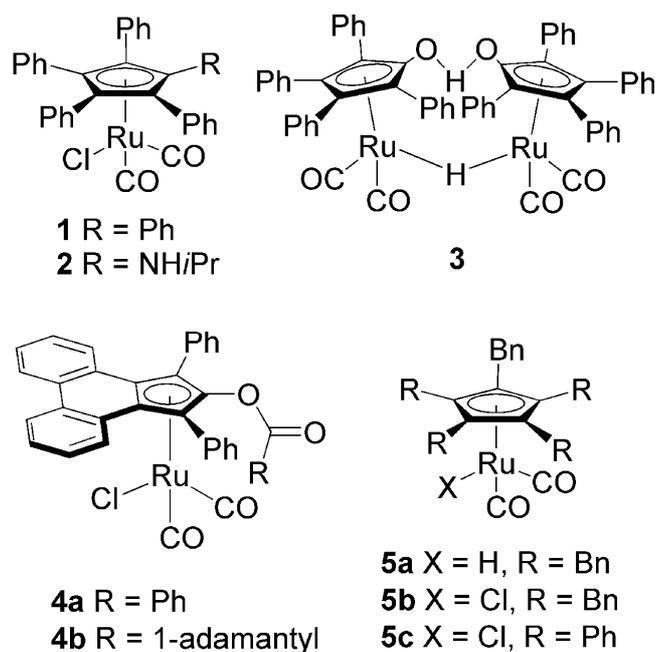


Schéma 13 : Structure de quelques complexes de ruthénium en demi-sandwich (Mavrynsky et coll., 2009).

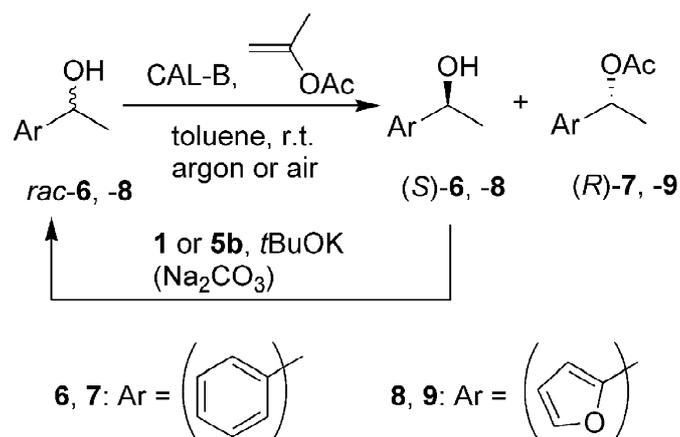


Schéma 14 : Résolution cinétique dynamique du (\pm)-1-phényl éthanol et du (\pm)-1-(furan-2-yl) éthanol avec le isopropenyl acétate catalysée par la CALB couplée à un complexe de ruthénium (Mavrynsky et coll., 2009).

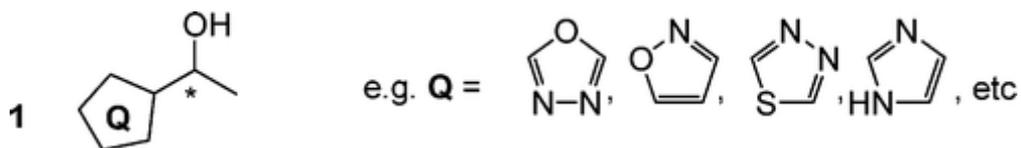


Schéma 15 : Structure du 1-hétéroaryl éthanol (Vallin et coll., 2009).

- **Faciliter la séparation** des deux énantiomères après la résolution enzymatique. Bien que les esters et les alcools puissent être facilement séparés par chromatographie, la séparation des liquides à grande échelle reste contraignante. Après dérivation de l'énantiomère qui n'a pas été acétylé avec de l'anhydride phtalique, le monoester d'acide phtalique résultant pourrait facilement être séparé de l'acétate correspondant par précipitation et filtration ou par distillation (Maywald et Pfaltz, 2009). Brossat et coll. ont proposé d'utiliser, pour la résolution des mélanges racémiques des alcools secondaires, des esters dérivés d'acides aminés portant un groupement protecteur facilement éliminable (Boc par exemple). Après lavage à l'acide, l'énantiomère transformé devient soluble dans l'eau, alors que l'énantiomère de l'alcool n'ayant pas réagi reste dans la phase aqueuse (Brossat et coll., 2009) (schéma 16).

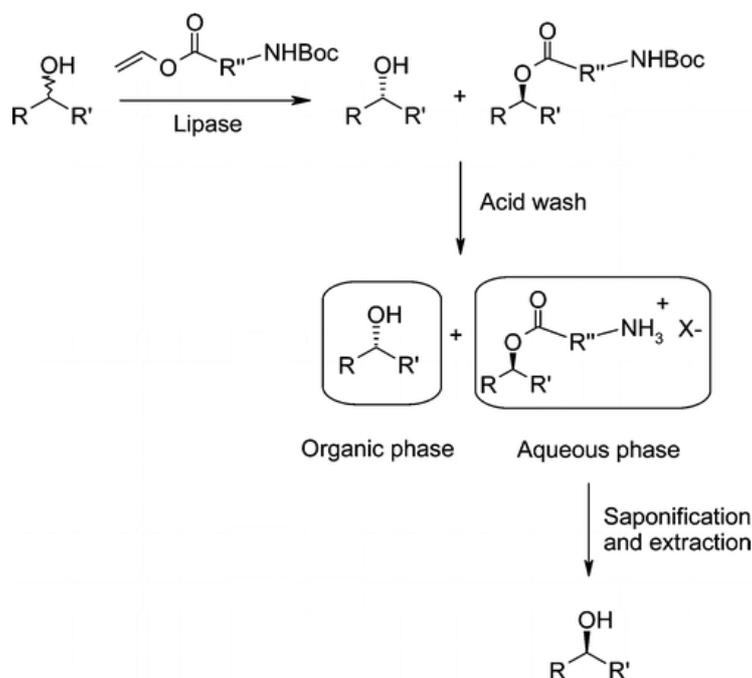


Schéma 16 : Résolution des alcools secondaires catalysée par la CALB en utilisant des vinyl esters d'acides aminés en tant que donneurs d'acyle (Brossat et coll., 2009).

- Tendre vers une "**chimie verte**". De plus en plus de travaux sont réalisés pour remplacer les solvants organiques utilisés en quantités massives par des "solvants" moins polluants. Ceci sera traité lors de paragraphe suivant (§ II.3.c).

II.3. Influence des paramètres réactionnels sur l'énantiosélectivité de la CALB

L'énantiosélectivité est une propriété intrinsèque de l'enzyme, pour un substrat donné, dans un environnement donné. Dans le paragraphe précédent, nous avons montré que la structure de l'alcool à résoudre influençait fortement l'énantiosélectivité de la CALB. Dans ce paragraphe nous avons cherché à montrer l'influence exercée par le donneur d'acyle et par le milieu réactionnel (présence de l'eau, type de solvant, température, additifs), sur la sélectivité des lipases et de la CALB en particulier.

II.3.a Influence du donneur d'acyle

La résolution d'alcools secondaires chiraux par la CALB par transestérification implique la présence de deux substrats dans son site actif, un donneur d'acyle et un alcool chiral, l'accepteur d'acyle. Dans le site actif étroit de la CALB, les parties acyle et alcool se positionnent de façon à former un motif en épingle à cheveux (figure 4). Il n'est donc pas surprenant que la chaîne acyle de l'intermédiaire tétraédrique interagisse avec la partie alcool et par conséquent intervienne dans la discrimination des énantiomères.

Un excès de donneur d'acyle permet de maintenir constant le rapport acyl-enzyme / enzyme libre, et d'orienter ainsi la réaction dans le sens de la synthèse. La cinétique de la réaction peut alors être assimilée à un modèle michaëlien (Chen et Sih, 1989 ; Faber et Riva, 1992) et E peut être calculé selon les équations de Chen et coll. (1982).

Raza et coll. ont étudié l'influence de la longueur de la chaîne acyle sur l'énantiosélectivité par modélisation moléculaire et ont observé une différence significative d'énergie libre d'activation $\Delta\Delta G^\ddagger$ entre les énantiomères en fonction de la longueur de la chaîne acyle. Cette différence d'énergie a été calculée pour la structure entière (enzyme-substrat) et pour différents groupes constitués de certains acides aminés de l'enzyme entourant le site actif et le substrat. Les acides aminés de ces groupes ont été sélectionnés en fonction de différents critères bien définis (structuraux, énergétiques, fonctionnels). En sélectionnant quelques atomes fonctionnels bien définis (le carbone tétraédrique, les quatre atomes liés et les atomes de l'enzyme potentiellement impliqués dans des liaisons hydrogène), une bonne corrélation a pu être trouvée entre la différence d'énergie calculée et la longueur de la chaîne acyle (Raza et coll., 2001) (figure 12).

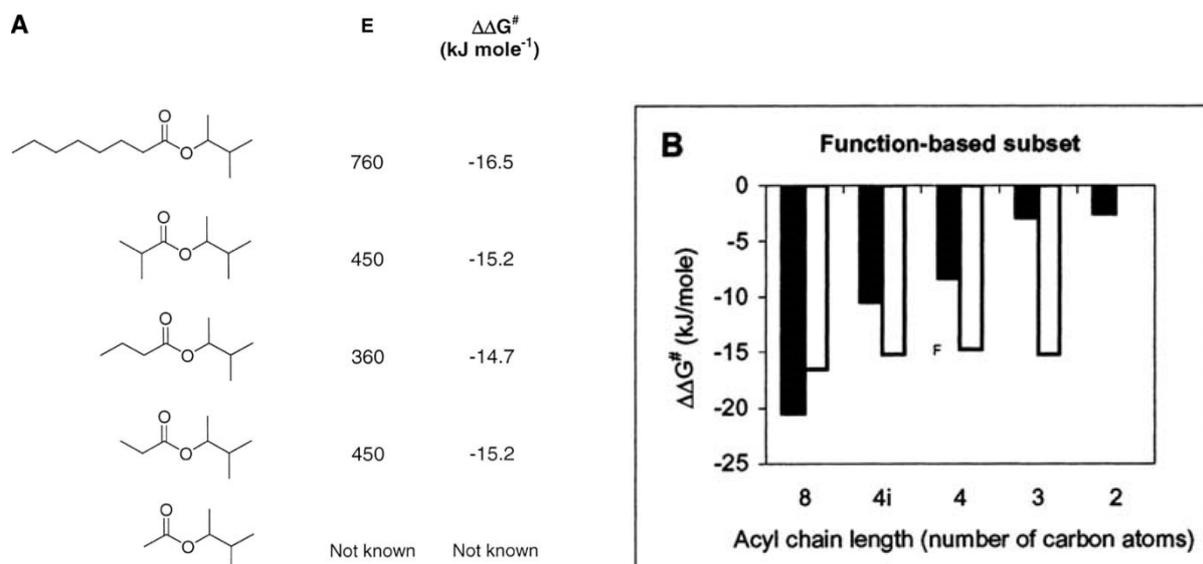


Figure 12 : (A) Structure des substrats modélisés, avec une partie acyle de longueur variable, lors de l'étude réalisée par Raza et coll. Les ratios énantiomériques, E, obtenus expérimentalement pour une température de 300 K dans l'hexane (Ottosson et Hult, 2001) et les valeurs correspondantes de $\Delta\Delta G^\ddagger$ sont également précisés. (B) Comparaison des valeurs calculées $\Delta\Delta G^\ddagger$ pour les sous-ensembles sélectionnés selon des critères fonctionnels, décrivant les principaux éléments structuraux de l'état de transition (barres noires), avec les valeurs expérimentales (barres blanches). 4i correspond à la chaîne iso-butanoyle (d'après Raza et coll., 2001).

D'autre part, Ottosson et Hult ont montré expérimentalement que la longueur de la chaîne acyle d'esters vinyliques employés comme donneurs d'acyle avait une grande influence sur le ratio énantiomérique (celui-ci augmente lorsque la longueur de la chaîne carbonée de la partie acyle passe de 4 à 8 atomes de carbone) et ses composantes thermodynamiques $T\Delta_{R-S}\Delta S^\ddagger$ et $\Delta_{R-S}\Delta H^\ddagger$ (Ottosson et Hult, 2001). L'étude de modélisation moléculaire a montré que le volume accessible dans le site actif pour la chaîne acyle du donneur d'acyle, lors de l'état de transition, est différent pour chacun des énantiomères (Ottosson et coll., 2002a). Lorsque le vinyl propionate (C3) est utilisé comme donneur d'acyle l'énantiosélectivité observée est meilleure que celle obtenue avec le butyl propionate (C4). Cette différence semble être liée au positionnement différent du groupement propyle au sein du site actif, par rapport aux groupements plus longs (Uppenberg et coll., 1995 ; Ottosson et Hult, 2001).

La partie alkyle du donneur d'acyle peut également influencer l'énantiosélectivité de la CALB. Les esters énoliques et vinyliques, très réactifs, sont souvent utilisés pour rendre les réactions de transestérification irréversibles (Patel et coll., 2000 ; Ottosson et Hult, 2001), car l'alcool formé se tautomérise en une cétone ou un aldéhyde, respectivement (Faber et Riva, 1992). Ainsi, la transestérification de l'octan-2-ol avec le vinyl octanoate catalysée par la CALB est deux fois plus rapide et cinq fois plus énantiosélective, qu'avec l'éthyl octanoate (Ohrner et coll., 1994). Par ailleurs, il a été observé que lorsqu'un ester avec une chaîne alkyle "mimant" la structure de l'alcool à résoudre est utilisé, l'énantiosélectivité de l'enzyme se trouvait améliorée (Lee et coll., 2000 ; Gonzalez-Sabin et coll., 2004). Ce phénomène sera étudié plus amplement dans la partie résultats et discussion (§ B.II.)

II.3.b Influence de l'eau

Nous avons vu précédemment, que l'eau intervenait dans les réactions catalysées par la CALB, comme substrat (réaction d'hydrolyse) ou comme produit (réaction d'estérification et d'amidification). Par ailleurs, l'eau est également un solvant polaire très utilisé, il est donc important de connaître précisément son influence sur la CALB et son énantiosélectivité. C'est pourquoi, l'influence de l'eau sur l'énantiosélectivité des enzymes a beaucoup été étudiée depuis le début des années 90.

L'eau est une petite molécule avec des propriétés très particulières en comparaison d'autres composés de masses molaires voisines (acide sulfurique, ammoniac et méthane) : elle est la seule à être sous forme liquide dans la gamme de température du monde vivant (0 à +100°C) ; elle a un point d'ébullition élevé et une chaleur de vaporisation importante. Ces caractéristiques sont liées à sa capacité à former 4 liaisons hydrogène (2 avec l'oxygène et une avec chaque hydrogène) avec d'autres molécules d'eau suivant un tétraèdre parfait, induisant une grande organisation des molécules entre elles. Ainsi, de par son moment dipolaire et les liaisons hydrogène qu'elle peut former, l'eau possède une constante diélectrique importante (78,5) et une tension de surface très élevée (72 dynes/cm) qui en font un solvant polaire exceptionnel. D'autre part, outre sa capacité à former des liaisons hydrogène, l'eau peut établir des interactions dipôle-dipôle, elle intervient dans la définition de liaisons de faible énergie, comme par exemple les forces de Van der Waals, et en s'ionisant, elle peut participer à des interactions ioniques. Par sa capacité à être impliquée dans des interactions très variées,

l'eau est d'une importance capitale pour l'organisation tridimensionnelle des macromolécules, et plus particulièrement pour les enzymes, dont les activités catalytiques sont étroitement liées à la structure. L'eau liée aux protéines est essentielle pour la catalyse et sert de lubrifiant pour l'enzyme (Zacks et Klibanov, 1988). En effet, l'eau, en fonction de sa disponibilité pour l'enzyme, semble influencer la flexibilité de ces dernières (Simon et coll., 1998). En revanche, les enzymes parfaitement sèches sont inactives et les enzymes dans les solvants organiques à forte teneur en eau présentent une dénaturation (Griebenow et Klibanov, 1996). L'étude de l'influence de l'eau sur l'activité de la CALB lors de l'acylation du pentan-2-ol et de l'hexan-3-ol montre bien que l'eau agit comme un lubrifiant. En effet, l'activité enzymatique augmente dans la gamme de valeurs d'activité thermodynamique de l'eau, a_w allant de proche de 0 à 0,02. Pour tous les alcools secondaires étudiés, l'activité de la réaction d'acylation a diminué lorsque l' a_w continue d'augmenter, suggérant que l'eau agit comme un nucléophile compétitif des alcools (Léonard-Nevers et coll., 2009) (figure 13).

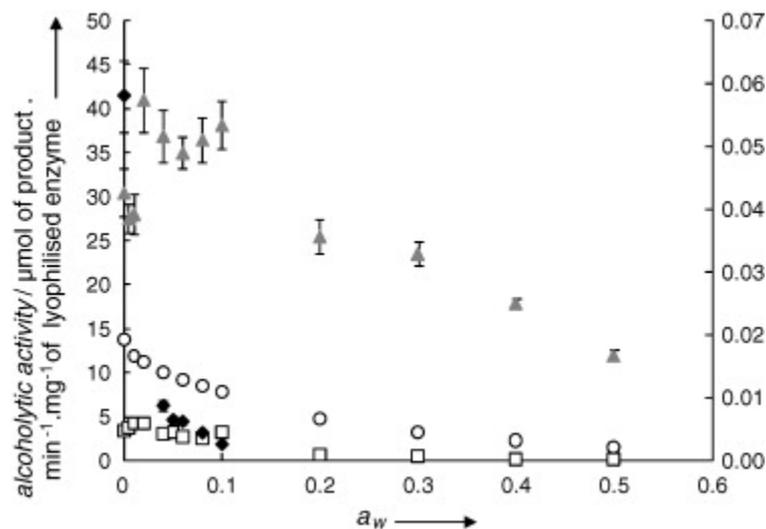


Figure 13 : Influence de l'activité thermodynamique de l'eau, a_w , sur l'activité acyltransférase de la CALB avec le méthyl propionate en tant que donneur d'acyle et les accepteurs d'acyle suivants : pentan-2-ol (▲), butan-2-ol (○), hexan-3-ol (□) et octan-4-ol (◆). L'échelle sur la droite de la figure concerne l'octan-4-ol. Les barres d'erreur sont trop petites pour être visibles à l'exception du pentan-2-ol. (Léonard-Nevers et coll., 2009).

Les résultats de l'influence de l'eau sur l'énantiosélectivité sur la CALB sont très variables : des effets positifs, négatifs et nuls ont été observés.

Une augmentation de l'énantiosélectivité a été observée lors de la résolution du (\pm)-1-phénoxypropan-2-ol (schéma 17 A) par transestérification catalysée par la CALB immobilisée dans l'hexane lorsque l' a_w s'accroît : $a_w = 0$ ($E = 4$) ; 0,65 ($E = 21$) ; 0,85 ($E = 48$). Parallèlement une diminution de la vitesse a été observée (Anthonsen et Hoff, 1998).

Certains auteurs ont montré que l'énantiosélectivité diminuait quand l' a_w augmente (de a_w proche de 0 à 0,85) lors de la résolution du (\pm)-seudenol (3-méthylcyclohex-2-en-1-ol) (schéma 17 B) par transestérification avec le vinyl acétate dans divers solvants organiques (Orrenius et coll., 1995a). Le même comportement a été reporté par Ducret et coll. pour l'estérification de l'ibuprofène (acide 2-(4-*iso*-butylphényl)propanoïque) (schéma 17 C) dans plusieurs solvants organiques, (dans une gamme d' a_w variant de 0,04 à 0,8) (Ducret et coll., 1998).

Cependant, d'autres auteurs ont trouvé que lors de l'estérification de l'ibuprofène (schéma 17 C) dans des milieux sans solvant l'énantiosélectivité de la CALB n'était pas significativement influencée par l' a_w (Pepin et Lortie, 1999). L'absence de l'influence de l' a_w sur l'énantiosélectivité de la CALB a également été observée lors de la catalyse de l'estérification d'alcools secondaires avec de l'acide décanoïque dans divers milieux organiques (de $a_w = 0,06$ à $a_w = 0,97$) (Wehtje et coll., 1997) et pour l'estérification de l'acide phénylpropanoïque (schéma 17 D) avec de l'heptan-1-ol dans de l'hexane (Persson et coll., 2002).

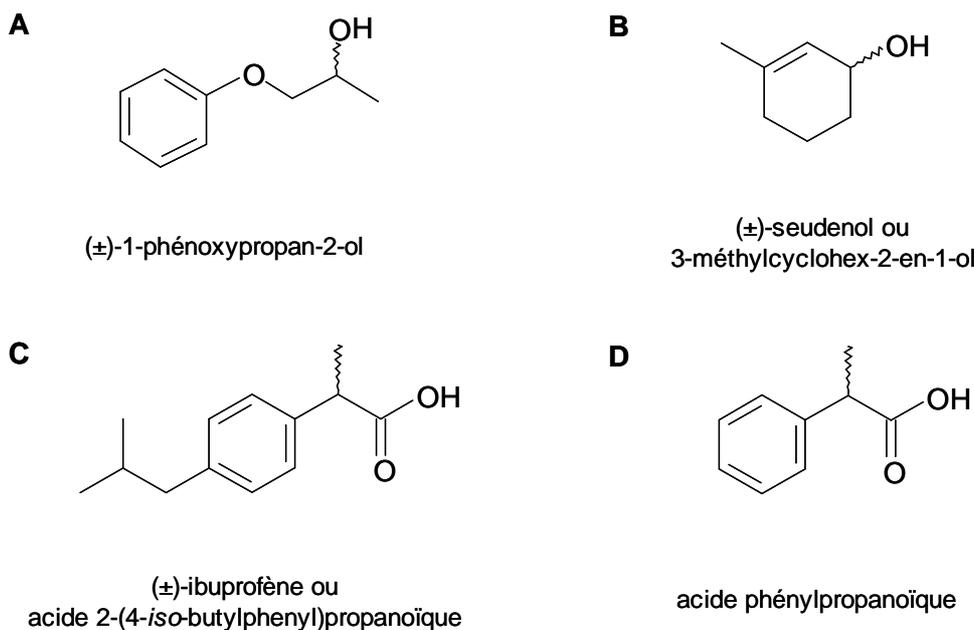


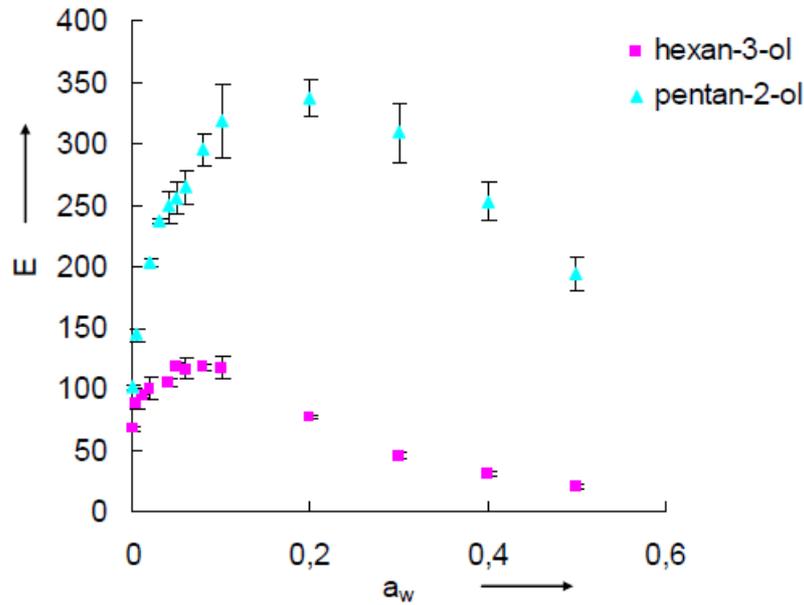
Schéma 17 : Structure de quelques alcool et esters utilisés lors de l'étude de l'influence de l'eau sur l'énantiosélectivité de la CALB : A. (±)-1-phénoxypropan-2-ol (Anthonsen et Hoff, 1998) ; B. (±)-seudenol (Orrenius et coll., 1995a) ; C. (±)-ibuprofène (Ducret et coll., 1998 ; (Pepin P et Lortie R 1999) ; D. acide phénylpropanoïque (Persson et coll., 2002).

L'étude en milieu gazeux de la résolution du pentan-2-ol et de l'hexan-3-ol avec le méthyl propionate comme donneur d'acyle catalysée par la CALB immobilisée montre une augmentation de E avec l' a_w (de a_w proche de 0 à $a_w = 0,05$ pour l'hexan-3-ol et de a_w proche de 0 à $a_w = 0,1$ pour le pentan-2-ol), puis une phase de stagnation de E (de $a_w = 0,05$ à $a_w = 0,1$ pour l'hexan-3-ol et de $a_w = 0,1$ à $a_w = 0,3$ pour le pentan-2-ol), et une diminution de l'énantiosélectivité pour des valeurs d' a_w supérieures (de $a_w = 0,1$ à $a_w = 0,5$ pour l'hexan-3-ol et de $a_w = 0,3$ à $a_w = 0,5$ pour le pentan-2-ol) (Léonard, 2007) (figure 14 A). Dans le cas du butan-2-ol, une augmentation légère avec l' a_w a été constatée, et pour l'octan-4-ol, c'est globalement l'inverse qui a été observé : E reste constant de a_w proche de 0 à $a_w = 0,3$ puis diminue avec l' a_w jusqu'à $a_w = 0,5$ (Léonard, 2007) (figure 14 B).

Il a été suggéré que l'eau à faible a_w avait un rôle d'inhibiteur énantiosélectif, pour la résolution du pentan-2-ol et de l'hexan-3-ol (pour des a_w inférieures à 0,1 et à 0,05 respectivement). En effet, une molécule d'eau placée dans la petite poche stéréospécifique diminuerait d'avantage son volume, gênant ainsi la fixation de l'énantiomère lentement transformé, ce qui conduit à une augmentation de E (Léonard et coll., 2007 ; Léonard-Nevers et coll., 2009). Pour des activités en eau supérieures à 0,1, la diminution de

l'énantiosélectivité pourrait être expliquée par des effets entropiques défavorisant de l'eau (Léonard-Nevers et coll., 2009).

A.



B.

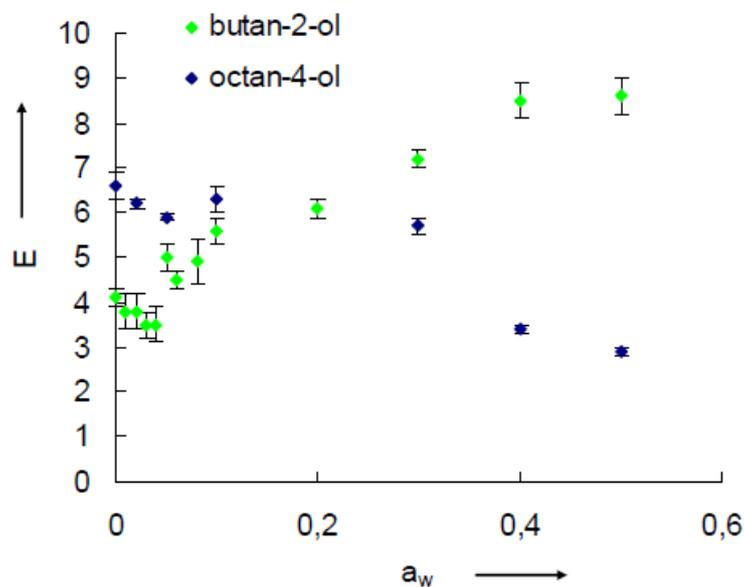


Figure 14 : Influence de l'activité thermodynamique de l'eau (a_w) sur l'énantiosélectivité de la CALB pour l'acylation du pentan-2-ol et de l'hexan-3-ol (A) et du butan-2-ol et de l'octan-4-ol (B) avec le méthyl propionate comme donneur d'acyle à 318K (Léonard, 2007).

Pour conclure, il apparaît qu'aucune loi générale de l'influence de l' a_w sur l'énantiosélectivité de la CALB ne peut être établie actuellement. Nous avons observé, que l'eau, en plus d'être un substrat, un produit ou un solvant de la réaction, en fonction de sa disponibilité pour l'enzyme, peut agir comme un lubrifiant et augmenter l'activité enzymatique, comme un second substrat et comme un inhibiteur compétitif et énantiosélectif. Ainsi, le rôle de l'eau dans la catalyse enzymatique et plus particulièrement dans l'énantiosélectivité des enzymes apparaît donc très complexe. Par ailleurs, les solvants organiques, dans lesquels ont été effectuées la plupart des études citées ci-dessus, peuvent également modifier l'énantiosélectivité des enzymes.

II.3.c Influence du solvant

Nous avons vu que l'eau avait un rôle très important dans l'énantiosélectivité. Afin de pouvoir limiter sa présence dans le milieu réactionnel et de favoriser ainsi les réactions de synthèse, les solvants organiques offrent une bonne alternative. Plus particulièrement, les solvants hydrophobes sont largement utilisés, car l'activité catalytique de la CALB s'y trouve généralement améliorée (Orrenius et coll., 1995a ; Anthonson et Hoff, 1998 ; Ducret et coll., 1998) et l'enzyme y serait plus stable (Laane et coll., 1987).

Le solvant semble jouer un rôle non négligeable sur l'énantiosélectivité. Notamment, on trouve dans la littérature des tentatives de corrélations entre le ratio énantiomérique E et certaines caractéristiques des solvants en particulier avec :

- la polarité du solvant mesurée à l'aide du log P défini comme le coefficient de partition du solvant entre l'octanol et l'eau (tableau 3) ;
- le moment dipolaire et la constante diélectrique du solvant ;
- la taille de la molécule de solvant mesurée par son rayon de Van der Waals.

Tableau 3 : Log P de solvants organiques couramment utilisés en biocatalyse. (Anthonsen et Jongejan, 1997).

Diméthylsulfoxyde	-1,3	Chloroforme	2,0
Dioxane	-1,1	Benzène	2,0
N, N-diméthylformamide	-1,0	Toluène	2,5
Méthanol	-0,76	Dibutyléther	2,9
Acétonitrile	-0,33	Styrène	3,0
Ethanol	-0,24	Tétrachlorométhane	3,0
Acétone	-0,23	Pentane	3,0
Tetrahydrofurane	0,49	Xylène	3,1
Acétate d'éthyle	0,68	Cyclohexane	3,2
Pyridine	0,71	Hexane	3,5
Diéthylether	0,85	Heptane	4,0
Cyclohexanone	0,96	Décane	5,6
Cyclohexanol	1,5	Hexadécane	8,8

Par exemple, une corrélation entre la constante diélectrique du solvant et le ratio énantiomérique E a été observée par certains auteurs, lors de la résolution du (\pm)-1-phényléthanol par la subtilisine avec du vinyl butyrate. Dans ce cas, l'énantiosélectivité de l'enzyme diminue quand la constante diélectrique du solvant augmente (Fitzpatrick et Klivanov, 1991 ; Carrea et coll., 1995).

Généralement une diminution du ratio énantiomérique E a été observée pour la CALB lorsque le Log P augmente (Morrone et coll., 1995; Wehtje et coll., 1997; Ducret et coll., 1998). Cependant, d'autres études montrent un manque total de corrélation entre ces deux paramètres (Forro et coll., 1998 ; Overbeeke et coll., 2000), ou des courbes en cloche (Orrenius et coll., 1995a).

Ottosson et coll. ont montré que l'énantiosélectivité de la CALB augmente avec la taille du solvant, représentée par son rayon de Van der Waals (Ottosson et coll., 2002b). Cette étude a été effectuée dans différents solvants et en milieu supercritique pour la résolution du 3-méthylbutan-2-ol avec le vinyl octanoate comme donneur d'acyle.

D'autres auteurs n'observent aucune corrélation quel que soit le paramètre étudié (Bovara et coll., 1991 ; Secundo et coll., 1992).

Parfois, en changeant de solvant, il se produit une inversion de l'énantiosélectivité comme par exemple, pour l'estérification de l'acide (\pm)-2-phénoxypropionique avec du butan-1-ol par la lipase de *Candida cylindracea* (Ueji et coll., 1992).

Ainsi, comme pour l' a_w , aucune règle générale n'a encore pu être établie en ce qui concerne l'effet du solvant sur l'énantiosélectivité des enzymes.

Ces solvants organiques souvent polluants sont de plus en plus remplacés par des liquides ioniques. Ce sont des sels qui sont liquides à une température ambiante, très stables et qui peuvent facilement être recyclés, mais leur influence sur l'activité et la sélectivité enzymatique est encore souvent méconnue. Actuellement des recherches sont menées dans notre laboratoire pour développer des liquides ioniques biodégradables qui conviendrait pour une utilisation avec la CALB. Une autre alternative pour remplacer les solvants "classiques" est d'utiliser du propylène carbonate non toxique et biodégradable. Ce solvant a permis de résoudre des alcools secondaires par transestérification catalysée avec la CALB avec une énantiométrie élevée ($E \gg 100$) (Wu et coll., 2008).

II.3.d Influence de la température

La stabilité d'une protéine globulaire correspond à la conservation de la structure tridimensionnelle de la chaîne polypeptidique sous des conditions extrêmes. Les liaisons de faible énergie de type liaison hydrogène, intervenant dans le maintien de la structure tridimensionnelle et la formation du complexe acyl-enzyme, sont favorisées à basse température, mais deviennent plus faibles lorsque la température augmente (Jaenicke, 1991).

Il n'est donc pas étonnant de constater que pour la CALB l'énantiosélectivité, représentée par le ratio énantiomérique (E), au cours de réactions de synthèse, augmente alors que la température diminue, ce qui correspond au cas généralement observé pour les enzymes (Arroyo et Sinisterra, 1994; Avdagic et coll., 1998; Overmeyer et coll., 1999; Secundo et coll., 1999; Overbeeke et coll., 1999; Ottosson et Hult, 2001; Léonard et coll., 2007; Léonard-Nevers et coll., 2009). Cependant, l'inverse a aussi été observé comme par exemple pour l'estérification de l'acide 2-phénylpropionique avec du 1-heptanol (Persson et coll., 2002).

L'existence d'une température de racémisation (T_r), température à laquelle l'énantiosélectivité est nulle, $E = 1$, a été mise en évidence. Cette température est une caractéristique propre au substrat (Pham et Philips, 1990; Philips, 1992; Philips, 1996). Lorsque $T > T_r$, un des énantiomères est favorisé et l'énantiosélectivité augmente avec la température, et quand $T <$

T_r , l'autre énantiomère est favorisé, mais l'énantiosélectivité augmente alors que la température diminue.

L'étude de la variation du ratio énantiomérique (E) en fonction de la température est souvent utilisée pour la détermination des paramètres d'activation thermodynamiques : les différences d'enthalpie d'activation et d'entropie d'activation entre les énantiomères ($\Delta_{R-S}\Delta H^\ddagger$ et $\Delta_{R-S}\Delta S^\ddagger$, respectivement) (Pham et coll., 1989; Phillips, 1992; Phillips, 1996; Overbeeke et coll., 1999 ; Lopez-Serrano et coll., 2001 ; Ottosson et Hult, 2001 ; Léonard et coll., 2007 ; Léonard-Nevers et coll., 2009). Cette méthode sera discutée plus amplement lors des résultats et discussion (§ B.III.).

II.3.e Influence des additifs

L'addition de certains additifs au milieu réactionnel peut avoir une influence bénéfique sur le microenvironnement de l'enzyme et par conséquent permet de moduler la réactivité et/ou la sélectivité de cette dernière. Différents additifs peuvent être utilisés pour parvenir à une réactivité et/ou sélectivité optimale de la CALB, comme par exemple :

- des **amines**, il semblerait qu'elles neutralisent les acides formés lors des réactions parasites et protègent ainsi les lipases de la dénaturation (Theil et coll., 1996 ; Parker et coll., 1998 ; Garcia-Urdiales et coll., 2001) ;
- des **éthers couronnés**, en apportant une protection en milieu acide (Itoh et coll., 1996 ; Itoh et coll., 1997), en changeant la conformation du site actif (Takagi et coll., 1996, Secundo et coll., 2007) ou en modifiant le réseau de liaisons hydrogène (Secundo et coll., 2007) ;
- des **sels**, en permettant de maintenir le niveau d'eau constant dans le milieu (Halling, 1992) ou en neutralisant les acides (Theil, 2000) ;
- des **surfactants**, en améliorant la solubilité des enzymes en milieu organique (Zheng et coll., 2007 ; Thielmann et coll., 2009).

II.4. Influence des mutations sur l'énantiosélectivité de la CALB

Une autre méthode de modification de l'énantiosélectivité des enzymes consiste à changer la séquence primaire de la protéine par le remplacement d'un ou plusieurs acides aminés par d'autres acides aminés. En effet, la séquence primaire des acides aminés détermine la structure tridimensionnelle finale de la protéine, la modification de cette séquence peut donc entraîner un changement de la structure finale de l'enzyme et donc de sa fonction, comme par exemple son énantiosélectivité.

Ces modifications peuvent être envisagées de manière rationnelle ou aléatoire. Une récente revue décrit les différentes techniques de mutagenèse utilisées pour le remodelage des lipases (Kourist et coll., 2010). Nous allons présenter certaines de ces techniques et leurs utilisations pour altérer les caractéristiques de la CALB.

II.4.a L'évolution moléculaire dirigée

L'évolution moléculaire dirigée est une méthode aléatoire qui ne nécessite aucun ou seulement peu de connaissances structurales et mécanistiques de la protéine. Elle correspond à toute une série de techniques expérimentales tendant à reproduire l'évolution dans sa diversité naturelle, en un temps accéléré (Otten et Quax, 2005) et elle est susceptible de donner de nombreuses mutations réparties sur toute l'enzyme (Kourist et coll., 2010). Le principe est résumé dans la figure 15 (Jeager et Reetz, 2000 ; Reetz, 2001). La méthode comporte plusieurs cycles de mutagenèse plus ou moins aléatoires à partir du gène de la protéine. A chaque cycle les meilleurs mutants sont sélectionnés pour la propriété recherchée et utilisés comme séquence de départ dans le cycle suivant de mutagenèse. Toute une banque de variants est ainsi constituée.

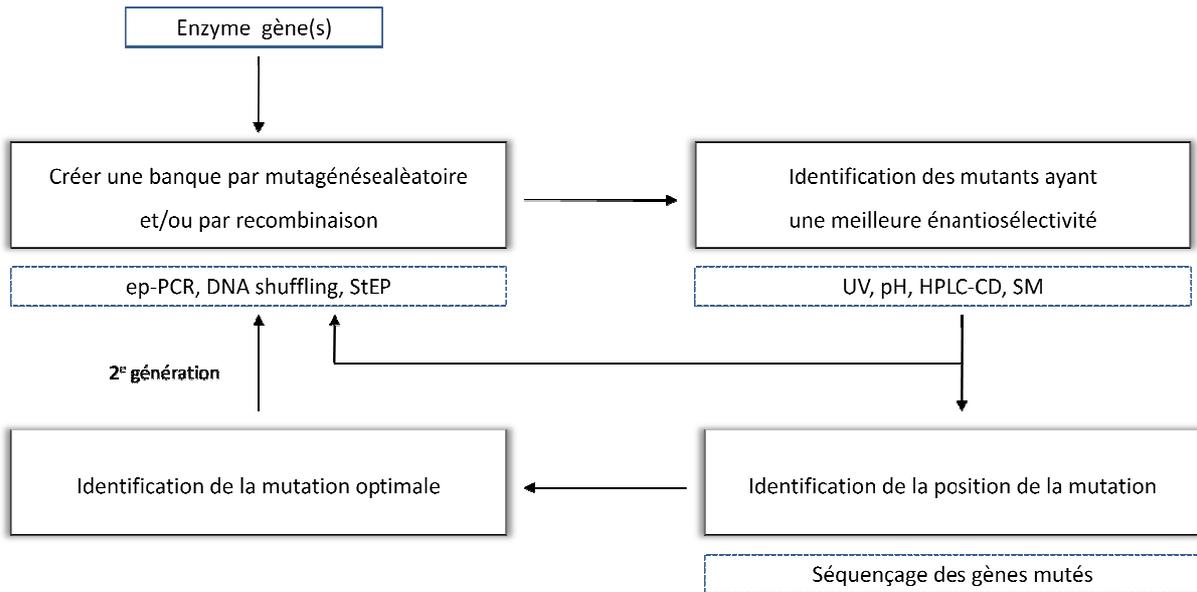


Figure 15 : Stratégie pour la création d'enzymes énantiosélectives par évolution dirigée (d'après Jeager et Reetz, 2000 ; Guieysse, 2002).

➤ La **réaction en chaîne par polymérase d'erreurs** ("error-prone PCR" ou **ep-PCR**), est un procédé dans lequel les conditions de la PCR sont modifiées de manière à introduire des mutations au hasard sur la totalité du gène codant des protéines. Elle est très simple à mettre en œuvre et ne nécessite aucune connaissance de la structure ou du mécanisme enzymatique. Après seulement deux cycles d'ep-PCR, un variant thermostable de la CALB a été identifié, avec une stabilité 20 fois plus élevée après 20 min d'incubation à 70°C, en mesurant l'activité pour la *p*-nitrophényl butyrate à 20°C, que l'enzyme de type sauvage. Les positions des acides aminés 221 et 281 se sont avérées être critiques pour la thermostabilité de la lipase (Zhang et coll., 2003).

➤ La **mutagenèse de saturation simultanée** (Hayashi et coll., 1994) permet d'obtenir des effets synergiques de mutations voisines, qui ne sont généralement pas produites par l'ep-PCR. C'est une stratégie de mutagenèse lors de laquelle on essaie de générer toutes les mutations possibles (ou presque) dans une région réduite, d'un gène. Elle nécessite la synthèse des oligonucléotides couvrant les régions à muter et contenant un assortiment aléatoire de bases erronées. L'effet de mutations simultanées est souvent extrêmement difficile à prévoir par des méthodes rationnelles. Très récemment, des variants de la lipase de *Candida antarctica* A avec une forte énantiosélectivité vis-à-vis de l'acide 2-méthylheptanoïque ont été

générés, alors que l'enzyme de type sauvage avait seulement une faible sélectivité pour ce substrat (Sandström et coll, 2009). Par une technique légèrement modifiée, Sanchis et coll. ont réussi à remplacer deux résidus éloignés de la CALB simultanément par une seule PCR. Ces deux positions, séparées par 171 pb, ont été randomisées avec succès donnant une bibliothèque de haute qualité de mutagenèse de saturation (Sanchis et coll., 2008)

➤ Le **DNA-shuffling** (ou le brassage des fragments de gènes), inventé par Stemmer en 1994 (Stemmer, 1994), consiste en la fragmentation de séquences d'ADN codant pour une protéine déterminée d'organismes différents, puis à rassembler les fragments par une enzyme, l'ADN polymérase. La plus grande avancée technologique résulte du fait que le mélange de multiples séquences parentes d'ADN accélère considérablement l'évolution. Les stratégies de recombinaisons multiparentales permettent l'exploration d'un grand espace séquentiel qui ne serait pas accessible autrement. Cette technique a été utilisée pour les gènes des lipases de *Candida antarctica*, *Hyphozyma* sp. CBS 648.91, et l'organisme thermophile *Cryptococcus tsukubaensis*, dans un but de trouver des enzymes chimériques capables d'hydrolyser le diéthyl 3-(3,4-dichlorophényl)pentanedioate (DDG) prochiral (schéma 18). Les trois parents affichent de faibles activités pour le DDG, mais des ee supérieurs à 99% pour les (S)-isomère monoéthylé (schéma 18). 69 clones (soit environ 2,7%) de la bibliothèque ont été identifiés ayant une activité hydrolytique améliorée du DDG. Cette amélioration des performances catalytiques peut atteindre un facteur de 22, avec rétention d'une forte énantiosélectivité. En outre, la stabilité thermique des clones analysés a été légèrement augmentée par rapport aux parents (Suen et coll., 2004).

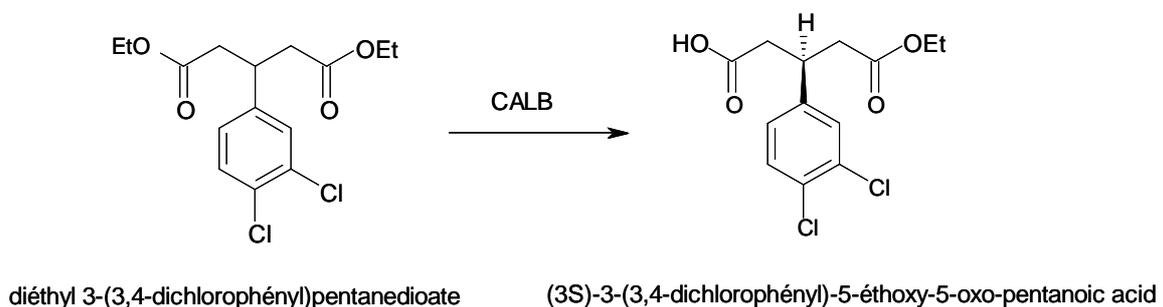


Schéma 18 : hydrolyse de diéthyl 3-(3,4-dichlorophényl)pentanedioate par la CALB (Suen et coll., 2004).

➤ La **permutation circulaire** consiste en un déplacement des extrémités N- et C-terminales de la protéine (figure 16). Cette méthode offre la possibilité de relâcher les contraintes structurales exercées sur le squelette carboné et a été proposée, en vue de permettre ainsi la conversion des substrats volumineux. La distance entre les terminaisons naturelles de l'enzyme est comblée par une séquence d'acides aminés riche en glycine et le gène circulaire ainsi obtenu est clivé à des positions aléatoires à l'aide de la DNase I, une endonucléase non spécifique.

La permutation circulaire a été appliquée récemment pour modifier la CALB (Qian et Lutz, 2005 ; Qian et coll., 2007 ; Qian et coll., 2009). 63 variants de la bibliothèque de l'enzyme avec les extrémités N- et C-terminales modifiées, actives sur la tributyrine (schéma 19 A), ont été isolés et étudiés. Les positions qui ont toléré ces permutations ont été trouvées dans différentes régions de la protéine, non seulement dans les boucles de la surface protéique, mais aussi dans les éléments de structure secondaire et dans la région de fixation de l'alcool dans le site actif. L'effet de la permutation circulaire sur les propriétés catalytiques de l'enzyme a été impressionnant: certains variants ont vu leur l'efficacité catalytique améliorée jusqu'à 170 fois dans l'hydrolyse du 6,8-difluoro-4-méthylumbelliferyl octanoate (schéma 19 B). La permutation circulaire n'a pas compromis l'énantiosélectivité de l'enzyme (Qian et coll., 2007).

Le variant très actif, le cp283, avec les terminaisons N-terminale et C-terminale correspondant aux positions 283 et 282 de l'enzyme native, a été sélectionné pour l'étude de la boucle nouvellement créée en surface. Des séquences comportant de 2 à 11 acides aminés ont été supprimées (cp283 Δ 2-11) et les plus actives pour l'hydrolyse du *p*-nitrophényl butyrate (schéma 19 C) ont été choisies. La chromatographie d'exclusion a révélé, que, contrairement à l'enzyme de type sauvage et au variant cp283 monomérique, les variants tronqués avait également une forme dimérique, et même trimérique pour cp283 Δ 8. La structure cristallographique du variant cp283 Δ 7 confirme la forme homodimérique. Cette dimérisation est due à la permutation de 35 résidus N-terminaux entre les deux dimères (figure 16). Suite à ces changements structuraux la cavité enzymatique a été élargie, facilitant ainsi le passage des substrats, mais la poche stéréospécifique n'est pas affectée par ces modifications (Qian et coll., 2009).

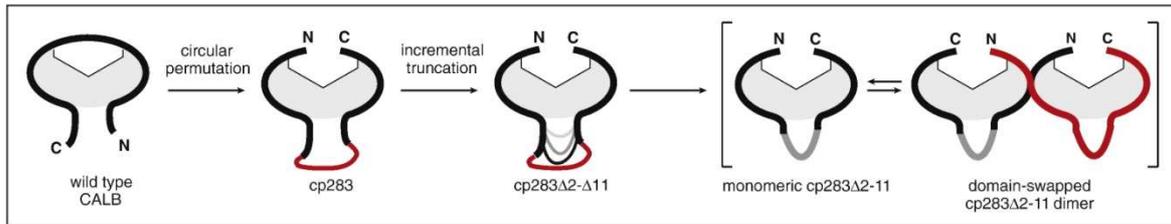


Figure 16 : Aperçu schématique de l'ingénierie de la CALB par permutation circulaire suivie des troncatures supplémentaires de la boucle nouvellement créée en surface dans cp283, le variant le plus actif parmi les permutants de la lipase. Selon l'ampleur de la troncature de la boucle, un changement dans la structure de l'enzyme quaternaire a été observé, passant d'une forme strictement monomérique à un dimère avec un segment de domaine N-terminal échangé.

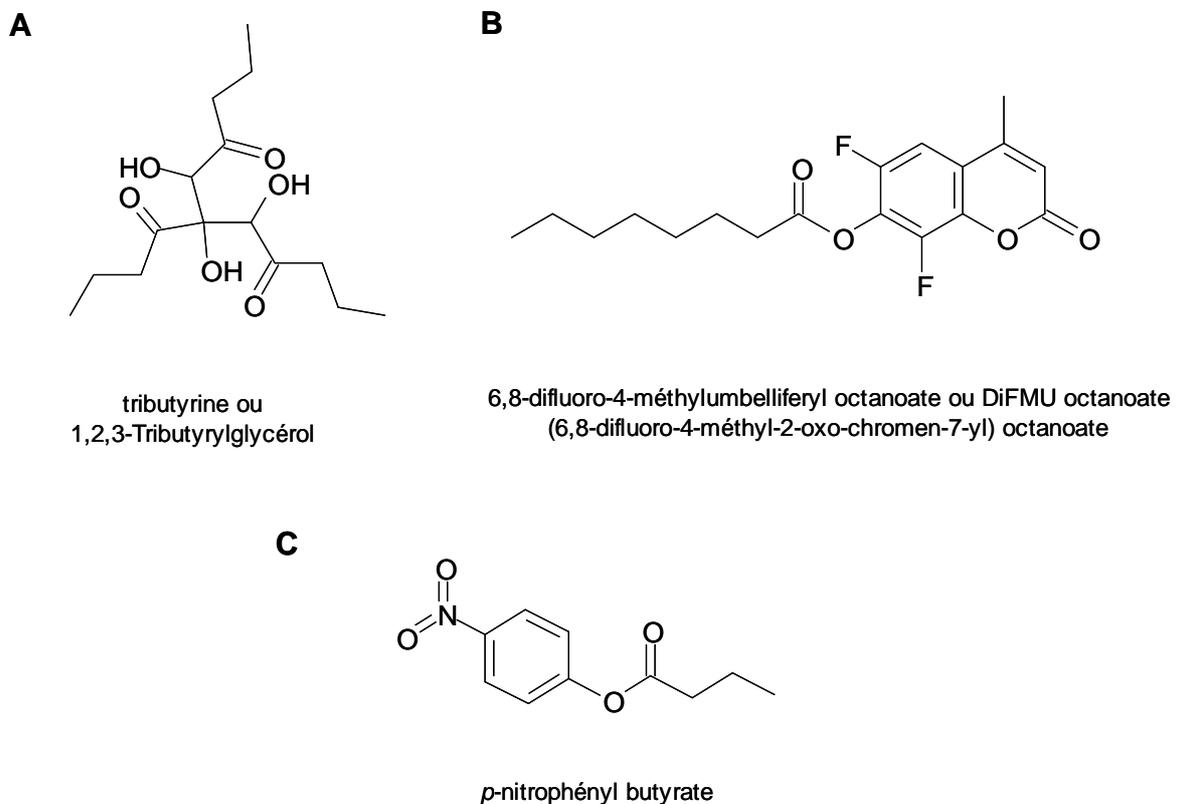


Schéma 19 : Structures des substrats utilisés pour caractériser les variants de la CALB obtenus par permutation circulaire (Qian et coll., 2007 ; Qian et coll., 2009). (A) Structure de la tributyrine. (B) Structure du DiFMU octanoate. (C) *p*-nitrophényl butyrate

II.4.b La mutagenèse dirigée

Dans une expérience de mutagenèse dirigée des paires de bases déterminées dans la séquence d'ADN sont substituées par des paires de bases différentes bien définies. En théorie, cette technique peut être utilisée pour améliorer les propriétés des enzymes, mais cela requiert une connaissance complète et minutieuse de la structure de l'enzyme pour désigner des mutations adéquates, de manière rationnelle. Cette méthode s'est avérée très utile dans l'étude des relations structure-fonction des enzymes. Par exemple la mutation de résidus d'acides aminés supposés très importants pour la catalyse a permis de confirmer leurs fonctions.

Cette stratégie a été utilisée pour obtenir une activité catalytique importante de la CALB pour les réactions d'aldolisation (Branneby et coll., 2003). Suite à des prédictions par des calculs de mécanique quantique, la Ser105 a été ciblée par mutagenèse dirigée pour créer des variants avec la fonction nucléophile absente du site actif. Les expériences ont clairement montré qu'avec le mutant Ser105Ala la vitesse de réaction augmente par rapport à la lipase de type sauvage.

Plusieurs cas de modifications de l'énantiosélectivité de la CALB par mutagenèse dirigée ont été reportés dans la littérature. Par exemple, Magnusson et coll. ont observé une augmentation du ratio énantiomérique E de 1,6 à 22 pour l'hydrolyse de l'éthyl 2-hydroxypropionate pour le mutant Thr40Val (Magnusson et coll., 2001).

Les travaux de Rotticci et coll. sont également un bon exemple d'amélioration de l'énantiosélectivité par mutagenèse dirigée pour la CALB (Rotticci, 2000; Rotticci et coll., 2001b). En effet, la CALB présente une faible énantiosélectivité pour les halohydrines à longues chaînes telles que le 1-chloro- et le 1-bromoocetan-2-ol (schéma 20) (Rotticci et coll. 1997). Les mêmes auteurs ont suggéré que cela pouvait être dû aux interactions peu favorables existant entre l'atome d'halogène et la poche stéréospécifique. Intuitivement, il semblait que l'atome de brome (ou de chlore) pouvait être repoussé par les groupes hydroxyle électronégatifs portés par la Thr42 et la Ser47 de la poche stéréospécifique de la CALB. Ainsi, si ces groupements hydroxyle étaient remplacés par des atomes hydrogènes, ces interactions électrostatiques seraient modifiées et l'affinité pour les substituants halogénés de la poche stéréospécifique serait augmentée. En mutant le résidu Thr42 en valine et la Ser 47 en alanine, ils ont obtenus 2 mutants simples Thr42Val et Ser47Ala. Le mutant double Thr42ValSer47Ala a également été produit. Les énantiosélectivités mesurées avec ces

mutants ont confirmé leur hypothèse (schéma 20). En effet, l'énantiosélectivité obtenue pour le mutant Ser47Ala est 2 fois plus importante que pour l'enzyme de type sauvage. L'énantiosélectivité obtenue pour le double mutant Thr42ValSer47Ala est plus importante que pour l'enzyme de type sauvage mais moins élevée que pour le mutant simple Ser47Ala. Enfin, la mutation Thr42Val n'a pas d'influence sur l'énantiosélectivité. Ceci suggère que seule la sérine 47 est importante pour l'énantiosélectivité dans ce cas.

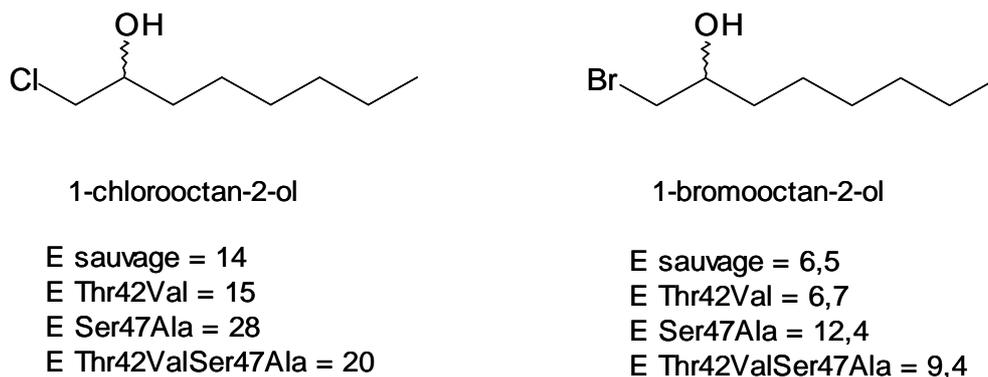


Schéma 20 : Structures des alcools halogénés et valeurs de E obtenues avec la CALB sauvage et ses variants Thr42Val, Ser47Ala et Thr42ValSer47Ala (d'après Rotticci et coll., 2001b)

Par ailleurs, l'énantiosélectivité de la lipase a pu être complètement inversée en utilisant la technique de mutagenèse dirigée. L'échange d'un seul acide aminé de la CALB à proximité du site actif a été suffisant pour créer cet effet (Magnusson et coll., 2005, Vallin et coll., 2010). Les contraintes stériques limitant la gamme des alcools qui peuvent être résolus avec cette enzyme ont été modifiées en augmentant la taille de la poche stéréospécifique par la mutation Trp104Ala. L'enzyme mutée a une bonne activité et énantiosélectivité envers les alcools secondaires encombrants, comme les 1-phénylalkanols. Contrairement à l'enzyme sauvage qui a une énantio-préférence pour la forme *R*, ce mutant préfère l'énantiomère *S* et les substrats avec de longues chaînes alkyles sont mieux résolus, avec des valeurs de E supérieures à 100.

Nous avons vu qu'il existe une multitude de stratégies différentes pour améliorer les enzymes. Ces différentes techniques sont représentées sur la figure 17. Même si les deux méthodes, aléatoire ou dirigée, peuvent atteindre le même objectif, le résultat dépend toujours du choix de la méthode: la mutagenèse aléatoire est susceptible de donner de nombreuses mutations réparties sur l'enzyme, où chaque mutation ponctuelle apporte une petite contribution au

résultat global ; en revanche, la conception rationnelle des protéines donne par défaut des variants avec très peu d'acides aminés mutés (Kourist et coll., 2010). Les propriétés intrinsèques, tels que la stabilité d'une enzyme dans les conditions réactionnels, sont difficiles à expliquer ou à prévoir, ce qui rend souvent la mutagenèse aléatoire la méthode la plus appropriée. Récemment, il a été démontré que l'approche semi-rationnelle peut être très efficace dans les cas où les acides aminés essentiels qui régissent la propriété d'intérêt sont connus (Reetz et coll., 2006). Pour l'amélioration d'une propriété catalytique telle que la sélectivité des enzymes, des mutations subtiles à proximité de la machine catalytique ont démontré qu'elles donnaient le meilleur effet (Morley et Kazlauskas, 2005). La structure et le mécanisme de la CALB étant très bien connus, la technique de mutagenèse dirigée semble la plus adaptée pour modifier son énantiosélectivité.

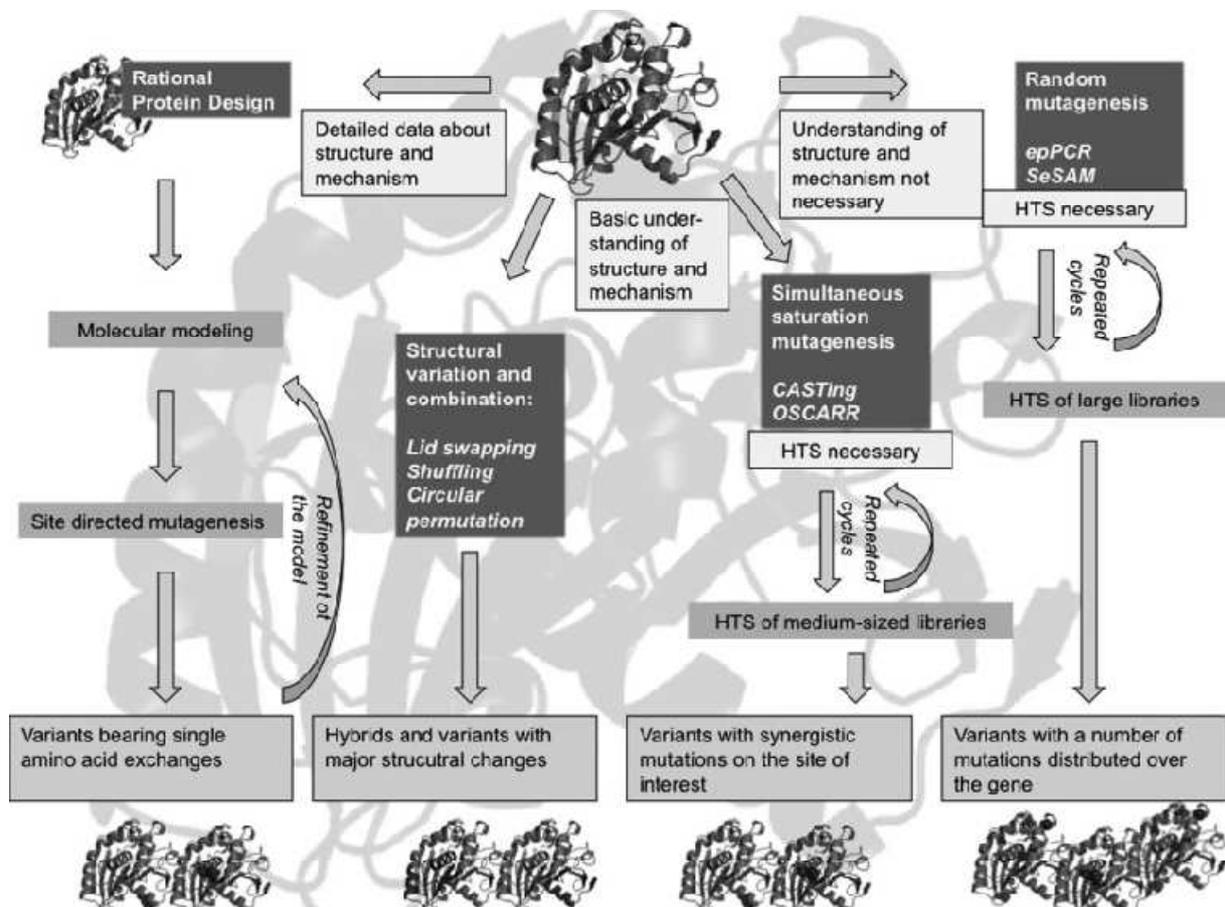


Figure 17 : Le choix de la méthode appropriée pour la conception de protéines de lipases est une décision au cas par cas et doit être effectué sur la base de la qualité des informations structurales et mécanistiques disponibles et la faisabilité d'un système de criblage/sélection à haut débit (HTS). Souvent, un problème peut être résolu par plusieurs méthodes, néanmoins, le résultat est quelque part prédéterminé par la méthode choisie (Kourist et coll., 2010).

III. Etude des enzymes en milieux gazeux

Dans le paragraphe précédent nous avons vu que l'eau avait une importance capitale dans l'énantiosélectivité des lipases. En milieu conventionnel, la forte concentration en eau (55M) impose à la réaction le sens de l'hydrolyse. En travaillant en milieu non conventionnel, l'eau est éliminée des réactions ou possède une concentration comparable à celles des autres composés. Dans ces conditions, les lipases peuvent avoir une activité inverse et de catalyser des réactions de synthèse. Néanmoins, l'eau étant indispensable pour le maintien de la conformation active et la flexibilité des enzymes, et ainsi à la catalyse, elle ne peut pas être complètement éliminée du milieu réactionnel (Trodler et Pleiss, 2008).

En milieu non conventionnel, la disponibilité de l'eau est généralement définie par son activité thermodynamique (a_w). A l'équilibre, l'utilisation de ce seul paramètre, l' a_w , permet de définir précisément l'état d'hydratation de toutes les composantes d'un système. La figure 18 illustre l'équilibre pouvant exister entre les différents états de l'eau et les différentes phases d'un milieu complexe (Halling, 1994).

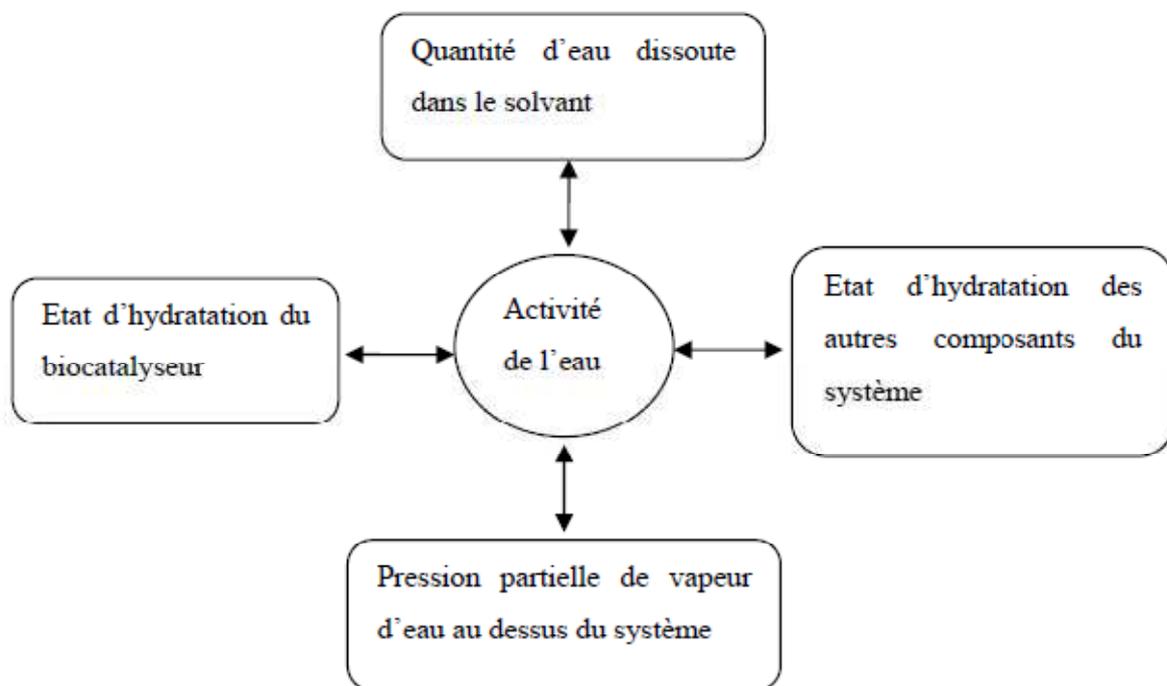


Figure 18 : L'activité de l'eau définit l'équilibre entre les différentes phases et les différents états d'un système, (Halling, 1994).

Une façon simple de définir l'activité thermodynamique de l'eau (a_w) consiste à utiliser la pression de vapeur d'eau de la phase gazeuse en équilibre avec le système considéré. On peut alors écrire :

$$a_w = \frac{pp_{H_2O}}{pp_{H_2O,sat}} \quad (\text{Eq. 11})$$

Où pp_{H_2O} est la pression partielle de l'eau au-dessus du système et $pp_{H_2O,sat}$ la pression partielle dite de référence mesurée à la même température au-dessus de l'eau pure. L' a_w d'un système est donc tributaire de grandeurs physiques caractérisant un système telles que la pression absolue et la température.

La disponibilité de l'eau est parfois définie par le taux d'humidité relative (HR) à l'équilibre égal à :

$$\text{HR (\%)} = a_w \cdot 100 \quad (\text{Eq. 12})$$

a_w et HR sont bornées et toujours comprises entre 0 et 1 ou 0 et 100% respectivement.

Les milieux non conventionnels recouvrent une grande diversité de milieux réactionnels qui peuvent être liquides, gazeux, supercritiques ou encore solides.

Nous avons choisi de travailler en milieux gazeux, ce qui permet de s'affranchir de l'utilisation des solvants, qui peuvent également influencer l'énantiosélectivité des enzymes. Les enzymes sont sous forme solide, alors que les substrats, les produits et autres composés éventuellement ajoutés sont à l'état gazeux. Par ailleurs, les transferts de masse sont plus efficaces en phase gazeuse du fait de la faible viscosité et de la forte diffusivité des gaz par rapport aux liquides. La disponibilité des composés pouvant être parfaitement contrôlée, ce type de milieu facilite donc l'étude de l'influence de chaque paramètre réactionnel sur la catalyse. A cet effet, le réacteur solide/gaz a été développé.

Les systèmes gazeux peuvent également être utilisés pour la détermination de l'état d'hydratation des enzymes soit directement, à partir des isothermes d'adsorption d'eau, soit indirectement, à partir de l'étude d'adsorption de différents composés polaires ou apolaires à l'aide de la chromatographie en phase gazeuse inverse (IGC). Dans cette partie nous allons présenter le réacteur solide/gaz, outil performant pour l'étude des paramètres réactionnels, décrire les isothermes de sorption et enfin expliquer le fonctionnement de la chromatographie en phase gazeuse inverse (IGC).

III.1. Le réacteur solide/gaz en flux continu

Le réacteur solide/gaz est un bioréacteur constitué de deux phases. Comme son nom l'indique, ce système comprend une phase solide, le biocatalyseur utilisé sous la forme d'un lit fixe, et une phase gaz constituée des substrats, et éventuellement autres composés, vaporisés et transportés par le gaz vecteur inerte jusqu'à l'enzyme. C'est un système sous flux continu, ainsi les produits sont éliminés au fur et à mesure de leurs formations, limitant ainsi la réaction inverse.

III.1.a Avantages de la biocatalyse solide/gaz

L'utilisation de substrats et de produits sous forme gazeuse présente de nombreux avantages, dont certains ne peuvent pas être obtenus avec les autres systèmes en milieu non conventionnel (Lamare et Legoy, 1995 ; Lamare et coll., 2002) :

- l'enzyme, sous forme solide, n'a pas forcément besoin d'être immobilisée pour être facilement récupérée puisque la phase gazeuse traverse le lit catalytique sans risque de solubilisation de l'enzyme ;
- il est possible de travailler uniquement avec les substrats, sans autre composé que le gaz vecteur, ainsi, seuls les substrats et les produits sont présents dans le microenvironnement de l'enzyme ;
- la disponibilité des substrats est parfaitement contrôlée ;
- il n'y a plus de problèmes de solubilité des substrats et des produits ;
- aucun solvant organique n'étant utilisé, le produit final ne contient pas de résidu de solvant qui pourrait être toxique ;
- le milieu réactionnel n'est pas dilué par l'utilisation d'un solvant, de ce fait le traitement aval pour la purification du produit est facilité et le volume à traiter est minimisé ;
- les enzymes et les substrats sont dans un système où l'activité de l'eau est contrôlée ;
- les enzymes déshydratées étant généralement plus résistantes à la thermoinactivation, les catalyses peuvent être réalisées à des températures supérieures à celles utilisées en milieu aqueux ;

- la formation et le maintien d'une phase gazeuse impliquent de travailler à des températures élevées, ainsi les risques de contamination microbienne au sein du réacteur sont limités (si le biocatalyseur est thermostable) ;
- les transferts de masse sont plus efficaces en phase gazeuse du fait de la faible viscosité et de la forte diffusivité des gaz par rapport aux liquides ;
- la phase gazeuse est homogène ;
- ce procédé étant basé sur la circulation d'une phase gazeuse, le dimensionnement à plus grande échelle est facilité.

L'activité thermodynamique a été reconnue comme étant le paramètre de choix pour quantifier les substrats et l'eau dans les milieux non conventionnels utilisés en biocatalyse (Straathof et coll., 1992). L'activité thermodynamique de chaque composé présent dans la phase gazeuse peut être calculée, fixée et contrôlée de façon indépendante, ce qui est un avantage primordial du bioréacteur solide/gaz par rapport aux autres milieux non conventionnels.

Par contre, le principal inconvénient de ce type de milieu réside dans le fait que les substrats et les produits doivent être vaporisables à des températures modérées (à cause de la thermostabilité limitée du biocatalyseur). Ainsi le nombre de substrats utilisable est limité. Travailler à des très basses pressions permettrait de vaporiser des composés avec des points d'ébullition élevés (250-300°C) (Lamare et Legoy, 1995), mais les sucres par exemple ne peuvent pas être utilisés car ils passent difficilement en phase vapeur en-dessous de 400°C à pression atmosphérique du fait des liaisons hydrogène difficiles à rompre qu'ils peuvent établir.

III.1.b Principe de fonctionnement d'un réacteur solide/gaz en flux continu

Une représentation schématique du réacteur solide/gaz utilisé en laboratoire est proposée figure 19.

Le réacteur se compose de deux étuves thermostatées :

La première permet l'évaporation des substrats et des composés non réactants éventuellement ajoutés. Ceux-ci sont placés dans des flacons de saturation (X, Y, Z). Un gaz vecteur inerte (dans notre cas de l'azote (N₂)) est mis à buller dans les fioles sous un débit contrôlé afin que, pour chaque composé, se crée un équilibre entre la phase liquide et la phase vapeur. Les

différents gaz provenant des différentes fioles sont ensuite mélangés dans une chambre de mélange (M) et dirigés vers la seconde étuve. Une quantité donnée de gaz vecteur peut également être ajoutée au mélange pour imposer un certain débit total de gaz dans le réacteur.

La seconde étuve contient le bioréacteur catalytique proprement dit. L'enzyme ou les cellules entières lyophilisées sont maintenues dans un tube en verre (d'environ 9 cm de long avec des diamètres interne et externe de 4 mm et 6 mm respectivement) par de la laine de roche. Le mélange gazeux composé des substrats, des autres composés éventuellement ajoutés et du gaz vecteur traverse le bioréacteur et entre en contact avec l'enzyme ou les cellules entières.

Les gaz sortant du bioréacteur et contenant les substrats résiduels et les produits sont ensuite acheminés vers d'autres appareillages (comme une chromatographie gazeuse par exemple) pour être analysés. La pression dans le réacteur et les températures de chaque étuve sont fixées et contrôlées de manière très précise.

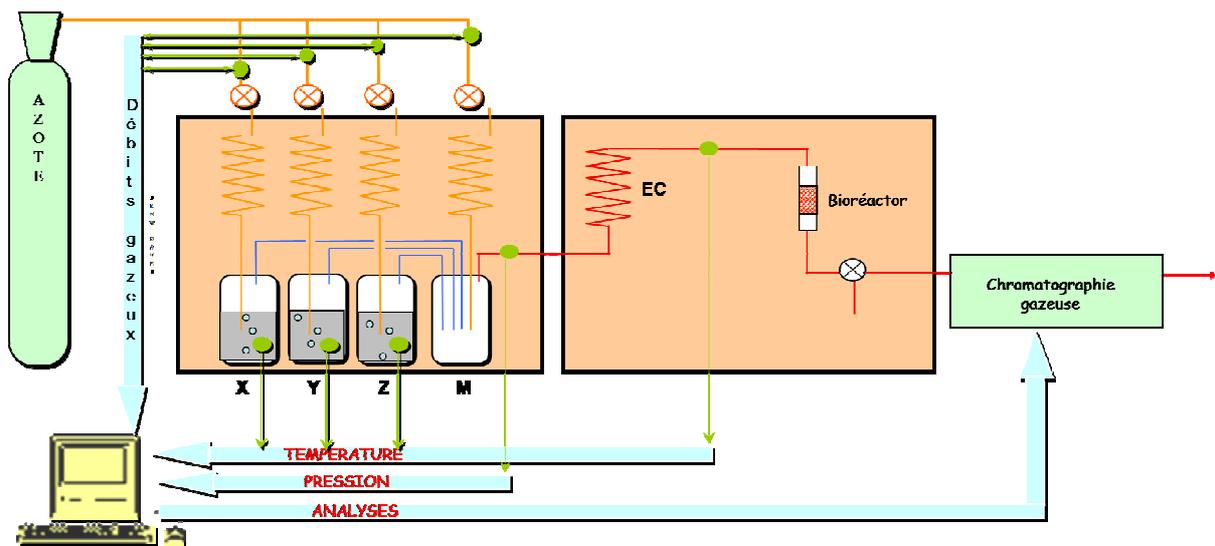


Figure 19 : Représentation schématique d'un bioréacteur solide/gaz avec un évaporateur fonctionnant par bullage.

X, Y, Z : flacons de saturation, M : chambre de mélange, EC : échangeur de chaleur pour mise en température de gaz (d'après Lamare et Legoy, 1995).

III.1.c Calcul des activités thermodynamiques

On peut supposer, qu'un gaz vecteur, après avoir bullé dans une solution de substrat à une température contrôlée, pendant un temps suffisant, est en équilibre avec la phase liquide. Ainsi, la pression partielle du substrat dans le gaz quittant le flacon de saturation est égale à la

pression de vapeur qui correspond à la pression de saturation ($P_{p,sat}$) au-dessus du composé pur à une température donnée. Pour pouvoir calculer la composition du gaz, le débit molaire de chaque composé doit être connu (gaz vecteur (N_2), substrats, autre composé ajouté). Le débit molaire du gaz vecteur (N_2) dans chaque ligne $Q_{N_2}^n$ peut être calculé selon l'équation suivante lorsque les débits molaires normalisés (Q_{V,N_2}^n normalisé ($L.h^{-1}$ à 273,15 K, 1 atm)) du gaz vecteur utilisé pour la saturation sont connus.

$$Q_{N_2}^n = \frac{Q_{V,N_2}^n \text{ normalisé}}{RT} \quad (\text{mol.h}^{-1} \text{ pour } T = 273,15) \quad (\text{Eq. 13})$$

Ainsi, lorsque le débit molaire du gaz vecteur est connu, il est possible de calculer les différents débits molaires Q_x^n à la sortie des flacons de saturation en utilisant l'équation 14 suivante, qui fait intervenir la pression de saturation ($P_{p,sat}$) déterminée pour un composé et une température donnée (P_a est la pression atmosphérique en atm).

$$Q_x^n = Q_{N_2}^n \cdot \frac{P_{p_x,sat}^n}{P_a - P_{p_x,sat}^n} \quad (\text{mol.h}^{-1}) \quad (\text{Eq. 14})$$

Après le mélange des gaz provenant des différentes lignes, la pression partielle de chaque composé $P_{p_x}^n$ dans le gaz entrant dans la 2^{ème} étuve est déterminée à l'aide de l'équation suivante (équation 15):

$$P_{p_x}^n = \frac{Q_x^n}{\sum_1^n (Q_{N_2}^n + Q_x^n)} \cdot P_a \quad (\text{atm}) \quad (\text{Eq. 15})$$

Puis, l'activité thermodynamique de chaque composé a_x peut être déduite à l'aide de l'équation 16 faisant intervenir la pression de saturation correspondant au composé à la température choisie.

$$a_x = \frac{P_{p_x}^n}{P_{p_x,sat}^n} \quad (\text{sans dimension}) \quad (\text{Eq. 16})$$

En admettant que les conditions appliquées sont éloignées de la température et de la pression critiques pour chaque composé, et en appliquant la loi des gaz parfaits $PV = nRT$ (coefficient de fugacité = 1), le débit volumique total et le temps de séjour dans le réacteur peuvent être estimés (à T = température du bioréacteur en K) :

$$Q_{V,total} = \frac{RT \sum_{i=1}^n (Q_{N_2}^n + Q_x^n)}{P_a} \quad (\text{L.h}^{-1}) \quad (\text{Eq. 17})$$

III.1.d Applications

Depuis les années 80, les études portant sur des biocatalyses pour lesquelles les substrats et les produits sont sous forme gazeuse sont apparues. Ces systèmes biocatalytiques mettent en jeu soit des enzymes isolées, soit des cellules entières pour des réactions à une ou plusieurs étapes. Différentes enzymes isolées ont été testées avec succès comme par exemple la déshydrogénase de foie de cheval (Pulvin et coll., 1986), la déshydrogénase de *Sulfolobus solfataricus* (Pulvin et coll., 1989), l'alcool oxydase de *Pischia pastoris* (Barzana et coll., 1987; Barzana et coll., 1989), l'alcool déshydrogénase de levure de boulanger (Yang et Russell, 1996), l'alcool déshydrogénase de *Thermoanaerobacter sp.* (Trivedi et coll., 2006a), l'alcool déshydrogénase de *Lactobacillus brevis* (Trivedi et coll., 2006b ; Dimoula et coll., 2009), la benzaldéhyde lyase de *Pseudomonas fluorescens* (Mikolajek et coll., 2007), la benzoylformate décarboxylase de *Pseudomonas putida* (Mikolajek et coll., 2007) ; la kéto-reductase (Nagayama et coll., 2010) et des enzymes lypolytiques (Parvaresh et coll., 1992 ; Robert et coll., 1992 ; Lamare et Legoy, 1995 ; Lamare et Legoy, 1997 ; Lamare et Legoy, 1999).

Depuis le début des années 1990, l'utilisation de cellules entières dans des systèmes solide-gaz a été reportée, comme par exemple pour des cellules entières de *Methylocystis sp* (Uchiyama et coll., 1992), *Pseudomonas putida* (Zilli et coll., 1992), *Saccharomyces cerevisiae* (Goubet et coll., 2002), *Rhodococcus erythropolis* (Erable et coll., 2005, Marchand et coll., 2008) ou *Escherichia coli* déshydraté (Marchand et coll., 2009a ; 2009b). Ces travaux concernent principalement la dépollution de gaz contenant des composés organiques volatils (COV).

La lipase B de *Candida antarctica* est également très étudiée en réacteur solide/gaz. Les paramètres cinétiques de la réaction d'alcoolyse du méthyl propionate avec le *n*-propanol ont pu être déterminés en absence d'eau et de solvant (schéma 21). Ces résultats ont permis de confirmer que le mécanisme réactionnel de la CALB restait inchangé en phase gazeuse : Bi-Bi Ping-Pong avec inhibition compétitive de l'alcool produit (Bousquet-Dubouch et coll., 2001). Les expériences réalisées en présence d'eau montrent que l'activité catalytique optimale de la CALB (lors de réaction d'alcoolyse) correspond à une activité thermodynamique en eau, a_w , aux alentours de 0,1. Par ailleurs, il a été montré que l'eau était également un inhibiteur compétitif de l'enzyme, mais cinq fois moins efficace que le *n*-propanol (Bousquet-Dubouch et coll., 2001). Ces expériences ont également permis de

montrer que l'eau n'avait pas d'influence sur l'étape catalytique d'acylation et qu'elle n'intervenait pas dans la formation des états de transition (Graber et coll., 2003a). Les effets des composés organiques, utilisés fréquemment comme solvants en milieu liquide, sur cette réaction d'alcoolyse ont également pu être quantifiés (Létisse et coll., 2003 ; Graber et coll., 2007). Les résultats indiquent que les solvants polaires, tels que le 3-méthylbutan-2-ol, le pentan-2-one et le pentan-3-one, peuvent agir comme des inhibiteurs compétitifs pour la fixation du méthyl propionate (premier substrat), tandis que cette inhibition est absente pour les composés apolaires. Il a été suggéré que cette inhibition pouvait être responsable des variations d'activité observées lors de l'alcoolyse en milieu organique (Graber et coll., 2007)

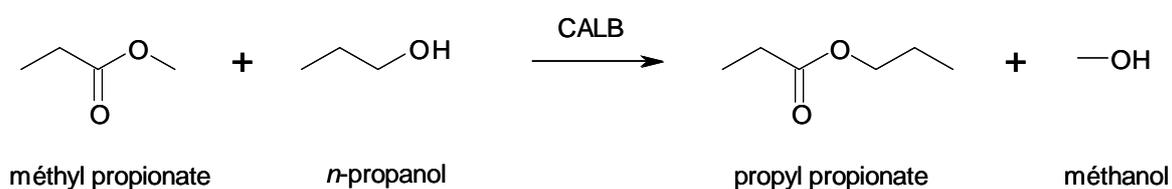


Schéma 21 : Réaction d'alcoolyse du méthyl propionate avec le *n*-propanol catalysée par la CALB.

Les paramètres influençant l'activité et l'énantiosélectivité de la CALB vis-à-vis des alcools secondaires, tels que l'eau, les solvants et la température, ont été également étudiés à l'aide de ce réacteur (Léonard et coll., 2004 ; 2007 ; Léonard- Nevers et coll., 2009).

Aujourd'hui, la biocatalyse solide/gaz apparait comme une technologie prometteuse pour la recherche fondamentale et pour le développement de nouveaux procédés industriels moins polluants (Lamare et coll., 2004).

III.2. Etude de l'hydratation des enzymes par isotherme d'adsorption

Pour caractériser l'état d'hydratation des solides, la méthode traditionnelle consiste à déterminer l'isotherme d'adsorption de l'eau. Dans ce paragraphe les phénomènes mis en jeu, les caractéristiques d'une isotherme d'adsorption, la théorie utilisée pour son interprétation et des exemples d'applications seront présentés.

III.2.a L'adsorption

L'adsorption est définie comme étant un enrichissement d'un constituant ou l'augmentation de la densité d'un fluide (liquide ou gaz) au voisinage d'une interface (Rouquerol et coll., 1999). L'adsorption implique l'établissement d'interactions de surface entre un solide, ou adsorbant, et un fluide, ou adsorbat. Les interactions de surface entre l'adsorbant et l'adsorbable dépendent fortement de la nature chimique (polaire, apolaire, acide, base, ionique...) des constituants mis en jeu. Il existe sur chaque solide des sites appropriés dits d'adsorption qui possèdent des propriétés physico-chimiques compatibles avec l'adsorbat. Les quantités adsorbées sont proportionnelles aux surfaces du solide accessibles à l'adsorbat, mais également à la température et à la pression. Un solide adsorbe moins lorsque la température augmente, car les interactions entre l'adsorbant et l'adsorbat sont défavorisées.

Deux types d'adsorption peuvent être distingués en fonction des mécanismes impliqués : l'adsorption chimique (ou chimisorption) et l'adsorption physique (ou physisorption).

La **chimisorption** est un phénomène irréversible, dépendant de la réactivité du fluide avec l'adsorbant et conduisant à la formation de monocouche. Elle met en jeu un échange d'électrons entre la surface du solide et l'adsorbat, altérant ainsi définitivement l'adsorbant. L'énergie d'interaction équivaut à l'énergie mise en jeu lors de la formation de liaisons chimiques covalentes au sens de Lewis.

La **physisorption** est un phénomène exothermique, réversible, de faible degré de spécificité. Elle fait intervenir des interactions de faible énergie, de type non covalent. Ces interactions seront présentées ci-dessous. En fonction des activités thermodynamiques du fluide, on distingue dans un premier temps la formation d'une monocouche puis de multicouches pour aboutir à des activités thermodynamiques plus importantes à des condensations capillaires sur des solides mésoporeux. Le phénomène étant réversible, il est possible d'étudier aussi bien l'adsorption que la désorption. Néanmoins, il arrive parfois, notamment pour des solides

mésoporeux, que le phénomène de désorption soit différent de celui de l'adsorption, suite à des condensations capillaires à des activités thermodynamiques élevées. On parle alors d'hystérésis d'adsorption/désorption.

Lors de l'adsorption de gaz sur un solide les interactions entre l'adsorbat et l'adsorbant sont généralement plus fortes que celles que peuvent échanger deux molécules d'adsorbat. Dans ce cas, la chaleur d'adsorption sera supérieure à celle de la condensation de l'adsorbat gazeux, résultant en une réaction exothermique. L'écart entre les chaleurs d'adsorption et les chaleurs de condensation dépend fortement de la nature du couple adsorbant-adsorbable.

Dans le cas particulier de l'adsorption d'eau, les sites d'adsorption correspondent aux sites hydrophiles où la fonctionnalité des groupements de surface joue un rôle essentiel. On peut dénombrer comme fonctions chimiques capables d'interagir avec l'eau les fonctions acides, alcools, amines, aldéhydes et cétones pour les adsorbants organiques et principalement hydroxyles pour les oxydes minéraux.

III.2.b Interactions non covalentes impliquées dans l'adsorption

L'adsorption résulte de la somme des interactions existant entre la surface d'un solide et les molécules en phase gazeuse ou liquide. Ces interactions sont souvent de faibles énergie, de type non covalent : liaisons hydrogène, interactions Van der Waals, interactions hydrophobes, interactions acide base, liaisons ioniques ou interaction métalliques. Le tableau 4 donne l'ordre de grandeur de certains de ces interactions.

➤ **Les liaisons hydrogène**

Ce sont des interactions électrostatiques entre des atomes électronégatifs tels que l'oxygène ou l'azote (dits accepteurs de liaisons hydrogène), et des atomes d'hydrogène (donneurs) engagés dans une liaison covalente avec d'autres atomes électronégatifs.

➤ **Interactions de type Van der Waals**

Elles comprennent trois types d'interactions : forces de Keesom, de Debye et de London.

Les **interactions de Keesom** (ou d'orientation) se produisent entre deux molécule ayant chacun un moment dipolaire permanent conduisant à l'alignement des deux dipôles. Ces interactions de faibles énergies peuvent avoir lieu entre molécules comportant des moments

dipolaires élevés (groupement alcools, aldéhydes cétones et esters). Les **forces de Debye** sont des forces de polarisation qui apparaissent lorsqu'une molécule possédant un moment dipolaire permanent va polariser une autre molécule apolaire. Les **interactions de London** tirent leur origine des fluctuations de densités électroniques au sein des liaisons qui créent à un instant donné un moment dipolaire instantané. L'intensité de cette interaction, appelée force de dispersion de London, est d'autant plus grande que les molécules sont plus polarisables.

➤ Les interactions hydrophobes

Il s'agit d'un effet hydrophobe plutôt que d'une liaison. Il concerne des molécules ou des portions de molécules apolaires, qui possèdent une faible affinité pour l'eau. Les molécules de soluté se regroupent entre elles (ou en l'occurrence avec le solide), s'associant par des liaisons de Van der Waals (moments dipolaires induits) et les molécules d'eau se réorganisent, s'associant par des liaisons hydrogène.

Tableau 4 : Ordre de grandeur des différentes interactions

Type d'interaction	Ordre de grandeur (kJ.mol ⁻¹)
Covalente	400 à 800
Ionique	5 à 20
Keesom	2 à 10
Debye	1 à 5
London	1 à 5
Hydrophobe	8 à 40

III.2.c Les isothermes d'adsorption

Une isotherme d'adsorption est la courbe reliant l'activité thermodynamique de l'adsorbat contenu dans une atmosphère donnée et connue à la quantité d'adsorbat adsorbée sur un solide en équilibre avec cette atmosphère. Sur la figure 20 un exemple d'isotherme à la vapeur d'eau, donnant la teneur en eau du solide en fonction de l'activité thermodynamique de l'eau est présenté.

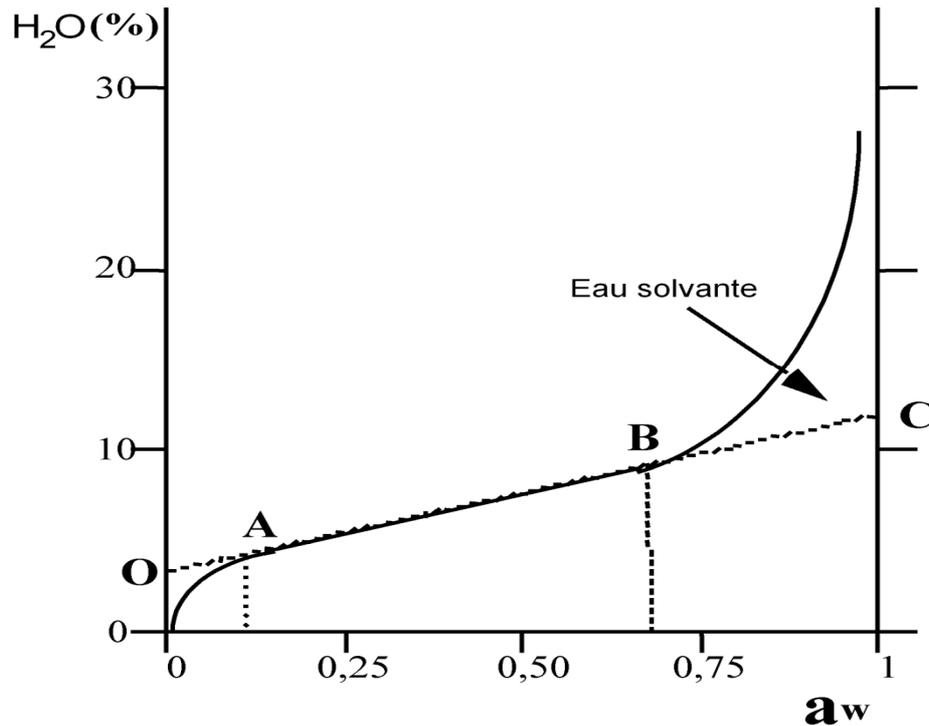


Figure 20 : Représentation schématique d'une isotherme d'adsorption.

La courbe présente deux points d'inflexions caractéristiques (A et B) correspondant à deux états de l'eau.

- Les molécules d'eau fixées sur l'échantillon correspondant à la partie située avant le point A sur la courbe sont les molécules très fortement liées. Elles sont positionnées majoritairement sur les sites polaires et les résidus ionisés. Ces molécules constituent la première "couche d'hydratation". Par extrapolation, le point O correspond à la quantité d'eau très fortement liée à l'échantillon.

- Entre les points A et B, la teneur en eau varie de façon linéaire avec l' a_w . L'augmentation de la quantité d'eau adsorbée correspond à la formation successive des nouvelles couches d'hydratation. L'eau forme alors des multicouches à la surface du solide. Ces molécules sont alors liées à la protéine par des liaisons de plus faible énergie.

- Le deuxième point d'inflexion B correspond alors à l'apparition d'eau solvante et une fois dépassée la valeur d' a_w qui lui correspond, une phase aqueuse, distincte, prend naissance. Par extrapolation de la partie AB linéaire, on peut déterminer le point C correspondant à la quantité totale d'eau non solvante, structurée par l'échantillon.

L'évolution des quantités adsorbées en fonction de la pression relative (ou l'activité thermodynamique) diffère selon la nature structurale des solides. En 1985, l'IUPAC en se basant sur les travaux de Brunauer, Deming et Teller a distingué six types d'isothermes d'adsorption physique (figure 21) (Brunauer et coll., 1940).

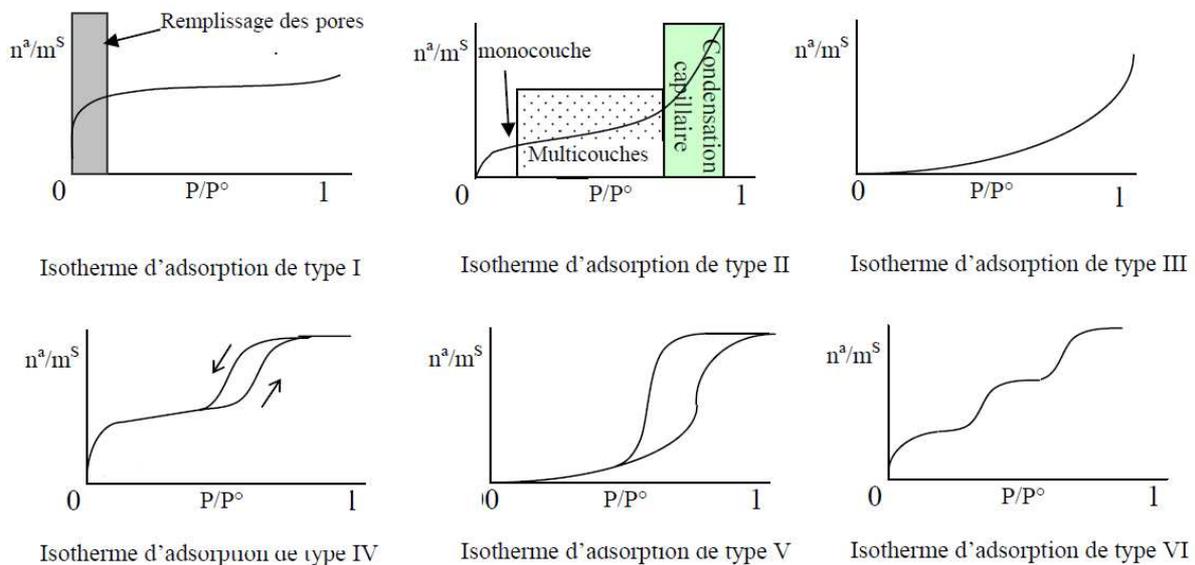


Figure 21 : les types d'isothermes de sorption (Comte, 2004)

- **type I** : sa particularité est la présence d'un plateau horizontal jusqu'à saturation $a_x = P/P^o = 1$. Ce type d'isotherme est caractéristique de produits microporeux (\emptyset pores < 2 nm). C'est une adsorption essentiellement monomoléculaire.
- **type II** : ces isothermes sont très répandues, pour des solides non poreux ou macroporeux. Ce type d'adsorption est caractéristique d'une adsorption multimoléculaire.
- **type III** : ces isothermes sont observées lorsque les interactions adsorbat/adsorbant sont très faibles (comparées aux interactions adsorbant/adsorbant), ce qui est le cas lors d'études d'adsorption d'eau sur des solides hydrophobes.
- **type IV** : Ces isothermes sont obtenues avec des adsorbants mésoporeux (\emptyset pores compris entre 2 et 50 nm). Elles sont comparables à celles de type II, mais pour les activités thermodynamiques élevées, un palier de saturation est observé. De plus, une hystérésis d'adsorption/désorption est observée due aux condensations à l'intérieur des mésopores.
- **type V** : il y a remplissage de mésopores et condensation capillaire dans les pores, comme pour le type IV, mais les interactions adsorbat/adsorbant sont plus faibles.

- **type VI** : ce type d'isotherme en "marches" est très rare : il ne se rencontre que pour des surfaces très homogènes.

III.2.d *Interprétation des isothermes d'adsorption : le modèle Brunauer-Emmett-Teller (BET)*

Les isothermes d'adsorption permettent de distinguer les différents états de l'eau d'une préparation. Il existe de nombreux modèles permettant de décrire, au moins sur une portion, une isotherme d'adsorption et permettre ainsi d'estimer les quantités de molécules d'adsorbant adsorbées en surface suivant la nature de l'adsorbant et des conditions expérimentales. Un des modèles les plus connus et utilisés est celui de Brunauer-Emmett-Teller (BET) (Brunauer et coll., 1938).

Le modèle BET est basé sur la théorie de Langmuir (Langmuir, 1918). Ce dernier a introduit la notion de monocouche après avoir constaté que la quantité de molécules adsorbées avait tendance à tendre vers une limite lorsque les pressions de l'adsorbant augmentaient (isotherme de type I). Le modèle BET suppose l'existence de plusieurs couches dont la première aurait une énergie d'adsorption différente de la seconde qui devient comme les suivantes égale à l'énergie de liquéfaction de l'adsorbant. En considérant que la surface du solide est énergétiquement homogène (il n'existe qu'un seul type de site d'adsorption) et que chaque site ne peut être occupé que par une seule molécule n'échangeant aucune interaction avec ces voisines, on peut déterminer les surfaces spécifiques.

Pour cela, il est recommandé dans un premier temps de calculer la quantité de molécules adsorbées nécessaires à la formation de la monocouche n_m à partir de la relation de la transformée BET (équation 18) :

$$\frac{a_x}{(1-a_x) \times m} = \frac{1}{m_0 \times C} + \frac{a_x \times (C-1)}{m_0 \times C} \quad (\text{Eq. 18})$$

où m est la masse de l'adsorbant (généralement l'eau) fixée par l'adsorbant (en mg par mg de solide), m_0 correspond à la masse de l'adsorbant nécessaire à la formation de monocouche, a_x à l'activité thermodynamique de l'adsorbant et C la constante BET (proportionnelle à l'énergie d'adsorption de la première couche E_1 et à celle de la liquéfaction E_L de l'adsorbant à la température T d'adsorption).

La masse théorique de l'adsorbat nécessaire à la formation de monocouche, m_0 , peut être obtenue à l'aide de la droite de régression de la partie linéaire de la courbe $\frac{a_x}{(1-a_x) \times m}$ en fonction d' a_x , selon l'équation 19 :

$$m_0 = \frac{1}{S+I} \quad (\text{Eq. 19})$$

S et I correspondent à la pente et à l'ordonnée à l'origine de la droite de régression respectivement.

Connaissant la valeur de l'aire occupée par une molécule d'adsorbable a adsorbée sur la surface dans la monocouche, il est possible de calculer la surface spécifique de l'adsorbant S_{sp} (équation 20).

$$S_{sp} = a \times n_m \quad (\text{Eq. 20})$$

Emmet et Brunauer ont estimé que pour un empilement hexagonal compact de sphères, la valeur moyenne de la surface occupée par une molécule de gaz a est donnée par l'équation 21 (Emmet et Brunauer, 1937 ; Rouquerol et coll., 2003) :

$$a = 1,091 \times \left(\frac{M}{\rho N_a} \right)^{2/3} \quad (\text{Eq. 21})$$

avec M la masse molaire de l'adsorbat, ρ sa masse volumique et N_a nombre d'Avogadro.

Cette notion de surface d'aire moléculaire est très importante car elle joue un rôle prépondérant dans la détermination des surfaces spécifiques des solides. Il a été démontré très clairement que la nature des interactions entre l'adsorbable et l'adsorbant ainsi que la température et la structure de la surface du solide peuvent influencer la valeur des aires d'adsorption de molécules d'adsorbable (Hamieh et Shultz, 1996).

III.2.e Applications

L'eau étant omniprésente dans l'environnement, elle peut naturellement s'adsorber sur les solides qui nous entourent. Il est donc important de comprendre son mécanisme d'adsorption ainsi que son influence sur les propriétés physico-chimiques de ces adsorbants. Ainsi, l'adsorption de molécules d'eau a fait l'objet de nombreuses recherches. Des études ont été menées sur des produits minéraux (Thielmann et Baumgarten, 2000 ; Muster et coll., 2001 ;

Pavlidou et Papaspyrides, 2003 ; Tisserand et coll., 2009) mais également sur des fibres naturelles (Cantergiani et Benczedi, 2002), sur des produits pharmaceutiques (Sunkersett et coll., 2001) et agroalimentaires (Demertzis et coll., 1991 ; Lagoudaki et coll., 1993 ; Riganokos et Kontominas, 1997 ; Ambarkhane et coll., 2005).

Les isothermes de sorption d'eau sont également utilisées pour relier l'activité enzymatique observée expérimentalement à l'état d'hydratation de l'enzyme. Des études ont été réalisées avec la chymotrypsine, la lactoglobuline, le sérum albumine de cheval (Lee et Kim, 1995), l'alcool déshydrogénase de *Lactobacillus brevis* (Dimoula et coll., 2009) et des lipases (Caro et coll., 2002 ; de la Casa et coll., 2002).

Bien que les études d'adsorption d'eau soient prédominantes, l'adsorption de composés organiques est également explorée, comme lors de l'étude de l'adsorption des composés organiques volatiles sur le sol calcaire de sud de Nevada (Steinberg et Kreamer, 1993), l'adsorption de l'éthanol sur des féculants (Vareli et coll., 1995) ou l'adsorption de composés d'arômes (hexane, hexan-1-ol et hexanal) par les protéines de soja (Zhou et Cadwallader, 2004).

Dimoula et coll. (2009) ont étudié l'adsorption d'eau, mais aussi des substrats (acétophénone et propan-2-ol) sur l'alcool déshydrogénase de *Lactobacillus brevis*, ce qui est très novateur dans le cas des études d'adsorption sur des enzymes. Ces auteurs ont utilisé le réacteur solide/gaz précédemment décrit, un peu modifié (le flux gazeux ne traverse l'échantillon que lorsque l'équilibre est atteint), ce qui permet d'être dans des conditions semblables à celles de la réaction. Lors de ces travaux l'importance de la présence du saccharose lors de l'immobilisation a été mise en évidence. En effet, l'enzyme immobilisée en présence de saccharose présente une hystérésis d'adsorption/désorption, due à des changements microstructuraux à forte teneur d'eau, moins importante que l'enzyme immobilisée seule. L'acétophénone est adsorbée par l'enzyme dans des quantités comparables à celles de l'eau, en revanche l'adsorption de propan-2-ol n'a pas pu être quantifiée par cette méthode, ce qui pourrait conduire à limitations de transfert de masses dues aux transports diffusionnels jusqu'à l'enzyme. Par ailleurs, l'adsorption compétitive des substrats et de l'eau a été étudiée. Il est apparu que la quantité d'acétophénone adsorbée par l'enzyme est moindre en présence de l'eau (Dimoula et coll., 2009)

III.3. Etude de l'hydratation par la chromatographie gazeuse en phase inverse (IGC)

Les caractéristiques des surfaces (porosité, surface spécifique, énergies de surface, état d'hydratation...) des solides divisés (poudres, particules, fibres) sont devenues des données importantes requises pour, par exemple, le développement de matériaux de très grandes puretés et donc à hautes valeurs ajoutées. De telles données peuvent être obtenues par des méthodes basées sur l'adsorption de molécules de gaz. Parmi ces techniques de caractérisation de surface, on peut citer la chromatographie gazeuse inverse, technique que nous avons choisie pour notre étude de l'hydratation de la lipase B de *Candida antarctica*. C'est une technique simple, entièrement automatisée, permettant une acquisition rapide des résultats, dans un milieu où l'activité de l'eau est parfaitement contrôlée, et dont le fonctionnement est peu coûteux. Nous allons présenter ici le principe de cette méthode, décrire quelques grandeurs expérimentales utilisées et pour finir nous allons donner quelques exemples d'applications, notamment pour l'étude des matériaux organiques.

III.3.a Principe et fonctionnement de la chromatographie gazeuse en phase inverse (IGC)

L'IGC est basée sur l'adsorption de molécules de gaz. Le terme inverse signifie que la situation est inversée par rapport à la chromatographie gazeuse analytique (CG). En effet, en CG les composés à étudier sont injectés dans une colonne où la phase stationnaire bien définie joue le rôle d'un séparateur. En IGC les molécules injectées appelées molécules **sondes** sont parfaitement identifiées et la phase stationnaire est constituée par le solide à analyser (avec des propriétés inconnues) (figure 22).

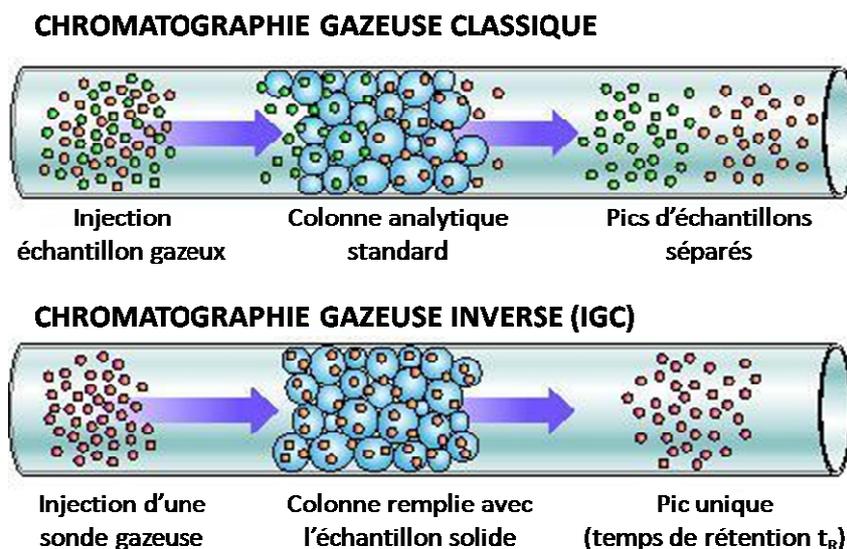


Figure 22 : Comparaison schématique de la chromatographie en phase gazeuse analytique et en phase gazeuse inverse (IGC). En GC (en haut) un mélange de composés est injecté et séparé par une colonne dont les propriétés sont connues. En IGC (en bas) un seul composé connu est injecté sur une colonne dont on cherche à déterminer les caractéristiques (Thielmann et Levoguer, 2000).

Les molécules sondes injectées sous forme gazeuse sont transportées par un gaz vecteur inerte à travers la colonne, puis analysées. Les changements de temps de rétention en fonction de la nature chimique, la taille et la concentration de la molécule sonde injectée, la température, l'humidité relative ou le débit du gaz vecteur permettent d'accéder à une large gamme de propriétés physico-chimiques du solide étudié. En effet, l'hétérogénéité énergétique, la morphologie et la nature chimique de la surface peuvent influencer l'adsorption des molécules sondes. Ainsi, les temps de rétention des sondes et les formes des chromatogrammes sont le reflet des interactions de la sonde avec la surface du solide.

L'IGC permet de travailler à des taux d'humidités relatifs parfaitement contrôlés. Ceci est réalisé par le mélange adéquat du gaz vecteur sec et du gaz vecteur saturé en eau, après avoir bullé dans un flacon contenant de l'eau. C'est le même principe qui est utilisé pour charger le gaz vecteur en molécules sondes avant injection (figure 23).

Les solides divisés (poudres, fibres, films de polymère...) peuvent être introduits dans la colonne seule, sans aucune préparation préalable, ou mélangés avec un matériau inerte. Les matériaux polymères peuvent être déposés sur des billes inertes (terre de diatomée ou verre désactivés) ou bien revêtir la face interne de la colonne, ce qui nécessite la dissolution préalable du polymère dans un solvant.

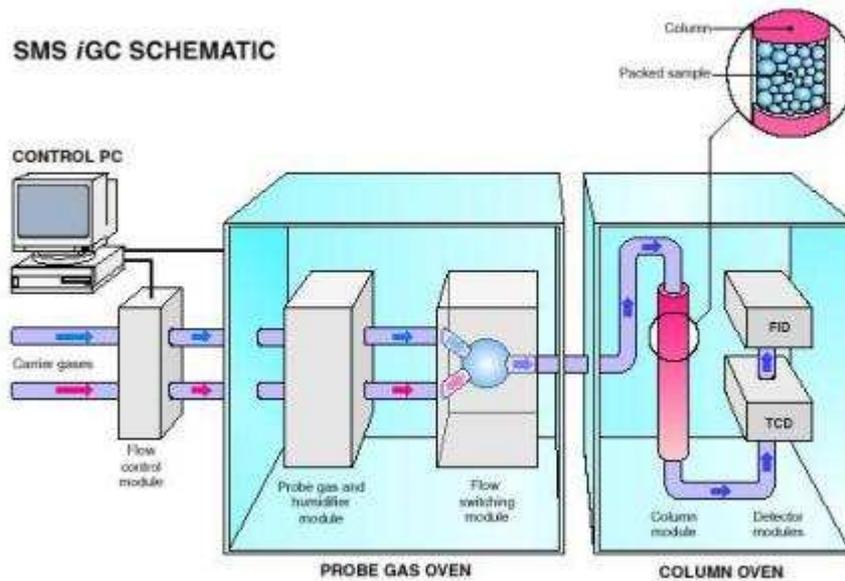


Figure 23 : Représentation schématique d'un appareil entièrement automatisé, commercialisé par SMS (Surface Measurement Systems, Londres, Grande-Bretagne). Avant de traverser la colonne, le gaz vecteur sec est mélangé à des gaz saturés en vapeur d'eau et en molécule sonde (Thielmann et Levoguer, 2000).

On distingue deux méthodes employées en chromatographie gazeuse inverse, la chromatographie gazeuse inverse à dilution infinie et à concentration finie.

En IGC en **dilution infinie** les molécules sondes sont injectées en très faibles quantités si bien que les interactions sondes-sondes sont négligeables, permettant d'évaluer uniquement les interactions de la molécule sonde avec le solide. Les quantités injectées ne suffisant pas à former une fraction notable de la monocouche à la surface du solide, l'IGC en dilution infinie est appliquée sur le domaine représenté par la partie linéaire de l'isotherme d'adsorption aux très faibles pressions relatives, décrite par la loi d'Henry.

En IGC en **concentration finie**, les quantités injectées étant plus importantes, tous les sites énergétiques contribueront à l'adsorption des molécules sondes. Toute la surface étant accessible, il est possible en faisant varier le taux de recouvrement de tracer les isothermes d'adsorption d'un grand nombre de molécules organiques. Ainsi, les fonctions de distribution des sites énergétiques de surface du solide étudié pourront ainsi être déduites et l'hétérogénéité énergétique de surface de ce solide quantifiée.

III.3.b Principales grandeurs expérimentales utilisées en IGC

Comme nous venons de voir, l'IGC repose sur les mesures de **temps de rétention** t_R . Ce dernier correspond au temps que met la sonde pour traverser la colonne. A partir de ce temps de rétention, on calcule le **temps de rétention net** t_N de la sonde qui est le temps de rétention auquel on a soustrait le **temps mort de la colonne** t_0 . Ce temps mort est déterminé par l'injection de molécules de méthane qui sont supposées ne pas s'adsorber sur le solide (figure 24).

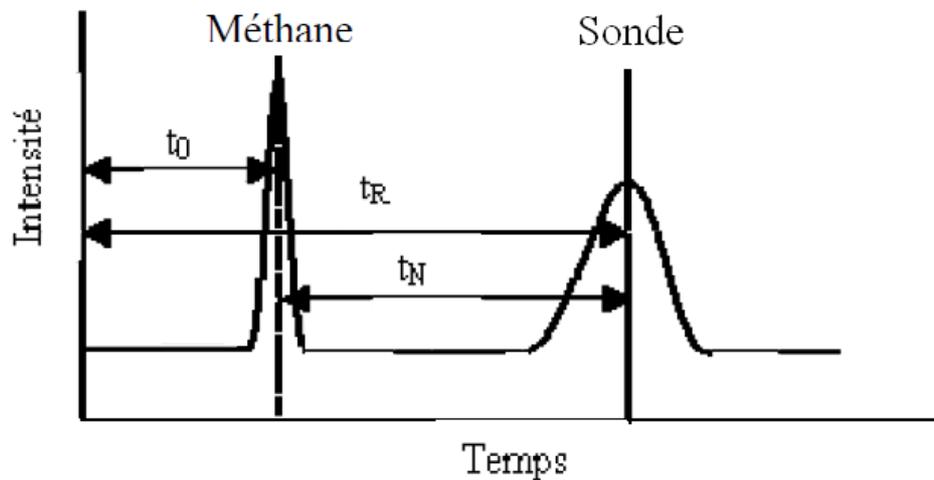


Figure 24 : Détermination du temps de rétention net t_N .

A partir du débit du gaz vecteur (hélium) corrigé D_c en sortie de colonne, le **volume de rétention net** V_N de la sonde injectée peut être exprimé selon l'équation 22.

$$V_N = D_c \times t_N \quad (\text{Eq. 22})$$

Généralement le **volume de rétention spécifique** V_g est préféré, car il permet de comparer des données obtenues sur des colonnes ayant des caractéristiques différentes. Ce volume est défini comme le volume de rétention normalisé à 1 gramme de solide et à une température de 0°C . Le volume de rétention spécifique peut être obtenu à partir du temps de rétention net à l'aide de l'équation 23 :

$$V_g = j \cdot \frac{t_R - t_0}{m} \cdot \frac{F \times 273,15}{T} \quad (\text{Eq. 23})$$

avec F le débit du gaz vecteur en $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$, m la masse de la CALB immobilisée en g et T la température de la colonne en K. Le facteur de compressibilité James-Martin, j , peut être

calculé en utilisant l'équation 24, où P_1 et P_0 sont les pressions à l'entrée et à la sortie de la colonne, respectivement.

$$j = \frac{3}{2} \cdot \frac{(P_i/P_0)^2 - 1}{(P_i/P_0)^3 - 1} \quad (\text{Eq. 24})$$

En première approximation, le volume de rétention spécifique est indépendant :

- du débit du gaz vecteur
- de la perte de charge
- de la masse de phase stationnaire
- de la nature du gaz vecteur et de sa pression.

Les **caractéristiques des sondes** généralement utilisés pour le traitement des résultats obtenus en IGC sont :

- la masse molaire ;
- la masse volumique ou densité ρ ;
- l'indice de réfraction ;
- le point d'ébullition ;
- l'aire de la molécule a , déjà évoqué lors des isothermes de sorption (§ III.2.d); elle peut être calculée selon l'équation 21 ;
- la pression vapeur saturante ou tension de vapeur : est la pression à laquelle la phase gazeuse d'une substance est en équilibre avec sa phase liquide ou solide ; elle dépend exclusivement de la température ;
- l'enthalpie ou chaleur de vaporisation ΔH_{vap} , est l'énergie nécessaire pour transformer une mole d'un liquide en un gaz ;
- la tension de superficielle γ : dans le cas d'un liquide, elle est définie comme le travail qu'il faut fournir pour étendre la surface d'une unité ; cela se résume à une énergie que l'on doit amener pour pouvoir à la fois attirer les atomes ou molécules de la masse vers la surface et les réorganiser dans la zone interfaciale ;
- sa concentration.

A partir des volumes de rétention et les caractéristiques des sondes, différentes propriétés physico-chimiques de surface du solide peuvent être déduites : les énergies de surface, les paramètres acide-base, les énergies libres d'adsorption (avec les composantes enthalpiques et

entropiques), les isothermes d'adsorption, les températures de transition vitreuse, les paramètres de solubilité, le degré de réticulation, la cristallinité, les paramètres de solubilité de Flory-Huggins, les coefficients de diffusion.... Par ailleurs, l'étude de la variation de certains de ces paramètres avec le taux d'humidité relative permet de déduire indirectement l'état d'hydratation des solides étudiés.

III.3.c Applications

La méthode de l'IGC apparue dans les années 60 s'est révélée très efficace pour l'étude des propriétés de surface des solides divisés. Le fait que cette technique soit d'une utilisation relativement simple et qu'elle donne accès à de nombreux paramètres ont contribué à son application très étendue dans des domaines très variés comme la chimie fine (Dove et coll., 1996 ; Feeley et coll., 1998a, b ; York et coll., 1998 ; Heng et coll., 2006), la chimie macromoléculaire (Panzer et Schreiber, 1992 ; van Asten et coll., 2000 ; Hamieh et coll., 2002 ; Hamieh et Schultz, 2002a, b ; Santos et coll., 2002a, b ; Gutiérrez et coll., 2005 ; Santos et Guthrie, 2005), la chimie minérale (Saint Flour et Papirer, 1982a, b ; Papirer et coll., 1991 ; Onjia et coll., 2000 ; Martos et coll., 2001 ; Fekete et coll., 2004 ; Comte et coll., 2005 ; Tisserand et coll., 2009), les nanotechnologies (Batko et coll., 2007 ; Menzel et coll., 2009), la pétrochimie (Herruzo et coll., 1999), la papeterie (Borch, 1991 ; Santos et coll., 2001 ; Pinto et coll., 2004), l'industrie du textile (Cantergiani et Benczédi, 2002 ; Heng, et coll., 2007 ; Rjiba et coll., 2007) et l'agroalimentaire (Thielmann et Williams, 2000 ; Boutboul et coll., 2002a, b ; Rousset et coll., 2002 ; Zhou et Cadwallader, 2004 ; 2006).

Comme ces différentes études en témoignent, l'IGC convient très bien aussi bien pour l'étude des matériaux organiques que minéraux.

Par exemple, en ce qui concerne les molécules organiques, dans le domaine de la papeterie, Pinto et coll. ont étudié les effets de l'adsorption d'un peptide, correspondant au domaine de fixation à la cellulose présent dans les glycanases, sur les propriétés de surface d'un modèle de cellulose, le Whatman CF11. Les modifications de l'énergie de surface observées montrent une diminution de l'acidité de la fibre de cellulose. Par ailleurs, l'affinité de cette fibre pour des molécules aliphatiques a été améliorée légèrement par l'adsorption de ce peptide, probablement en raison des acides aminés hydrophobes présents à la surface du peptide ou à une augmentation de la surface des fibres. Il semblerait que ces peptides permettent la

dissolution des agglomérats présents entre les fibres, mais aucune modification de l'indice de cristallinité n'a été remarquée par les auteurs (Pinto et coll., 2004).

Dans le domaine de l'agroalimentaire, Boutboul et coll. ont utilisé l'IGC pour étudier les interactions entre les composés d'arôme et l'amidon (Boutboul et coll., 2002a ; 2002b). Ils ont trouvé que la rétention des arômes augmentait avec leur polarité, dans l'ordre : *d*-limonène < éthyl hexanoate < octanal < hexan-1-ol. Ces auteurs ont donc supposé que les interactions arômes/amidon étaient essentiellement dues à un phénomène d'adsorption impliquant des liaisons hydrogène, plutôt qu'à la formation de complexes d'inclusions (Boutboul et coll., 2002b). En déterminant les énergies libres d'adsorption (ΔG_{ads}) et l'enthalpie d'adsorption (ΔH_{ads}), les auteurs ont montré que les interactions entre arôme et amidon se font par des liaisons de faibles énergies, comme des liaisons hydrogène et des interactions dipôle-dipôle (Boutboul et coll., 2002a) (tableau 5).

Tableau 5 : Enthalpies d'adsorptions (ΔH_{ads}) des constituants d'arôme sur l'amidon de maïs à forte teneur en amylose, comparées aux enthalpies de condensation (ΔH_c) des composés (données de la littérature, NIST Chemistry WebBook). Les différences $\Delta H_{ads} - \Delta H_c$ correspondent aux énergies d'interaction entre les constituants d'arôme et l'amidon (d'après Boutboul et coll., 2002a).

Constituant de l'arôme	ΔH_{ads} (kJ.mol ⁻¹)	ΔH_c (kJ.mol ⁻¹)	$\Delta H_{ads} - \Delta H_c$ (kJ.mol ⁻¹)
hexan-1-ol	-92,1	-61,6	30,5
octanal	-64,8	-43,0	21,8
éthyl hexanoate	-57,4	-51,7	5,7
<i>d</i> -limonène	-55,0	-44,0	11,0

Rousset et coll., en étudiant l'adsorption des sondes polaires et apolaires sur le saccharose seul ou recouvert par des émulsifiants (lécithine ou polyglycérol polyricinoleate), ont montré que ces derniers permettent d'augmenter la lipophilicité du saccharose en diminuant son acidité (Rousset et coll., 2004) (tableau 6).

Tableau 6 : Effet des émulsifiants adsorbés sur le saccharose sur la composante dispersive de son énergie de surface (γ_s^d) et ses constantes d'acidité et de basicité (K_A et K_B).

	γ_s^d (mJ.m ⁻²)	$K_A.10^{-2}$	$K_B.10^{-2}$
Saccharose	30,35	30,6	31,05
Saccharose avec lécithine	18	15	15
Saccharose avec polyglycérol polyricinoleate	23	28	33

Par ailleurs, de nombreuses expériences montrent que l'eau adsorbée joue très souvent un rôle prépondérant sur l'évolution des propriétés physicochimiques de surface.

Ainsi, Cantergiani et Benczedi ont étudié les interactions entre les parfums et le coton à l'aide de l'IGC en fonction de l'humidité relative. Ils ont pu montrer que les composantes dispersives de l'énergie de surface diminuaient légèrement avec l'humidité. Par contre, ils sont parvenus à la conclusion que la présence d'eau adsorbée influençait fortement les forces d'interaction entre la surface et les adsorbats, l'undécane et le dimetol (ou 2,6-diméthylheptan-2-ol). Les valeurs plus élevées d'enthalpie d'adsorption obtenues pour le dimetol témoignent de la présence des liaisons hydrogène, suggérant que l'adsorption se fait *via* ce type d'interactions (Cantergiani et Benczedi, 2002) (tableau 7).

Tableau 7 : Evolution en fonction du taux d'humidité relative de la composante dispersive de l'énergie de surface (γ_s^d) du coton et des enthalpies et des entropies d'adsorption (ΔH_{ads} et ΔS_{ads}) des parfums sur le coton (d'après Cantergiani et Benczedi, 2002).

Humidité relative (%)	γ_s^d	Undécane		Dimetol	
		ΔH_{ads}	ΔS_{ads}	ΔH_{ads}	ΔS_{ads}
0	42 ± 1	-33	-11	-70	-112
20	42 ± 1	-54	-84	-71	-119
50	40 ± 1	-56	-92	-81	-148
80	36 ± 2	-56	-91	-78	-147

En s'appuyant sur des résultats obtenus en IGC, Thielmann et Williams ont montré, que la température de transition vitreuse (Tg) du maltose variait en sens inverse de l'augmentation de l'humidité relative (Thielmann et Williams, 2000) (tableau 8).

Tableau 8 : Evolution des températures de transition vitreuse du maltose en fonction du taux d'humidité relative (Thielmann et Williams, 2000).

Humidité relative (%)	Tg (K)
0	361,6
5	348,6
10	338,8
15	332,5

Zhou et Cadwallader ont étudié l'influence de l'humidité relative sur l'adsorption des constituants de l'arôme sur des isolats des protéines de soja déshydratées par chromatographie en phase gazeuse inverse. Les données thermodynamiques de l'adsorption (enthalpie

d'adsorption ΔH_{ads}) suggèrent que l'adsorption des composés aromatiques non polaires (de l'hexane, du hex-1-ène, et du limonène) sur les protéines de soja n'est pas affectée par la présence d'eau, ce qui témoigne d'interactions faibles, non spécifiques (forces de dispersion) entre les composés aromatiques et la protéine. En revanche, l'adsorption des constituants de l'arôme plus polaires (ester, cétone, aldéhyde, et alcool) est influencée par la présence de l'eau à faible taux d'humidité relative ($|\Delta H_{\text{ads}}|$ diminue lorsque HR augmente de 0 à 30%). Les auteurs ont suggéré qu'il y a compétition entre ces composés et l'eau pour les sites de liaisons de haute énergie de la protéine. L'augmentation supplémentaire de l'humidité (30 à 50% de HR) n'affecte plus l'adsorption de composés polaires, suggérant que leurs interactions avec les protéines de soja sont relativement faibles et limitées (tableau 9) (Zhou et Cadwallader, 2006).

Tableau 9 : Enthalpie d'adsorption ($|\Delta H_{\text{ads}}| \pm$ écart-type standard) de sondes volatiles individuelles sur les protéines de soja à des différentes humidités relatives. Résultats obtenus à partir de deux colonnes et un total de quatre mesures à partir des expériences réalisées à 30, 35 et 40 °C (d'après Zhou et Cadwallader, 2006).

Constituant de l'arôme	0% RH	8% HR	30% HR	40% HR	50% HR
hexane	28,3 ± 0,4	29,7 ± 0,9	27,5 ± 1,0	29,3 ± 2,3	28,7 ± 2,3
hex-1-ène	27,5 ± 0,6	ND	30,2 ± 1,7	28,7 ± 2,0	28,1 ± 2,2
limonène	47,3 ± 0,0	ND	46,6 ± 1,2	46,5 ± 0,4	47,7 ± 0,9
éthyl butyrate	43,2 ± 1,1	ND	38,9 ± 0,1	40,0 ± 0,8	39,8 ± 2,2
hexan-2-one	44,1 ± 2,0	ND	37,6 ± 2,0	39,5 ± 1,2	39,9 ± 1,6
hexanal	43,0 ± 1,7	41,6 ± 0,9	35,9 ± 2,1	38,7 ± 1,5	39,4 ± 1,6
<i>trans</i> -hex-2-ène	50,8 ± 2,2	ND	41,1 ± 1,8	42,4 ± 0,7	41,3 ± 1,0
hexan-1-ol	68,4 ± 2,1	63,4 ± 1,4	54,4 ± 1,8	58,5 ± 0,2	54,9 ± 1,5
<i>trans</i> -hex-2-ène-1-ol	92,5 ± 3,2	ND	56,3 ± 1,3	57,7 ± 1,4	55,2 ± 0,7
<i>cis</i> -hex-3-ène-1-ol	84,8 ± 1,6	ND	53,7 ± 1,7	55,1 ± 2,5	53,8 ± 0,4

Dans le présent travail, nous avons également étudié les variations des paramètres de surface de la CALB avec le taux d'humidité relative, et ces résultats ont été utilisés pour déduire indirectement l'état d'hydratation de l'enzyme. Ce travail sera présenté au paragraphe C.III. des résultats et discussion.

Matériels et méthodes

I. Matériel biologique

La lipase B de *Candida antarctica* (CALB) a été choisie pour cette étude. Des enzymes de différentes provenances ont été utilisées :

- CHIRAZYME[®] L-2, qui correspond à l'enzyme lyophilisée et qui est commercialisée par la société ROCHE (Penzberg, Allemagne);
- Novozyme 435, qui est une préparation immobilisée par adsorption de la CALB sur une résine acrylique macroporeuse et qui est commercialisée par la firme Novo Nordisk (Glaxo, Danemark).
- Une enzyme recombinante produite et purifiée au laboratoire de Biotechnologies de l'Institut Royal de Technologie de Stockholm (KTH) (Suède).

Par ailleurs, six variants de la CALB obtenus par mutagenèse dirigée ont été utilisés : trois avec des mutations des résidus formant la poche stéréospécifique (Ser47Ala, Thr42Val et Ser47AlaThr42Val) (Rotticci et coll., 2001b) et trois avec des mutations des résidus constituant le canal d'accès au site actif (Ile189Ala, Leu278Val et Ala282Leu) (Magnusson et coll., 2005). Tous ces variants ont été produits et purifiés au laboratoire de Biotechnologies de l'Institut Royal de Technologie de Stockholm (KTH) (Suède).

Toutes ces enzymes, à l'exception du Novozyme 435 où l'enzyme est déjà immobilisée, ont été adsorbées sur le support solide commercial constitué de diatomite suivant : Chromosorb P Acid-washed, traité au diméthyl dichlorosilane (AW DMCS) 60-80 Mesh (VARIAN, France). Le traitement appliqué à ce support (AW DMCS) le rend relativement inerte vis-à-vis de l'adsorption et permet d'obtenir des adsorptions et des activités catalytiques reproductibles. Dans ce type d'immobilisation, l'enzyme est reliée au support par des interactions de faible énergie (interactions de Van der Waals, liaisons hydrogène, liaisons hydrophobe ou liaisons ionique ou électrostatique) entre ses groupements fonctionnels et le support. Afin d'obtenir une a_w la plus proche possible de 0, l'enzyme adsorbée a été séchée sous vide pendant au moins une semaine avec du pentoxyde de phosphore (P_2O_5) avant utilisation.

I.1. Préparation de l'enzyme de type sauvage et des variants de la poche stéréospécifique

L'enzyme de type sauvage et les variants de poche stéréospécifique obtenus par mutagenèse dirigée (Ser47Ala, Thr42Val et Ser47Ala-Thr42Val) (Rotticci et coll., 2001b) ont été produits dans la levure méthylophile *Pichia pastoris*. La surexpression de ces lipases est extracellulaire. La purification de ces enzymes a été effectuée à partir du milieu d'expression par chromatographie d'interaction hydrophobe suivie d'une filtration sur gel. (Rotticci et coll., 2001b; Rotticci-Mulder et coll., 2001). L'adsorption enzymatique a été réalisée sur Chromosorb P AW DMCS (Varian, France) : l'enzyme de type sauvage (0,106 mg) ou un variant (0,85 mg) a été dissous dans un tampon phosphate de sodium (pH 7,5, 10 mM), et le Chromosorb P AW DMCS sec (1g) a été ajouté à la solution. Après agitation vigoureuse, la préparation a été laissée pendant une semaine sous vide en présence du P₂O₅ à température ambiante.

I.2. Préparation des variants du canal d'accès au site actif de la CALB

Les trois mutants Ile189Ala, Leu278Val et Ala282Leu ont été obtenus par mutagenèse dirigée (Magnusson et coll, 2005). Le plasmide pGAPZα B a été amplifié par réaction en chaîne par polymérase (PCR) avec des amorces mutagènes conçues pour ne pas présenter des chevauchements à la fin de séquence (Zheng et coll, 2004). Le produit de PCR a été analysé sur gel d'agarose 1% et a été utilisé pour transformer des cellules d'*E. coli* XL-1 blue. Les colonies contenant la mutation souhaitée ont été identifiées par séquençage et utilisées pour produire le plasmide en grande quantité (à savoir > 20μg) à l'aide QIAprep Spin miniprep (QIAGEN GmbH, Hilden, Allemagne). Les plasmides ont été linéarisés et utilisés pour transformer *Pichia pastoris* SMD 1168 H par électroporation. Les transformants de *Pichia pastoris* ont été cultivés pour produire les variants de la CALB. L'enzyme contenue dans le surnageant a été purifiée sur colonne de butyle Sepharose FF. Les fractions de protéines purifiées ont subi un échange de tampon pour du tampon phosphate de potassium 50mM, pH 7,5, puis lyophilisées.

0,53 mg enzyme a été dissous dans 1 mL d'eau milliQ et du Chromosorb P AW DMCS sec (1g) a été ajouté à la solution. Après agitation vigoureuse, la préparation a été laissée pendant une semaine sous vide en présence du P_2O_5 à température ambiante.

II. Produits chimiques

Les produits chimiques utilisés dans le cadre de ces travaux ont été achetés chez Sigma-Aldrich-Fluka Chemical Co, avec une pureté minimale de 98%. Les alcools secondaires et les esters (tableau 10 et 11) ont été distillés sous argon, dans le but d'éliminer l'eau. Les produits ainsi distillés ont ensuite été stockés sous argon et sur du tamis moléculaire à activé de 3 Å (également en provenance de chez Sigma-Aldrich-Fluka Chemical Co). Tous les solvants utilisés proviennent de chez Carlo Erba.

Tableau 10 : Propriétés des alcools secondaires utilisés lors de cette étude.

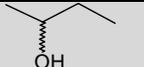
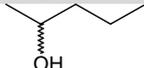
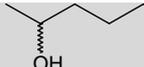
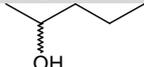
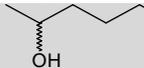
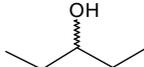
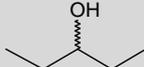
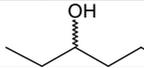
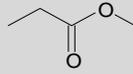
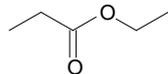
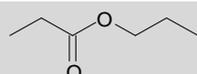
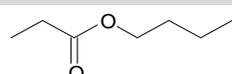
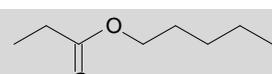
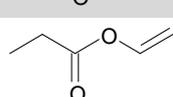
Alcool racémique	Structure	N° CAS	Masse moléculaire (g.mol ⁻¹)	Point d'ébullition (°C)	Densité (g/mL à 25 °C)	Pureté (%)
Butan-2-ol		78-92-2	74,18	115	0,808	99,5
Pentan-2-ol		6032-29-7	88,15	118-121	0,809	98
Hexan-2-ol		626-93-7	102,18	137-140	0,814	99
Heptan-2-ol		543-49-7	116,2	160-162	0,817	99
Octan-2-ol		123-96-6	130,13	174-181	0,819	97
Hexan-3-ol		623-37-0	102,18	135	0,818	98
Heptan-3-ol		589-82-2	116,2	155-157	0,82	98
Octan-3-ol		589-98-0	130,13	177-179	0,822	99

Tableau 11 : Propriétés des esters commerciaux utilisés lors de cette étude

Ester	Structure	N° CAS	Masse moléculaire (g.mol ⁻¹)	Point d'ébullition (°C)	Densité (g/mL à 25 °C)	Pureté (%)
méthyl propionate		554-12-1	88,11	78-80	0,915	99
éthyl propionate		105-37-3	102,13	99	0,888	99
propyl propionate		106-36-5	116,16	122-124	0,881	99
butyl propionate		590-01-2	130,19	145	0,861	99
pentyl propionate		624-54-4	144,21	169	0,873	99
vinyl propionate		105-38-4	100,18	94-95	0,919	98

Les esters produits lors des réactions enzymatiques ((±)-1-méthylpropyl propionate, (±)-1-méthylbutyl propionate, (±)-1-méthylpentyl propionate, (±)-1-méthylhexyl propionate, (±)-1-méthylheptyl propionate, (±)-1-éthylbutyl propionate, (±)-1-éthylpentyl propionate et (±)-1-éthylhexyl propionate) n'étant pas commercialisés, ont été préparés par voie chimique, dans le but d'identifier ces produits. Les mélanges racémiques de ces esters ont été obtenus selon deux méthodes de synthèse : la première est réalisée à partir de l'acide propionique et la seconde à partir de l'anhydride propionique (voir descriptif ci-dessous).

Le (±)-1-méthylpropyl propionate, le (±)-1-méthylpentyl propionate et le (±)-1-éthylpentyl propionate étant également utilisés comme substrat, ont été produits par les mêmes méthodes de synthèse, mais dans en quantités plus importantes. Le (*R*)-1-méthylpentyl propionate a été obtenu par voie enzymatique et le (*S*)-1-méthylpentyl propionate par voie chimique à partir de l'hexan-2-ol fortement enrichi en énantiomère *S* et l'anhydride propionique.

II.1. Synthèse des esters à partir de l'acide propionique

Le (±)-1-méthylpropyl propionate, le (±)-1-méthylbutyl propionate, le (±)-1-méthylpentyl propionate, le (±)-1-éthylbutyl propionate, le (±)-1-éthylhexyl propionate et le (±)-1-éthylpentyl propionate ont été synthétisés chimiquement à partir de l'alcool secondaire racémique correspondant, respectivement (±)-butan-2-ol, (±)-pentan-2-ol, (±)-hexan-2-ol, (±)-hexan-3-ol, (±)-octan-3-ol et (±)-heptan-3-ol (1 éq) et de l'acide propionique (1,5 équivalent) en présence d'un catalyseur acide, l'acide para toluène sulfonique (APTS) (0,01 équivalent) et sous chauffage à 150-200°C pendant 3 à 4 heures (schéma 22). Notre produit est ensuite lavé avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium (NaHCO₃) et purifié, soit par distillation inverse, c'est-à-dire que notre ester reste dans notre ballon de départ et que les autres composés sont éliminés, soit par une colonne de silice (éluant : mélange v/v d'éther de pétrole (EP) et d'éthyl acétate (AcOEt) en proportion 95/5) lorsque le point d'ébullition de l'alcool est trop élevé. Pour finir, ils sont séchés sur sulfate de magnésium (MgSO₄), puis stockés sous argon et sur du tamis moléculaire de 3 Å.

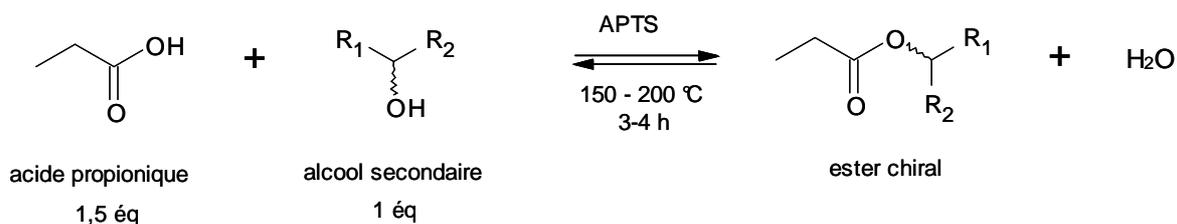


Schéma 22 : Réaction de synthèse d'ester à partir de l'acide propionique

II.2. Synthèse des esters à partir de l'anhydride propionique

Le (±)-1-méthylpentyl propionate, le (±)-1-méthylhexyl propionate et le (±)-1-méthylheptyl propionate ont été obtenus à partir de l'anhydride propionique et de l'alcool correspondant, (±)-hexan-2-ol, (±)-heptan-2-ol et (±)-octan-2-ol respectivement (schéma 23).

A une solution de l'alcool (1 équivalent) dans la pyridine maintenue à 0°C est additionné goutte à goutte l'anhydride propionique (1,1 équivalent). Le mélange est agité à 0°C pendant 1 heure, puis 12 heures à température ambiante (TA). Au brut réactionnel est additionné de l'acide chlorhydrique 1M. La phase aqueuse est extraite trois fois à l'éthyl acétate. Les phases

organiques combinées sont lavées avec NaHCO_3 , puis de la saumure, séchées sur MgSO_4 et concentrées sous vide partiel. Le résidu huileux purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : EP/AcOEt : 95/5) permet d'isoler l'ester racémique avec un rendement de 100%. Les esters sont ensuite stockés sous argon et sur du tamis moléculaire de 3 Å.

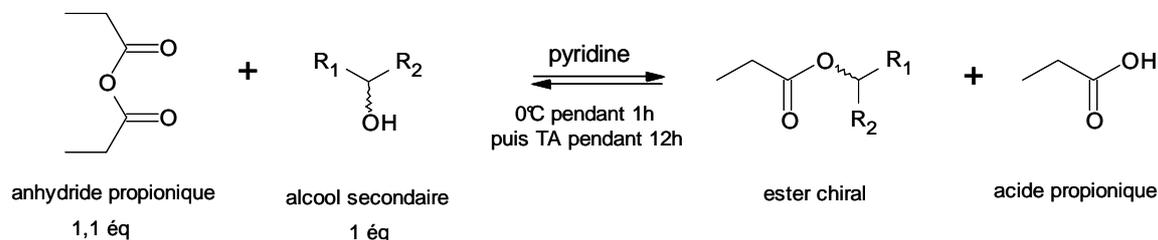


Schéma 23 : Réaction de synthèse d'ester à partir de l'anhydride propionique

II.3. Synthèse du (*R*)-1-méthylpentyl propionate

Le (*R*)-1-méthylpentyl propionate a été obtenu par voie enzymatique à partir du vinyl propionate et du (\pm)-hexan-2-ol (schéma 24). La réaction est catalysée par la CALB commerciale immobilisée, le Novozyme 435, et elle a lieu dans l'heptane à 35°C sous agitation douce (150 rpm) (schéma 3). L'acétaldéhyde formé au cours de la réaction étant gazeux (point d'ébullition 21°C), la réaction est irréversible. La réaction est arrêtée après 4 heures par filtration et l'ester produit isolé par chromatographie sur gel de silice (éluant : EP/AcOEt : 95/5). La CALB présente une forte préférence pour l'énantiomère *R* de l'hexan-2-ol, ainsi, dans ces conditions le (*R*)-1-méthylpentyl propionate est obtenu quasi exclusivement, avec un excès énantiomérique de l'ester produit (ee_P) de 99,3% et un ratio énantiomérique $E = 490$.

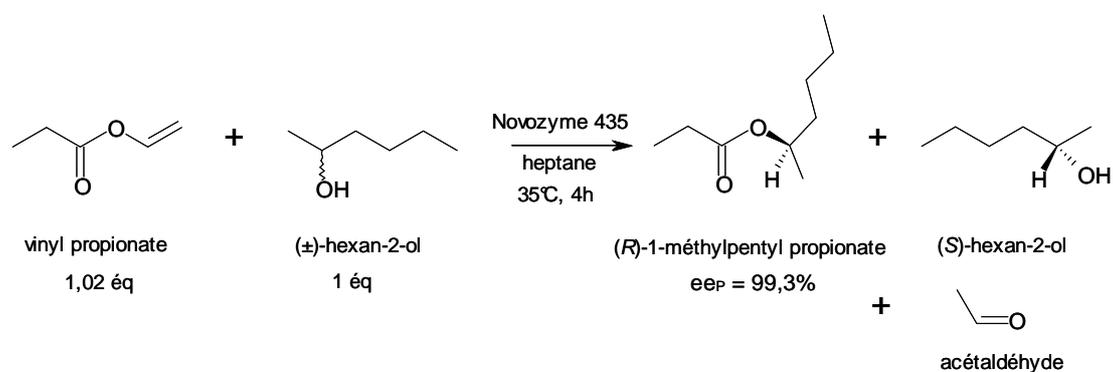


Schéma 24 : Réaction de synthèse (*R*)-1-méthylpentyl propionate par voie enzymatique.

II.4. Synthèse du (*S*)-1-méthylpentyl propionate

Du hexan-2-ol fortement enrichie en forme *S* a été obtenu selon la réaction enzymatique ci-dessus (§ II. 3. synthèse du (*R*)-1-méthylpentyl propionate) arrêtée au bout de 12 heures. Après purification par chromatographie sur gel de silice (éluant : EP/AcOEt : 95/5), l'hexan-2-ol a été utilisé avec de l'anhydride propionique pour synthétiser le (*S*)-1-méthylpentyl propionate selon le procédé décrit précédemment (§ II. 1.)

III. Expériences en réacteur solide/gaz

Nous avons étudié l'influence des certains paramètres de la réaction d'acylation des alcools secondaires catalysée par la CALB et ses variants à l'aide du réacteur solide/gaz (schéma 25). Le donneur d'acyle étant un ester et comme lors de la réaction il y formation d'un autre ester, cette réaction peut également être appelée réaction de transestérification.

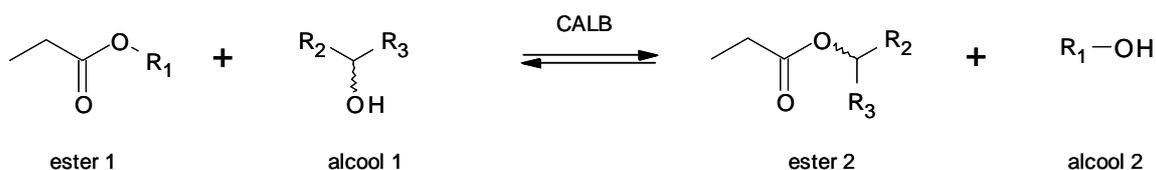


Schéma 25 : Réaction d'acylation (ou de transestérification) catalysée par la CALB. R₁, R₂ et R₃ correspondent à des chaînes alkyle comportant 1 à 6 atomes de carbone.

Le principe et le fonctionnement général du réacteur solide/gaz ont été présentés lors de l'étude bibliographique. Le réacteur que nous avons utilisé lors de cette étude est présenté ci-dessous (photographie 1) ainsi que les flacons de saturation utilisés pour l'évaporation des substrats (photographie 2) et le bioréacteur contenant l'enzyme immobilisée (photographie 3).



Photographie 1 : Le réacteur solide/gaz



Photographie 2 : Flacons de saturation (étuve 1)



Photographie 3 : Bioréacteur (étuve 2)

Le lit catalytique est placé dans un tube en verre possédant un diamètre externe de 6.5 mm et un diamètre interne de 3.5 mm. La longueur du tube est adaptée à la masse de l'enzyme qui varie avec l'enzyme utilisé (type sauvage ou variant) et dépend également des substrats utilisés. Le lit catalytique constitué par les enzymes immobilisées est retenu par deux couches de laine de roche.

Les substrats contenus dans des fioles de saturation sont vaporisés et apportés par le gaz vecteur pour réagir avec la lipase. Pour cela, les différents produits utilisés doivent avoir des points d'ébullition suffisamment bas pour que leur volatilisation (phase indispensable pour travailler en phase gazeuse) puisse être obtenue à des températures comprises entre 35°C et 90°C.

L'activité thermodynamique de ces composés est définie dans le réacteur par le rapport entre la pression partielle des substrats gazeux à l'intérieur du réacteur (Pp_x^n) et la pression de saturation à la température de travail (Pp_{sat}).

$$a_x = \frac{Pp_x^n}{Pp_{sat}} \quad (\text{Eq. 16})$$

Grâce à la valeur de la pression de saturation que l'on peut déterminer pour les différents composés à une température donnée, l'activité thermodynamique des substrats a_x peut être calculée et maintenue tout au long de la réaction en contrôlant la pression partielle de ces substrats. La courbe Pp_{sat} en fonction de la température a été déterminée à partir de l'équation d'Antoine <http://webbook.nist.gov/> et à l'aide du logiciel Curve Fit. Pour les substrats pour lesquels les coefficients d'Antoine n'ont pas été déterminés (heptan-3-ol, octan-3-ol, 1-méthylpentyl propionate) les coefficients d'autres substrats avec des propriétés similaires ont été utilisés (respectivement ceux du heptan-2-ol, octan-2-ol et 1-méthylbutyl propionate).

III.1. Etude de l'influence des mutations au niveau du canal d'accès au site actif

L'acylation du butan-2-ol, du pentan-2-ol, de l'hexan-2-ol, de l'heptan-2-ol, de l'octan-2-ol, de l'hexan-3-ol, de l'heptan-3-ol et de l'octan-3-ol avec le méthyl propionate a été réalisée avec l'enzyme sauvage et les variants Ile189Ala ; Leu278Val et Ala282Leu (10 à 30 mg). Toutes les expériences ont été réalisées à 318 K. Le débit total a été fixé à 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$. Les activités thermodynamiques du méthyl propionate et des alcools secondaires ont été fixées à 0,1 et 0,05, respectivement, à l'exception des expériences réalisées avec l'heptan-3-ol et l'octan-3-ol, pour lesquels les activités thermodynamiques ont été fixées à 0,1 pour l'alcool et 0,2 pour méthyl propionate. Les produits obtenus à la sortie du réacteur sont directement

analysés en Chromatographie Gazeuse (CG) afin de déterminer les activités enzymatiques, ou sont condensés pour analyse ultérieure en vue de la détermination du ratio énantiomérique.

III.2. Etude de l'influence du donneur d'acyle (ester 1)

La réaction d'acylation du (\pm)-pentan-2-ol catalysée par la CALB et le variant Ala282Leu a été réalisée avec plusieurs donneurs d'acyle : méthyl propionate, éthyle propionate, propyl propionate, butyl propionate, pentyl propionate, (\pm)-1-méthylpropyl propionate, (\pm)-1-éthylbutyl propionate, (\pm)-1-méthylpentyl propionate, (*R*)-1-méthylpentyl propionate et (*S*)-1-méthylpentyl propionate. La quantité d'enzyme varie entre 20 et 200 mg en fonction du donneur d'acyle utilisé. La température de la réaction est de 343 K. Le débit total en passant par le réacteur a été fixé à $900 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$. L'activité thermodynamique du donneur d'acyle (ester 1) est de 0,1 et celle de l'alcool est de 0,05. Les produits obtenus à la sortie du réacteur sont condensés afin d'être analysés en CG.

III.3. Détermination des paramètres thermodynamiques

Les paramètres thermodynamiques d'activation de la réaction d'acylation du (\pm)-pentan-2-ol avec le méthyl propionate catalysée par la CALB et ses six variants ont été déterminés en faisant varier la température de 308 à 363 K. La quantité d'enzyme varie entre 5 et 200 mg en fonction du variant utilisé. Les activités thermodynamiques du (\pm)-pentan-2-ol et du méthyl propionate ont été fixées à 0,05 et 0,1, respectivement. Le débit total en passant par le réacteur a été fixé à $800 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$. Les produits obtenus à la sortie du réacteur sont condensés afin d'être analysés en CG.

IV. Analyses par chromatographie en phase gazeuse (CG)

Les produits des réactions menées dans le réacteur solide gaz ont été analysés par un chromatographe en phase gazeuse Agilent 6890 N équipé d'une colonne Chirasil-Dex CB (Chrompack : 25 m * 0,25 mm, épaisseur du film 0,25 μM). Il s'agit d'une colonne capillaire

chirale dont la phase stationnaire est composée de cyclodextrine β et qui permet de séparer les énantiomères *R* et *S* d'un composé. Le chromatographe était équipé d'un injecteur diviseur et d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) permettant la détection de tous les produits. Pour ce dernier, les débits d'hydrogène et d'air étaient respectivement 35 mL.min⁻¹ et 350 mL.min⁻¹. L'azote a été utilisé comme gaz porteur avec un débit constant (entre 1,5 et 2 mLmin⁻¹ d'après les expériences). Les conditions d'injection (température de l'injecteur, de la colonne et du détecteur, débit de d'azote de la colonne, ratio de « split ») varient en fonction du mélange à analyser. Ces conditions ont été reportées dans le tableau 3. Les données quantitatives ont été obtenues par l'intégration sur un intégrateur Agilent 3396 Series III ou sur GC Chemstation Rev B.03.02.

La calibration externe, la détermination des activités, ainsi que la vérification de la vitesse initiale ont été effectuées directement à la sortie du réacteur solide/gaz couplé avec le chromatographe. Les produits sortant du réacteur sous forme de gaz ont été injectés à l'aide d'une boucle (0,25 mL) sur une vanne à six voies (Valco) maintenue à 220 °C. Le ratio de « split » était de 2.

Les calibrations externes des substrats ont été effectuées en programmant dans le bioréacteur des gammes de pressions partielles de ces substrats et en les analysant en CG. Pour les produits (méthanol et esters chiraux), un étalonnage interne a été effectué à l'aide de l'alcool correspondant et le méthyl propionate comme étalons internes.

Pour la détermination précise des valeurs de *E*, les produits en phase vapeur ont été condensés à la sortie du réacteur solide/gaz. Le calcul du ratio énantiomérique n'est pas affecté par cette étape, car les énantiomères ont, par définition, les mêmes points d'ébullition, et par conséquent ils devront se liquéfier à la même vitesse. Les condensats ainsi obtenus ont été analysés en CG après injection manuelle. Le split et le volume d'injection des échantillons ont été modifiés en fonction des expériences respectivement de 2 à 98 et de 0,05 à 10 μ L. Les condensats obtenus avec le 1-méthylpentyl propionate comme donneur d'acyle ont été préalablement purifiés par chromatographie sur gel de silice (éluant : EP/AcOEt : 95/5), afin d'éliminer les alcools, car l'hexan-2-ol libéré au cours de la réaction a un temps de rétention très proche de celui du 1-méthylbutyl propionate produit.

Les pics d'élution du (*R*)-pentan-2-ol et (*S*)-pentan-2-ol ont été identifiés à l'aide du (*R*)-pentan-2-ol pur commercial. Le temps de rétention des produits de réaction a été obtenu en

additionnant les esters racémiques obtenus par voie chimique, comme décrit ci-dessus, et reportés dans le tableau 12. La configuration absolue des produits de réaction a été obtenue à l'aide du produit issu de l'estérification de l'alcool énantiopur commerciale.

Tableau 12 : Conditions d'analyse (températures de l'injecteur, de la colonne et du détecteur, et débit de la colonne) des produits des réactions menées en réacteur solide/gaz, choisis pour permettre une bonne séparation des deux énantiomères de l'ester produit, et temps de rétention de ces énantiomères.

Ester synthétisé	Programme des températures	Débit colonne (en mL.min ⁻¹)	Température de l'injecteur (en °C)	Température du détecteur (en °C)	Temps rétention (en min) de la forme	
					R	S
1-méthylpropyl propionate	55°C pendant 20 minutes	1,5	180	180	7,3	6,4
1-méthylbutyl propionate	Palier à 55°C pendant 15 minutes, puis gradient de 3°C par minute jusqu'à 85°C et palier de 5 minutes à 85°C	1,5	180	180	19,7	17,4
1-méthylpentyl propionate	Palier à 60°C pendant 15 minutes, puis gradient de 3°C par minute jusqu'à 90°C et palier de 5 minutes à 90°C	2	180	180	21,8	18,9
1-méthylhexyl propionate	Palier à 60°C pendant 15 minutes, puis gradient de 3°C par minute jusqu'à 90°C et palier de 5 minutes à 90°C	2	200	200	26,6	25,2
1-méthylheptyl propionate	Palier à 70°C pendant 15 minutes, puis gradient de 3°C par minute jusqu'à 100°C et palier de 5 minutes à 100°C	2	200	200	27,4	26,2
1-éthylbutyl propionate	Palier à 60°C pendant 15 minutes, puis gradient de 3°C par minute jusqu'à 90°C et palier de 5 minutes à 90°C	2	180	180	18,3	17,6
1-éthylpentyl propionate	Palier à 60°C pendant 15 minutes, puis gradient de 3°C par minute jusqu'à 90°C et palier de 5 minutes à 90°C pendant 5 minutes	2	200	200	24,7	24,0
1-éthylhexyl propionate	90°C pendant 17 minutes	2	200	200	14,7	12,7

V. Traitement des données

V.1. Détermination des excès énantiomérique

A partir des résultats de la séparation par CG sur colonne chirale, les excès énantiomériques du substrat (ee_s) et du produit (ee_p) peuvent être calculés à partir des équations (1) et (2) ci-dessous. (R) et (S) représentent les énantiomères substrats, (P) et (Q) les énantiomères produits.

$$\% ee_s = \frac{R-S}{R+S} \times 100 \quad (\text{Eq. 1}) \quad \quad \quad \% ee_p = \frac{P-Q}{P+Q} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

V.2. Détermination du ratio énantiomérique

L'énantiosélectivité d'une enzyme représente la capacité de cette dernière à différencier entre les énantiomères R et S. Elle peut être définie par le rapport des vitesses initiales d'apparition des produits R et S de la réaction (Wescott et Klivanov, 1993) (équation 25)

$$E = \frac{Vi_R}{Vi_S} = \frac{(k_{cat}/K_M)_R}{(k_{cat}/K_M)_S} \quad (\text{Eq. 25})$$

Or, la vitesse initiale peut être calculée à partir de l'aire du produit formé au cours de la réaction selon l'équation 26 (avec n = quantité d'énantiomère produit en moles, K = coefficient de réponse de l'énantiomère produit et t = temps).

$$Vi = \frac{n \text{ énantiomère produit}}{t} = \frac{K \times \text{aire de l'énantiomère produit}}{t} \quad (\text{Eq. 26})$$

Par conséquent E peut être obtenu à partir du rapport des aires des deux énantiomères produit (équation 27) :

$$E = \frac{\text{aire ester R produit}}{\text{aire ester S produit}} \quad (\text{Eq. 27})$$

Le rapport énantiomérique ne peut être déterminé que si la réaction est en vitesse initiale. Afin de vérifier que cette condition est respectée l'évolution de l'aire du produit en fonction du temps de séjour des substrats dans le bioréacteur a été tracée. Le temps de séjour est déterminé à partir du débit molaire des substrats qui est contrôlé par le système informatique

du réacteur solide/gaz et le volume du catalyseur. Nous avons considéré que nous étions en conditions de vitesse initiale, lorsque le temps de séjour choisi pour la réaction d'acylation étudiée se situait dans la partie linéaire de la courbe d'étalonnage.

Pour chaque expérience, la valeur de E a été obtenue en calculant la moyenne de 3 à 5 mesures.

V.3. Calcul des activités

L'activité enzymatique a été calculée à partir de l'équation 28 ci-dessous (avec Pp ester produit la pression partielle de l'ester formé au cours de la réaction en atm ; Q_{tot}^n le débit molaire total en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$; P_a la pression atmosphérique en atm ; m_{enz} la masse de l'enzyme immobilisée en mg et t_{imm} le taux d'immobilisation). Elle correspond au nombre de μmol de produit formé par minute et par mg d'enzyme libre. La pression partielle de l'ester produit a été calculée à partir de l'aire du pic correspondant et de l'aire du pic d'alcool de départ, en utilisant les courbes d'étalons internes et externes. Le taux d'immobilisation correspond au rapport de masse de l'enzyme immobilisée et de la masse de support (en mg). Nous avons supposé que toute l'enzyme utilisée a été immobilisée.

$$\text{activité enzymatique} = \frac{Pp \text{ ester produit} \times Q_{tot}^n}{P_a \times m_{enz} \times t_{imm}} \quad (\text{Eq. 28})$$

V.4. Traitement statistique des données.

V.4.a Analyse de régression par la méthode des moindres carrés

Dans le cadre de l'étude thermodynamique nous avons étudié la variation de E (LnE plus précisément) en fonction de l'inverse de la température selon l'équation 29. Il s'agit d'une relation linéaire de type $y = a \cdot x + b$, avec $x = T^{-1}$ et $y = \text{LnE}$.

$$\text{LnE} = - \frac{\Delta_{R-S}\Delta H^\ddagger}{R} \times \frac{1}{T} + \frac{\Delta_{R-S}\Delta S^\ddagger}{R} \quad (\text{Eq. 29})$$

Afin de tracer la meilleure droite passant par les points expérimentaux et de calculer les incertitudes associées, nous avons utilisé la méthode des moindres carrés. Nous avons considéré, que l'incertitude sur x est négligeable, mais que y est entaché d'erreurs expérimentales aléatoires. L'écart vertical de chaque point à la droite est appelé un **résidu**. La droite calculée par la méthode des moindres carrés est celle qui minimise la somme des carrés des résidus de tous les points.

En pratique, on définit trois grandeurs S_{xx} , S_{yy} et S_{xy} :

$$S_{xx} = \sum (x_i - M_x)^2 = \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{N}$$

$$S_{yy} = \sum (y_i - M_y)^2 = \sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{N}$$

$$S_{xy} = \sum (x_i - M_x)(y_i - M_y) = \sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{N}$$

Où x_i et y_i sont des paires de données, N le nombre de paires et M_x et M_y sont les valeurs moyennes des variables x et y.

On peut en déduire :

- la pente de la droite

$$a = \frac{S_{xy}}{S_{xx}} \text{ qui correspond dans notre cas à } -\frac{\Delta_{R-S}\Delta H^\ddagger}{R}$$

- l'ordonnée à l'origine

$$b = M_y - a M_x \text{ qui correspond dans notre cas à } \frac{\Delta_{R-S}\Delta S^\ddagger}{R}$$

- l'écart-type des résidus

$$S_r = \sqrt{\frac{S_{yy} - m^2 S_{xx}}{N-2}}$$

- l'écart-type de la pente

$$S_m = \sqrt{\frac{S_r^2}{S_{xx}}}$$

- l'écart-type de l'ordonnée à l'origine

$$S_b = S_r \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{N \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}}$$

- le coefficient de corrélation : r ou coefficient de Pearson qui permet d'établir le niveau de validité de la relation entre les deux variables x et y . Plus la valeur de r est proche de 1, plus grande est la probabilité d'une corrélation de linéarité entre les deux variables x et y .

$$r = \frac{N \sum x_i y_i - \sum x_i \sum y_i}{\sqrt{[N \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2][N \sum y_i^2 - (\sum y_i)^2]}}$$

V.4.b Notion d'écart type et d'intervalle de confiance

Les valeurs des termes enthalpique $\Delta_{R-S}\Delta H^\ddagger$ et entropique $\Delta_{R-S}\Delta S^\ddagger$ étant obtenues par des régressions linéaires, il était nécessaire de définir une méthode de calcul des écarts-types adaptée pour ces valeurs afin de contrôler la fiabilité des résultats.

On peut approfondir la signification statistique de l'écart-type (par exemple pour exprimer la précision) à condition d'y associer une limite de confiance (LC). La limite de confiance définit un intervalle de confiance dans lequel la valeur réelle a p % de chance de se trouver. Les calculs théoriques démontrent que l'écart-type doit être majoré par un facteur multiplicatif d'autant plus grand que le nombre de mesures est faible et l'exigence de fiabilité grande :

à une limite de confiance de $p\%$ correspond l'intervalle $= M \pm \frac{ts}{\sqrt{N}}$.

Où : N est le nombre d'observations expérimentales de la grandeur x ;

s est l'écart-type classiquement utilisé $s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - M)^2}{N-1}}$;

M est la moyenne des valeurs expérimentales $M = \frac{\sum_{i=1}^N x_i}{N}$;

t est le t statistique ou t de Student. On trouve dans les ouvrages de statistique des tableaux complets donnant t en fonction de N et des limites de confiance (voir annexe 2). t est donné par la table de Student (voir annexe 2).

Prenons l'exemple du calcul de l'écart-type avec un intervalle de confiance de 95% pour E obtenu avec le variant Ala282Leu à 45°C lors des expériences menées pour déterminer les paramètres thermodynamiques d'activation. Les 4 valeurs de E trouvées sont : 205,7 ; 201,8 ;

199,0 et 208,3, d'où $M = 203,7$ et $s = 4,1$. Donc, à une limite de confiance de 95% correspond l'intervalle $= 203,7 \pm \frac{3,82 \times 4,1}{\sqrt{4}} = 203,7 \pm 7,8$. Cela signifie que la valeur de E a 95% de chance de se trouver entre 195,9 et 211,5.

VI. Détermination des isothermes de sorption

L'isotherme de sorption de l'eau sur le Chromosorb seul et avec la lipase immobilisée a été mesurée à 25 °C à l'aide d'un DVS Advantage analyseur de sorption d'humidité automatisé (Surface Measurement Systems Ltd., Londres, Royaume-Uni) (figure 25) entre 0 et 95% d'humidité relative. Les échantillons ont d'abord été séchés pendant 10 h à 25 °C sous flux d'air complètement sec dans le DVS analyseur de sorption d'humidité afin d'obtenir la masse de l'échantillon sec de départ. Le taux d'humidité requis est généré par mélange de flux de gaz sec et de flux de gaz saturé en vapeur d'eau dans des proportions correctes à l'aide de deux contrôleurs de débit massique et un humidificateur. L'instrument a été réglé avec un dm/dt (m, la masse; t, temps), fixé à $0,002\% \text{ min}^{-1}$ pour atteindre l'équilibre. Cela signifie que l'humidité relative reste constante jusqu'à ce que la variation de masse soit inférieure à ce seuil pendant plus d'une minute. Une fois cette condition a été atteinte, l'humidité relative du système a été augmentée ou diminuée au niveau suivant.

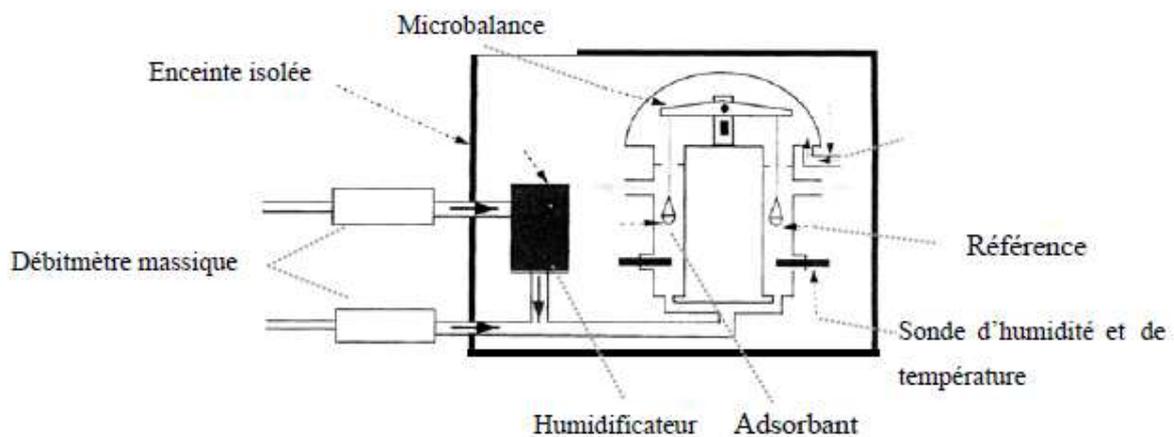


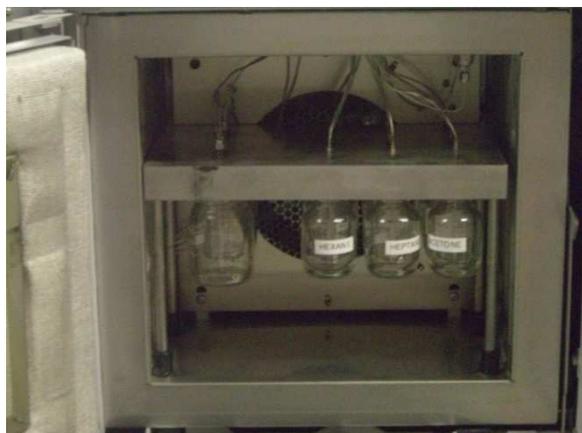
Figure 25 : principe de la DVS (Fetsch, 2000).

VII. Expériences en chromatographie en phase inverse (IGC)

Les expériences ont été effectuées à l'aide d'un appareil SMS-IGC2000 (Surface Measurement Systems Ltd., Londres, Royaume-Uni), permettant de déterminer les interactions de dix différentes molécules sondes gazeuses (neuf au choix et le méthane) avec le solide à étudier (Chromosorb seul ou avec la CALB immobilisé dans notre cas) empaqueté dans une colonne en verre, pour une large gamme d'humidité et de température. Le principe et le fonctionnement général de l'appareil ont été présentés lors de l'étude bibliographique. L'appareil comporte quatre modules (photographie 4): un ordinateur contrôlant les autres modules et permettant la sauvegarde des chromatogrammes ; un module contenant les débitmètres massiques ; un CG Agilent HP 6890 modifié avec la partie étuve transformé en chambre d'échantillonnage et humidificateur (photographie 5) et comportant un détecteur à conductivité thermique (TCD) et un FID pour l'analyse ; une deuxième étuve permettant l'installation de deux colonnes (photographie 6). L'appareil a été conçu pour accepter des colonnes de 30 cm de longs et de 6 mm de diamètre externe. Le diamètre interne (ID) de la colonne en verre traité DMCS utilisée peut varier entre 2 à 4 mm en fonction de la quantité du solide à analyser.



Photographie 4 : Appareil IGC



Photographie 5 : Chambre d'échantillonnage et humidificateur (étuve 1) : flacons contenant les différentes sondes (à droite) et l'eau (à gauche).



Photographie 6 : Intérieur de la deuxième étuve contenant deux colonnes en verre.

Le gaz vecteur utilisé était l'hélium. Lors des expériences, son débit était réglé à $10 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. $250 \mu\text{L}$ du mélange gazeux (hélium, molécule sonde et vapeurs d'eau éventuellement) sont injectés sur la colonne (ID 4 mm) comportant le support seul ou la CALB immobilisée (30 mg d'enzyme Chirazyme L-2 lyophilisée pour 6 g de support Chromosorb P AW DMCS). Le taux d'humidité requis est généré par mélange de flux de gaz sec et de flux de gaz saturé en vapeur d'eau dans des proportions correctes à l'aide de deux contrôleurs de débit massique. Le flux de gaz saturé en vapeur d'eau est obtenu par bullage du gaz sec dans un flacon contenant de l'eau (humidificateur). L'étuve contenant l'eau et les sondes était réglée à 35°C . A la sortie de colonne, le gaz a été analysé par détecteur à conductivité thermique (TCD) et par FID montés en série et portés à 250°C . Pour ce dernier, les débits d'hydrogène et d'air étaient respectivement $35 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ et $350 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Pour le TCD, l'hélium sec a été utilisé comme référence avec un débit de $15 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Les données ont été enregistrées à l'aide de la Chemstation Rev A.10.02, puis analysées à l'aide d'un logiciel fourni avec l'appareil et intégré à Excel (IGC Analysis Macros, version 1.4). Les volumes morts d'élution (t_0) ont été obtenus avec le méthane injecté dans les conditions de l'expérience à concentration $p/p^0 = 0,1$ (p et p^0 étant respectivement la pression partielle et la pression saturante du composé, ici le méthane).

Entre chaque expérience, la colonne contenant le solide a été portée à 70°C avec un débit de gaz vecteur de 20 mL.min⁻¹, dans le but de décrocher les molécules de sondes et d'eau éventuellement fixées et de retrouver des conditions de départ identiques. Ensuite, avant chaque expérience nous avons procédé au pré-conditionnement de la colonne en laissant pendant 10 heures à l' a_w et à la température initiale de travail.

VII.1. Détermination des énergies de surfaces spécifiques et dispersives.

Pour obtenir les énergies de surface spécifiques et dispersives de la CALB immobilisée et du support seul, différentes molécules de sondes polaires (acétonitrile, chloroforme, éthanol, éthyl acétate et 1,4-dioxane) et apolaires (n-heptane, n-octane, n-nonane, n-décane et n-undécane) en phase vapeur ont été injectées ($p/p^0 = 0,025$) à des températures comprises entre 313 et 338 K (tableau 13). p et p^0 correspondent respectivement à la pression partielle de l'alcool dans le mélange gazeux et la pression de vapeur saturante de l'alcool, obtenues en supposant un comportement des gaz parfait selon la formule $p^0(T) = e^{(-\Delta H_{vap}/RT)}$. Par ailleurs, afin d'étudier l'influence de l'eau sur ces énergies, nous avons réalisé ces expériences à différentes a_w comprises entre 0 et 0,4.

VII.2. Détermination de l'enthalpie d'adsorption

Les enthalpies d'adsorption du pentan-2-ol et de l'hexan-3-ol sur la CALB immobilisée (530 et 500 mg respectivement) ont été déterminées à l'aide de l'IGC. Avant les mesures, la colonne comportant le biocatalyseur immobilisé a été pré-conditionnée pendant 10 heures à la température initiale et a_w étudiées. Ensuite, 250 μ l de pentan-2-ol et de hexan-3-ol à $p/p^0 = 0,05$ ont été injectés à différentes températures variant : entre 308 et 324 K pour $0 < a_w < 0,15$ et entre 314 et 322 K pour les valeurs a_w supérieures dans le cas du pentan-2-ol ; entre 314 et 322 K pour toutes les a_w dans le cas de l'hexan-3-ol.

Tableau 13 : Caractéristiques des sondes n-alcane et polaires utilisées dans l'IGC : aire moléculaire (a), la tension de surface (γ) à 20 °C, nombre accepteur d'électrons de Fowkes (AN*) et nombre donneur d'électrons de Gutman (DN).

Les paramètres AN* et DN permettent de définir la nature acide et basique des sondes (selon la définition de Lewis). DN (en kcal.mol⁻¹) mesure l'énergie d'une liaison de coordination entre un atome donneur et l'acide de Lewis de référence, SbCl₅, dans une solution de 1,2-dichlorométhane (Gutman, 1978). AN (nombre sans dimension) est dérivé des déplacements chimiques relatifs du spectre RMN de l'atome ³¹P de la base de référence Et₃PO₄ dissoute dans l'acide de travail. AN* (en kcal.mol⁻¹) correspond à une correction des valeurs d'AN, en considérant la valeur de l'AN du Et₃PO₄ égal à 40 kcal.mol⁻¹ (Riddle et Fowkes, 1989).

Sonde	a (en m ²)	γ_L^D (en J.m ⁻²)	AN* (en kcal.mol ⁻¹)	DN (en kcal.mol ⁻¹)
acétonitrile	2,15 E-19	0,0275	4,7	14,1
1,4-dioxane	3,14 E-19	0,0250	0	14,8
éthyl acétate	3,3 E-19	0,0196	1,5	17,1
éthanol	3,53 E-19	0,0211	10,3	19,0
chloroforme	4,4 E-19	0,0332	5,4	0
n-heptane	5,73 E-19	0,0203	-	-
n-octane	6,3 E-19	0,0213	-	-
n-nonane	6,9 E-19	0,0227	-	-
n-décane	7,5 E-19	0,0234	-	-
n-undécane	8,1 E-19	0,0246	-	-

VIII. Etude par modélisation moléculaire

Les études de modélisation moléculaire ont été réalisées à l'aide du logiciel Discovery Studio version 1.6, 1.7 ou 2.1 (Accelrys Inc., San Diego, CA). Les figures présentées ont été obtenues avec Discovery Studio Visualizer version 2.0 (Accelrys Inc., San Diego, CA). Les minimisations, les simulations de la dynamique moléculaire (MD) et les calculs énergétiques ont été réalisés à l'aide du champ de force CHARMM appliqué à tous les atomes (MacKerell et al. 1998). Les surfaces accessibles aux solvants de 1,4 Å ont été calculées selon la méthode de Connolly (Connolly, 1983).

VIII.2. Optimisation des structures

Une fois les intermédiaires tétraédriques construits ils ont été optimisés par deux minimisations successives. Lors de la première minimisation de 10000 itérations selon l'algorithme Steepest Descent (SD) tous les atomes du squelette ont été fixés. L'intermédiaire tétraédrique et les chaînes latérales des résidus ont été libres de bouger. Lors de la deuxième minimisation seuls les atomes de carbone alpha des résidus éloignés du site actif ont été maintenus fixes. Les résidus Pro38-Phe48, Ile66-Thr76, Thr103-Leu109, Phe131-Ala162, Ser184-Gln193, Ile222-Ala225 et Ala275-Asn292, dont la grande majorité participe à la formation de la cavité, ont été laissés libres. Les minimisations ont été stoppées une fois que la variation de *rmsd* (écart quadratique de la moyenne de déviations ou Root Mean Square Deviation) entre deux conformations successives était inférieure ou égale à 0,01. Les deux séries de minimisations ont été réalisées dans le vide (constant diélectrique de 1) et sans modèle de solvation. Pour toutes les structures obtenues, l'énergie potentielle de l'ensemble enzyme-seconde intermédiaire, l'énergie potentielle de l'alcool et l'énergie d'interaction entre les atomes de l'alcool et de l'enzyme ont été calculées. Pour simplifier les calculs les atomes au delà de 12 Å n'ont pas été pris en compte.

VIII.3. Etude *in silico* des résidus bordant l'entrée du site actif

La structure cristallographique de l'enzyme vide (PDB ID: 1TCA) a été utilisée. Une recherche systématique des rotamères des résidus Ile189, Leu278, Ala282 et Ile285, seuls ou combinés entre eux, a été effectuée en utilisant la banque de rotamères de Richardson (Lovell et coll., 2000). Pour chaque modification de rotamères, l'énergie potentielle instantanée des conformations enzymatiques a été calculée. Les conformations présentant une augmentation très importante de cette énergie par rapport à la structure de départ (causée par une gêne stérique importante entre le rotamère modifié et les résidus environnants, gêne considérée comme difficile à résoudre par l'optimiseur mathématique) ont été écartées. Tous les rotamères induisant une modification assez faible de l'énergie potentielle instantanée ont été superposés, et le volume de cet ensemble a été calculé en utilisant la surface de Connolly (Connolly, 1983).

VIII.4. Structure de la deuxième intermédiaire tétraédrique formé (*R*)-heptan-3-ol

La structure du deuxième intermédiaire tétraédrique formé (*R*)-heptan-3-ol, le complexe enzyme-(*R*)-1-éthylpentyl propionate, a été obtenue à partir d'une structure précédemment obtenue avec le (*S*)-hexan-3-ol, le complexe enzyme-(*S*)-1-éthylbutyl propionate, par des modifications manuelles suivie d'une minimisation selon l'algorithme SD (variation rmsd \leq 0,01). Cette dernière structure a été obtenue à partir de la structure cristallographique de la CALB par construction manuelle, comme décrit ci-dessus. Puis elle a été optimisée par simulation MD réalisée en adoptant un seuil de coupure sphérique de 12 Å, en utilisant l'ensemble isotherme-isochore (NVT) (Berendsen et coll., 1984) et sans solvant. Le protocole de " Standard Dynamique Cascade" de DS 1.6 a été utilisé, avec un pas de 1 fs : le complexe a été minimisé par deux minimisations successives selon l'algorithme SD (2500 itérations) puis Adopted Basis NR (2500 itérations) ; la température du système a été portée de 50 à 400K sur 2 ps ; après une courte équilibration (1 ps), un cycle de production de 10 ps a été réalisé à 400K. Les atomes du squelette ont été maintenus fixes pendant la simulation. En plus, les atomes de la chaîne latérale de la Thr40 ont été fixés pour conserver la liaison hydrogène formée avec l'atome oxyanion de l'intermédiaire tétraédrique.

Résultats et discussion

Chapitre A. Explications structurales de l'énantiosélectivité

La lipase B de *Candida antarctica* (CALB) est souvent utilisée dans la synthèse asymétrique afin d'obtenir des produits de grande pureté. Elle est particulièrement adaptée aux réactions de transestérification et d'hydrolyse faisant intervenir des alcools secondaires chiraux (Öhrner et coll., 1996 ; Rotticci et coll., 1997 ; Orrenius et coll., 1998a ; Patel et coll., 2000 ; Léonard et coll., 2007). Au début des années 90, l'énantiosélectivité de l'enzyme était prédite selon des méthodes empiriques. Ainsi Kazlauskas et son équipe (1991) ont proposé une loi permettant de déterminer l'énantiomère préféré par l'enzyme (Figure 11). De plus, ils ont postulé que l'énantiosélectivité des lipases dépendait de la taille respective des substituants moyen (M) et gros (L) portés par le stéréocentre (Figure 11) : plus la différence entre les substituants était élevée plus l'énantiosélectivité était importante.

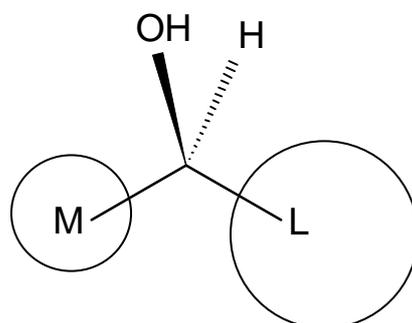


Figure 11 : Représentation schématique d'un alcool secondaire selon Kazlauskas. M pour le substituant de taille moyenne et L pour le substituant le plus gros. La figure montre l'énantiomère préféré par les lipases de *Pseudomonas cepacia* et *Candida rugosa* (Kazlauskas et coll., 1991).

La structure cristallographique de CALB a été déterminée par Uppenberg (Uppenberg et coll., 1994). Cette enzyme possède une triade catalytique (Ser105, His224 et Asp187) et un trou oxyanionique (Thr40 et Gln106) enfouie au cœur de l'enzyme. Sa structure co-cristallisée avec un inhibiteur phosphate, le *n*-hexylchlorophosphate éthyl ester, suggère l'existence au sein du site actif d'une petite poche délimitée par les résidus Thr42, Ser47 et Trp104. Cette cavité est appelée poche énantiosélective et elle est supposée être responsable de l'énantiosélectivité de CALB vis-à-vis des alcools secondaires (Uppenberg et coll., 1995).

Avec la détermination de la structure cristallographique une nouvelle possibilité d'étude pour prédire l'énantiosélectivité de la CALB s'est offerte : celle de la modélisation moléculaire. Ces études ont été réalisées selon trois approches : quantique, empirique ou mixte.

a) Les approches quantiques (*ab initio*) ont été développées en se basant sur le caractère ondulatoire des électrons et l'équation de Schrödinger. Les techniques de la mécanique quantique (MQ) considèrent chaque électron séparément et nécessitent beaucoup de calcul et par conséquent beaucoup de temps. De nombreuses approximations ont été faites pour simplifier ces calculs. Par exemple dans les méthodes appelées semi-empiriques seuls les électrons externes sont traités. Le noyau et les électrons des couches internes sont alors paramétrés d'après des données expérimentales ou des calculs *ab initio* (Szabo et Ostlund, 1996 ; Hæffner et Norin, 1999). Néanmoins ces types de calculs restent peu adaptés pour des systèmes importants, tels que les enzymes. Pour l'étude des réactions enzymatiques (étude de la formation ou de la rupture d'une liaison), il est préférable d'utiliser des modèles où le site catalytique et le substrat sont remplacés par des petites molécules. Ainsi dans les études des réactions catalysées par la CALB, l'équipe de professeur Hult a représenté la triade catalytique par le méthanol, l'imidazole et l'ion formate, l'ester par le méthyl formate et des molécules d'eau pour le trou oxyanionique (Hu et coll., 1998 ; Hæffner et coll., 1998 ; Branneby et coll., 2003 ; Carlqvist et coll., 2003). En outre des études de mécanismes réactionnelles, les études de MQ ont été utilisées pour déterminer l'orientation des substrats ou les charges partielles de l'intermédiaire tétraédrique (Hæffner et Norin, 1999; Carlqvist et coll., 2003 ; Branneby et coll., 2003 ; Kwon et coll., 2007).

b) Les méthodes empiriques ont été développées pour l'étude des systèmes de grande taille, tels que les enzymes. Une molécule est assimilée, en première approximation, à un ensemble d'atomes liés par des liaisons covalentes et elle est caractérisée par les paramètres internes : longueurs de liaison, angles de valence et angles dièdres. L'ensemble des fonctions analytiques basées sur ces paramètres internes (champs de forces) permettent d'évaluer l'énergie potentielle d'une conformation donnée. En utilisant un optimiseur mathématique, on peut faire varier ces paramètres internes pour minimiser l'énergie potentielle et rechercher les conformations les plus stables (relation de Boltzmann). Ce schéma s'applique aussi bien à une molécule isolée qu'à un ensemble de molécules. Lorsque que l'on veut prendre en compte l'évolution temporelle d'un système moléculaire, les équations de mouvement de Newton sont appliquées à tous les atomes avec les fonctions analytiques du champ de forces (dynamique moléculaire (MD)) (Karplus et Petsko, 1990).

De nombreuses études de modélisation moléculaire réalisées avec la CALB et faisant intervenir des alcools secondaires, ont été réalisées selon cette approche (Hæffner et coll., 1998 ; Orrenius et coll., 1998 a,b ; Rotticci et coll., 1998 ; Raza et coll., 2001 ; Ottoson et coll., 2002 ; Léonard et coll. 2007). De plus, des études avec d'autres substrats peuvent également être citées. On peut ainsi trouver des études qui ont pour but la compréhension de l'énantiosélectivité des amines (Öhrner et coll., 1996), des esters chiraux tel que (\pm)-cis-4-acetamido-cyclopent-2-ène-1-éthyl acétate (Kwon et coll., 2007) ou des substrats moins conventionnels comme le 3,4-dihydroxypiperidine (Solares et coll., 2006).

Souvent, les structures cristallographiques, ont été obtenues avec des substrats très différents de ceux étudiés ou ne contiennent pas de tout de substrat. Par conséquent elles ne permettent pas de déduire l'orientation du substrat. Dans des telles situations il est utile de faire appel à une méthode, dite d'arrimage ('docking'). Cette technique empirique constitue un cas particulier, car au-delà des paramètres internes de chaque molécule, il faut prendre en compte le positionnement relatif des 2 molécules (6 degrés de liberté). Lors de la minimisation qui se fait sur l'ensemble du système, on peut distinguer 3 termes énergétiques : l'énergie de chacune des molécules et l'énergie d'interaction. Les méthodes de 'docking' sont basées sur l'exploration du site catalytique par une multitude d'orientations possibles du substrat. Les différentes orientations sont ensuite classées, généralement selon les énergies d'interaction avec l'enzyme, et seules les meilleures structures seront retenues. De telles études ont été réalisées avec des aldéhydes ou des cétones (Carlqvist et coll., 2003 ; Branneby et coll., 2004), des flavonoïdes glycosylés (De Oliveira et coll., 2009), des diols primaires asymétriques (Oger et coll., 2010) ou le 2-méthyl-2-nitro-5-oxohexanoate (Strohmeier et coll., 2009). Les premières méthodes de 'docking' présentaient un inconvénient majeur : seul le substrat était flexible et l'enzyme était fixe. De ce fait, les modifications structurales de l'enzyme pour s'adapter au substrat ne pouvaient pas avoir lieu. Pour pallier à ce problème, des nouvelles techniques de 'docking' sont développées, incluant la flexibilité de l'enzyme. Par exemple, l'équipe de Pleiss a mis au point une technique selon laquelle un 'pré-arrimage' est réalisé, l'enzyme avec le substrat 'pré-arrimé' est minimisée, puis le substrat est de nouveau 'arrimé' dans cette structure enzymatique porteur de l'empreinte du substrat (Juhl et coll., 2009).

c) Les approches mixtes mécanique quantique/ mécanique moléculaire (MQ/MM). Lors de ces études, seuls les atomes d'intérêt sont traités par mécanique quantique et le reste par mécanique moléculaire (Warshel et Levitt, 1976). Le mécanisme

d'action des sérine protéases et des métallo-enzymes a été étudié avec succès par la méthode MQ/MM (Dagett et coll., 1991 ; Merz et coll., 1996 ; Colombo et coll., 1999 ; Colombo et coll., 2000). A notre connaissance il n'y a pas eu d'étude de MQ/MM avec CALB.

A l'issue des travaux de modélisation réalisés avec la CALB, un consensus semble apparaître concernant l'orientation des alcools secondaires au sein du site actif. Orrenius et ses collaborateurs décrivent deux modes de fixations possibles pour chaque énantiomère avec le substituant L dirigé vers la surface, mode I, ou vers la poche énantiosélective, mode II (Orrenius et coll. 1998a). Ces orientations sont schématisées sur la figure 27. Pour l'énantiomère *R*, ceux ayant leurs substituants M ou L orientés vers l'intérieur de l'enzyme ont été envisagés. Le mode de fixation où le substituant L est dirigé vers la poche énantiosélective (mode II) est considéré comme non productif car la liaison hydrogène catalytique entre l'histidine 224 et l'oxygène de l'alcool est absente. Dans le cas du butan-2-ol et du pentan-2-ol, les auteurs ont constaté une exception à cette règle. En effet, pour la forme *R*, cette liaison est présente en mode I et II. Par ailleurs l'énergie potentielle du substrat est largement défavorisée par rapport à celle où c'est le substituant M qui est orienté vers la poche énantiosélective et le groupement L vers l'extérieur (mode I) (Orrenius et coll., 1998a). Ce dernier correspond à l'énantiomère décrit par Kazlauskas comme étant privilégié par l'enzyme (Kazlauskas et coll., 1991). C'est également le mode d'orientation utilisé dans les études plus récentes.

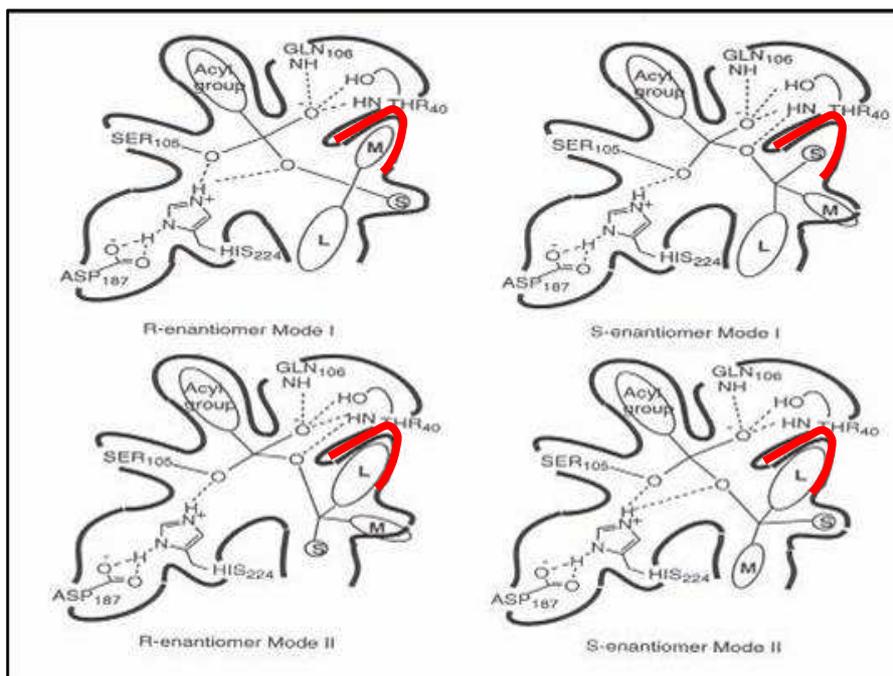


Figure 27 : Les deux modes de fixation des énantiomères. La poche énantiosélective est surlignée en rouge. Les modes productifs sont le mode I pour l'énantiomère *R* et le mode II pour l'énantiomère *S* (d'après Hæffner et coll., 1998).

Les orientations envisagées par Orrenius pour l'énantiomère *S* sont celles où le substituant *L* est orienté soit vers l'extérieur soit vers le fond de la poche énantiosélective (mode I et II respectivement) (figure 27). Comme pour l'énantiomère *R*, seul un des deux modes permet l'établissement de la liaison hydrogène entre l'histidine catalytique et l'atome d'oxygène de l'alcool secondaire, et qui est ainsi considéré productif : le mode II. Dans ce mode, la poche énantiosélective est occupée par le substituant *L* et le substituant *M* est orienté vers l'extérieur. Ceci correspond à une permutation *M/L* par rapport au mode productif de l'énantiomère *R*, suggéré par le modèle généraliste de Kazlauskas (Kazlauskas, 2000) (Figure 4). Bien que les auteurs soient d'accord pour l'orientation de l'énantiomère privilégié, pour la forme non privilégiée d'autres orientations ont été envisagées. Par exemple la structure cristallographique de la lipase de *Candida rugosa* montre une permutation *H/O* (Zuegg et coll., 1997) et les études de Nakamura et son équipe avec la lipase de *Bulkhoderia cepacia* suggèrent une permutation *M/H* (Nakamura et coll., 1994 ; 1996). Une étude récente avec CALB montre qu'une permutation *M/H* est possible avec certains substrats (Xu et coll., 2010) (Figure 28). Un troisième mode de fixation a également été envisagé par l'équipe de Pleiss pour la lipase de *Pseudomonas cepacia*, mais dans ce mode le groupement *L* serait orienté

vers la Leu17 et Thr18, équivalents à la Thr40 et Gly41 de la CALB, et de ce fait serait stériquement défavorisé (Schulz et coll., 2000).

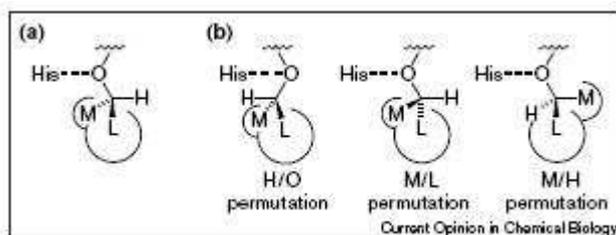


Figure 28 : Propositions des orientations "catalytiquement" productives des alcools secondaires chiraux au sein du site actif des lipases. (a) orientation décrite dans la littérature pour l'énantiomère privilégié (énantiomère *R*, lorsque le groupement M ne comporte pas de substituant impliquant un changement d'ordre selon la règle de Cahn-Ingold-Prelog). (b) plusieurs orientations ont été proposées pour l'énantiomère défavorisé (énantiomère *S*) (Kazlauskas, 2000).

Au vu de ces résultats, il est possible que d'autres orientations des substrats que ceux précédemment étudiés dans la littérature existent. Pour vérifier cette hypothèse, une étude systématique des différentes orientations du butan-2-ol et du pentan-2-ol a été menée, en modélisant le second intermédiaire tétraédrique formé par ces alcools avec l'enzyme. Ces structures ont été optimisées par deux minimisations successives, avec un nombre croissant de degrés de libertés croissantes. Nous avons commencé par classer les structures minimisées en fonction de l'orientation finale du substrat afin d'éliminer les structures les moins stables, donc peu probables. Ensuite, en se basant sur des critères structuraux, tels que la distance, nous avons regardé si ces structures étaient productives ou pas. Puis, nous avons regardé si les structures non productives étaient associées à un mode de fixation. Le mode de fixation privilégié a également été recherché, en effectuant des comparaisons selon des énergies potentielles et d'interaction moyennes ou selon les énergies des structures les plus stables pour chaque forme. Le but final des études de modélisation est de pouvoir prédire quantitativement l'énantiosélectivité. Généralement la modélisation permet de prédire quel énantiomère sera privilégié par l'enzyme, mais il reste difficile de relier ces résultats à des valeurs d'énantiosélectivité (Kazlauskas, 2000). Afin de corréler les résultats de la modélisation avec ceux issus de l'expérience, deux approches ont été envisagées. Lors de la première approche les structures étaient considérées comme équiprobables. Dans ce cadre, nous avons vérifié si les structures de la forme *R* étaient plus nombreuses, si les structures non productives étaient plus fréquentes pour l'énantiomère non privilégié (*S*) ou si les distances catalytiques étaient plus courtes pour un des formes. Pour la seconde approche, un deuxième

critère énergétique a été appliqué afin de sélectionner les meilleures structures. Ce terme énergétique a été utilisé pour différencier les deux formes *R* et *S*, et de déterminer ainsi l'énantiosélectivité de la CALB. Par ailleurs, la déformation du substrat au sein du site actif a été analysée. Ces résultats seront discutés ci-dessous.

A.I. Construction des complexes enzyme-substrats

D'après le mécanisme réactionnel de la CALB (cf. étude bibliographique figure 6), la discrimination entre les deux formes *R* et *S* se fait lors de la formation du second état de transition, l'alcool n'étant pas présent dans le premier état de transition. Le second intermédiaire tétraédrique est structuralement et énergétiquement très proche de ce second état de transition (Hu et coll., 1998) et dans une première approximation il constitue un bon modèle de l'état de transition (Warshel et coll., 1989). Par ailleurs le second intermédiaire tétraédrique a déjà été utilisé avec succès lors des travaux de modélisation par l'équipe du professeur Hult (Orrenius et coll., 1998 a ; Raza et coll., 2001).

Selon ce qui était décrit précédemment (cf. étude bibliographique) l'énantiosélectivité est causée par la différence d'énergie d'activation observée entre l'état initial, identique pour les deux formes, et l'état de transition correspondant pour les formes *R* et *S* de l'alcool secondaire (figure 29). Ainsi le ratio énantiomérique (*E*) peut être relié à la différence d'énergie libre des deux états de transition ($\Delta_{R-S}\Delta G^\ddagger$) selon l'équation suivante (équation 30) :

$$\Delta_{R-S}\Delta G^\ddagger = -RT\ln E = -RT\ln \frac{(k_{cat}/K_M)_R}{(k_{cat}/K_M)_S} \quad (\text{Eq. 30})$$

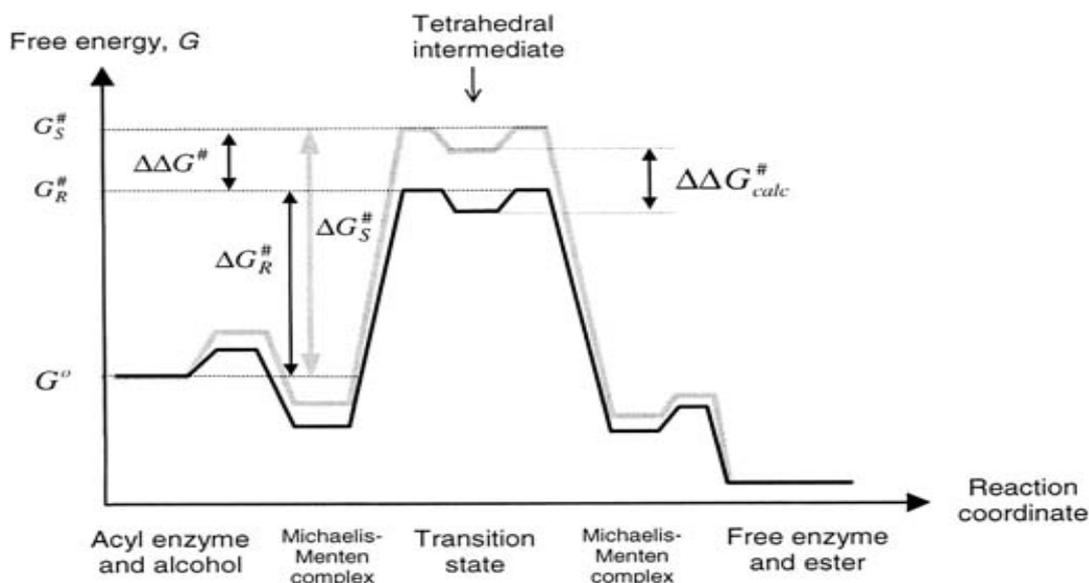


Figure 29 : Variation de l'énergie libre pour la conversion de l'acyl-enzyme de la sérine hydrolase et de l'alcool à l'enzyme libre et l'ester. La figure montre les profils énergétiques pour l'énantiomère *R* rapidement transformé (trait foncé) et pour l'énantiomère *S* lentement transformé (trait claire) du substrat. L'énergie de l'état fondamentale des réactifs, G^0 , est la même pour les deux énantiomères. Les énergies libres d'activation des énantiomères *R* et *S* sont données par ΔG_R^\ddagger et ΔG_S^\ddagger , respectivement, et les énergies libres absolues pour les états de transition correspondants sont donnés par G_R^\ddagger et G_S^\ddagger . La différence d'énergie libre entre l'état de transition et les intermédiaires tétraédriques correspondants est négligeable (Hu et coll., 1998). Par conséquent, $\Delta\Delta G^\ddagger$ peut être estimée par la différence des énergies libres absolues entre les intermédiaires tétraédriques des énantiomères *R* et *S*, $\Delta\Delta G_{calc}^\ddagger$. (Raza et coll., 2001)

Selon Burkert, les termes translationnels et rotationnels de l'énergie libre de Gibbs ne permettent pas de différencier énergétiquement deux isomères. La différence de la composante vibrationnelle de l'énergie entre deux isomères est négligeable par rapport l'énergie potentielle (Burkert et coll., 1982). Le champ de force nous donne accès à la différence de l'énergie potentielle. Ce terme énergétique constitue une bonne approximation de la composante enthalpique de l'énergie libre de Gibbs. Par conséquent, dans un système où l'entropie a peu d'influence sur l'énantiosélectivité, la différence observée entre les énergies stériques calculées par le champ de force ($\Delta\Delta V^\ddagger$) sera très proche de la différence de l'énergie libre ($\Delta\Delta G^\ddagger$) (Hæffner et coll., 1998) (figure 29).

Le second intermédiaire tétraédrique utilisé pour la suite des études a été construit à partir de la structure cristallographique de l'enzyme vide (PDB ID: 1TCA (Uppenberg et coll., 1994).

La structure de l'enzyme sans substrat a été préférée à une structure comportant un inhibiteur phosphate, formant un complexe tétraédrique avec CALB par liaison covalente à la Ser105 (PDB ID: 1LBS (Uppenberg et coll., 1995), car sa résolution est meilleure (1.55 Å pour 1TCA et 2.6 Å pour 1LBS). Néanmoins ce dernier a été utilisé comme modèle pour l'orientation respective des parties acyle et alcool au sein du site actif. Ainsi le groupement propionyle a été dirigé vers les résidus Ile189 et Gln157 formant avec d'autres résidus hydrophobes la poche acyle. Une attention particulière a été portée sur l'orientation de l'oxygène du groupement carbonyle (oxyanion). Ce dernier a été orienté vers le trou oxyanionique formé par le Thr40 et Gln106. Afin d'optimiser les interactions avec l'oxyanion, l'hydrogène du groupement hydroxyle de la Thr40 a été réorienté pour former une liaison hydrogène avec l'oxyanion. La partie acyle étant très courte, seule l'orientation du groupement CH₃ reste à être optimisée. En effet, selon l'angle dièdre formé par les atomes O_CC₁C₂C₃, trois orientations peuvent être envisagées pour ce groupe, l'angle dièdre prenant alors les valeurs de -60°, +60° et 180°. Une étude préliminaire a montré que l'orientation du groupement méthyle selon un angle de -60°, conduit à des structures plus stables, par conséquent, c'est cette orientation qui a été retenue pour la construction (Figure 30).

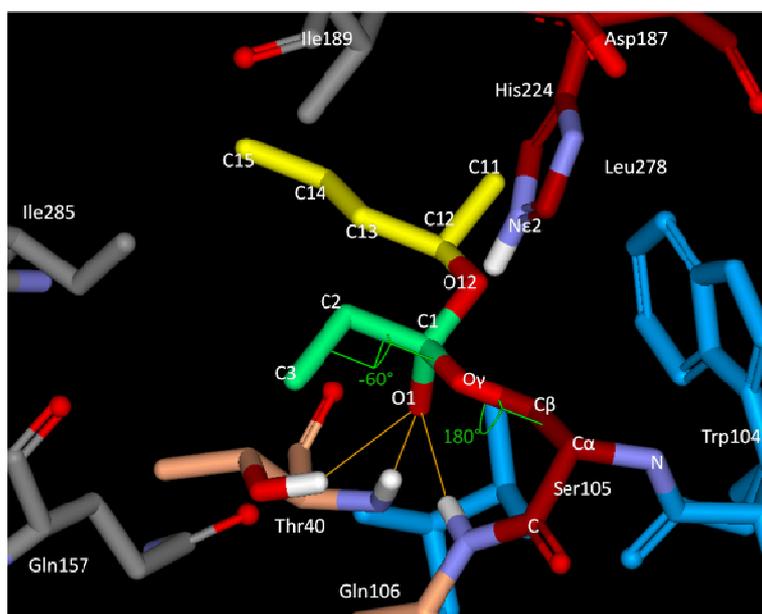


Figure 30 : Orientation du groupement propionyle lors de la construction de l'intermédiaire tétraédrique. La chaîne carbonée (en vert) a été dirigée vers la poche acyle. L'oxyanion est stabilisé par le trou oxyanionique (Thr 40 et Gln106, en saumon). Les liaisons hydrogène formées avec les résidus du trou oxyanionique sont représentées par des traits oranges. Les résidus de la triade catalytique sont en rouge foncé et les résidus de la poche énantiosélective en bleu. Seuls les atomes d'hydrogène d'intérêt sont visibles.

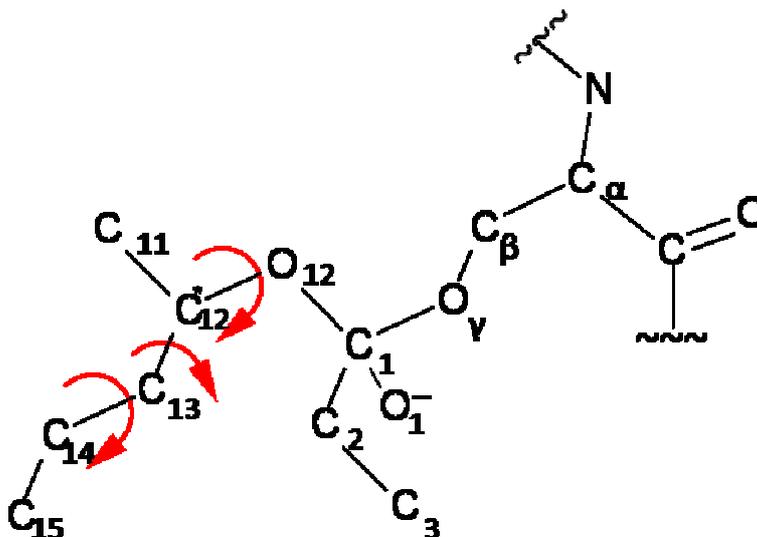


Figure 31 : Intermédiaire tétraédrique formé avec le pentan-2-ol. Pour plus de simplicité les atomes d'hydrogène ne sont pas représentés. Les flèches rouges représentent les dièdres qui ont été modifiés lors de l'exploration systématique des conformations.

Les seconds intermédiaires tétraédriques formés avec le (*R*)-pentan-2-ol ont été construits manuellement à partir de la sérine catalytique 105 acylée, en allongeant la molécule vers la partie alcool du site actif. La liaison de l'alcool secondaire à l'acyl-enzyme se fait par liaison covalente entre C_1 sp^3 du propionyle et O_{12} de l'alcool (Figure 30 et 31). La liaison entre O_{12} et le carbone asymétrique C_{12} est telle que les doublets libres de l'oxygène puissent participer à une liaison hydrogène avec l'histidine catalytique. Lors de la construction, trois degrés de libertés supplémentaires ont été introduits : les dièdres $C_1O_{12}C_{12}C_{11}$, $O_{12}C_{12}C_{13}C_{14}$ et $C_{12}C_{13}C_{14}C_{15}$ (Figure 31). Dans ce cas, l'absence de double liaison conduit à une exploration systématique avec 3 conformations par dièdre (180° , $+60^\circ$ et -60° , correspondant à des conformations décalées) soit en tout 27 ($3 \times 3 \times 3$) conformations à tester. Afin de balayer les trois orientations possibles au sein du site catalytique pour le (*R*)-pentan-2-ol, avec respectivement le méthyle (substituant M), propyle (substituant L) ou l'hydrogène orienté vers la poche énantiosélective, l'angle dièdre $C_1O_{12}C_{12}C_{11}$ a été modifié. Néanmoins en respectant strictement les valeurs de -60° , $+60^\circ$ ou $+180^\circ$ pour tous les angles dièdres, on constate qu'aucun des groupements n'est orienté vers le fond de la poche énantiosélective, représenté par une flèche blanche sur les figures (Figure 32). Ce point est particulièrement important car il révèle que le substrat doit obligatoirement se déformer pour occuper tous les

volumes disponibles et notamment la poche stéréospécifique. On peut supposer que lors des minimisations qui suivent les constructions initiales, les différents paramètres internes (essentiellement les angles dièdres) vont pouvoir varier significativement hors de leurs valeurs d'équilibre pour que les différents atomes puissent occuper les volumes disponibles. Néanmoins, étant donné les risques de faux-minima rencontrés lors des optimisations, nous avons préféré utiliser un balayage plus serré du premier dièdre ($C_1O_{12}C_{12}C_{11}$ par pas de 60°) en rajoutant trois autres valeurs de départ : $+120$, 0 et -120° . Ces trois derniers angles dièdres se traduisent par des conformations éclipsées, qui sont énergétiquement défavorables, mais cette contrainte devrait en partie s'atténuer lors de l'optimisation (autoadaptation des positions atomiques). Ainsi, six orientations différentes ont été explorées avec le (R)-pentan-2-ol, avec les valeurs initiales de l'angle dièdre $C_1O_{12}C_{12}C_{11}$ suivantes: 180° (type A), $+60^\circ$ (type B), -60° (type C) et $+120^\circ$ (type D), 0° (type E), -120° (type F). Les trois premiers types sont représentés dans le contexte catalytique sur la figure 32 et les trois derniers sur la figure 33. Cela ramène le nombre de conformations initiales construits à 54 ($6 \times 3 \times 3$).

Pour certaines de ces structures, une gêne stérique importante a été observée avec les résidus environnants (Thr40, Gly41, Thr42, Trp104, His224, Leu278 et Ala281). Quand la structure et l'environnement de l'acide aminé en question le permettaient, les rotamères ont été modifiés manuellement afin de minimiser cette gêne. Ainsi les chaînes latérales des résidus Thr42, His224 et Leu278 ont été modifiées selon la banque de rotamères Ponder et Richards (Ponder et Richards, 1987).

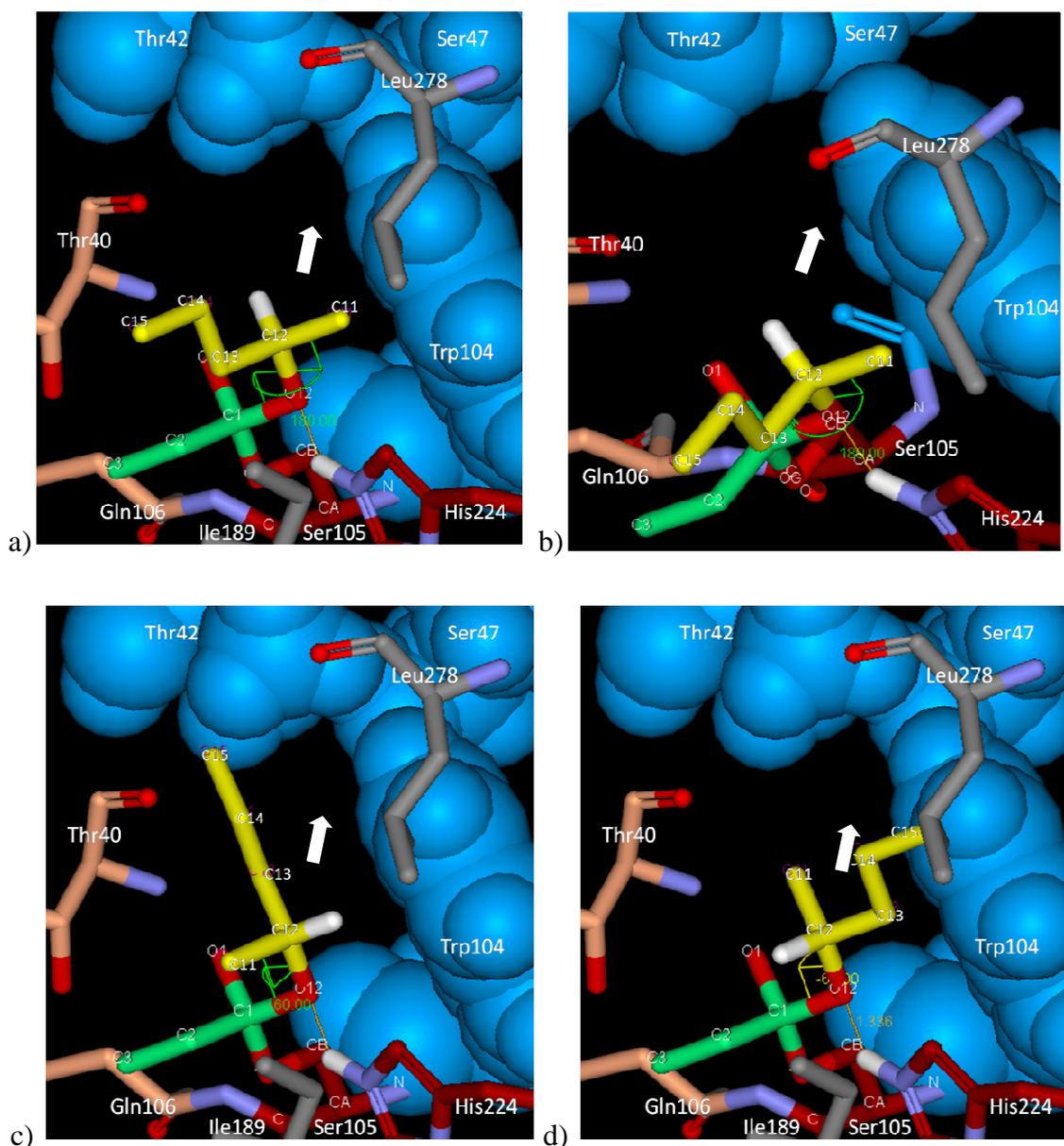


Figure 32 : Orientations du (R)-pentan-2-ol (en jaune) au sein du site actif de CALB lors de la construction de l'intermédiaire tétraédrique. Sont représentés en vert la partie acyle, en rouge foncé les résidus de la triade catalytique, en bleu les résidus de la poche énantiosélective et en saumon les résidus du trou oxyanionique. Seuls les atomes d'hydrogène d'intérêt sont visibles. L'axe de la poche énantiosélective est représenté par une flèche blanche.

a) et b) vues différentes de l'alcool avec $C_1O_{12}C_{12}C_{11}$ de 180° (type A) ; c) orientation avec $C_1O_{12}C_{12}C_{11}$ de $+60^\circ$ (type B) ; d) orientation avec $C_1O_{12}C_{12}C_{11}$ de -60° (type C).

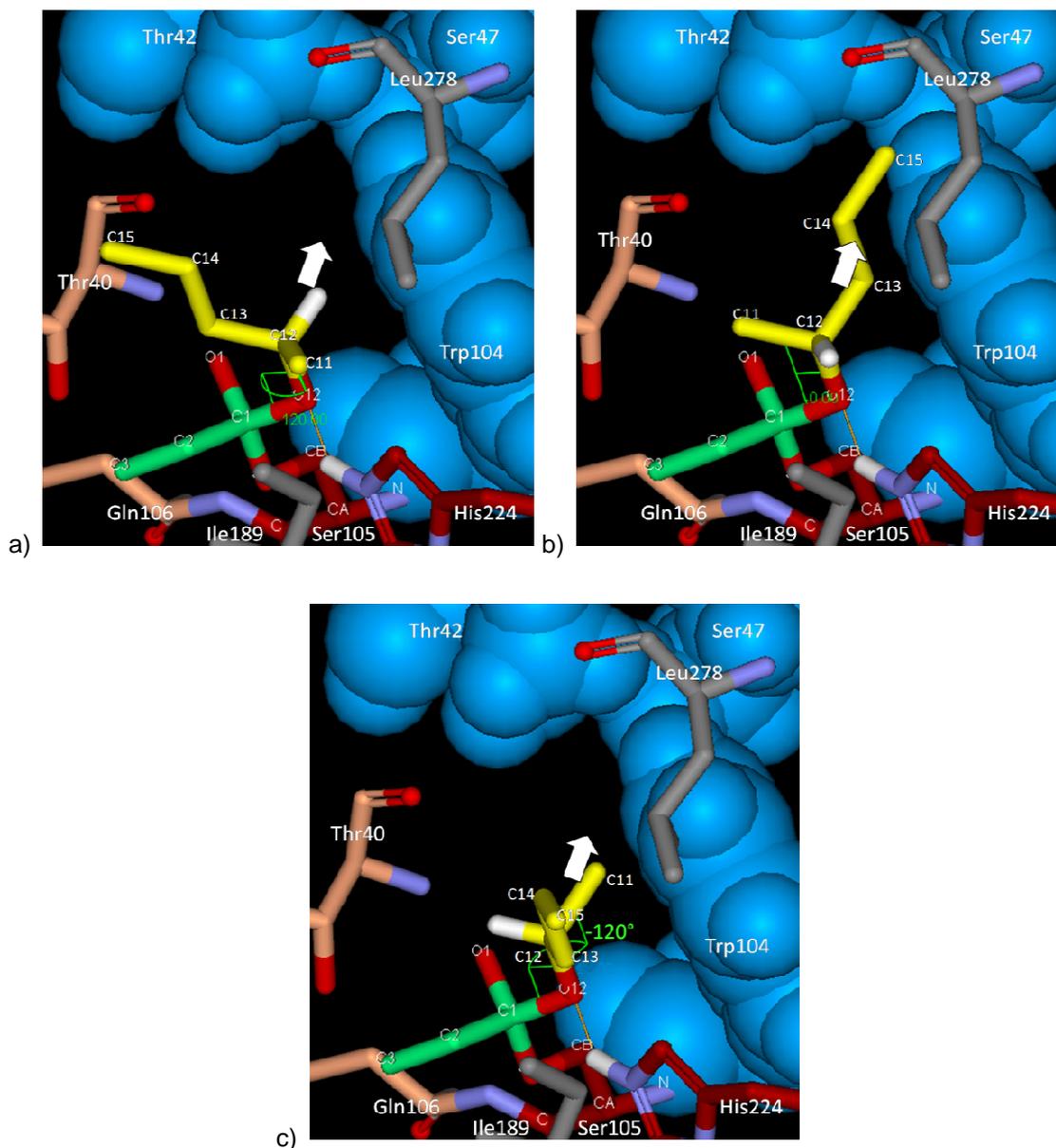


Figure 33 : Orientations supplémentaires du (*R*)-pentan-2-ol (en jaune) au sein du site actif de CALB lors de la construction de l'intermédiaire tétraédrique. Sont représentés en vert la partie acyle, en rouge foncé les résidus de la triade catalytique, en bleu les résidus de la poche énantiosélective et en saumon les résidus du trou oxyanionique. Seuls les atomes d'hydrogène d'intérêt sont visibles. L'axe de la poche énantiosélective est représenté par une flèche blanche.

a) orientation avec $C_1O_{12}C_{12}C_{11}$ de $+120^\circ$ (type D) ; b) orientation avec $C_1O_{12}C_{12}C_{11}$ de 0° (type E) ; c) orientation avec $C_1O_{12}C_{12}C_{11}$ de -120° (type F).

Le même travail a été réalisé avec le (*S*)-pentan-2-ol. On a ainsi 54 structures de l'énantiomère *S* réparties selon 6 orientations de départ : l'angle dièdre $C_1O_{12}C_{12}C_{13}$ qui prend les valeurs de $+60$, 180 , -60 , $+120$, 0 et -120° , correspondant aux types A, B, C, D, E et F respectivement. Les structures des types D, E et F, qui dès leur construction ont un

groupement orienté vers la poche énantiosélective, correspondent à des permutations M/L, M/H et L/H (Kazlauskas, 2000) (Figure 28 et 34). La permutation H/O a été écartée car elle conduirait forcément à un mode non productif avec la liaison hydrogène entre N_{E2} His224 et O₁₂ rompue.

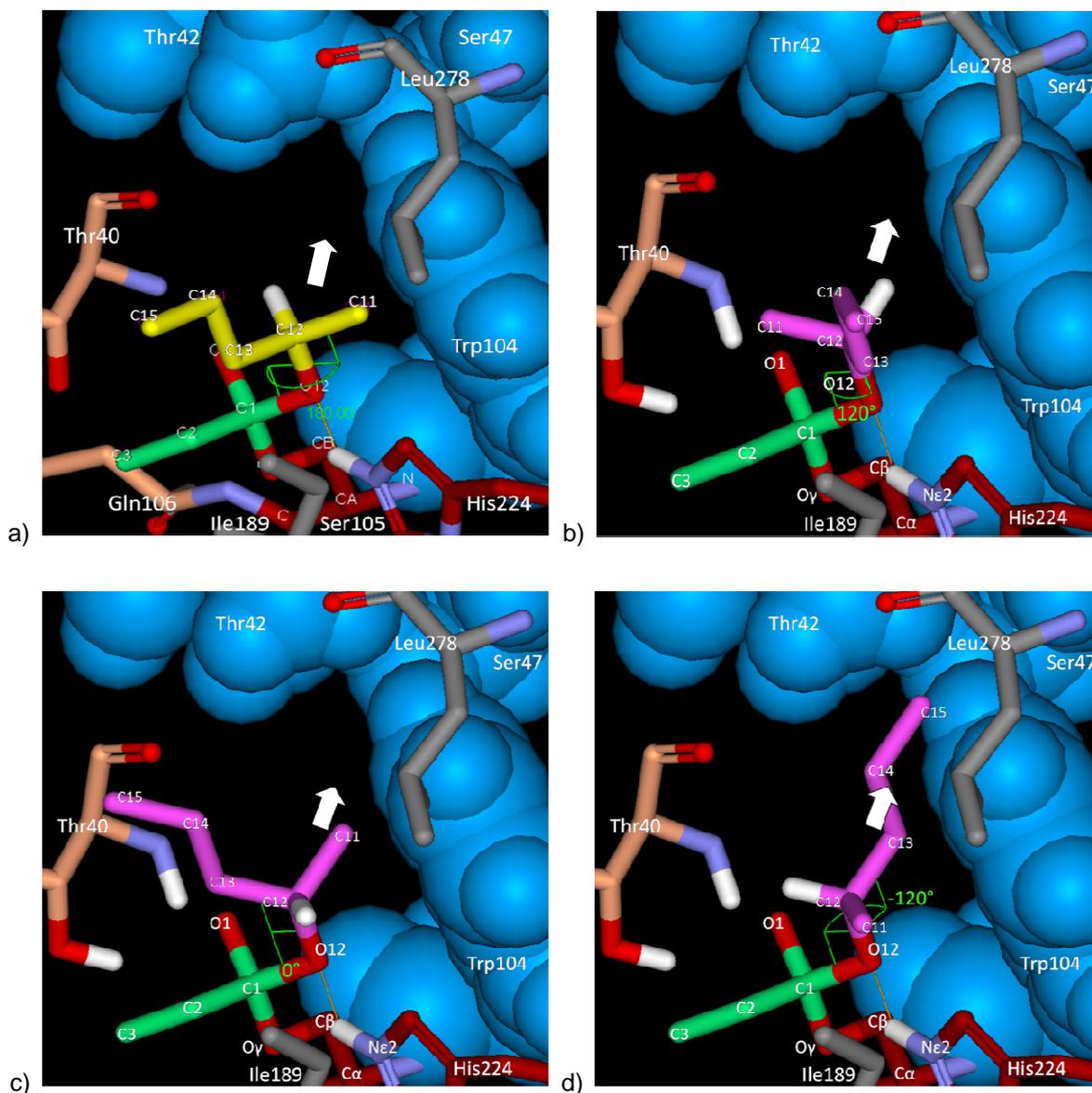


Figure 34 : a) orientation du (*R*)-pentan-2-ol (en jaune) avec son substituant moyen vers le fond de la poche énantiosélective (type F). b), c) et d) orientations du (*S*)-pentan-2-ol au sein du site actif de CALB lors de la construction de l'intermédiaire tétraédrique respectivement en types D, E et F avec C₁O₁₂C₁₂C₁₃ de +120, 0 et -120°.

Sont représentés en vert la partie acyle, en rouge foncé les résidus de la triade catalytique, en bleu les résidus de la poche énantiosélective et en saumon les résidus du trou oxyanionique. Seuls les atomes d'hydrogène d'intérêt sont visibles. L'axe de la poche énantiosélective est représenté par une flèche blanche.

Les intermédiaires tétraédriques formés avec le butan-2-ol *R* et *S* ont été construits de la même manière qu'avec le pentan-2-ol. Six orientations de départ ont été choisies pour chacune des formes selon la valeur de l'angle dièdre $C_1O_{12}C_{12}C_{11}$ ou $C_1O_{12}C_{12}C_{13}$. Le substituant L du butan-2-ol étant plus court, éthyle au lieu de propyle, seulement l'angle dièdre $O_{12}C_{12}C_{13}C_{14}$ a dû être modifié afin de balayer tous les rotamères (Figure 35). De plus, avec le groupement éthyle il n'y avait plus de gêne stérique importante, nécessitant des changements d'orientations des chaînes latérales des résidus environnants. 18 structures ont été ainsi obtenues pour chacune des deux formes *R* et *S*.

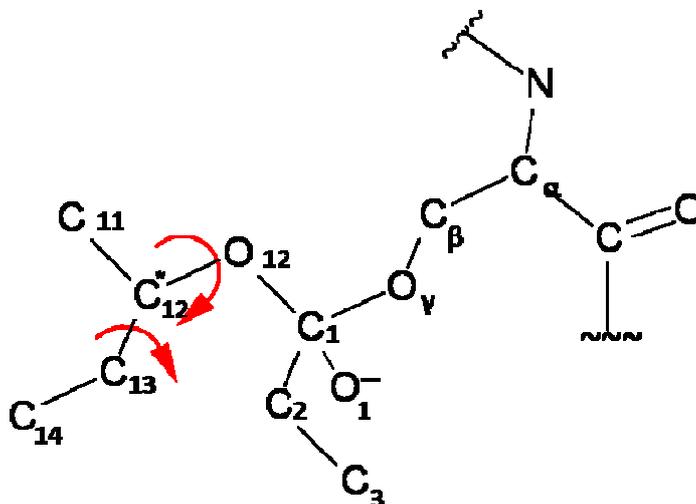


Figure 35 : Intermédiaire tétraédrique formé avec le butan-2-ol. Pour plus de simplicité les atomes d'hydrogène ne sont pas représentés. Les flèches rouges représentent les dièdres qui ont été modifiés lors de l'exploration systématique des conformations.

Protocole : Toutes ces structures ont été ensuite optimisées par mécanique moléculaire. Les calculs ont été effectués dans le vide, dans le but de simuler les expériences réalisées dans le réacteur solide/gaz sans solvant et avec une enzyme séchée à l'extrême. Toutes les molécules d'eau cristallographiques ont été effacées. Afin de libérer progressivement les degrés de liberté de notre système, nous avons réalisé deux minimisations successives avec des contraintes différentes. Pour obliger le substrat se positionner par rapport à l'enzyme et éviter que l'absence d'eau n'introduise des déformations trop importantes sur l'enzyme, une première série de minimisations a été réalisée avec les atomes du squelette fixes. A l'issue de cette première série de minimisations, il est apparu que les structures dont les chaînes latérales

de certains des résidus avaient été modifiées au départ, étaient énergétiquement défavorisées par rapport à celles où l'orientation cristallographique des chaînes latérales avait été conservée. Par conséquent, elles ont été abandonnées pour la suite de l'étude. Afin de permettre à l'enzyme de s'adapter au mieux aux substrats, la deuxième série de minimisations a été réalisée avec un degré de liberté supplémentaire. Ainsi, l'ensemble du substrat, les résidus bordant le site actif et les résidus appartenant aux mêmes structures secondaires (par exemple la même hélice) ont été libres de tout mouvement (pour la liste de résidus auxquels aucune contrainte n'a été appliquée, voir la partie matériel et méthodes). Dans le but de garder une base commune à toutes ces structures et faciliter ainsi leurs comparaisons entre elles, les atomes de carbone alpha des résidus éloignés de la cavité ont été maintenues fixes.

A.II. Modes de fixation des alcools secondaires

A.II.1. Description des modes de fixation

A.II.1.a Description générale

Dans notre approche, les modes de fixation du butan-2-ol et du pentan-2-ol ont été étudiés systématiquement dans le but de vérifier si d'autres modes de fixation que ceux décrits dans la littérature étaient possibles. L'existence de modes "non conventionnels" peut être envisagée, car les alcools secondaires étudiés sont de petite taille. La poche énantiosélective est parfaitement adaptée pour accepter des petits substituants, tels que les groupements méthyle et éthyle. De plus, elle peut s'adapter pour accepter un groupement propyle (Orrenius et coll., 1998 a). Ceci a été clairement démontré par Magnusson et ses collaborateurs qui ont mesuré la constante de spécificité (k_{cat}/K_M) d'alcools secondaires symétriques, dans le cas de leur acylation par le butanoate de vinyle. Pour l'heptan-4-ol, une constante de spécificité de $4,2 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ est obtenue. Cette valeur est certes 100 fois plus faible que dans le cas du pentan-3-ol ($k_{cat}/K_M = 420 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$) mais elle est loin d'être nulle (Magnusson et coll., 2005).

Lors des minimisations, certains types d'orientation parmi les six prévus initialement (A, B, C, D, E, F) convergent vers d'autres. Cet aspect technique est tout à fait logique car nous avons effectué un balayage fin pour explorer systématiquement ce paramètre interne. Les orientations privilégiées par ces alcools seront détaillées ci-après. Dans la suite nous parlerons essentiellement de trois modes de fixation pour chaque énantiomère (figure 36). Ceux-ci ont été inspirés de ceux décrits par Orrenius et ses collaborateurs (1998 b) et représentés sur la figure 27. On a ajouté aux deux modes de fixation pour chacun des énantiomères, les modes III, déduits des deux premiers et correspondant à des orientations où le troisième substituant est dirigé vers la poche énantiosélective. Ainsi pour l'énantiomère *R*, on peut rencontrer le mode I, qui correspond à une structure où le substituant M est dirigé vers la poche énantiosélective et le groupement L vers l'extérieur, le mode II avec le substituant L dirigé vers la poche énantiosélective et l'atome d'hydrogène vers l'extérieur, enfin le mode III avec l'hydrogène vers la poche énantiosélective et le substituant M tourné vers l'extérieur (figure 36). De même pour l'énantiomère *S* trois modes seront utilisés : les modes I, II et III avec respectivement un hydrogène, le substituant L ou le substituant M dirigés vers la poche énantiosélective (figure 36). Malgré nos efforts pour classer toutes les structures dans un de

ces trois modes, des structures avec des orientations différentes de ces 3 modes existent. Ils seront appelés ici des modes intermédiaires.

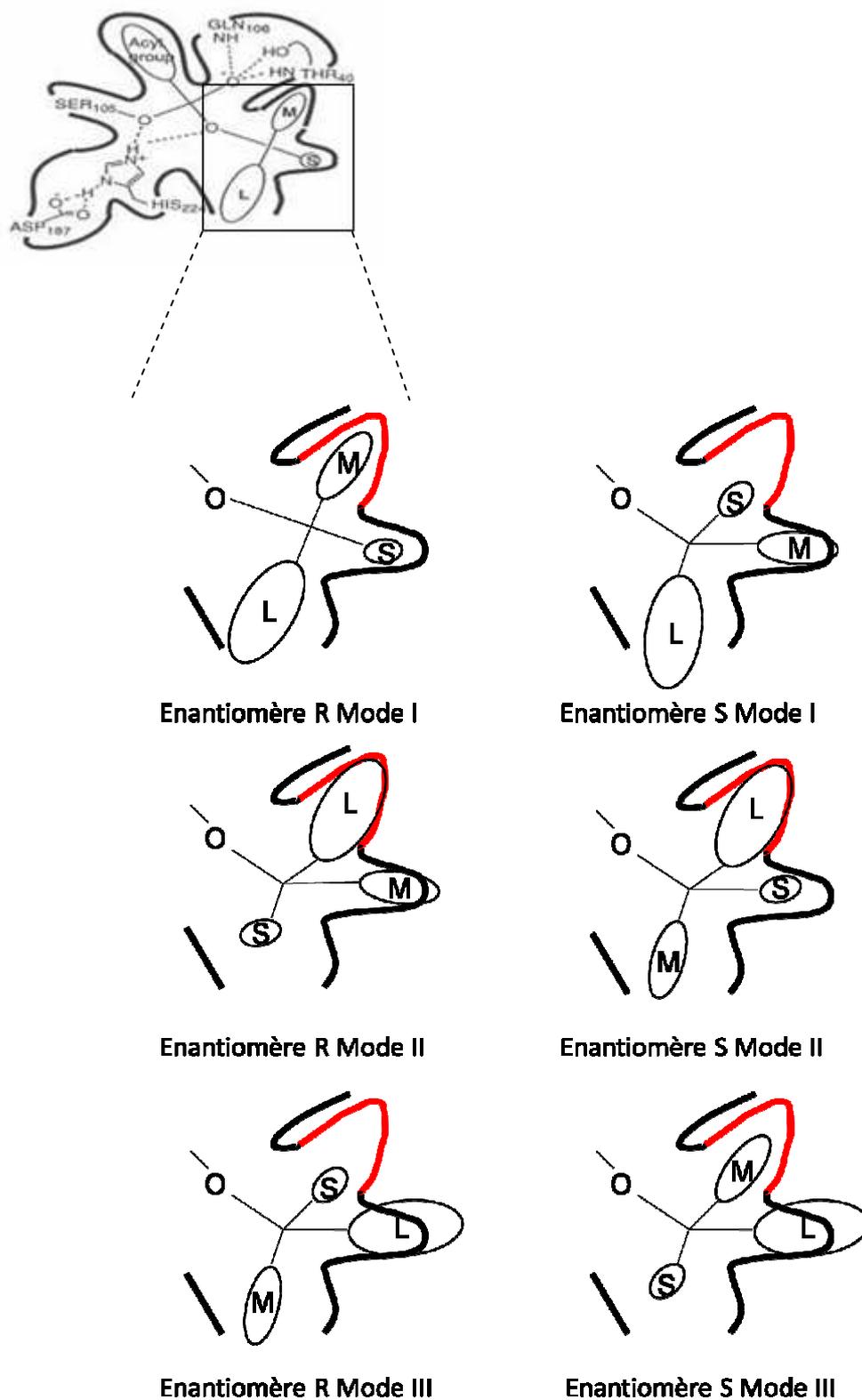


Figure 36 : Les trois modes de fixation des énantiomères inspirés de Hæffner et coll. (1998). La poche énantiométrique est surlignée en rouge.

A.II.1.b Description énergétique

En fonction de la géométrie de départ, les minimisations peuvent conduire à des structures plus ou moins stables. Les structures avec des énergies très élevées, ayant très peu de chance d'exister, ont donc été éliminées.

Différents termes énergétiques peuvent être calculés pour chaque structure. Les trois énergies mentionnées ci-dessous ont été utilisées pour sélectionner les structures les plus stables :

- **Energie potentielle totale (E_{pT}).** Lors des minimisations la structure enzymatique est optimisée de telle manière que l'énergie potentielle totale soit la plus basse possible. Cette énergie potentielle totale tient compte à la fois de l'énergie du substrat, de l'enzyme et aussi l'énergie d'interaction. Mais des modifications des chaînes latérales de résidus éloignés du site actif peuvent conduire à une augmentation importante de cette énergie sans rapport avec le mode de fixation du substrat. Cela nous oblige à se focaliser sur la zone de l'enzyme en interaction avec le substrat.
- **Energie potentielle de la partie alcool du substrat (E_{pA}).** L'énergie du substrat a été utilisée avec succès lors des travaux de modélisation de Hult et son équipe (Orrenius et coll., 1998 a). Plus les contraintes exercées par l'enzyme seront importantes, plus le substrat sera déformé et plus son énergie sera élevée. Lors de la construction des structures de départ, seule la partie alcool a été modifiée. L'orientation du groupement propionyle est restée identique pour toutes les structures. Nous avons supposé que les différences d'énergies les plus importantes concernent essentiellement la partie alcool. L'énergie potentielle de la partie alcool a donc été calculée. Ce terme énergétique est un bon indicateur de la déformation nécessaire du substrat au sein de la poche catalytique comme nous l'avons expliqué précédemment. Si cette énergie est trop élevée, la solution d'arrimage correspondante est à exclure du fait d'une distorsion trop forte notamment au niveau des angles dièdres. Une énergie trop forte peut également être expliquée par un report artificiel des contraintes stériques sur la partie la plus mobile par le minimiseur mathématique. Ces solutions artefactuelles doivent aussi être exclues.
- **Energie d'interaction entre l'enzyme et la partie alcool du substrat (E_{intEA}).** Le terme énergétique qui devrait le mieux décrire les effets des différentes orientations du substrat, est l'énergie d'interaction entre l'enzyme et le substrat. Häffner et ses collègues, en utilisant l'énergie d'interaction entre chaque résidu de la CALB et

l'alcool, ont déterminé les résidus interagissant différemment avec les deux formes *R* et *S* du butan-2-ol, 3-methylbutan-2-ol et le 3,3-dimethylbutan-2-ol. Puis ils ont montré la préférence de la lipase pour la forme *R* de ces alcools en se basant sur la différence d'énergie entre les 2 formes calculées avec les résidus ainsi sélectionnés (Hæffner et coll., 1998). Les valeurs de l'énergie d'interaction avec un résidu proche de l'alcool étant très faibles et avec les résidus éloignés cette énergie étant négligeable, nous avons choisi de calculer l'énergie d'interaction entre la partie alcool et l'enzyme dans sa globalité.

Mais quel critère d'énergie choisir pour sélectionner les structures les plus probables ? Nous avons opté pour l'utilisation simultanée de ces trois critères énergétiques, sans les hiérarchiser. Ainsi pour déterminer les modes de fixation de ces alcools, les structures ayant à la fois une énergie potentielle totale, une énergie potentielle de la partie alcool du substrat et une énergie d'interaction entre l'enzyme et l'alcool, suffisamment basses, ont été retenues. Les valeurs limites de ces énergies ont été choisies de manière à retenir un échantillon représentatif des structures minimisées. En s'inspirant des études de "docking" (étape de "scoring"), 30 à 40% des conformations ont été retenues (Tableau 14 et 15).

A.II.2. Modes de fixation du pentan-2-ol

54 structures pour chaque forme *R* et *S* ont été minimisées. Les six orientations de départ ont évoluées pour se retrouver dans un des trois modes décrits ci-dessus, à l'exception d'une structure *R* et deux structures *S* ayant adopté des modes intermédiaires. Pour ne conserver que les structures les plus probables, les critères énergétiques ont été appliqués. Ainsi les structures ayant l'énergie potentielle totale, l'énergie potentielle de la partie alcool et l'énergie d'interaction entre l'enzyme et la partie alcool inférieures à la $m+0,5*s$, avec m la moyenne des énergies des 54 structures et s l'écart-type, ont été retenues. 16 structures pour la forme *R* et 20 pour la forme *S*, soit 30 et 37% des structures, correspondent à ces critères (Tableau 14). Les structures en modes intermédiaires étaient énergétiquement très défavorisées, par conséquent elles n'ont pas été retenues.

Tableau 14 : Récapitulatif des modes de fixation du pentan-2-ol après optimisation. m correspond à la moyenne des énergies des 54 structures et s à l'écart-type.

Alcool		Total	%	Mode I	Mode II	Mode III	Mode intermédiaire
<i>(R)</i> -pentan-2-ol	$<m+0,5*s$	16	30	12	3	1	0
	tous	54	100	25	20	8	1
<i>(S)</i> -pentan-2-ol	$<m+0,5*s$	20	37	2	14	4	0
	tous	54	100	6	25	21	2

Le tableau 1 montre que plusieurs modes existent. La majorité des formes *R* retenues selon les critères énergétiques, soit 12 structures sur les 16, s'orientent avec le groupement méthyle dirigé vers le fond de la poche énantiosélective. Ce type d'orientation correspond au mode I, décrit dans la littérature comme l'unique mode de fixation de la forme privilégiée des alcools secondaires. Pour ces structures, deux orientations du groupement L sont possibles. Pour la plupart des structures, le groupement propyle est dirigé vers la surface, mais pour certaines d'entre elles il est dirigé vers la leucine 278 et pour d'autres il est plutôt orienté vers les résidus Ile285/Ile189 (Figure 37). Deux autres modes de fixations peuvent être rencontrés avec le *(R)*-pentan-2-ol. Pour une des structures, c'est l'hydrogène qui est dirigé vers la poche énantiosélective. Il s'agit du mode de fixation III (Figure 38). Trois des structures retenues selon les critères énergétiques sont en mode II avec leurs groupements méthyle positionnés dans la poche énantiosélective. Ce mode de fixation a déjà été observé par l'équipe d'Orrenius (Orrenius et coll., 1998 a). Afin que le groupement propyle puisse se loger dans la poche énantiosélective, cette dernière a dû s'adapter en basculant systématiquement le cycle indole du Trp104. Lorsque ce résidu s'approche du résidu Leu228, la poche énantiosélective s'en trouve agrandie (Figure 39).

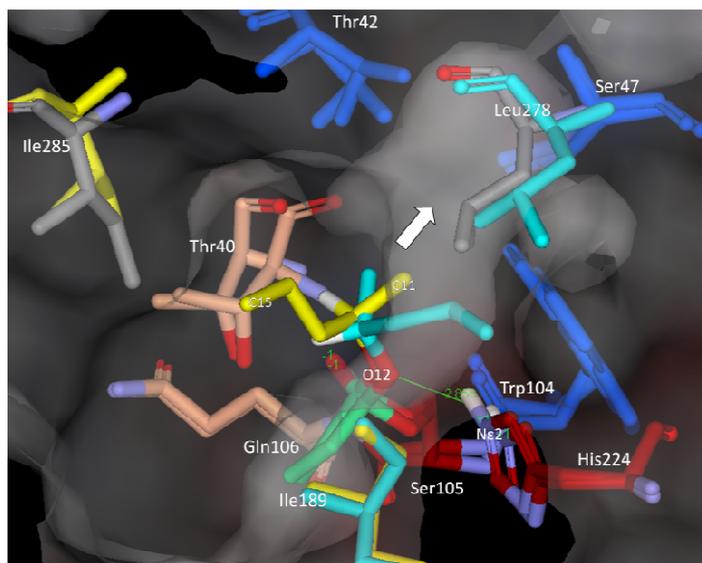


Figure 37 : Les deux orientations du (*R*)-pentan-2-ol en mode I avec son substituant moyen vers le fond de la poche énantiosélective (signalé par une flèche blanche) : groupement propyle vers Ile189 et Ile285 (en jaune) ou vers Ile189 et Leu278 (en cyan). Sont représentés en vert la partie acyle, en rouge foncé les résidus de la triade catalytique, en bleu les résidus de la poche énantiosélective et en saumon les résidus du trou oxyanionique. La surface de l'enzyme est représentée en blanc par transparence. Seuls les atomes d'hydrogène d'intérêt sont visibles.

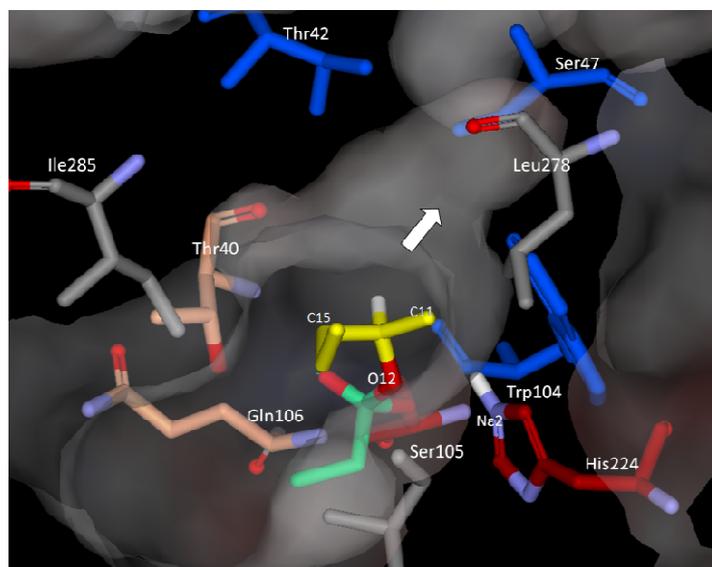


Figure 38 : Mode III du (*R*)-pentan-2-ol (en jaune) avec son atome d'hydrogène orienté vers le fond de la poche énantiosélective (signalé par une flèche blanche). Sont représentés en vert la partie acyle, en rouge foncé les résidus de la triade catalytique, en bleu les résidus de la poche énantiosélective et en saumon les résidus du trou oxyanionique. La surface de l'enzyme est représentée en blanc par transparence. Seuls les atomes d'hydrogène d'intérêt sont visibles.

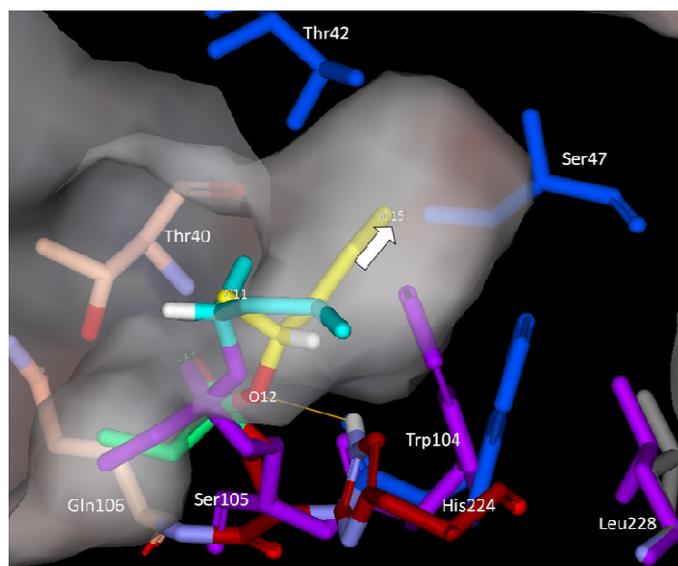


Figure 39 : Orientations du (*R*)-pentan-2-ol en mode I (en cyan) et mode II (en jaune). Pour la structure en mode II le groupement propyle dirigé vers le fond de la poche énantiosélective (signalé par une flèche blanche) provoque le déplacement du Trp104. Sont représentés en violet les acides aminés d'intérêt pour le mode I, en vert la partie acyle, en rouge foncé les résidus de la triade catalytique, en bleu les résidus de la poche énantiosélective, en gris la Leu228 et en saumon les résidus du trou oxyanionique. La surface de l'enzyme est représentée en blanc par transparence. Seuls les atomes d'hydrogène d'intérêt sont visibles.

Les structures retenues pour la forme *S* du pentan-2-ol adoptent également trois modes de fixation possibles. Comme pour la forme *R*, la majorité des structures (près des trois-quarts) correspondent au mode de fixation répertorié dans la littérature, c'est-à-dire le mode II. Pour ce dernier mode c'est le groupement propyle, substituant L, qui est orienté dans la poche énantiosélective. Pour laisser de la place au groupement L, le résidu Trp104 subit une déformation similaire à celle observée lors du mode de fixation II du (*R*)-pentan-2-ol (Figure 40). Deux structures retenues ont des orientations de l'alcool correspondant au mode I avec l'hydrogène dans la poche énantiosélective (Figure 41). En supplément de ces deux modes un troisième mode de fixation est observé pour quatre des structures retenues. Pour ces structures, la poche énantiosélective est occupée par le groupement méthyle du (*S*)-pentan-2-ol. Quant au groupement propyle, il est orienté vers l'Ile285 et reste relativement enfoui dans la cavité, excepté pour une structure où il est dirigé vers la Leu278 et vers l'extérieur. Pour cette structure nous pouvons constater que le cycle imidazole de l'histidine a basculé (Figure 42).

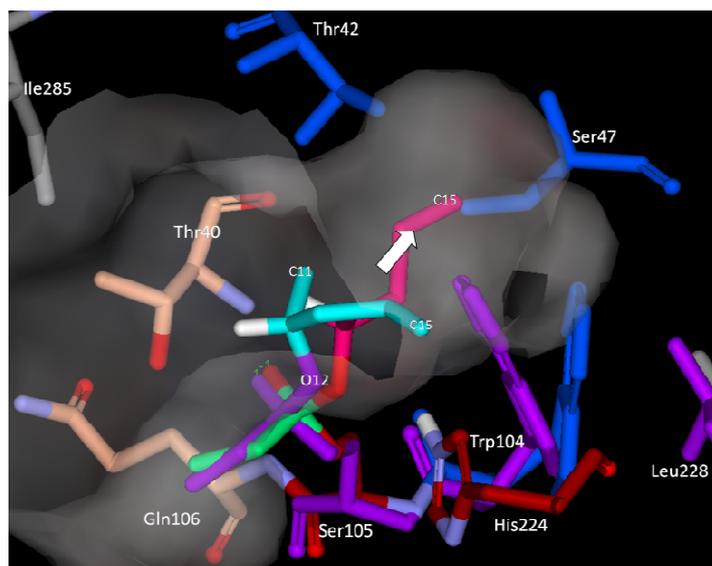


Figure 40 : Orientation du (*S*)-pentan-2-ol en mode II (en rose) comparé au (*R*)-pentan-2-ol en mode I (en cyan). Pour le (*S*)-pentan-2-ol en mode II, le groupement propyle dirigé vers le fond de la poche énantiosélective (signalé par une flèche blanche) provoque le déplacement du Trp104. Sont représentés en violet les acides aminés d'intérêt pour le mode I, en vert la partie acyle, en rouge foncé les résidus de la triade catalytique, en bleu les résidus de la poche énantiosélective et en saumon les résidus du trou oxyanionique. La surface de l'enzyme est représentée en blanc par transparence. Seuls les atomes d'hydrogène d'intérêt sont visibles.

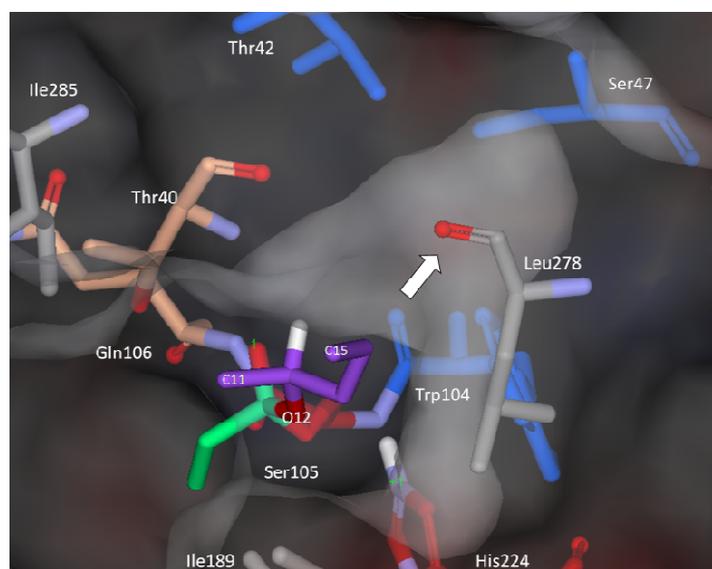


Figure 41 : Mode I du (*S*)-pentan-2-ol (en violet) avec son atome d'hydrogène orienté vers le fond de la poche énantiosélective (signalé par une flèche blanche). Sont représentés en vert la partie acyle, en rouge foncé les résidus de la triade catalytique, en bleu les résidus de la poche énantiosélective, en saumon les résidus du trou oxyanionique et en gris les résidus hydrophobe d'intérêt de l'entrée. La surface de l'enzyme est représentée en blanc par transparence. Seuls les atomes d'hydrogène d'intérêt sont visibles.

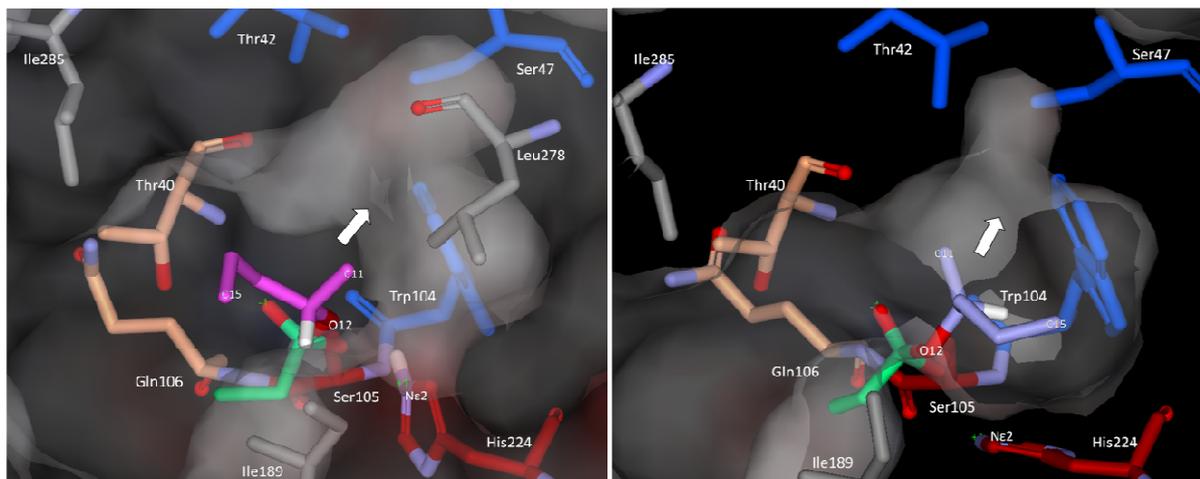


Figure 42 : Deux orientations pour le Mode III du (S)-pentan-2-ol avec son groupement méthyle orienté vers le fond de la poche énantiosélective (signalé par une flèche blanche). Sont représentés en vert la partie acyle, en rouge foncé les résidus de la triade catalytique, en bleu les résidus de la poche énantiosélective, en saumon les résidus du trou oxyanionique et en gris les résidus hydrophobe d'intérêt de l'entrée. La surface de l'enzyme est représentée en blanc par transparence. Seuls les atomes d'hydrogène d'intérêt sont visibles. A) groupement propyle enfoui dans la cavité orienté vers l'Ile285 ; B) groupement propyle dirigé vers l'extérieur du côté de la Leu278.

A.II.3. Modes de fixation du butan-2-ol

Un travail similaire a été effectué avec le butan-2-ol. Ainsi 18 structures, réparties selon six types d'orientations, ont été minimisées pour chaque énantiomère. Comme pour le pentan-2-ol, lors des minimisations les structures obtenues avec le butan-2-ol adoptent un des trois modes précédemment décrits, sauf pour quatre structures (deux pour la forme *R* et deux pour *S*), qui n'ont pas pu être classées dans un de ces modes, mais dans des modes intermédiaires. En effet pour ces structures aucun substituant n'est dirigé vers la poche énantiosélective. Afin d'éliminer les structures les moins stables, qui ont peu de chance d'exister, le triple critère énergétique a été appliqué. En choisissant d'éliminer les structures ayant l'énergie potentielle totale, l'énergie potentielle de l'alcool et l'énergie d'interaction entre la partie alcool et l'enzyme supérieure à $m+0,5*s$, seulement trois structures sur 18 ont été conservées pour la forme *S*, soit 17%. Pour conserver 30 à 40% des structures nous avons modifié cette limite. Ainsi nous avons écarté les structures avec les trois énergies supérieures à la valeur $m+0,6*s$. Au final 8 structures pour la forme *R* et 6 structures pour la forme *S*, soit 44 et 33% des structures, ont été conservées (Tableau 15).

Tableau 15 : Récapitulatif des modes de fixation du butan-2-ol après optimisation. m correspond à la moyenne des énergies des 18 structures et s à l'écart-type.

Alcool		Total	%	Mode I	Mode II	Mode III	Mode intermédiaire
<i>(R)</i> -butan-2-ol	$<m+0,6*s$	8	44	4	3	0	1
	tous	18	100	7	7	2	2
<i>(S)</i> -butan-2-ol	$<m+0,6*s$	6	33	0	4	1	1
	tous	18	100	2	7	7	2

Pour le *(R)*-butan-2-ol les structures retenues adoptent essentiellement deux orientations. Quatre structures sont en mode I avec le groupement méthyle dirigé vers le fond de la poche énantiosélective et le groupement éthyle vers la surface en direction des résidus isoleucine 189 et 285. Pour certaines de ces structures un basculement du Trp104 est observé (Figure 43). Ce type de mouvement a également été rencontré pour quelques structures obtenues avec le pentan-2-ol. Le groupement méthyle est trop petit pour induire ce mouvement. Nous pensons que ce basculement est lié au mouvement naturel de la chaîne latérale d'un résidu lorsqu'il a suffisamment d'espace pour le faire. En effet la structure enzymatique n'est pas figée, mais elle est en constant mouvement. Trois structures sont en mode II avec le groupement éthyle orienté vers la poche énantiosélective. Ces deux modes sont ceux déjà décrits par l'équipe du professeur Hult (Orrenius et coll., 1998 a). En supplément des ces deux modes, pour une des structures retenues le *(R)*-butan-2-ol a une orientation différente, correspondant à un mode intermédiaire (Figure 44). Qu'une telle structure soit énergétiquement favorable doit être une particularité du butan-2-ol. En effet cet alcool étant très petit, une orientation non conventionnelle de ses substituants peut ne pas engendrer de déformation importante ni pour le substrat ni pour l'enzyme.

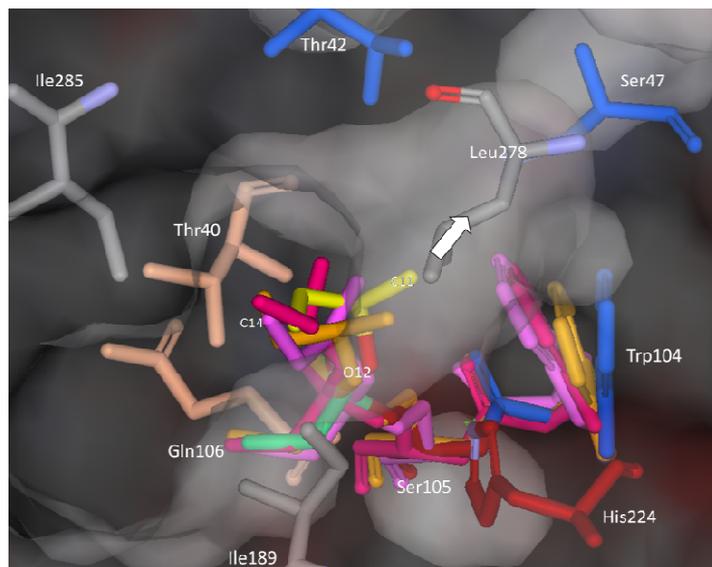


Figure 43 : Orientations du (*R*)-butan-2-ol (en jaune) en mode I, avec son groupement méthyle orienté vers le fond de la poche énantiosélective (signalé par une flèche blanche). Pour une des structures sont représentés en vert la partie acyle, en rouge foncé les résidus de la triade catalytique, en bleu les résidus de la poche énantiosélective, en saumon les résidus du trou oxyanionique et en gris les résidus hydrophobe d'intérêt de l'entrée. Pour les autres structures seulement l'intermédiaire tétraédrique et le Trp104 sont représentés. La surface de l'enzyme est représentée en blanc par transparence. Pour plus de simplicité les atomes d'hydrogène ont été masqués.

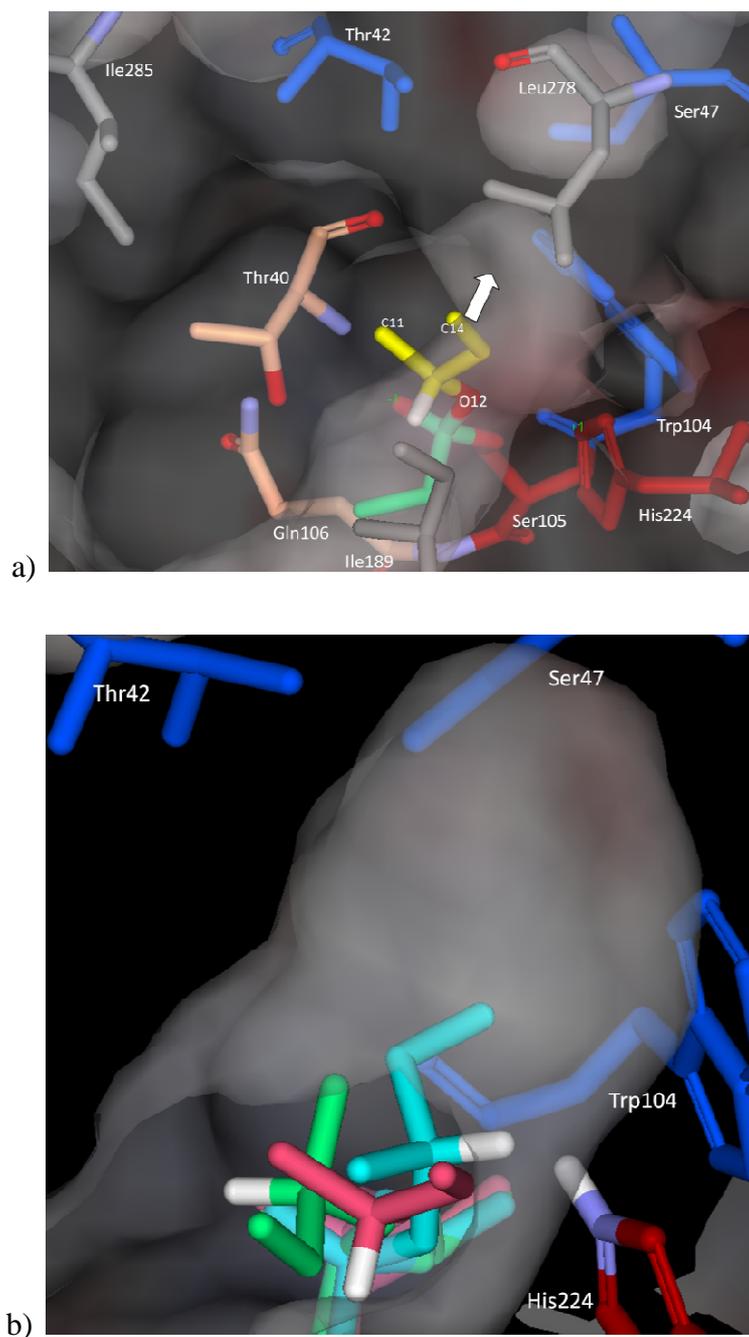


Figure 44 : a) Orientation du (*R*)-butan-2-ol (en jaune) en mode intermédiaire : il n'y a pas de groupement orienté vers le fond de la poche énantiosélective (signalé par une flèche blanche). b) Comparaison du mode intermédiaire obtenue avec le butan-2-ol avec les modes I et II. Sont représentés en vert la partie acyle, en rouge foncé les résidus de la triade catalytique, en bleu les résidus de la poche énantiosélective, en saumon les résidus du trou oxyanionique et en gris les résidus hydrophobe d'intérêt de l'entrée. La surface de l'enzyme est représentée en blanc par transparence. Seuls les atomes d'hydrogène d'intérêt sont visibles.

Pour la forme *S*, quatre des six structures retenues sont en mode II. La poche énantiosélective est alors occupée par le substituant L (groupement éthyle) et le substituant M (groupement méthyle) est orienté vers l'extérieur. Contrairement à ce qui était observé avec le pentan-2-ol en mode II, où le Trp104 basculait systématiquement, avec le butan-2-ol le cycle indole du Trp104 peut avoir plusieurs positions (Figure 45). Une des structures a son groupement méthyle dirigé vers la poche énantiosélective, tandis que son groupement éthyle reste dans la cavité (Figure 46). Ce type d'orientation correspond à un mode de fixation de type III, non envisagé par l'équipe du professeur Hult (Orrenius et coll., 1998 a). Comme pour la forme *R*, une des structures énergétiquement favorable correspond à un mode intermédiaire. Aucune des structures retenues ne correspond à un mode de fixation de type I avec l'atome d'hydrogène dans la poche énantiosélective.

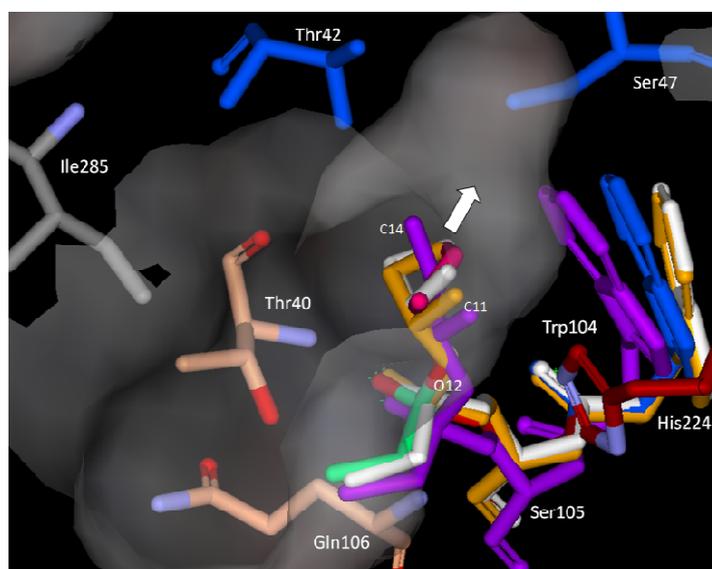


Figure 45 : Orientations du (*S*)-butan-2-ol en mode II, avec le groupement éthyle orienté vers le fond de la poche énantiosélective (signalé par une flèche blanche). Pour une des structures sont représentés en rose la partie alcool, en vert la partie acyle, en rouge foncé les résidus de la triade catalytique, en bleu les résidus de la poche énantiosélective, en saumon les résidus du trou oxyanionique et en gris les résidus hydrophobe d'intérêt de l'entrée. Pour les autres structures seuls l'intermédiaire tétraédrique et le Trp104 sont représentés. La surface de l'enzyme est représentée en blanc par transparence. Pour plus de simplicité les atomes d'hydrogène ont été masqués.

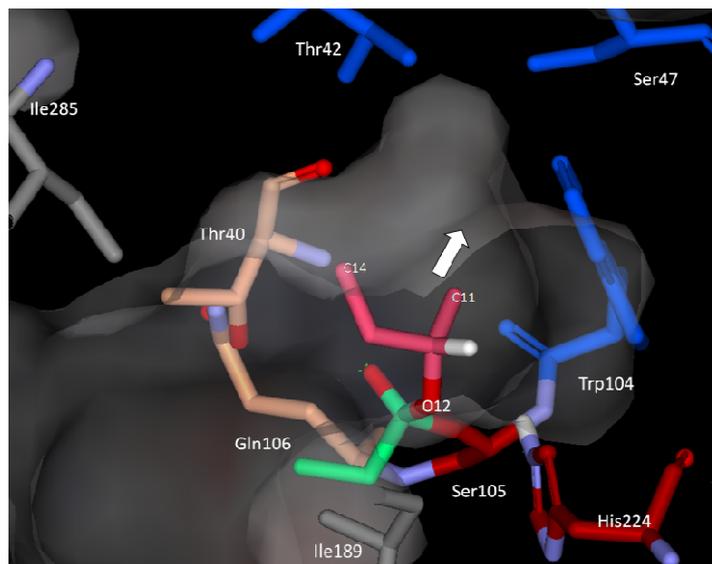


Figure 46 : Orientation du (S)-butan-2-ol (en rose claire) en mode III, avec son groupement méthyle orienté vers le fond de la poche énantiosélective (signalé par une flèche blanche). Sont représentés en vert la partie acyle, en rouge foncé les résidus de la triade catalytique, en bleu les résidus de la poche énantiosélective, en saumon les résidus du trou oxyanionique et en gris les résidus hydrophobe d'intérêt de l'entrée. La surface de l'enzyme est représentée en blanc par transparence. Seuls les atomes d'hydrogène d'intérêt sont visibles.

A.II.4. Conclusions

Dans la littérature deux modes de fixations ont été décrits pour chaque forme *R* et *S* des alcools secondaires. Pour ces modes, le groupement L est respectivement orienté vers le fond de la poche énantiosélective ou vers l'extérieur (Orrenius et coll., 1998 a). Par ailleurs, dans une étude réalisée avec des substrats différents, des orientations supplémentaires ont été envisagées pour la forme *S*, mais à l'issue de leurs travaux le troisième mode apparaît énergétiquement moins favorable que le mode I et II (Xu et coll., 2010). Nous avons réalisé une étude systématique afin d'envisager toutes les orientations possibles. A l'issue des minimisations, les structures les plus probables ont été sélectionnées selon des critères énergétiques. Dans le cas du pentan-2-ol, 16 structures *R* et 20 structures *S* ont été retenues. En supposant que toutes les solutions retenues soient équiprobables et qu'aucun autre critère ne soit pris en compte, nous n'avons pas d'explications satisfaisantes de l'énantiosélectivité. En effet les solutions *R* ne sont pas plus nombreuses que les solutions *S*. Pour le butan-2-ol, nous avons un rapport de solutions sélectionnées (8 et 6 pour *R* et *S* respectivement) assez satisfaisant par rapport aux résultats expérimentaux ; le plus grand nombre de possibilités *R* pourrait donner une partie de l'explication de l'énantiosélectivité. Les structures retenues suggèrent la possibilité pour le butan-2-ol et le pentan-2-ol des modes d'arrimages supplémentaires à ceux mentionnés dans la littérature. Bien que certains modes soient plus fréquemment rencontrés que d'autres, il n'y a pas unicité et spécificité des modes d'arrimage pour *R* et *S*. Ces modes de fixations sont énergétiquement viables, mais ne donnent pas forcément lieu à la catalyse, c'est-à-dire que le substrat rentre dans la cavité puis il en ressort sans subir de transformation. Ceci sera discuté dans le paragraphe suivant.

A.III. Rôle de la coexistence de modes de fixation productifs et non productifs sur l'énantiosélectivité

Dans le paragraphe précédent, nous avons montré pour le butan-2-ol et le pentan-2-ol l'existence des modes de fixation supplémentaires à ceux décrits dans la littérature. Pour certaines de ces structures, notamment avec le (*S*)-pentan-2-ol en mode III, un basculement de l'histidine catalytique (His224) a été observé. On peut alors se demander, si pour ces structures, l'histidine participe toujours au réseau de liaisons hydrogène. Est-ce un mode de fixation permettant la formation de produit d'intérêt ? Est-ce qu'il existe d'autres modes de fixation dits "non productifs" ? Et si c'est le cas, quel est le ratio entre modes de fixation productifs et non productifs pour les formes *R* et *S* ? Est-ce que l'existence de telles structures non productives peut générer une explication rationnelle de l'énantiosélectivité ? Par ailleurs, plusieurs modes de fixations sont apparus énergétiquement viables pour le butan-2-ol et le pentan-2-ol. Est-ce que les structures productives sont réparties entre plusieurs modes ou appartiennent à mode de fixation unique ? Si plusieurs modes productifs existent, est-ce que un de ces modes serait énergétiquement favorisé ? C'est ce que nous allons voir dans cette partie, mais tout d'abord nous allons définir les critères permettant de déterminer si une structure est productive ou non.

A.III.1. Critères à respecter par une structure productive

Le modèle généraliste de mode de fixation des alcools secondaires proposé par l'équipe du professeur Hult décrit, entre autres, deux modes non productifs. Ainsi le mode II pour la forme *R* et le mode I pour la forme *S*, avec respectivement le substituant L et l'atome d'hydrogène dans la poche énantiosélective, sont considérés comme modes non productifs, car la liaison hydrogène entre l'His224 et l'atome d'oxygène de l'alcool (D1) est absente (Figure 27 et 47) (Orrenius et coll., 1998 a ; Hæffner et coll., 1998). En supplément de cette liaison entre les atomes H_{ε2} de l'His224 et l'oxygène de l'alcool, d'autres liaisons hydrogène sont indispensables pour la catalyse. Tout d'abord on peut citer celles établies entre les résidus de la triade catalytique : une liaison hydrogène entre les atomes O_γ de la Ser105 et H_{ε2} de l'His224 (D2), et au moins une liaison entre l'atome H_{δ1} de l'His224 et un des deux oxygènes du groupement carboxylate de l'Asp187 (D3) doivent être présentes. L'oxyanion formé doit également être stabilisé par les résidus du trou oxyanionique. L'oxygène de l'acyle peut ainsi établir trois liaisons hydrogène avec les résidus environnants : les atomes d'hydrogène H_N du

squelette des résidus Thr40 et Gln106 (D4 et D6), ainsi que H_{γ1} de la chaîne latérale de la Thr40 se trouvent ainsi impliqués (D5) (Figure 47). Afin d'avoir une stabilisation correcte de l'oxyanion, au moins deux parmi ces trois liaisons doivent être présentes (Ottosson et coll., 2002a). Pour déterminer si une structure est productive, nous avons vérifié l'existence de ces liaisons en mesurant les distances qui séparent les atomes impliqués. Nous avons considéré qu'une distance entre atomes lourds inférieure ou égale 3,5 Å correspond à une liaison hydrogène (Desiraju et Steiner, 1999 ; Koellner et coll., 2000). La distance entre l'atome d'hydrogène et l'accepteur constitue un critère supplémentaire : elle doit être inférieure ou égale à la somme des rayons de Van der Waals des deux atomes. Les donneurs d'électrons rencontrés dans notre étude sont des atomes d'oxygène et d'azote, ainsi la distance entre l'atome lourd et l'hydrogène doit être inférieure à 2,62 ou 2,65 Å en fonction de l'atome impliqué. Pour plus de simplicité nous avons choisi le critère de 2,65 Å pour les deux types d'atomes.

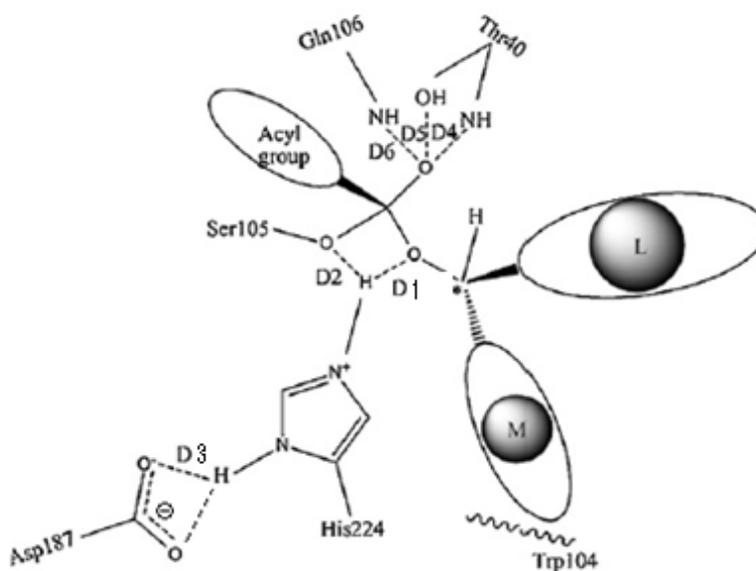


Figure 47 : Schéma du mode de fixation des alcools secondaires forme *R*. M et L représentent respectivement les substituants moyen et gros. Les liaisons hydrogène d'intérêt sont représentées par des pointillés. "~~~~" représente le fond de la poche énantiosélective correspondant au cycle indole du Trp104 (d'après Xu et coll., 2010).

En plus de ces critères concernant les liaisons hydrogène, un autre critère est évoqué dans la littérature : la structure obtenue après modélisation doit être assez proche de la structure cristallographique. Pour la comparaison on peut utiliser la moyenne des distances séparant les coordonnées atomiques après superposition (écart quadratique moyen) ou le "root-mean-square deviation" (*rmsd*). D'après les travaux de Vallikivi et coll. sur l'acétylation des prostaglandines avec la CALB, cette valeur doit être inférieure à 3 Å, pour pouvoir considérer que les structures sont proches (Vallikivi et coll., 2005).

Après avoir déterminé quelles structures étaient productives, c'est-à-dire celles qui présentaient au moins cinq des six liaisons hydrogènes cités ci-dessus et avaient des structures proches de la structure cristallographique, nous avons tenté de relier ces résultats à l'énantiosélectivité observée expérimentalement. Pour cela nous avons comparé les résultats obtenus avec les deux formes *R* et *S* des alcools étudiés. Nous n'avons analysé que celles retenues sur des critères énergétiques, et regardé si un des énantiomères adoptait préférentiellement des orientations non productives. Nous avons également vérifié si la fixation non productive était propre à un mode de fixation ou non. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 16 et seront interprétés ci-après. Dans un deuxième temps, nous avons vérifié si un des modes de fixation était énergétiquement plus favorable que d'autres. Pour cela les différents termes énergétiques calculés précédemment ont été utilisés : l'énergie potentielle du complexe enzyme-substrat (E_{pT}), l'énergie d'interaction entre l'enzyme et la partie alcool du substrat ($E_{int_{EA}}$) et l'énergie potentielle de la partie alcool du substrat (E_{pA}). Nous avons également calculé les moyennes de ces énergies de chaque mode de fixation obtenu pour les structures présélectionnées après application des trois critères énergétiques et les structures productives (parmi celles présélectionnées).

Tableau 16 : Récapitulatif des modes de fixation du butan-2-ol et du pentan-2-ol après optimisation. Les chiffres entre parenthèses correspondent au nombre de structures non productives.

Alcool	Total	Mode I	Mode II	Mode III	Mode intermédiaire
(<i>R</i>)-pentan-2-ol	16 (9)	12 (8)	3 (1)	1 (0)	0 (0)
(<i>S</i>)-pentan-2-ol	20 (5)	2 (1)	14 (1)	4 (3)	0 (0)
(<i>R</i>)-butan-2-ol	8 (2)	4 (1)	3 (1)	0 (0)	1 (0)
(<i>S</i>)-butan-2-ol	6 (2)	0 (0)	4 (0)	1 (1)	1 (1)

A.III.2. Corrélacion structure-énantiosélectivité

A.III.2.a Corrélacion structure-énantiosélectivité dans le cas du pentan-2-ol

Près d'une structure sur quatre, soit 15 sur les 54, obtenues avec le (*R*)-pentan-2-ol peut être considérée comme non productive. Nous avons vu précédemment que seules 16 structures sur les 54 peuvent être considérées comme énergétiquement stables (après application de trois critères énergétiques simultanés E_{pT} , E_{pA} et E_{intEA}). Parmi ces structures 9 sont non productives, ramenant le ratio à une structure sur deux (Tableau 16A). Ces structures ont été classées parmi les non productives, car une ou plusieurs liaisons hydrogène stabilisant l'intermédiaire tétraédrique sont absentes à la fin des minimisations. Trois causes peuvent être évoquées, qu'on peut rencontrer seule ou combinées entre elles :

- **Non stabilisation de l'oxyanion.** Dans ce cas, seule la liaison hydrogène entre l'oxyanion (O_1) de l'acyle et le groupement amine ($N-H_N$) de la Thr40 (D4) est maintenue. Les deux autres liaisons pouvant stabiliser cette charge ont été rompues, suite à un déplacement du squelette pour la liaison avec Gln106 ou une rotation de la chaîne latérale pour la Thr40 (Figure 48 a).
- **Absence de la liaison entre l'His224 ($H_{\epsilon 2}$) et la partie alcool du substrat (O_{12}) (D1).** Pour ces structures, un décalage de la partie alcool du substrat a été observé vers les résidus Ala281 et 282 (Figure 48 b).
- **Absence d'une liaison entre les résidus de la triade catalytique.** Pour les structures avec les liaisons hydrogène entre l'His224 et l'Asp187 (D3) rompues, l'absence de liaison peut généralement être corrélée avec un basculement du cycle imidazole de l'histidine (Figure 48 c). Pour toutes les structures retenues, la distance entre la Ser105 (O_γ) et l'His224 ($H_{\epsilon 2}$) (D2) est telle que la liaison hydrogène peut se former.

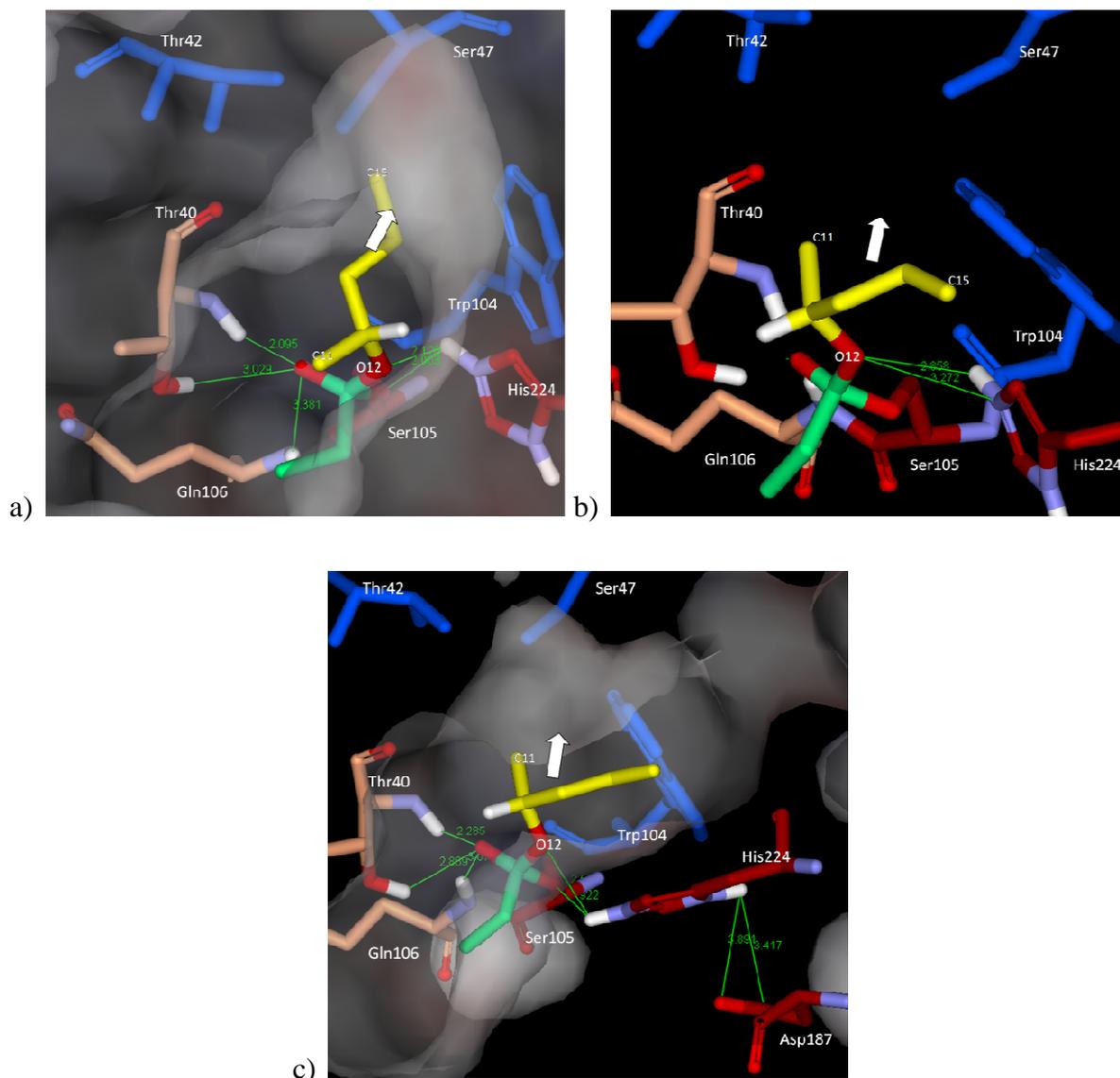


Figure 48 : Structures non productives obtenues avec le (*R*)-pentan-2-ol (en jaune). Sont représentés en vert la partie acyle, en rouge foncé les résidus de la triade catalytique, en bleu les résidus de la poche énantiométrique et en saumon les résidus du trou oxyanionique. Les distances entre les atomes impliqués dans des liaisons hydrogène sont en vert. La surface de l'enzyme est représentée en blanc par transparence. Seuls les atomes d'hydrogène d'intérêt sont visibles. a) Structure avec l'oxyanion non stabilisé. b) Structure avec la liaison hydrogène entre l'histidine et l'alcool absente. c) Structure avec la liaison hydrogène entre l'histidine et l'acide aspartique absente.

Aucune structure n'a été considérée comme non productive à cause d'une différence trop importante par rapport la structure cristallographique de l'enzyme seule. En effet, les valeurs de *rmsd* obtenues pour la comparaison entre l'enzyme et la structure cristallographique sont basses. La valeur la plus élevée est de 0,51 Å pour le squelette, et de 0,76 Å pour l'enzyme

entière. Les moyennes calculées pour les 16 structures énergétiquement viables sont de 0,45 Å et 0,68 Å. Ces valeurs restent très inférieures à 3 Å, respectant ainsi le critère imposé par Vallikivi comme limite de similarité (Vallikivi et coll., 2005). Nous pouvons constater que les valeurs sont plus élevées pour l'enzyme entière. Ces augmentations peuvent être attribuées aux chaînes latérales des résidus, qui présentent plus de liberté de mouvement. Ce mouvement devient très important pour le substrat. En effet, la moyenne des *rmsd* des atomes concernés pour tous les structures *R* retenues est de 1,21 Å et la valeur maximale est de 1,61 Å.

Tableau 16 A : Récapitulatif des modes de fixation du pentan-2-ol après optimisation. Les chiffres entre parenthèses correspondent au nombre de structures non productives.

Alcool	Total	Mode I	Mode II	Mode III	Mode intermédiaire
(<i>R</i>)-pentan-2-ol	16 (9)	12 (8)	3 (1)	1 (0)	0 (0)
(<i>S</i>)-pentan-2-ol	20 (5)	2 (1)	14 (1)	4 (3)	0 (0)

Ces structures non productives sont pratiquement toutes en mode de fixation de type I (tableau 16A), avec la poche énantiosélective occupée par le groupement méthyle. Néanmoins ce mode de fixation ne peut pas être considéré comme mode non productif car près de la moitié des structures de ce mode sont productives. Une structure non productive a été identifiée en mode II, avec le substituant L orienté vers la poche énantiosélective. On trouve également des structures productives en mode II et III.

Seulement 8 structures sur 54 au total et 5 sur les 20 plus stables sont considérées non productives pour la forme *S* (tableau 16A). Pour ces structures, soit l'oxyanion qui n'est pas stabilisé, soit la liaison hydrogène entre l'His224 et le substrat (D1) est rompue. Pour une des structures la liaison hydrogène entre l'His224 (H_{ε2}) et la Ser105(O_γ) (D2) est également absente. Bien que pour certaines des structures obtenues avec le (*S*)-pentan-2-ol nous ayons observé le basculement du cycle de l'histidine, au moins une liaison hydrogène avec l'Asp187 (D3) est toujours présente. Par conséquent, ce basculement ne conduit pas forcément à une structure non productive. En analysant la répartition des structures, aucun consensus ne peut être trouvé. En effet, les structures non productives ne sont pas propres à un mode de fixation en particulier. On trouve ainsi une structure non productive pour les modes de fixation I et II et trois pour le mode III. La majorité des structures non productives sont en mode III. Malgré cela ce mode regroupe également des structures productives.

Parmi les 16 structures énergétiquement acceptables du (*R*)-pentane-2-ol, 7 seulement sont productives (tous modes confondus). En comparaison avec le (*S*)-pentane-2-ol, il reste beaucoup plus de structures productives (15 au total). Ce premier bilan est totalement en désaccord avec les résultats expérimentaux. Le décompte des structures non productives (indépendamment de la répartition dans les différents modes) donne respectivement 8 et 5 possibilités pour *R* et *S*. En admettant l'équiprobabilité de ces formes, ce rapport des structures non productives va à l'encontre des résultats expérimentaux et l'on se serait attendu à ce qu'un plus grand nombre de structures non productives pour *S* (par rapport à *R*) contrebalance l'effet négatif du rapport des structures productives. Il faut donc constater que ces interprétations statistiques ne sont pas conformes à l'énantiosélectivité mesurée.

A.III.2.b Corrélation structure-énantiosélectivité dans le cas du butan-2-ol

Pour les 18 structures de (*R*)-butan-2-ol, cinq se sont avérées non productives. Pour les structures retenues selon les trois critères énergétiques utilisés précédemment (énergie potentielle totale, énergie potentielle de la partie alcool du substrat et énergie d'interaction), deux structures peuvent être considérées comme non productives (une en mode I et une en mode II) (Tableau 16B). Pour la première on constate, que la distance entre l'His224 et l'atome d'oxygène de l'alcool D1 est trop grande, et pour la seconde structure non productive, c'est l'oxyanion qui n'est pas stabilisé (figure 49). On peut noter que la structure en mode intermédiaire présente toutes les liaisons hydrogène nécessaires à la catalyse et peut être considéré comme productive.

Tableau 16 B: Récapitulatif des modes de fixation du butan-2-ol après optimisation. Les chiffres entre parenthèses correspondent au nombre de structures non productives.

Alcool	Total	Mode I	Mode II	Mode III	Mode intermédiaire
(<i>R</i>)-butan-2-ol	8 (2)	4 (1)	3 (1)	0 (0)	1 (0)
(<i>S</i>)-butan-2-ol	6 (2)	0 (0)	4 (0)	1 (1)	1 (1)

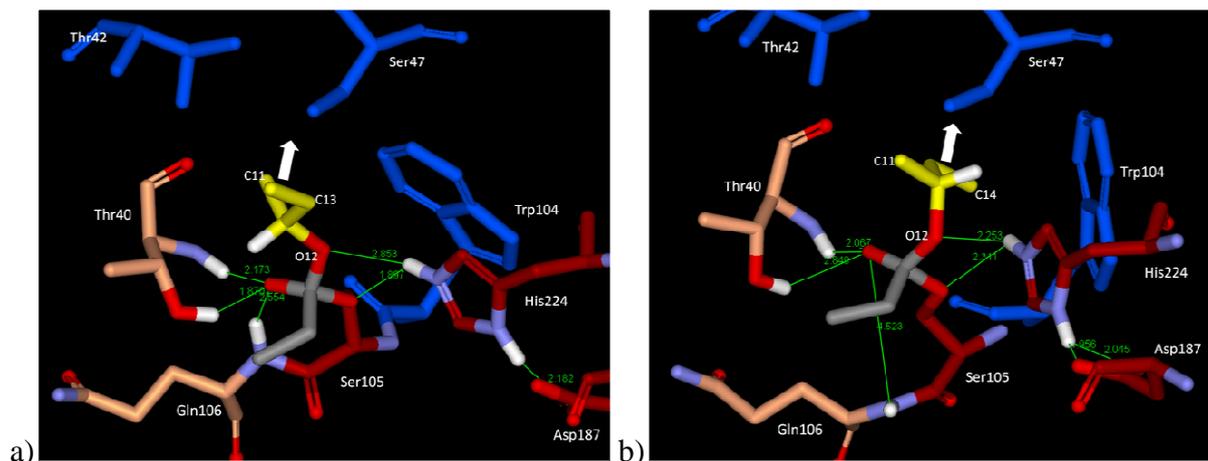


Figure 49 : Structures non productives obtenues avec le (*R*)-butan-2-ol (en jaune). Sont représentés en gris la partie acyle, en rouge foncé les résidus de la triade catalytique, en bleu les résidus de la poche énanti sélective et en saumon les résidus du trou oxyanionique. Les distances entre les atomes impliqués dans des liaisons hydrogène sont en vert. Seuls les atomes d'hydrogène d'intérêt sont visibles. a) Structure avec la liaison hydrogène entre l'histidine et l'alcool absente. b) Structure avec l'oxyanion non stabilisé.

Comme pour le pentan-2-ol, les valeurs de *rmsd* obtenues pour la comparaison entre l'enzyme et la structure cristallographique sont basses. En effet le *rmsd* moyen des 8 structures retenues n'est que de 0,46 Å, si on ne considère que les atomes du squelette et de 0,72 Å si on prend en compte tous les atomes. Les valeurs maximales rencontrées sont 0,55 et 0,80 Å. Ces valeurs témoignent d'une évolution faible au cours des minimisations et sont très inférieures au critère de 3 Å, imposé par Vallikivi comme limite de similarité (Vallikivi et coll., 2005). Les variations de *rmsd* sont beaucoup plus importantes pour le substrat. En prenant en compte uniquement le substrat (alcool + acyle) et les atomes de la chaîne latérale de la Ser105, on obtient un *rmsd* moyen de 1,27 Å et la variation la plus importante est de 1,59 Å. Ces valeurs traduisent bien les réorientations précédemment constatées (six orientations au départ et seulement trois à l'arrivée).

En ce qui concerne la forme *S* du butan-2-ol, deux structures peuvent être considérées comme non productives, à cause d'une mauvaise stabilisation de l'oxyanion. Les valeurs de *rmsd* calculées sont très proches de celles trouvées pour la forme *R*. Ainsi les valeurs moyennes obtenues pour les atomes du squelette, tous les atomes et les atomes du substrat additionnés de la chaîne latérale de la Ser105, sont respectivement de 0,45 ; 0,71 et 1,16 Å. Ces deux structures non productives sont conformes aux critères énergétiques imposés. On peut constater que les deux structures non productives correspondent au mode III et au mode

intermédiaire. Par conséquent, toutes les structures retenues, sur critères énergétiques et productives appartiennent au mode II (avec le groupement éthyle orienté vers la poche énantiométrique). Ce dernier mode correspond bien au mode de fixation décrit dans la littérature comme privilégié par l'énantiomère *S* des alcools secondaires.

Si l'on ne s'intéresse qu'aux formes productives, l'énantiomère *R* est privilégié par rapport à *S* (6 et 4 possibilités respectivement et quelle que soit la répartition dans les modes) ; cela est qualitativement conforme aux résultats expérimentaux si l'on admet que ces formes sont énergétiquement équiprobables. Quant aux formes non productives, elles peuvent avoir un effet inverse et leur présence peut diminuer l'énantiosélectivité de l'énantiomère correspondant. En effet, leurs fixations probables dans le site catalytique (attestées par les critères énergétiques) diminueraient l'efficacité enzymatique puisque la réaction ne peut avoir lieu. Dans le cas présent des (*R*)- et (*S*)-butan-2-ol, le nombre de formes non productives est équivalent et donc sans effet global sur l'énantiosélectivité.

A.III.3. Détermination du mode de fixation privilégié

Dans les paragraphes précédents, les modes de fixation du butan-2-ol et du pentan-2-ol ont été répertoriés. Ici, nous avons tenté de déterminer le mode de fixation privilégié des énantiomères du butan-2-ol et du pentan-2-ol en utilisant les termes énergétiques précédemment calculés pour sélectionner les structures les plus probables (E_{pT} , E_{pA} et E_{intEA}). L'énergie d'interaction entre l'enzyme et le substrat (E_{intES}) et l'énergie potentielle du substrat entier (E_{pS}) ont également été calculées. Afin de comparer les modes de fixation entre eux, les moyennes des énergies correspondant à chaque mode de fixation ont été calculées. Puis, les meilleures structures ont été sélectionnées selon ces différents critères d'énergies (Tableau 17). Ce travail a été effectué sur la totalité des structures retenues, considérées comme les plus stables, ainsi que sur les structures productives.

Le mode de fixation privilégié par le (*R*)-pentan-2-ol peut être déterminé sans ambiguïté. En effet, toutes les énergies calculées, excepté la moyenne des E_{pT} , sont en faveur du mode I. Ainsi il semblerait que pour le pentan-2-ol le mode de fixation privilégié des structures productives, correspond bien au mode de fixation décrit comme tel dans la littérature (Orrenius et coll., 1998 a ; Hæffner et coll., 1998).

La détermination du mode de fixation privilégié du (*S*)-pentan-2-ol est plus difficile. Ainsi, pour toutes les structures retenues, il apparaît que le mode I soit privilégié par E_{p_T} , le mode II par E_{p_A} et E_{p_S} et le mode III par les énergies d'interaction ($E_{int_{EA}}$ et $E_{int_{ES}}$). En considérant uniquement les structures productives le mode II semble être préféré par l'enzyme. En effet, les énergies potentielles moyennes E_{p_T} , E_{p_A} et E_{p_S} sont en faveur de ce mode, et les meilleures structures choisies en fonction de E_{p_T} , E_{p_A} , E_{p_S} et $E_{int_{EA}}$ sont en mode II (Tableau 17 et 18). Bien que la moyenne des énergies d'interaction soit meilleure pour le mode III (avec le substituant M dans la poche énantiosélective), la structure la plus stable sélectionnée selon l'énergie $E_{int_{EA}}$ appartient au mode II.

Un problème semblable a été rencontré lors de la détermination du mode de fixation privilégié du (*R*)-butan-2-ol. En effet, pour cet énantiomère il n'y a pas de concordance entre les différentes énergies. Ainsi les moyennes des énergies E_{p_S} et E_{p_A} sont en faveur du mode I, $E_{int_{EA}}$ est en faveur du mode II et $E_{int_{ES}}$ et E_{p_T} sont en faveur du mode intermédiaire. La même chose peut être constatée pour les structures productives. Le choix de la meilleure structure n'apporte pas plus d'information, car en fonction des énergies choisies, ces structures auront des modes différentes (Tableau 17). On peut noter par ailleurs que les résultats sont différents, si on regarde l'énergie d'interaction entre l'enzyme et la partie alcool du substrat ou entre l'enzyme et la totalité du substrat. Par conséquent, la partie acyle semble jouer un rôle non négligeable dans la fixation de l'alcool secondaire. Une fois de plus, il est nécessaire de sélectionner un critère énergétique fiable. Précédemment, nous avons supposé que c'est l'énergie d'interaction entre l'enzyme et la partie alcool du substrat ($E_{int_{EA}}$) qui décrit le mieux notre système. Si ce terme énergétique est choisi, c'est le mode II, avec le substituant L dirigé vers la poche énantiosélective, qui est favorisé. Ce mode est différent du mode de fixation considéré productif, mode I, selon Orrenius et coll. (Orrenius et coll., 1998a).

Pour les structures retenues pour le (*S*)-butan-2-ol il apparaît que la moyenne des énergies d'interaction entre l'enzyme et la partie alcool du substrat soit en faveur du mode III. Toutes les autres énergies moyennes calculées ont été en faveur du mode II. De plus, la structure ayant la meilleure $E_{int_{EA}}$ appartient également au mode II (Tableau 18). Le même résultat a été trouvé en sélectionnant la meilleure structure selon l'énergie potentielle totale (E_{p_T}), du substrat (E_{p_S}) ou de l'alcool (E_{p_A}) ou selon l'énergie d'interaction entre l'enzyme et le substrat ($E_{int_{ES}}$) (Tableau 4). Ainsi, bien que l'énergie d'interaction moyenne $E_{int_{EA}}$ soit en faveur du mode III, c'est le mode de fixation II qui est privilégié pour le (*S*)-butan-2-ol.

Toutes les structures productives étant en mode II, il n’y a finalement aucune ambiguïté concernant le choix du mode de fixation.

Tableau 17 : Meilleures énergies mesurées pour les structures retenues après application des trois critères énergétiques et pour les structures retenues et productives. Ces valeurs n’appartiennent pas à une même structure. Les modes de fixation de ces structures sont entre parenthèses ; (int) représente le mode intermédiaire. E_{pT} , $E_{int_{ES}}$, $E_{int_{EA}}$, E_{pS} et E_{pA} représentent respectivement l’énergie potentielle totale, l’énergie d’interaction entre l’enzyme et le substrat, l’énergie d’interaction entre l’enzyme et la partie alcool du substrat, l’énergie potentielle du substrat et l’énergie potentielle de la partie alcool du substrat (en kcal.mol⁻¹).

Alcool		E_{pT}	$E_{int_{ES}}$	$E_{int_{EA}}$	E_{pS}	E_{pA}
(R)-pentan-2-ol	retenues	-17406 (I)	-192,9 (I)	-95,5 (I)	0,2 (I)	8,1 (I)
	productives	-17296 (III)	-192,9 (I)	-79,6 (I)	4,0 (I)	8,1 (I)
(S)-pentan-2-ol	retenues	-17394 (I)	-189,6 (III)	-99,0 (III)	0,9 (II)	8,9 (II)
	productives	-17354 (II)	-189,0 (III)	-87,4 (II)	0,9 (II)	8,9 (II)
(R)-butan-2-ol	retenues	-17434 (II)	-192,3 (II)	-86,7 (II)	-2,4 (I)	5,6 (I)
	productives	-17376 (int)	-186,1 (int)	-84,6 (II)	-2,4 (I)	5,6 (I)
(S)-butan-2-ol	retenues	-17425 (II)	-180,3 (II)	-78,0 (II)	-0,5 (II)	5,3 (II)
	productives	-17425 (II)	-180,3 (II)	-78,0 (II)	-0,5 (II)	5,3 (II)

Tableau 18 : Energies mesurées pour la structure ayant l’énergie interaction entre l’enzyme et la partie alcool du substrat la plus basse parmi les structures retenues après application des trois critères énergétiques et pour les structures retenues et productives. E_{pT} , $E_{int_{ES}}$, $E_{int_{EA}}$, E_{pS} et E_{pA} représentent respectivement l’énergie potentielle totale, l’énergie d’interaction entre l’enzyme et le substrat, l’énergie d’interaction entre l’enzyme et la partie alcool du substrat, l’énergie potentielle du substrat et l’énergie potentielle de la partie alcool du substrat (en en kcal.mol⁻¹).

Alcool		Mode	E_{pT}	$E_{int_{ES}}$	$E_{int_{EA}}$	E_{pS}	E_{pA}
(R)-pentan-2-ol	retenues	I	-17337	-187,8	-95,5	6,3	12,2
	productives	I	-17273	-172,6	-79,6	7,3	14,6
(S)-pentan-2-ol	retenues	III	-17294	-182,3	-99,0	11,8	10,8
	productives	III	-17238	-189,0	-80,1	13,2	12,2
(R)-butan-2-ol	retenues	II	-17434	-192,3	-86,7	4,6	9,9
	productives	II	-17260	-178,1	-84,6	6,8	10,1
(S)-butan-2-ol	retenues	II	-17304	-176,9	-78,0	3,0	6,6
	productives	II	-17304	-176,9	-78,0	3,0	6,6

A.III.4. Conclusions

Deux modes de fixation ont été décrits dans la littérature pour chaque énantiomère des alcools secondaires. Pour la CALB, le mode de fixation II pour la forme *R* et le mode I pour la forme *S* ont été considérés comme non productifs, car la liaison hydrogène entre l'His224 et l'atome oxygène de l'alcool était absente (Hæffner et coll., 1998). Nous avons montré précédemment que d'autres modes de fixation peuvent exister. Dans cette partie nous avons regardé si ces structures étaient productives ou non. L'équipe de Hult a montré que pour le butan-2-ol et le pentan-2-ol le mode de fixation II pour la forme *R*, avec substituant L vers la poche énantiosélective, était également productif. Dans leur étude, seul le mode de fixation I de l'énantiomère *S*, avec substituant L vers la surface, était non productif (Orrenius et coll., 1998a). On retrouve les modes I et II pour les formes *R* et *S*, mais ces modes contiennent des structures productives et non productives. Globalement nous n'avons pas trouvé de mode de fixation spécifique aux structures dites "non productives". Les modes de fixation III et intermédiaires regroupent des structures non productives à l'exception de trois structures : une structure avec le (*R*)-butan-2-ol en mode intermédiaire et une pour chacun des énantiomères du pentan-2-ol en mode III (Tableau 15).

Nous avons espéré pouvoir expliquer l'énantiosélectivité de la CALB vis-à-vis du butan-2-ol et du pentan-2-ol en se basant sur les nombres de structures productives et non productives pour les deux formes *R* et *S*. En effet, si la forme *S* présentait plus de structures non productives, cela aurait suggéré qu'il y avait plus de chance que l'énantiomère *S* se fixe en mode non productif et ressorte (ou reste) de la cavité sans subir l'acétylation. Malheureusement les résultats obtenus sont décevants. Dans le cas du butan-2-ol, l'identification et le comptage des structures non productives n'a pas permis d'améliorer quantitativement l'explication de l'énantiosélectivité car les formes *R* et *S* ont autant de structures non productives (2 chacun). A l'inverse, dans le cas du pentan-2-ol, la statistique basée uniquement sur le comptage des solutions énergétiquement acceptables était déjà non conforme aux résultats expérimentaux, mais elle devient encore plus divergente lorsque l'on distingue les formes non productives, car l'énantiomère *R* a plus de formes non productives que *S* (8 et 5 respectivement). La règle simple d'additivité des formes productives et de perturbation des formes non productives ne permet donc pas d'expliquer l'énantiosélectivité de la CALB.

En dernier lieu, nous avons regardé si certains modes étaient privilégiés par rapport à d'autres, selon des critères énergétiques. D'après notre étude, il apparaît que le mode I est privilégié pour le (*R*)-pentan-2-ol. Pour le (*S*)-butan-2-ol, nous avons noté précédemment, que tous les structures retenues et productives appartenaient au mode II. Néanmoins, nous avons montré que ce mode était bien le mode de fixation privilégié pour les structures retenues précédemment sur des critères d'énergie. Pour le (*R*)-butan-2-ol et (*S*)-pentan-2-ol, le choix d'un mode nécessitait le choix d'un critère énergétique adapté. Nous avons choisi comme critère l'énergie d'interaction entre l'enzyme et la partie alcool du substrat. Ainsi, le mode de fixation II a été considéré comme privilégié pour ces deux énantiomères. Pour le (*R*)-butan-2-ol, nos résultats diffèrent de ceux de la littérature, car le mode de fixation privilégié d'après la littérature est le mode I (Orrenius et coll., 1998 a, Hæffner et coll., 1998).

Aucun des paramètres étudiés dans ce paragraphe ne permet d'expliquer l'énantiosélectivité de la CALB. Il apparaît que l'hypothèse de l'équiprobabilité des structures soit erronée. Dans le prochain paragraphe, nous allons donc affiner les paramètres énergétiques, afin de ne considérer que les meilleures structures.

A.IV. Tentatives de corrélation de l'énantiosélectivité avec des critères structuraux et énergétiques

Précédemment, nous avons cherché à expliquer l'énantiosélectivité de la CALB vis-à-vis du butan-2-ol et du pentan-2-ol en se basant sur la fréquence de structures énergétiquement favorables puis en modulant ce critère simple par la présence de structures non productives, mais sans succès (§ A.III). Ici, nous allons essayer de trouver une explication en utilisant des critères structuraux puis des critères énergétiques. Dans un premier temps les distances établies entre l'histidine catalytique et l'oxygène de la partie alcool (D1), d'une part, et entre l'histidine catalytique et l'oxygène de la sérine (D2), d'autre part, ont été utilisés. Dans un deuxième temps, nous avons décidé de ne plus assimiler les structures sélectionnées à des structures équiprobables énergétiquement. Afin de sélectionner les meilleures structures, des critères énergétiques plus sophistiqués ont été choisis. Pour finir, ces résultats ont été reliés à la déformation du substrat.

A.IV.1. Etude des distances caractérisant les liaisons hydrogènes indispensables à la catalyse enzymatique

Une corrélation a été trouvée par Schulz et coll. entre la distance des atomes $H_{\epsilon 2}$ de l'histidine et l'oxygène des alcools secondaires et l'énantiosélectivité observée pour leurs résolutions par la lipase de *Pseudomonas cepacia*. Ils ont montré que, pour l'énantiomère le plus lent, dans un mode de fixation productif, cette distance était plus grande pour les alcools présentant un ratio énantiomérique élevé (Schulz et coll, 2000). Sur la base de cette étude nous avons comparé cette distance pour les deux formes *R* et *S* du butan-2-ol et du pentan-2-ol d'une part, puis entre ces deux alcools. En plus de cette distance, nous avons également utilisé la distance séparant l'histidine de l'atome O_{γ} de la Ser105 (tableau 19).

Tableau 19 : Récapitulatif des moyennes des distances et des valeurs de distance les plus courtes (en Å) mesurées pour les structures retenues avec le butan-2-ol et le pentan-2-ol.

Alcool		dist O ₁₂ --- N _{ε2} H His 224		dist O _γ --- N _{ε2} H His 224	
		d O/H	d O/N	d O/H	d O/N
(R)-pentan-2-ol	moyenne	2,52	2,94	2,00	2,59
	minimum	2,10	2,51	1,81	2,45
(S)-pentan-2-ol	moyenne	2,46	2,89	2,14	2,70
	minimum	1,95	2,50	1,85	2,47
(R)-butan-2-ol	moyenne	2,35	2,76	2,16	2,65
	minimum	2,07	2,54	1,90	2,47
(S)-butan-2-ol	moyenne	2,30	2,69	2,05	2,62
	minimum	2,13	2,52	1,93	2,51

A.IV.1.a Cas du pentan-2-ol

Les distances "catalytiques", correspondant aux liaisons hydrogène établies entre l'His224 et l'oxygène de la partie alcool du substrat (O₁₂) (D1) d'une part et l'oxygène de la Ser105 (O_γ) (D2) d'autre part, ont été mesurées. Deux méthodes ont été utilisées afin de les comparer : soit en comparant les moyennes obtenues pour les structures les plus stables, retenues selon le triple critère énergétique, soit en comparant la distance la plus courte. En ce qui concerne la distance entre l'His224 (H_{ε2}) et l'oxygène de l'alcool (O₁₂) (D1), elle est plus longue pour la forme *R* que pour la forme *S* (les valeurs moyennes des distances sont de 2,52 et 2,46 Å respectivement) (Tableau 19). C'est l'inverse qui est observé pour la distance mesurée entre l'His224 (H_{ε2}) et la Ser105 (O_γ) (D2). Ainsi cette distance, conformément à nos attentes, est plus courte pour la forme *R*. Ceci reste vrai, que l'on considère la moyenne des distances de toutes les structures, ou uniquement la distance la plus courte (Tableau 19). Néanmoins cette différence reste très faible, aux alentours de 0,1 Å, ce qui est inférieur à la précision de la résolution de la structure cristallographique, $1,7 * 10\% = 0,17$ Å. De plus, il est difficilement imaginable qu'une différence si faible puisse être responsable d'un ratio énantiomérique de 100.

A.IV.1.b Cas du butan-2-ol

Nous avons comparé les distances correspondant aux liaisons hydrogène susceptibles d'être formées par l'His224. La comparaison selon les deux méthodes conduit aux mêmes résultats : les distances D1 et D2 sont plus courtes pour la forme *S* que pour la forme *R* (Tableau 19). Ces résultats suggèrent que l'énantiomère *S* serait transformé plus facilement par l'enzyme

que l'énantiomère *R*, or ce n'est pas ce qui a été trouvé expérimentalement (la forme *R* est transformée globalement quatre fois plus vite que la forme *S*). Ces distances ne permettent donc pas d'expliquer l'énantiosélectivité de la CALB pour le butan-2-ol.

A.IV.2. Détermination de l'énantiosélectivité par de critères énergétiques

Sur la base des solutions déjà sélectionnées, notre objectif était donc de trouver un deuxième crible énergétique plus contraignant capable de restreindre encore plus les solutions (productives et non productives) et permettant de généraliser une explication qualitative de l'énantiosélectivité pour les deux alcools secondaires étudiés. Avant de choisir ce critère unique, il faut d'abord analyser les différents termes énergétiques globaux disponibles : l'énergie potentielle totale du complexe enzyme-substrat (E_{pT}), l'énergie potentielle de l'enzyme (E_{pE}), l'énergie potentielle du substrat (E_{pS}) et finalement l'énergie d'interaction enzyme-substrat (E_{intES}). (Rappel : précédemment, l'énergie potentielle totale du complexe enzyme-substrat (E_{pT}), l'énergie potentielle de la partie alcool du substrat (E_{pA}) et l'énergie d'interaction enzyme-alcool (E_{intEA}) ont été utilisées simultanément, afin de sélectionner les structures les plus stables.)

Dans ce protocole qui ne fait pas intervenir de molécules de solvant, ces énergies sont reliées de la façon suivante : $E_{pT} = E_{pE} + E_{pS} + E_{intES}$

L'énergie potentielle de l'enzyme (E_{pE}) est susceptible de variations artéfactuelles liées à des modifications conformationnelles hors des zones d'interaction avec le substrat ; ces variations peuvent être induites par le processus d'optimisation mathématique (quel qu'il soit) de l'énergie. A ce titre, ce terme énergétique ne nous semble pas pertinent et n'a donc pas été retenu. De la même façon, l'énergie potentielle totale du complexe enzyme-substrat, dépendant en partie du terme énergétique de l'enzyme n'a pas été retenue non plus. Quant au substrat, nous avons déjà mentionné qu'il ne pouvait se positionner dans le site catalytique (en solutions productives ou non productives) qu'en se déformant. De ce fait, il ne nous a pas semblé raisonnable de prendre en compte son énergie potentielle (E_{pS}) ne sachant pas exactement l'effet de cette déformation sur cette énergie. *A contrario*, en prenant un autre critère énergétique, il est plus utile d'analyser (E_{pS}) pour quantifier la déformation du

substrat. Au bout du compte, le seul terme restant est l'énergie d'interaction enzyme-substrat ($E_{int_{ES}}$) qui contient intrinsèquement l'information recherchée : l'adaptation des deux acteurs pour une solution d'arrimage énergétiquement acceptable tenant compte notamment de la déformation nécessaire du substrat. Par ailleurs, ce terme d'interaction est très classiquement utilisé pour comparer des complexes engageant des partenaires différents mais présentant des zones d'interactions similaires en surface et en types de contacts. Il est intéressant de noter que les valeurs les plus basses obtenues pour ce terme énergétique pour le butan-2-ol et le pentan-2-ol (formes *R* et *S* confondues) sont très proches (-192,4 et -192,9 kcal.mol⁻¹ respectivement). Ce terme énergétique nous ayant semblé tout à fait adapté pour notre problème, nous avons pu appliquer un critère de sélection certes arbitraire mais relativement strict de 10 kcal.mol⁻¹ par rapport aux valeurs les plus basses pour (±)-butan-2-ol et (±)-pentan-2-ol respectivement. S'agissant de mécanique moléculaire, les valeurs mentionnées ne peuvent s'interpréter qu'en relatif en non pas en absolu ; une variation maximale de 10 kcal.mol⁻¹ entre la solution la plus stable et la dernière retenue correspondrait selon la relation de Boltzmann à une différence de probabilités d'existence de ces solutions très importante. Néanmoins, à cause des différents biais introduits par nos protocoles de minimisations de l'énergie, nous avons estimé que le critère de coupure utilisé était globalement en adéquation avec la précision de nos calculs énergétiques.

Le tableau 20 (ci-dessous) indique le nombre de solutions retenues avec ce deuxième crible énergétique, la répartition des solutions selon les différents modes déjà décrits et également le caractère productif ou non productif. Lorsque la solution est unique, la valeur entre parenthèses correspond à cette énergie d'interaction ; dans le cas de plusieurs solutions, la valeur représente la moyenne des énergies d'interaction.

Le tableau 20 : Solutions retenues avec le deuxième crible énergétique : nombre de solutions et leur répartition selon les différents modes. P représente les structures productives et NP les structures non productif. Lorsque la solution est unique, la valeur entre parenthèses correspond à l'énergie d'interaction ; dans le cas de plusieurs solutions, la valeur représente la moyenne des énergies d'interaction (en kcal.mol⁻¹).

Alcool		Total	Mode I	Mode II	Mode III	Mode intermédiaire
(R)-pentan-2-ol	P	2(-188,2)	1(-192,9)	1(-183,4)		
	NP	2(-185,2)	2(-185,2)			
(S)-pentan-2-ol	P	2(-186,9)		1(-184,8)	1(-189,0)	
	NP	2(-186,8)	1(-184,0)		1(-189,6)	
(R)-butan-2-ol	P	1 (-186,1)				1 (-186,1)
	NP	1 (-192,4)		1(-192,4)		
(S)-butan-2-ol	P	0				
	NP	0				

A.IV.2.a Cas du (\pm)-pentan-2-ol

Pour le (R)-pentan-2-ol, deux solutions productives sont sélectionnées appartenant aux modes I et II avec une préférence assez marquée toutefois pour le premier mode (-192,9 et -183,4 kcal.mol⁻¹ respectivement), ce qui correspond à ce qui est décrit dans la littérature. Il existe bien une solution d'arrimage productive correspondant au mode III mais qui n'a pas été retenue à cause d'une énergie d'interaction très défavorable (-167,9 soit 25,0 kcal.mol⁻¹ au dessus de la meilleure solution). Par ailleurs, il existe aussi 2 solutions non productives regroupées dans le mode I avec des énergies certes moins basses que les solutions productives mais cependant significatives. Enfin, bien que non retenue par ce crible, il faut mentionner une solution non productive en mode II (-180,5 kcal.mol⁻¹). Finalement, sur la base de ce critère, il faut donc admettre que la résolution du (R)-pentan-2-ol est probablement perturbée par l'arrimage occasionnel de ce substrat en mode non productif.

Pour le (S)-pentan-2-ol, 2 solutions productives sont sélectionnées appartenant aux modes II et III avec une préférence marquée toutefois pour le mode III (-189,0 kcal.mol⁻¹) qui n'a pas été décrit dans la littérature. Pour ces solutions productives, une seule solution du mode I, sélectionnée par le premier crible mais non retenue par ce deuxième crible à cause d'une énergie d'interaction très médiocre (-159,5 kcal.mol⁻¹), devrait avoir une probabilité d'existence quasiment nulle (33,4 kcal.mol⁻¹ au-dessus de la meilleure solution). Cependant, la caractéristique importante du (S)-pentan-2-ol est d'avoir également deux formes non productives (mode I et III) d'énergies d'interaction tout à fait comparables aux solutions

productives. Il existe également une autre forme non productive en mode II mais négligeable et non mentionnée dans le tableau compte tenu de sa mauvaise énergie d'interaction (-156,0 kcal.mol⁻¹). Finalement, avec les solutions retenues par ce deuxième crible, la résolution du (*S*)-pentan-2-ol est très significativement perturbée par l'arrimage de ce substrat en mode non productif (probabilité aussi importante que le mode productif, eu égard aux valeurs moyennes des énergies d'interaction).

La comparaison des solutions *R* et *S* du pentan-2-ol permet d'obtenir une explication qualitativement satisfaisante de l'énantiosélectivité mesurée expérimentale (préférence de la résolution de la forme *R*). Pour la conformation *R*, le tableau indique une préférence des formes productives par rapport aux formes non productives (différences des moyennes d'énergie de 3 kcal.mol⁻¹ en faveur des solutions productives). Alors que pour les formes *S*, la perturbation des formes non productives est bien plus marquée (pas de différences des moyennes d'énergies). De plus, les solutions productives *R* sont un peu meilleures en énergies d'interaction que les celles de *S* (-188,2 et 186,9 kcal.mol⁻¹ respectivement).

A.IV.2.b Cas du (\pm)-butan-2-ol

Pour le (*R*)-butan-2-ol, une seule solution productive est sélectionnée mais appartenant à un mode intermédiaire contrairement à ce qui est décrit dans la littérature (mode I). A titre de comparaison et même si les solutions I et II n'ont pas été retenues, les meilleures valeurs énergétiques sont respectivement de -177,8 et -178,1 kcal.mol⁻¹. Par contre, la seule forme productive du (*R*)-butan-2-ol est sérieusement concurrencée par une forme non productive (mode II) encore meilleure en énergie. Il faut également noter une autre forme non productive en mode I, non retenue à cause de son énergie d'interaction (-173,4 kcal.mol⁻¹) et donc peu probable. En ne s'intéressant qu'aux solutions mentionnées dans le tableau, on peut donc en déduire que la résolution du (*R*)-butan-2-ol est largement perturbée par cette forme non productive.

Pour le (*S*)-butan-2-ol, aucune solution est retenue d'après notre deuxième crible énergétique aussi bien productive que non productive. Pour information, les solutions productives sélectionnées par le premier crible étaient toutes de mode II et la meilleure d'entre elles a une énergie d'interaction de -180,3 kcal.mol⁻¹ donc seulement 12,1 kcal.mol⁻¹ au-dessus de la meilleure solution, non loin du seuil de coupure. Sa probabilité d'existence notamment par

rapport à la solution productive *R* n'est pas complètement négligeable. Enfin, la meilleure solution non productive a une énergie d'interaction de $-172,2 \text{ kcal.mol}^{-1}$ donc significativement plus mauvaise et on estime que sa probabilité d'existence est insignifiante.

Concernant l'énantiosélectivité pour le butan-2-ol, l'explication à partir des différences de valeurs d'énergies d'interaction est donc bien plus aisée que pour le pentan-2-ol. Néanmoins, il faut clairement admettre qu'une forme non productive peut perturber l'efficacité de la résolution de l'énantiomère *R* et moduler l'énantiosélectivité sans toutefois l'inverser.

A.IV.2.c Déformations du substrat dans le site catalytique

Ces déformations se traduisent par une augmentation de l'énergie potentielle du substrat. Après le premier crible énergétique, pour l'ensemble des solutions retenues pour le pentan-2-ol et le butan-2-ol (solutions *R/S* et productives/non productives confondues), les valeurs moyennes d'énergies potentielles sont de 6,5 et 3,1 kcal.mol^{-1} respectivement. Cet écart est tout à fait interprétable étant donné les faibles poids moléculaires. Après ce deuxième crible énergétique, on constate que les meilleures solutions retenues ont des énergies potentielles pour le substrat globalement bien supérieures. Pour les deux meilleures solutions productives retenues du (*R*)-pentan-2-ol, la moyenne des énergies du substrat est de 11,3 kcal.mol^{-1} (soit une augmentation très significative de 4,8 kcal.mol^{-1}) mais ce n'est pas le cas pour les 2 modes non productifs (6,1 kcal.mol^{-1}). Pour le (*S*)-pentan-2-ol, les modes productifs et non productifs ont tous les deux des valeurs moyennes d'énergies potentielles du substrat élevées (12,2 et 9,8 kcal.mol^{-1} respectivement). Enfin pour le (*R*)-butan-2-ol, les formes productive et non productive ont également des énergies potentielles du substrat significativement élevées (6,1 et 4,6 kcal.mol^{-1} respectivement en comparaison à la moyenne de référence du premier crible : 3,1 kcal.mol^{-1}). Ces variations de l'énergie potentielle du substrat peuvent également être reliées à des déformations des angles dièdres. Le tableau 21 montre que certaines valeurs d'angles dièdres des meilleures structures (retenues après application du second critère) sont très éloignées des valeurs attendues pour une conformation décalée (-60 , $+60$ ou 180°).

Cela montre clairement d'une part, que les meilleures solutions d'arrimage nécessitent globalement les déformations les plus importantes du substrat pour s'adapter au site catalytique et d'autre part, qu'on ne peut pas différencier les modes productifs de ceux non productifs.

Tableau 21 : Valeurs des angles dièdres du substrat lié à la Ser105 mesurées pour les structures retenues après application du deuxième critère énergétique. Les valeurs en gras correspondent aux dièdres modifiés lors de la construction des intermédiaires tétraédriques. P représente une structure productive, NP une structure non productive et (int) représente le mode intermédiaire. t1 à t7 correspondent respectivement aux angles dièdres $C_{\alpha}C_{\beta}O_{\gamma}C_1$, $C_{\beta}O_{\gamma}C_1C_2$, $O_{\gamma}C_1O_{12}C_{12}$, $C_1O_{12}C_{12}C_{11}$, $O_{\gamma}C_1C_2C_3$, $O_{12}C_{12}C_{13}C_{14}$, $C_{12}C_{13}C_{14}C_{15}$. E_{p_s} est l'énergie potentielle du substrat en $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

	mode		E_{p_s}	t1	t2	t3	t4	t5	t6	t7
<i>(R)</i> -pentan-2-ol	P	I	11,3	-154	90	-180	-65	-135	-178	-163
	P	II	11,3	-126	140	150	67	-132	-88	65
	NP	I	6,3	-133	139	132	-69	-99	36	58
	NP	I	5,9	-128	135	129	-63	-72	-61	86
<i>(S)</i> -pentan-2-ol	P	II	11,3	-147	134	169	-59	-141	-40	-30
	P	III	13,2	-123	107	-176	-42	-127	-173	-53
	NP	I	7,5	-138	140	165	152	-120	66	-166
<i>(R)</i> -butan-2-ol	NP	III	12,1	-134	122	87	147	-66	83	65
	P	int	6,1	-143	103	-175	-63	-134	172	
	NP	II	4,6	-165	95	116	86	-125	-63	

A.IV.3. Conclusions

Dans un premier temps, nous avons comparé les distances correspondant à deux liaisons hydrogènes nécessaires pour la catalyse impliquant l'His224. Ces distances se sont avérées plus courtes pour la forme *S*, suggérant une réaction plus facile pour cet énantiomère (Tableau 19). Une fois de plus, ce n'est pas un bon paramètre pour expliquer l'énantiosélectivité de la CALB vis-à-vis de ces alcools. Néanmoins, nous avons constaté que cette distance était un peu plus longue pour les structures obtenues avec le pentan-2-ol que pour celles avec le butan-2-ol (Tableau 16). Conformément à ce qui était trouvé pour la lipase de *Pseudomonas cepacia* par Schulz et coll., ces résultats suggèrent une énantiosélectivité plus élevée de l'enzyme vis-à-vis du pentan-2-ol que du butan-2-ol. Bien que ces résultats corroborent ceux de l'expérimentation, la différence de distance est trop faible pour expliquer la forte différence d'énantiosélectivité observée.

Ensuite, un deuxième critère énergétique a été appliqué aux solutions déjà retenues, afin de réduire d'avantage les nombres de solutions. Ce deuxième critère énergétique, même s'il peut être discuté quant au seuil de coupure, a le mérite de pouvoir expliquer qualitativement la préférence de la résolution de la forme *R* par rapport à la forme *S* pour le butane-2-ol et le pentan-2-ol. Pour cela, plusieurs modes sont nécessaires et de plus, ce schéma explicatif nécessite explicitement de prendre aussi en compte les solutions non productives. Ces deux aspects sont réellement novateurs et très peu évoqués jusqu'à présent. Il faut cependant admettre que ce schéma explicatif n'est pas capable d'être quantitativement adapté à la très forte préférence de la conformation *R* dans le cas de pentan-2-ol. Enfin ce crible énergétique met en évidence la nécessité de la déformation du substrat dans le site catalytique, cette déformation étant d'autant plus forte pour les meilleures solutions d'arrimages.

A.V. Conclusions et perspectives du chapitre A

Dans cette partie, nous avons essayé de corréler les résultats de la modélisation avec ceux issus de l'expérience. Pour cela, une étude systématique des différentes orientations du butan-2-ol et du pentan-2-ol a été menée. Le second intermédiaire tétraédrique formé par ces alcools avec l'enzyme a été construit. Différentes orientations ont été envisagées de façon à balayer tout le volume de la cavité. Ainsi, pour chaque forme du butan-2-ol et du pentan-2-ol, 18 et 54 structures, respectivement, ont été construites manuellement. Ces structures ont été optimisées par deux minimisations successives. Les structures les moins stables, ayant l'énergie potentielle totale, l'énergie potentielle de la partie alcool du substrat et l'énergie d'interaction entre l'enzyme et la partie alcool du substrat trop hautes, ont été éliminées. L'étude des structures retenues pour ces deux alcools, montre l'existence des modes de fixation différents de ceux de la littérature (Tableau 14). En effet, Orrenius et coll., n'ont décrits que deux orientations pour chaque forme (Orrenius et coll., 1998 a), et des orientations supplémentaires pour la forme *S* ont été envisagées que très récemment, mais finalement écartées car moins stables (Xu et coll., 2010).

Ensuite, nous avons vérifié si ces structures étaient productives, c'est-à-dire pouvaient donner lieu à la catalyse, ou pas. Les structures ont été considérées productives si toutes les liaisons hydrogène nécessaires ont été présentes et si la structure finale était relativement proche de la structure cristallographique. L'équipe de Hult a montré que pour le butan-2-ol et le pentan-2-ol le mode de fixation I pour la forme *S*, avec substituant L vers la surface, était non productif, car la liaison hydrogène entre l'His224 et l'atome oxygène de l'alcool (D1) était absente (Orrenius et coll., 1998 a). Notre étude n'a pas permis d'associer les structures non productives à un mode particulier. Le seul mode de fixation où toutes les structures sont non productives est le mode III pour la forme *R* du butan-2-ol, mais ceci n'est pas vérifié pour le pentan-2-ol. Parmi les toutes les structures en mode intermédiaire pour les deux alcools, une seule est productive pour le (*R*)-butan-2-ol (Tableau 15).

La fréquence de modes non productifs ne peut pas utilisée seule pour expliquer l'énantiosélectivité, car cela conduirait à des résultats inverses à ceux obtenues expérimentalement. En effet, pour le pentan-2-ol, la forme *R* présente plus de structures non productives, ce qui suggèrerait une préférence de la CALB pour la forme *S*. Dans le cas des structures les plus stables du butan-2-ol, nous avons trouvé autant de structures *R* que de

structures *S* non productives. Ces résultats vont dans le sens d'une préférence similaire de la CALB pour les deux formes.

La comparaison des différents modes de fixation des structures productives selon différents termes énergétiques nous a permis de déterminer les modes de fixation privilégiés pour les alcools étudiés. Ainsi, le (*R*)-pentan-2-ol semble adopter une orientation correspondant au mode I et le (*R*)-butan-2-ol une conformation correspondant au mode II. Pour la forme *S* de ces alcools, c'est le mode II qui semble être privilégié. Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature, excepté pour le (*R*)-butan-2-ol (Orrenius et coll., 1998 a).

En s'inspirant des études réalisées pour la lipase de *Pseudomonas cepacia* par Schulz et coll. (2000), nous avons étudié les distances correspondant à deux liaisons hydrogènes nécessaires pour la catalyse impliquant l'His224 (D1 et D2). Ces distances se sont avérées plus courtes pour la forme *S*, suggérant une réaction plus facile pour cet énantiomère (Tableau 16), par conséquent ce paramètre ne peut pas être utilisé pour expliquer l'énantiosélectivité de la CALB vis-à-vis de des alcools étudiés. Néanmoins, nous avons constaté que cette distance était un peu plus longue pour les structures obtenues avec le pentan-2-ol que pour celles avec le butan-2-ol (Tableau 16), suggérant une énantiosélectivité plus élevée de l'enzyme vis-à-vis du pentan-2-ol que du butan-2-ol. Mais la différence de distance semble trop faible pour pouvoir expliquer la forte différence d'énantiosélectivité observée.

Pour finir, un dernier crible énergétique a été appliqué. La comparaison selon l'énergie potentielle du substrat des structures ainsi retenues a été utilisée, avec succès, pour déterminer l'énantiopréférence de la CALB vis-à-vis du pentan-2-ol et du butan-2-ol : les structures obtenues pour la forme *R* ont été trouvées plus stables. Ce crible énergétique plus sophistiqué a permis une explication qualitative de l'énantiosélectivité mais nécessitant obligatoirement l'existence de solutions non productives.

Notre but de trouver un critère **quantitatif** pouvoir prédire l'énantiosélectivité de la CALB, n'a pas pu être atteint. Cet objectif était peut-être trop ambitieux. En effet, les ratios énantiomériques mesurés pour le butan-2-ol et le pentan-2-ol sont de 4 et 100, respectivement, ce qui correspond à une variation d'énergie potentielle $\Delta_{R-S}\Delta G$ faible, d'environ 0,9 et 2,9 kcal.mol⁻¹ (d'après l'équation 30 et si on néglige le terme entropique).

Même si les études plus anciennes ont permis de déterminer l'énantiomère privilégié (Orrenius et coll., 1998 a, Hæffner et coll., 1998, Raza et coll., 2001), relier les résultats à des valeurs du ratio énantiomérique n'a pas été possible (Kazlauskas, 2000).

Différentes explications sont possibles pour cet échec. Dans un premier temps, nous pouvons évoquer le protocole choisi pour notre étude. En effet, nous avons choisi de fixer certains atomes (tous les atomes du squelette dans un premier temps, puis uniquement certains atomes de carbone alpha). Néanmoins, ceci ne devrait pas forcément induire trop d'erreurs, car une étude récente témoigne de la rigidité de la CALB. Cette étude réalisée avec différents solvants, dont l'eau, a montré que la variation du *rmsd* par rapport à la structure cristallographique était faible (0,4 - 0,8 Å). De plus, la flexibilité des régions mobiles décroît avec la constante diélectrique du solvant (Trodler et Pleiss, 2008). Dans notre cas les variations du *rmsd* par rapport à la structure cristallographique sont de même ordre et la constante de diélectrique est un.

D'autre part nous avons choisi d'effectuer nos calculs sans modèle de solvation, afin de mieux tenir compte de notre milieu sans solvant. Un modèle de solvation, par exemple le modèle "distance dependant dielectrics", avec constante diélectrique de 1, aurait peut-être permis de mieux tenir compte des énergies électrostatiques. Pour des raisons similaires, le fait d'effacer les molécules d'eau présentes dans la structure cristallographique, peut également conduire à des erreurs. Par ailleurs, les charges partielles de l'intermédiaire tétraédrique ont été définies par défaut. Une étude par mécanique quantique des atomes à proximité de la liaison formée aurait été, peut-être, plus appropriée, mais les liaisons formées par les deux énantiomères, impliquent les mêmes atomes, par conséquent la différence devrait être négligeable lors de la comparaison des énergies.

On peut également mettre en cause la technique utilisée. En effet, la technique de la mécanique moléculaire ne permet pas de changer des conformations, car ce dernier nécessiterait le franchissement d'une barrière énergétique. Au vu des multitudes de conformations qui peuvent exister pour le complexe enzyme-substrat, la probabilité d'accéder par cette technique à un minimum global, correspondant à la conformation la plus stable, reste donc faible. Ainsi, par cette technique uniquement des minimums locaux peuvent être obtenus et ces derniers sont dépendants de la géométrie de départ. Dans le but d'explorer d'autres conformations de l'enzyme des techniques de dynamique moléculaire auraient pu être utilisées.

Un autre inconvénient de la mécanique moléculaire est le fait qu'elle ne tient pas compte de l'entropie. D'après les travaux de Burkert et coll. (1982), selon lesquelles la composante vibrationnelle de l'énergie peut être négligée par rapport à l'énergie potentielle, nous avons choisi d'exclure de notre étude l'entropie. Des études plus récentes, ont montré que l'entropie ne pouvait pas être négligée. On peut notamment citer les travaux de l'Ottosson (Ottosson et coll., 2001 et 2002). Par ailleurs une étude réalisée dans notre laboratoire, a montré, que pour le butan-2-ol et le pentan-2-ol, le terme entropique représentait un tiers de la différence énergétique mesurée (Léonard et coll., 2007). Une façon appropriée pour quantifier l'entropie à l'aide de la modélisation, serait d'étudier les volumes occupés par les substrats ou les amplitudes des déplacements des atomes du substrat au cours d'une dynamique (Ottosson et coll., 2002a).

Pour finir, notre étude est basée sur les différences observées entre les deux formes de l'alcool étudié, une fois que cette dernière est en place, mais elle ne tient pas compte de tout ce qui s'est passé avant ou après. Parmi les phénomènes qui ont lieu avant l'étape de transformation de l'alcool secondaire on peut citer la fixation du premier substrat, avec la cassure d'une liaison covalente, la libération d'un alcool et l'arrivée du second substrat. La fixation du premier substrat ne devrait avoir aucune influence, s'il ne comporte pas de centre de chiralité. Dans le cas de substrats chiraux, il se pourrait que les deux formes induisent des modifications différentes dans la structure enzymatique. Si ces modifications peuvent persister dans le temps elles pourraient avoir des effets sur le second substrat ("imprinting" ou "effet empreinte"). Une autre explication de l'énantiosélectivité pourrait résider dans une différence de chemin préférentiel pour les deux formes des alcools secondaires. En effet, il se peut que la forme *R* emprunte un chemin d'accès au site actif différent de celui emprunté par *S* ce qui se traduirait par un profil énergétique différent. Plus probablement même, on peut supposer que ce chemin soit le même (géométriquement parlant) mais que la courbe énergétique d'interaction enzyme/substrat soit différente entre *R* et *S*, exprimant ainsi une accessibilité différente. A notre connaissance, la seule étude de trajectoire du substrat a été réalisée par Guieysse et coll. pour la lipase de *Bulkhoderia cepacia*, mais ce dernier comporte un long tunnel d'accès au site actif. Avant de se lancer dans des études de modélisation très fastidieuses, nous avons choisis de vérifier expérimentalement, si ces phénomènes pouvaient réellement avoir des effets sur l'énantiosélectivité. Ces résultats seront présentés dans la suite.

Chapitre B. Explications non conventionnelles de l'énantiosélectivité

Dans la partie précédente, nous avons cherché de relier l'énantiosélectivité de la CALB vis-à-vis du butan-2-ol et du pentan-2-ol à la structure de l'enzyme et de l'alcool. Nous avons trouvé un critère énergétique, la différence d'énergie d'interaction entre l'enzyme et le substrat, entre les seconds intermédiaires tétraédriques formés avec les deux énantiomères, qui pouvait qualitativement expliquer l'énantiopréférence de la CALB pour ces alcools : la(les) meilleure(s) structures sélectionnées, après application de nos cribles énergétiques, étaient obtenus pour la forme *R*. Malheureusement, nous n'avons pas trouvé de critère quantitatif. Nous avons émis plusieurs hypothèses pour expliquer cet échec. Entre autres nous pouvons citer les hypothèses suivantes : les deux énantiomères présenteraient des chemins d'accès au site actif différents ; le premier substrat (l'ester, jouant le rôle de donneur d'acyle) déformerait le site actif de façon à privilégier ensuite la fixation de l'énantiomère *R* ; l'entropie aurait un rôle important dans la définition de l'énantiosélectivité. Dans cette partie, nous allons vérifier ces hypothèses pour la réaction de transestérification des alcools secondaires chiraux, et plus particulièrement le pentan-2-ol, catalysé par la CALB (schéma 25).

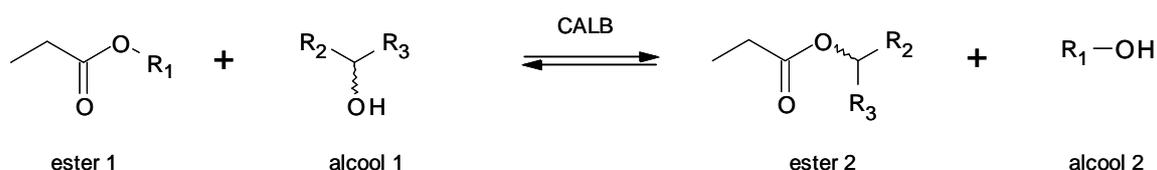


Schéma 25 : Réaction d'acylation (ou de transestérification) catalysée par la CALB. R_1 , R_2 et R_3 correspondent à des chaînes alkyles comportant 1 à 6 atomes de carbone.

Afin de mieux contrôler les paramètres de la réaction, nous avons utilisé le réacteur solide/gaz pour ces expériences. En effet, comme nous l'avons déjà souligné lors de l'étude bibliographique, le réacteur solide/gaz présente l'avantage majeur de pouvoir fixer et contrôler les activités thermodynamiques des substrats et d'un composé non réactant ajouté, indépendamment les uns des autres. Ceci permet notamment de travailler avec uniquement les substrats, sans solvant ou composé ajouté, et donc, d'avoir accès aux paramètres

intrinsèques de l'enzyme. Des travaux antérieurs ont montré que le réacteur solide/gaz pouvait être utilisé pour réaliser des réactions de transestérification, car le mécanisme de la CALB pour l'alcoolyse semble inchangé lorsqu'elle est utilisée avec des substrats gazeux (Bousquet-Dubouch et coll., 2001). En effet, les résultats cinétiques obtenues pour l'alcoolyse du méthyl propionate avec du *n*-propanol en réacteur solide/gaz ont montré que les vitesses initiales de réaction concordent avec un mécanisme Bi-Bi Ping-Pong avec inhibition compétitive par l'alcool (Bousquet-Dubouch et coll., 2001).

Dans un premier temps, nous avons identifié les résidus pouvant modifier le chemin d'accès des substrats au site actif, puis l'influence des mutations à ce niveau de l'enzyme a été étudiée pour la résolution des alcools chiraux. Dans un deuxième temps, afin de vérifier si la structure du premier substrat pouvait influencer l'énantiosélectivité de la CALB vis-à-vis du pentan-2-ol, différents esters ont été testés : des esters avec des parties alkyle (R_1) linaires de longueurs différentes puis des esters avec des parties alkyle chirales, mimant la structure du pentan-2-ol. Pour les esters chiraux des mélanges racémiques et des esters énantiopurs ont été utilisés. Pour finir, les paramètres thermodynamiques de la réaction d'acylation du pentan-2-ol catalysée par des variants de la CALB ont été déterminés, afin de mesurer l'importance du terme entropique dans l'énergie libre d'activation de la réaction.

B.I. Implication des résidus situés sur le chemin d'accès du substrat au site catalytique

D'après nos travaux de modélisation, l'énantiosélectivité de la CALB vis-à-vis du butan-2-ol et du pentan-2-ol ne peut pas être clairement expliquée quantitativement par des différences énergétiques ou structurales observées pour les deux formes énantiomères *R* et *S* au niveau du second intermédiaire tétraédrique. Des résultats similaires ont été trouvés avec la lipase de *Bulkhoderia cepacia*. En effet, l'énantiosélectivité observée pour cette lipase lors de l'étude de la réaction de transestérification du (\pm)-éthyl 2-bromo-2-phényl-acétate et de l'octan-1-ol en présence du *n*-octane (schéma 26), n'a pas pu être expliquée par des différences énergétiques entre les intermédiaires tétraédriques formés avec les deux énantiomères (Guieysse et coll., 2003). Ces auteurs ont montré ensuite que l'énantiosélectivité pouvait être expliquée par une différence d'accessibilité au site actif des deux énantiomères. En effet, la mutation d'un résidu bordant le canal d'accès au site actif de la lipase de *Bulkhoderia cepacia* par un résidu plus encombrant (Val266Leu) conduit à une forte augmentation de l'énantiosélectivité. Ces résultats, combinés à ceux issus d'une étude par modélisation moléculaire, suggèrent que la trajectoire au site actif de l'énantiomère *R*, serait favorisée (Guieysse et coll., 2003).

D'autres études du rôle des acides aminés situés à l'entrée de la cavité ont été réalisées, à l'aide de mutations, généralement dans le but de moduler la sélectivité des lipases vis-à-vis des acides gras à chaîne plus ou moins longues. Chez les lipases des champignons filamenteux, les acides gras doivent se fixer dans une longue crevasse hydrophobe située à proximité de la surface (Pleiss et coll., 1998). La mutation du résidu Phe112 de cette crevasse chez la lipase de *Rhizopus delemar* en un résidu tryptophane (plus encombrant), conduit à une augmentation de la spécificité de cette lipase pour les acides gras à chaîne courte (C4 ou moins) et en une diminution importante de l'activité vis-à-vis des acides gras à chaîne longue (Joerger et Haas, 1994). Le mutant double Phe112Trp/Val209Trp présente la même spécificité que le précédent variant (Klein et coll., 1997). Par ailleurs, une réduction de l'encombrement à l'entrée de la crevasse peut également conduire à une diminution de l'activité relative vis-à-vis des acides gras à chaîne longue. C'est ce qui a été observé avec le mutant Phe94Gly de la lipase de *Rhizomucor miehei*. Cette mutation permet d'exposer des parties hydrophiles de l'enzyme à la surface et semble modifier le mécanisme d'activation en favorisant une conformation ouverte de la lipase (Gaskin et coll., 2001).

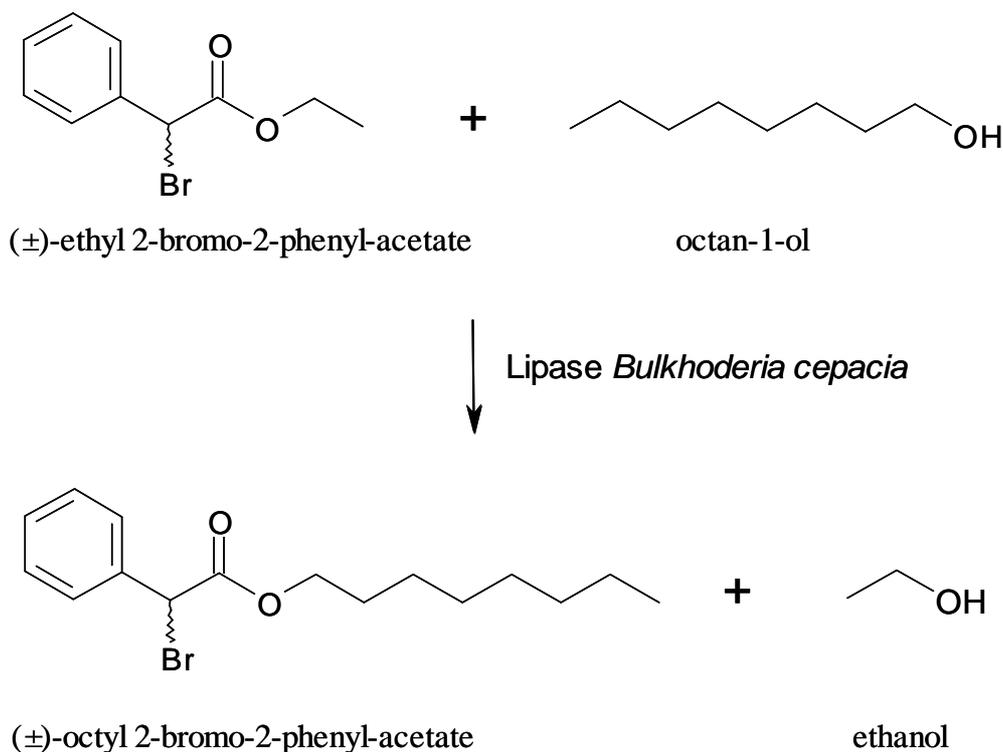


Schéma 26 : réaction de transestérification du (±)-ethyl 2-bromo-2-phenyl-acetate et de l'octan-1-ol catalysée par la lipase de *Burkholderia cepacia* (d'après Guieysse et coll., 2003).

Des résultats très intéressants ont été obtenus lors des mutations des résidus situés à l'intérieur du canal de fixation du groupement acyle des substrats de la lipase de *Candida rugosa*. Cette dernière, contrairement aux autres lipases, possède un site de fixation de la partie acyle enfoui au cœur de l'enzyme. Ainsi, des mutations ponctuelles des résidus hydrophobes aliphatiques de ce tunnel en des résidus phénylalanine, conduisent à une diminution importante de l'activité hydrolytique vis-à-vis des acides gras suffisamment longs, pour que leur fixation soit gênée, mais sans affecter l'activité vis-à-vis des acides gras à chaîne plus courtes (Schmitt et coll., 2002).

Depuis les travaux de Guieysse et coll. en 2003, une seule étude a été publiée concernant des modifications des résidus du tunnel d'accès des lipases susceptibles d'affecter la résolution des alcools secondaires : dans la lipase de *Pseudomonas fluorescens* les résidus Phe126, Phe144, Phe159 et I225 forment un goulot d'étranglement, rendant l'accès au site actif très difficile. Le remplacement d'un ou plusieurs de ces résidus par la leucine affecte fortement l'activité et l'énantiosélectivité de cette lipase vis-à-vis de trois esters chiraux : le 1-phényl-1-

propyl acétate, le 1-phényl-2-propyl acétate et le 1-phényl-1-éthyl acétate (on peut noter que le centre de chiralité de ces molécules se situe sur la partie alkyle de l'ester) (Schließmann et coll., 2009).

Par ailleurs, une étude récente a été réalisée avec la CALB par permutation circulaire en vue de modifier les terminaisons N-terminale et C-terminale. La structure cristallographique d'un des variants obtenus, le variant cp283Δ7 (avec les terminaisons N-terminale et C-terminale correspondant aux positions 283 et 282 de l'enzyme native) montre une cavité enzymatique très élargie. Ce mutant présente une activité hydrolytique vis-à-vis du *p*-nitrophenol butyrate très fortement améliorée. Néanmoins, le fond du site catalytique et la poche énantiosélective étant très peu affectés par cette permutation, le mécanisme enzymatique ne devrait pas être affecté. Par conséquent, l'augmentation d'activité serait due à l'élargissement de l'entrée au site actif, facilitant le passage des substrats et des produits (Qian et coll., 2009).

En, s'inspirant de ces travaux, nous avons envisagé d'étudier l'implication des résidus bordant l'entrée du site catalytique de la CALB dans l'énantiosélectivité de l'enzyme. Dans un premier temps, les résidus bordant l'entrée du site actif de la CALB ont été répertoriés, leurs occupations volumiques ont été déterminées par une recherche systématique des conformères, puis des mutations de ces résidus ont été envisagées. Dans un deuxième temps, trois mutants ont été produits : Ile189Ala, Leu278Val et Ala282Leu. Leurs activités et énantiosélectivités ont été testées vis-à-vis d'une large gamme d'alcools secondaires linéaires chiraux.

B.I.1. Etude *in silico* des résidus bordant l'entrée du site actif.

Nous avons vu précédemment, que la CALB possédait un site actif en forme d'entonnoir. L'entrée et la paroi de la cavité sont constituées de résidus hydrophobes. Comme pour d'autres lipases, le fond de la cavité comporte des résidus hydrophiles, notamment ceux de la triade catalytique et du trou oxyanionique. La cavité se divise en deux parties : une partie accueillant la partie acyle et l'autre partie responsable de la fixation de la partie alcool. Comme notre étude porte sur les alcools secondaires chiraux, seule l'étude de cette deuxième partie présente un intérêt pour la suite. Nous avons donc répertorié les acides aminés bordant cette partie de la cavité, et plus particulièrement ceux qui peuvent influencer l'entrée des alcools secondaires jusqu'au site catalytique. Nous avons calculé leurs volumes et avons répertorié les acides aminés avec lesquels ces résidus peuvent interagir. Ensuite nous avons

envisagé des mutations pouvant influencer le chemin d'accès des alcools au site actif, soit en diminuant, soit en augmentant l'encombrement des résidus bordant ce chemin.

B.I.1.a Les résidus bordant le chemin d'accès au site actif

D'après la structure cristallographique, pour accéder au site actif, l'alcool secondaire doit traverser un court tunnel formé par des résidus hydrophobes : un côté du tunnel est délimité par le résidu Ile189 et l'autre côté par les résidus de l'hélice α 10 (Uppenberg et coll., 1994) (figure 50). Cette hélice est constituée des résidus compris entre Pro268 et Ala287, mais seule sa deuxième partie est à proximité de la cavité. De plus, certains de ces résidus ont leurs chaînes latérales orientées vers le côté opposé de la cavité. Après exclusion de ces derniers, il apparaît que seuls les résidus Leu278, Ala281, Ala282 et Ile285 peuvent influencer le chemin d'accès de l'alcool au site actif. Afin de déterminer les volumes potentiellement occupés par ces résidus et l'Ile189, nous avons procédé à une étude des rotamères de ces derniers. Le résidu Ala281 est localisé plus profondément dans la cavité et par conséquent, sa modification affectera essentiellement le volume de la poche énantiosélective, de ce fait ce résidu a été exclu de cette étude.

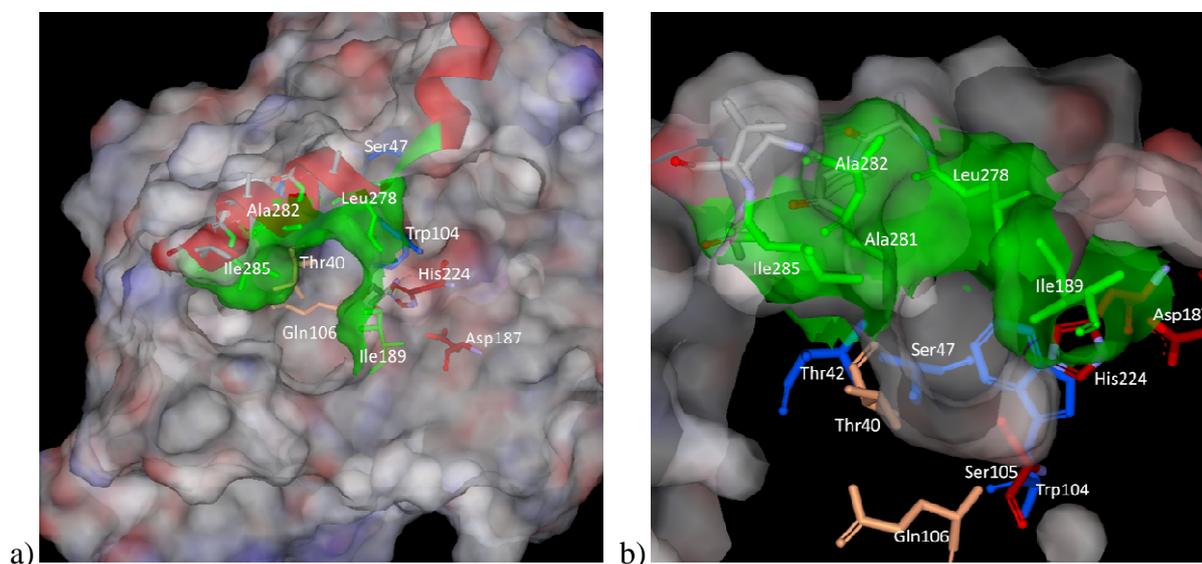


Figure 50 : Tunnel d'accès de l'alcool au site actif de la CALB. a) vue de dessus ; b) vue en coupe transversale. Sont représentés en vert les résidus délimitant le tunnel, en rouge foncé les résidus de la triade catalytique, en bleu les résidus de la poche énantiosélective, en saumon les résidus du trou oxyanionique et en gris d'autres résidus hydrophobes de l'hélice α 10. Cette hélice est visualisée par un ruban rouge. La surface de l'enzyme est représentée en blanc par transparence et la surface des résidus délimitant le tunnel en vert par transparence. Pour plus de simplicité les atomes d'hydrogène ne sont pas visibles.

Pour les acides aminés Ile189, Leu278, Ala282 et Ile285, seuls ou combinés entre eux, une recherche systématique des rotamères a été menée selon la banque de rotamères Richardson (Lovell et coll., 2000). Pour chaque conformation de rotamère, l'énergie potentielle instantanée des conformations enzymatiques a été calculée. Les conformations présentant une augmentation très importante de cette énergie par rapport à la structure de départ (due à une gêne stérique importante entre le rotamère modifié et les résidus environnants, et qui ne pourra pas être résolue par l'optimiseur mathématique) ont été écartées. Tous les rotamères induisant une modification assez faible de l'énergie potentielle instantanée ont été superposés, et le volume de cet ensemble a été calculé. Les volumes obtenus pour chaque résidu de l'enzyme native sont reportés au tableau 22 (valeurs en gras).

Tableau 22 : Volumes occupés par les acides aminés (ensemble de rotamères) en positions 189, 278, 282 et 285 (en Å³).

Position de l'acide aminé	189	278	282	285
Alanine	70	69	71	69
Valine	122	123	124	124
Leucine	191	211	222	219
Isoleucine	200	194	197	218
Phénylalanine		273	230	
Tryptophane		348	356	

En outre, cette étude nous a permis de démontrer que ces quatre résidus étaient libres de tout mouvement, sans présenter d'interactions significatives avec les résidus environnants. Pour le montrer, nous avons également procédé à des modifications simultanées des rotamères de ces résidus et de leurs résidus voisins. Le cas de l'Ala282 reste particulier, car ce dernier est un acide aminé peu volumineux, avec une chaîne latérale ne présentant pas de degré de liberté. Pour la Leu278 et l'Ile285, le balayage systématique des rotamères a conduit à des conformations toutes viables, n'engendrant que des modifications légères de l'énergie. Ce résultat reste inchangé, lorsqu'on introduit la variation simultanée des rotamères des acides aminés voisins (Ile 189 et Leu277 pour le Leu278 ; Leu73 et Val286 pour Ile285). L'étude simultanée des résidus Ile189 et Leu278, a permis de montrer que, malgré une proximité spatiale évidente, les mouvements de ces deux résidus étaient indépendants. En effet, sur la figure 51, on peut constater que les volumes globaux balayés par ces deux résidus sont en contact direct (surfaces en rose et en violet), mais ne se superposent pas. Par conséquent, dans le cas de notre enzyme il n'est pas possible d'envisager un mouvement concerté des résidus

constituant le tunnel, tel que cela a été observé chez la lipase de *Bulkhoderia cepacia* (Guieysse et coll., 2003). D'après notre étude, l'Ile189 est le seul résidu de ce tunnel, dont le mouvement peut considérablement être altéré par son voisinage. Pour deux des rotamères de ce résidu, des gênes stériques importantes ont été répertoriées avec son entourage, impliquant une augmentation importante de l'énergie instantanée. Ces résidus sont ceux de la triade catalytique (His224 et Asp187), les atomes du squelette du résidu Glu188 et la chaîne latérale de la Val190 (pour seulement un des rotamères). Cependant, la probabilité que l'Ile189 adopte une de ces 2 conformations est négligeable, car impliquerait des déformations du squelette carboné de la lipase.

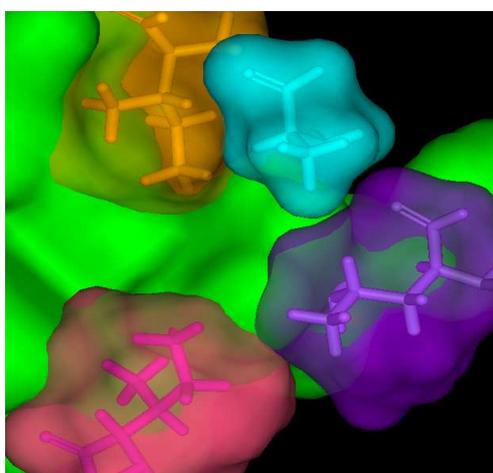


Figure 51 : Représentation des volumes pouvant être balayés par les résidus Ile189 (en rose), Leu278 (en violet), Ala282 (en bleu) et Ile285 (en orange). La cavité enzymatique est représentée en vert.

B.I.1.b Mutations élargissant le chemin d'accès

Afin de modifier l'accessibilité des substrats au site actif, et éventuellement de moduler l'énantiosélectivité de la CALB vis-à-vis des alcools secondaires, des mutations des résidus bordant le chemin d'accès ont été envisagées. Comme le tunnel d'accès comporte essentiellement des résidus encombrants (leucine et isoleucine), nous avons cherché à faciliter le passage des substrats en diminuant le volume global occupé par ces résidus. Nous avons donc procédé au remplacement *in silico* de trois résidus leucine et isoleucine en positions 189, 278 et 285, par d'autres résidus hydrophobes aliphatiques : glycine, alanine, valine, leucine et isoleucine. Selon le procédé décrit dans le paragraphe précédent, nous avons calculé les volumes occupés par ces résidus mutés. Les résultats sont regroupés dans le tableau 1. Comme le montrent ces valeurs et la figure 52, le remplacement de la leucine par une isoleucine et vice-versa a peu d'intérêt car elles occupent sensiblement le même volume. La mutation en valine conduit bien à une diminution du volume occupé, et celle en alanine à une diminution encore plus marquée. En effet, dans ce cas, on constate que le résidu muté occupe trois fois moins de place que la leucine ou l'isoleucine. Comme attendu, la diminution de l'encombrement la plus spectaculaire est observée lors de la mutation de ces résidus en glycine, mais cette mutation peut engendrer des modifications de la structure tridimensionnelle. En résumé, pour obtenir un canal d'accès au site actif plus large, on peut envisager de remplacer par mutagenèse dirigée, les résidus leucine ou isoleucine en position 189, 278 et/ou 285 par des résidus alanine ou valine.

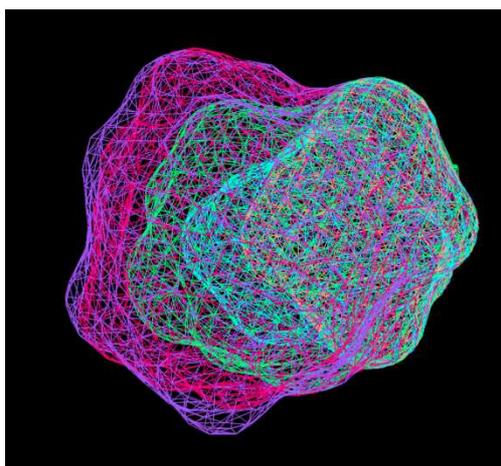


Figure 52 : Représentation des volumes pouvant être balayés par des résidus glycine (en orange), alanine (en bleu), valine (en vert), leucine (en violet) ou isoleucine (en rose).

B.I.1.c Mutations encombrant le chemin d'accès

Parallèlement, nous avons cherché à rétrécir le tunnel d'entrée, mais ce dernier étant déjà composé de résidus encombrants, les possibilités d'augmenter l'encombrement restent très limitées. Ainsi, les mutations de la Leu278 en résidus hydrophobes aromatiques (phénylalanine et tryptophane) ont été envisagées. Les volumes calculés après remplacement (tableau 1) attestent bien une augmentation de l'encombrement, mais lorsqu'on observe les structures, on constate que la phénylalanine adopte essentiellement trois orientations dont une bloque entièrement l'entrée de la cavité et les deux autres sont tournées vers l'extérieur, sans gêner les déplacements du substrat (figure 53). Des résultats semblables ont été obtenus avec un tryptophane en position 278, mais ce dernier n'adopte que deux positions.

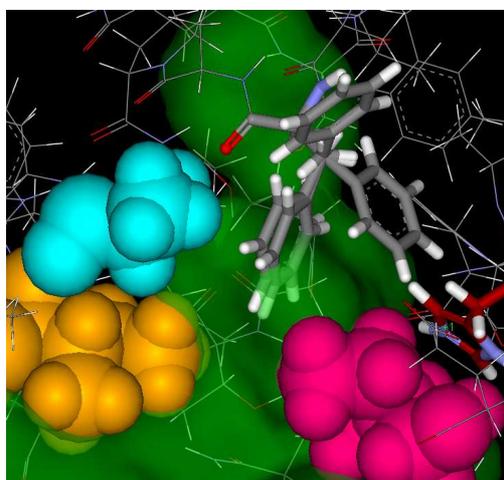


Figure 53 : Les trois orientations possibles d'un résidu phénylalanine en position 278 (en bâtonnets gris). Sont représentés en CPK les résidus Ile189 (en rose), Ala282 (en bleu) et Ile285 (en orange). La cavité enzymatique est représentée en vert par transparence.

Comme il a été précisé précédemment, la mutation de Ala281 est à exclure car sa chaîne latérale est orientée vers la poche énantiosélective, et non pas vers le canal d'accès des substrats au site actif. Par conséquent, la seule mutation à envisager dans le but de rétrécir le tunnel est celle de l'Ala282. Ainsi, le remplacement de cette Ala282 par des résidus valine, leucine, isoleucine, phénylalanine et tryptophane ont été envisagés. Toutes ces mutations induisent bien une augmentation de l'encombrement volumique de l'Ala282 (tableau22). Néanmoins, le remplacement de l'alanine par une valine semble être insuffisant pour affecter le chemin de l'alcool (figure 54), et le remplacement par la phénylalanine ou par le tryptophane risque de boucher complètement l'entrée au site actif ou d'introduire un effet "clapet". En effet, des études réalisées avec la lipase de *Candida rugosa*, atteste que le tunnel

de fixation de la partie acyle peut être complètement bloqué par une mutation ponctuelle d'un des résidus de ce tunnel par une phénylalanine (Schmitt et coll., 2002). Un effet "clapet" d'un résidu phénylalanine a été observé pour l'estérase I de *Pseudomonas fluorescens*. Pour cette estérase, la Phe159, présente dans la forme native, a été identifiée comme résidu induisant par son orientation l'ouverture ou la fermeture du site de fixation du substrat (Schließmann et coll., 2009). Cet effet "clapet" est à éviter, car l'enzyme perdrait un de ses avantages : l'absence d'activation interfaciale. En conclusion, pour rétrécir le tunnel d'accès au site actif, seules les mutations du résidu Ala282 en leucine ou isoleucine peuvent être envisagées.

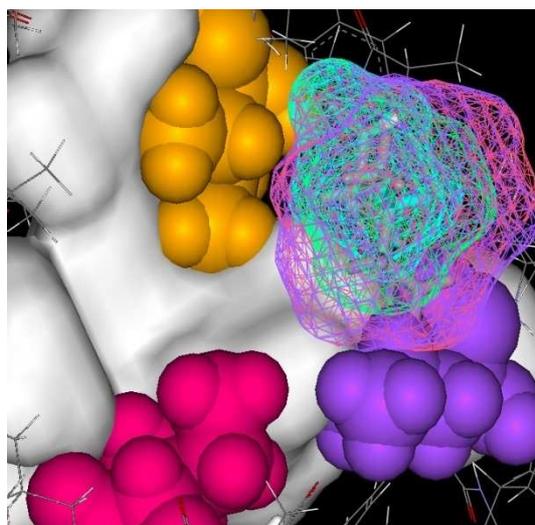


Figure 54 : Représentation des volumes pouvant être balayés par les résidus hydrophobes en position 282 : alanine (maillage bleu), valine (maillage vert), leucine (maillage violet) ou isoleucine (maillage rose). Sont représentés en CPK les résidus Ile189 (en rose), Leu278 (en violet) et Ile285 (en orange). La cavité enzymatique est représentée en blanc.

B.I.2. Etude expérimentale des effets des mutations des résidus constituant le tunnel d'accès de l'alcool au site actif

Nous avons montré que l'accès de l'alcool au site actif est contrôlé essentiellement par quatre résidus hydrophobes (Ile189, Leu278, Ala282 et Ile285), constituant un court tunnel. Afin de moduler l'ouverture de ce tunnel, des mutations de ces résidus peuvent être envisagées. Le tunnel peut être élargi en diminuant l'encombrement volumique des résidus : une, ou plusieurs, leucine ou isoleucine devraient être remplacées par un résidu valine, ou mieux, par une alanine. A l'inverse, on peut obtenir un rétrécissement de ce tunnel, en mutant l'Ala282 en leucine ou isoleucine. Sur la base de ces prédictions issues de la modélisation, trois mutants de la CALB ont été produits au laboratoire de Biotechnologie de l'Institut Royal Technologie de Stockholm (KTH) : Ile189Ala, Leu278Val et Ala282Leu. Les deux premières mutations devraient induire un élargissement du tunnel (plus prononcé pour le mutant Ile189Ala), et le dernier mutant devrait présenter un tunnel plus étroit (figure 55).

Les effets de ces mutations sur l'activité enzymatique et sur l'énantiosélectivité vis-à-vis d'une série d'alcools secondaires chiraux, comportant entre 4 et 8 atomes de carbone, ont été mesurés. Ainsi, le butan-2-ol, le pentan-2-ol, le hexan-2-ol, le heptan-2-ol, l'octan-2-ol, le hexan-3-ol, le heptan-3-ol et l'octan-3-ol ont été acylés par le méthylpropionate (schéma 2). Les réactions ont été menées dans le réacteur solide-gaz à 318K. Les activités thermodynamiques des alcools et de l'ester et les débits totaux de gaz ont été choisis de manière à être en vitesse initiale de réaction. Ainsi le rapport énantiomérique a pu être calculé à partir des rapports des aires des deux formes de l'ester produits au cours de la réaction (équation 1) (Wescott et Klibanov, 1993). Les résultats obtenus seront présentés et discutés ci-dessous.

$$E = \frac{\text{Aire de l'ester R formé}}{\text{Aire de l'ester S formé}} \quad (\text{Eq. 27})$$

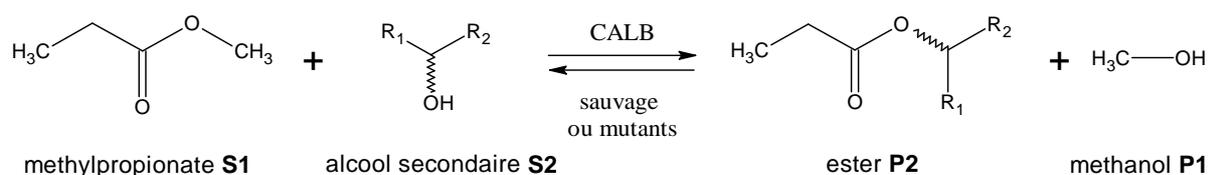


Schéma 27 : Réaction d'acylation des alcools secondaires par le méthylpropionate

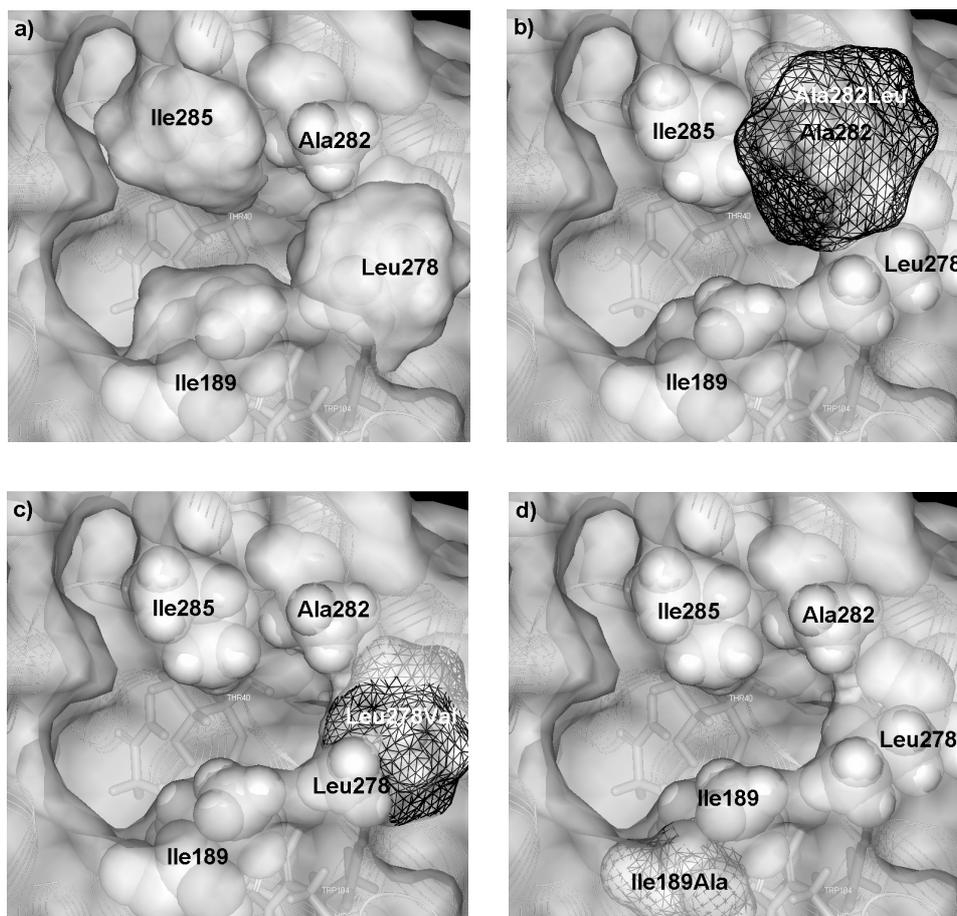
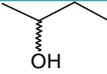
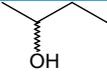
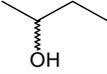
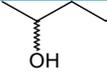
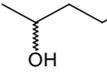
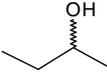
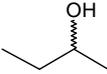
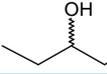


Figure 55 : Le tunnel d'accès au site actif de la CALB. a) Occupation volumique des résidus hydrophobes susceptibles d'influencer l'accès de l'alcool de l'enzyme sauvage: Ile189, Leu278, Ala282 and Ile285 (surface de l'ensemble de rotamères); b) le mutant Ala282Leu; c) le mutant Leu278Val; d) le mutant Ile189Ala; l'occupation volumique des mutants est représentée par un maillage noir.

B.I.2.a Effets des mutations sur l'activité enzymatique

Les activités enzymatiques de la réaction d'acylation entre l'alcool secondaire et le méthylpropionate, catalysées par la CALB sauvage et les trois mutants du tunnel d'accès, ont été mesurées à 318K, par analyse directe en ligne en chromatographie gazeuse (CG) à la sortie du réacteur solide/gaz. Dans ces conditions, pour les plupart des réactions, seule la forme *R* des esters produits peut être détectée. Ceci s'explique par l'énantiopréférence marquée de la CALB pour la forme *R* des alcools secondaires. Ainsi les valeurs des activités reportées dans le tableau 23, ne prennent en compte que la forme *R* de l'ester formé, la forme *S* se trouvant en dessous du seuil de détection en CG.

Tableau 23 : Activités enzymatiques obtenues à 318K avec la CALB sauvage et ses mutants lors de la réaction d'acylation des alcools secondaires par le méthyl propionate (en μmol de produits formés par minute et par mg d'enzyme libre).

Alcool	Structure	Sauvage	A282L	L278V	I189A
Butan-2-ol			20,7	20,5	12,3
Pentan-2-ol		17,7	22,6	29,1	12,6
Hexan-2-ol		13,5	26,1	18,2	10,8
Heptan-2-ol		11,7	20,9	11,1	4,8
Octan-2-ol		6,7	11,1	7,2	4,3
Hexan-3-ol		8,7	9,8	6,4	2,8
Heptan-3-ol		2,4	2,2	1,8	1,7
Octan-3-ol		3,1	4,1	3,3	2,0

D'après ces valeurs, on peut noter que les alcools de la série 3 (avec le groupement hydroxyle en position 3) donnent lieu à des activités plus faibles que leurs homologues de la série 2. Ainsi, l'activité mesurée pour la CALB sauvage, avec l'hexan-2-ol est 1,5 fois plus importante que celle mesurée avec l'hexan-3-ol. Cette différence est plus marquée dans le cas de l'heptanol, avec un rapport proche de 5. Cette variation semble être indépendante de la mutation. En effet, lors de la comparaison de l'octan-2-ol avec l'octan-3-ol, des rapports

d'activité très proches ont été obtenus pour l'enzyme sauvage et ses variants (entre 2,2 et 2,7). Cette différence d'activité observée entre les deux séries d'alcools, pourrait être attribuée à une différence de la taille du substituant moyen (M), qui est un groupement méthyle pour la série 2 des alcools et un groupement éthyle pour la série 3. En effet, selon le modèle proposé par Hæffner et coll., l'énantiomère *R*, pour former l'intermédiaire tétraédrique catalytiquement actif, doit positionner son substituant M dans la poche énantiosélective, située au fond de la cavité (Hæffner et coll., 1998). On peut alors penser que la baisse d'activité observée pour les alcools de la série 3, est liée au positionnement plus difficile de l'éthyle dans cette poche, par rapport à celui du méthyle. Cette différence d'activité de la lipase pour des alcools secondaires de taille différente a été démontrée auparavant par Magnusson et ses collaborateurs qui ont mesuré la constante de spécificité (k_{cat}/K_M) d'alcools secondaires symétriques, dans le cas de leur acylation par le butanoate de vinyle. Pour le pentan-3-ol (les substituants M et L sont des groupements éthyle), une constante de spécificité 120 fois plus faible a été obtenue que dans le cas du propan-3-ol (les substituants M et L sont des groupements méthyle) (Magnusson et coll., 2005).

En supposant que le nombre de sites actifs disponibles après immobilisation soit le même pour l'enzyme sauvage et pour ses variants, on peut noter une activité 1,5 à 2 fois plus importante pour le mutant Ala282Leu, que ce qui est observé pour l'enzyme sauvage. Dans le cas du mutant Leu278Val, l'activité enzymatique varie peu, ou augmente légèrement. Pour le mutant Ile189Ala, une diminution légère de l'activité a été observée.

Une augmentation de l'activité peut éventuellement être la conséquence d'un accès au site actif facilité. En effet, de tels effets ont été rapportés dans la littérature : pour le variant cp283Δ7 de la CALB, obtenu par permutation circulaire, l'élargissement de l'entrée de la cavité s'accompagne d'une amélioration importante de l'activité hydrolytique du p-nitrophenol butyrate (l'efficacité catalytique k_{cat}/K_M est 8 fois plus grande par rapport à celle de l'enzyme sauvage) (Qian et coll., 2009). Schließmann et coll. ont observé une amélioration du taux de conversion du 1-phényl-1-propyl acétate et du 1-phényl-2-propyl acétate par l'estérase I de *Pseudomonas fluorescens*, lorsque des résidus du tunnel d'accès au site actif de cette dernière sont remplacés par des résidus moins encombrants (Schließmann et coll., 2009). Dans notre cas, l'effet inverse a été constaté : l'activité augmente pour le mutant possédant un tunnel hydrophobe plus encombré (Ala282Leu) et diminue pour le mutant pour lequel ce tunnel a fortement été élargi (Ile189Ala). Seul le mutant Leu278Val permettrait de relier l'activité à un encombrement du tunnel d'accès. En effet, pour ce variant, la mutation

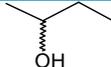
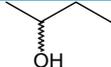
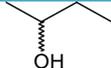
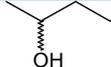
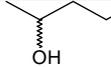
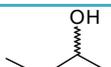
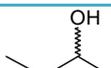
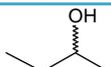
induit une légère diminution de l'encombrement, facilitant ainsi légèrement l'accès de l'alcool au site actif, et qui correspond bien à une légère augmentation de l'activité.

Pour conclure, l'activité enzymatique ne peut pas être reliée directement à l'encombrement des résidus hydrophobes formant le tunnel. Il se peut, que ces mutations affectent également d'autres étapes de la catalyse (par exemple l'étape de formation de l'intermédiaire tétraédrique), ou même qu'ils induisent des modifications de la structure tridimensionnelle, en dehors du tunnel d'accès.

B.1.2.b Effets des mutations sur l'énantiosélectivité

Nous avons noté précédemment, que l'analyse directe en CG des produits réactionnels à la sortie du réacteur solide/gaz ne permettait pas de détecter la forme S de l'ester produit. Pour pallier ce problème, les produits formés dans le réacteur, ainsi que les substrats n'ayant pas réagi, ont été condensés à la sortie du réacteur, puis ensuite analysés en CG. Ainsi, les ratios énantiomériques (E) pour les réactions d'acylation des 8 alcools secondaires, catalysées par la CALB sauvage et ses trois variants sensés perturber l'accès au site actif, ont été déterminés. Les mutants montrent, comme l'enzyme sauvage, une énantio-préférence pour la forme R de ces alcools. Néanmoins, les valeurs des ratios énantiomériques présentées dans le tableau 24, montrent une différence significative pour les mutants par rapport à la forme sauvage, avec des augmentations de E pouvant atteindre 150%, ou des diminutions atteignant 50%. Ces tendances sont variables pour chaque mutant, et dépendent de la longueur de la chaîne carbonée du substituant le plus gros (L) des alcools résolus. L'analyse de ces résultats semble complexe et nécessite la considération d'une multitude de causes structurales.

Tableau 24 : Ratios énantiomériques $E^{[a]}$ obtenus à 318K avec la CALB sauvage et ses mutants lors de la réaction d'acylation des alcools secondaires par le méthylpropionate.

Alcool	Structure	Sauvage	A282L	L278V	I189A
Butan-2-ol		4.6 ± 0.1	4.9 ± 0.1	5.8 ± 0.2	6.9 ± 0.4
Pentan-2-ol		100 ± 6	130 ± 1	98 ± 8	87 ± 1
Hexan-2-ol		297 ± 9	228 ± 8	216 ± 7	211 ± 6
Heptan-2-ol		476 ± 30	337 ± 2	299 ± 18	437 ± 25
Octan-2-ol		435 ± 18	298 ± 11	227 ± 3	400 ± 10
Hexan-3-ol		78 ± 5	103 ± 8	83 ± 3	45 ± 3
Heptan-3-ol		318 ± 15	208 ± 14	203 ± 15	192 ± 7
Octan-3-ol		523 ± 31	245 ± 15	210 ± 15	199 ± 14

^[a] Les erreurs standards ont été calculées à partir de 5 à 12 mesures de E obtenues à partir de deux condensats différents, et correspondent à une intervalle de confiance de 95%.

Afin d'analyser ces résultats, le postulat suivant a été émis : les mutations des acides aminés du tunnel d'entrée au site actif, affecteront essentiellement la trajectoire de l'énantiomère S , car ce dernier, pour réagir, doit rentrer dans le site actif avec son substituant L dirigé vers l'avant. En effet, selon le modèle proposé par Hæffner et coll., l'énantiomère S , pour former un intermédiaire tétraédrique donnant lieu à catalyse, doit positionner son substituant L dans la poche énantiosélective, située au fond de la cavité (Hæffner et coll., 1998). Comme expliqué dans la partie "Explications structurales de l'énantiosélectivité", ce second intermédiaire covalent peut être considéré comme un bon modèle de l'état de transition de la réaction d'acylation par la CALB, des substrats nucléophiles chiraux.

Comme expliqué dans les paragraphes qui suivent, ce postulat nous a permis de fournir une explication rationnelle d'une majorité des variations de E observées. Mais dans certains cas, ce postulat ne peut pas, à lui seul, expliquer les résultats, et doit être combiné à d'autres explications structurales. Ces différents autres effets possibles seront également évoqués.

Le mutant Leu278Val est supposé faciliter l'accès au site actif de l'énantiomère *S*, car le résidu leucine très encombrant a été remplacé par un résidu valine, moins volumineux. Cette facilité devrait se traduire par une diminution de la valeur de *E*, par rapport à la réaction catalysée par l'enzyme sauvage. Cette hypothèse est vérifiée pour l'hexan-2-ol, l'heptan-2-ol, l'octan-2-ol, l'heptan-3-ol et l'octan-3-ol, c'est-à-dire pour les alcools secondaires linéaires avec un substituant *L* comportant au moins quatre atomes de carbone. Si le substituant *L* comporte trois atomes de carbone, ou moins, les variations de *E* ne sont plus en accord avec ce postulat. En effet, une valeur de *E* similaire à celle de l'enzyme sauvage a été trouvée dans le cas du pentan-2-ol, et pour les deux autres alcools (le butan-2-ol et l'hexan-3-ol), une augmentation des valeurs de *E* a pu être observée. Pour ces alcools, un accès facilité au site actif de l'énantiomère *R*, pourrait expliquer les effets observés. Par ailleurs, nous avons montré précédemment, que pour le butan-2-ol et le pentan-2-ol des modes de fixation dits non productifs peuvent exister. Dans ce cas les alcools rentrent dans le site actif, forment un complexe inactif avec l'enzyme et en ressortent sans subir de modification, par conséquent ils ne seront pas pris en compte pour le calcul du ratio énantiomérique. En effet, ce ratio est calculé à partir des quantités d'esters *R* et *S* formés au cours de la catalyse. Néanmoins, l'existence de complexes enzyme-alcool non productifs peut perturber l'énantiosélectivité. Ainsi, si la mutation Leu278Val favorise l'entrée de l'énantiomère *S*, mais dans une orientation non productive, ne permettant pas la formation de l'ester *S*, une augmentation du ratio énantiomérique peut être observée.

La mutation Ile189Ala est également supposée faciliter l'entrée de l'énantiomère *S*. Notre hypothèse est vérifiée pour tous les alcools, sauf le butan-2-ol. En effet, pour les alcools secondaires linéaires avec un substituant *L* comportant plus de trois atomes de carbone, une diminution des valeurs de *E* a été observée. Nous pouvons constater, que la gamme de l'alcool pour lesquels notre postulat est vérifié se trouve élargie dans le cas de ce mutant par rapport au mutant Leu278Val. Ceci est peut-être lié à un élargissement plus important de la crevasse, causé par l'introduction d'un résidu encore moins volumineux.

A l'inverse des deux cas précédents, la mutation du résidu Ala282 en leucine, devrait, par son encombrement stérique, rétrécir le tunnel, rendant l'accès au site actif de l'énantiomère *S* plus difficile. Notre postulat est vérifié (valeur de *E* plus élevée que pour l'enzyme sauvage) pour le butan-2-ol, le pentan-2-ol et l'hexan-3-ol. Ainsi, lorsque le substituant *L* des alcools secondaires linéaires comportent trois atomes de carbone, ou moins, le postulat est vérifié. Pour les alcools avec un substituant *L* comportant plus de trois atomes de carbone (hexan-2-

ol, heptan-2-ol, octan-2-ol, heptan-3-ol et octan-3-ol), des effets inverses à celui prédit par le postulat ont été constatés. En effet, pour ces alcools, des valeurs de E plus basses à celles obtenues avec l'enzyme sauvage ont été reportées. Cette diminution de E , pourrait être expliquée par une perturbation de la trajectoire de l'énantiomère R (qui serait également défavorisée), ou par une orientation de l'énantiomère R de type non productif, ou bien par l'interaction entre le substituant L de cet énantiomère et la chaîne latérale du résidu leucine en position 282, qui affecterait la formation de l'intermédiaire tétraédrique. Une telle interaction est montrée sur la figure 56, pour l'intermédiaire tétraédrique formé avec le (R)-heptan-3-ol.

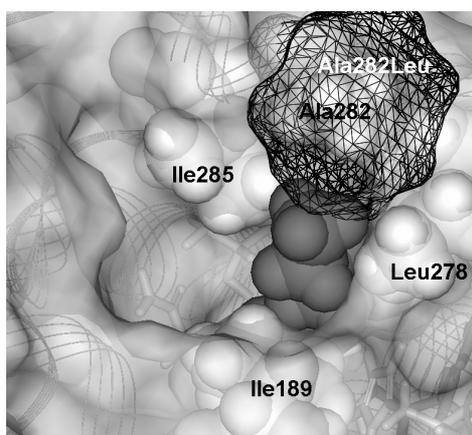


Figure 56 : Structure du second intermédiaire tétraédrique formé par la CALB sauvage et le mutant Ala282Leu avec le (R)-1-éthylpentyl propionate (en gris) par liaison covalente avec la Ser105 (second intermédiaire tétraédrique formé avec le (R)-heptan-3-ol). L'occupation volumique du résidu muté est représentée par un maillage noir. Le (R)-heptan-3-ol occupe partiellement le volume balayé par les rotamères de la leucine en position 278.

B.I.3. Conclusions et perspectives

Pour accéder au site actif, l'alcool secondaire doit traverser un court tunnel hydrophobe formé des résidus Ile189, Leu278, Ala282 et Ile285. L'étude systématique des conformères de ces résidus a montré que leurs chaînes latérales ne présentaient pas d'interaction stérique avec les résidus voisins et par conséquent qu'ils étaient libres d'adopter de nouvelles conformations. Pour la CALB, nous n'avons pas pu observer de mouvement concerté des résidus du canal d'accès au site actif, similaire à ce qui était décrit pour la lipase de *Bulkhoderia cepacia*, lors du passage du substrat à travers le goulot formé par les résidus Leu17 et Val226 (Guieysse et coll., 2003).

Afin de tester les influences des résidus constituant le tunnel sur l'énantiosélectivité de la CALB, les mutants Ile189Ala, Leu278Val et Ala282Leu ont été produits par mutagenèse dirigée et testés pour la résolution d'alcools secondaires chiraux linéaires par réaction d'acylation. Les résultats obtenus montrent un effet significatif des mutations sur l'énantiosélectivité. Cependant l'interprétation de ces effets est complexe, car ils dépendent à la fois de la taille des substituants de l'alcool et du mutant testé. Notre hypothèse selon laquelle ces résidus hydrophobes de l'entrée de la cavité affecteraient préférentiellement l'énantiomère *S*, ne permet pas d'expliquer tous nos résultats, suggérant ainsi que le problème est bien plus complexe. En effet, ces mutations peuvent également influencer la trajectoire de l'énantiomère *R* ou perturber la fixation du substrat au site actif, voir même favoriser des modes de fixations non productifs des alcools secondaires.

Nous avons donc réussi à montrer que les résidus situés à l'entrée du site affectaient l'énantiosélectivité, mais il reste à déterminer le mécanisme par lequel ils interviennent et à quelle étape de la réaction. Par ailleurs, l'utilisation des variants de la CALB ne nous permet pas d'identifier l'énantiomère qui serait le plus influencé par ces résidus. Pour identifier l'énantiomère affecté par la mutation, les paramètres cinétiques propres à chaque énantiomère devront être déterminés, mais cela nécessite l'utilisation des alcools énantio-pures, ce qui est très coûteux.

L'étude par modélisation moléculaire pourrait constituer une alternative. Une telle étude a été réalisée avec la lipase de *Bulkhoderia cepacia* (Guieysse et coll., 2003). Ainsi, les trajectoires de deux énantiomères de l'éthyl 2-bromo-2-phényl acétate (Schéma 26) ont été déterminées à l'aide de simulations de dynamique pseudo-moléculaires : des minimisations successives sous

forte contrainte de distance croissante, par incréments de 0,1 Å, ont été effectuées, puis à la fin de chaque étape le système a été relaxé par dynamique moléculaire. Les auteurs ont choisi de visualiser la sortie du substrat, plutôt que son entrée, car lors de la sortie, la position de départ du substrat est précisément connue (obtenue par modélisation moléculaire de l'intermédiaire tétraédrique). En suivant l'énergie d'interaction entre l'enzyme et le substrat au cours de la trajectoire, ils ont réussi de montrer que la trajectoire de l'énantiomère *S* était plus fortement perturbée par les résidus Leu17 et Val266 que celle de l'énantiomère *R*. Une étude similaire pourrait être réalisée avec la CALB et ses variants, dans le but de déterminer la trajectoire de sortie des alcools secondaires. Il pourrait également être envisagé une étude par dynamique moléculaire avec une contrainte de distance harmonique moins forte ou absente. Par ailleurs, des paramètres supplémentaires, tels que l'axe principal du substrat et les rotations autour de cet axe, pourraient être inclus dans les calculs. Dans un deuxième temps, une fois la position de l'alcool à l'extérieur de l'enzyme connue, la trajectoire d'entrée des substrats pourra être explorée.

B.II. Influence sur l'énantiosélectivité de la partie alkoxy du donneur d'acyle.

Dans cette partie nous allons nous intéresser à l'étude de l'influence de la partie alkoxy du donneur d'acyle. Cette partie alkoxy, est à l'origine du premier produit libéré, l'alcool, lors de l'étape de formation de l'acyle-enzyme de la réaction de transestérification. D'après le mécanisme enzymatique, cet alcool produit est libéré avant la fixation de l'alcool secondaire substrat à résoudre, par conséquent, il ne devrait pas affecter la formation du second intermédiaire tétraédrique, étape cruciale pour l'énantiosélectivité de la CALB vis-à-vis ces alcools secondaires (figure 6 partie étude bibliographique). Or dans la littérature plusieurs exemples ont été reportés, attestant que la partie alkoxy du donneur d'acyle pouvait influencer l'énantiosélectivité des enzymes (Hoff et coll., 1996; Anthonen et Hoff, 1998). Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer ce phénomène : l'alcool libéré agirait comme un co-solvant (Berglund et coll., 1995 ; Lundhaug et coll., 1998 ; Heinsman et coll., 2001) ; l'alcool libéré se fixerait dans une petite cavité, autre que le site catalytique, mais provoquerait déformations de ce dernier conduisant à une diminution de l'énantiosélectivité (figure 57) (Lundhaug et coll., 1998 ; Léonard, 2007) ; les déformations du site actif ("empreinte") causées par la partie alkoxy seraient mémorisées par l'enzyme, et l'alcool secondaire se fixerait dans une cavité déjà préformée (figure 58) (Lee et coll., 2000).

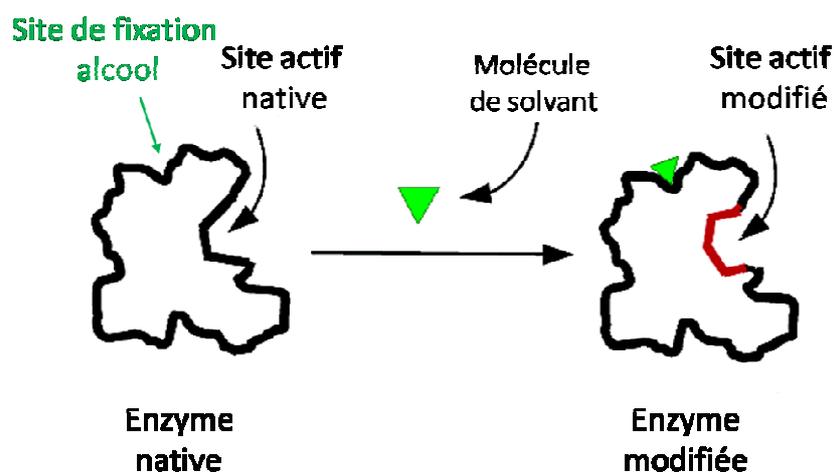


Figure 57 : Modification du site actif de l'enzyme suite à la fixation de l'alcool à un site de fixation secondaire.

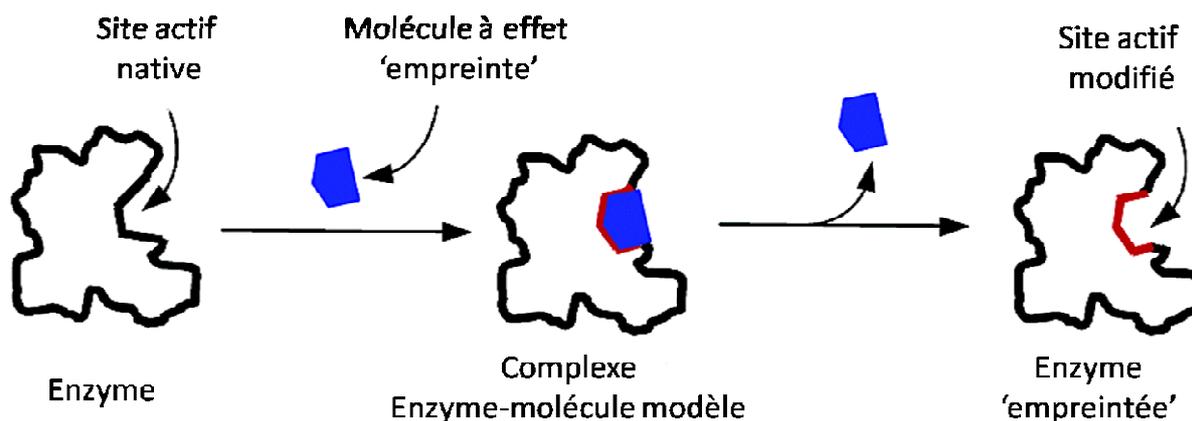
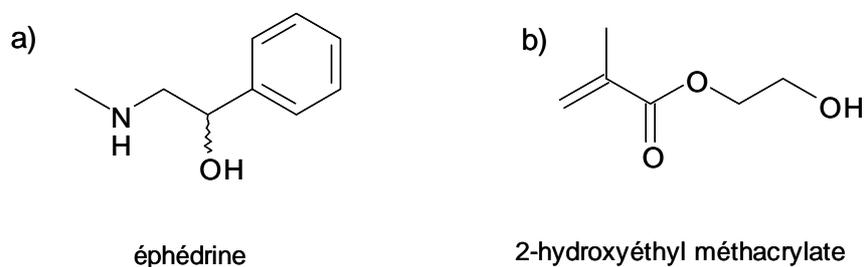


Figure 58 : Modification du site actif de l'enzyme induit par la fixation d'une molécule (substrat ou analogue de substrat) à effet "d'empreinte" au site actif (d'après Rich et coll., 2002).

L'effet "d'empreinte" est souvent utilisé lors de la synthèse de polymères capables de séparer des énantiomères d'une molécule ou de catalyser des réactions chimiques : la sélectivité de ces polymères ou leurs activités se trouvent fortement améliorées, lorsque leur synthèse s'effectue en présence de la molécule d'intérêt (Wei et coll., 2006). Ainsi, les énantiomères de l'éphédrine ont pu être séparés en utilisant des polymères d'hydroxyéthyle méthacrylate synthétisés en présence d'(-)-éphédrine (schéma 28) (Piletsky et coll., 2001). Par ailleurs, le taux de conversion de la réaction de transestérification du *p*-nitrophényl acétate par des alcools, catalysée par des polymères d'acide méthacrylique ou d'acide itaconique, est meilleur lorsque ces polymères ont été synthétisés en présence de l'ester que pour les polymères synthétisés seuls. De plus, les polymères synthétisés en présence de *p*-nitrophényl acétate, présentent une activité plus forte pour la transformation de ce dernier, par rapport à celle du *p*-nitrophényl salicylate (schéma 29) (Meng et coll., 2004).



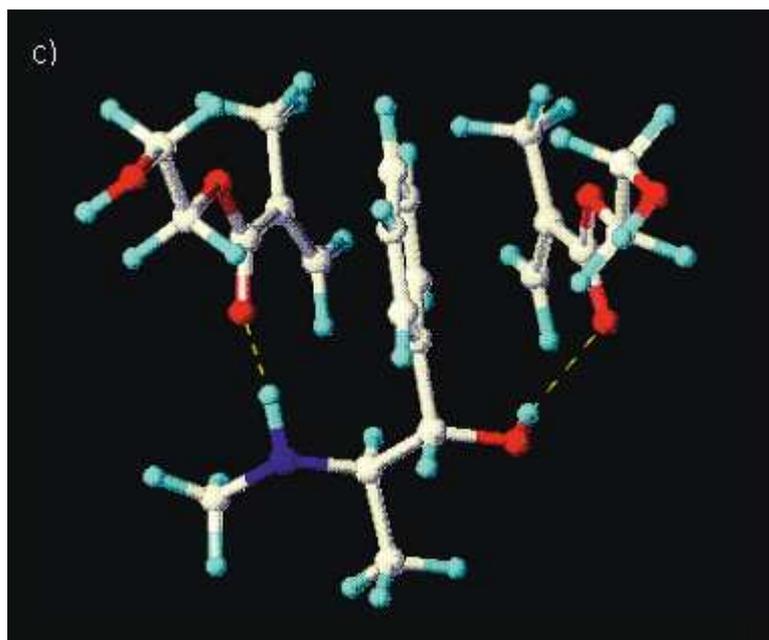


Schéma 28 : a) structure de l'éphédrine, molécule à résoudre; b) structure d'une unité du polymère, le 2-hydroxyéthyle méthacrylate ; c) structure probable du complexe formée entre l'(-)-éphédrine et l'hydroxyéthyle méthacrylate (d'après Piletsky et coll., 2001).

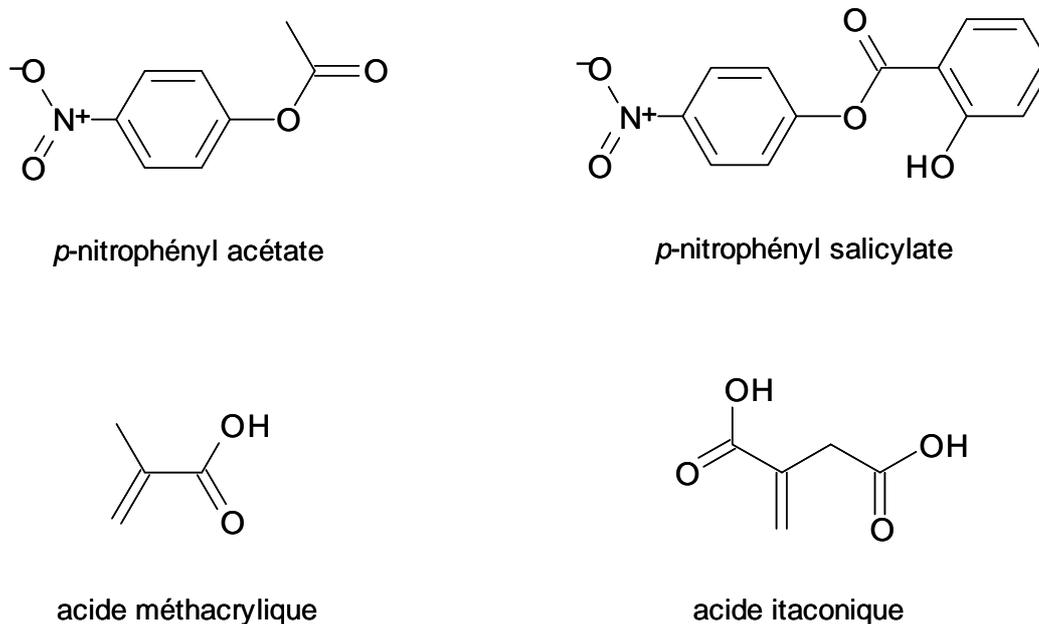


Schéma 29 : structures des substrats (*p*-nitrophényl acétate et *p*-nitrophényl salicylate) et des unités constituant les polymères (acide méthacrylique et acide itaconique).

Ces polymères étant assez rigides, il est facile d'admettre qu'ils puissent garder en mémoire la forme de la molécule présente lors de sa synthèse, même après son élimination. En revanche, les enzymes sont des macromolécules très flexibles, et par conséquent, elles sont capables de

retrouver leurs formes initiales très rapidement. Néanmoins, les études réalisées avec des enzymes lyophilisées en présence du substrat ou des molécules analogues, suggèrent qu'elles pourraient garder en mémoire certaines déformations et voir leurs propriétés modifiées. Rich et Dordick ont montré que l'activité et la sélectivité de la subtilisine lors de l'acylation de nucléosides pouvaient être contrôlées par la présence de ces nucléosides, entiers ou tronqués (la base seule ou le ribose), lors de l'étape de lyophilisation. Ainsi, la subtilisine lyophilisée en présence de thymidine, présente une activité 50 fois plus élevée pour l'acylation de ce dernier, que l'enzyme lyophilisée seule (schéma 30) (Rich et Dordick, 1997). Cette amélioration de l'activité et de la sélectivité est conservée pendant plus de deux mois à -20°C . L'étude par modélisation moléculaire montre des différences structurales des résidus catalytiques Asp32 et His64 de la subtilisine en présence ou absence de thymidine ou du sucrose, différences qui peuvent être reliés à une augmentation du k_{cat} (Rich et Dordick, 1997). Pour avoir un effet "d'empreinte" il est nécessaire d'utiliser des molécules solubles dans le milieu avant lyophilisation (Rich et coll., 2002).

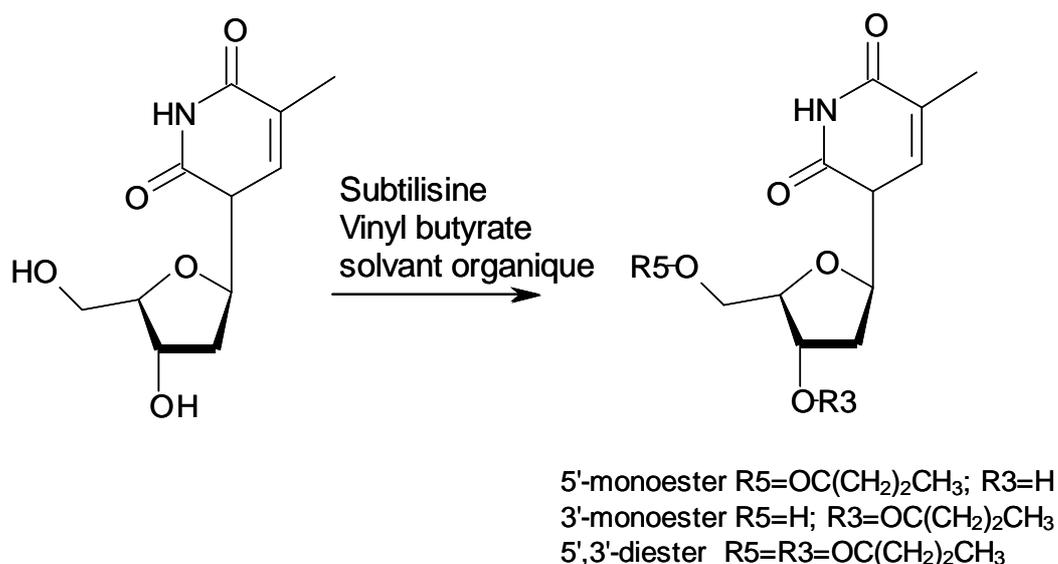


Schéma 30 : Schéma de la réaction d'acylation de la thymidine avec le vinyl butyrate catalysée par la subtilisine (d'après Rich et Dordick, 1997).

Des études réalisées avec des lipases de *Candida antarctica* et de *Bulkhoderia cepacia*, décrivent des variations des valeurs de E dépendantes de la partie alcool de donneurs d'acyle (Hoff et coll, 1996 ; Lee et coll., 2000 ; Gonzalez-Sabin et coll., 2003). Ainsi, des variations importantes de E ont été observées lors de la résolution du (\pm) -1-phénoxypropan-2-ol par la CALB en fonction de l'ester utilisé (Schéma 31) (Hoff et coll, 1996). La résolution du (\pm) -1-

phényléthanol, du (\pm)-indan-1-ol et du (\pm)-tetralin-1-ol par ces deux lipases, a été fortement améliorée lorsque des esters avec une partie alkyle mimant l'alcool à résoudre ont été utilisés, par rapport à la résolution observée avec le vinyl acétate (schéma 32) (Lee et coll., 2000). Par ailleurs, la résolution du (\pm)-*trans* et du (\pm)-*cis*-2-phénylcyclopentanamine par la CALB a pu être améliorée en utilisant des esters avec un groupement alkoxy chiral et E augmente fortement lorsque ce groupement mime au mieux la structure de l'amine à résoudre (schéma 33) (Gonzalez-Sabin et coll., 2003). Ces travaux suggèrent que les lipases sont capables de mémoriser "l'empreinte" laissée par le premier substrat, suffisamment longtemps pour affecter la fixation du second substrat (Lee et coll., 2000 ; Gonzalez-Sabin et coll., 2003). Ce phénomène pourrait être expliqué par une diminution de la flexibilité des lipases en milieu organique par rapport au milieu aqueux (Affleck et coll., 1992).

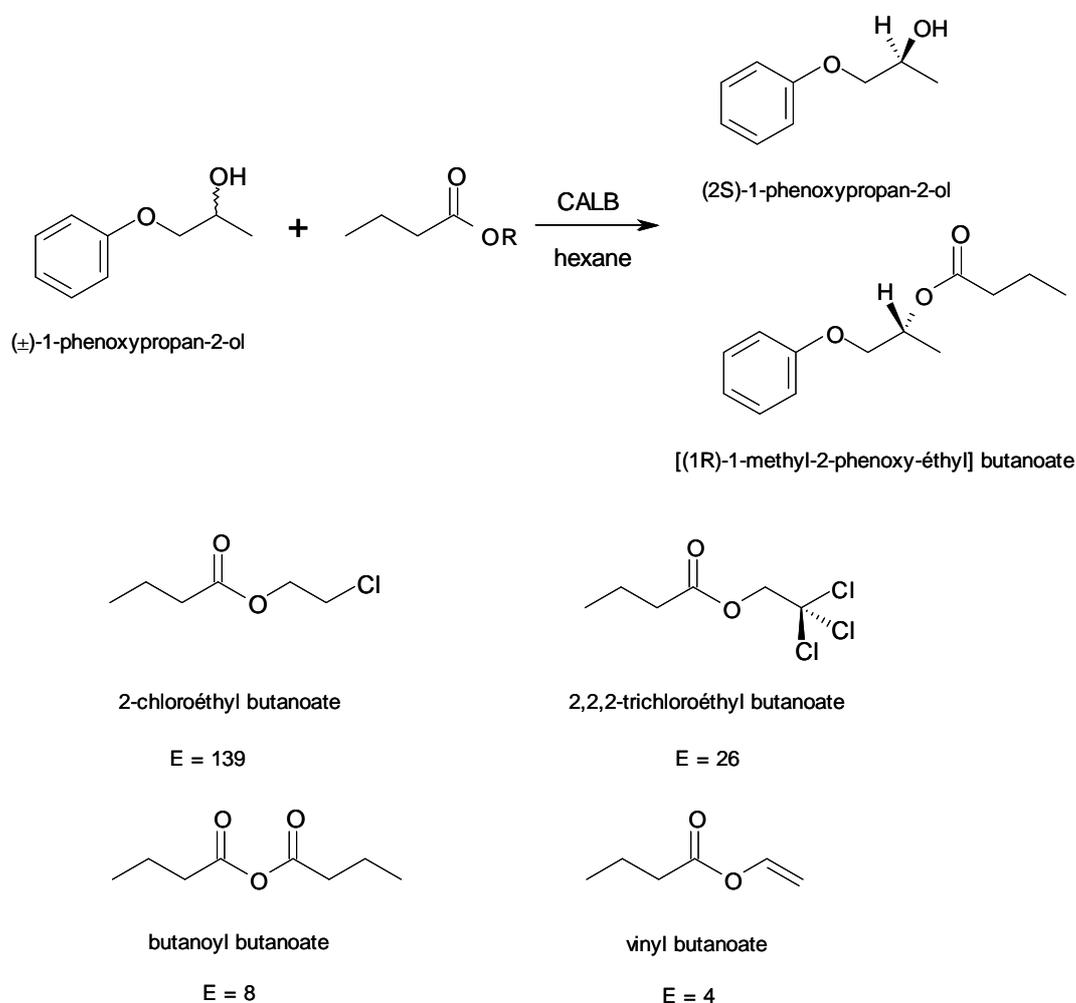


Schéma 31 : Réaction de transestérification du (\pm)-1-phénoxypropan-2-ol catalysée par la CALB dans l'hexane, esters utilisés et E mesurés (d'après Hoff et coll., 1996).

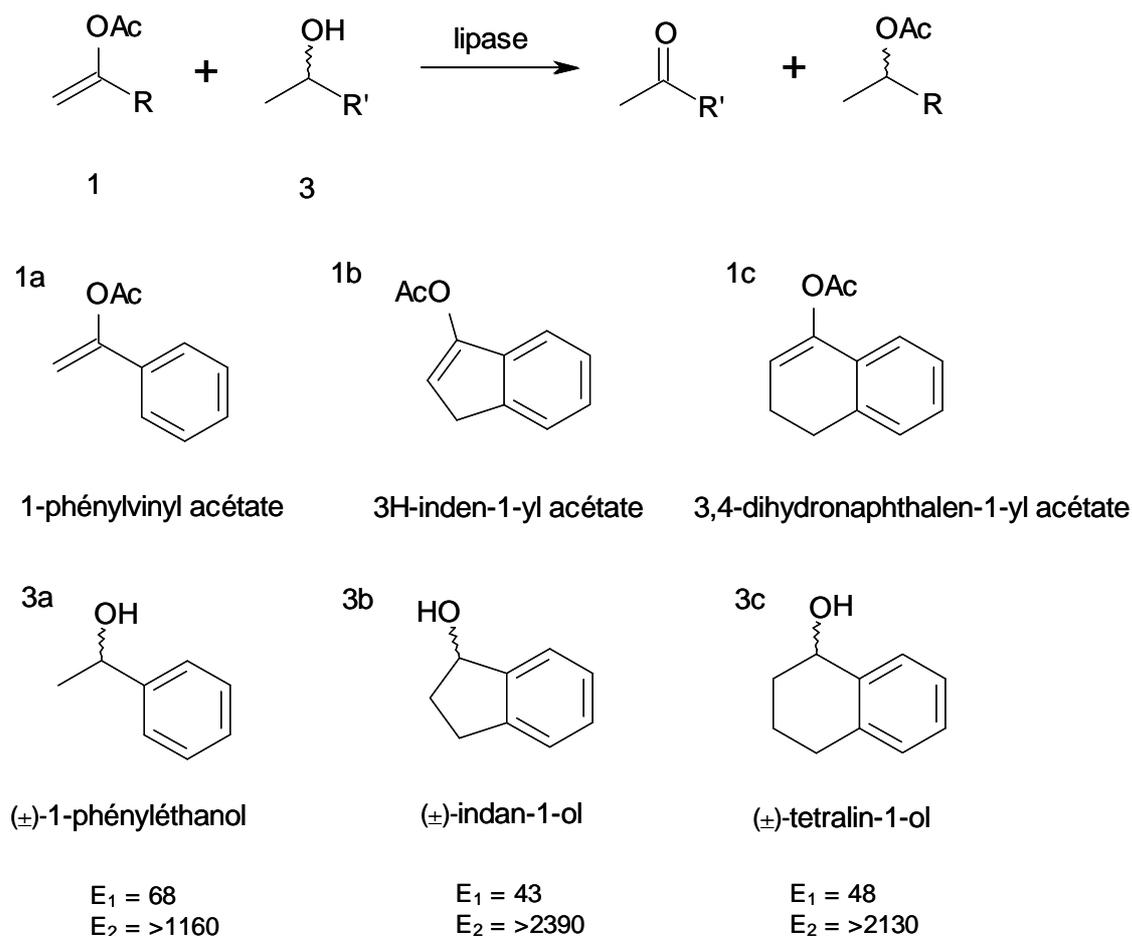
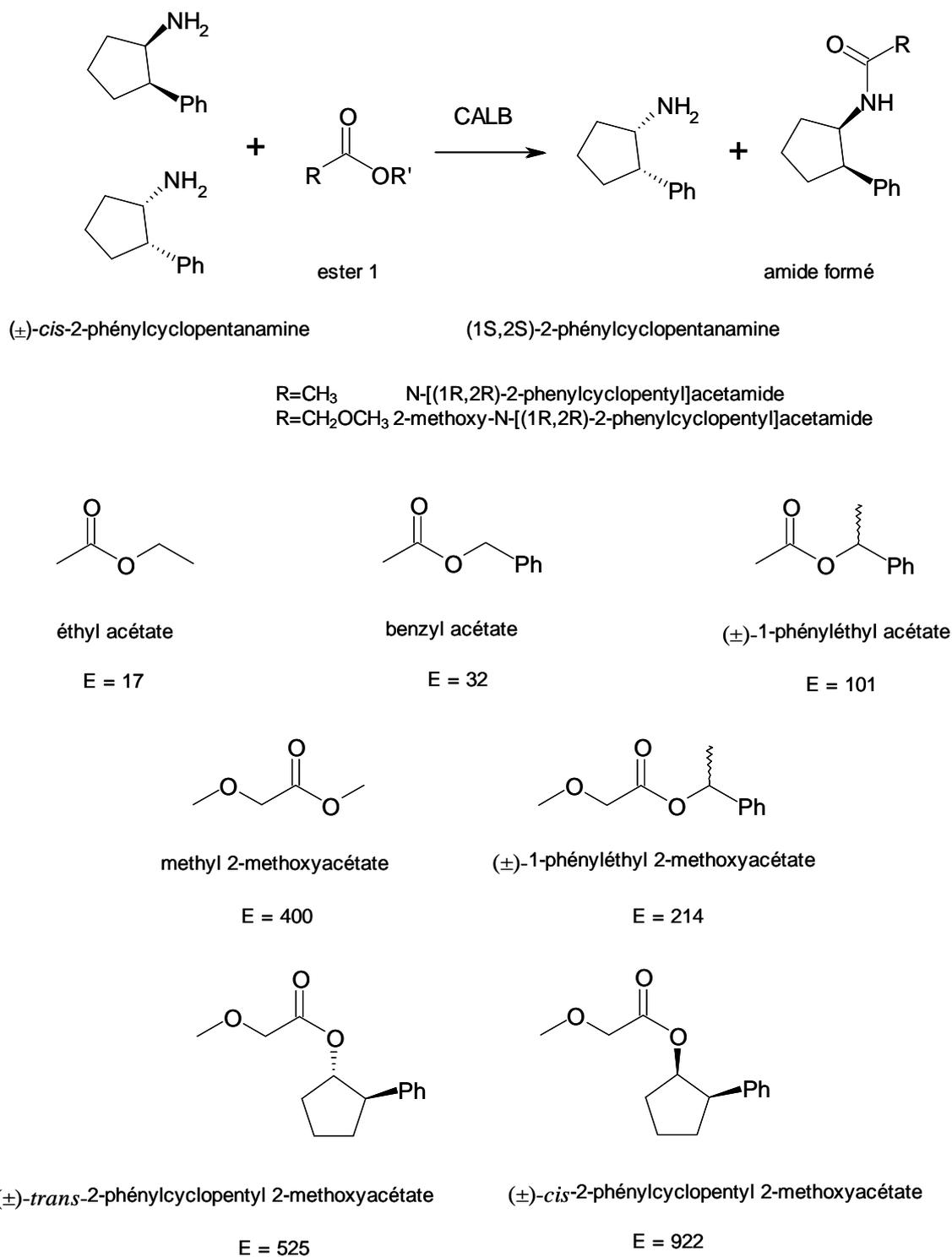
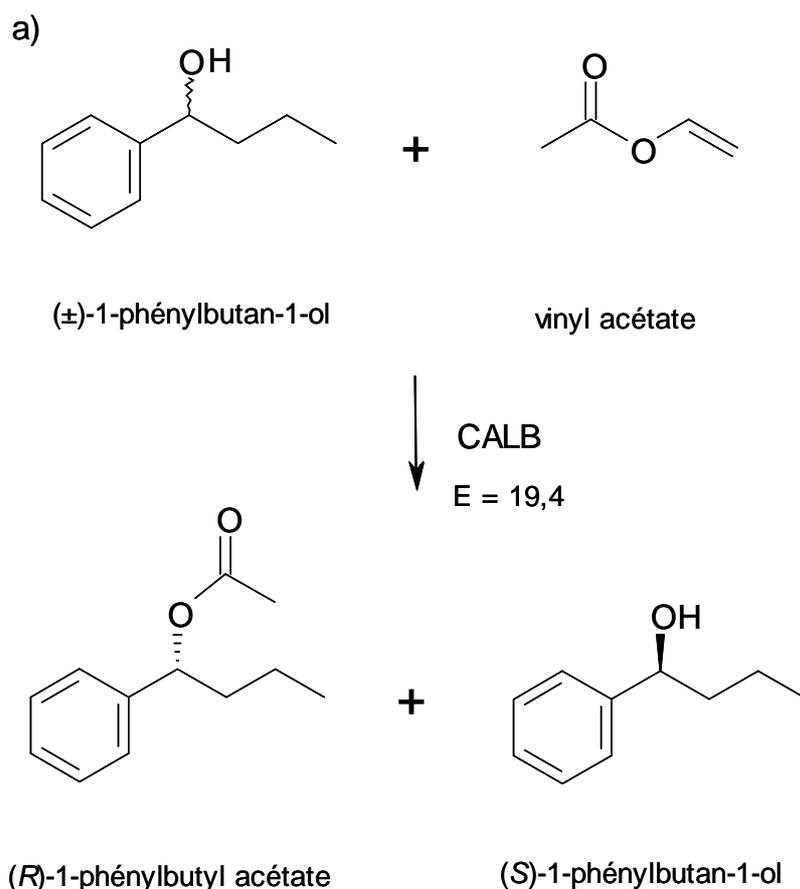


Schéma 32 : réaction de transestérification des alcools secondaires chiraux (3a-3c) et leurs esters homologues (1a-1c) catalysée par la CALB et la lipase de *Bulkhoderia cepacia*. E_1 correspond au ratio énantiomérique mesuré lors de la réaction de transestérification en présence de vinyl acétate par la lipase de *Bulkhoderia cepacia* et E_2 au ratio énantiomérique mesuré lors de la réaction de transestérification réalisée entre l'alcool et son ester homologue (d'après Lee et coll., 2000).



Shéma 33 : Résolution de (\pm) -*cis*-2-phénylcyclopentanamines, par aminolyse des esters catalysée par la CALB, structure des esters étudiés et E mesurés (d'après Gonzalez-Sabin et coll., 2003).

Par ailleurs, une meilleure résolution du (\pm)-1-phénylbutan-1-ol par la CALB a été reportée lorsque, au lieu d'une transestérification avec le vinyl acétate, l'aminolyse de l'ester correspondant, le (\pm)-1-phénylbutyl acétate, a été réalisée (schéma 34) (Garcia-Urdiales et coll., 2001). En plus de l'effet protecteur des amines contre la dégradation par les acides libérés lors de la réaction (Parker et coll., 1998), il a également été montré que la structure de l'amine pouvait affecter la résolution de l'ester chiral. Ainsi, le ratio énantiomérique E varie en fonction des substituants de l'amine, le meilleur résultat étant obtenu pour la (\pm)-1-phénylpropanamine. Les auteurs ont supposé, en admettant que la CALB préférait l'énantiomère *R* des amines, que la désacylation de l'intermédiaire acyl-enzyme par les amines modifiait le site actif de la CALB de manière que l'enzyme devienne plus sélective envers l'énantiomère *R* lors de l'acylation de l'enzyme par le 1-phénylbutyl acétate (Garcia-Urdiales et coll., 2001).



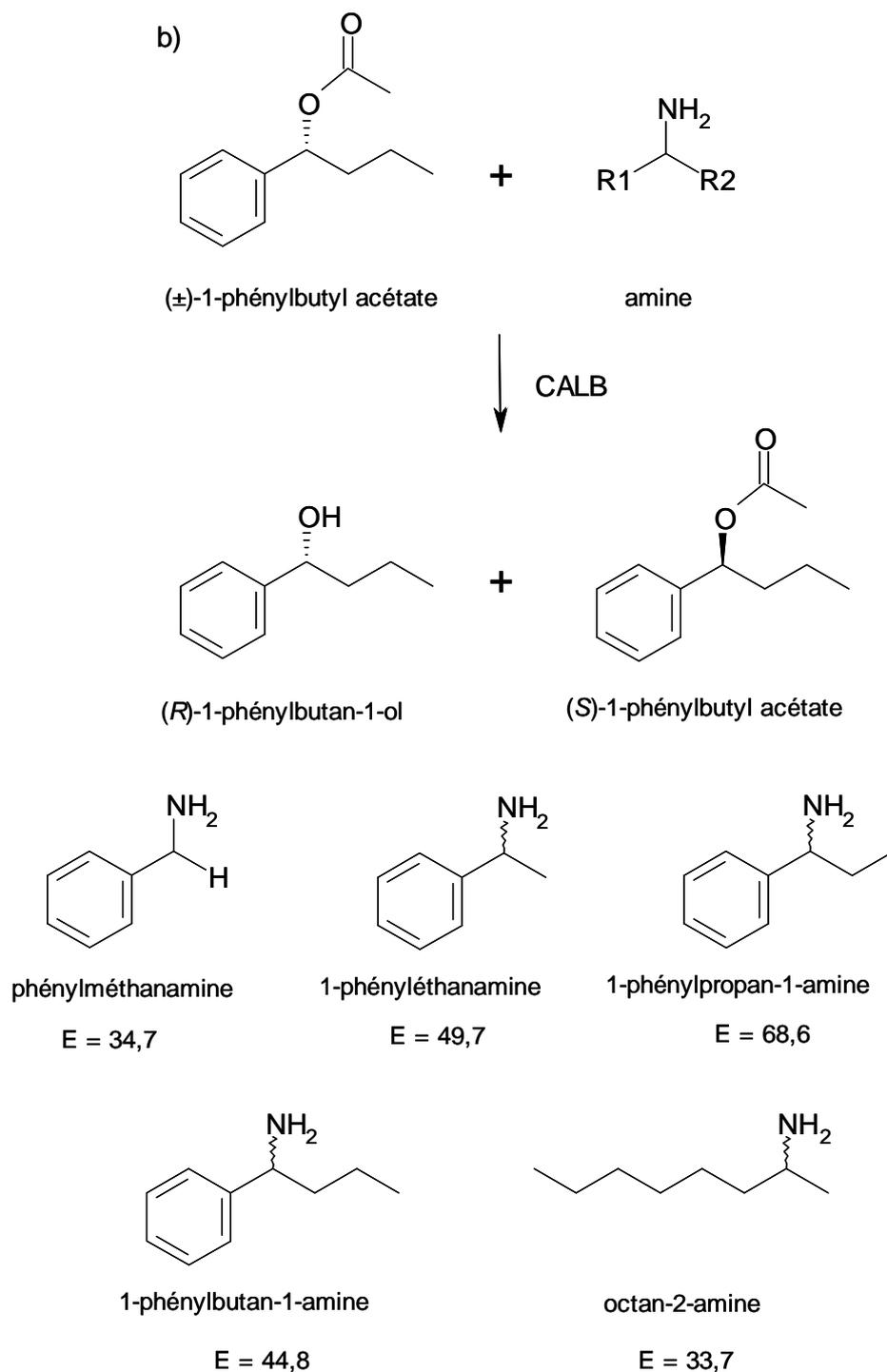


Schéma 34 : Résolution de (±)-1-phénylbutan-1-ol par la CALB : a) réaction de transestérification ; b) réaction d'aminolyse du (±)-1-phénylbutyl acétate, amines utilisées et E mesurés (d'après Garcia-Urdiales et coll., 2001).

En nous inspirant de ces travaux, nous avons étudié l'influence de la partie alkyle de l'ester sur l'énantiosélectivité de la CALB observée lors de la résolution du pentan-2-ol en réacteur solide/gaz (Schéma 35). Une étude récente par modélisation moléculaire a montré que la flexibilité de la CALB diminuait, dans les solvants organiques, avec la diminution de la constante diélectrique (Trodler et Pleiss, 2008). Il est donc possible qu'en milieu gazeux et en absence d'eau, la flexibilité de la CALB soit suffisamment faible, pour pouvoir mémoriser les déformations induites par la partie alkyle du donneur d'acyle, et ainsi affecter la fixation du (\pm)-pentan-2-ol. Si la fixation d'un des deux énantiomères de l'alcool est affectée différemment, le ratio énantiomérique E mesuré sera différent.

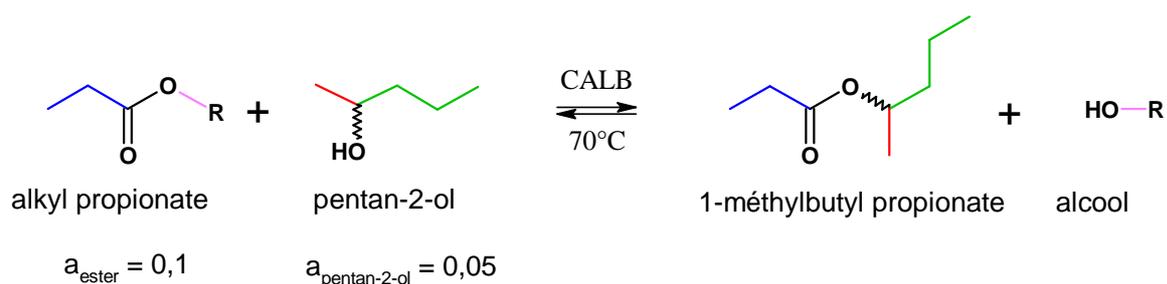


Schéma 35 : Réaction de transestérification étudiée. La partie alkyle de l'ester est variable : les radicaux méthyle, éthyle, propyle, butyle, pentyle, 1-méthylpropyle, 1-éthylbutyle et (\pm , R et S)-1-méthylpentyle ont été testés.

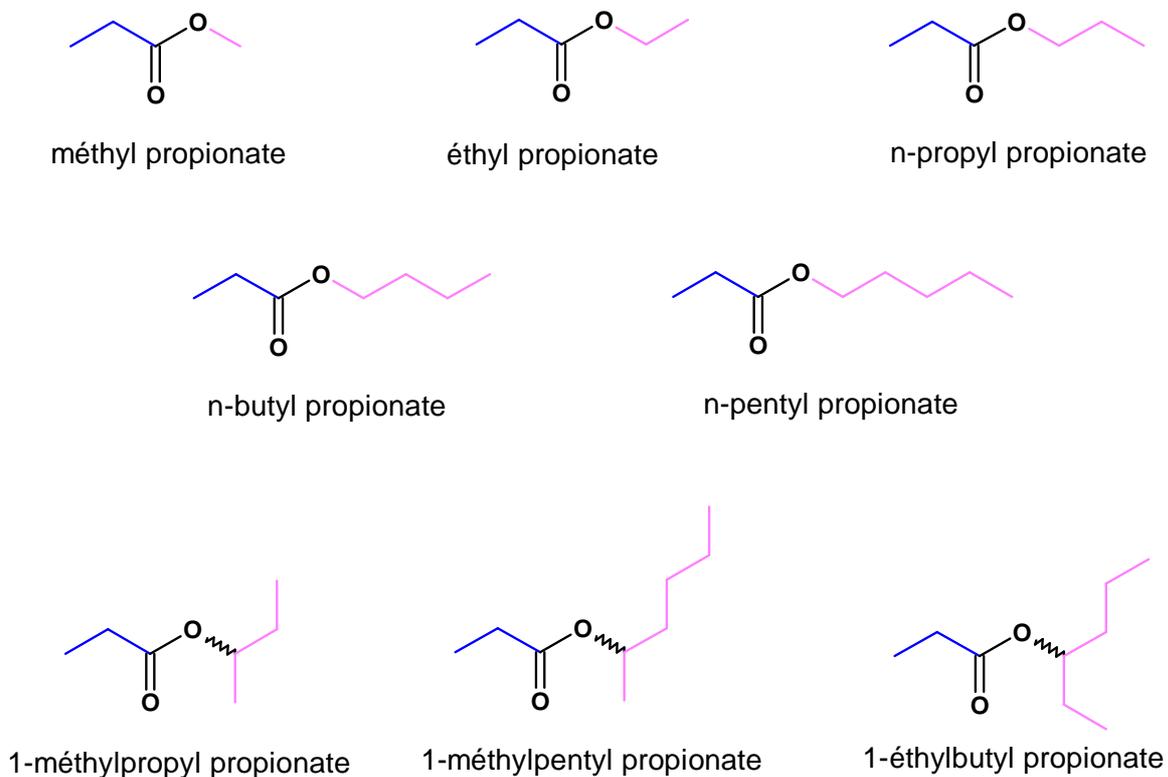


Schéma 36 : Structures des esters utilisés comme donneurs d'acyle.

Dans un premier temps nous avons utilisé des esters avec une chaîne alkyle de plus en plus longue : groupement méthyle, éthyle, propyle, butyle et pentyle (schéma 36). Dans un deuxième temps, nous avons testé des esters avec une partie alkyle chirale, rassemblant au produit final (1-méthylbutyl propionate) : le 1-méthylpropyl propionate, le 1-éthylbutyl propionate et le 1-méthylpentyl propionate (schéma 36). Pour finir, nous voulions vérifier si les deux énantiomères des esters chiraux induisaient des modifications différentes de E. Pour cela les deux énantiomères du 1-méthylpentyl propionate ont été synthétisés séparément à l'aide de la CALB, puis testés avec la CALB sauvage et le variant Ala282Leu, dans les mêmes conditions que le mélange racémique. Les esters à longue chaîne alkyle étant très peu volatiles, pour éviter les phénomènes de condensation dans le réacteur solide/gaz, les expériences ont été réalisées à 70°C, soit 343 K.

B.II.1. Influence de l'élongation de la chaîne alkyle du donneur d'acyle

Le ratio énantiomérique E de la réaction de transestérification du méthylpropionate par le pentan-2-ol catalysée par la CALB à 70°C est égal à $62 \pm 2,5$. Cette valeur augmente lorsqu'on utilise des esters avec des chaînes alkyles linéaires plus longues. Une augmentation constante liée aux nombres d'atomes de carbone n'a pas pu être constatée. Pour tous les esters, comportant des chaînes alkyles de plus de deux atomes de carbone, les valeurs de E sont comprises entre 103 et 117 (Figure 59). Conformément, à ce qui était observé lors des études antérieures réalisées dans le laboratoire, il se peut que la valeur de E plus faible observée avec le méthylpropionate soit due au méthanol libéré dans le milieu. En effet, il a été montré précédemment, que l'ajout de l'alcool primaire au milieu réactionnel conduisait à une diminution de E, et cette diminution s'estompait avec la longueur de la chaîne carbonée (Léonard, 2007). Dans notre cas, les alcools primaires plus longs que le méthanol ne semblent pas influencer l'énantiosélectivité, après leur libération. Cette absence d'effet des alcools primaires libérés, peut être expliquée par leur concentration faible dans le milieu. En effet, les mesures de E ont été effectuées en vitesse initiale, avec un taux de conversion compris entre 10 et 15%, ce qui correspond à une activité thermodynamique de 0,005 à 0,0075.

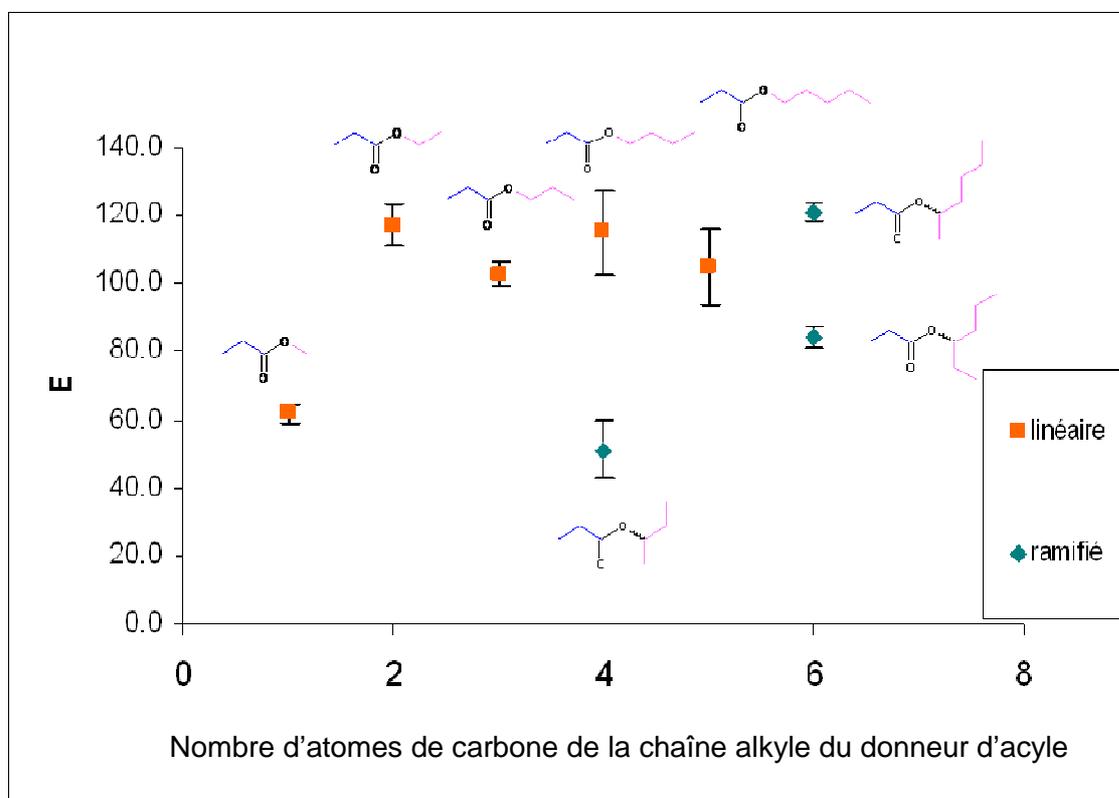


Figure 59 : Variations de E avec la longueur de la chaîne alkyle du donneur d'acyle.

B.II.2. Influence des esters avec des chaînes alkyles chirales

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'influence d'esters chiraux racémiques présentant une forte homologie avec l'alcool à résoudre, le pentan-2-ol. Le (\pm)-1-méthylbutyl propionate ne pouvant pas être utilisé car la différenciation de l'ester de départ et de l'ester formé est impossible, nous avons utilisé des esters dont la chaîne alkyle est plus courte ou plus longue d'un atome de carbone. Ainsi, le (\pm)-1-méthylpropyl propionate, avec le substituant L plus court, le (\pm)-1-éthylbutyl propionate, avec le substituant M plus long, et le (\pm)-1-méthylpentyl propionate, avec le substituant L plus long, ont été testés. Ces esters étant non commercialisés, nous les avons synthétisés chimiquement.

Les résultats présentés sur les figures 59 et 60, montrent que la structure de la chaîne alkyle des esters a une influence sur l'énantiosélectivité de la CALB vis-à-vis du pentan-2-ol. Ainsi, l'énantiosélectivité augmente, lorsque des esters chiraux avec des chaînes alkyles plus longues sont utilisées : E passe de 62 pour le méthyl propionate à 84 et 122 respectivement avec le (\pm)-1-éthylbutyl propionate et le (\pm)-1-méthylpentyl propionate. Nous pouvons noter, que l'augmentation de E est plus importante pour le (\pm)-1-méthylpentyl propionate, lorsque le substituant L a été rallongé d'un atome de carbone et le substituant M est restée inchangé. Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature. En effet, Lee et coll. ont montré que la résolution des alcools secondaires était fortement améliorée lorsque des donneurs d'acyles structuralement proches ont été utilisés (schéma 32) (Lee et coll., 2000). Par ailleurs, la résolution des (\pm)-2-phénylcyclopentanamines par aminolyse catalysée par la CALB, a été améliorée lors de l'utilisation des esters avec un groupement alkoxy chiral (schéma 33) (Gonzalez-Sabin et coll., 2003). L'importance de l'utilisation des substrats ressemblant fortement à l'alcool à résoudre, a également été montrée lors de l'aminolyse du (\pm)-1-phénylbutyl acétate (schéma 34b) (Garcia-Urdiales et coll., 2001).

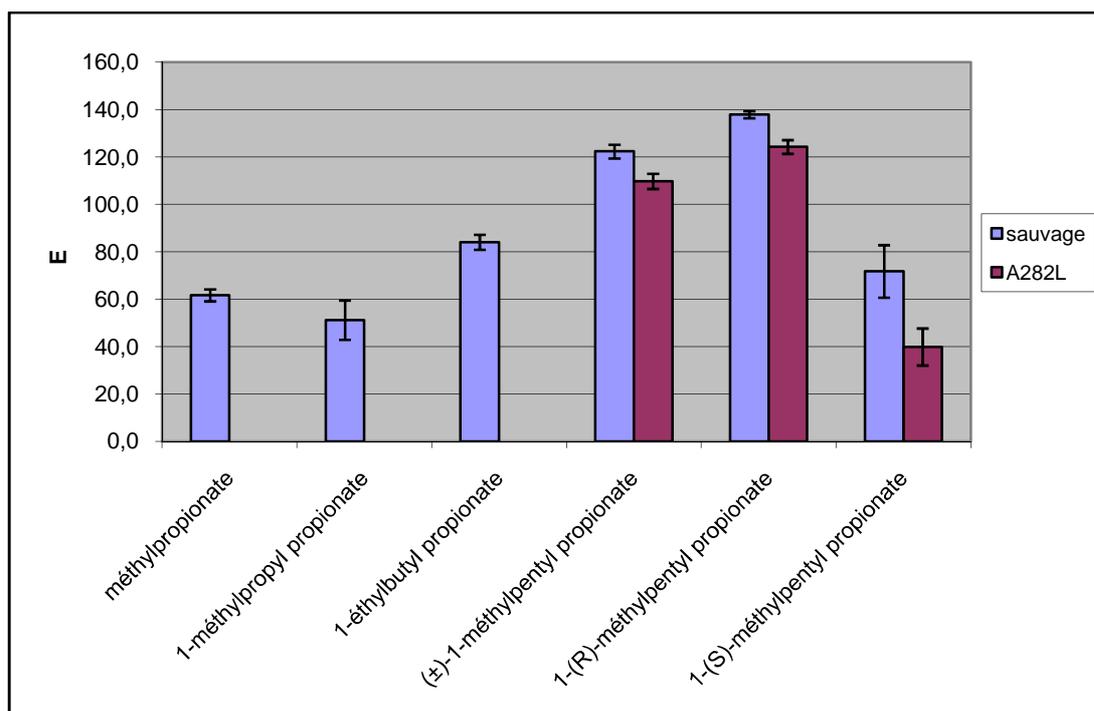


Figure 60 : Valeurs de E obtenus avec des donneurs d'acyle à chaîne alkyle chirale.

En revanche, E diminue légèrement pour le (±)-1-méthylpropyl propionate par rapport à ce qui a été observé avec le méthyl propionate (valeurs de E de 51 et 62 respectivement). Cette diminution inattendue, peut partiellement être expliquée par l'énantiosélectivité faible de la CALB vis-à-vis l'alcool correspondant à la chaîne alkyle, le butan-2-ol (E=4). Par ailleurs, nous avons montré dans le paragraphe 'Explications structurales de l'énantiosélectivité', que le butan-2-ol pouvait adopter plusieurs orientations au sein du site actif. Plus particulièrement, nous avons vu que cet alcool se fixait dans le site actif préférentiellement dans un mode non productif ou un mode productif intermédiaire, sans substituant dirigé dans la poche énantiosélective. Pour l'énantiomère *R* du pentan-2-ol, un mode de fixation productif, avec le groupement méthyle dirigé vers le fond de la poche énantiosélective, a été trouvé. Par conséquent, les déformations de la cavité induites par le butan-2-ol, sont différentes de celles favorisant le (*R*)-pentan-2-ol, et il semblerait que le butan-2-ol privilégierait l'énantiomère *S*.

B.II.3. Influence des esters énantiopures

Pour finir, nous voulions mesurer s'il y avait une différence entre les *E* obtenus avec les énantiomères *R* ou *S* de l'ester chiral pris séparément, comme donneur d'acyle. Ainsi nous avons décidé d'utiliser les esters énantiopures du 1-méthylpentyl propionate, car c'est avec cet ester qu'on a observé le ratio énantiomérique le plus élevé, et donc c'est pour cet ester qu'on peut s'attendre à des variations plus marquées. L'énantiomère *R* a été obtenu par transestérification de l'hexan-2-ol avec le vinyl propionate par la CALB dans l'heptane. Au bout de 4 heures à 35°C, on a uniquement la forme *R* qui est formé ($E = 490$), et cette dernière peut être isolée par chromatographie sur gel de silice avec un éluant éther de pétrole/acétate d'éthyle (95 :5) (excès énantiomérique de l'ester *R* produit, ee_p , est de 99,3%). L'énantiomère *S* de l'ester a été synthétisé chimiquement à partir de l'hexan-2-ol fortement enrichi en forme *S* ($ee_p = 93,2\%$), issus de la réaction précédente, arrêtée au bout de 12 heures.

La résolution du pentan-2-ol par transestérification avec ces esters par la CALB conduit à une augmentation de *E* avec l'énantiomère *R* et à une diminution de *E* avec l'énantiomère *S* ($E=140$ et 72 respectivement), par rapport à ce qui était observé pour le mélange racémique ($E=122$) (figure 60). L'erreur plus importante observée pour *E* en présence de l'énantiomère *S* est due à des traces d'hexan-2-ol restant dans le milieu après purification et ayant un temps de rétention très proche de celle du (*R*)-1-méthylbutyl propionate, formé au cours de la réaction. L'étude réalisée par Gonzalez-Sabin et coll., montre également que la meilleure énantiosélectivité est observée lorsque la partie alkoxy présente une isomérisation identique à celle de l'amine à résoudre. Ainsi, la valeur de *E* est plus élevée pour la résolution du (\pm)-*cis*-2-phénylcyclopentanamine lorsque l'alcool libéré est le (\pm)-*cis*-2-phénylcyclopentanol, par rapport à la valeur mesurée lors de la libération du (\pm)-*trans*-2-phénylcyclopentanol (922 et 525 respectivement) (schéma 33) (Gonzalez-Sabin et coll., 2003).

Ces résultats, ainsi que les nôtres, suggèrent que les deux énantiomères de l'ester laisseraient des empreintes différentes dans la cavité de la CALB, chacun favorisant ensuite la fixation de l'énantiomère correspondant du pentan-2-ol. L'amplitude de la diminution provoquée par la forme *S* est plus importante que l'augmentation observée avec la forme *R* du donneur d'acyle, suggérant, que l'énantiomère *S* aurait un effet plus prononcé.

Par ailleurs, la résolution du pentan-2-ol par transestérification avec le 1-méthylpentyl propionate (mélange racémique, ester *R* pur et ester enrichie en *S*) a été réalisée par le variant

Ala282Leu de la CALB. Une évolution similaire au sauvage a été trouvée pour ce variant avec les ratios énantiomérique de 110, 126 et 41 respectivement (figure 60). Ces résultats témoignent à nouveau de la forte influence du groupe partant du donneur d'acyle. On peut noter, que contrairement à ce qui était observé lors de la transestérification du méthyl propionate avec le pentan-2-ol (§ B.I.2.b.), une diminution de l'énantiosélectivité par rapport à l'enzyme sauvage est observée.

Enfin, une diminution plus importante de *E* a été observée lorsque le (*S*)-1-méthylpentyl propionate a été utilisé comme donneur d'acyle avec l'enzyme variant Ala282Leu par rapport à ce qui était obtenue avec l'enzyme sauvage (figure 60). Ces résultats vont dans le sens du postulat formulé pour expliquer l'effet des mutations du canal d'accès au site sur *E*, selon lequel l'accès au site actif de la l'énantiomère *S* serait plus fortement influencée par les résidus de ce canal.

B.II.4. Conclusions et perspectives

Dans ce paragraphe nous avons étudié l'influence de la partie alkyle de l'ester sur la résolution du pentan-2-ol par transestérification catalysée par la CALB. L'allongement de la chaîne alkyle de l'ester par ajout d'un groupement méthyle conduit à une augmentation de la valeur de E par rapport à celle obtenue avec le méthylpropionate ($E = 117$ et 62 respectivement), mais E n'augmente plus lors de l'allongement supplémentaire de cette chaîne. L'interprétation de ces résultats reste délicate. En effet, on ne peut pas dire si cette augmentation est due à l'allongement de la chaîne carbonée ou à une absence de l'effet induit par l'alcool libéré, qui deviendrait trop grand et moins hydrophile. En revanche, les E mesurés lors de la résolution du pentan-2-ol avec des donneurs d'acyle à chaîne alkyle chirale ont une valeur qui varie à chaque fois que la structure de cette chaîne est modifiée. Les meilleurs résultats ont été obtenus pour le (\pm)-1-méthylpentyl propionate : cet ester possède une chaîne alkyle dont le substituant L a été rallongé d'un atome de carbone, par rapport à celle du pentan-2-ol, et le substituant M est resté inchangé. L'étude avec les 1-méthylpentyl propionate énantiopures a montré que les deux formes influencent l'énantiosélectivité de la CALB de façon opposée : pour la forme R , E présente une augmentation plus importante que pour le mélange racémique, alors que pour la forme S une diminution de E par rapport au mélange racémique est observée. L'influence de la forme S est plus marquée que celle de la forme R .

Ces variations ont été obtenues pour des valeurs de E calculées à partir des quantités de 1-méthylbutyl propionate de la forme R et S produites lors de la réaction. Elles reflètent uniquement les transformations effectives du pentan-2-ol, mais ne tiennent pas compte des modes de fixation non productifs de ce dernier. Or, on peut envisager que les modes de fixation non productifs laissent également une empreinte, privilégiant un mode de fixation ultérieur non productif. Ce phénomène peut éventuellement être relié à la diminution du ratio énantiomérique avec le 1-méthylpropyl propionate utilisé comme donneur d'acyle.

Pour étudier l'empreinte laissée par chaque énantiomère on pourrait envisager de co-lyophiliser la lipase avec les deux énantiomères du pentan-2-ol séparément. En effet, la co-lyophilisation de la subtilisine avec la thymidine a permis d'améliorer l'activité et la sélectivité de l'enzyme lors de l'acylation de ce substrat (Rich et Dordick, 1997). La subtilisine lyophilisée dans de telles conditions garde en mémoire la structure du substrat jusqu'à deux mois à -20°C (Rich et Dordick, 1997).

Une autre possibilité pour améliorer la résolution du pentan-2-ol par la CALB, serait d'utiliser l'amide analogue à l'ester synthétisé, le (\pm)-N-(1-méthylbutyl)propanamide. Ce substrat présente un groupement alkyle identique à celui de l'alcool à résoudre, ce qui semble avantageux d'après nos résultats et de ceux de la littérature (Lee et coll., 2000 ; Gonzalez-Sabin et coll., 2004). De plus, lors de la réaction, du (\pm)-pentan-2-amine serait libéré, qui par son caractère basique protégerait l'enzyme. En effet, il a été montré, que l'utilisation de triéthylamine comme additif lors de la transestérification du (\pm)-1-phénylbutan-1-ol, permet d'améliorer l'énantiosélectivité de la CALB (Garcia-Urdiales et coll., 2001). Cet effet serait lié à l'inactivation par des bases présentes dans le milieu, des acides issus de l'hydrolyse de l'ester, et qui pourrait désactiver l'enzyme par formation de bases de Schiff avec les amines primaires présentes à la surface enzymatique (Berger et Faber, 1991 ; Garcia-Urdiales et coll., 2001).

Pour finir, l'étude cristallographique de la CALB cristallisée avec des analogues phosphorés des deux énantiomères du pentan-2-ol séparément, pourrait être envisagée. Cette étude permettrait, de confirmer nos hypothèses, selon laquelle les deux énantiomères déformeraient le site actif de l'enzyme de façon distincte, et offrirait la possibilité d'identifier les résidus affectés. De plus, ces structures cristallographiques présenteraient de bonnes structures de départ pour l'étude de l'énantiosélectivité.

B.III.Rôle de l'entropie d'activation pour la définition de l'énantiosélectivité de la CALB et ses variants

Dans la partie précédente (Explications structurales de l'énantiosélectivité), nous avons cherché à expliquer la capacité de la CALB à résoudre les énantiomères d'alcools secondaires, en étudiant les modes de fixation du butan-2-ol et du pentan-2-ol, ainsi que les différences énergétiques entre les états de transition formés par les deux énantiomères. Ainsi, l'énantiosélectivité de la CALB a pu être reliée à des différences d'énergie d'interaction entre le substrat et l'enzyme. Nous avons utilisé un modèle statique, qui considère uniquement les différences d'enthalpie d'activation, sans tenir compte de la contribution entropique à l'énergie d'activation. En effet, les deux énantiomères se trouvent contraints dans un volume réduit du site actif de l'enzyme (DeTar, 1981), ce qui nous a conduit à considérer, dans un premier temps, que cette dernière contribution était relativement faible. Cependant, un certain nombre d'études thermodynamiques de l'énantiosélectivité ont révélé que l'entropie était un paramètre aussi important que l'enthalpie dans la discrimination de deux énantiomères (Philips, 1992 ; Overbeeke et coll., 1999 ; Ottosson et coll., 2001 ; Ottosson et coll., 2002a), et que la prise en compte de l'entropie permettait de fournir une meilleure explication de l'énantiosélectivité.

Dans cette partie nous nous sommes donc intéressés aux variations des paramètres thermodynamiques d'activation (enthalpie et entropie), dans le but de mieux comprendre l'énantiosélectivité mesurée expérimentalement avec la CALB sauvage ou mutée. Dans un premier temps, des enzymes mutées au niveau de la poche stéréospécifique ont été étudiées: mutants simples Thr42Val et Ser47Ala et mutant double Thr42ValSer47Ala. Ensuite, dans le but de vérifier si les mutations du canal d'accès au site actif ont un effet sur l'état de transition formé lors de la deuxième étape de la transestérification, nous avons déterminé les paramètres thermodynamiques d'activation avec les variants Ile189Ala, Leu278Val et Ala282Leu. Dans la partie qui suit, toutes les expériences concernent la résolution des énantiomères du pentan-2-ol par acylation avec le méthyl propionate, à l'aide du réacteur solide/gaz, en utilisant un flux gazeux ne contenant que les substrats.

B.III.1. Théorie

La théorie de l'état de transition permet de relier le ratio énantiomérique E à la différence d'énergie libre d'activation entre les deux énantiomères, $\Delta_{R-S}\Delta G^\ddagger$, selon l'équation 31 (avec T la température en K, R la constante universelle des gaz parfaits et dans le cas où c'est l'énantiomère R qui est préféré).

$$\Delta_{R-S}\Delta G^\ddagger = \Delta G_R^\ddagger - \Delta G_S^\ddagger = -RT \ln E \quad (\text{Eq. 31})$$

Par ailleurs, l'énergie d'activation comporte deux termes, un terme enthalpique et un terme entropique (équation 32).

$$\Delta_{R-S}\Delta G^\ddagger = \Delta_{R-S}\Delta H^\ddagger - T\Delta_{R-S}\Delta S^\ddagger \quad (\text{Eq. 32})$$

Les différences d'enthalpie d'activation et d'entropie d'activation entre deux énantiomères, (figure 61), peuvent être déterminées en étudiant la variation de E en fonction de la température. La combinaison des équations 31 et 32 conduit à l'équation 33 qui peut être réarrangée en l'équation 4.

$$-RT \ln E = \Delta_{R-S}\Delta H^\ddagger - T\Delta_{R-S}\Delta S^\ddagger \quad (\text{Eq. 33})$$

$$\ln E = -\frac{\Delta_{R-S}\Delta H^\ddagger}{R} \times \frac{1}{T} + \frac{\Delta_{R-S}\Delta S^\ddagger}{R} \quad (\text{Eq. 34})$$

Ainsi, le terme enthalpique $\Delta_{R-S}\Delta H^\ddagger$ est calculé à partir de la pente de la droite de l'équation 34 et le terme entropique $\Delta_{R-S}\Delta S^\ddagger$ à partir de l'ordonnée à l'origine de cette même droite. La différence d'enthalpie d'activation est reliée à la différence de complémentarité entre les deux énantiomères et le site actif de l'enzyme lors de l'état de transition. Cette complémentarité est basée sur des interactions stériques et électrostatiques entre le substrat, l'enzyme et les molécules de solvant. Le terme entropique comporte des termes d'entropie translationnelle, rotationnelle et vibrationnelle. Par conséquent, la différence d'entropie est un terme complexe, correspondant à la différence de liberté spatiale du substrat dans le site actif, mais également à la différence de degré de liberté conformationnelle des acides aminés du site actif de l'enzyme ou à la différence de solvation du substrat et de l'enzyme en fonction de l'énantiomère étudié. En effet, lors de la formation de l'état de transition, des molécules de solvant peuvent être expulsées hors du site actif, générant une variation positive d'entropie.

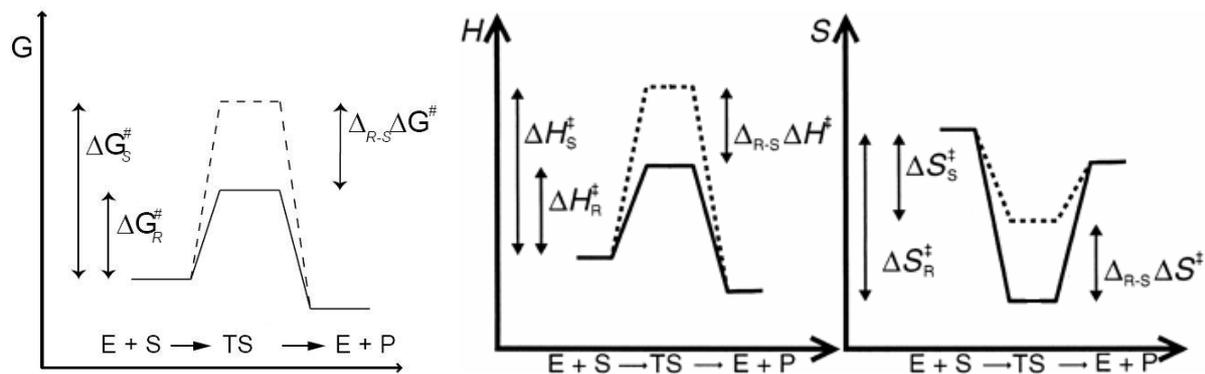


Figure 61 : Diagrammes d'énergie d'activation, d'enthalpie d'activation, et d'entropie d'activation d'une réaction catalysée par une enzyme énantiosélective. E est l'enzyme, S le substrat, P le produit et TS l'état de transition. Le trait pointillé représente l'énantiomère lentement transformé par l'enzyme (S ici) et le trait plein l'énantiomère rapidement transformé par l'enzyme (R ici) (Ottosson et coll., 2001). La figure correspond au cas le plus fréquent où l'énantiomère préféré est favorisé par l'enthalpie et défavorisé par l'entropie.

Les variations des paramètres d'activation peuvent être soit négatives soit positives. Généralement, les contributions enthalpiques et entropiques se compensent, c'est-à-dire qu'elles sont soit toutes les deux positives, soit toutes les deux négatives. Le cas le plus fréquent est celui où l'énantiomère préféré est favorisé par l'enthalpie et défavorisé par l'entropie. Ceci est en lien avec le fait que, plus la fixation du substrat dans le site actif est forte, plus l'état de transition formé sera rigide, donc plus l'entropie sera faible.

Ces variations des paramètres d'activation de l'énantiosélectivité, $\Delta_{R-S}\Delta H^\ddagger$ et $\Delta_{R-S}\Delta S^\ddagger$, sont reliées aux changements des paramètres d'activation individuels, ΔH^\ddagger et ΔS^\ddagger , de chaque énantiomère. Par conséquent, elles peuvent également être déterminées en utilisant les alcools énantio-purs, et en mesurant les vitesses de réaction absolue. Dans la pratique, c'est le mélange racémique d'alcools qui est utilisé, pour des raisons de cherté des énantio-purs, et seules les différences $\Delta_{R-S}\Delta H^\ddagger$ et $\Delta_{R-S}\Delta S^\ddagger$ sont mesurées.

A partir des équations précédentes on peut déterminer la température de racémisation, T_r , qui correspond à une absence de discrimination entre les énantiomères : $E = 1$ et $\Delta_{R-S}\Delta G^\ddagger = 0$. Cette température peut être déterminée à partir du rapport de différence d'enthalpie d'activation et d'entropie d'activation, selon l'équation 35.

$$T_r = \frac{\Delta_{R-S}\Delta H^\ddagger}{\Delta_{R-S}\Delta S^\ddagger} \quad (\text{Eq. 35})$$

Lorsque $T < T_r$: l'enzyme va préférentiellement catalyser l'énantiomère favorisé par l'enthalpie et l'énantiosélectivité diminue lorsque la température et le terme entropique, $\Delta_R \Delta S^\ddagger$, augmentent. Ceci correspond au cas le plus fréquent aux températures habituellement utilisées pour la catalyse enzymatique.

Lorsque $T > T_r$: l'énantiosélectivité de l'enzyme s'inverse, et c'est l'énantiomère privilégié par l'entropie qui sera privilégié ; E augmente avec la température.

Théoriquement, les différences d'enthalpie d'activation et d'entropie d'activation peuvent être de signe différent, ce qui signifie que l'un des énantiomères est privilégié à la fois par l'enthalpie et par l'entropie. Ceci résulte en une T_r négative, qui n'a pas de signification physique.

B.III.2.Exemples d'études des paramètres d'activation de la CALB et ses variants, issues de la littérature

Depuis les années 90, le nombre d'études qui se focalisent sur la détermination des paramètres thermodynamiques d'activation s'accroît. Ces travaux concernent l'étude de l'influence du substrat, de la protéine et du solvant. Nous allons détailler un exemple d'étude réalisée avec la CALB pour chacun de ces paramètres.

B.III.2.a Influence du substrat

La détermination des paramètres thermodynamiques pour le butan-2-ol et ses homologues substitués, réalisée par Ottosson et coll., constitue un bon exemple pour l'étude de l'influence du substrat. Ces auteurs ont étudié la réaction d'acylation du butan-2-ol, du 3-méthylbutan-2-ol, du 3,3-diméthylbutan-2-ol et du 1-bromobutan-2-ol par la CALB (schéma 37) (Ottosson et coll. 2002). Les variations d'enthalpie et d'entropie d'activation de cette réaction ont été déterminées par l'étude de la variation du ratio énantiomérique (E) en fonction de la température. Les valeurs de E et les paramètres thermodynamiques enthalpiques et entropiques obtenus sont présentés dans le tableau 25.

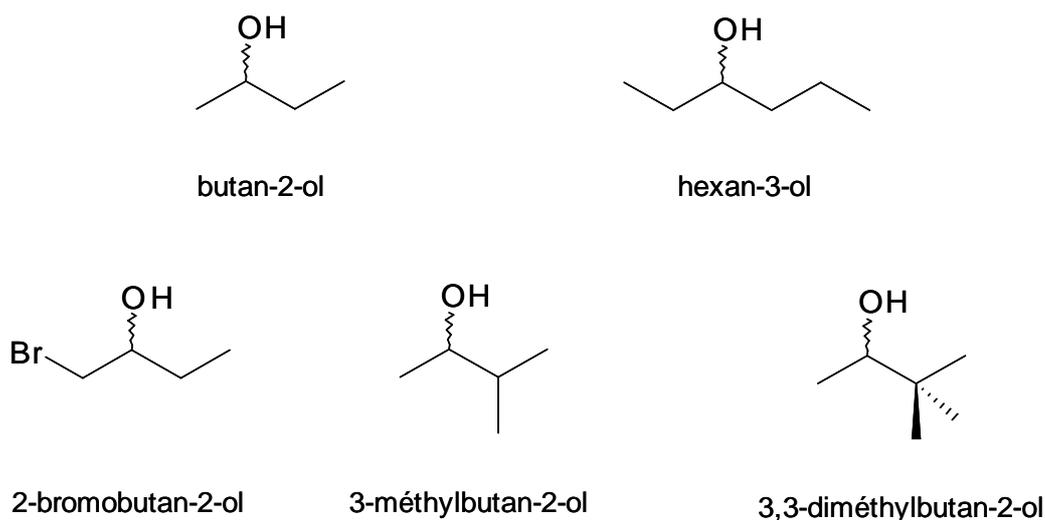


Schéma 37 : Structures des alcools utilisés par Ottosson et coll. (2002) pour l'étude de l'influence du substrat sur les paramètres thermodynamiques d'activation lors de leur résolution par la CALB.

Tableau 25 : Ratio énantiomérique, E , et ses composantes thermodynamiques pour la réaction de transestérification des alcools secondaires catalysée par la CALB. Le donneur d'acyle utilisé est le vinyl octanoate, sauf pour le 1-bromobutan-2-ol, pour lequel le vinyl propionate a été utilisé. Les erreurs ont été calculées à partir des erreurs standards de la régression linéaire de $\ln E = f(1/T)$ et E a été calculé à partir de la relation linéaire (Ottosson et coll., 2002a)

Alcool	E à 298K	$\Delta_{R-S}\Delta G^\ddagger$ à 298 K [kJ.mol ⁻¹]	$\Delta_{R-S}\Delta H^\ddagger$ [kJ.mol ⁻¹]	$T\Delta_{R-S}\Delta S^\ddagger$ [kJ.mol ⁻¹]	$\Delta_{R-S}\Delta S^\ddagger$ [J.mol ⁻¹ K ⁻¹]	T_f [K]
1-bromobutan-2-ol	100	-11,4	-23,5 ± 1,0	-12,1 ± 1,0	-40,7 ± 3,2	580
butan-2-ol	8,3	-5,3	-10,7 ± 0,7	-5,4 ± 1,4	-18,2 ± 4,6	590
3-méthyl-butane-2-ol	810	-16,6	-24,3 ± 1,1	-7,7 ± 1,0	-26,0 ± 3,4	940
3,3-diméthylbutane-2-ol	460	-15,2	-20,4 ± 1,3	-5,2 ± 1,3	-17,6 ± 4,2	1160
hexan-3-ol	340	-14,4	-9,0 ± 0,7	+5,5 ± 0,7	+18,3 ± 2,4	-490

La substitution du butan-2-ol par un ou deux groupes méthyle ou par un atome de brome provoque des changements à la fois pour le terme enthalpique ($\Delta_{R-S}\Delta H^\ddagger$) et pour le terme entropique ($\Delta_{R-S}\Delta S^\ddagger$), ce qui se traduit par une modification importante du ratio énantiomérique. Pour tous ces alcools secondaires étudiés, l'énantiomère R de l'alcool secondaire est favorisé par l'enthalpie et défavorisé par l'entropie. En plus de ces alcools homologues du butan-2-ol, les paramètres thermodynamiques d'activation de l'hexan-3-ol ont été également déterminés. Pour cet alcool, contrairement aux autres alcools étudiés, $\Delta_{R-S}\Delta S^\ddagger$ est positif, en d'autres termes, l'énantiomère R de l'hexan-3-ol n'est pas seulement favorisé

par l'enthalpie mais aussi par l'entropie. De plus, pour cet alcool la température de racémisation (T_r) est négative. Pour tous ces substrats, on peut noter une contribution significative de l'entropie d'activation. En fait, le terme entropique, $T\Delta_{R-S}\Delta S^\ddagger$, représente 25 à 61% du terme enthalpique $\Delta_{R-S}\Delta H^\ddagger$ de la différence de l'énergie libre d'activation $\Delta_{R-S}\Delta G^\ddagger$.

Ces auteurs ont cherché de relier le volume accessible du substrat à la variation d'entropie (Ottoosson et coll., 2002a). Ils ont déterminé ces volumes par deux méthodes distinctes : en superposant les structures obtenues au cours d'une dynamique moléculaire ou en procédant à une exploration systématique des conformations, par une méthode apparentée à la méthode de Monte-Carlo, qui consiste à faire varier les angles dièdres du substrat par petit pas (5°). Cette étude a révélé que le (*R*)-hexan-3-ol avait accès à un plus grand volume au sein du site actif que l'énantiomère *S*. Ce résultat est en accord avec le fait que la variation d'entropie d'activation est plus élevée pour le (*R*)-hexan-3-ol que pour le (*S*)-hexan-3-ol ($\Delta_{R-S}\Delta S^\ddagger > 0$, tableau 25). De même, pour le butan-2-ol, un volume plus important a été trouvé pour l'énantiomère *S*, favorisé par l'entropie. Cependant, cette étude a également montré que des explications stériques ne suffisent pas à expliquer le rôle de l'entropie dans l'énantiosélectivité. En effet, aucune corrélation n'a pu être trouvée entre l'entropie et le volume accessible au substrat dans le site actif pour le 3,3-diméthylbutan-2-ol alors que pour cet alcool aussi, une large part de l'énantiosélectivité est allouée au terme entropique $T\Delta_{R-S}\Delta S^\ddagger$ (Ottoosson et coll., 2002a).

B.III.2.b Influence de la protéine

Le remplacement d'un acide aminé d'une enzyme conduit parfois à des modifications importantes de son activité et de sa sélectivité, voire même à l'apparition de nouvelles activités. Néanmoins, les connaissances actuelles, basées sur la relation structure-fonction, sont insuffisantes pour prédire en totalité les effets des mutations. L'étude thermodynamique des réactions catalysées par les variants d'une enzyme permet parfois de mieux comprendre les nouvelles fonctions apportées par la mutation. Dans ce but, les paramètres thermodynamiques de la réaction d'acylation du 3-méthylbutan-2-ol avec le vinyl octanoate catalysée par la CALB et cinq variants avec des mutations au niveau de la poche stéréospécifique (Thr103Gly, Trp104His, Thr42Val, Ser47Ala et Thr42ValSer47Ala), ont été déterminés (Ottoosson et coll., 2001). Les résultats sont représentés dans le tableau 26.

Tableau 26 : Ratio énantiomérique, E, et ses composantes thermodynamiques pour la résolution cinétique du 3-méthylbutan-2-ol catalysée par la CALB et ses variants. $\Delta\Delta H^\ddagger$ et $\Delta\Delta S^\ddagger$ représentent les variations de $\Delta_{R-S}\Delta H^\ddagger$ et $\Delta_{R-S}\Delta S^\ddagger$ par rapport à l'enzyme sauvage. Les erreurs ont été calculées à partir des erreurs standards de la régression linéaire de $\ln E = f(1/T)$ et E à 296 K a été calculé à partir de la relation linéaire (Ottosson et coll., 2001).

Enzyme	E à 296K	$\Delta_{R-S}\Delta G^\ddagger$ à 296 K [kJ.mol ⁻¹]	$\Delta_{R-S}\Delta H^\ddagger$ [kJ.mol ⁻¹]	$\Delta_{R-S}\Delta S^\ddagger$ [J.mol ⁻¹ K ⁻¹]	$\Delta\Delta H^\ddagger$ [kJ.mol ⁻¹]	$\Delta\Delta S^\ddagger$ [kJ.mol ⁻¹]	T _r [K]
sauvage	970	-16,9	-20,8 ± 0,9	-13,2 ± 3,0	0	0	1570
T103G	2140	-18,9	-31,7 ± 0,1	-43,4 ± 0,4	-10,9	-8,9	730
W104H	150	-12,3	-44,7 ± 1,0	-109,5 ± 3,3	-23,8	-28,5	410
T42V	520	-15,4	-16,7 ± 0,9	-4,5 ± 2,9	+4,1	+2,6	3740
S47A	340	-14,3	-18,3 ± 0,7	-13,4 ± 2,4	+2,6	-0,1	1360
T42VS47A	390	-14,7	-18,1 ± 0,4	-11,5 ± 1,4	+2,8	+0,5	1570

Pour tous ces variants de la CALB, on constate que T_r est supérieure aux températures de l'expérience, et les termes enthalpiques et entropiques se compensent : plus la variation de $\Delta_{R-S}\Delta H^\ddagger$ par rapport à l'enzyme native est importante, plus la variation du terme entropique est importante, et vice-versa. Néanmoins, la compensation n'est pas parfaite d'où les variations de E observées. On peut noter que l'énantiomère R est privilégié par l'enthalpie ($\Delta_{R-S}\Delta H^\ddagger < 0$) et l'énantiomère S par l'entropie ($\Delta_{R-S}\Delta S^\ddagger < 0$).

Des variations importantes des différences d'enthalpie et d'entropie d'activation ont été observées pour les variants Thr103Gly et Trp104His, pour lesquels la variation de E est également la plus importante. La mutation Thr103Gly introduit autour de sérine la séquence consensus G-X-S-X-G, retrouvée pour la plupart des lipases (Patkar et coll., 1997). Les études de modélisation moléculaire suggèrent, que cette mutation conduit à une diminution de la poche stéréospécifique, réduisant la place disponible pour le substituant L de la forme S du 3-méthylbutan-2-ol, et qui se traduit par une augmentation du ΔH^\ddagger_S . Au contraire, la mutation Trp104His conduit à une augmentation de la poche stéréospécifique. Pour ce mutant le terme entropique est très important et en faveur de l'énantiomère S ($\Delta_{R-S}\Delta S^\ddagger < 0$), ce qui se traduit par une diminution de l'énantiosélectivité.

Les variants Thr42Val, Ser47Ala et Thr42ValSer47Ala, ont été construits afin d'améliorer la résolution des halohydrines. Ces mutations ont été suggérées par une étude de modélisation moléculaire, car le remplacement *in silico* de ces résidus permettait d'obtenir des structures plus stables : meilleure énergie d'interaction basée sur l'enthalpie mais ne prenant pas en compte l'entropie (Rotticci et coll., 2001b). L'utilisation de ces mutants pour la résolution des

alcools *vic*-halogénés, le 1-chlorooctan-2-ol et le 1-bromooctan-2-ol, a permis d'améliorer l'énantiosélectivité de la CALB (schéma 20). L'absence de groupement hydroxyle, résultant de ces mutations, semble favoriser le positionnement du substituant M ($-\text{CH}_2-\text{Cl}$ et $-\text{CH}_2-\text{Br}$) dans la poche stéréospécifique, suite à l'absence d'interaction répulsive entre les groupements électronégatifs (halogène et groupement hydroxyle) (Rotticci et coll., 1997 ; Rotticci et coll., 2001b). Ces mêmes variants ont été testés pour la résolution du 3-méthylbutan-2-ol et les paramètres thermodynamiques d'activation ont été déterminés. Pour les trois variants une légère diminution (en valeur absolue) du terme enthalpique a été observée. Le terme entropique ne change pratiquement pas pour les variants Ser47Ala et Thr42ValSer47Ala, par rapport à l'enzyme sauvage. Parmi ces trois mutants, les variations les plus importantes par rapport à l'enzyme sauvage ont été observées pour Thr42Val, alors que l'énantiosélectivité de ce dernier vis-à-vis du 3-méthylbutan-2-ol varie le moins et l'énantiosélectivité vis-à-vis des halohydrines est très proche de celle de l'enzyme sauvage (schéma 20). Ces résultats soulignent le fait que les interprétations basées sur les seules valeurs de E ou sur des modèles théoriques basés sur l'enthalpie seule, sont incomplètes.

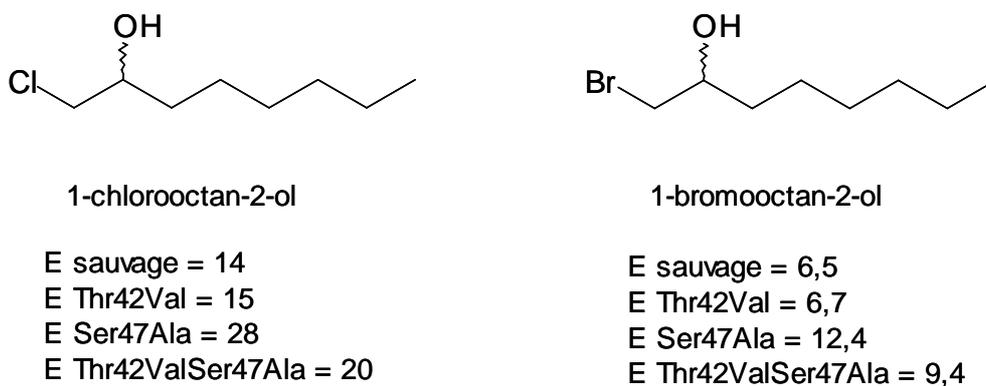


Schéma 20 : Structures des alcools halogénés et les valeurs de E obtenues avec la CALB sauvage et ses variants Thr42Val, Ser47Ala et Thr42ValSer47Ala (d'après Rotticci et coll., 2001b)

B.III.2.c Influence de l'eau

L'influence de l'eau sur la réaction d'acylation du pentan-2-ol avec le méthyl propionate catalysée par la CALB a été réalisée précédemment dans notre laboratoire (Léonard et coll., 2007). Les expériences ont été réalisées à l'aide du réacteur solide/gaz qui permet de contrôler avec précision l'activité thermodynamique de l'eau (a_w) dans le milieu. Les variations de E en

fonction de l' a_w sont représentées sur la figure 62. On peut noter que l'énantiosélectivité de la CALB sauvage envers le pentan-2-ol (courbe en bleu claire) : augmente de a_w proche de 0 à $a_w = 0,1$; stagne entre $a_w=0,1$ et $a_w = 0,3$; diminue de $a_w = 0,3$ à $a_w = 0,5$. L'énantiosélectivité atteint un maximum à $a_w = 0,2$ avec $E = 337 \pm 15$.

L'augmentation de l'énantiosélectivité lorsque a_w passe de 0 à 0,1 peut être expliquée par une molécule d'eau qui se positionnerait au fond de la poche stéréospécifique. En effet, pour $a_w < 0,1$ le coefficient de Hill obtenu est de 0,78 ce qui suggère la fixation d'une molécule d'eau dans la poche stéréospécifique. L'étude par modélisation moléculaire de l'intermédiaire tétraédrique formé avec le pentan-2-ol et avec une molécule d'eau positionnée dans cette poche montre que l'énantiomère *R* (en mode I) n'est pas perturbé par cette molécule d'eau. De plus, la molécule d'eau peut potentiellement former cinq liaisons hydrogène avec la protéine. En revanche, l'énantiomère *S* en mode II, avec son substituant L dans la poche stéréospécifique est fortement perturbé par cette molécule d'eau. La molécule d'eau est également moins bien stabilisée, car elle ne peut participer qu'à trois liaisons hydrogène (Léonard et coll., 2007).

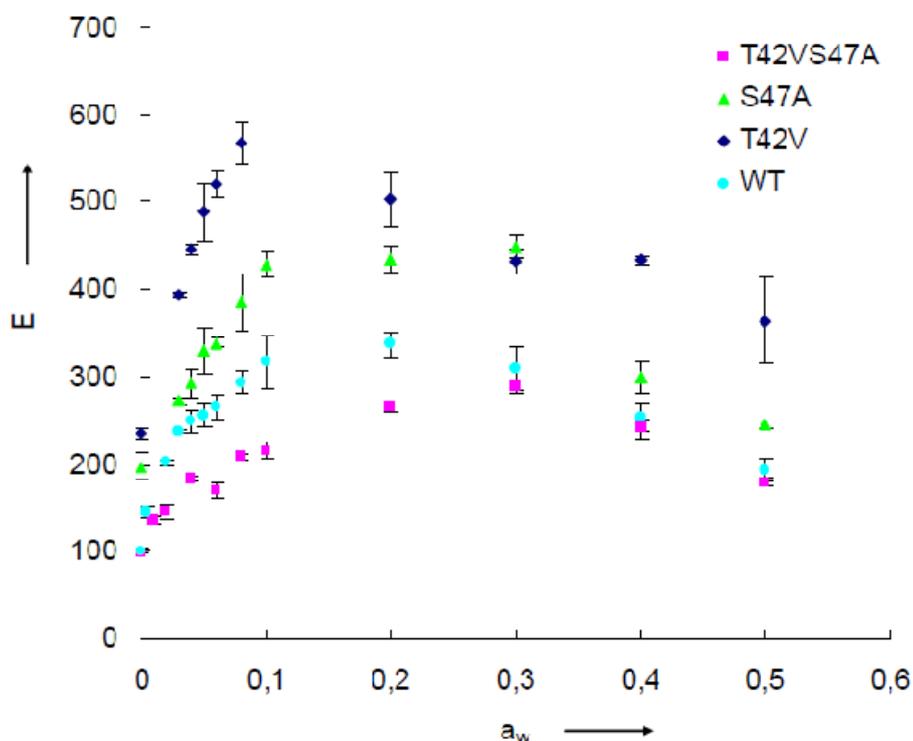


Figure 62 : Influence de l'activité thermodynamique de l'eau (a_w) sur l'énantiosélectivité de la CALB et ses variants pour l'acylation du pentan-2-ol ($a_{\text{pentan-2-ol}} = 0,05$), le donneur d'acyle est le méthyl propionate ($a_{\text{méthyl propionate}} = 0,1$), la température est fixée à 318K (d'après Léonard, 2007).

Afin de mieux comprendre ces résultats les paramètres thermodynamiques ont été déterminés pour chaque point important : à $a_w = 0 ; 0,1 ; 0,3$ et $0,5$ (Léonard et coll., 2007). Les résultats sont reportés tableau 27.

On peut noter que l'énantiomère préféré, le (*R*)-pentan-2-ol, est favorisé par l'enthalpie mais défavorisé par l'entropie (toutes les valeurs de $\Delta_{R-S}\Delta H^\ddagger$ et de $\Delta_{R-S}\Delta S^\ddagger$ sont négatives). De plus, on constate une contribution significative de l'entropie d'activation, le terme entropique $T\Delta_{R-S}\Delta S^\ddagger$ représente 33 à 66% du terme enthalpique $\Delta_{R-S}\Delta H^\ddagger$ dans l'énergie libre d'activation $\Delta_{R-S}\Delta G^\ddagger$. Par ailleurs, on peut remarquer que les variations d'enthalpie et d'entropie d'activation augmentent (en valeur absolue) lorsque a_w s'accroît. Ceci est vrai, même lorsque l'énantiosélectivité diminue. Les auteurs ont expliqué ces augmentations des $\Delta_{R-S}\Delta H^\ddagger$ et $\Delta_{R-S}\Delta S^\ddagger$, par une différence de déplacement de molécules d'eau au site actif, induite par les deux énantiomères lors de la formation de l'état de transition. En effet, l'énantiomère *S* qui doit positionner son substituant *L* au fond de la poche stéréospécifique, doit déplacer plus de molécules d'eau que l'énantiomère *R*, qui positionne son substituant *M* dans cette poche, et le nombre de molécules d'eau à déplacer s'accroît avec l'état d'hydratation de l'enzyme. Pour toutes les conditions d'activité thermodynamique (a_w) testées, l'énantiosélectivité diminue lorsque la température augmente, ce qui signifie que les températures expérimentales (variant de 308 à 363 K) sont en-dessous de la température de racémisation (T_r), ce qui est généralement le cas lors des catalyses enzymatiques.

Tableau 27 : Composantes thermodynamiques du ratio énantiomérique, E, pour l'acylation du pentan-2-ol ($a_{\text{pentan-2-ol}} = 0,05$), avec du méthyl propionate ($a_{\text{méthyl propionate}} = 0,1$) par la CALB à différentes activités thermodynamiques de l'eau (a_w) (Léonard, 2007).

a_w	E à 318K ^[a]	$\Delta_{R-S}\Delta G^\ddagger$ à 318 K [kJ.mol ⁻¹] ^[b]	$\Delta_{R-S}\Delta H^\ddagger$ [kJ.mol ⁻¹] ^[c]	$-T\Delta_{R-S}\Delta S^\ddagger$ [kJ.mol ⁻¹] ^[d]	$\Delta_{R-S}\Delta S^\ddagger$ [J.mol ⁻¹ K ⁻¹] ^[c]	T_r [K]	N ^[e]
0	101 ± 5	-12,2 ± 0,1	-18 ± 1	6 ± 1	-19 ± 4	953	18
0,1	318 ± 75	-15,2 ± 0,7	-30 ± 1	15 ± 1	-48 ± 3	627	18
0,3	309 ± 60	-15,2 ± 0,6	-33 ± 1	18 ± 1	-56 ± 4	595	17
0,5	194 ± 35	-13,9 ± 0,5	-41 ± 1	27 ± 1	-86 ± 3	481	11

^[a] les écarts-types ont été calculés avec 3 valeurs de E et pour un intervalle de confiance de 95% (voir partie Matériels et méthodes).

^[b] les valeurs de $\Delta_{R-S}\Delta G^\ddagger$ ont été calculées à partir de l'équation $\Delta_{R-S}\Delta G^\ddagger = -RT\ln E$ avec $R = 8,315 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ et $T = 318 \text{ K}$. Les écarts-types ont été obtenus à partir des écarts-types sur E.

^[c] les valeurs de $\Delta_{R-S}\Delta H^\ddagger$ et $\Delta_{R-S}\Delta S^\ddagger$ et leurs écarts-types ont été calculés en utilisant la méthode des moindres carrés (voir explications partie Matériels et méthodes), ces écarts-types ont été calculés pour un intervalle de confiance de 99%.

^[d] les valeurs de $T\Delta_{R-S}\Delta S^\ddagger$ ont été calculées à 318 K, les écarts-types sur ces valeurs ont été obtenus à partir des écarts-types sur $\Delta_{R-S}\Delta S^\ddagger$.

^[e] nombre d'observations expérimentales de la grandeur E aux différentes températures étudiées (voir partie Matériels et méthodes).

B.III.3. Etude des paramètres thermodynamiques d'activation pour les réactions catalysées par différentes formes de la CALB obtenues par mutation au niveau de la poche stéréospécifique

Précédemment, l'effet de l'activité thermodynamique de l'eau (a_w) sur la CALB et ses variants possédant des mutations des résidus constituant la poche stéréospécifique, a été étudié (Léonard, 2007). La figure 62 montre que E augmente dans un premier temps avec l' a_w , puis diminue, ceci aussi bien pour l'enzyme sauvage que pour ses variants. Cependant, on constate que la valeur maximale de E est atteinte à des valeurs d' a_w différentes selon les enzymes. De plus, l'amplitude de la variation de E est différente pour chaque variant, la plus forte variation étant obtenue avec Thr42Val.

Par ailleurs, la figure 62 montre des différences significatives de E en absence d'eau ajoutée dans le flux gazeux ($a_w \approx 0$) (Léonard, 2007). Ainsi, une meilleure énantiosélectivité vis-à-vis

du pentan-2-ol a pu être observée pour les mutants simples Thr42Val et Ser47Ala, E égal à 236 et 198 respectivement, par rapport à ce qui était obtenu précédemment pour l'enzyme sauvage dans les mêmes conditions ($E = 100$) (Léonard et coll., 2007). En revanche, le mutant double Thr42ValSer47Ala, présente une valeur de E très proche de celle obtenue pour l'enzyme sauvage.

Ces variations de E ne peuvent pas être attribuées à des modifications de la taille de la poche stéréospécifique, car la thréonine et la valine, d'une part, et la sérine et l'alanine, d'autre part ont des volumes similaires, et leur interconversion donne lieu à des mutations isostériques de la poche. En revanche, on trouve dans la littérature des exemples où la variation de l'énantiosélectivité observée est directement liée à des variations du volume de la poche, provoquées par des mutations ponctuelles ; c'est le cas de la transestérification du 3-méthylbutan-2-ol avec le vinyl octanoate catalysée par le variant Trp104His de la CALB (Tableau2) (Ottosson et coll., 2001). Un autre exemple est l'inversion d'énantiosélectivité lors de la résolution de 1-phényléthanol obtenue avec le variant Trp104Ala, qui peut être directement reliée à une augmentation de la poche stéréospécifique, suite au remplacement du Trp104 constituant le fond de la poche stéréospécifique par des résidus histidine ou alanine moins volumineux (Magnusson et coll., 2005b). Dans le cas de la mutation Trp104Ala, cette augmentation de la poche s'accompagne d'une augmentation de l'efficacité catalytique pour le heptan-4-ol et le nonan-5-ol (k_{cat}/K_M respectivement 270 et 5500 fois plus grands que pour l'enzyme sauvage) (Magnusson et coll., 2005).

Par ailleurs, il a été montré par Magnusson et coll. que l'acylation des alcools secondaires symétriques (propan-2-ol, pentan-3-ol et heptan-4-ol), était réalisée avec une sélectivité identique à celle de l'enzyme sauvage, par les mutants Thr42Val, Ser47Ala et Thr42ValSer47Ala (Magnusson et coll., 2005), ce qui suggère que la spécificité de la CALB vis-à-vis du pentan-2-ol n'est pas altérée par ces mutations.

Dans le but de mieux comprendre l'origine de l'énantiosélectivité obtenue avec les mutants Thr42Val et Ser47Ala, nous avons déterminé les paramètres thermodynamiques d'activation en faisant varier la température. Les droites $\ln E = f(1/T)$ sont représentées sur la figure 63 et les variations d'enthalpie d'activation et d'entropie d'activation, obtenues selon la méthode de moindres carrées, ont été reportées le tableau 28. Les expériences ont été réalisées sans eau ajoutée dans le flux gazeux, par conséquent l'entropie calculée concerne uniquement les variations des degrés de liberté de l'enzyme et du substrat.

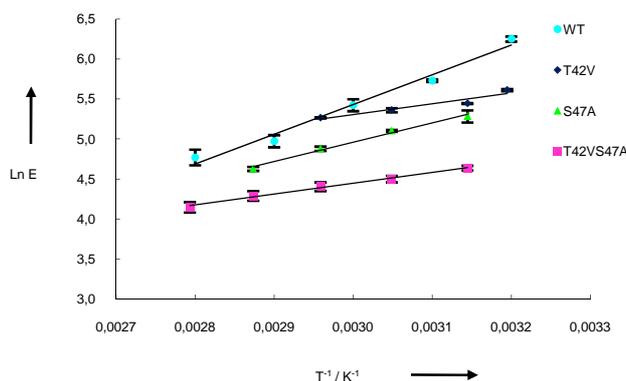


Figure 63 : Régressions linéaires de LnE en fonction de $1/T$, utilisées pour déterminer les paramètres thermodynamiques d'activation des réactions catalysées par la CALB et ses variants Thr42Val, Ser47Ala et Thr42ValSer47Ala.

Tableau 28 : Composantes thermodynamiques du ratio énantiomérique, E, pour l'acylation du pentan-2-ol ($a_{\text{pentan-2-ol}} = 0,05$), avec du méthyl propionate ($a_{\text{méthyl propionate}} = 0,1$) par la CALB et ses variants.

Enzyme	E à 318K ^[a]	$\Delta_{R-S}\Delta G^\ddagger$ à 318 K [kJ.mol ⁻¹] ^[b]	$\Delta_{R-S}\Delta H^\ddagger$ [kJ.mol ⁻¹] ^[c]	$-T\Delta_{R-S}\Delta S^\ddagger$ [kJ.mol ⁻¹] ^[d]	$\Delta_{R-S}\Delta S^\ddagger$ [J.mol ⁻¹ K ⁻¹] ^[e]	N ^[e]
Sauvage ^[f]	101 ± 5	-12,2 ± 0,1	-18 ± 1,2	+6 ± 1,3	-19 ± 4	18
T42V	236 ± 6	-14,4 ± 0,2	-11 ± 0,7	-3 ± 0,5	+11 ± 2	16
S47A	198 ± 19	-14,0 ± 0,6	-20 ± 1,0	+6 ± 0,9	-19 ± 3	11
T42VS47A	98 ± 13	-12,1 ± 0,4	-11 ± 0,7	-1 ± 0,6	+3 ± 2	13

Pour la signification de ^[a]-^[e] voir tableau 3.

^[f] résultats publiés par Léonard et coll., 2007.

D'après ces résultats, il apparaît que l'énantiomère *R* du pentan-2-ol est privilégié par l'enthalpie d'activation ($\Delta_{R-S}\Delta H^\ddagger < 0$) et défavorisé par l'entropie ($\Delta_{R-S}\Delta S^\ddagger < 0$) dans le cas de l'enzyme sauvage et du variant Ser47Ala. Pour les mutants Thr42Val et Thr42ValSer47Ala, l'énantiomère *R* est favorisé à la fois par l'enthalpie et l'entropie.

Les effets des mutations semblent complexes, car les différences d'enthalpie d'activation et d'entropie d'activation entre les deux énantiomères sont simultanément affectées. Ainsi, pour les mutants Thr42Val et Thr42ValSer47Ala, il semble que l'énantiomère *R* soit moins favorisé par l'enthalpie qu'avec l'enzyme sauvage, car des valeurs absolues de $\Delta_{R-S}\Delta H^\ddagger$ plus

faibles ont été obtenues pour ces mutants, mais cette diminution est contrebalancée par l'entropie, également en faveur de la forme *R*. Pour le mutant Ser47Ala, seul le terme enthalpique varie, qui est un peu plus important que pour l'enzyme sauvage ($|\Delta_{R-S}\Delta H^\ddagger| = 20 \text{ kJ.mol}^{-1}$ au lieu de 18).

Dans le but de chercher une explication aux différences d'énantiosélectivité observées avec les mutants simples Thr42Val et Ser47Ala, l'hypothèse suivante a été envisagée : L'augmentation importante de l'énantiosélectivité pourrait provenir de la modification du réseau de liaisons hydrogène formé par les résidus de la poche stéréospécifique, entre eux et avec les résidus du voisinage. En effet, après mutation des positions 42 et 47 pour des résidus hydrophobes, ces derniers ne peuvent plus participer à des liaisons hydrogène avec leurs chaînes latérales. Cette modification pourrait induire des degrés de liberté supplémentaires pour les chaînes latérales et conduire ainsi à une mobilité accrue de ces résidus, voire même du substrat. Une mobilité plus importante dans le cas des mutants en comparaison de l'enzyme sauvage pourrait résulter en une diminution du volume disponible de la poche stéréospécifique, perturbant la fixation de l'énantiomère *S* et augmentant la valeur de *E*.

Afin de tester notre hypothèse, selon laquelle les mutations des résidus situés dans la poche stéréospécifique conduiraient à une diminution du volume de cette poche, par augmentation de la mobilité des résidus, une étude par modélisation moléculaire a été envisagée. Inspiré de travaux d'Ottosson et coll., nous avons réalisé des calculs de dynamique moléculaire. Ainsi, après un apport initial d'énergie cinétique sous forme de chauffage à 300 ou 400 K, l'enzyme sauvage et ses variants Thr42Val, Ser47Ala et Thr42ValSer47Ala ont été libres d'évoluer pendant 100 ps. Les conformations sauvegardées, à intervalles de temps réguliers, au cours du calcul ont été ensuite superposés, et les volumes totaux occupés par les chaînes latérales des résidus en position 42, 47 et 104 ont été calculés. Malheureusement, les premiers essais n'ont pas permis de relier les volumes balayés par ces résidus avec les variations d'entropie mesurées expérimentalement.

B.III.4. Etude des paramètres thermodynamiques d'activation pour les réactions catalysées par différentes formes de la CALB obtenues par mutation du canal d'accès au site actif

Nous avons vu précédemment, que l'accès au site actif de la CALB était contrôlé par quatre résidus hydrophobes, Ile189, Leu278, Ala282 et Ile285, constituant un tunnel court. Les mutants Ile189Ala, Leu278Val et Ala282Leu ont été produits par mutagenèse dirigée et testés pour la résolution d'alcools secondaires chiraux linéaires par réaction d'acylation avec le méthyl propionate. Les résultats obtenus montrent un effet significatif de ces mutations sur l'énantiosélectivité. Nous avons vu que l'interprétation de ces effets était néanmoins complexe, car ils dépendent à la fois de la taille des substituants de l'alcool et du mutant testé. Notre hypothèse selon laquelle ces résidus hydrophobe de l'entrée de la cavité affecteraient préférentiellement l'énantiomère *S*, ne permet pas d'expliquer tous nos résultats. Nous avons évoqué la possibilité que ces mutations puissent également affecter la fixation du substrat au site actif. En effet, ces résidus ne sont pas très éloignés du site actif. Afin de vérifier si les mutations perturbaient l'état de transition, nous avons décidé d'étudier les paramètres thermodynamiques d'activation. Comme dans le cas des mutants de la poche stéréospécifique, nous avons choisi de déterminer ces paramètres pour la réaction d'acylation du pentan-2-ol avec le méthyl propionate, catalysée par les variants Ile189Ala, Leu278Val et Ala282Leu de la CALB. Les ratios énantiomériques ont été déterminés à six températures (40, 45, 55, 65, 75 et 85°C), à l'aide du réacteur solide gaz, à une activité thermodynamique de l'eau proche de 0. Ensuite, les différences d'enthalpie d'activation et d'entropie d'activation ont été calculées selon la méthode utilisée précédemment (figure 64). Les résultats obtenus ont été regroupés dans le tableau 29.

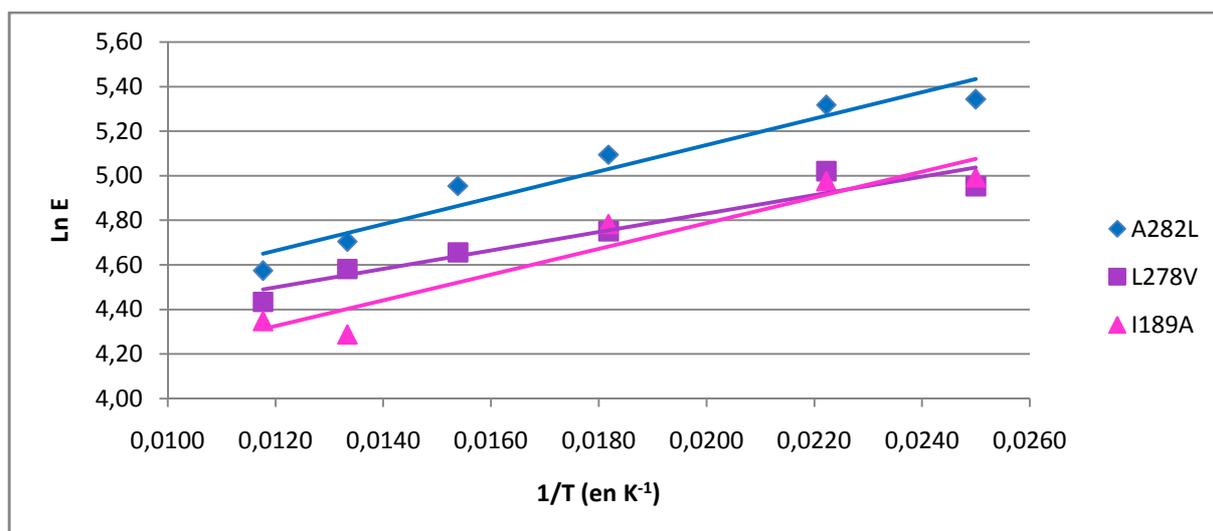


Figure 64 : Régression linéaire de LnE en fonction de 1/T, utilisée pour déterminer les composantes thermodynamiques des variants Ile189Ala, Leu278Val et Ala282Leu de la CALB.

Tableau 29 : Ratio énantiomérique, E, et ses composantes thermodynamiques pour l'acylation du pentan-2-ol ($a_{\text{pentan-2-ol}} = 0,05$), avec du méthyl propionate ($a_{\text{méthyl propionate}} = 0,1$) catalysée par la CALB et ses variants.

Enzyme	E à 318K ^[a]	$\Delta_{R-S}\Delta G^\ddagger$ à 318 K [kJ.mol ⁻¹] ^[b]	$\Delta_{R-S}\Delta H^\ddagger$ [kJ.mol ⁻¹] ^[c]	$-T\Delta_{R-S}\Delta S^\ddagger$ [kJ.mol ⁻¹] ^[d]	$\Delta_{R-S}\Delta S^\ddagger$ [J.mol ⁻¹ K ⁻¹] ^[c]	T _r [K]	N ^[e]
Sauvage ^[f]	101±5	-12,2 ± 0,1	-18 ± 1,2	+6 ± 1,3	-19 ± 4	953	18
A282L	203,7 ± 4,1	-14,1 ± 0,3	-16,7 ± 0,3	+2,8 ± 0,2	-8,7 ± 0,8	1929	24
L278V	151,4 ± 0,5	-13,3 ± 0,1	-11,6 ± 0,4	-1,5 ± 0,4	+4,6 ± 1,2	-2494	24
I189A	144,6 ± 0,8	-13,2 ± 0,1	-15,8 ± 0,7	+2,8 ± 0,6	-8,8 ± 2,0	1806	20

^[a] les écarts-types ont été calculés avec 4 valeurs de E et pour un intervalle de confiance de 95% (voir partie Matériels et méthodes).

Pour la signification de ^[b] - ^[e] voir tableau 3.

^[f] résultats publiés par Léonard et coll., 2007.

Ces résultats montrent que le remplacement d'un acide aminé situé à l'entrée du site actif induit des modifications des paramètres thermodynamiques d'activation de la réaction d'acylation du pentan-2-ol. Ainsi, pour le variant Leu278Val on observe une diminution importante de la valeur absolue du terme enthalpique par rapport à l'enzyme sauvage ($\Delta_{R-S}\Delta H^\ddagger$ de -11,6 kJ.mol⁻¹ au lieu de -18 kJ.mol⁻¹ pour le sauvage), mais ce terme reste toujours en faveur de l'énantiomère R. De plus, on constate que $\Delta_{R-S}\Delta S^\ddagger$ devient positif, favorisant également l'énantiomère R. La diminution de l'encombrement en position 278 conduirait

donc à une moins bonne fixation de cet énantiomère, mais avec une liberté de mouvement du substituant L plus grande. Nous pensons que cette mutation favorise à la fois l'énantiomère *S*, en facilitant son entrée au site actif (avec le substituant L dirigé en avant), et l'énantiomère *R*, en lui laissant plus d'espace et de liberté de mouvement lors de la formation de l'état de transition. Ceci expliquerait pourquoi nous n'avons pas observé de variation de l'énantiosélectivité pour la résolution du pentan-2-ol, lorsqu'on utilise le variant Leu278Val à la place de l'enzyme sauvage ($E = 100$ pour l'enzyme sauvage et 98 pour Leu278Val).

Pour les variants Ile189Ala et Ala282Leu, similairement aux résultats obtenus avec l'enzyme sauvage, l'énantiomère *R* est favorisé par l'enthalpie et l'énantiomère *S* par l'entropie. On peut noter une variation légère du terme enthalpique pour le variant Ile189Ala, mais pour le variant Ala282Leu, en considérant les erreurs, la diminution est négligeable. Pour ces deux variants on observe une diminution de l'écart entre les entropies d'activation des énantiomères *R* et *S*, par rapport à ce qui était mesuré pour l'enzyme sauvage : $\Delta_{R-S}\Delta S^\ddagger$ est de -8,7 et -8,8 J.mol⁻¹K⁻¹ pour les mutants et -19 J.mol⁻¹K⁻¹ pour l'enzyme sauvage. Ces résultats sont difficiles à interpréter car ils correspondent à des différences des variations des paramètres thermodynamiques d'activation entre les deux énantiomères, ne permettant pas de savoir lequel des deux énantiomères est affecté.

En résumé, nous avons montré que les modifications des résidus du canal d'accès au site actif pouvaient également influencer l'état de transition formé lors de la résolution du pentan-2-ol, la modification la plus importante étant obtenue pour le mutant Leu278Val, pour lequel l'énantiomère *R* est favorisé à la fois par l'enthalpie et l'entropie. Nos résultats sont en accord avec ceux de la littérature. En effet, lors d'une étude de modélisation moléculaire, Hæffner et coll. ont montré que le butan-2-ol, alcool encore plus petit que le pentan-2-ol, pouvait interagir avec les résidus hydrophobes situés à l'entrée de la cavité (Hæffner et coll., 1998). Ils ont déterminé les résidus intervenant dans la fixation des alcools secondaires en mesurant la différence d'énergie d'interaction entre chaque résidu et l'énantiomère *R* en mode I, d'une part, et l'énantiomère *S* en mode II, d'autre part. Ainsi, ils ont trouvé que la différence d'énergie d'interaction entre les deux énantiomères du butan-2-ol était supérieure à 0,1 kcal.mol⁻¹ pour les résidus Ile189 et Ala282 et supérieure à 0,3 kcal.mol⁻¹ pour le résidu Ile285. Bien qu'ils n'aient pas noté de différence d'énergie d'interaction mesurée entre le butan-2-ol et le résidu Leu278, ce dernier semble interagir avec le 3-méthylbutan-2-ol et le 3,3-diméthylbutan-2-ol (différence d'énergie d'interaction entre les deux énantiomères > 0,3 kcal.mol⁻¹ et > 0,5 kcal.mol⁻¹ respectivement) (Hæffner et coll., 1998).

Par extrapolation, les effets de ces mutations sur l'état de transition devront être plus importants pour les alcools présentant un substituant L plus long que le groupe propyle (substituant L du pentan-2-ol).

B.III.5. Conclusions et perspectives

Dans cette partie nous avons étudié l'influence des modifications des résidus de la poche stéréospécifique, d'une part, et du canal d'accès au site actif, d'autre part, sur les paramètres thermodynamiques d'activation de la résolution du pentan-2-ol, catalysée par la CALB. Nous avons montré que le remplacement d'un ou deux résidus conduit à des variations importantes des différences d'enthalpie et d'entropie d'activation. Pour tous les variants étudiés, l'énantiomère *R* du pentan-2-ol est favorisé par l'enthalpie. Pour les variants Thr42Val, Thr42ValSer47Ala et Leu278Val, on observe une inversion du signe du terme entropique $\Delta_{R-S}\Delta S^\ddagger$, ce qui signifie que pour ces variants l'énantiomère *R* est également favorisé par l'entropie. Dans le cas des mutations des résidus de la poche stéréospécifique (Thr42Val ; Ser47Ala et Thr42ValSer47Ala), nous supposons, que les modifications des paramètres thermodynamiques sont liées à des modifications du réseau de liaisons hydrogène formés entre les résidus, induisant une liberté de mouvement accrue des chaînes latérales de ces résidus. Par ailleurs, nos résultats suggèrent que la modification d'un résidu du canal d'accès au site actif (Ile189Ala ; Leu278Val et Ala282Leu), perturbe également l'état de transition formé avec le pentan-2-ol, et ces résidus devront également interagir avec des substrats plus longs. Néanmoins, ces résultats restent difficiles à interpréter, car ils correspondent à des différences de variations des paramètres thermodynamiques d'activation entre les deux énantiomères, et ne permettant pas de savoir lequel de ces deux énantiomères est affecté.

Conformément aux études antérieures réalisées avec la CALB, nous avons montré que l'entropie jouait un rôle important dans l'énantiosélectivité. Par conséquent, on ne peut pas l'ignorer lors des études par modélisation moléculaire, comme nous l'avons fait précédemment. Par exemple, l'étude par modélisation du variant Trp104His, présentant un terme enthalpique important (tableau 2), suggérerait une énantiosélectivité améliorée par rapport à l'enzyme sauvage, si l'entropie n'était pas prise en compte. Or, pour ce mutant le terme enthalpique est plus que compensé par le terme entropique en faveur de l'énantiomère *S*, résultant en une diminution importante de l'énantiosélectivité (Ottosson et coll., 2001).

Depuis une dizaine d'année, de plus en plus d'études par modélisation moléculaire prennent en compte (au moins partiellement) l'entropie dans les calculs. Ainsi, la régiosélectivité de la subtilisine lors de la transestérification du saccharose a pu être expliquée par modélisation moléculaire. L'intermédiaire tétraédrique formé avec le saccharose via l'OH en position 1' (figure 65), est de 4-5 kcal.mol⁻¹ plus stable que les intermédiaires formés avec les OH en positions 6 ou 6', lorsque l'entropie est également prise en compte. La différence n'est que de 0,7 kcal.mol⁻¹ lorsqu'uniquement l'enthalpie d'interaction est calculée (Fuentes et coll., 2002).

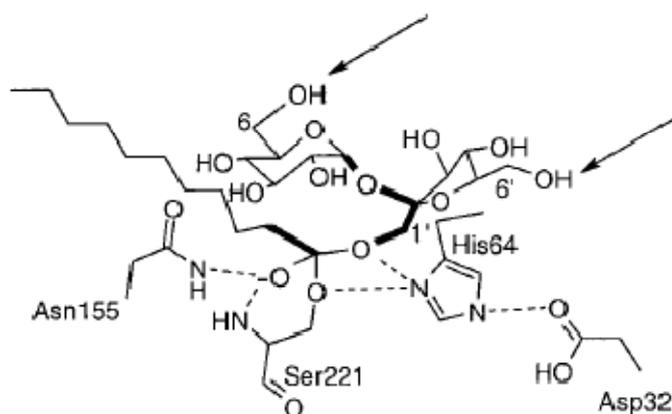


Figure 65 : Représentation schématique du site actif de la subtilisine (triade catalytique et trou oxyanionique) et des centres réactionnels du saccharose (sites 6OH, 6'OH et 1'OH) (Fuentes et coll., 2002).

De plus, des études cherchant à relier l'entropie à des explications structurales se sont développées. Ainsi, Bocola et coll. ont utilisé des structures cristallographiques de la CALB obtenues avec les homologues phosphorylés de la (\pm)-1-phényléthylamine (schéma 38) (Bocola et coll., 2003). Avec l'énantiomère *S* du composé phosphorylé, la partie correspondant à l'amine est moins bien résolue, suggérant que ce dernier peut adopter plusieurs conformations. Les auteurs ont confirmé cette hypothèse à l'aide d'une étude par dynamique moléculaire. Pour l'énantiomère *R*, la différence de densité électronique suggère l'existence d'une structure bien définie. De plus, pour cet énantiomère, la surface du substrat coïncide avec celle de l'enzyme, attestant une très bonne complémentarité de forme entre les deux, et peu de variations de la position de l'amine ont été observé lors de l'étude par dynamique moléculaire (Bocola et coll., 2003).

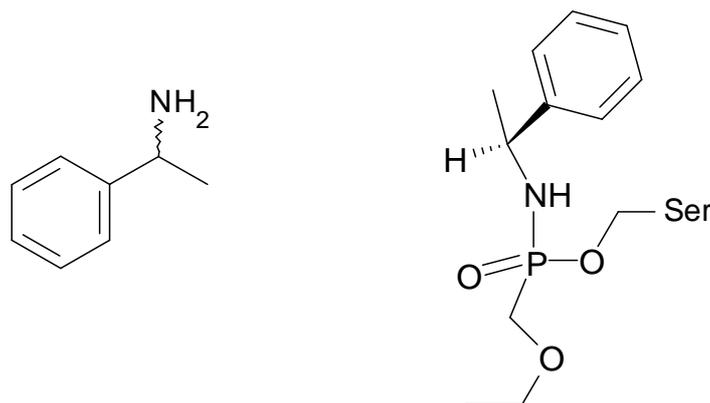


Schéma 38 : Structure du (±)-1-phényléthylamine et de son homologues phosphorylés *R* lié par liaison covalente à la Ser105 (d'après Bocola et coll., 2003).

Par ailleurs, Ottosson et coll. lors d'une étude par modélisation moléculaire, ont réussi à relier le volume accessible au substrat à la variation d'entropie (Ottosson et coll., 2002a). Cette étude a révélé que l'énantiomère favorisé par l'entropie (*R* pour l'hexan-3-ol, *S* pour le butan-2-ol et ses homologues) avait généralement accès à un plus grand volume au sein du site actif que l'autre énantiomère. Cependant, cette corrélation n'a pas pu être montrée dans le cas de 3,3-diméthylbutan-2-ol. Les auteurs pensent que des calculs supplémentaires (dynamique plus longue et d'autres structures de départ pour l'étude systématique) sont nécessaires pour obtenir des résultats cohérents (Ottosson et coll., 2002a).

Nous nous sommes inspirés de ces études pour essayer d'expliquer nos résultats obtenus avec les mutants de la poche stéréospécifique (Thr42Val, Ser47Ala et Thr42ValSer47Ala). Nous avons utilisé la dynamique moléculaire pour montrer que ces mutations impliquaient la liberté de mouvement accrue de ces résidus. Malheureusement nos premiers essais n'ont pas été concluants. Nous pourrions envisager d'allonger les temps de calcul ou modifier d'autres paramètres. Par ailleurs, il se peut que la mobilité du substrat (pentan-2-ol ici) soit également affectée. On pourra alors étudier le volume accessible au substrat selon les méthodes décrites par Ottosson et coll. (2002). De la même manière, nous pourrions tenter d'expliquer les variations d'entropies observés avec les variants de la CALB avec des mutations du canal d'accès au site actif (Ile189Ala ; Leu278Val et Ala282Leu). Ainsi, nous pourrions déterminer les volumes accessibles pour les alcools secondaires linéaires testés (butan-2-ol, pentan-2-ol, hexan-2-ol, heptan-2-ol, octan-2-ol, hexan-3-ol, heptan-3-ol et octan-3-ol) et regarder si ces volumes varient lorsque les variants de la CALB sont utilisés.

B.IV. Conclusion du chapitre B

Dans cette partie, nous avons étudié différents paramètres pouvant influencer l'énantiosélectivité de la CALB.

Dans un premier temps, nous avons montré que les résidus hydrophobes formant le canal d'accès du substrat au site actif (Ile189, Leu278 et Ala282), jouaient un rôle significatif dans l'énantiosélectivité de la CALB vis-à-vis des alcools secondaires. Notre hypothèse selon laquelle ces résidus hydrophobes de l'entrée de la cavité affecteraient préférentiellement l'énantiomère *S*, ne permet d'expliquer que partiellement nos résultats obtenues avec les variants Ile189Ala ; Leu278Val et Ala282Leu. Dans le cas du pentan-2-ol, nous avons montré que ces mutations, en plus de perturber l'accès de cet alcool au site actif, modifiaient également les paramètres thermodynamiques d'activation de son acylation. Nous supposons que pour les alcools avec des substituants *L* plus longs que le groupement propyle (substituant *L* du pentan-2-ol) les paramètres thermodynamiques d'activation de leurs acylations devront également être modifiés.

Par ailleurs, nous avons montré que la structure de la partie alkoxy du donneur d'acyle pouvait modifier la valeur de *E*. L'augmentation la plus importante de *E* a été observée pour le (±)-1-méthylpentyl propionate : cet ester possède une chaîne alkyle dont le substituant *L* a été rallongé d'un atome de carbone, par rapport à celui du pentan-2-ol, et le substituant *M* est resté inchangé. L'étude avec les 1-méthylpentyl propionate énantiopurs a montré que les deux formes influencent l'énantiosélectivité de la CALB de façon opposée : pour la forme *R*, *E* présente une augmentation plus importante que pour le mélange racémique, alors que pour la forme *S* une diminution de *E* par rapport au mélange racémique est observée. L'influence de la forme *S* est plus marquée que celle de la forme *R*.

Enfin, il est apparu que le remplacement isostérique d'un ou deux résidus polaires situés dans la poche énantiosélective par des résidus hydrophobes pouvait également influencer l'énantiosélectivité de la CALB. Nous avons montré que les paramètres thermodynamiques d'activation ($\Delta_{R-S}\Delta H^\ddagger$ et $\Delta_{R-S}\Delta S^\ddagger$) d'acylation du pentan-2-ol catalysée par ces variants (Thr42Val ; Ser47Ala et Thr42ValSer47Ala) sont différents de ceux obtenus avec l'enzyme sauvage. Pour ces variants avec des mutations des résidus de la poche énantiosélective, nous supposons, que les modifications des paramètres thermodynamiques sont liées à des modifications du réseau de liaisons hydrogène formé entre les résidus de la poche, induisant

une liberté de mouvement accrue des chaînes latérales de ces résidus, et éventuellement du substrat.

Au vu de ces résultats, bien que l'interprétation de certains résultats soit difficile, nous pouvons dire que l'énantiosélectivité de la CALB est un phénomène complexe. Elle ne peut pas être simplement expliquée par une différence d'enthalpie d'activation mesurée entre les états de transition formés avec les énantiomères *R* et *S* de l'alcool à résoudre. Nous avons montré que le terme entropique ne peut pas être négligé. L'énantiosélectivité dépend également des composés (substrat ou autre composé chimique présent dans le milieu lors de la réaction) rencontrés par l'enzyme avant la fixation du substrat, de l'orientation de ces composées au sein du site actif et du chemin parcouru par le substrat jusqu'au site actif. L'établissement des nouveaux modèles structuraux basés sur des études de modélisation devront tenir compte de tous ces paramètres.

Bien que nos résultats aient été obtenus en absence du solvant, il a été montré que les solvants pouvaient également influencer l'énantiosélectivité. Notamment l'effet de l'eau a été étudié dans notre laboratoire (Léonard et coll., 2007 ; 2009). Ainsi, l'énantiosélectivité de la CALB augmente à faible activité thermodynamique de l'eau, puis diminue lorsque pour des a_w supérieures à 0,3. Dans la prochaine partie, nous tenterons d'expliquer ces phénomènes.

Chapitre C. Etude de l'hydratation de la lipase B de *Candida antarctica* en fonction de l' a_w et relation avec l'effet de l'eau sur l'activité et la sélectivité de l'enzyme

Depuis une quinzaine d'années, le réacteur solide/gaz a été utilisé dans notre laboratoire pour étudier les réactions catalysées par la CALB. A l'aide de ce réacteur, l'influence de l'eau sur plusieurs types de réactions catalysées par la CALB a été prospectée. Ceci a pu être réalisé grâce au contrôle précis de l'activité thermodynamique de l'eau (a_w) dans le milieu réactionnel gazeux. Les résultats ainsi obtenus ont été présentés précédemment (cf. étude bibliographique § II.3.b. et III.1.d. et résultats et discussion §B.III.2.c) et à l'issue de ces travaux il est apparu que l'eau avait un rôle très complexe, et pouvait agir simultanément comme un lubrifiant, en modifiant la flexibilité de l'enzyme et accroître ainsi son activité, comme un inhibiteur compétitif et énantiosélectif, comme un substrat compétitif, et en interagissant avec tous les réactifs, l'enzyme libre, l'état de transition et les produits par des mécanismes de solvation (Graber et coll., 2003 a ; 2003 b ; Létisse et coll., 2003 ; Léonard et coll., 2007).

Dans nos différentes études réalisées en réacteur solide/gaz, tous ces effets variés de l'eau ont été évalués en fonction de l' a_w dans le milieu réactionnel, mais n'ont pas pu être reliés à l'état d'hydratation réel de la CALB. Ceci est regrettable, car une telle connaissance est essentielle pour acquérir une compréhension fondamentale de l'effet de l'eau sur la catalyse enzymatique. Ainsi, la connaissance de l'état d'hydratation de l'enzyme permet de répondre aux questions suivantes : A quelle a_w pouvons-nous considérer que les groupes chargés de la protéine sont entourés par des amas de molécules d'eau? A partir de quelle a_w peut-on considérer que la surface de l'enzyme est recouverte d'une monocouche d'eau stable? A partir de quelle a_w le substrat doit-il déplacer les molécules d'eau adsorbées sur l'enzyme afin d'interagir avec elle? La réponse ne dépend pas seulement de l' a_w permettant la formation d'une monocouche d'eau, mais aussi de la capacité du substrat à rivaliser avec l'eau pour s'adsorber sur l'enzyme immobilisée.

Récemment, l'hydratation de la CALB pure, déglycosylée et dessalée, a été étudiée par isotherme de sorption de l'eau et modélisation moléculaire. Il a été montré que l'hydratation se produit en deux phases. Pour des a_w en dessous de 0,5, l'eau se lie d'abord à des sites de fixation bien définis de la surface de la protéine, et puis au-dessus de 0,5, peu à peu un réseau de molécules d'eau couvrant la surface est formé (Branco et coll., 2009).

Néanmoins, ces résultats n'ont pas permis d'expliquer la cinétique de réaction enzymatique, mesurée dans le réacteur solide/gaz, avec une préparation de la CALB immobilisée sur Chromosorb silanisé.

Dans cette partie, nous avons essayé de répondre aux différentes questions posées ci-dessus, en étudiant l'adsorption des vapeurs d'eau et l'effet de la présence d'eau sur l'adsorption des composés polaires et apolaires, ainsi que sur l'adsorption des substrats sur l'enzyme. En effet, il y a eu très peu d'études expérimentales portant à la fois sur l'adsorption de l'eau et des substrats sur des enzymes (Hidaka et Matsumoto, 2000 ; Dimoula et coll., 2009), bien que ces phénomènes d'adsorption compétitifs puissent constituer un moyen très pertinent pour mieux comprendre la cinétique et la spécificité enzymatique.

Pour réaliser ces études d'adsorption nous avons utilisé deux techniques : les isothermes d'adsorption et la chromatographie en phase gazeuse inverse (IGC), qui est une technique d'adsorption de vapeur dynamique et très précise, permettant une caractérisation des propriétés de surface. Afin de pouvoir relier nos résultats aux cinétiques enzymatiques obtenues en réacteur solide/gaz sous flux continu, nous avons choisi d'étudier l'état d'hydratation de la même préparation enzymatique : la CALB glycosylée et immobilisée sur Chromosorb silanisé. Ce support poreux de diatomite permet d'avoir un débit uniforme du gaz vecteur et des vapeurs de sonde à travers le lit enzymatique fixe, et un meilleur accès du gaz à la surface de l'enzyme. En outre, il évite la surpression importante en tête de la colonne contenant l'échantillon enzymatique.

Dans un premier temps, les isothermes de sorption de la CALB immobilisée et du support seul ont été obtenues par gravimétrie (DVS). L' a_w nécessaire à la formation d'une monocouche d'eau sur la surface de l'enzyme a été déterminée en utilisant le modèle Brunauer-Emmett-Teller (BET) (Brunauer et coll., 1938) et la quantité d'eau fixée par mole d'enzyme a été calculée. Dans un deuxième temps l'adsorption des sondes gazeuses polaires et apolaires sur l'enzyme immobilisée a été étudiée en IGC à différentes a_w . A partir de ces

résultats, les humidités permettant le recouvrement des sites polaires et hydrophobes ont pu être déterminées. Pour finir, l'adsorption de deux alcools précédemment utilisés, le pentan-2-ol et l'hexan-3-ol, sur la CALB immobilisée, a été examinée en présence d'eau en quantité variable. Ainsi, les zones de compétition entre l'eau et alcools ont pu être déterminées. Par ailleurs, tout au long de ce travail, nous avons cherché de relier nos résultats à l'activité et la sélectivité de la CALB mesurées à l'aide du réacteur solide/gaz. Avant de vous présenter les résultats, quelques principes permettant leur interprétation ont été développés.

C.I. Théorie

L'IGC consiste à mesurer le temps de rétention des sondes gazeuses, véhiculées par un gaz vecteur (de l'hélium dans notre cas), dont les propriétés sont connues, après qu'elles ont traversé une colonne remplie avec le solide d'intérêt, qui est la CALB immobilisée dans notre cas. Le temps de rétention de ces sondes est lié à l'affinité de ces dernières pour le support. La mesure des variations du temps de rétention en fonction de la nature de la molécule sonde, de la température de la colonne et de l'humidité relative ambiante, permet accéder à des nombreuses propriétés physiques des solides étudiés. Le principe et le fonctionnement général de l'appareil étant présentés dans l'étude bibliographique, nous nous focaliserons ici sur la théorie utilisée pour le traitement de nos résultats.

Dans la présente étude, l'IGC a été utilisée en régime de dilution infinie, ce qui signifie qu'une très petite quantité de sonde gazeuse a été injectée dans le flux de gaz vecteur traversant la colonne. Dans ces conditions, la surface couverte par l'adsorbable est très faible. Le volume de rétention de la sonde est donc indépendant de sa concentration et le résultat est une isotherme d'adsorption linéaire, pouvant être décrite par la loi de Henry.

Le volume de rétention spécifique (V_g) des sondes gazeuses, normalisé à une température de 273,15 K et pour 1g d'enzyme immobilisée a été calculée en utilisant l'équation 23, où t_R est le temps de rétention de la sonde en minutes, t_0 est le temps mort en minutes obtenu avec le méthane, F le débit du gaz vecteur en $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, m la masse de la CALB immobilisée en g et T la température de la colonne en K. Le facteur de compressibilité James-Martin, j , a été calculé en utilisant l'équation 24, où P_i et P_0 sont les pressions à l'entrée et à la sortie de la colonne, respectivement.

$$V_g = j \cdot \frac{t_R - t_0}{m} \cdot \frac{F \times 273,15}{T} \quad (\text{Eq. 23})$$

$$j = \frac{3}{2} \cdot \frac{(P_i/P_0)^2 - 1}{(P_i/P_0)^3 - 1} \quad (\text{Eq. 24})$$

Le volume de rétention spécifique (V_g) des sondes gazeuses peut être relié à l'énergie libre d'adsorption ΔG_{ads} selon l'équation 36:

$$\Delta G_{ads}^d = -RT \ln V_g + C \quad (\text{Eq. 36})$$

où C est une constante dépendant du choix de l'état de référence de l'adsorbable et également de la surface totale de l'adsorbant accessible à la sonde. Dans la littérature, deux états pris arbitrairement comme référence peuvent être rencontrés, celui de Kemball et Rideal, et de de Boer (Kemball et Rideal, 1946 ; de Boer et Kruyer, 1952). En pratique, on s'affranchit très souvent de la constante C (Papirer et Brandlé, 1998). En effet, les résultats expérimentaux ont permis de montrer qu'au sein d'une famille d'homologues chimiques, le logarithme du volume de rétention net est une fonction linéaire du nombre d'atomes de carbone du soluté lorsque ce dernier est supérieur ou égal à 2 (Derminot, 1981).

ΔG_{ads} prend en compte deux types d'interactions: les interactions dispersives (correspondant aux forces de London) et les interactions spécifiques, qui consistent principalement en des interactions acide-base de Lewis, les interactions de Debye et Keesom pouvant être négligées :

$$\Delta G_{ads} = \Delta G_{ads}^d + \Delta G_{ads}^{sp} \quad (\text{Eq. 37})$$

Afin d'obtenir les composantes dispersive et spécifique de l'énergie libre d'adsorption ΔG_{ads} , différentes molécules sondes apolaires et polaires en phase vapeur sont respectivement injectées et leur volume de rétention spécifique V_g déterminé. L'injection d'une série de sondes de type alcane linéaire permet d'obtenir la droite des alcanes, dont la pente donne la composante dispersive de l'énergie de surface du solide (γ_S^d), qui est un paramètre intrinsèque du solide, permettant de calculer la composante dispersive de l'énergie libre d'adsorption, ΔG_{ads}^d , de n'importe quelle sonde.

A partir de la droite des alcanes, par simple différence entre l'énergie totale obtenue par injection de la sonde polaire et celle liée aux interactions dispersives échangées entre la

surface du solide et la molécule sonde apolaire, nous pouvons estimer la composante spécifique de l'énergie libre d'adsorption (figure 66).

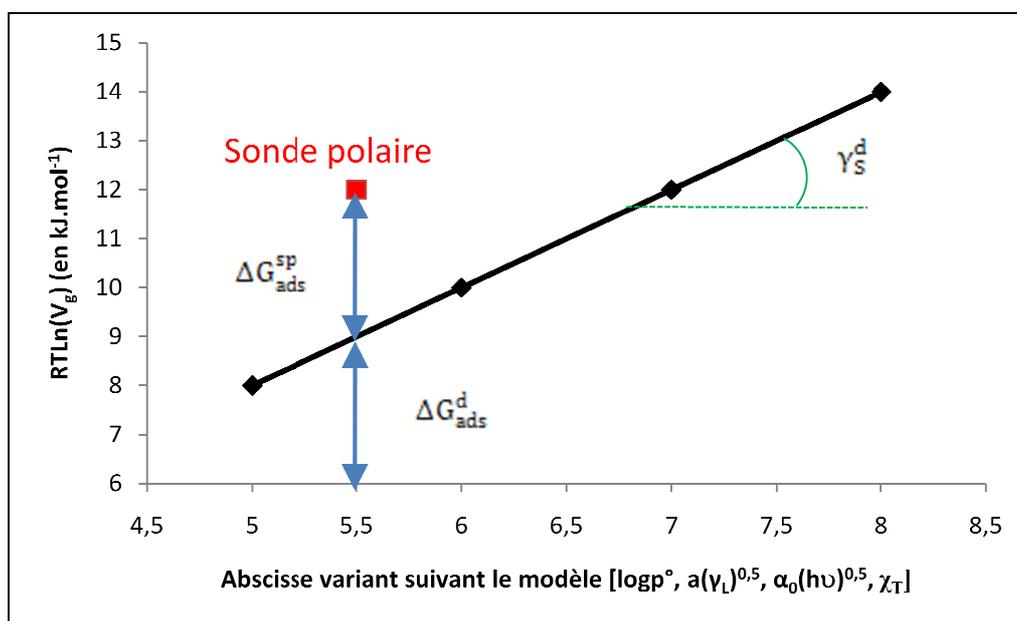


Figure 66 : Détermination par IGC de la composante dispersive de l'énergie de surface du solide (CALB immobilisée) et de la composante spécifique de l'énergie libre d'adsorption des sondes polaires sur le solide.

En fonction du paramètre choisi pour décrire la molécule sonde, il existe plusieurs modèles permettant l'accès à (Comté, 2004). Quel que soit le modèle utilisé, la molécule sonde polaire est assimilée à une molécule hypothétique d'alcane qui échangerait les mêmes interactions dispersives :

- **Modèle Saint Fluor et Papirer**

Cette méthode propose de caractériser les molécules sondes en utilisant le logarithme de leurs pressions de vapeur saturante ($\log(p^0)$) à la température de la colonne contenant le solide étudié. Le gros avantage de cette méthode vient de la facilité à accéder aux valeurs de pressions de vapeur saturante disponible dans la littérature (Saint Fluor et Papirer, 1983). Mais cette méthode semble inappropriée pour comparer des sondes polaires, car les interactions spécifiques diminueraient les pressions de vapeur saturante des molécules polaires, ce qui entraînerait un décalage de ces sondes vers les faibles $\log(p^0)$ sur l'axe des abscisses (Brendlé, 1997).

- Modèle de Schultz

Cette méthode utilise la grandeur $a(\gamma_L^d)^{0,5}$ comme échelle de comparaison où a et γ_L^d représentent respectivement l'aire de la molécule adsorbée et la composante dispersive de l'énergie de surface de la sonde injectée à l'état liquide (Schultz et coll., 1987 ; Hamieh et Schultz, 1996). L'inconvénient de cette méthode est d'accéder à l'aire de la molécule adsorbée, a , généralement approximée à l'aide d'un modèle, qui tient compte de la masse molaire et de la forme de la sonde. Nous avons vu précédemment que dans le cas d'un arrangement hexagonal compact, a pouvait être calculé selon l'équation 21 (Emmet et Brunauer, 1937 ; Rouquerol et coll., 2003).

- Modèle de Donnet

La méthode proposée par Donnet est basée sur la polarisabilité des molécules sondes, c'est-à-dire la capacité de ces molécules de se polariser pour créer un dipôle permanent (Donnet et coll., 1991). La difficulté de cette méthode est d'accéder aux valeurs caractéristiques des molécules sondes utilisées. Elles ne sont disponibles que pour les plus courantes.

- Modèle de Brendlé

Brendlé et al ont proposé d'utiliser le paramètre χ_T , qui correspond au nombre (entier ou non) d'atomes de carbone que comporterait un alcane linéaire hypothétique qui interagirait avec la surface de la même façon (Brendlé et Papirer, 1997).

Parmi toutes ces méthodes proposées, nous avons décidé dans cette étude d'utiliser le modèle de Schultz pour estimer l'énergie libre d'adsorption spécifique et la composante dispersive de l'énergie de surface du solide. La théorie qui est à l'origine de cette méthode est basée sur l'expression du travail d'adhésion W_a estimé par Fowkes (équation 38).

$$W_a = 2(\gamma_S^d \cdot \gamma_L^d)^{1/2} + W_a^{sp} \quad (\text{Eq. 38})$$

Avec γ_L^d la composante dispersive de l'énergie de surface de la sonde et γ_S^d la composante dispersive de l'énergie de surface du solide.

L'énergie libre d'adsorption peut alors être exprimée selon l'équation suivante (39), où a est l'aire de la molécule sonde et N_A le nombre d'Avogadro.

$$\Delta G_{ads} = -N_A a W_a = -2N_A a (\gamma_S^d \cdot \gamma_L^d)^{1/2} + \Delta G_{ads}^{sp} \quad (\text{Eq. 39})$$

En cas de sondes apolaires, comme les alcanes, qui ne peuvent interagir que par des interactions dispersives, V_g est liée à ΔG_{ads}^d selon l'équation 40:

$$\Delta G_{ads}^d = -RTLnV_g = -2N_A(\gamma_S^d)^{1/2}a(\gamma_L^d)^{1/2} + C' \quad (\text{Eq. 40})$$

Où N_A est la constante d'Avogadro, R la constante des gaz parfait, a l'aire de la molécule sonde, γ_L^d la composante dispersive de l'énergie de surface de la sonde à l'état liquide, γ_S^d la composante dispersive de l'énergie de surface du solide et C' une constante. Si une série d'alcanes est injectée, γ_S^d peut être déduite à partir de la pente de la droite des alcanes de la courbe $RTlnV_g$ en fonction de $a(\gamma_L^d)^{1/2}$ (figure 66).

Si des molécules sondes amphotères polaires sont également injectées, les interactions spécifiques peuvent être mesurées. Les points expérimentaux pour les molécules sondes polaires sont situés au-dessus de la droite des alcanes. La distance verticale entre chaque point et cette droite représente la contribution spécifique de l'interaction, l'énergie libre d'adsorption spécifique ΔG_{ads}^{sp} (figure 66). Lors de cette étude, l'énergie libre spécifique d'adsorption et la composante dispersive de l'énergie de surface de l'enzyme supportée ont été calculées en utilisant les constantes (a et γ_L^d) présentées dans le tableau 13 (partie Matériels et Méthodes).

La partie enthalpique de ΔG_{ads}^{sp} (ΔH_{ads}^{sp}) peut être calculée en réalisant l'expérience à différentes températures, et en calculant la pente de la droite $\Delta G_{ads}^{sp}/T$ en fonction de $1/T$, conformément à l'équation 41, tirée de l'équation de Gibbs:

$$\Delta G_{ads}^{sp}/T = \Delta H_{ads}^{sp}/T - \Delta S_{ads}^{sp} \quad (\text{Eq. 41})$$

Ces valeurs de ΔH_{ads}^{sp} peuvent ensuite être utilisées pour déterminer les paramètres acide-base du solide, en se basant sur les concepts développés par plusieurs auteurs, dont Gutmann (Gutmann, 1978). L'approche de Gutmann met en jeu une simple équation à quatre paramètres, avec un terme acide et un terme basique pour chaque molécule sonde amphotère polaire selon l'équation 42:

$$\Delta H_{ads}^{sp} = K_A \times DN + K_B \times AN \quad (\text{Eq. 42})$$

K_A et K_B sont les constantes d'acidité et de basicité du solide, décrivant sa capacité d'accepter ou de donner des électrons. Les paramètres AN (nombre accepteur d'électrons) et DN (nombre donneur d'électrons) permettent de définir la nature acide et basique des sondes (selon la définition de Lewis). DN (en kcal.mol⁻¹) mesure l'énergie d'une liaison de coordination entre un atome donneur et l'acide de Lewis de référence, SbCl₅, dans une solution de 1,2-dichlorométhane (Gutman, 1978). AN (nombre sans dimension) est obtenu à partir des déplacements chimiques relatifs du spectre RMN de l'atome ³¹P de la base de référence Et₃PO₄ dissoute dans l'acide de travail. Nous avons choisi d'utiliser la valeur corrigée de AN par Riddle et Fowkes, AN*. La correction a été effectuée en considérant la valeur de l'AN du Et₃PO₄ égale à 40 kcal.mol⁻¹, ainsi AN* a la même dimension que DN (kcal.mol⁻¹) (Riddle et Fowkes, 1989). Les valeurs AN* et DN des molécules sondes amphotères sont disponibles dans la littérature (Mukhopadhyay et Schreiber, 1995) et ont été reportées dans le tableau 13 (partie Matériels et Méthodes).

Les valeurs de K_A et K_B peuvent être obtenues en traçant la courbe $\Delta H_{ads}^{SP}/AN^*$ en fonction de DN/AN*, avec des valeurs de ΔH_{ads}^{SP} obtenues pour plusieurs sondes amphotères.

Pour la détermination de l'enthalpie d'adsorption ΔH_{ads} du pentan-2-ol et de l'hexan-3-ol, on a supposé que ce terme était indépendant de la température sur l'intervalle étudié. ΔH_{ads} a été obtenu à partir de la courbe $\ln(V_g/T)$ en fonction de $1/T$ (à partir de la pente de cette droite), selon l'équation 43, tirée de l'équation de Clausius-Clapeyron (équation 44). Cette dernière appliquée à des données chromatographiques à dilution infinie, qui sont nécessairement isostériques (couverture adsorbat constante de zéro), permet d'accéder à la différence de chaleur d'adsorption isostérique, ΔH_{st} , en traçant $\ln p$ par rapport à $1/T$, (Condor et Young, 1979 ; Kiselev et Yashin, 1969).

$$\ln\left(\frac{V_g}{T}\right) = -\frac{\Delta H_{ads}}{RT} + C \quad (\text{Eq. 43})$$

$$\left(\frac{\partial \ln p}{\partial \left(\frac{1}{T}\right)}\right)_\vartheta = -\frac{\Delta H_{st}}{R} \quad (\text{Eq. 44})$$

C.II. Etude de l'hydratation de la CALB par mesure d'isothermes d'adsorption de l'eau

Les expériences d'adsorption d'eau ont été réalisées avec la CALB immobilisée sur Chromosorb silanisé et avec ce même support seul (Figure 67). Bien que le taux d'immobilisation de la CALB (rapport des masses d'enzyme immobilisée et du support) soit seulement de 1/200, la présence de l'enzyme sur le support induit des changements importants: dans la gamme complète des a_w , une absorption faible de l'eau a été observée avec le support, avec seulement 0,15% d'augmentation de masse à $a_w = 0,9$. L'isotherme d'adsorption du support avec l'enzyme immobilisée a montré une absorption de l'eau entre 2 et 3 plus élevée que le support seul, dans la première partie de la courbe ($0 < a_w < 0,35$) et une adsorption d'eau beaucoup plus élevée, augmentation exponentielle, pour les valeurs d' a_w supérieures à 0,35, atteignant une augmentation de masse de 0,92% à $a_w = 0,9$.

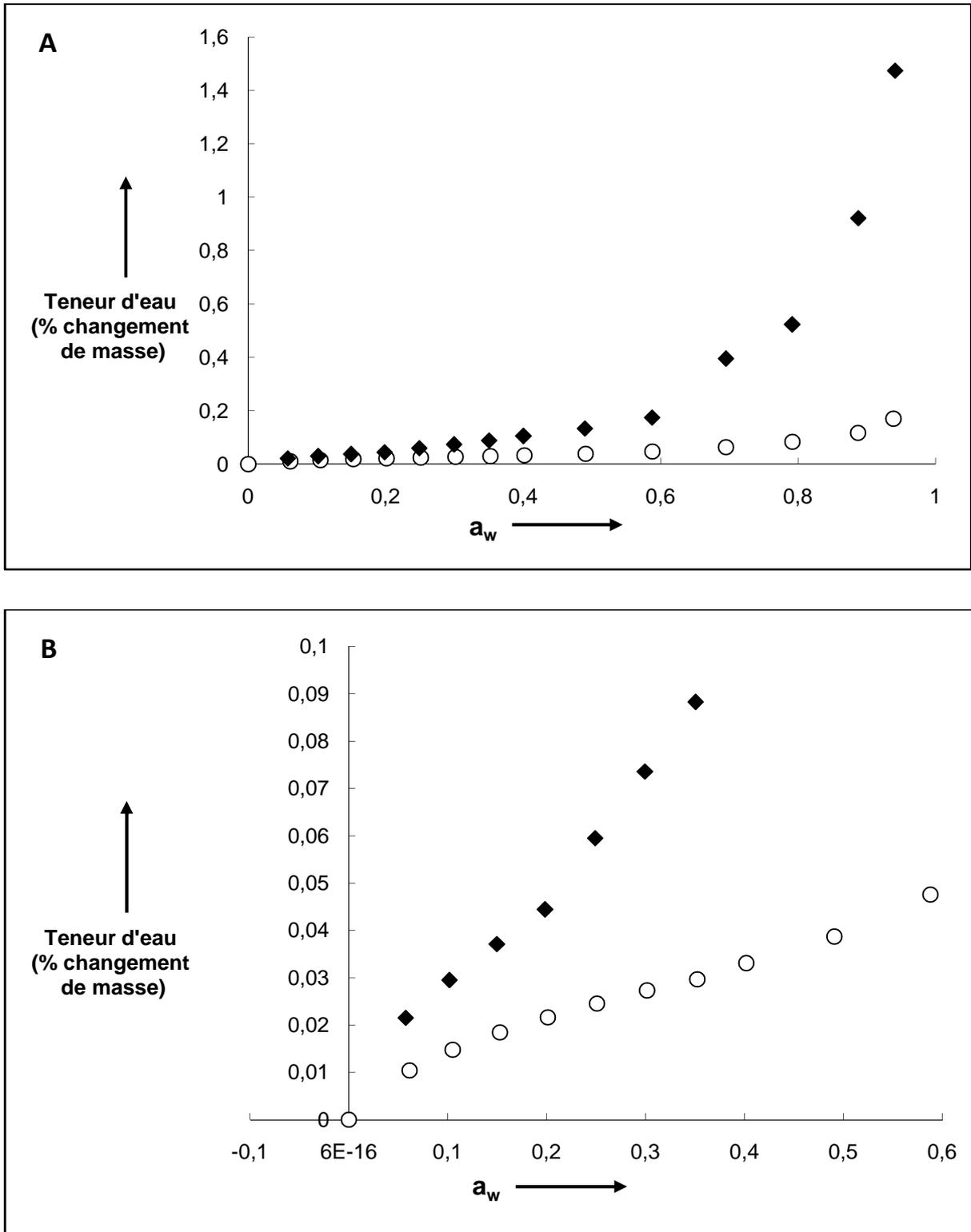


Figure 67: Isotherme d'adsorption de l'eau à 298K avec le Chromosorb seul (○) et avec la CALB immobilisée (5mg de Chirazyme L2 lyophilisée par gramme de Chromosorb) (◆). A. Isotherme complète. B. agrandissement de la zone à faible a_w .

L'isotherme d'adsorption de l'eau de la CALB immobilisée sur Chromosorb ressemble à une isotherme de type II (cf. étude bibliographique § III.2.c). Nous avons donc décidé d'utiliser le modèle Brunauer-Emmett-Teller (BET) (cf. étude bibliographique § III.2.d). Ce modèle suppose un nombre fixe de sites de liaisons indépendants, pouvant accueillir une monocouche de molécules adsorbable fortement liées, et permettre la fixation des couches successives avec des liaisons plus faibles. Nous avons donc tracé la courbe — en fonction de l' a_w (figure 68). L'utilisation de la régression linéaire de l'équation de BET dans la gamme d' a_w de 0,15 à 0,6, a permis de déterminer la masse d'eau correspondant à la première monocouche d'eau fixée par le solide. On a trouvé qu'elle était égale à 0,00092 mg d'eau par mg de protéine immobilisée sec. Cette quantité d'eau liée est obtenue pour des a_w aux alentours de 0,15.

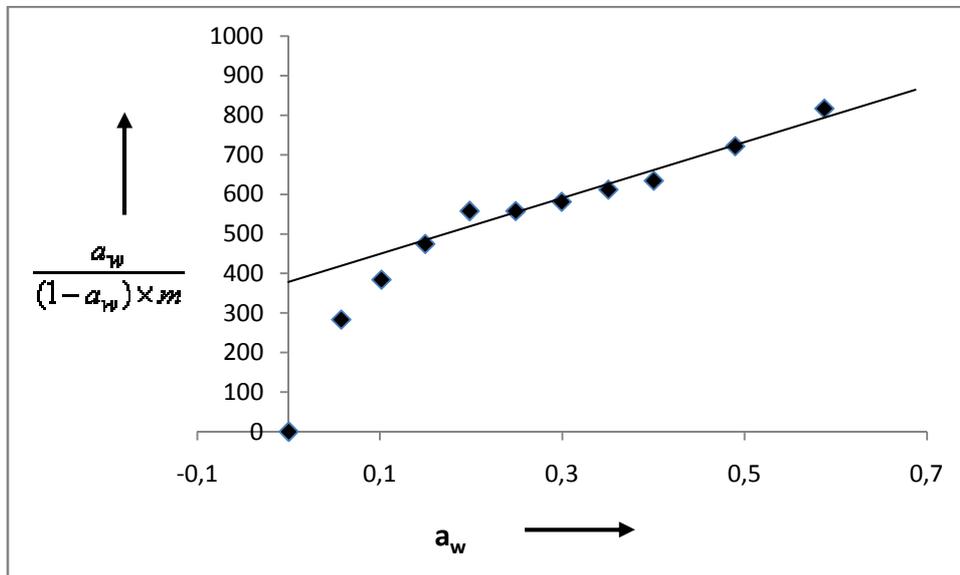


Figure 68 : Modèle BET de l'isotherme d'adsorption d'eau sur la CALB immobilisée : — en fonction de l' a_w et droite de régression obtenue pour a_w comprise entre 0,2 et 0,6 permettant de calculer m_0 , la masse de l'eau fixée par mg d'enzyme immobilisée lorsqu'une monocouche d'eau est formée.

La quantité d'eau adsorbée mesurée correspond à la somme de l'eau adsorbée par le support solide, les sels contenus dans le tampon utilisé pour l'immobilisation de l'enzyme et de l'enzyme elle-même. Malgré la distribution inconnue de sels et des enzymes à la surface du support, une soustraction de l'isotherme d'adsorption du support seul peut être effectuée afin d'éliminer les effets de ce dernier et d'obtenir une approximation du modèle de sorption de l'eau uniquement avec l'enzyme et les sels. L'isotherme d'adsorption ainsi obtenue permet de suivre la masse d'eau adsorbée par mg d'enzyme. A partir de ces valeurs, la quantité d'eau

adsorbée par mole d'enzyme (seule), en fonction de l' a_w peut également être calculée avec $M_{\text{CALB}} = 33\text{kDa}$ (figure 69). Cette courbe permet d'accéder directement aux nombres de molécules d'eau fixées par une molécule d'enzyme à différentes a_w . Le premier point d'inflexion de la courbe (point A à $a_w \approx 0,15$) correspond au niveau de l'activité auquel l'eau forme une monocouche à la surface de l'enzyme. Pour les a_w inférieures, l'eau adsorbée est fortement liée à l'enzyme. Le deuxième point d'inflexion (point B à $a_w = 0,6$) indique le niveau d'activité de l'eau au-dessus duquel l'eau libre apparaît. Entre ces deux points, la courbe est linéaire et correspond à un épaissement de la couche d'eau pour former des multicouches.

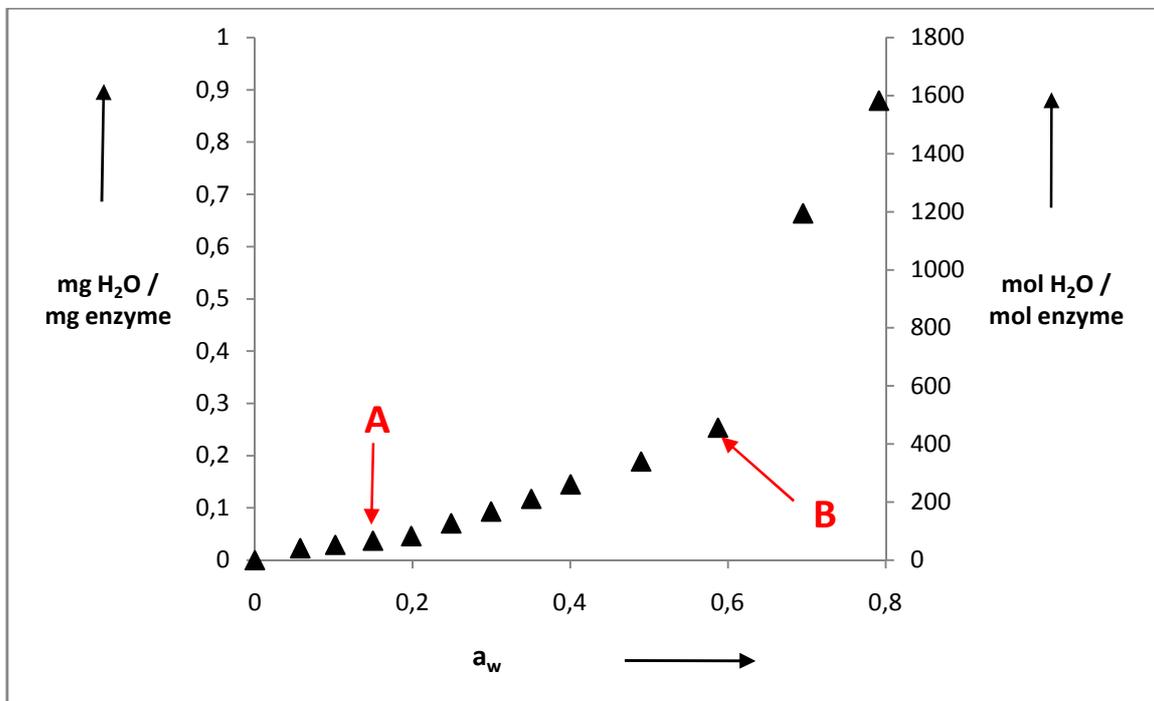


Figure 69: Isotherme d'adsorption de l'eau sur CALB à 298K, obtenue en soustrayant l'isotherme de sorption du support seul à l'isotherme de l'enzyme immobilisée.

D'après la courbe présentée figure 69, lorsque l' a_w passe de 0 à 0,15, environ 70 molécules d'eau sont absorbées par une molécule d'enzyme, ce qui permet de couvrir environ un cinquième de la surface enzymatique et qui suggère que les molécules d'eau sont liées uniquement à des points spécifiques de l'enzyme, probablement des groupements polaires. Ainsi, il semblerait que les molécules d'eau ne forment pas une couche uniforme à la surface de l'enzyme, mais plutôt des amas de molécules d'eau à proximité des sites polaires. Ces résultats sont similaires à ceux observés lors de l'étude de l'adsorption d'eau sur l'enzyme

déglycosylée et dessalée (Branco et coll., 2009). L'isotherme d'adsorption obtenue lors de cette étude est très similaire, mais les quantités d'eau fixées par l'enzyme sont un peu plus faibles (cette différence est probablement due à l'absence des groupements glycosylés présents à la surface de l'enzyme, et des sels). Dans la publication des Branco et coll., l'étude de modélisation moléculaire réalisée montre bien que l'eau constitue des amas à la surface de l'enzyme, dont la taille augmente lorsque l' a_w s'accroît. Pour les conditions de sursaturation en eau (systèmes avec plus de 1600 molécules d'eau), l'enveloppe d'hydratation en multicouche est devenue instable, et des gouttelettes de l'eau libre sont apparues. Dans ces conditions, la couche d'eau formée peut atteindre 10 Å d'épaisseur sur le côté hydrophile de la protéine, tandis que la cavité hydrophobe accueillant les substrats n'est pas du tout hydratée. Dans cette zone hydrophobe seule la présence d'un amas d'eau isolé et attaché aux résidus du site actif a été observé (Branco et coll., 2009). L'absence de monocouche d'eau recouvrant complètement la protéine a également été observée lors d'études antérieures réalisées en milieux liquide avec la cutinase de *Fusarium solani* (Micaêlo et Soares, 2007) et la subtilisine (Parker et coll., 1995).

L'isotherme d'adsorption de l'eau permet d'établir une relation entre l'activité catalytique de la CALB en phase gazeuse à différentes a_w , et l'état des molécules d'eau (fortement ou faiblement liés). Précédemment, des expériences réalisées dans le réacteur solide/gaz ont montré que l'activité hydrolytique de la CALB s'accroît avec l' a_w et atteint une valeur maximale à partir d' $a_w = 0,2$, suggérant que l'eau a une affinité spécifique pour le site actif (Léonard-Nevers et coll., 2009) (cf. étude bibliographique § II.3.b et Résultats et Discussion § B.III.2.c.). Par ailleurs, il a été montré que l' a_w optimale de la réaction d'alcoololyse enzymatique est comprise entre 0,05 et 0,1 (Bousquet-Dubouch et coll., 2001). Cela correspond à un niveau d'activité de l'eau où seules les interactions d'adsorption les plus fortes peuvent avoir lieu, et les groupes polaires de l'enzyme immobilisée ne sont pas totalement couverts par l'eau. Cette forte activité catalytique de la CALB à a_w très faible a également été observée par d'autres auteurs en milieux liquides (Valivety et coll., 1992). Elle pourrait être attribuée à la capacité de l'enzyme déshydratée à garder les molécules d'eau essentielles emprisonnées dans sa structure par des liaisons très fortes. Pour beaucoup d'autres enzymes, il a été démontré qu'elles commencent à reprendre leur activité catalytique à un niveau d'hydratation compris entre 0,12 et 0,2 mg d' H_2O /mg de protéine, correspondant à des valeurs d' a_w beaucoup plus élevées que 0,1 (Roger, 1994).

C.III. Etude de l'hydratation de la CALB par IGC

La saturation des sites de fixation de l'eau à la surface de l'enzyme immobilisée, en présence d' a_w croissantes, peut également être estimée en déterminant les propriétés de surface, comme la tendance de l'enzyme à adsorber des molécules apolaires ou les propriétés acide-base Lewis de la surface, en fonction de l' a_w . Ces études peuvent être réalisées à l'aide de l'IGC, qui est devenue une technique largement utilisée pour caractériser les propriétés de surface des solides organiques tels que des fibres naturelles (Heng et coll., 2007) et les produits alimentaires (Zhou et Cadwallader, 2006).

Nous avons étudié l'adsorption de différentes molécules de sondes apolaires (*n*-heptane, *n*-octane, *n*-nonane, *n*-décane et *n*-undécane) et polaires (acétonitrile, chloroforme, éthanol, éthyl acétate et 1,4-dioxane) sur la CALB immobilisée sur Chromosorb à l'aide de l'IGC en dilution infinie. Ces résultats nous ont permis d'accéder à la composante spécifique de l'énergie d'adsorption des sondes polaires sur le support ΔG_{ads}^{sp} et à la composante dispersive de l'énergie de surface de l'enzyme immobilisée γ_S^d . A partir de ces valeurs, les constantes d'acidité (K_A) et de basicité (K_B) de l'enzyme ont pu être déterminées. Par ailleurs, l'évolution de ces paramètres en fonction de l' a_w a été recherchée. A partir de ces données l'état d'hydratation de la CALB a pu être estimé de façon indirecte.

C.III.1. Influence de l' a_w sur l'adsorption des molécules apolaires sur la CALB immobilisée

La figure 70 présente l'évolution des volumes de rétention spécifiques V_g de cinq sondes apolaires l'undécane (C11), le décane (C10), le nonane (C9), l'octane (C8) et l'heptane (C7) en fonction de l' a_w du gaz vecteur, obtenus après avoir traversé la colonne remplie de la CALB immobilisée et thermostatée à 313K. Pour les alcanes les plus longs, undécane et décane, il apparaît que les volumes de rétention diminuent, puis se stabilisent pour des $a_w \geq 0,25$. Comte et coll. ont réalisé des observations similaires lors de l'adsorption de ces alcanes sur les perles de verre pour des $a_w \geq 0,15$, et cette stabilisation a été expliquée par le recouvrement de la surface du support par les molécules d'eau (Comte et coll., 2005). En effet, les molécules d'eau cachent progressivement les sites d'interaction des sondes alcanes, induisant une diminution de leurs temps de rétention. Lorsque le volume de rétention devient

constant, on peut supposer que la surface de la CALB immobilisée est couverte par une couche de molécules d'eau, pour des $a_w \geq 0,25$. Or, dans le paragraphe précédent nous avons montré que la surface enzymatique n'est jamais complètement recouverte d'eau. On peut donc supposer, que l'eau adsorbée cache progressivement les sites de fixation de ces sondes, puis pour des $a_w \geq 0,25$ la couche d'eau discontinue s'épaissit sans occuper des sites de fixation supplémentaires, et ceci au moins jusqu'à $a_w \leq 0,4$.

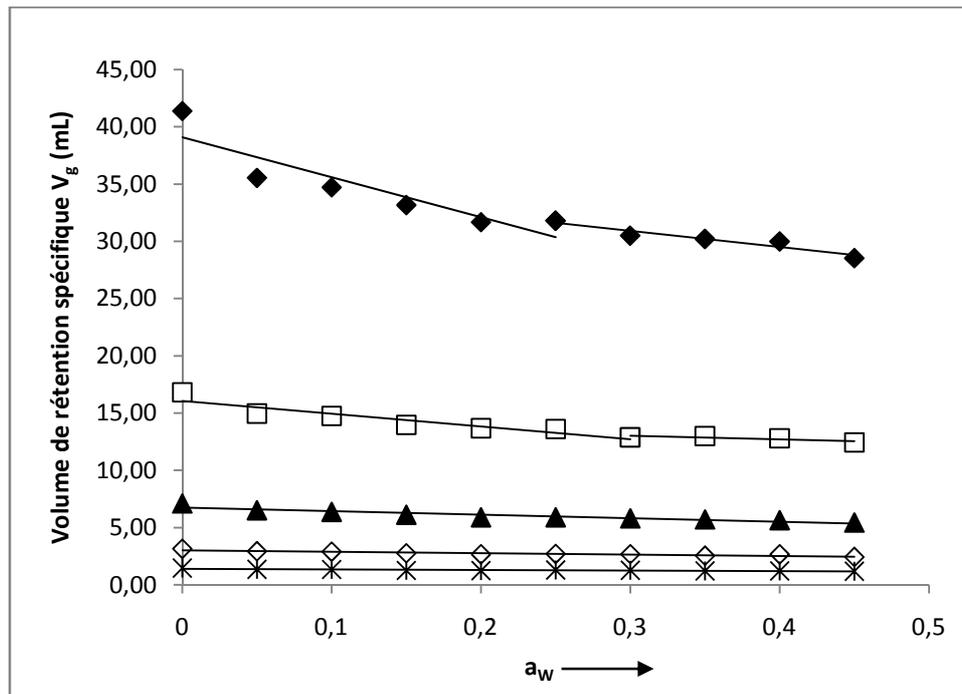


Figure 70 : Evolution du volume de rétention spécifique V_g pour des molécules apolaires sous l'influence de la CALB immobilisée avec l' a_w à 313K : undecane (◆), decane (□), nonane (▲), octane (◇) and heptane (x).

La valeur de γ_S^d pour l'enzyme immobilisée suit la même tendance avec l'humidité croissante (tableau 30), confirmant ainsi l'hypothèse de la couverture progressive de la surface enzymatique par les molécules d'eau jusqu'à une a_w de 0,25. Au-delà de cette valeur, l'eau ne se fixe plus directement à la surface de l'enzyme et par conséquent n'influe plus sur la composante dispersive de l'énergie de surface.

Tableau 30: Evolution de la composante dispersive de l'énergie de surface, γ_S^d à 313K et les paramètres acide (K_A) et base (K_B) de la CALB immobilisée avec l' a_w . (ND pour non déterminé)

a_w	0	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4
γ_S^d	26,47	25,49	25,31	25,30	25,02	24,50	24,38	24,67	24,08
K_A	1,46	1,02	0,86	0,88	0,84	0,78	1,00	ND	ND
K_B	0,70	0,89	0,25	0,10	0	0,22	0,37	ND	ND

C.III.2. Détermination du caractère acide-base au sens de Lewis de la surface de la CALB immobilisée

L'utilisation de sondes polaires permet l'évaluation des interactions acide-base de Lewis entre ces sondes et un support solide. Tout d'abord, le caractère acide-base du support d'immobilisation seul, Chromosorb silanisé, a été déterminé par IGC à $a_w = 0$ et à 313K. Des sondes monopolaires ont été utilisées: le chloroforme et le 1,4-dioxane, étant respectivement des sondes acide et base au sens de Lewis, afin d'obtenir respectivement une mesure de la basicité et de l'acidité Lewis du support. Il convient de souligner que les valeurs mesurées ne sont pas des propriétés intrinsèques du support, mais dépendent des propriétés de l'adsorbable également. Néanmoins, les résultats ont permis de conclure que le support présente principalement un caractère acide ou accepteur d'électrons, car il présente une affinité beaucoup plus élevée pour le 1,4-dioxane ($\Delta G_{ads}^{sp} = 9,5 \text{ kJ.mol}^{-1}\text{mg}^{-1}$) par rapport au chloroforme ($\Delta G_{ads}^{sp} = 5 \text{ kJ.mol}^{-1}\text{mg}^{-1}$). Ceci pourrait être attribué à la présence de groupements silanol résiduels à la surface du support après silanisation.

Par ailleurs, la basicité et l'acidité Lewis du support avec la CALB immobilisée ont été déterminées dans les mêmes conditions avec ces deux sondes monopolaires. On a constaté que le support avec l'enzyme et les sels utilisés pour préparer le tampon d'immobilisation présente un caractère acide encore plus marqué que le Chromosorb seul : l'énergie libre d'adsorption spécifique de 1,4-dioxane est encore plus importante ($\Delta G_{ads}^{sp} = 12,4 \text{ kJ.mol}^{-1}\text{mg}^{-1}$) que pour le support seul et son affinité pour le chloroforme encore plus faible ($\Delta G_{ads}^{sp} = 2,1 \text{ kJ.mol}^{-1}\text{mg}^{-1}$) (figure 71). Ces variations ne pouvant pas être attribuées aux sels du tampon d'immobilisation (pH = 7,5), elles sont sûrement dues à la présence de l'enzyme. Ces résultats

sont surprenants, car la surface de la CALB est plutôt basique. En effet, on peut y trouver plus d'acides aminés basiques (arginine, lysine et histidine) que d'acides (acide aspartique et acide glutamique), comme le suggère les images ci-dessous (figure 72). Nous pensons que les acides aminés basiques sont en contact avec les groupements silanols résiduels du support, et ainsi masqués ; seuls les acides aminés à chaîne latérale acide sont disponibles pour interagir avec les sondes polaires, se traduisant par une diminution de la basicité.

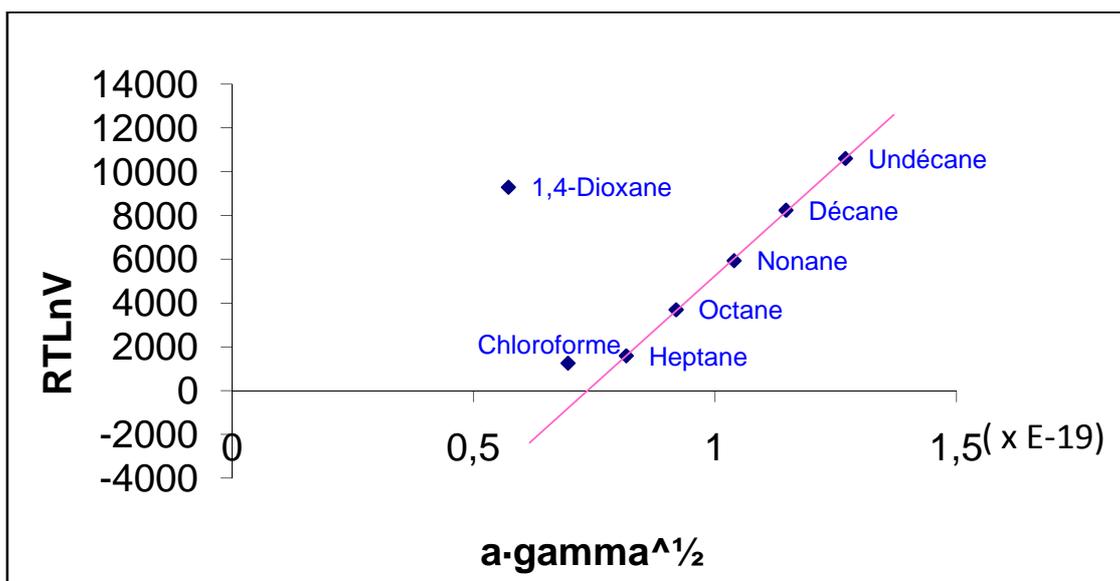


Figure 71 : Exemple de courbe obtenue en traçant $RTLn(V_g)$ en fonction de $a(\gamma_L^d)^{0,5}$, permettant de déterminer ΔG_{ads}^{sp} du 1,4-dioxane et du chloroforme sur la CALB immobilisé à partir de la droite des alcanes.

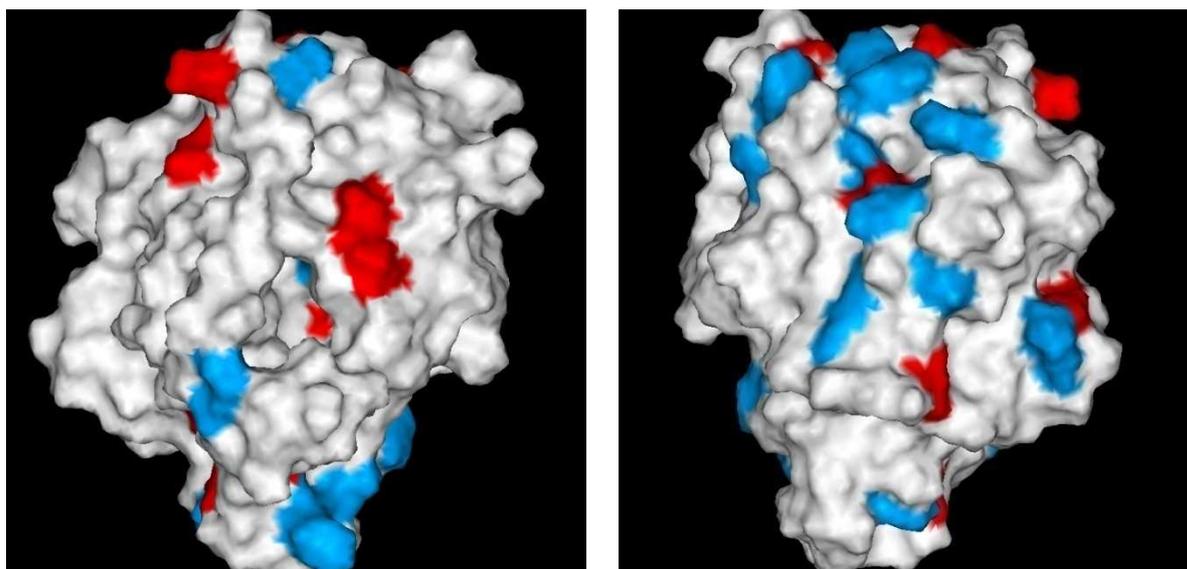


Figure 72 : Surface de la CALB vue par dessus (du côté du site catalytique, à gauche) et du côté opposé (à droite). Les acides aminés basiques sont représentés en bleu et les acides en rouges.

C.III.3. Influence de l' a_w sur l'adsorption de molécules polaires amphotères sur la surface de la CALB

L'utilisation de différentes sondes polaires amphotères permet d'accéder aux constantes d'acidité et de basicité au sens de Lewis du solide. Afin de déterminer les effets de l' a_w sur les constantes de Lewis de la CALB immobilisée, $\Delta G_{\text{ads}}^{\text{sp}}$ de trois sondes polaires amphotères (éthanol, acétonitrile et éthyl acétate) ont été déterminées pour des humidités variables. Les résultats obtenus à 313K sont indiqués sur la figure 73. Il semble que les valeurs de $\Delta G_{\text{ads}}^{\text{sp}}$ des différentes sondes diminuent fortement lorsque l' a_w s'accroît de 0 à 0,1, puis se stabilise. Une telle baisse de l'énergie libre spécifique d'adsorption avec l' a_w croissante à faible taux d'humidité, suivie d'une stabilisation pour les a_w supérieurs, a été observée par le Comte et coll. pour l'adsorption des sondes gazeuses sur des solides minéraux (Comte et coll., 2005). Cette évolution a été interprétée comme une couverture progressive de la surface par les molécules d'eau jusqu'à ce que les sites polaires soient saturés.

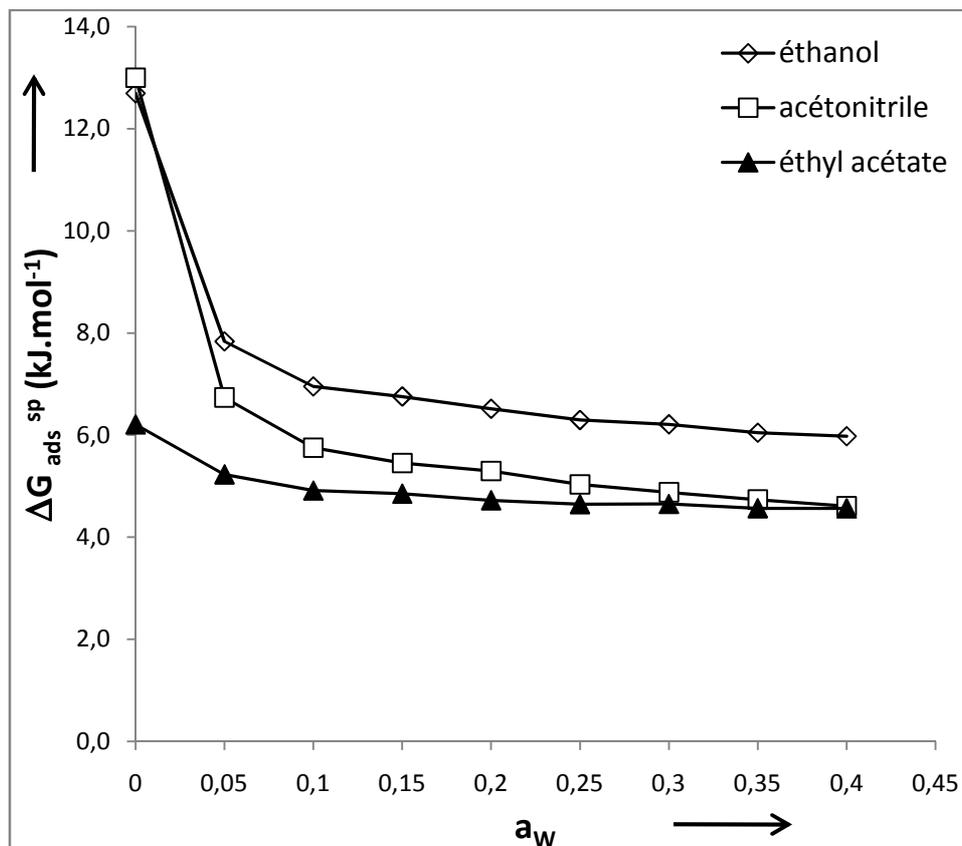


Figure 73: Variation de la composante spécifique de l'énergie libre d'adsorption $\Delta G_{\text{ads}}^{\text{sp}}$ de l'éthanol, de l'acétonitrile et de l'éthyl acétate sur la CALB immobilisée avec l' a_w à 313K.

C.III.4. Evolution des constantes d'acidité (K_A) et de basicité (K_B) de l'enzyme avec l' a_w

La partie enthalpique de ΔG_{ads}^{sp} , ΔH_{ads}^{sp} , a été calculée pour chacune des trois sondes polaires amphotères (éthanol, acétonitrile et éthyl acétate) en réalisant les expériences à différentes températures pour chaque a_w . La figure 64 montre un exemple de courbes obtenues pour $a_w = 0,2$, et pour des températures comprises entre 313 et 338K.

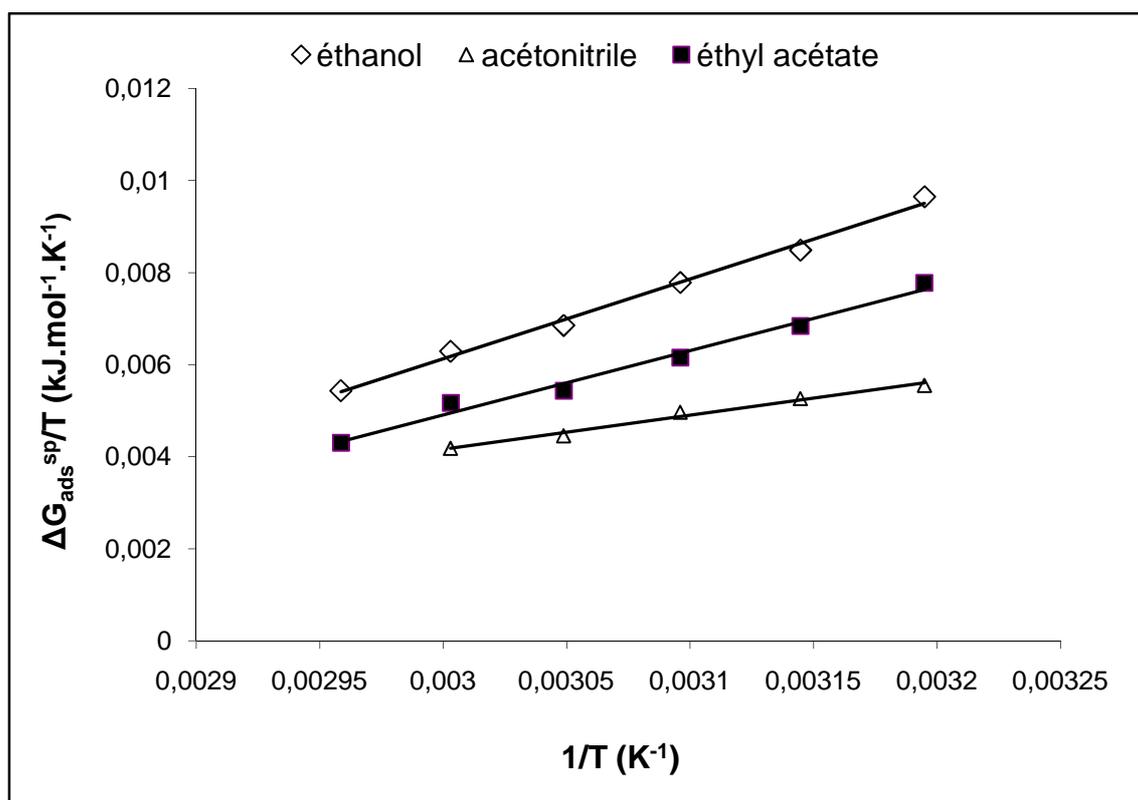


Figure 74: Détermination de l'enthalpie d'adsorption spécifique pour a_w égale à 0,2, à l'aide de la courbe $\Delta G_{ads}^{sp}/T$ en fonction $1/T$ pour les températures comprises entre 313 et 338K.

Puis, à partir des nombres donneur et accepteur d'électrons (DN et AN*) caractérisant les sondes amphotères injectées et des valeurs de ΔH_{ads}^{sp} , les propriétés K_A accepteur d'électrons (acidité) et K_B donneur d'électrons (basicité) de la CALB immobilisée, ont été évaluées. Les constantes d'acidité (K_A) et de basicité (K_B) de Lewis diminuent lorsque l' a_w augmente (tableau 30 et figure 75), suivant la même tendance que les valeurs de ΔG_{ads}^{sp} . Ces résultats indiquent que les molécules d'eau sont en mesure de masquer progressivement les groupements polaires sur la surface de l'enzyme immobilisée et que ces groupements sont

entièrement couverts par l'eau à l' a_w égale à 0,1. Cette valeur correspond bien à l' a_w optimale trouvé pour la réaction d'alcoololyse enzymatique (Bousquet-Dubouch et coll., 2001).

En accord avec les résultats trouvés avec les sondes monopolaires (1,4-dioxane et chloroforme), l'enzyme immobilisée présente une constante d'acidité de Lewis plus élevée que la constant de basicité de Lewis.

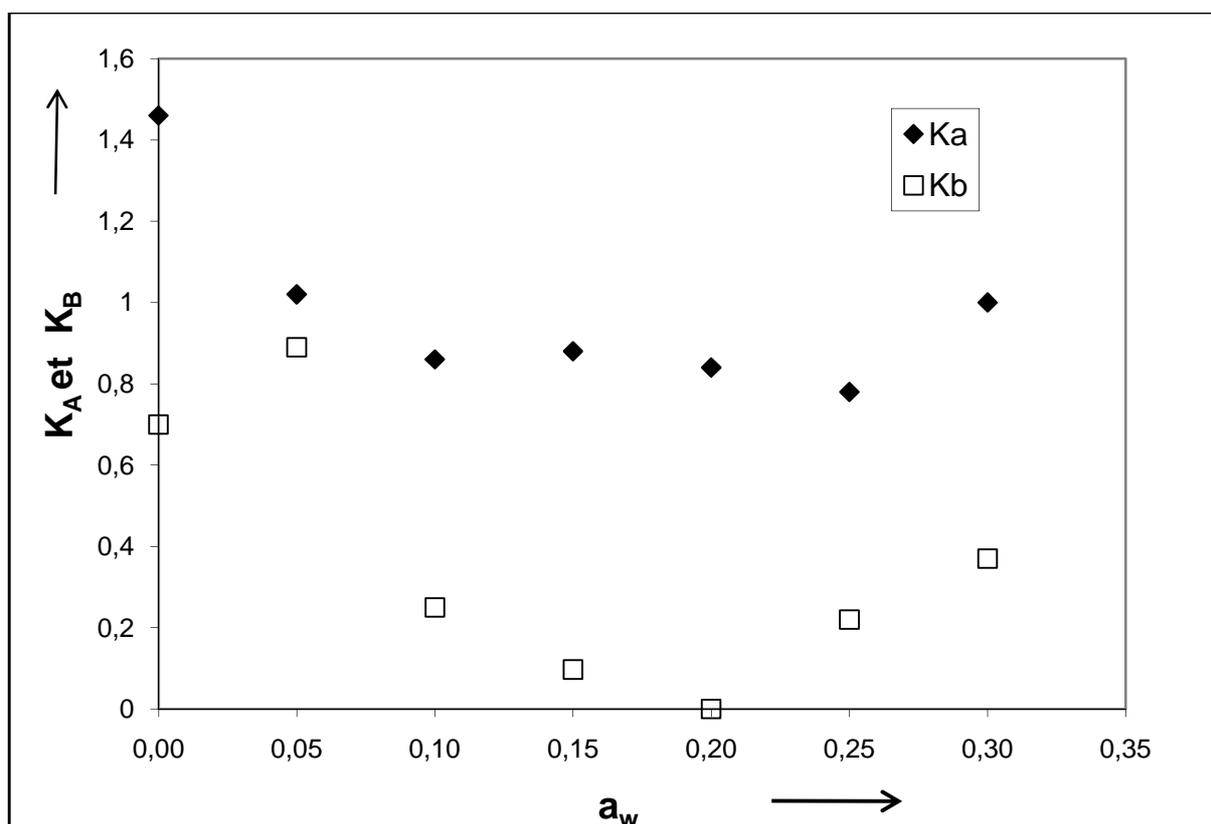


Figure 75: Evolution des paramètres acide (K_A) et base (K_B) de la CALB immobilisé en fonction de l' a_w .

C.IV. Etude de l'adsorption compétitive des substrats et de l'eau sur la surface de la CALB par IGC

Lors de notre étude de la CALB réalisée à l'aide le réacteur solide/gaz, plusieurs substrats polaires (des esters et des alcools) ont été utilisés. L'influence de l'eau sur l'acylation de certains de ces alcools a également été explorée à l'aide de ce réacteur (Léonard-Nevers et coll., 2009) Ces composés peuvent entrer en compétition avec l'eau pour les sites d'adsorption à la surface de l'enzyme immobilisée. Une façon d'évaluer cette compétition est de mesurer l'enthalpie d'adsorption (ΔH_{ads}) de substrats polaires sur l'enzyme immobilisée à différentes

humidités. Ce paramètre est une mesure directe de la force de l'interaction entre le substrat et l'enzyme immobilisée, et l'évolution de ce paramètre avec l' a_w peut être attribuée au blocage des sites de fixation de l'alcool par l'eau par adsorption compétitive.

Les esters pouvant être hydrolysés par la CALB immobilisée en présence de l'eau, leur adsorption n'a pas pu être étudiée par cette technique, car l'aire des pics mesurée aurait été faussée. Une solution à ce problème aurait été de désactiver l'enzyme comme cela a été fait dans d'autres études, pour l'adsorption de l'acétophénone et du propan-2-ol sur l'alcool déshydrogénase de *Lactobacillus brevis* (Dimoula et coll., 2009).

Nous avons donc étudié l'adsorption de deux alcools, le pentan-2-ol et l'hexan-3-ol sur la CALB immobilisée. ΔH_{ads} a été obtenu à partir de la courbe $\ln(V_g/T)$ en fonction de $1/T$ (figure 76). L'influence de l' a_w sur ΔH_{ads} est indiquée sur la figure 77.

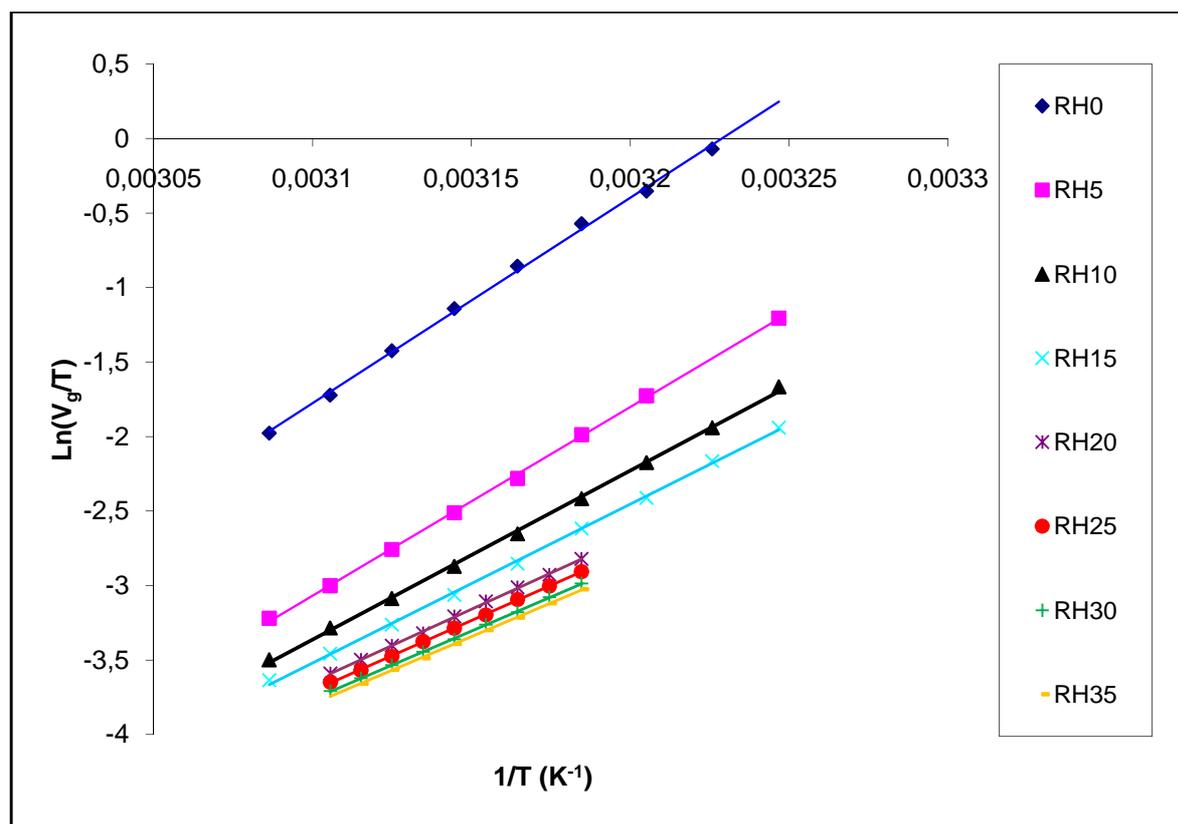


Figure 76 : Variation de $\ln(V_g/T)$ en fonction de $1/T$, permettant de déterminer ΔH_{ads} , obtenue pour l'adsorption du pentan-2-ol sur la CALB immobilisée.

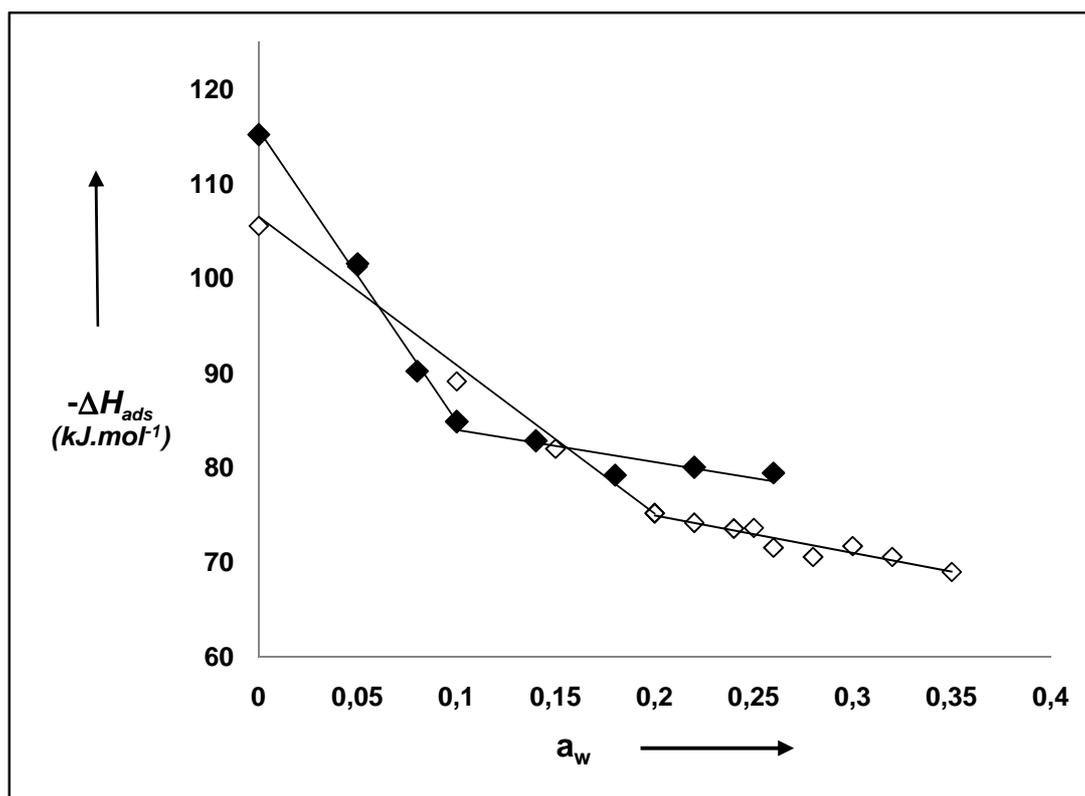


Figure 77 : Evolution de l'enthalpie d'adsorption du pentan-2-ol (◇) et du hexan-3-ol (◆) sur la CALB immobilisée en fonction de l'activité de l'eau.

Premièrement, on a noté que dans la gamme complète des a_w étudiées, aussi bien lors l'adsorption du pentan-2-ol que celle du hexan-3-ol, les valeurs $|\Delta H_{ads}|$ sont supérieures à l'enthalpie de condensation, étant respectivement égales à $-52,6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ et $-43,4 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Cela implique que les enthalpies d'adsorption ne sont pas seulement dues à la chaleur de condensation des composés sur le solide, mais aussi à des interactions physico-chimiques entre les composés et l'enzyme immobilisée.

Deuxièmement, il semble que les enthalpies d'adsorption de pentan-2-ol et de l'hexan-3-ol varient en deux étapes avec l' a_w . Lors de la première étape, $|\Delta H_{ads}|$ décroît rapidement avec l' a_w croissante. Lors de la deuxième étape, elle continue à décroître, mais avec une pente très faible. Cette stabilisation des valeurs $|\Delta H_{ads}|$ correspond à une diminution des temps de rétention de l'alcool, et de leur variation plus faible avec la température. Cela pourrait être attribué au recouvrement de la surface de la lipase immobilisée par des molécules d'eau adsorbées, qui, dans une situation compétitive d'adsorption, rendent ainsi les sites de fixations indisponibles pour ces alcools. L' a_w correspondant au "point de cassure" entre ces deux parties de la courbe d'adsorption diminue de 0,2 à 0,1, lors du changement de l'alcool du pentan-2-ol à l'hexan-3-ol.

Lors de la résolution du pentan-2-ol et de l'hexan-3-ol, par transestérification avec le méthyl propionate catalysée par la CALB (immobilisée) dans le réacteur solide/gaz, le ratio énantiomérique, E , a été fortement influencé par l'eau : pour des a_w faibles, il augmente rapidement de 101 et 67 (pour $a_w \approx 0$), respectivement pour le pentan-2-ol et l'hexan-3-ol, jusqu'à atteindre un maximum autour de 320 (à $a_w = 0,2$) et 120 (à $a_w = 0,1$) (Léonard et coll., 2007 ; Léonard-Nevers et coll., 2009). Pour expliquer l'augmentation de E à des faibles valeurs d' a_w , l'inhibition énantiosélective a été évoquée : une molécule d'eau fixée au fond de la poche énantiosélective générerait préférentiellement un des deux énantiomères (le S en l'occurrence). Au-delà de ces valeurs d' a_w optimales pour l'énantiosélectivité de la CALB vis-à-vis de ces alcools secondaires, une diminution des valeurs de E a été observée.

Dans le cas du pentan-2-ol, la valeur d' $a_w = 0,2$ apparaît comme un "point tournant" pour l'évolution de l'énantiosélectivité de la CALB vis-à-vis de cet alcool. Nous avons montré que cette $a_w = 0,2$ correspond également à un "point de cassure" pour la variation de l'enthalpie d'adsorption de pentan-2-ol sur la CALB immobilisée. Pour des a_w supérieurs à 0,2, les molécules d'eau qui ont été piégées par l'enzyme doivent se désorber, afin de faire de la place et permettre l'adsorption de l'alcool. Ainsi, les molécules d'eau accèdent à une liberté de mouvement accrue se traduisant par une augmentation du terme entropique ($T\Delta S$). Il peut être suggéré qu'au-delà de cette valeur, l'eau agit d'avantage comme un "solvant", avec des effets entropiques importants, que comme un inhibiteur énantiosélectif (Léonard et coll., 2007). Cela peut également être relié au terme entropique important, défavorisant l'énantiosélectivité de l'enzyme, observé pour des activités élevées en eau. En résumé, pour $a_w < 0,2$, l'eau en se liant à la poche stéréospécificité agit principalement par des effets stériques, conduisant à une augmentation de E , puis pour $a_w > 0,2$ elle agit comme un "solvant" », induisant l'augmentation du terme entropique, ce qui résulte en une diminution de E avec l' a_w croissante.

Des observations similaires peuvent être reportées pour l'hexan-3-ol, avec une petite différence : "le point de cassure" pour cet alcool se situe à un a_w plus faible ($a_w = 0,1$), aussi bien pour l'évolution de l'énantiosélectivité que pour l'enthalpie d'adsorption. Cette différence par rapport au pentan-2-ol, peut s'expliquer par la taille plus grande et le caractère moins polaire de l'hexan-3-ol, qui aurait plus de difficulté à accéder à la partie non humidifiée de la surface de l'enzyme immobilisée.

C.V. Conclusions et perspectives du chapitre C

Dans cette partie, nous avons cherché à déterminer l'état d'hydratation de la CALB immobilisée par deux méthodes : à partir de l'isotherme d'adsorption de l'eau et par chromatographie en phase gazeuse inverse en dilution infinie. Puis, l'effet de l'hydratation sur l'adsorption du pentan-2-ol et de l'hexan-3-ol a été étudié, selon cette deuxième méthode.

A partir de l'isotherme d'adsorption d'eau, obtenue par gravimétrie, nous avons déterminé la masse d'eau correspondant à la première monocouche d'eau fixée par la CALB immobilisée. D'après le modèle BET utilisé, nous avons trouvé qu'une monocouche d'eau couvrait la surface de l'enzyme immobilisée vers une a_w égale à 0,15 (correspondant à 0,00092 mg d'eau par mg de protéine immobilisée), puis cette pellicule d'eau s'épaissit en formant des multicouche jusqu'à une $a_w = 0,6$, et au-delà de cette valeur l'eau libre apparaît. La comparaison des isothermes de sorption de l'eau sur le support seul et sur le support avec l'enzyme, nous a suggéré que l'adsorption d'eau est essentiellement due aux molécules d'enzyme et les sels du tampon d'immobilisation. D'après nos calculs, à $a_w = 0,15$ seulement 70 molécules d'eau ont été fixées par une molécule d'enzyme, ce qui est insuffisant pour couvrir toute la surface enzymatique et qui nous a conduit à penser que la monocouche est discontinue et qu'à cette humidité seuls les groupements polaires sont recouverts d'eau. Des résultats similaires ont été trouvés avec l'enzyme déglycosylée (Branco et coll., 2009). Par ailleurs, il est possible qu'une certaine quantité d'eau soit emprisonné dans la structure de la CALB même après la lyophilisation, ce qui impliquerait une réduction de la quantité d'eau nécessaire pour la formation de monocouche.

Les expériences menées en IGC nous ont permis d'accéder à des résultats supplémentaires. Ainsi, l'adsorption des molécules sondes polaires amphotères sur la CALB immobilisée, nous a suggéré que l'eau se fixait progressivement sur les sites chargés et polaires à la surface de l'enzyme à faible humidité ($0 < a_w < 0,1$) et à partir d' a_w égale à 0,1 tous les sites polaires de surface étaient occupés par l'eau. L'étude d'adsorption des molécules apolaires, alcanes linéaires, nous a montré que l'eau se fixait sur la surface progressivement jusqu'à une a_w égale à 0,25. Au-delà de cette valeur nous pouvons supposer que l'enzyme est complètement recouverte par l'eau, ou que seulement des zones fortement apolaires restent découvertes. Par ailleurs, l'adsorption des sondes polaires (amphotères ou monopolaires) nous a révélé que la CALB immobilisée sur Chromosorb avait un caractère acide. Cette acidité est partiellement

due aux groupements silanols persistants après silinisation, mais également à l'enzyme (la CALB immobilisée présente un caractère plus acide que le Chromosorb seul).

La diminution rapide de $|\Delta H_{\text{ads}}|$ du pentan-2-ol et de l'hexan-3-ol sur la CALB immobilisée observée à faible humidité nous a suggéré qu'il y avait compétition entre les molécules d'eau et d'alcool pour les sites polaires de surface à faible a_w . Au-delà des a_w de 0,2 et de 0,1 pour le pentan-2-ol et l'hexan-3-ol, respectivement, l'eau agirait comme un "solvant", induisant une augmentation de l'entropie du système. Ces valeurs d' a_w coïncident avec les a_w pour lesquelles des valeurs maximales de E , mesurées lors de la résolution de ces alcools, par transestérification avec le méthyl propionate catalysée par la CALB (immobilisée) dans le réacteur solide/gaz, ont été obtenues. L'énantiosélectivité de la CALB pour la résolution de ces alcools secondaires étant défavorisée par l'entropie, au niveau des différences d'énergie libre d'activation entre les énantiomères R et S , ces deux types de résultats sont en accord.

Ainsi, nous avons montré que l'adsorption de l'eau et des études en IGC peuvent être utilisées avec succès pour suivre l'état d'hydratation de la CALB immobilisée, et aussi pour étudier l'adsorption des substrats dans une situation de compétitivité avec de l'eau. Comme les conditions utilisées pour ces études ressemblent à celles du bioréacteur solide/gaz sous flux continu, dans lequel nous avons étudié l'activité et la sélectivité de la CALB, il a été possible de relier les résultats d'adsorption avec des effets particuliers de l'eau sur les propriétés des enzymes.

En conséquence, cette étude permet de mieux appréhender la complexité et le rôle de l'eau dans la biocatalyse. Néanmoins, il reste beaucoup à faire : premièrement nous pourrions envisager d'étendre les études d'adsorption simples et en situation compétitive avec l'eau à d'autres substrats ; ensuite, on pourra projeter des études d'adsorption compétitive de deux substrats ; pour finir, nous pourrions essayer de mieux comprendre le rôle joué par chaque acteur entrant dans la composition de l'enzyme immobilisée (le support, les sels du tampon d'immobilisation et l'enzyme) séparément lors de l'adsorption de l'eau et/ou des substrats.

Conclusions générales

Dans un contexte où les molécules chirales optiquement pures sont de plus en plus recherchées (notamment pour l'industrie pharmaceutique), la biocatalyse s'est fortement développée pour la résolution des mélanges racémiques. Les lipases, en particulier, sont des enzymes très utilisées pour l'obtention d'alcools, d'amines, d'acides ou d'esters énantiopurs. De nombreux travaux ont été menés pour mieux comprendre les paramètres réactionnels et structuraux intervenant dans la sélectivité des lipases, de façon à pouvoir prédire leur comportement vis-à-vis des substrats. Cependant, jusqu'à présent aucune loi générale n'a encore pu être établie, pour définir de façon rationnelle les paramètres réactionnels optimaux pour l'énantiosélectivité.

L'objectif de cette thèse était donc de mieux comprendre les paramètres structuraux et environnementaux gouvernant l'énantiosélectivité de la lipase B de *Candida antarctica* (CALB) pour la résolution des alcools secondaires linéaires chiraux.

Dans un premier temps, nous avons cherché une méthode simple pouvant être utilisée comme outil prédictif de l'énantiosélectivité de la CALB. Ainsi, nous nous sommes orientés vers la modélisation moléculaire, qui est une technique de plus en plus utilisée pour explorer les facteurs structuraux responsables de l'énantiosélectivité à la fois propres à l'enzyme et au substrat.

Nous avons suivi une approche classique qui a consisté à modéliser le second intermédiaire tétraédrique de la réaction (considéré comme un bon modèle de l'état de transition), l'existence d'un intermédiaire plus stable pour un des énantiomères pouvant être à l'origine du dédoublement cinétique. Nous avons réalisé une étude systématique afin d'envisager toutes les orientations possibles des deux alcools à résoudre sélectionnés pour notre étude : le butan-2-ol et le pentan-2-ol. A l'issue des minimisations, les structures les plus probables ont été sélectionnées selon des critères énergétiques. Les structures retenues suggèrent la possibilité pour le butan-2-ol et le pentan-2-ol de modes d'arrimage supplémentaires à ceux mentionnés dans la littérature, montrant qu'il n'y a pas unicité et spécificité des modes d'arrimage pour les formes *R* et *S*.

Ensuite, nous avons vérifié si ces structures étaient productives, c'est-à-dire si elles pouvaient donner lieu à la catalyse, ou pas. Les structures ont été considérées productives si toutes les liaisons hydrogène nécessaires à la catalyse sont présentes et si la structure finale est

relativement proche de la structure cristallographique. Notre étude n'a pas permis d'associer les structures non productives à un mode particulier.

La comparaison des différents modes de fixation des structures productives selon plusieurs termes énergétiques nous a permis de déterminer les modes de fixation privilégiés pour les alcools étudiés. Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature (Orrenius et coll., 1998 a), excepté pour le (*R*)-butan-2-ol, pour lequel le mode II, avec le substituant L dirigé vers la poche stéréosélective, semble être favorisé.

Plusieurs critères de comparaison entre les structures *R* et *S* obtenues avec les deux alcools ont été envisagés. La fréquence des structures *R* par rapport aux structures *S*, la fréquence de modes non productifs et la longueur des distances de liaisons hydrogène formées par l'His224 avec les atomes d'oxygène O₁₂ de l'alcool et O_γ de la Ser105 ne peuvent pas être utilisées pour expliquer l'énantiosélectivité. En effet, ces résultats ne semblent montrer aucune différence significative entre les énantiomères *R* et *S*, ou même parfois elles vont à l'inverse des résultats obtenus expérimentalement, qui montrent une préférence de l'enzyme pour la forme *R*.

Pour finir, afin de sélectionner les structures les plus stables, un dernier crible énergétique a été appliqué. La comparaison, selon l'énergie potentielle du substrat, des structures ainsi retenues a été utilisée avec succès, pour déterminer l'énantiopréférence de la CALB vis-à-vis des formes *R* du pentan-2-ol et du butan-2-ol : les structures de ces formes ont été trouvées plus stables. Ce crible énergétique plus sophistiqué a permis une explication **qualitative** de l'énantiosélectivité.

Notre but, qui était de trouver un critère prédictif **quantitatif** de l'énantiosélectivité de la CALB, n'a pas pu être atteint. Cet objectif était peut-être trop ambitieux. En effet, les ratios énantiomériques mesurés pour le butan-2-ol et le pentan-2-ol sont de 4 et 100, respectivement, ce qui correspond à une variation d'énergie potentielle $\Delta_{R,S}\Delta G$ faible, d'environ 0,9 et 2,9 kcal.mol⁻¹.

A l'issue de cette étude par modélisation moléculaire, il apparaît que l'énantiosélectivité ne puisse pas être expliquée par de simples différences structurales entre les intermédiaires formés avec les deux énantiomères. Nous avons donc étudié de nouveaux paramètres pouvant influencer l'énantiosélectivité de la CALB lors de la résolution des alcools secondaires à l'aide du réacteur solide/gaz. Ce réacteur présente en effet l'avantage majeur de pouvoir fixer

et contrôler de manière indépendante toutes les activités thermodynamiques des substrats et autres composés ajoutés dans le flux gazeux. Il est donc possible d'étudier le rôle d'un composé particulier, toutes choses égales par ailleurs. De plus, on peut travailler uniquement avec l'enzyme et les substrats sans autre composé ajouté, ce qui permet d'accéder aux paramètres cinétiques et thermodynamiques intrinsèques de l'enzyme.

Ainsi, en utilisant des variants de la CALB avec des mutations situées à l'entrée de la crevasse menant au site actif, nous avons montré, que les résidus hydrophobes formant le canal d'accès du substrat au site actif (Ile189, Leu278 et Ala282), jouaient un rôle significatif dans l'énantiosélectivité de la CALB vis-à-vis des alcools secondaires. Dans le cas du pentan-2-ol, nous avons montré que ces mutations, en plus de perturber l'accès de cet alcool au site actif, modifiaient également les paramètres thermodynamiques d'activation de son acylation. Ainsi, il semblerait qu'un élargissement du tunnel d'accès puisse favoriser l'entrée de la forme *S* au site actif (notre hypothèse de départ) mais également perturber la fixation de l'énantiomère *R*. Ces hypothèses devront être vérifiées par modélisation moléculaire.

L'influence de la partie alkoxy du donneur d'acyle sur le ratio énantiomérique *E* a également pu être mise en évidence en utilisant différents donneurs d'acyle (avec chaîne alkyle linéaire de longueur variable et avec chaîne alkyle chirale). L'augmentation la plus importante de *E* a été observée pour un donneur d'acyle dont la structure était semblable à celle du pentan-2-ol (alcool à résoudre) : le 1-méthylpentyl propionate. De plus, l'étude avec les formes énantiopures du 1-méthylpentyl propionate a montré que les deux formes influencent l'énantiosélectivité de la CALB de façon opposée. Ces résultats suggèrent que cette lipase peut mémoriser au niveau de son site actif les déformations laissées par les structures des composés avec lesquels elle interagit. La fixation d'un deuxième substrat ayant une conformation semblable à celle d'un premier substrat précédemment lié à l'enzyme, serait favorisée. Ceci pourrait être confirmé par des expériences de co-lyophilisation de l'enzyme avec les énantiomères de l'alcool à résoudre pris séparément.

Par ailleurs, nous avons montré que les paramètres thermodynamiques d'activation ($\Delta_{R-S}\Delta H^\ddagger$ et $\Delta_{R-S}\Delta S^\ddagger$) de la réaction d'acylation du pentan-2-ol catalysée par les variants de la CALB portant des mutations isostériques (Thr42Val ; Ser47Ala et Thr42ValSer47Ala) sont différents de ceux obtenus avec l'enzyme sauvage. Pour ces variants, nous avons supposé, que ces variations pouvaient être reliées à des modifications du réseau de liaisons hydrogène formé entre les résidus de la poche, induisant une liberté de mouvement accrue des chaînes

latérales de ces résidus, et éventuellement du substrat. Une étude par modélisation moléculaire pourrait confirmer ces suppositions.

Enfin, au vu de l'effet important de l'eau sur l'énantiosélectivité de la CALB, démontrée au cours d'études précédentes, nous avons cherché à déterminer l'état d'hydratation de la CALB immobilisée en fonction de l' a_w , de façon à mieux comprendre l'origine de cet effet. Pour cela nous avons utilisé deux méthodes : la détermination de l'isotherme d'adsorption de l'eau et la chromatographie en phase gazeuse inverse en dilution infinie.

Le traitement des résultats d'isothermes d'adsorption par le modèle de Brauner-Emmett-Teller (BET) nous a suggéré que peu de molécules d'eau fixées par molécule d'enzyme sont nécessaires pour former une monocouche d'eau. Ceci nous a conduit à penser que cette monocouche d'eau était discontinue, recouvrant uniquement les groupements polaires ou que l'enzyme n'était pas complètement déshydratée dans une atmosphère à humidité relative nulle. En effet, il est possible qu'une certaine quantité d'eau soit emprisonné dans la structure de la CALB même après la lyophilisation et séchage, impliquant une réduction de la quantité d'eau nécessaire pour la formation d'une monocouche.

Les résultats d'adsorption des sondes polaires et apolaires sur la CALB immobilisée obtenus à l'aide de la chromatographie gazeuse en phase inverse (IGC) à des différents taux d'humidité relatives, nous ont permis de montrer, indirectement, que l'eau se fixait progressivement sur les sites chargés et polaires à la surface de l'enzyme à faible humidité ($0 < a_w < 0,1$), puis continuait à se fixer sur la surface progressivement jusqu'à une a_w égale à 0,25. Au-delà de cette valeur nous pouvons supposer que l'enzyme est complètement recouverte par l'eau, ou que seulement des zones fortement apolaires restent découvertes. A l'aide de cette technique nous avons également mis en évidence le caractère acide de la CALB immobilisée sur Chromosorb. Cette acidité est partiellement due aux groupements silanols persistant après silanisation au niveau du support, mais également à l'enzyme (la CALB immobilisée présente un caractère plus acide que le Chromosorb seul).

L'étude de l'effet de l'hydratation sur l'adsorption du pentan-2-ol et de l'hexan-3-ol nous a suggéré qu'il y avait un recouvrement de la surface de la lipase immobilisée par des molécules d'eau adsorbées, qui, dans une situation compétitive d'adsorption, rendaient progressivement les sites de fixations polaires indisponibles pour ces alcools. Pour chacun des deux alcools, il existe une valeur d' a_w à partir de laquelle l'eau doit être déplacée de la surface

pour que l'alcool puisse s'y adsorber. Ces valeurs d' a_w caractéristiques ont pu être reliées aux variations de E observées lors de la résolution de ces alcools, par transestérification catalysée par la CALB (immobilisée) dans le réacteur solide/gaz.

Au vu de ces résultats, dont l'interprétation n'est pas toujours facile, nous pouvons dire que l'énantiosélectivité de la CALB est un phénomène complexe. Elle ne peut pas être simplement expliquée par une différence d'enthalpie d'activation mesurée entre les états de transition formés avec les énantiomères R et S de l'alcool à résoudre. Nous avons montré que le terme entropique ne peut pas être négligé. L'énantiosélectivité dépend également des composés (substrat ou autre composé chimique présent dans le milieu lors de la réaction) rencontrés par l'enzyme avant la fixation du substrat, de l'orientation de ces composés au sein du site actif et du chemin parcouru par le substrat jusqu'au site actif. Enfin, l'état d'hydratation et l'énantiosélectivité de la CALB sont fortement liés, et l'eau peut avoir des rôles multiples, qui tour à tour favorisent ou défavorisent l'énantiosélectivité.

Bien que nous ayons progressé dans la compréhension de l'énantiosélectivité, il reste encore beaucoup de questions en suspens : Quelle est l'implication réelle des résidus situés à l'entrée du site actif dans l'énantiosélectivité ? Comment expliquer les variations des paramètres thermodynamiques d'activation ? Quels sont les phénomènes/résidus impliqués dans la mémorisation des structures ? Comment optimiser davantage les réactions catalysées par la CALB ?

Des études plus approfondies peuvent être envisagées afin de vérifier nos hypothèses émises au cours de ce travail et de mieux comprendre les effets des différents paramètres environnementaux et structuraux sur l'énantiosélectivité de la CALB. Les techniques utilisées pour les travaux présentées, ayant chacune leurs avantages, peuvent continuer à être exploitées pour la compréhension des effets du microenvironnement sur l'activité et la spécificité enzymatique (réacteur solide/gaz et IGC) et la compréhension des éléments structuraux impliqués dans chaque étape de la réaction (l'entrée des substrats, la reconnaissance et la fixation des substrats, la catalyse, et enfin la sortie de produits formés) (modélisation moléculaire).

Les simulations de modélisation moléculaire futures devront être envisagées différemment afin d'obtenir une explication quantitative de l'énantiosélectivité. En effet, il serait souhaitable de laisser plus de liberté au système et d'utiliser la dynamique moléculaire, ce qui

permettrait de prendre en compte l'entropie, qui comme nous l'avons montré, joue un rôle important dans l'énantiosélectivité. Par ailleurs, notre étude sur l'hydratation de la CALB nous laisse penser que l'enzyme fixe fortement quelques molécules d'eau même après séchage en conditions extrêmes. Il serait alors judicieux de prendre en compte ces molécules d'eau dans les simulations. De plus, l'accès du substrat jusqu'au site catalytique ne devrait pas être négligé. Une fois établi ce nouveau protocole, tenant compte de tous les paramètres pouvant influencer l'énantiosélectivité, il serait envisageable de tester d'autres alcools et si les résultats issus des simulations sont corrélées à ceux de l'expérience, cette technique pourrait être utilisée pour prédire efficacement l'énantiosélectivité de la CALB vis-à-vis de nouveaux substrats.

Références bibliographiques

A

- Affleck R., Haynes C. A., Clark D. S.** (1992). Solvent dielectric effects on protein dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89(11),5167-5170.
- Ambarkhane A. V., Pincott K., Buckton G.** (2005). The use of inverse gas chromatography and gravimetric vapour sorption to study transitions in amorphous lactose. *International J. of Pha.* 294,129-135.
- Anderson E. M., Larsson K. M., Kirk O.** (1998). One biocatalyst-many applications: the use of *Candida antarctica* B-lipase in organic synthesis. *Biocatalysis Biotransformations* 16,181-204.
- Anthonsen T., Hoff B. H.** (1998). Resolutions of derivatives of 1,2-propanediol with lipase B from *Candida antarctica*. Effect of substrate structure, medium, water activity and acyl donor on enantiomeric ratio. *Chem. Phys. Lipids* 93,199-207.
- Anthonsen T., Jongejan J. A.** (1997). Solvent Effect in Lipase-Catalysed racemate Resolution. *Methods in enzymology* 286,473-495.
- Arroyo M., Sinisterra J. V.** (1994). High enantioselective esterification of 2-aryl propionic acids catalyzed by immobilized lipase from *Candida antarctica*: a mechanistic approach. *Journal of Organic Chemistry* 59,4410-4417.
- Avdagic A., Lesac A., Majer Z., Hollosi M., Sunjic V.** (1998). Lipase-catalysed acetylation of 3-substituted 2,3-dihydro-1H-1,4-benzodiazepin-2-ones: Effects of temperature and conformation on enantioselectivity and configuration. *Helv. Chim. Acta.* 81,1567-1582.

B

- Barzana E., Klibanov A., Karel M.** (1987). Enzyme-catalysed gas-phase reactions. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 15,25-34.
- Barzana E., Klibanov A., Karel M.** (1989). A colorimetric method for the enzymatic analysis of gases: the determination of ethanol and formaldehyde vapors using solid alcohol oxydase. *Anal. Biochem.* 182,109-115.
- Batko K., Voelkel A.** (2007). Inverse gas chromatography as a tool for investigation of nanomaterials. *Journal of Colloid and Interface Science* 315(2),768-771.
- Berendsen H. J. C., Postma J. P. M., Van Gunsteren W. F., Dinola A., Haak J. R.** (1984). Molecular dynamics with coupling to an external bath. *The Journal of Chemical Physics* 81(8),3684-3690.

- Berger B., Faber K.** (1991). 'Immunization' of lipase against acetaldehyde emerging in acyl transfer reactions from vinyl acetate. *Journal of the Chemical Society - Series Chemical Communications*(17),1198-1200.
- Berglund P., Holmquist M., Hult K., Hogberg H. E.** (1995). Alcohols as enantioselective inhibitors in a lipase catalysed esterification of a chiral acyl donor. *Biotechnology Letters* 17(1),55-60.
- Berman H. M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T. N., Weissig H., Shindyalov I. N., Bourne P. E.** (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research* 28(1),235-242.
- Binns F., Harffey P., Roberts S. M., A. T.** (1998). Studies of lipase-catalyzed polyesterification of an unactivated diacid/diol system." 36 2069-2080. *Journal of polymer Science:Part A:Polymer Chemistry* 36,2069-2080.
- Bocola M., Stubbs M. T., Sotriffer C., Hauer B., Friedrich T., Dittrich K., Klebe G.** (2003). Structural and energetic determinants for enantiopreferences in kinetic resolution of lipases. *Protein Engineering* 16(5),319-322.
- Borch J.** (1991). Thermodynamics of polymer-paper adhesion. A review. *Journal of Adhesion Science and Technology* 5(7),523-541.
- Bousquet-Dubouch M. P., Graber M., Sousa N., Lamare S., Legoy M. D.** (2001). Alcoholysis catalyzed by *Candida antarctica* lipase B in a gas/solid system obeys a Ping Pong Bi Bi mechanism with competitive inhibition by the alcohol substrate and water. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1550(1),90-99.
- Boutboul A., Giampaoli P., Feigenbaum A., Ducruet V.** (2002b). Influence of the nature and treatment of starch on aroma retention. *Carbohydrate Polymers* 47(1),73-82.
- Boutboul A., Lenfant F., Giampaoli P., Feigenbaum A., Ducruet V.** (2002). Use of inverse gas chromatography to determine thermodynamic parameters of aroma-starch interactions. *Journal of Chromatography A* 969,9-16.
- Boutboul A., Lenfant F., Giampaoli P., Feigenbaum A., Ducruet V.** (2002a). Use of inverse gas chromatography to determine thermodynamic parameters of aroma-starch interactions. *Journal of Chromatography A* 969(1-2),9-16.
- Bovara R., Carrea G., Ferrara L., Riva S.** (1991). Resolution of *trans*-sobrerol by lipase PS catalyzed transesterification and effects of organic solvents on enantioselectivity *Tetrahedron Asymmetry* 2, 931-938.
- Branco R. J. F., Graber M., Denis V., Pleiss J.** (2009). Molecular mechanism of the hydration of *Candida antarctica* lipase B in the gas phase: Water adsorption isotherms and molecular dynamics simulations. *ChemBioChem* 10(18),2913-2919.
- Branneby C., Carlqvist P., Hult K., Brinck T., Berglund P.** (2004). Aldol additions with mutant lipase: Analysis by experiments and theoretical calculations. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 31(4-6),123-128.

- Branneby C., Carlqvist P., Magnusson A., Hult K., Brinck T., Berglund P.** (2003). Carbon-carbon bonds by hydrolytic enzymes. *Journal of the American Chemical Society* 125(4),874-875.
- Brendlé E.** (1997). Etude des propriétés de surface d'oxydes de fer (goethite, hématite). Influence de traitements thermiques, thèse de l'Université de Haute Alsace. Mulhouse, 336 p.
- Brendlé E., Papirer E.** (1997). A new topological index for molecular probes used in inverse gas chromatography : 2 Application for the evaluation of the solid surface specific interaction potential. *Journal of Colloid and Interface Science* 194(1),217-224.
- Brossat M., Moody T. S., Nanteuil F. D., Taylor S. J. C., Vaughan F.** (2009). Development of an acid-washable tag for the separation of enantiomers from bioresolutions. *Organic Process Research and Development* 13(4),706-709.
- Brunauer S., Deming L. S., Deming W. E., Teller E.** (1940). On a theory on the Van der Waals adsorption of gases. *Journal of the American Chemical Society* 62,1723-1732.
- Brunauer S., Emmett P. H., Teller E.** (1938). Adsorption of gases in multi molecular layers. *Journal of American Chemical Society* 60,309-319.
- Brunet C.** (2000). Transestérification énantiosélective catalysée par la lipase de *Candida antarctica* immobilisée. Application à la résolution de précurseurs d'analogues d'hormones d'insectes, thèse de l'Université de la Rochelle. La Rochelle, 107 p.
- Burkert U., Allinger N. L.** (1982). *Molecular Mechanics*. ACS Monograph 177, American Chemical Society, Washington, DC.

C

- Cantergiani E., Benczedi D.** (2002). Use of inverse gas chromatography to characterize cotton fabrics and their interactions with fragrance molecules at controlled relative humidity. *Journal of Chromatography A* 969,103-110.
- Carlqvist P., Eklund R., Hult K., Brinck T.** (2003). Rational design of a lipase to accommodate catalysis of Baeyer-Villiger oxidation with hydrogen peroxide. *Journal of Molecular Modeling* 9(3),164-171.
- Caro Y., Pina M., Turon F., Guilbert S., Mougeot E., Fetsch D. V., Attwool P., Graille J.** (2002). Plant lipases: Biocatalyst aqueous environment in relation to optimal catalytic activity. *Biotechnology and Bioengineering* 77(6),693-703.
- Carrea G., Ottolina G., Riva S.** (1995). Role of solvents in the control of enzyme selectivity in organic media. *Trends in Biotechnology* 13,63-70.
- Chen C.-S., Fujimoto Y., Girdaukas G., Sih J. C.** (1982). Quantitative analyses of biochemical kinetic resolution of enantiomers. *Journal of the American Chemical Society* 104,7294-7299.

- Chen C.-S., Sih J. C.** (1989). General aspects and optimization of enantioselective biocatalysis in organic solvents: the use of lipases. *Angewandte Chemie Int. Ed.* 28,695-707.
- Chen C.-S., Wu S.-H., Girdaukas G., Sih C. J.** (1987). Quantitative analyses of biochemical kinetic resolution of enantiomers. 2- Enzyme-catalysed esterifications in water-organic solvent biphasic systems. *Journal of the American Chemical Society* 109,2812-2817.
- Chen X.-Y., Zong M.-H., Lou W.-Y., Wu H.** (2008). Highly efficient Regioselective Synthesis of 5'-O-lauryl-5-azacytidine catalysed by *Candida antarctica* lipase B. *Appl Biochem Biotechnol* 151,21-28.
- Chua L. S., Sarmidi M. R.** (2005). Enzymatic enantioselective acylation of sterically aromatic secondary alcohol. *Developments in Chemical Engineering and Mineral Processing* 13(5-6),605-616.
- Colombo G., Carrea G.** (2002). Modeling enzyme reactivity in organic solvents and water through computer simulations *Journal of Biotechnology* 96,23-33.
- Colombo G., Ottolina G., Carrea G., Merz Jr. K. M.** (2000). Modelling the enantioselectivity of subtilisin in water and organic solvents: insights from molecular dynamics and quantum mechanical/molecular mechanical studies. *Chemical Communications*(7),559-560.
- Colombo G., Toba S., Merz Jr. K. M.** (1999). Rationalization of the enantioselectivity of subtilisin in DMF. *Journal of American Chemical Society* 121,3486-3493.
- Comte S.** (2004). Couplage de la chromatographie gazeuse inverse à un générateur d'humidité. Etude de l'hydrophilie de surface de solides divisés et des limites de la technique, thèse de l' Institut National Polytechnique de Toulouse. Toulouse.
- Comte S., Calveta R., Doddsa J. A., Balard H.** (2005). Surface properties of low specific surface powders using inverse gas chromatography. *Powder Technology* 157,39-47.
- Condor J. R., Young C. L.** (1979). *Physicochemical Measurement by Gas Chromatography*, John Wiley and Sons, Chichester.
- Connolly M. L.** (1983). Solvent-accessible surfaces of proteins and nucleic acids. *Science* 221(4612),709-713.
- Córdova A., Hult A., Hult K., Ihre H., Iversen T., Malmstrom E.** (1998). Synthesis of a poly(ϵ -caprolactone) monosubstituted first generation dendrimer by lipase catalysis. *Journal of the American Chemical Society* 120(51),13521-13522.
- Cygler M., Grochulski P., Kazlauskas R. J., Schrag J. D., Bouthillier F., Rubin B., Serreqi A., Gupta A. K.** (1994). Molecular basis for the chiral preference of lipases. *Journal of American Chemical Society* 116, 3180-3186.

D

- Daggett V., Schröder S., Kollman P.** (1991). Catalytic pathway of serine proteases: classical and quantum-mechanical calculations. *Journal of American Chemical Society* 113,8926-8935.
- De Boer J. H., Kruyer S.** (1952). Entropy and mobility of adsorbed molecules. I) Procedure; atomic gases on charcoal. *Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen*, 55,452-463.
- de la Casa R. M., Guisan J. M.** (2002). Modification of the activities of two different lipases from *Candida rugosa* with dextrans. *Enzyme and Microbial Technology* 30,30-40.
- De Oliveira E. B., Humeau C., Chebil L., Maia E. R., Dehez F., Maigret B., Ghouli M., Engasser J.-M.** (2009). A molecular modelling study to rationalize the regioselectivity in acylation of flavonoid glycosides catalyzed by *Candida antarctica* lipase B. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 59,96-105.
- Demertzis P. G., Riganakos K. A., Giannakakos P. N.** (1991). Study of water behavior of pectins using a computerized elution gas chromatographic technique. *J. Sci. Food Agric.* 54,421-428.
- Derewenda U., Brzozowski A. M., Lawson D. M., Derewenda Z. S.** (1992a). Catalysis at the interface: The anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. *Biochemistry* 31(5),1532-1541.
- Derewenda Z. S., Derewenda U., Dodson G. G.** (1992b). The crystal and molecular structure of the *Rhizomucor miehei* triacylglyceride lipase at 1.9 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* 227(3),818-839.
- Derminot J.** (1981). Physicochimie de polymères & surfaces par chromatographie gazeuse. collection de l'ANRT, Paris, 178 p.
- Desiraju G., Steiner T.** (1999). The weak hydrogen bond. IUCr monographs on crystallography.
- DeTar D. F.** (1981). Computation of enzyme-substrate specificity. *Biochemistry* 20,1730-1743.
- Dimoula K., Pohl M., Büchs J., Spiess A. C.** (2009). Substrates and water adsorption phenomena in a gas/solid enzymatic reactor. *Biotechnol. J.* 4:1-10. . *Biotechnol. J.* 4,1-10.
- Dinh P. M., Howarth J. A., Hudnott A. R., Williams J. M. J., Harris W.** (1996). Catalytic racemisation of alcohols: Applications of enzymatic resolution reactions. *Tetrahedron Letters* 37(42),7623-7626.
- Donnet J. B., Park S. J., Ballard H.** (1991). Evaluation of specific interactions of solid surfaces by inverse gas chromatography: a new approach based on polarizability of the probes. *Chromatographia* 31(9/10),434-440.

Dove J. W., Buckton G., Doherty C. (1996). A comparison of tpo contact angle measurement methods and inverse gas chromatography to asses the surface energies of theophylline and caffeine. *International J. of Pha* . 138,199-206.

Ducret A., Trani M., Lorti R. (1998). Lipase-catalyzed enantioselective esterification of ibuprofen in organic solvents under controlled water activity. *Enzyme and Microbial Technology* 22(4),212-216.

E

Emmett P. H., Brunauer S. (1937). The use of low temperature Van der Waals adsorption isotherms in determining the surface area of iron synthetic ammonia catalysts. *Journal of American Chemical Society* 59,1553-1564.

Erable B., Maugard T., Goubet I., Lamare S., Legoy M. D. (2005). Biotransformation of halogenated compounds by lyophilized cells of *Rhodococcus erythropolis* in a continuous solid-gas biofilter. *Process Biochemistry* 40(1),45-51.

F

Faber K. (2000). Biotransformation in organic chemistry, Springer-Verlag.

Faber K., Riva S. (1992). Enzyme-catalysed irreversible acyl transfer . *Synthesis*,895-910.

Feeley J., York P., Sumbly B. S., Dicks H. (1998b). The Use of Inverse Gas Chromatography (IGC) to highlight Batch-to-Batch variations in powders used for dry powder inhalers (DPIs). *Drug delivery to the lungs-aerosol society* 8,159-162.

Feeley J. C., York P., Sumbly B. S., Dicks H. (1998a). Determination of surface properties and flow characteristics of salbutamol sulphate, before and after micronisation. *International J. of Pha* . 172(1-2),89-96.

Fekete E., Móczó J., Pukánszky B. (2004). Determination of the surface characteristics of particulate fillers by inverse gas chromatography at infinite dilution: a critical approach. *Journal of Colloid and Interface Science* 269,143–152.

Fetsch D. (2000). Dynamic Vapor System Guide/ Manuel de l'utilisation. SMS V.8.2.

Fitzpatrick P. A., Klibanov A. M. (1991). How can the solvent affect enzyme enantioselectivity? *Journal of the American Chemical Society* 113,3166-3171.

Forro E., Kanerva F., Fülöp F. (1998). Lipase-catalyzed resolution of 2-dialkylaminomethylcyclohexanols. *Tetrahedron Asymmetry* 9,513-520.

Frykman H., Ohrner N., Norin T., Hult K. (1993). S-ethyl thiooctanoate as acyl donor in lipase catalysed resolution of secondary alcohols. *Tetrahedron Letters* 34(8),1367-1370.

Fuglseth E., Anthonsen T., Hoff B. H. (2006). New chiral building blocks from acetovanillone using lipase A and B from *Candida antarctica*. *Tetrahedron Asymmetry* 17(8),1290-1295.

G

Garcia-Urdiales E., Rebolledo F., Gotor V. (2001). Kinetic Resolution of (\pm)-1-Phenylbutan-1-ol by Means of CALB-Catalyzed Aminolyses: A Study on the Role of the Amine in the Alcohol Resolution. *Advanced Synthesis and Catalysis* 343(6-7),646-654.

Gaskin D. J. H., Romojaro A., Turner N. A., Jenkins J., Vulfson E. N. (2001). Alteration of lipase chain length specificity in the hydrolysis of esters by random mutagenesis. *Biotechnology and Bioengineering* 73(6),433-441.

Gonzalez-Sabin J., Gotor V., Rebolledo F. (2004). Kinetic resolution of (\pm)-*trans*- and (\pm)-*cis*-2- phenylcyclopentanamine by CALB-catalyzed aminolysis of esters: The key role of the leaving group. *Tetrahedron Asymmetry* 15(3),481-488.

Goubet I., Maugard T., Lamare S., Legoy M. D. (2002). Role of water activity and temperature on activity and stability of dried whole cells of *Saccharomyces cerevisiae* in a continuous solid-gas bioreactor. *Enzyme and Microbial Technology* 31(4),425-430.

Graber M., Bousquet-Dubouch M. P., Lamare S., Legoy M. D. (2003a). Alcoholysis catalyzed by *Candida antarctica* lipase B in a gas/solid system: Effects of water on kinetic parameters. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1648(1-2),24-32.

Graber M., Bousquet-Dubouch M. P., Sousa N., Lamare S., Legoy M. D. (2003b). Water plays a different role on activation thermodynamic parameters of alcoholysis reaction catalyzed by lipase in gaseous and organic media. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1645(1),56-62.

Graber M., Irague R., Rosenfeld E., Lamare S., Franson L., Hult K. (2007). Solvent as a competitive inhibitor for *Candida antarctica* lipase B. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1774(8),1052-1057.

Griebenow K., Klibanov A. M. (1996). On protein denaturation in aqueous-organic mixtures but not in pure organic solvents. *Journal of the American Chemical Society* 118(47),11695-11700.

Guieysse D. (2002). Dédoublément enzymatique d'acides α -halogéno aryl acétique: Approche expérimentale et modélisation moléculaire, thèse de l' Institut National des Sciences appliquées de Toulouse. Toulouse, 232 p.

- Guiysse D., Salagnad C., Monsan P., Remaud-Simeon M., Tran V.** (2003). Towards a novel explanation of *Pseudomonas cepacia* lipase enantioselectivity via molecular modelling of the enantiomer trajectory into the active site. *Tetrahedron Asymmetry* 14,1807-1817.
- Gutiérrez M. C., Osuna S., Baraibar I.** (2005). Solide surface mapping by inverse gas chromatography. *Journal of Chromatography A* 1087,142-149.
- Guttman V.** (1978). The donor-acceptor approach to molecular interactions, Plenum Press, New York, 87 p.

H

- Hæffner F., Norin T.** (1999). Molecular Modelling of lipase catalysed Reactions. Prediction of Enantioselectivities. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 47(5),591-600.
- Hæffner F., Norin T., Hult K.** (1998). Molecular modeling of the enantioselectivity in lipase-catalyzed transesterification reactions. *Biophysical Journal* 74(3),1251-1262.
- Halling P.** (1994). Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventionnal media: theory, tests and recommendations for experimental design and analysis. *Enzyme Microb.Technol.* 16,178-206.
- Halling P. J.** (1992). Salt hydrates for water activity control with biocatalysts in organic media. *Biotechnology Techniques* 6(3),271-276.
- Hamieh T., Fadlallah M. B., Schultz J.** (2002). New approach to characterise physicochemical properties of solid substrates by inverse gas chromatography at infinite dilution - III. Determination of the acid-base properties of some solid substrates (polymers, oxides and carbon fibres): A new model. *Journal of Chromatography A* 969(1-2),37-47.
- Hamieh T., Schultz J.** (1996). Etude par chromatographie gazeuse inverse de l'influence de la température sur l'aire de molécules adsorbées. *J. Chim. Phys.* 93(7),1292-1331.
- Hamieh T., Schultz J.** (2002a). New approach to characterise physicochemical properties of solid substrates by inverse gas chromatography at infinite dilution: I. Some new methods to determine the surface areas of some molecules adsorbed on solid surfaces. *Journal of Chromatography A* 969(1-2),17-25.
- Hamieh T., Schultz J.** (2002b). New approach to characterise physicochemical properties of solid substrates by inverse gas chromatography at infinite dilution: II. Study of the transition temperatures of poly(methyl methacrylate) at various tacticities and of poly(methyl methacrylate) adsorbed on alumina and silica. *Journal of Chromatography A* 969(1-2),27-36.
- Hayashi N., Welschof M., Zewe M., Braunagel M., Dubel S., Breitling F., Little M.** (1994). Simultaneous mutagenesis of antibody CDR regions by overlap extension and PCR. *Biotechniques* 17,310-315.

- Heermann D. W.** (1990). Computer simulation methods, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg.
- Heinsman N. W. J. T., Valente A. M., Smienk H. G. F., Van Padt A. D., Franssen M. C. R., De Groot A., Van Riet K. T.** (2001). The effect of ethanol on the kinetics of lipase-mediated enantioselective esterification of 4-methyloctanoic acid and the hydrolysis of its ethyl ester. *Biotechnology and Bioengineering* 76(3),193-199.
- Heng J. Y. Y., Pearse D. F., Thielmann F., Lampke T., Bismarck A.** (2007). Methods to determine surface energies of natural fibres: A review. *Composite Interfaces* 14(7-9),581-604.
- Heng J. Y. Y., Thielmann F., Williams D. R.** (2006). The effects of milling on the surface properties of form I paracetamol crystals. *Pharmaceutical Research* 23(8),1918-1927.
- Herruzo F. G., Maroto J. M. R., Delgado R. A. G., Lahoz C. G., Alonso C. V.** (1999). Column study of the influence of air humidity on the retention of hydrocarbons on oil. *Chemosphere* 41,1167-1172.
- Hidaka N., Matsumoto T.** (2000). Gaseous ethanol oxidation by immobilized enzyme in a packed bed reactor. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 39(4),909-915.
- Hoff B. H., Anthonsen H. W., Anthonsen T.** (1996). The enantiomer ratio strongly depends on the alkyl part of the acyl donor in transesterification with lipase B from *Candida antarctica*. *Tetrahedron Asymmetry* 7(11),3187-3192.
- Holmquist M., Haeffner F., Norin T., Hult K.** (1996). A structural basis for enantioselective inhibition of *Candida rugosa* lipase by long-chain aliphatic alcohols. *Protein Science* 5(1),83-88.
- Hu C. H., Brinck T., Hult K.** (1998). Ab initio and density functional theory studies of the catalytic mechanism for ester hydrolysis in serine hydrolases. *International Journal of Quantum Chemistry* 69(1),89-103.
- Husson E., Humeau C., Blanchard F., Framboisier X., Marc I., Chevalot I.** (2008). Chemo-selectivity of N,O-enzymatic acylation in organic media and in ionic liquids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 55,110-117.
- Husson E., Humeau C., Paris C., Vanderesse R., Framboisier X., Marc I., Chevalot I.** (2009). Enzymatic acylation of polar dipeptides: Influence of reaction media and molecular environment of functional groups. *Process Biochemistry* 44,428-434.

I

- Itoh T., Mitsukura K., Kanphai W., Takagi Y., Kihara H., Tsukube H.** (1997). Thiacycrown Ether Technology in Lipase-Catalyzed Reaction: Scope and Limitation for Preparing Optically Active 3-Hydroxyalkanenitriles and Application to Insect Pheromone Synthesis. *Journal of Organic Chemistry* 62(26),9165-9172.

Itoh T., Takagi Y., Murakami T., Hiyama Y., Tsukube H. (1996). Crown ethers as regulators of enzymatic reactions: Enhanced reaction rate and enantioselectivity in lipase-catalyzed hydrolysis of 2-cyano-1-methylethyl acetate. *Journal of Organic Chemistry* 61(6),2158-2163.

J

Jaeger K. E., Reetz M. T. (2000). Directed evolution of enantioselective enzymes for organic chemistry. *Current Opinion in Chemical Biology* 4(1),68-73.

Jaeger K.-E., Dijkstra B. W., Reetz M. T. (1999). Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures and Biotechnological Applications of Lipases. *Annual Reviews of Microbiology* 53,315-351.

Jaenicke R. (1991). Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions. *European Journal of Biochemistry* 202,715-728.

Joerger R. D., Haas M. J. (1994). Alteration of chain length selectivity of a *Rhizopus delemar* lipase through site-directed mutagenesis. *Lipids* 29(6),377-384.

Johnson C. R., Sakaguchi H. (1992). Enantioselective transesterifications using immobilised, recombinant *Candida antarctica* lipase B : resolution of 2-iodo-2-cycloalken-1-ols. *Synlett*,813-816.

Juhl P. B., Trodler P., Tyagi S., Pleiss J. (2009). Modelling substrate specificity and enantioselectivity for lipases and esterases by substrate-imprinted docking. *BMC Structural Biology* 9.

K

Karplus M., Petsko G. A. (1990). Molecular dynamics simulations in biology. *Nature* 347(6294),631-639.

Kazlauskas R. J. (1994). Elucidating structure-mechanism relationships in lipases: Prospects for predicting and engineering catalytic properties. *Trends in Biotechnology* 12(11),464-472.

Kazlauskas R. J. (2000). Molecular modeling and biocatalysis: Explanations, predictions, limitations, and opportunities. *Current Opinion in Chemical Biology* 4(1),81-88.

Kazlauskas R. J., Weissfloch A. N. E., Rappaport A. T., Cuccia L. A. (1991). A rule to predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions catalyzed by cholesterol esterase, lipase from *Pseudomonas cepacia*, and lipase from *Candida rugosa*. *Journal of Organic Chemistry* 56(8),2656-2665.

- Kemball C., Rideal E. K.** (1946). The adsorption of vapours on mercury. I) Non polar substances. *Proc. R. Soc. London, Ser A* 187,53-73.
- Kiselev A. V., Yashin I.** (1969). Gas Adsorption Chromatography, Plenum Press, New York.
- Klein R. R., King G., Moreau R. A., Haas M. J.** (1997). Altered acyl chain length specificity of *Rhizopus delemar* lipase through mutagenesis and molecular modeling. *Lipids* 32(2),123-130.
- Koellner G., Kryger G., Millard C. B., Silman I., Sussman J. L., Steiner T.** (2000). Active-site gorge and buried water molecules in crystal structures of acetylcholinestérase from *Torpedo californica*. *Journal of Molecular Biology* 296,713-735.
- Kourist R., Brundiek H., Bornscheuer U. T.** (2010). Protein engineering and discovery of Lipases. *European Journal of Lipid Science and Technology* 112(1),64-74.
- Kwon, Hoon C., Shin D. Y., Lee J. H., Kim S. W., Kang J. W.** (2007). Molecular modeling and its experimental verification for the catalytic mechanism of *Candida antarctica* lipase B. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 17(7),1098-1105.

ℒ

- Laane C., Boeren S., Vos K., Veeger C.** (1987). Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnology and Bioengineering* 30(1),81-87.
- Lagoudaki M., Demertzis P. G., Kontominas G.** (1993). Moisture adsorption behavior of pasta products. *Lebensm. Wiss. U. Technol.* 26(6),512-516.
- Lai D. T., O'Connor C. J.** (1999). Studies on synthesis of short chain alkyl esters catalyzed by goat pregastric lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 6,411-420.
- Lamare S., Legoy M. D.** (1995). Working at controlled water activity in a continuous process: the gas/solid system as a solution. *Biotechnology and Bioengineering* 45,387-397.
- Lamare S., Legoy M. D.** (1997). Kinetic studies of a *Fusarium solani pisi* cutinase used in a gas/solid system. Hydrolysis and transesterification reactions. *Biotechnology and Bioengineering* 56,1-8.
- Lamare S., Legoy M. D.** (1999). Procédé réactionnel par catalyse solide/gaz en milieu non conventionnel, réacteur correspondant et utilisation de ce réacteur. *International Patent*.
- Lamare S., Roule-Woiry K., Goubet I., Maugard T., Legoy M. D.** (2002). La biocatalyse solide/gaz. *Bioconversions*(août-septembre),43-47.
- Langmuir I.** (1918). The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. *Journal of the American Chemical Society* 40,1361-1403.

- Lee D., Choi Y. K., Kim M.-J.** (2000). Enhancing the enantioselectivity of lipase in transesterification by substrate matching: an enzyme memory based approach. *Organic Letters* 2(16),2553-2555.
- Lee S. B., Kim K.-J.** (1995). Effect of water activity on enzyme hydration and enzyme reaction rate in organic solvents. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 79(5),473-478.
- Léonard V.** (2007). Etude de l'énantiosélectivité de la lipase B de *Candida antarctica* à l'aide d'un bioréacteur solide-gaz, thèse de l' Université de la Rochelle. La Rochelle.
- Léonard V., Fransson L., Lamare S., Hult K., Graber M.** (2007). A water molecule in the stereospecificity pocket of *Candida antarctica* lipase B enhances enantioselectivity towards pentan-2-ol. *ChemBioChem* 8(6),662-667.
- Léonard-Nevers V., Marton Z., Lamare S., Hult K., Graber M.** (2009). Understanding water effect on *Candida antarctica* lipase B activity and enantioselectivity towards secondary alcohols. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 59(1-3),90-95.
- Létisse F., Lamare S., Legoy M. D., Graber M.** (2003). Solid/gas biocatalysis: An appropriate tool to study the influence of organic components on kinetics of lipase-catalyzed alcoholysis. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1652(1),27-34.
- Ley J. P., Hilmer J. M., Weber B., Krammer G., Gatfield I. L., Bertram H. J.** (2004). Stereoselective enzymatic synthesis of *cis*-pellitorine, a taste active alkamide naturally occurring in tarragon. *European Journal of Organic Chemistry*(24),5135-5140.
- Lopez-Serrano P., Wegman M. A., Van Rantwijk F., Sheldon R. A.** (2001). Enantioselective enzyme catalysed ammoniolysis of amino acid derivatives. Effect of temperature. *Tetrahedron Asymmetry* 12,235-240.
- Lovell S. C., Word J. M., Richardson J. S., Richardson D. C.** (2000). The penultimate rotamer library. *Proteins: Structure, Function and Genetics* 40(3),389-408.
- Lundhaug K., Overbeeke P. L. A., Jongejan J. A., Anthonsen T.** (1998). Organic co-solvent restore the inherently high enantiomeric ratio of lipase B from *Candida antarctica* in hydrolytic resolution by relieving the enantiospecific inhibition of product alcohol. *Tetrahedron Asymmetry* 9,2851-2856.

M

- MacKerell Jr A. D., Bashford D., Bellott M., Dunbrack Jr R. L., Evanseck J. D., Field M. J., Fischer S., Gao J., Guo H., Ha S. and others.** (1998). All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *Journal of Physical Chemistry B* 102(18),3586-3616.

- Magnusson A., Hult K., Holmquist M.** (2001). Creation of an enantioselective hydrolase by engineered substrate-assisted catalysis. *Journal of the American Chemical Society* 123(18),4354-4355.
- Magnusson A. O., Rotticci-Mulder J. C., Santagostino A., Hult K.** (2005). Creating space for large secondary alcohols by rational redesign of *Candida antarctica* lipase B. *ChemBioChem* 6(6),1051-1056.
- Marchand P., Crémont M., Lamare S., Goubet I.** (2009a). Dehalogenation of a gaseous effluent by dehydrated whole cells in a solid/gas reactor: A study of catalyst stability. *Biocatalysis and Biotransformation* 27(3),195-203.
- Marchand P., Lamare S., Legoy M. D., Goubet I.** (2009b). Dehalogenation of gaseous 1-chlorobutane by dehydrated whole cells: Influence of the microenvironment of the halidohydrolase on the stability of the biocatalyst. *Biotechnology and Bioengineering* 103(4),687-695.
- Marchand P., Rosenfeld E., Erable B., Maugard T., Lamare S., Goubet I.** (2008). Coupled oxidation-reduction of butanol-hexanal by resting *Rhodococcus erythropolis* NCIMB 13064 cells in liquid and gas phases. *Enzyme and Microbial Technology* 43(6),423-430.
- Martinelle M., Holmquist M., Hult K.** (1995). On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase. *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism* 1258(3),272-276.
- Martos C., Rubio F., Rubio J., Oteo J. L.** (2001). Surface energy of Silica-TEOS-PDMS Ormosils. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* 20,197-210.
- Maugard T., Rемаud-Simeon M., Petre D., Monsan P.** (1997). Enzymatic synthesis of glycamide surfactants by amidification reaction. *Tetrahedron* 53(14),5185-5194.
- Mavrynsky D., Päiviö M., Lundell K., Sillanpää R., Kanerva L. T., Leino R.** (2009). Dicarboxylchloro(pentabenzylcyclopentadienyl)ruthenium as racemization catalyst in the dynamic kinetic resolution of secondary alcohols. *European Journal of Organic Chemistry*(9),1317-1320.
- Maywald M., Pfaltz A.** (2009). Chromatography-free enzymatic kinetic resolution of secondary alcohols. *Synthesis*(21),3654-3660.
- Meng Z., Yamazaki T., Sode K.** (2004). A molecular imprinted catalyst designed by computational approach in catalysing a transesterification process. *Biosensors & Bioelectronics* 20,1068-1075.
- Menzel R., Lee A., Bismarck A., Shaffer M. S. P.** (2009). Inverse gas chromatography of as-received and modified carbon nanotubes. *Langmuir* 25(14),8340-8348.
- Merz Jr K. M., Banci L.** (1996). Binding of azide to human carbonic anhydrase II: The role electrostatic complementarity plays in selecting the preferred resonance structure of azide. *Journal of Physical Chemistry - US* 100(43),17414-17420.

- Micaêlo N. M., Soares C. M.** (2007). Modeling hydration mechanisms of enzymes in nonpolar and polar organic solvents. *FEBS Journal* 274(9),2424-2436.
- Mikolajek R., Spiess A. C., Pohl M., Lamare S., Büchs J.** (2007). An activity, stability and selectivity comparison of propion synthesis by thiamine diphosphate-dependent enzymes in a solid/gas bioreactor. *ChemBioChem* 8(9),1063-1070.
- Momany F. A., Rone R.** (1992). Validation of general purpose QANTA 3.2/CHARMm force field. *Journal of Computational Chemistry* 13(7),888-900.
- Morrone R., Nicolosi G., Patti A., Piattelli M.** (1995). Resolution of racemic flurbiprofen by lipase-mediated esterification in organic solvent. *Tetrahedron Asymmetry* 6(7),1773-1778.
- Mukhopadhyay P., Schreiber H. P.** (1995). Review: Aspects of acid-base interactions and use of inverse gas chromatography. *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 100,47-71.
- Muster T. H., Prestidge C. A., Hayes R. A.** (2001). Water adsorption kinetics and contact angles of silica particles. *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects* 176,253-266.

N

- Nagayama K., Spiess A. C., Büchs J.** (2010). Immobilization conditions of ketoreductase on enantioselective reduction in a gas-solid bioreactor. *Biotechnology Journal* 5(5),520-525.
- Nakamura K., Kawasaki M., Ohno A.** (1994). Effects of substrate structure on lipase-catalysed transesterifications of omega-substituted 1-alkanols in organic solvents. *Bull Chem Soc Jpn* 67,3053-3056.
- Nakamura K., Kawasaki M., Ohno A.** (1996). Lipase-catalysed transesterification of aryl-substituted alkanols in organic solvent. *Bull Chem Soc Jpn* 69,1079-1085.
- Nicolas A., Egmond M., Verrips C. T., de Vileg J., Longhi S., Cambillau C., Martinez C.** (1996). Contribution of cutinase Serine 42 side chain to the stabilisation of the oxyanion transition state. *Biochemistry* 35,398-410.
- Nicolosi G., Patti A., Piattelli M., Sanfilippo C.** (1995). Desymmetrization of cis-1,2-dihydroxycycloalkanes by stereoselective lipase mediated esterification *Tetrahedron Asymmetry* 6(2),519-524.
- Norin M., Häffner F., Achour A., Norin T., Hult K.** (1994). Computer modeling of substrate binding to lipases from *Rhizomucor miehei*, *Humicola lanuginosa* and *Candida rugosa*. *Protein Science* 3(9),1493-1503.

O

- Oger C., Marton Z., Brinkmann Y., Bultel-Poncé V., Durand T., Graber M., Galano J.-M. (2010). Lipase-catalyzed regioselective monoacetylation of unsymmetrical 1,5-primary diols. *Journal of Organic Chemistry* 75(6),1892-1897.
- Öhrner N., Martinelle M., Mattson A., Norin T., Hult K. (1994). Thioethyl-, vinyl-, ethyl octanoate esters and octanic acid as acyl donors in lipase catalysed acyl transfert reactions. *Biocatalysis* 9,106-114.
- Öhrner N., Orrenius C., Mattson A., Norin T., Hult K. (1996). Kinetic resolution of amine and thiol analogues of secondary alcohols catalyzed by *Candida antarctica* lipase B. *Enzyme and Microbial Technology* 19(5),328-331.
- Ohtani T., Nakatsukasa H., Kamezawa M., Tachibana H., Naoshima Y. (1998). Enantioselectivity of *Candida antarctica* lipase for some synthetic substrates including aliphatic secondary alcohols. *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic* 4,53-60.
- Ollis D. L., Cheah E., Cygler M., Dijkstra B., Frolow F., Franken S., Harel M., Remington S. J., Silman I. (1992). The α/β hydrolase fold. *Protein Engineering* 5,197-211.
- Onjia A. E., Milonjic S. K., Todorovic M., Loos-Neskovic C., Fedoroff M., Jones D. J. (2002). An inverse gas chromatography study of the adsorption of organics on nickel- and copper-hexacyanoferrates at zero surface coverage. *Journal of Colloid and Interface Science* 251(1),10-17.
- Orrenius C., Häffner F., Rotticci D., Öhrner N., Norin T., Hult K. (1998a). Chiral recognition of alcohol enantiomers in acyl transfer reactions catalysed by *Candida antarctica* lipase B. *Biocatalysis and Biotransformation* 16(1),1-15.
- Orrenius C., Mattson A., Norin T., Öhrner N., Hult K. (1994). Préparation of 1-pyridinylethanol of high enantiomeric purity by lipases catalysed transesterifications. *Tetrahedron Asymmetry* 5(7),1363-1366.
- Orrenius C., Norin T., Hult K., Carrea G. (1995a). The *Candida antarctica* lipase B catalysed kinetic resolution of seudenol in non-aqueous media of controlled water activity. *Tetrahedron Asymmetry* 6(12),3023-3030.
- Orrenius C., Öhrner N., Rotticci D., Mattson A., Hult K., Norin T. (1995b). *Candida antarctica* lipase B catalysed kinetic resolutions: Substrate structure requirements for the preparation of enantiomerically enriched secondary alcohols. *Tetrahedron Asymmetry* 6(5),1217-1220.
- Orrenius C., van Heusden C., van Ruiten J., Overbeeke P. L. A., Kierkels H., Jongejan J. A., Duine J. A. (1998b). Simple space search protocols for the evolution of enantioselectivity of lipases. *Protein Engineering* 11(12),1147-1153.
- Otten L. G., Quax W. J. (2005). Directed evolution: selecting today's biocatalysts. *Biomolecular Engineering* 22,1-9.

- Ottosson J.** (2001). Enthalpy and entropy in enzyme catalysis - A study of lipase enantioselectivity, thèse de l' Royal Institute of Technology. Stockholm, Suède.
- Ottosson J., Fransson L., Hult K.** (2002a). Substrate entropy in enzyme enantioselectivity: An experimental and molecular modeling study of a lipase. *Protein Science* 11(6),1462-1471.
- Ottosson J., Fransson L., King J. W., Hult K.** (2002b). Size as a parameter for solvent effects on *Candida antarctica* lipase B enantioselectivity. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1594(2),325-334.
- Ottosson J., Hult K.** (2001). Influence of acyl chain length on the enantioselectivity of *Candida antarctica* lipase B and its thermodynamic components in kinetic resolution of sec-alcohols. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic* 11(4-6),1025-1028.
- Ottosson J., Rotticci-Mulder J. C., Rotticci D., Hult K.** (2001). Rational design of enantioselective enzymes requires considerations of entropy. *Protein Science* 10(9),1769-1774.
- Overbeeke P. L. A., Jongejan J. A., Heijnen J. J.** (2000). Solvent effect on lipase enantioselectivity. Evidence of two thermodynamic states. *Biotechnology and Bioengineering* 70,278-290.
- Overbeeke P. L. A., Orrenius C., Jongejan J. A., Duine J. A.** (1998). Enthalpic and entropic contributions to lipase enantioselectivity. *Chemistry and Physics of Lipids* 93(1-2),81-93.
- Overbeeke P. L. A., Ottosson J., Hult K., Jongejan J. A., Duine J. A.** (1999). The temperature dependence of enzymatic kinetic resolutions reveals the relative contribution of enthalpy and entropy to enzymatic enantioselectivity. *Biocatalysis and Biotransformation* 17(1),61-79.
- Overmeyer A., Schrader-Lippelt S., Kasche V., Brunner G.** (1999). Lipase-catalysed kinetic resolution of racemates at temperatures from 40°C to 160°C in supercritical CO₂. *Biotechnology Letters* 21,65-69.

P

- Pandey A., Benjamin S., Soccol C. R., Nigam P., Krieger N., Soccol V. T.** (1999). The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology and applied biochemistry* 29,119-131.
- Panzer U., Schreiber H.** (1992). On the evaluation of surface interactions by inverse gas chromatography. *Macromolecules* 25,3633-3637.
- Papirer E., Brendlé E.** (1998). Progrès récents dans l'utilisation de la chromatographie gazeuse inverse pour la détermination des propriétés acide-base des surfaces solides. *J. Chim. Phys.* 95,122-149.

- Papirer E., Perrin J. M., Siffert B., Philipponneau G.** (1991). Surface characteristics of aluminas in relation with polymer adsorption. *Journal of Colloid And Interface Science* 144(1),263-270.
- Parker M. C., Brown S. A., Robertson L., Turner N. J.** (1998). Enhancement of *Candida antarctica* lipase B enantioselectivity and activity in organic solvents. *Chemical Communications*(20),2247-2248.
- Parker M. C., Moore B. D., Blacker A. J.** (1995). Measuring enzyme hydration in nonpolar organic solvents using NMR. *Biotechnology and Bioengineering* 46(5),452-458.
- Parvaresh F., Robert H., Thomas D., Legoy M. D.** (1992). Gas phase transesterification reactions catalyzed by lipolytic enzymes. *Biotechnology and Bioengineering* 39,467-473.
- Patel R. N.** (2001). Biocatalytic synthesis of intermediates for the synthesis of chiral drug substances. *Current Opinion in Biotechnology* 12(6),587-604.
- Patel R. N., Banerjee A., Nanduri V., Goswami A., Comezoglu F. T.** (2000). Enzymatic resolution of racemic secondary alcohols by lipase B from *Candida antarctica*. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 77(10),1015-1019.
- Patkar S. A., Svendsen A., Kirk O., Clausen I. G., Borch K.** (1997). Effect of mutation in non-consensus sequence Thr-X-Ser-X-Gly of *Candida antarctica* lipase B on lipase specificity, specific activity and thermostability. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic* 3(1-4),51-54.
- Pavlidou S., Papaspyrides C. D.** (2003). The effect of hygrothermal history on water sorption and interlaminar shear strength of glass/polyester composites with different interfacial strength, *Composites Part A : applied science and manufacturing*. *Composites Part A : applied science and manufacturing* 34,1117-1124.
- Pepin P., Lortie R.** (1999). Influence of water activity on the enantioselective esterification of (*R,S*)-ibuprofen by *Candida antarctica* lipase B in solventless media. *Biotechnology and Bioengineering* 63(4),502-505.
- Persson B. A., Larsson A. L. E., Le Ray M., Bäckvall J. E.** (1999). Ruthenium- and enzyme-catalyzed dynamic kinetic resolution of secondary alcohols. *Journal of the American Chemical Society* 121(8),1645-1650.
- Persson M., Costes D., Wehtje E., Adlercreutz P.** (2002). Effects of solvent, water activity and temperature on lipase and hydroxynitrile lyase enantioselectivity. *Enzyme and Microbial Technology* 30(7),916-923.
- Pham V. T., Phillips R. S.** (1990). Effect of substrate structure and temperature on the stereospecificity of secondary alcohol dehydrogenase from *Thermoanaerobacter ethanolicus*. *Journal of the American Chemical Society* 112,3629-3632.
- Pham V. T., Phillips R. S., Ljungdahl L. G.** (1989). Temperature-dependent enantiospecificity of secondary alcohol dehydrogenase from *Thermoanaerobacter ethanolicus*. *Journal of the American Chemical Society* 111,1935-1936.

- Phillips R. S.** (1992). Temperature effects on stereochemistry of enzymatic reactions. *Enzyme and Microbial Technology* 14(5),417-419.
- Phillips R. S.** (1996). Temperature modulation of the stereochemistry of enzymatic catalysis: prospects for exploitation. *Trends in Biotechnology* 14,13-16.
- Phillips R. S.** (2002). How does active site water affect enzymatic stereorecognition? *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic* 19-20,103-107.
- Piletsky S. A., Karim K., Piletska E. V., Day C. J., Freebairn K. W., Legge C., Turner A. P. F.** (2001). Recognition of ephedrine enantiomers by molecularly imprinted polymers designed using a computational approach. *Analyst* 126(10),1826-1830.
- Pinto R., Moreira S., Mota M., Gama M.** (2004). Studies on the Cellulose-Binding Domains Adsorption to Cellulose. *Langmuir* 20,1409-1413.
- Pleiss J., Fischer M., Peiker M., Thiele C., Schmid R. D.** (2000). Lipase engineering database: Understanding and exploiting sequence-structure-function relationships. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic* 10(5),491-508.
- Pleiss J., Fischer M., Schmid R. D.** (1998). Anatomy of lipase binding sites: The scissile fatty acid binding site. *Chemistry and Physics of Lipids* 93(1-2),67-80.
- Ponder J. W., Richards F. M.** (1987). Tertiary templates in proteines. Use of packing criteria in the enumeration of allowed sequences for different structural classes. *Journal of molecular Biology* 193,775-791.
- Pulvin S., Legoy M. D., Lortie R.** (1986). Enzyme technology and gas phase catalysis: Alcohol dehydrogenase example. *Biotechnology Letters* 8(11),783-784.
- Pulvin S., Parvaresh F., Thomas D., Legoy M. D.** (1989). Solid-gas reactors. A comparison between the horse liver and the thermostable *Sulfolobus solfataricus* ADH. *Annals of the New York Academy of Sciences* 542,434-439.

Q

- Qian Z., Fields C. J., Lutz S.** (2007). Investigating the structural and functional consequences of circular permutation on lipase B from *Candida antarctica*. *ChemBioChem* 8(16),1989-1996.
- Qian Z., Horton J. R., Cheng X., Lutz S.** (2009). Structural Redesign of Lipase B from *Candida antarctica* by Circular Permutation and Incremental Truncation. *Journal of Molecular Biology* 393(1),191-201.
- Qian Z., Lutz S.** (2005). Improving the catalytic activity of *Candida antarctica* lipase B by circular permutation. *Journal of the American Chemical Society* 127(39),13466-13467.

R

- Rakels J. L. L., Straathof A. J. J., Heijnen J. J.** (1993). A simple method to determine the enantiomeric ratio in enantioselective biocatalysis. *Enzyme and Microbial Technology* 15,1051-1056.
- Raza S., Fransson L., Hult K.** (2001). Enantioselectivity in *Candida antarctica* lipase B: A molecular dynamics study. *Protein Science* 10(2),329-338.
- Reetz M. T.** (2001). Combinatorial and evolution-based methods in the creation of enantioselective catalysts. *Angewandte Chemie - International Edition* 40(2),284-310.
- Rich J. O., Dordick J. S.** (1997). Controlling subtilisin activity and selectivity in organic media by imprinting with nucleophilic substrates. *Journal of the American Chemical Society* 119(14),3245-3252.
- Rich J. O., Mozhaev V. V., Dordick J. S., Clark D. S., Khmelnitsky Y. L.** (2002). Molecular imprinting of enzymes with water-insoluble ligands for nonaqueous biocatalysis. *Journal of the American Chemical Society* 124(19),5254-5255.
- Riddle Jr. F. L., Fowkes F. M.** (1990). Spectral shifts in acid-base chemistry. I. Van der Waals contributions to acceptor numbers. *Journal of the American Chemical Society* 112(9),3259-3264.
- Riganokos K. A., Kontominas M. G.** (1997). Study of water sorption of flours (wheat and soy) using a hygrometric method : effect of relative humidity during heat treatment. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* 204,369-373.
- Rjiba N., Nardin M., Dréan J.-Y., Frydrych R.** (2007). A study of the surface properties of cotton fibers by inverse gas chromatography. *Journal of Colloid and Interface Science* 314(2),373-380.
- Robert H., Lamare S., Parvaresh F., Legoy M. D.** (1992). The role of water in gaseous biocatalysis. *Prog. Biotechnol* 8,23-29.
- Roger B. G.**, (editor). 1994. Protein-Solvent Interaction. Marcel Dekker. New York.
- Rotticci D.** (2000). Understanding an Engineering the enantioselectivity of *Candida antarctica* lipase B toward *sec*-alcohols, thèse de l' Royal Institute of Technology. Stockholm, Suède.
- Rotticci D., Hæffner F., Orrenius C., Norin T., Hult K.** (1998). Molecular recognition of *sec*-alcohol enantiomers by *Candida antarctica* lipase B. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 5(1-4),267-272.
- Rotticci D., Orrenius C., Hult K., Norin T.** (1997). Enantiomerically enriched bifunctional *sec*-alcohols prepared by *Candida antarctica* lipase B catalysis. Evidence of non-steric interactions. *Tetrahedron Asymmetry* 8(3),359-362.
- Rotticci D., Ottosson J., Norin M., Hult K.** (2001a). *Candida antarctica* lipase B: a tool for the preparation of optically active alcohols. *Methods in Biotechnology* 15,261-276.

- Rotticci D., Rotticci-Mulder J. C., Denman S., Norin T., Hult K.** (2001b). Improved enantioselectivity of a lipase by rational protein engineering. *ChemBioChem* 2(10),766-770.
- Rotticci-Mulder J. C., Gustavsson M., Holmquist M., Hult K., Martinelle M.** (2001). Expression in *Pichia pastoris* of *Candida antarctica* lipase B and lipase B fused to a cellulose-binding domain. *Protein Expression and Purification* 21(3),386-392.
- Rouquerol F., Luciani L., Llewellyn P., Denoyel R., Rouquerol J.** (2003). Caractérisation de la texture des matériaux pulvérulents ou poreux (aire spécifique et distribution de taille des pores), Traité Analyse et Caractérisation. *Technique de l'ingénieur* P1050,1-24.
- Rouquerol F., Rouquerol J., Sing K.** (1999). Adsorption by powders and porous solids, Academic Press, 467 p.
- Rousset P., Sellappan P., Daoud P.** (2002). Effect of emulsifiers on surface properties of sucrose by inverse gas chromatography. *Journal of Chromatography A* 969,97-101.

S

- Saint Flour C., Papirer E.** (1983). Gas solid chromatography. A quick method of estimating surface free energy variations induced by the heat treatment of short glass fibers. *Journal of Colloid and Interface Science* 91(1),69-75.
- Saint Flour C., Papirer E.** (1982a). Gas-solid chromatography. A method of measuring surface free energy characteristics of short glass fibers. 1. Through adsorption isotherms. *Industrial and Engineering Chemistry Product Research and Development* 21(2),337-341.
- Saint Flour C., Papirer E.** (1982b). Gas-solid chromatography: A method of measuring surface free energy characteristics of short glass fibers. 2. Through retention volumes measured near zero surface coverage. *Industrial and Engineering Chemistry Product Research and Development* 21(4),666-669.
- Sanchis J., Fernandez L., Carballeira J. D., Drone J., Gumulya Y., Höbenreich H., Kahakeaw D., Kille S., Lohmer R., Peyralans J. J. P. and others.** (2008). Improved PCR method for the creation of saturation mutagenesis libraries in directed evolution: Application to difficult-to-amplify templates. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81(2),387-397.
- Sandström A. G., Engström K., Nyhlén J., Kasrayan A., Bäckvall J. E.** (2009). Directed evolution of *Candida antarctica* lipase A using an episomally replicating yeast plasmid. *Protein Engineering, Design and Selection* 22(7),413-420.
- Santos J. M. R. C. A., Fagelman K., Guthrie J. T.** (2002). Characterisation of the surface Lewis acid-base properties of poly(butylene terephthalate) by inverse gas chromatography. *Journal of Chromatography A* 969(1-2),111-118.

- Santos J. M. R. C. A., Fagelman K., Guthrie J. T.** (2002). Characterisation of the surface Lewis acid-base properties of the components of pigmented, impact-modified, bisphenol A polycarbonate-poly(butylene terephthalate) blends by inverse gas chromatography-phase separation and phase preferences. *Journal of Chromatography A* 969(1-2),119-132.
- Santos J. M. R. C. A., Gil M. H., Portugal A., Guthrie J. T.** (2001). Characterisation of the surface of a cellulosic multi-purpose office paper by inverse gas chromatography. *Cellulose* 8(3),217-224.
- Santos J. M. R. C. A., Guthrie J. T.** (2005). Analysis of interactions in multicomponent polymeric systems: The key-role of inverse gas chromatography. *Materials Science and Engineering R: Reports* 50(3),79-107.
- Schließmann A., Hidalgo A., Berenguer J., Bornscheuer U. T.** (2009). Increased Enantioselectivity by Engineering Bottleneck Mutants in an Esterase from *Pseudomonas fluorescens*. *ChemBioChem* 10(18),2920-2923.
- Schmid R. D., Verger R.** (1998). Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. *Angewandte Chemie Int. Ed.* 37,1608-1633.
- Schmidt-Dannert C.** (1999). Recombinant microbial lipases for biotechnological applications. *Bioorg. Med. Chem.* 7,2123-2130.
- Schmitt J., Brocca S., Schmid R. D., Pleiss J.** (2002). Blocking the tunnel: Engineering of *Candida rugosa* lipase mutants with short chain length specificity. *Protein Engineering* 15(7),595-601.
- Schultz J., Lavielle L., Martin C.** (1987). Propriétés de surface des fibres de carbone déterminées par chromatographie gazeuse inverse. *J. Chim. Phys.* 84(2),231-237.
- Schulz T., Pleiss J., Schmid R. D.** (2000). Stereoselectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase toward secondary alcohols: A quantitative model. *Protein Science* 9(6),1053-1062.
- Secundo F., Barletta G. L., Dumitriu E., Carrea G.** (2007). Can an inactivating agent increase enzyme activity in organic solvent? Effects of 18-crown-6 on lipase activity, enantioselectivity, and conformation. *Biotechnology and Bioengineering* 97(1),12-18.
- Secundo F., Oppizi M. L., Carrea G., De Amici M., Dallanocce C.** (1999). Enzymatic resolution of 3-butene-1,2-diol in organic solvent and optimization of reaction conditions. *Biocatalysis and Biotransformation* 17,241-250.
- Secundo F., Riva S., Carrea G.** (1992). Effects of medium and of reaction conditions on the enantioselectivity of lipases in organic solvents and possible rationales. *Tetrahedron Asymmetry* 3,267-280.
- Sih C. J., Wu S.-H.** (1989). Resolution of enantiomers via biocatalysis. *Top. Stereochem* 19,63-125.
- Simon L. M., Laszlo K., Vértesi A., Bagi K., Szajani B.** (1998). Stability of hydrolytic enzymes in water-organic solvent systems. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic* 4(1-2),41-45.

- Skjot M., de Maria L., Chatterjee R., Svendsen A., Patkar S. A., Ostergaard P. R., Brask J.** (2009). Understanding the plasticity of the α -hydrolase fold: Lid swapping on the *Candida antarctica* lipase B results in chimeras with interesting biocatalytic properties. *ChemBioChem* 10(3),520-527.
- Solares L. F., Lavandera I., Gotor-Fernandez V., Brieva R., Gotor V.** (2006). Biocatalytic preparation of enantioenriched 3,4-dihydropiperidine and theoretical study of *Candida antarctica* lipase B enantioselectivity. *Tetrahedron* 62,3284-3291.
- Steinberg S. M., Kreamer D. K.** (1993). Evaluation of the sorption of volatile organic compounds by unsaturated calcareous soil from Southern Nevada using inverse gas chromatography. *Environ. Sci. Technol.* 27(5),883-888.
- Stemmer W. P.** (1994). Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature* 370,389-391.
- Straathof A. J. J., Jongejan J. A.** (1997). The enantiomeric ratio: origin, determination and prediction. *Enzyme and Microbial Technology* 21,559-571.
- Straathof A. J. J., Rakels J. L. L., Heijnen J. J.** (1992). Enzyme kinetics in monophasic and biphasic aqueous– organic systems. In: Tramper J, Vermue MH, Beftink HH, Von Stockar U, editors. *Biocatalysis in Non-Conventional Media*, Elsevier, Amsterdam, p 137–144.
- Straathof A. J. J., Rakels J. L. L., Heijnen J. J.** (1992). Kinetic of the enzymatic resolution of racemic compounds in bi-bi reactions. *Biocatalysis* 7,13-27.
- Strohmeier G. A., Sovic T., Steinkellner G., Hartner F. S., Andryushkova A., Purkarthofer T., Glieder A., Gruber K., Griengle H.** (2009). Investigation of lipase-catalyzed Michael-type carbon-carbon bond formations. *Tetrahedron* 65,5663-5668.
- Suen W. C., Zhang N., Xiao L., Madison V., Zaks A.** (2004). Improved activity and thermostability of *Candida antarctica* lipase B by DNA family shuffling. *Protein Engineering, Design and Selection* 17(2),133-140.
- Sunkersett R., Grimsey M., Doughty S.** (2001). The changes in surface energetics with relative humidity of carbamazepine and paracetamol as measured by IGC. *European J. of P. Sci.* 13,219-225.
- Szabo A., Ostlund N. S.** (1996). *Modern quantum chemistry. Introduction to advanced electronic structure theory*, Dover Publications Inc., Mineola, New York.

T

- Takagi Y., Teramoto J., Kihara H., Itoh T., Tsukube H.** (1996). Thiocrown ether as regulator of lipase-catalyzed trans-esterification in organic media: Practical optical resolution of allyl alcohols. *Tetrahedron Letters* 37(28),4991-4992.
- Theil F.** (2000). Enhancement of Selectivity and Reactivity of Lipases by Additives. *Tetrahedron* 56,2905-2919.
- Theil F., Sonnenschein H., Kreher T.** (1996). Lipase-catalysed resolution of 3,3'-bi-indolizines: The first preparative access to enantiomerically pure samples. *Tetrahedron Asymmetry* 7(12),3365-3370.
- Thielmann F., Baumgarten E.** (2000). Characterization of microporous aluminas by inverse gas chromatography. *Journal of Colloid and Interface Science* 229(2),418-422.
- Thielmann F., Levoguer C.** (2000). IGC – A new instrument for characterising the physicochemical properties of polymers (SMS Application Note 301). *Pharm. Techn. Europe* 11,36.
- Thielmann F., Williams D.** (2000). Determination of the glass transition temperatures T_g of maltose and its dependance on relative humidity by infinite dilution inverse gas chromatography, SMS Application note 204. *SMS Application note 204*.
- Thielmann Y., Mokhtari T., Sorensen C. M., Kang I. J., Pfromm P. H., Czermak P.** (2009). Catalytic properties of *Candida antarctica* lipase B clusters solubilized in hexane. *Biocatalysis and Biotransformation* 27(2),152-158.
- Tisserand C., Calvet R., Patry S., Galet L., Dodds J. A.** (2009). Comparison of two techniques for the surface analysis of alumina (Al₂O₃): Inverse Gas Chromatography at Finite Concentration (IGC-FC) and Dynamic Vapor Sorption (DVS). *Powder Technology* 190(1-2),53-58.
- Tomin A., Hornyánszky G., Kupai K., Dorko Z., Üрге L., Darvas F., Poppe L.** Lipase-catalyzed kinetic resolution of 2-methylene-substituted cycloalkanols in batch and continuous-flow modes. *Process Biochemistry* 45(6),859-865.
- Trivedi A. H., Spiess A. C., Dausmann T., Büchs J.** (2006b). Study on mesophilic and thermophilic alcohol dehydrogenases in gas-phase reaction. *Biotechnology Progress* 22(2),454-458.
- Trivedi A. H., Spiess A. C., Dausmann T., Büchs J.** (2006a). Effect of additives on gas-phase catalysis with immobilised *Thermoanaerobacter* species alcohol dehydrogenase (ADH T). *Applied Microbiology and Biotechnology* 71(4),407-414.
- Trodler P., Pleiss J.** (2008). Modeling structure and flexibility of *Candida antarctica* lipase B in organic solvents. *BMC Structural Biology* 8.

U

- Uchiyama H., Oguri K., Yagi O., Kokufuta E.** (1992). Trichloroethylene degradation by immobilized resting-cells of *Methylocystis* sp. in a gas-solid bioreactor. *Biotechnology Letters* 14,619-626.
- Ueji S., Fujino R., Okubo N., Miyazawa T., Kurita S., Kitadani M., Muromatsu A.** (1992). Solvent-induced inversion of enantioselectivity in lipase-catalyzed esterification of 2-phenoxypropionic acids. *Biotechnology Letters* 14,163-168.
- Uppenberg J., Hansen M. T., Patkar S., Alwyn Jones T.** (1994). The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B *Candida antarctica*. *Structure* 2,293-308.
- Uppenberg J., Ohrner N., Norin M., Hult K., Kleywegt G. J., Patkar S., Waagen V., Anthonsen T., Alwyn Jones T.** (1995). Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols. *Biochemistry* 34(51),16838-16851.
- Uyama H., Suda S., Kikuchi H., Kobayashi S.** (1997). Extremely efficient catalysis of immobilized lipase in ring-opening polymerization of lactones. *Chemistry Letters*,1109-1110.

V

- Valivety R. H., Halling P. J., Peilow A. D., Macrae A. R.** (1992). Lipases from different sources vary widely in dependence of catalytic activity on water activity. *Biochim. Biophys. Acta. Protein structure and molecular enzymology* 1122,143-146.
- Vallikivi I., Fransson L., Hult K., Järving I., Pehk T., Samel N., Tóugu V., Villo L., Parve O.** (2005). The modelling and kinetic investigation of the lipase-catalysed acetylation of stereoisomeric prostaglandins. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 35(1-3),62-69.
- Vallin K. S. A., Posaric D. W., HamerÅ;ak Z., Svensson M. A., Minidis A. B. E.** (2009). Efficient chemoenzymatic dynamic kinetic resolution of 1-heteroaryl ethanols. *Journal of Organic Chemistry* 74(24),9328-9336.
- Vallin M., Syrèn P. O., Hult K.** (2010). Mutant lipase-catalyzed kinetic resolution of bulky phenyl alkyl sec-alcohols: A thermodynamic analysis of enantioselectivity. *ChemBioChem* 11(3),411-416.
- van Asten A., van Veenendaal N., Koster S.** (2000). Surface characterization of industrial fibers with inverse gas chromatography. *Journal of Chromatography A* 888,175-196.

Vareli G., Demertzis P. G., Akrida-Demertzis K. (1995). Water and ethanol adsorption on starchy substrates as biomass separation systems. *Food Flavors : Generation, analysis and Process influence* 37//A,1187-1199.

Verger R. (1997). Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. *Trends in Biotechnology* 15,32-38.

W

Warshel A., Levitt M. (1976). Theoretical studies of enzymic reactions: dielectric, electrostatic and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme. *Journal of Molecular Biology* 103,227-249.

Warshel A., Naray-Szabo G., Sussman F., Hwang J.-K. (1989). How do serine protease really work? *Biochemistry* 28,3629-3637.

Wehtje E., Costes D., Adlercreutz P. (1997). Enantioselectivity of lipases: effects of water activity. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic* 3(5),221-230.

Wei S., Jakusch M., Mizaikoff B. (2006). Capturing molecules with templated materials - Analysis and rational design of molecularly imprinted polymers. *Analytica Chimica Acta* 578,50-58.

Wescott C. R., Klibanov M. (1993). Solvent variation inverts substrate specificity of an enzyme. *Journal of the American Chemical Society* 115(1629-1631).

Wu J.-Y., Liu S.-W. (2000). Influence of alcohol concentration on lipase-catalyzed enantioselective esterification of racemic naproxen in isooctane: under controlled water activity. *Enzyme and Microbial Technology* 26(2-4),124-130.

Wu X. M., Sun W., Xin J. Y., Xia C. G. (2008). Lipase-catalysed kinetic resolution of secondary alcohols with improved enantioselectivity in propylene carbonate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24(11),2421-2424.

X

Xu T., Zhang L., Su E., Cui D., Wang X., Wei D. (2010). Disparity in productive binding mode of the slow-reacting enantiomer determines the novel catalytic behavior of *Candida antarctica* lipase B. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 62,288-296.

Y

- Yang F. X., Russell A. J.** (1996). The role of hydration in enzyme activity and stability: 1. Water sorption by alcohol dehydrogenase in a continuous gas phase reactor. *Biotechnology and Bioengineering* 49,700-708.
- York P., Ticehurst M. D., Osborn J. C., Robert R. J., Rowe R. C.** (1998). Characterization of the surface energetics of milled dl-propranolol hydrochloride using IGC and molecular modeling. *International J. of Pha* . 174(1-2),179-186.

Z

- Zaks A., Klibanov A. M.** (1988). The effect of water on enzyme action in organic media. *The journal of biological chemistry* 263,8017-8021.
- Zhang N., Suen W. C., Windsor W., Xiao L., Madison V., Zaks A.** (2003). Improving tolerance of *Candida antarctica* lipase B towards irreversible thermal inactivation through directed evolution. *Protein Engineering* 16(8),599-605.
- Zheng L., Baumann U., Reymond J. L.** (2004). An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic acids research* 32(14).
- Zheng L., Zhang S., Gao G., Zhao L., Jia F., Cao S.** (2007). Resolution of N-(2-ethyl-6-methylphenyl) alanine catalyzed by Lipase B from *Candida antarctica*. *Biocatalysis and Biotransformation* 25(6),430-433.
- Zhou Q., Cadwallader K. R.** (2004). Inverse gas chromatographic method for measurement of interactions between soy protein isolate and selected flavor compounds under controlled relative humidity. *J. Agr. Food Chem.* 52(20),6271-6277.
- Zhou Q., Cadwallader K. R.** (2006). Effects of flavor compound chemical structure and environmental relative humidity on the binding of volatile flavor compounds to dehydrated soy protein isolates. *J. Agr. Food Chem.* 54,1838-1843.
- Zilli M., Converti A., Lodi A., Del Borghi M., Ferraiolo G.** (1992). Phenol removal from water gases with a biological filter by *Pseudomonas putida*. *Biotechnology and Bioengineering* 41,693-699.
- Zuegg J., Höning H., Schrag J. D., Cygler M.** (1997). Selectivity of lipases: Conformational analysis of suggested intermediates in ester hydrolysis of chiral primary and secondary alcohols. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 3,83-98.

Annexes

Annexe 1 : Notations et symboles

a	aire moléculaire
AN	nombre accepteur d'électrons
a_w	activité thermodynamique de l'eau
AW-DMCS	Acid-washed, dimethyl dichlorosilane treated
a_x	activité thermodynamique d'un composé x
c	taux de conversion
CALB	Lipase B de <i>Candida antarctica</i>
CG	Chromatographie Gazeuse
CMC	concentration micéllaire critique
DN	nombre donneur d'électrons
E	ratio énantiomérique
ee_s	excès énantiomérique du substrat
ee_p	excès énantiomérique du produit
$E_{int_{EA}}$	énergie d'interaction entre l'enzyme et la partie alcool du substrat
$E_{int_{ES}}$	énergie d'interaction entre l'enzyme et le substrat
E_{p_A}	énergie potentielle de la partie alcool du substrat
E_{p_S}	énergie potentielle du substrat entier
E_{p_T}	énergie potentielle totale
F	débit du gaz vecteur
G^\ddagger	énergie libre d'activation
HR	taux d'humidité relative
ID	diamètre interne

IGC	Chromatographie Gazeuse Inverse (Invers Gas Chromatography)
j	facteur de compressibilité James-Martin
K_A	paramètre acide du solide
K_B	paramètre basique du solide
k_{cat}	constante catalytique
K_d	constante de dissociation
K_{eq}	constante d'équilibre
K_m	constante de Michaelis-Menten
M et m	moyen
MD	dynamique moléculaire
MM	mécanique moléculaire
MQ	mécanique quantique
N_a	nombre d'Avogadro
P_a ou P_0	pression atmosphérique
P_i	pression en tête de colonne
PCR	réaction en chaîne par polymérase
P_{p_x} ou p	pression partielle d'un composé x
$P_{p_{x,sat}}$ ou p^0	pression de saturation
Q_{tot}^n	débit molaire total
R	constante universelle des gaz parfaits (8,31 kJ.K ⁻¹ .mol ⁻¹)
<i>rmsd</i>	Root Mean Square Deviation
s	écart-type
SD	Steepest Descent
T	température
t	temps

t_{imm}	taux d'immobilisation
t_R	temps de rétention
t_N	temps de rétention net
t_0	temps mort d'élution
V_g	volume de rétention spécifique
V_i	vitesse initiale
V_{iR}	vitesse initiale de l'énantiomère <i>R</i>
V_{iS}	vitesse initiale de l'énantiomère <i>S</i>
V_m	vitesse maximale
V_N	volume de rétention net
V_R	volume de rétention
γ	tension superficielle
γ_L^d	composante dispersive de l'énergie de surface de la sonde
γ_S	composante de l'énergie de surface du solide
γ_S^d	composante dispersive de l'énergie de surface du solide
γ_S^{sp}	composante spécifique de l'énergie de surface du solide
ΔG^\ddagger	différence d'énergie libre d'activation
ΔG_{ads}	énergie libre d'adsorption
ΔG_{ads}^d	composante dispersive de l'énergie libre d'adsorption
$\Delta G_{\text{ads}}^{\text{sp}}$	composante spécifique de l'énergie libre d'adsorption
ΔH_{ads}	enthalpie d'adsorption
ΔH_{vap}	enthalpie de vaporisation
$\Delta_{R-S}\Delta G^\ddagger$	différence d'énergie d'activation entre l'énantiomère <i>R</i> et l'énantiomère <i>S</i>
$\Delta_{R-S}\Delta H^\ddagger$	différence d'enthalpie d'activation entre l'énantiomère <i>R</i> et l'énantiomère <i>S</i>
$\Delta_{R-S}\Delta S^\ddagger$	différence d'entropie d'activation entre l'énantiomère <i>R</i> et l'énantiomère <i>S</i>

Annexe 2 : Table de loi de Student

Valeur de t en fonction de la probabilité et du degré de liberté

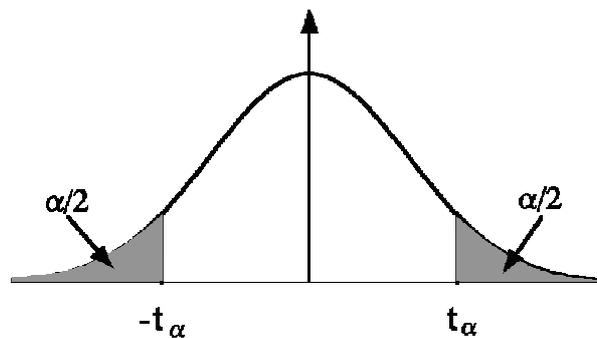
v	0,55	0,6	0,65	0,7	0,75	0,8	0,85	0,9	0,95	0,975	0,99	0,995	0,9995	
1	0,158	0,325	0,51	0,727	1	1,376	1,963	3,078	6,314	12,706	31,821	63,657	636,619	1
2	0,142	0,289	0,445	0,617	0,816	1,061	1,386	1,886	2,92	4,303	6,965	9,925	31,598	2
3	0,137	0,277	0,424	0,584	0,765	0,978	1,25	1,638	2,353	3,82	4,541	5,841	12,929	3
4	0,134	0,271	0,414	0,569	0,741	0,941	1,19	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	8,61	4
5	0,132	0,267	0,408	0,559	0,727	0,92	1,156	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	6,869	5
6	0,131	0,265	0,404	0,553	0,718	0,906	1,134	1,44	1,943	2,447	3,143	3,707	5,959	6
7	0,13	0,263	0,402	0,549	0,711	0,896	1,119	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	5,408	7
8	0,13	0,262	0,399	0,546	0,706	0,889	1,108	1,397	1,86	2,306	2,896	3,355	5,041	8
9	0,129	0,261	0,398	0,543	0,703	0,883	1,1	1,383	1,833	2,262	2,821	3,25	4,781	9
10	0,129	0,26	0,397	0,542	0,7	0,879	1,093	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	4,587	10
11	0,129	0,26	0,396	0,54	0,697	0,876	1,088	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	4,437	11
12	0,128	0,259	0,395	0,539	0,695	0,873	1,083	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	4,318	12
13	0,128	0,259	0,394	0,538	0,694	0,87	1,079	1,35	1,771	2,16	2,65	3,012	4,221	13
14	0,128	0,258	0,393	0,537	0,692	0,868	1,076	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	4,14	14
15	0,128	0,258	0,393	0,536	0,691	0,866	1,074	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	4,073	15
16	0,128	0,258	0,392	0,535	0,69	0,865	1,071	1,337	1,746	2,12	2,583	2,921	4,015	16
17	0,128	0,257	0,392	0,534	0,689	0,863	1,069	1,333	1,74	2,11	2,567	2,898	3,965	17
18	0,127	0,257	0,392	0,534	0,688	0,862	1,067	1,33	1,734	2,101	2,552	2,878	3,922	18
19	0,127	0,257	0,391	0,533	0,688	0,861	1,066	1,323	1,729	2,093	2,539	2,861	3,883	19
20	0,127	0,257	0,391	0,533	0,687	0,86	1,064	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,85	20
21	0,127	0,257	0,391	0,532	0,686	0,859	1,063	1,323	1,721	2,08	2,518	2,831	3,819	21
22	0,127	0,256	0,39	0,532	0,686	0,858	1,061	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,792	22
23	0,127	0,256	0,39	0,532	0,685	0,858	1,06	1,319	1,714	2,069	2,5	2,807	3,767	23
24	0,127	0,256	0,39	0,531	0,685	0,857	1,059	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,745	24
25	0,127	0,256	0,39	0,531	0,684	0,856	1,058	1,316	1,708	2,06	2,485	2,787	3,725	25
26	0,127	0,256	0,39	0,531	0,684	0,856	1,058	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779	3,707	26
27	0,127	0,256	0,389	0,531	0,684	0,855	1,057	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	3,69	27
28	0,127	0,256	0,389	0,53	0,683	0,855	1,056	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763	3,674	28
29	0,127	0,256	0,389	0,53	0,683	0,854	1,055	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756	3,659	29
30	0,127	0,256	0,389	0,53	0,683	0,854	1,055	1,31	1,697	2,042	2,457	2,75	3,646	30
40	0,126	0,255	0,388	0,529	0,681	0,851	1,05	1,303	1,684	2,011	2,423	2,704	3,551	40
60	0,126	0,254	0,387	0,527	0,679	0,848	1,046	1,296	1,671	2	2,39	2,66	3,46	60
120	0,126	0,254	0,386	0,526	0,677	0,845	1,041	1,289	1,658	1,98	2,358	2,617	3,373	120
∞	0,126	0,253	0,385	0,524	0,674	0,842	1,036	1,282	1,645	1,96	2,326	2,576	3,291	∞
v														□
	0,55	0,6	0,65	0,7	0,75	0,8	0,85	0,9	0,95	0,975	0,99	0,995	0,9995	

Utilisation de la table :

Cette table donne les fractiles de la loi de Student à ν degrés de liberté : valeur t ayant la probabilité α d'être dépassée en valeur absolue :

$$P(-t < T < t) = 1 - \alpha.$$

Le degré de liberté correspond à la différence entre le nombre de résultats (n) et le nombre de paramètres indépendants (p) : $\nu = n - p$.



Dans la pratique, si on désire un niveau de confiance de 99%, cela signifie que l'on cherche la probabilité que T soit supérieure à 0,005 et inférieure à 0,995. Ce qui laisse 0,5% des deux côtés de la courbe, 1% en tout. Comme la distribution de loi de Student est symétrique, le coefficient est le même pour ces deux valeurs. Il suffit de prendre le coefficient t à 0,995.

Exemple: 20 résultats, ne dépendant que d'un seul paramètre ($\nu = 19$), et pour un niveau de confiance de 0,99 : $T_{0,995}(19) = 2,861$.

Table des illustrations

Figures

- Figure 1: Diagramme de la structure secondaire de la CALB. Les hélices α_2 , α_9 et α_{10} ont toutes des régions courtes où le réseau de liaisons hydrogène des hélices est brisé, introduisant ainsi un changement de direction de l'hélice (d'après Uppenberg et coll., 1994)..... 14
- Figure 2 : Deux vues différentes de la structure tridimensionnelle de la CALB (code PDB : 1TCA). Sont représentés en rouge les hélices α , en bleu les feuillets β , en vert les coudes, en blanc les boucles et en jaune la sérine catalytique..... 15
- Figure 3 : A. Surface de la CALB avec son site actif. B. Coupe du site actif. Sont représentés en rouge les résidus de la triade catalytique, en bleu les résidus de la poche énantiosélective, en saumon les résidus du trou oxyanionique, en violet les résidus hydrophobes délimitant le sous-site de fixation acyle et en vert les résidus hydrophobes délimitant le sous-site de fixation alcool. Ces deux sous-sites sont séparés par les résidus Ile189 et Ile285, qui peuvent ainsi interagir avec les deux chaînes acyle et alcool. Pour plus de clarté les atomes d'hydrogène n'ont pas été représentés. 16
- Figure 4 : Représentation schématique de la cavité du site actif de la CALB. Ce dernier peut être divisé en deux parties, un côté acyle et un côté alcool, correspondant respectivement au site de fixation de la partie acyle et alcool du substrat durant la catalyse (d'après Uppenberg et coll., 1995). 16
- Figure 5 : Site actif de la lipase. Le trou oxyanionique et la poche stéréospécifique sont visualisés respectivement par des arcs de couleur jaune et cyan. Sont représentés en rouge les résidus de la triade catalytique, en bleu les résidus de la poche énantiosélective, en saumon les résidus du trou oxyanionique et en blanc le résidu stabilisant le trou oxyanionique, Gln 157. Les lignes grises schématisent la structure secondaire de l'enzyme. Ces deux sous-sites sont séparés par les résidus Ile189 et Ile285, qui peuvent ainsi interagir avec les deux chaînes acyle et alcool. Pour plus de clarté les atomes d'hydrogènes n'ont pas été représentés. 18
- Figure 6 : Mécanisme réactionnel de la CALB lors de la catalyse d'une réaction de transestérification. R_1 , R_2 et R_3 = chaînes alkyle. (Si R_3 = H, c'est une réaction d'hydrolyse) 19
- Figure 7 : A. Schéma du mécanisme de la réaction de type Bi-Bi Ping-Pong simple. B. Schéma du mécanisme de la réaction de type Bi-Bi Ping-Pong avec inhibition compétitive par l'eau (H_2O) et par le second substrat (S2). L'eau peut constituer également un second substrat pour la réaction..... 21
- Figure 8 : Diagramme d'énergie de Gibbs ou d'énergie libre d'activation d'une réaction énantiosélective catalysée par une enzyme. A^S et A^R sont les énantiomères substrats, P^S et P^R les énantiomères produits de la réaction ; $[EA^S]^\ddagger$ et $[EA^R]^\ddagger$ les états de transition, dans notre cas A^R est préférentiellement transformé par l'enzyme (Faber, 2000)..... 29
- Figure 9 : Variation de l'excès énantiomérique du substrat (ee_s) (A), et de l'excès énantiomérique du produit (ee_p) (B), en fonction du degré de conversion ($= c / 100$), pour différentes valeurs du ratio énantiomérique, E (chiffres sur les courbes) (Straathof et Jongejan, 1997)..... 31
- Figure 10 : Evolution des excès énantiomériques du substrat et du produit (ee_s et ee_p) dans le cas d'une réaction réversible (avec $E = 20$ et $K = 0,1$) (Faber K et Riva S 1992)..... 33
- Figure 11 : Représentation schématique d'un alcool secondaire selon Kazlauskas. M pour le substituant de taille moyenne et L pour le substituant le plus gros. La figure montre l'énantiomère préféré par les lipases de *Pseudomonas cepacia* et *Candida rugosa* (Kazlauskas et coll., 1991)..... 35
- Figure 12 : (A) Structure des substrats modélisés, avec une partie acyle de longueur variable, lors de l'étude réalisée par Raza et coll. Les ratios énantiomériques, E, obtenus expérimentalement pour une

température de 300 K dans l'hexane (Ottosson et Hult, 2001) et les valeurs correspondantes de $\Delta\Delta G^\ddagger$ sont également précisés. (B) Comparaison des valeurs calculées $\Delta\Delta G^\ddagger$ pour les sous-ensembles sélectionnés selon des critères fonctionnels, décrivant les principaux éléments structuraux de l'état de transition (barres noires), avec les valeurs expérimentales (barres blanches). 4i correspond à la chaîne iso-butanoyl (d'après Raza et coll., 2001). 41

Figure 13 : Influence de l'activité thermodynamique de l'eau, a_w , sur l'activité acyltransférase de la CALB avec le méthyl propionate en tant que donneur d'acyl et les accepteurs d'acyl suivants : pentan-2-ol (\blacktriangle), butan-2-ol (\circ), hexan-3-ol (\square) et octan-4-ol (\blacklozenge). L'échelle sur la droite de la figure concerne l'octan-4-ol. Les barres d'erreur sont trop petites pour être visibles à l'exception du pentan-2-ol. (Léonard-Nevers et coll., 2009). 43

Figure 14 : Influence de l'activité thermodynamique de l'eau (a_w) sur l'énantiosélectivité de la CALB pour l'acylation du pentan-2-ol et de l'hexan-3-ol (A) et du butan-2-ol et de l'octan-4-ol (B) avec le méthyl propionate comme donneur d'acyl à 318K (Léonard, 2007). 46

Figure 15 : Stratégie pour la création d'enzymes énantiosélectives par évolution dirigée (d'après Jeager et Reetz, 2000 ; Guieysse, 2002). 52

Figure 16 : Aperçu schématique de l'ingénierie de la CALB par permutation circulaire suivie des troncatures supplémentaires de la boucle nouvellement créée en surface dans cp283, le variant le plus actif parmi les permutants de la lipase. Selon l'ampleur de la troncature de la boucle, un changement dans la structure de l'enzyme quaternaire a été observé, passant d'une forme strictement monomérique à un dimère avec un segment de domaine N-terminal échangé. 55

Figure 17 : Le choix de la méthode appropriée pour la conception de protéines de lipases est une décision au cas par cas et doit être effectué sur la base de la qualité des informations structurales et mécanistiques disponibles et la faisabilité d'un système de criblage/sélection à haut débit (HTS). Souvent, un problème peut être résolu par plusieurs méthodes, néanmoins, le résultat est quelque part prédéterminé par la méthode choisie (Kourist et coll., 2010). 58

Figure 18 : L'activité de l'eau définit l'équilibre entre les différentes phases et les différents états d'un système, (Halling, 1994). 59

Figure 19 : Représentation schématique d'un bioréacteur solide/gaz avec un évaporateur fonctionnant par bullage. 63

Figure 20 : Représentation schématique d'une isotherme d'adsorption. 70

Figure 21 : les types d'isothermes de sorption (Comte, 2004) 71

Figure 22 : Comparaison schématique de la chromatographie en phase gazeuse analytique et en phase gazeuse inverse (IGC). En GC (en haut) un mélange de composés est injecté et séparé par une colonne dont les propriétés sont connues. En IGC (en bas) un seul composé connu est injecté sur une colonne dont on cherche à déterminer les caractéristiques (Thielmann et Levoguer). 76

Figure 23 : Représentation schématique d'un appareil entièrement automatisé, commercialisé par SMS (Surface Measurement Systems, Londre, Grande-Bretagne). Avant de traverser la colonne, le gaz vecteur sec est mélangé à des gaz saturés en vapeur d'eau et en molécule sonde (Thielmann et Levoguer). 77

Figure 24 : Détermination du temps de rétention net t_N 78

Figure 25 : principe de la DVS (Fetsch, 2000). 101

- Figure 26 : intermédiaires tétraédriques formés avec la Ser105 et le (*R*)-1-méthylbutyl propionate (a) ou le (*R*)-1-méthylpropyl propionate (b). 106
- Figure 27 : Les deux modes de fixation des énantiomères. La poche énantiosélective est surlignée en rouge. Les modes productifs sont le mode I pour l'énantiomère *R* et le mode II pour l'énantiomère *S* (d'après Hæffner et coll., 1998). 114
- Figure 28 : Propositions des orientations "catalytiquement" productives des alcools secondaires chiraux au sein du site actif des lipases. (a) orientation décrite dans la littérature pour l'énantiomère privilégié (énantiomère *R*, lorsque le groupement M ne comporte pas de substituant impliquant un changement d'ordre selon la règle de Cahn-Ingold-Prelog). (b) plusieurs orientations ont été proposées pour l'énantiomère défavorisé (énantiomère *S*) (Kazlauskas, 2000). 115
- Figure 29 : Variation de l'énergie libre pour la conversion de l'acyl-enzyme de la sérine hydrolase et de l'alcool à l'enzyme libre et l'ester. La figure montre les profils énergétiques pour l'énantiomère *R* rapidement transformé (trait foncé) et pour l'énantiomère *S* lentement transformé (trait claire) du substrat. L'énergie de l'état fondamentale des réactifs, G° , est la même pour les deux énantiomères. Les énergies libres d'activation des énantiomères *R* et *S* sont donnés par ΔG_R^\ddagger et ΔG_S^\ddagger , respectivement, et les énergies libres absolues pour les états de transition correspondants sont donnés par G_R^\ddagger et G_S^\ddagger . La différence d'énergie libre entre l'état de transition et les intermédiaires tétraédriques correspondants est négligeable (Hu et coll., 1998). Par conséquent, $\Delta \Delta G^\ddagger$ peut être estimée par la différence des énergies libres absolues entre les intermédiaires tétraédriques des énantiomères *R* et *S*, $\Delta \Delta G_{\text{calc}}^\ddagger$. . 117
- Figure 30 : Orientation du groupement propionyle lors de la construction de l'intermédiaire tétraédrique. La chaîne carbonée (en vert) a été dirigée vers la poche acyle. L'oxyanion est stabilisé par le trou oxyanionique (Thr 40 et Gln106, en saumon). Les liaisons hydrogène formées avec les résidus du trou oxyanionique sont représentés par des traits oranges. Les résidus de la triade catalytique sont en rouge foncé et les résidus de la poche énantiosélective en bleu. Seuls les atomes d'hydrogène d'intérêt sont visibles. 118
- Figure 31 : Intermédiaire tétraédrique formé avec le pentan-2-ol. Pour plus de simplicité les atomes d'hydrogène ne sont pas représentés. Les flèches rouges représentent les dièdres qui ont été modifiés lors de l'exploration systématique des conformations. 119
- Figure 32 : Orientations du (*R*)-pentan-2-ol (en jaune) au sein du site actif de CALB lors de la construction de l'intermédiaire tétraédrique. Sont représentés en vert la partie acyle, en rouge foncé les résidus de la triade catalytique, en bleu les résidus de la poche énantiosélective et en saumon les résidus du trou oxyanionique. Seuls les atomes d'hydrogène d'intérêt sont visibles. L'axe de la poche énantiosélective est représenté par une flèche blanche. 121
- Figure 33 : Orientations supplémentaires du (*R*)-pentan-2-ol (en jaune) au sein du site actif de CALB lors de la construction de l'intermédiaire tétraédrique. Sont représentés en vert la partie acyle, en rouge foncé les résidus de la triade catalytique, en bleu les résidus de la poche énantiosélective et en saumon les résidus du trou oxyanionique. Seuls les atomes d'hydrogène d'intérêt sont visibles. L'axe de la poche énantiosélective est représenté par une flèche blanche. 122
- Figure 34 : a) orientation du (*R*)-pentan-2-ol (en jaune) avec son substituant moyen vers le fond de la poche énantiosélective (type F). b), c) et d) orientations du (*S*)-pentan-2-ol (en rose) au sein du site actif de CALB lors de la construction de l'intermédiaire tétraédrique respectivement en types D, E et F avec $C_1O_{12}C_{12}C_{13}$ de +120, 0 et -120°. 123
- Figure 35 : Intermédiaire tétraédrique formé avec le butan-2-ol. Pour plus de simplicité les atomes d'hydrogène ne sont pas représentés. Les flèches rouges représentent les dièdres qui ont été modifiés lors de l'exploration systématique des conformations. 124

Figure 36 : Les trois modes de fixation des énantiomères inspirés de Hæffner et coll. (1998). La poche énantiosélective est surlignée en rouge. 127

Figure 37 : Les deux orientations du (*R*)-pentan-2-ol en mode I avec son substituant moyen vers le fond de la poche énantiosélective (signalé par une flèche blanche) : groupement propyle vers Ile189 et Ile285 (en jaune) ou vers Ile189 et Leu278 (en cyan). Sont représentés en vert la partie acyle, en rouge foncé les résidus de la triade catalytique, en bleu les résidus de la poche énantiosélective et en saumon les résidus du trou oxyanionique. La surface de l'enzyme est représentée en blanc par transparence. Seuls les atomes d'hydrogène d'intérêt sont visibles. 131

Figure 38 : Mode III du (*R*)-pentan-2-ol (en jaune) avec son atome d'hydrogène orienté vers le fond de la poche énantiosélective (signalé par une flèche blanche). Sont représentés en vert la partie acyle, en rouge foncé les résidus de la triade catalytique, en bleu les résidus de la poche énantiosélective et en saumon les résidus du trou oxyanionique. La surface de l'enzyme est représentée en blanc par transparence. Seuls les atomes d'hydrogène d'intérêt sont visibles. 131

Figure 39 : Orientations du (*R*)-pentan-2-ol en mode I (en cyan) et mode II (en jaune). Pour la structure en mode II le groupement propyle dirigé vers le fond de la poche énantiosélective (signalé par une flèche blanche) provoque le déplacement du Trp104. Sont représentés en violet les acides aminés d'intérêt pour le mode I, en vert la partie acyle, en rouge foncé les résidus de la triade catalytique, en bleu les résidus de la poche énantiosélective, en gris la Leu228 et en saumon les résidus du trou oxyanionique. La surface de l'enzyme est représentée en blanc par transparence. Seuls les atomes d'hydrogène d'intérêt sont visibles. 132

Figure 40 : Orientation du (*S*)-pentan-2-ol en mode II (en rose) comparé au (*R*)-pentan-2-ol en mode I (en cyan). Pour le (*S*)-pentan-2-ol en mode II, le groupement propyle dirigé vers le fond de la poche énantiosélective (signalé par une flèche blanche) provoque le déplacement du Trp104. Sont représentés en violet les acides aminés d'intérêt pour le mode I, en vert la partie acyle, en rouge foncé les résidus de la triade catalytique, en bleu les résidus de la poche énantiosélective et en saumon les résidus du trou oxyanionique. La surface de l'enzyme est représentée en blanc par transparence. Seuls les atomes d'hydrogène d'intérêt sont visibles. 133

Figure 41 : Mode I du (*S*)-pentan-2-ol (en violet) avec son atome d'hydrogène orienté vers le fond de la poche énantiosélective (signalé par une flèche blanche). Sont représentés en vert la partie acyle, en rouge foncé les résidus de la triade catalytique, en bleu les résidus de la poche énantiosélective, en saumon les résidus du trou oxyanionique et en gris les résidus hydrophobe d'intérêt de l'entrée. La surface de l'enzyme est représentée en blanc par transparence. Seuls les atomes d'hydrogène d'intérêt sont visibles. 133

Figure 42 : Deux orientations pour le Mode III du (*S*)-pentan-2-ol avec son groupement méthyle orienté vers le fond de la poche énantiosélective (signalé par une flèche blanche). Sont représentés en vert la partie acyle, en rouge foncé les résidus de la triade catalytique, en bleu les résidus de la poche énantiosélective, en saumon les résidus du trou oxyanionique et en gris les résidus hydrophobe d'intérêt de l'entrée. La surface de l'enzyme est représentée en blanc par transparence. Seuls les atomes d'hydrogène d'intérêt sont visibles. A) groupement propyle enfoui dans la cavité orienté vers l'Ile285 ; B) groupement propyle dirigé vers l'extérieur du côté de la Leu278. 134

Figure 43 : Orientations du (*R*)-butan-2-ol (en jaune) en mode I, avec son groupement méthyle orienté vers le fond de la poche énantiosélective (signalé par une flèche blanche). Pour une des structures sont représentés en vert la partie acyle, en rouge foncé les résidus de la triade catalytique, en bleu les résidus de la poche énantiosélective, en saumon les résidus du trou oxyanionique et en gris les résidus hydrophobe d'intérêt de l'entrée. Pour les autres structures seulement l'intermédiaire tétraédrique et le Trp104 sont représentés. La surface de l'enzyme est représentée en blanc par transparence. Pour plus de simplicité les atomes d'hydrogène ont été masqués. 136

Figure 44 : a) Orientation du (*R*)-butan-2-ol (en jaune) en mode intermédiaire : il n'y a pas de groupement orienté vers le fond de la poche énantiosélective (signalé par une flèche blanche). b) Comparaison du mode intermédiaire obtenue avec le butan-2-ol avec les modes I et II. Sont représentés en vert la partie acyle, en rouge foncé les résidus de la triade catalytique, en bleu les résidus de la poche énantiosélective, en saumon les résidus du trou oxyanionique et en gris les résidus hydrophobe d'intérêt de l'entrée. La surface de l'enzyme est représentée en blanc par transparence. Seuls les atomes d'hydrogène d'intérêt sont visibles. 137

Figure 45 : Orientations du (*S*)-butan-2-ol en mode II, avec le groupement éthyle orienté vers le fond de la poche énantiosélective (signalé par une flèche blanche). Pour une des structures sont représentés en rose la partie alcool, en vert la partie acyle, en rouge foncé les résidus de la triade catalytique, en bleu les résidus de la poche énantiosélective, en saumon les résidus du trou oxyanionique et en gris les résidus hydrophobe d'intérêt de l'entrée. Pour les autres structures seuls l'intermédiaire tétraédrique et le Trp104 sont représentés. La surface de l'enzyme est représentée en blanc par transparence. Pour plus de simplicité les atomes d'hydrogène ont été masqués. 138

Figure 46 : Orientation du (*S*)-butan-2-ol (en rose claire) en mode III, avec son groupement méthyle orienté vers le fond de la poche énantiosélective (signalé par une flèche blanche). Sont représentés en vert la partie acyle, en rouge foncé les résidus de la triade catalytique, en bleu les résidus de la poche énantiosélective, en saumon les résidus du trou oxyanionique et en gris les résidus hydrophobe d'intérêt de l'entrée. La surface de l'enzyme est représentée en blanc par transparence. Seuls les atomes d'hydrogène d'intérêt sont visibles. 139

Figure 47 : Schéma du mode de fixation des alcools secondaires forme *R*. M et L représentent respectivement les substituants moyen et gros. Les liaisons hydrogène d'intérêt sont représentées par des pointillés. "~~~~" représente le fond de la poche énantiosélective correspondant au cycle indole du Trp104 (d'après Xu et coll., 2010). 142

Figure 48 : Structures non productives obtenues avec le (*R*)-pentan-2-ol (en jaune). Sont représentés en vert la partie acyle, en rouge foncé les résidus de la triade catalytique, en bleu les résidus de la poche énantiosélective et en saumon les résidus du trou oxyanionique. Les distances entre les atomes impliqués dans des liaisons hydrogène sont en vert. La surface de l'enzyme est représentée en blanc par transparence. Seuls les atomes d'hydrogène d'intérêt sont visibles. a) Structure avec l'oxyanion non stabilisé. b) Structure avec la liaison hydrogène entre l'histidine et l'alcool absente. c) Structure avec la liaison hydrogène entre l'histidine et l'acide aspartique absente. 145

Figure 49 : Structures non productives obtenues avec le (*R*)-butan-2-ol (en jaune). Sont représentés en gris la partie acyle, en rouge foncé les résidus de la triade catalytique, en bleu les résidus de la poche énantiosélective et en saumon les résidus du trou oxyanionique. Les distances entre les atomes impliqués dans des liaisons hydrogène sont en vert. Seuls les atomes d'hydrogène d'intérêt sont visibles. a) Structure avec la liaison hydrogène entre l'histidine et l'alcool absente. b) Structure avec l'oxyanion non stabilisé. 148

Figure 50 : Tunnel d'accès de l'alcool au site actif de la CALB. a) vue de dessus ; b) vue en coupe transversale. Sont représentés en vert les résidus délimitant le tunnel, en rouge foncé les résidus de la triade catalytique, en bleu les résidus de la poche énantiosélective, en saumon les résidus du trou oxyanionique et en gris d'autres résidus hydrophobes de l'hélice $\alpha 10$. Cette hélice est visualisée par un ruban rouge. La surface de l'enzyme est représentée en blanc par transparence et la surface des résidus délimitant le tunnel en vert par transparence. Pour plus de simplicité les atomes d'hydrogène ne sont pas visibles. 172

Figure 51 : Représentation des volumes pouvant être balayés par les résidus Ile189 (en rose), Leu278 (en violet), Ala282 (en bleu) et Ile285 (en orange). La cavité enzymatique est représentée en vert. . 174

Figure 52 : Représentation des volumes pouvant être balayés par des résidus glycine (en orange), alanine (en bleu), valine (en vert), leucine (en violet) ou isoleucine (en rose)..... 175

Figure 53 : Les trois orientations possibles d'un résidu phénylalanine en position 278 (en bâtonnets gris). Sont représentés en CPK les résidus Ile189 (en rose), Ala282 (en bleu) et Ile285 (en orange). La cavité enzymatique est représentée en vert par transparence. 176

Figure 54 : Représentation des volumes pouvant être balayés par les résidus hydrophobes en position 282 : alanine (maillage bleu), valine (maillage vert), leucine (maillage violet) ou isoleucine (maillage rose). Sont représentés en CPK les résidus Ile189 (en rose), Leu278 (en violet) et Ile285 (en orange). La cavité enzymatique est représentée en blanc..... 177

Figure 55 : Le tunnel d'accès au site actif de la CALB. a) Occupation volumique des résidus hydrophobes susceptibles d'influencer l'accès de l'alcool de l'enzyme sauvage: Ile189, Leu278, Ala282 and Ile285 (surface de l'ensemble de rotamères); b) le mutant Ala282Leu; c) le mutant Leu278Val; d) le mutant Ile189Ala; l'occupation volumique des mutants est représentée par un maillage noir..... 179

Figure 56 : Structure du second intermédiaire tétraédrique formé par la CALB sauvage et le mutant Ala282Leu avec le (*R*)-1-éthylpentyl propionoate (en gris) par liaison covalente avec la Ser105 (second intermédiaire tétraédrique formé avec le (*R*)-heptan-3-ol). L'occupation volumique du résidu muté est représentée par un maillage noir. Le (*R*)-heptan-3-ol occupe partiellement le volume balayé par les rotamères de la leucine en position 278. 185

Figure 57 : Modification du site actif de l'enzyme suite à la fixation de l'alcool à un site de fixation secondaire..... 188

Figure 58 : Modification du site actif de l'enzyme induit par la fixation d'une molécule (substrat ou analogue de substrat) à effet "d'empreinte" au site actif (d'après Rich et coll., 2002). 189

Figure 59 : Variations de E avec la longueur de la chaîne alkyle du donneur d'acyle..... 199

Figure 60 : Valeurs de E obtenus avec des donneurs d'acyle à chaîne alkyle chirale..... 201

Figure 61 : Diagrammes d'énergie d'activation, d'enthalpie d'activation, et d'entropie d'activation d'une réaction catalysée par une enzyme énantiosélective. E est l'enzyme, S le substrat, P le produit et TS l'état de transition. Le trait pointillé représente l'énantiomère lentement transformé par l'enzyme (*S* ici) et le trait plein l'énantiomère rapidement transformé par l'enzyme (*R* ici) (Ottosson et coll., 2001). La figure correspond au cas le plus fréquent où l'énantiomère préféré est favorisé par l'enthalpie et défavorisé par l'entropie..... 208

Figure 62 : Influence de l'activité thermodynamique de l'eau (a_w) sur l'énantiosélectivité de la CALB et ses variants pour l'acylation du pentan-2-ol ($a_{\text{pentan-2-ol}} = 0,05$), le donneur d'acyle est le méthyl propionate ($a_{\text{méthyl propionate}} = 0,1$), la température est fixée à 318K (d'après Léonard, 2007). 214

Figure 63 : Régressions linéaires de LnE en fonction de 1/T, utilisées pour déterminer les paramètres thermodynamiques d'activation des réactions catalysées par la CALB et ses variants Thr42Val, Ser47Ala et Thr42ValSer47Ala. 218

Figure 64 : Régression linéaire de LnE en fonction de 1/T, utilisée pour déterminer les composantes thermodynamiques des variants Ile189Ala, Leu278Val et Ala282Leu de la CALB..... 221

Figure 65 : Représentation schématique du site actif de la subtilisine (triade catalytique et trou oxyanionique) et des centres réactionnels du saccharose (sites 6OH, 6'OH et 1'OH) (Fuentes et coll., 2002)..... 224

Figure 66 : Détermination par IGC de la composante dispersive de l'énergie de surface du solide (CALB immobilisée) γ_{Sd} et de la composante spécifique de l'énergie libre d'adsorption ΔG_{adssp} des sondes polaires sur le solide.	232
Figure 67: Isotherme d'adsorption de l'eau à 298K avec le Chromosorb seul (\circ) et avec la CALB immobilisée (5mg de Chirazyme L2 lyophilisée par gramme de Chromosorb) (\blacklozenge). A. Isotherme complète. B. agrandissement de la zone à faible a_w	237
Figure 68 : Modèle BET de l'isotherme d'adsorption d'eau sur la CALB immobilisée : $aw(1 - aw) \times m$ en fonction de l' a_w et droite de régression obtenue pour a_w comprise entre 0,2 et 0,6 permettant de calculer m_0 , la masse de l'eau fixée par mg d'enzyme immobilisée lorsqu'une monocouche d'eau est formée.....	238
Figure 69: Isotherme d'adsorption de l'eau sur CALB à 298K, obtenue en soustrayant l'isotherme de sorption du support seul à l'isotherme de l'enzyme immobilisée.....	239
Figure 70 : Evolution du volume de rétention spécifique V_g pour des molécules apolaires sous l'influence de la CALB immobilisée avec l' a_w à 313K : undecane (\blacklozenge), decane (\square), nonane (\blacktriangle), octane (\diamond) and heptane (x).	242
Figure 71 : Exemple de courbe obtenue en traçant $RTLn(V_g)$ en fonction de $a(\gamma_{Ld})^{0.5}$, permettant de déterminer ΔG_{adssp} du 1,4-dioxane et du chloroforme sur la CALB immobilisée à partir de la droite des alcanes.....	244
Figure 72 : Surface de la CALB vue par dessus (du côté du site catalytique, à gauche) et du côté opposé (à droite). Les acides aminés basiques sont représentés en bleu et les acides en rouges.	244
Figure 73: Variation de la composante spécifique de l'énergie libre d'adsorption ΔG_{adssp} de l'éthanol, de l'acétonitrile et de l'éthyl acétate sur la CALB immobilisée avec l' a_w à 313K.....	245
Figure 74: Détermination de l'enthalpie d'adsorption spécifique pour a_w égale à 0,2, à l'aide de la courbe $\Delta G_{adssp}/T$ en fonction $1/T$ pour les températures comprises entre 313 et 338K.	246
Figure 75: Evolution des paramètres acide (K_A) et base (K_B) de la CALB immobilisée en fonction de l' a_w	247
Figure 76 : Variation de $Ln(V_g/T)$ en fonction de $1/T$, permettant de déterminer ΔH_{ads} , obtenue pour l'adsorption du pentan-2-ol sur la CALB immobilisée.	248
Figure 77 : Evolution de l'enthalpie d'adsorption du pentan-2-ol (\diamond) et du hexan-3-ol (\blacklozenge) sur la CALB immobilisée en fonction de l'activité de l'eau.....	249

Schémas

Schéma 1 : Structure du détergeant Tween 80 et de l'inhibiteur phosphonate co-cristallisés avec la CALB et structure de l'ester utilisé pour l'étude par modélisation moléculaire (d'après Uppenberg et coll., 1995).....	14
Schéma 2 : Réactions catalysées par la CALB.....	22
Schéma 3 : Modèles de réactions chimio-, régio-, diastéréo- et énantiosélectives.....	23
Schéma 4 : Acylation chimiosélective de la N-méthyl-glucamine avec l'acide oléique catalysée par la CALB (Maugard et coll., 1997).	24
Schéma 5 : Acylation chimiosélective du 6-aminohexan-1-ol avec l'acide oléique catalysée par la CALB (Husson et coll., 2008).....	24
Schéma 6 : Structure de quelques isoprostanes 1,5-diols asymétriques, et résultats de la régiosélectivité observée (Oger et coll., 2010)	25
Schéma 7 : Structure de la rutine. La flèche verte indique la fonction attaquée sélectivement par la CALB (De Oliveira et coll., 2009).....	26
Schéma 8 : Acylation régiosélective de la 5-azacytidine avec le vinyl laurate e catalysée par la CALB en solvants organiques.....	26
Schéma 9 : Réaction d'aminolyse catalysée par la CALB du mélange de diastéréoisomères de l'éthyl déca-2,4-diénoate en vue de la production de la <i>cis</i> -pellitorine (Ley et coll., 2004).....	27
Schéma 10 : Résolution des amines secondaires avec l'éthyl octanoate catalysée par la CALB (Ohrner et coll., 1996).....	28
Schéma 11 : Structure du dipeptide Lys-Ser. La flèche verte indique la fonction attaquée sélectivement par la CALB (Husson et coll., 2009).....	28
Schéma 12 : Dédoublément enzymatique. R et S représentent les énantiomères substrat, P et Q représentent les énantiomères produit.	30
Schéma 13 : Structure de quelques complexes de ruthénium en demi-sandwich (Mavrynsky et coll., 2009).....	38
Schéma 14 : Résolution cinétique dynamique du (\pm)-1-phényl éthanol et du (\pm)-1-(furan-2-yl) éthanol avec le isopropenyl acétate catalysée par la CALB couplée à un complexe de ruthénium.....	38
Schéma 15 : Structure du 1-hétéroaryl éthanol (Vallin et coll., 2009).....	38
Schéma 16 : Résolution des alcools secondaires catalysée par la CALB en utilisant des vinyl esters d'acides aminés en tant que donneurs d'acyle.	39
Schéma 17 : Structure de quelques alcool et esters utilisés lors de l'étude de l'influence de l'eau sur l'énantiosélectivité de la CALB : A. (\pm)-1-phénoxypropan-2-ol (Anthonsen et Hoff, 1998) ; B. (\pm)-seudenol (Orrenius et coll., 1995) ; C. (\pm)-ibuprofène (Ducret et coll., 1998 ; (Pepin P et Lortie R 1999) ; D. acide phénylpropanoïque (Persson et coll., 2002).....	45

Schéma 18 : hydrolyse de diéthyl 3-(3,4-dichlorophényl)pentanedioate par la CALB (Suen et coll., 2004).....	53
Schéma 19 : Structures des substrats utilisés pour caractériser les variants de la CALB obtenus par permutation circulaire (Qian et coll., 2007 ; Qian et coll., 2009). (A) Structure de la tributyrine. (B) Structure du DiFMU octanoate. (C) <i>p</i> -nitrophényl butyrate	55
Schéma 20 : Structures des alcools halogénés et valeurs de E obtenues avec la CALB sauvage et ses variants Thr42Val, Ser47Ala et Thr42ValSer47Ala (d'après Rotticci et coll., 2001)	57
Schéma 21 : Réaction d'alcoololyse du méthyl propionate avec le <i>n</i> -propanol catalysée par la CALB.	66
Schéma 22 : Réaction de synthèse d'ester à partir de l'acide propionique	89
Schéma 23 : Réaction de synthèse d'ester à partir de l'anhydride propionique.....	90
Schéma 24 : Réaction de synthèse (<i>R</i>)-1-méthylpentyl propionate par voie enzymatique.	90
Schéma 25 : Réaction d'acylation (ou de transestérification) catalysée par la CALB. R ₁ , R ₂ et R ₃ correspondent à des chaînes alkyle comportant 1 à 6 atomes de carbone.....	91
Schéma 26 : réaction de transestérification du (±)-ethyl 2-bromo-2-phenyl-acetate et de l'octan-1-ol catalysée par la lipase de <i>Bulkhoderia cepacia</i> (d'après Guieysse, et coll., 2003).	170
Schéma 27 : Réaction d'acylation des alcools secondaires par le méthylpropionate.....	178
Schéma 28 : a) structure de l'éphédrine, molécule à résoudre; b) structure d'une unité du polymère, le 2-hydroxyéthyle méthacrylate ; c) structure probable du complexe formée entre l'(-)-éphédrine et l'hydroxyéthyle méthacrylate (d'après Piletsky et coll., 2001).....	190
Schéma 29 : structures des substrats (<i>p</i> -nitrophényl acétate et <i>p</i> -nitrophényl salicylate) et des unités constituant les polymères (acide méthacrylique et acide itaconique).....	190
Schéma 30 : Schéma de la réaction d'acylation de la thymidine avec le vinyl butyrate catalysée par la subtilisine (d'après Rich et Dordick, 1997).....	191
Schéma 31 : Réaction de transestérification du (±)-1-phénoxypropan-2-ol catalysée par la CALB dans l'hexane, esters utilisés et E mesurés (d'après Hoff et coll., 1996).....	192
Schéma 32 : réaction de transestérification des alcools secondaires chiraux (3a-3c) et leurs esters homologues (1a-1c) catalysée par la CALB et la lipase de <i>Bulkhoderia cepacia</i> . E ₁ correspond au ratio énantiomérique mesuré lors de la réaction de transestérification en présence de vinyl acétate par la lipase de <i>Bulkhoderia cepacia</i> et E ₂ au ratio énantiomérique mesuré lors de la réaction de transestérification réalisée entre l'alcool et son ester homologue (d'après Lee et coll., 2000).	193
Schéma 33 : Résolution de (±)- <i>cis</i> -2-phenylcyclopentanamines, par aminolyse des esters catalysée par la CALB, structure des esters étudiés et E mesurés (d'après Gonzalez-Sabin et coll., 2003).....	194
Schéma 34 : Résolution de (±)-1-phénylbutan-1-ol par la CALB : a) réaction de transestérification ; b) réaction d'aminolyse du (±)-1-phénylbutyl acétate, amines utilisées et E mesurés (d'après Garcia-Urdiales et coll., 2001).	196
Schéma 35 : Réaction de transestérification étudiée. La partie alkyle de l'ester est variable : les radicaux méthyle, éthyle, propyle, butyle, pentyle, 1-méthylpropyle, 1-éthylbutyle et (±, R et S)-1-méthylpentyle ont été testés.	197

Schéma 36 : Structures des esters utilisés comme donneurs d'acyle. 198

Schéma 37 : Structures des alcools utilisés par Ottosson et coll. (2002) pour l'étude de l'influence du substrat sur les paramètres thermodynamiques d'activation lors de leur résolution par la CALB..... 210

Schéma 38 : Structure du (\pm)-1-phényléthylamine et de son homologues phosphorylés *R* lié par liaison covalente à la Ser105 (d'après Bocola et coll., 2003). 225

Tableaux

Tableau 1 : Exemples de l'activité biologique de différents composés en fonction de leur configuration absolue..... 8

Tableau 2 : Résolution d'alcools secondaires par la lipase B de *Candida antarctica* (Orrenius et coll., 1998). Le donneur d'acyle est le S-éthyl thiooctanoate. La température est fixée à 40°C. La réaction a lieu sans solvant. Le ratio énantiomérique (E) a été déterminé d'après la méthode de Rakels et coll. (1993). 36

Tableau 3 : Log P de solvants organiques couramment utilisés en biocatalyse. (Anthonsen T et Jongejan J A 1997). 48

Tableau 4 : Ordre de grandeur des différentes interactions..... 69

Tableau 5 : Enthalpies d'adsorptions (ΔH_{ads}) des constituants d'arôme sur l'amidon de maïs à forte teneur en amylose, comparées aux enthalpies de condensation (ΔH_c) des composés (données de la littérature, NIST Chemistry WebBook). Les différences $\Delta H_{ads} - \Delta H_c$ correspondent aux énergies d'interaction entre les constituants d'arôme et l'amidon (d'après Boutboul et coll., 2002a). 81

Tableau 6 : Effet des émulsifiants adsorbés sur le saccharose sur la composante dispersive de son énergie de surface (γ_{Sd}) et ses constantes d'acidité et de basicité (K_A et K_B). 81

Tableau 7 : Evolution en fonction du taux d'humidité relative de la composante dispersive de l'énergie de surface (γ_{Sd}) du coton et des enthalpies et des entropies d'adsorption (ΔH_{ads} et ΔS_{ads}) des parfums sur le coton (d'après Cantergiani et Benczedi, 2002). 82

Tableau 8 : Evolution des températures de transition vitreuse du maltose en fonction du taux d'humidité relative (Thielmann et Williams, 2000). 82

Tableau 9 : Enthalpie d'adsorption ($|\Delta H_{ads}| \pm$ écart-type standard) de sondes volatiles individuelles sur les protéines de soja à des humidités relatives. Résultats obtenus à partir de deux colonnes et un total de quatre mesures à partir des expériences réalisées à 30, 35 et 40 °C (d'après Zhou et Cadwallader, 2006). 83

Tableau 10 : Propriétés des alcools secondaires utilisés lors de cette étude. 87

Tableau 11 : Propriétés des esters commerciaux utilisés lors de cette étude..... 88

Tableau 12 : Conditions d'analyse (températures de l'injecteur, de la colonne et du détecteur, et débit de la colonne) des produits des réactions menées en réacteur solide/gaz, choisis pour permettre une

bonne séparation des deux énantiomères de l'ester produit, et temps de rétention de ces énantiomères. 96

Tableau 13 : Caractéristiques des sondes n-alcane et polaires utilisées dans l'IGC : aire moléculaire (a), la tension de surface (γ) à 20 °C, nombre accepteur d'électrons de Fowkes (AN*) et nombre donneur d'électrons de Gutman (DN). 105

Tableau 14 : Récapitulatif des modes de fixation du pentan-2-ol après optimisation. *m* correspond à la moyenne des énergies des 54 structures et *s* à l'écart-type. 130

Tableau 15 : Récapitulatif des modes de fixation du butan-2-ol après optimisation. *m* correspond à la moyenne des énergies des 18 structures et *s* à l'écart-type. 135

Tableau 16 : Récapitulatif des modes de fixation du butan-2-ol et du pentan-2-ol après optimisation. Les chiffres entre parenthèses correspondent au nombre de structures non productives. 143

Tableau 17 : Meilleures énergies mesurées pour les structures retenues après application des trois critères énergétiques et pour les structures retenues et productives. Ces valeurs n'appartiennent pas à une même structure. Les modes de fixation de ces structures sont entre parenthèses ; (int) représente le mode intermédiaire. E_{pT} , E_{intES} , E_{intEA} , E_{pS} et E_{pA} représentent respectivement l'énergie potentielle totale, l'énergie d'interaction entre l'enzyme et le substrat, l'énergie d'interaction entre l'enzyme et la partie alcool du substrat, l'énergie potentielle du substrat et l'énergie potentielle de la partie alcool du substrat (en kcal.mol⁻¹). 151

Tableau 18 : Energies mesurées pour la structure ayant l'énergie interaction entre l'enzyme et la partie alcool du substrat la plus basse parmi les structures retenues après application des trois critères énergétiques et pour les structures retenues et productives. E_{pT} , E_{intES} , E_{intEA} , E_{pS} et E_{pA} représentent respectivement l'énergie potentielle totale, l'énergie d'interaction entre l'enzyme et le substrat, l'énergie d'interaction entre l'enzyme et la partie alcool du substrat, l'énergie potentielle du substrat et l'énergie potentielle de la partie alcool du substrat (en en kcal.mol⁻¹). 151

Tableau 19 : Récapitulatif des moyennes des distances et des valeurs de distance les plus courtes (en Å) mesurées pour les structures retenues avec le butan-2-ol et le pentan-2-ol. 155

Le tableau 20 : Solutions retenues avec le deuxième crible énergétique : nombre de solutions et leur répartition selon les différents modes. P représente les structures productives et NP les structures non productif. Lorsque la solution est unique, la valeur entre parenthèses correspond à l'énergie d'interaction ; dans le cas de plusieurs solutions, la valeur représente la moyenne des énergies d'interaction (en kcal.mol⁻¹). 158

Tableau 21 : Valeurs des angles dièdres du substrat lié à la Ser105 mesurées pour les structures retenues après application du deuxième critère énergétique. Les valeurs en gras correspondent aux dièdres modifiés lors de la construction des intermédiaires tétraédriques. P représente une structure productive, NP une structure non productive et (int) représente le mode intermédiaire. t1 à t7 correspondent respectivement aux angles dièdres $C_{\alpha}C_{\beta}O_{\gamma}C_1$, $C_{\beta}O_{\gamma}C_1C_2$, $O_{\gamma}C_1O_{12}C_{12}$, $C_1O_{12}C_{12}C_{11}$, $O_{\gamma}C_1C_2C_3$, $O_{12}C_{12}C_{13}C_{14}$, $C_{12}C_{13}C_{14}C_{15}$. E_{pS} est l'énergie potentielle du substrat en kJ.mol⁻¹. 161

Tableau 22 : Volumes occupés par les acides aminés (ensemble de rotamères) en positions 189, 278, 282 et 285 (en Å³). 173

Tableau 23 : Activités enzymatiques obtenues à 318K avec la CALB sauvage et ses mutants lors de la réaction d'acylation des alcools secondaires par le méthyl propionate (en μ mol de produits formés par minute et par mg d'enzyme libre). 180

Tableau 24 : Ratios énantiomériques $E^{[a]}$ obtenus à 318K avec la CALB sauvage et ses mutants lors de la réaction d'acylation des alcools secondaires par le méthylpropionate..... 183

Tableau 25 : Ratio énantiomérique, E , et ses composantes thermodynamiques pour la réaction de transestérification des alcools secondaires catalysée par la CALB. Le donneur d'acyle utilisé est le vinyl octanoate, sauf pour le 1-bromobutan-2-ol, pour lequel le vinyl propionate a été utilisé. Les erreurs ont été calculées à partir des erreurs standards de la régression linéaire de $\ln E = f(1/T)$ et E a été calculé à partir de la relation linéaire (Ottosson et coll., 2002) 210

Tableau 26 : Ratio énantiomérique, E , et ses composantes thermodynamiques pour la résolution cinétique du 3-méthylbutan-2-ol catalysée par la CALB et ses variants. $\Delta\Delta H^\ddagger$ et $\Delta\Delta S^\ddagger$ représentent les variations de $\Delta_{R-S}\Delta H^\ddagger$ et $\Delta_{R-S}\Delta S^\ddagger$ par rapport à l'enzyme sauvage. Les erreurs ont été calculées à partir des erreurs standards de la régression linéaire de $\ln E = f(1/T)$ et E à 296 K a été calculé à partir de la relation linéaire (Ottosson et coll., 2001). 212

Tableau 27 : Composantes thermodynamiques du ratio énantiomérique, E , pour l'acylation du pentan-2-ol ($a_{\text{pentan-2-ol}} = 0,05$), avec du méthyl propionate ($a_{\text{méthyl propionate}} = 0,1$) par la CALB à différentes activités thermodynamiques de l'eau (a_w) (Léonard, 2007). 216

Tableau 28 : Composantes thermodynamiques du ratio énantiomérique, E , pour l'acylation du pentan-2-ol ($a_{\text{pentan-2-ol}} = 0,05$), avec du méthyl propionate ($a_{\text{méthyl propionate}} = 0,1$) par la CALB et ses variants. 218

Tableau 29 : Ratio énantiomérique, E , et ses composantes thermodynamiques pour l'acylation du pentan-2-ol ($a_{\text{pentan-2-ol}} = 0,05$), avec du méthyl propionate ($a_{\text{méthyl propionate}} = 0,1$) catalysée par la CALB et ses variants..... 221

Tableau 30: Evolution de la composante dispersive de l'énergie de surface, γS_d à 313K et les paramètres acide (K_A) et base (K_B) de la CALB immobilisée avec l' a_w . (ND pour non déterminé)... 243

Photographies

Photographie 1 : Le réacteur solide/gaz 92

Photographie 2 : Flacons de saturation (étuve 1) 92

Photographie 3 : Bioréacteur (étuve 2)..... 92

Photographie 4 : Appareil IGC..... 102

Photographie 5 : Chambre d'échantillonnage et humidificateur (étuve 1) : flacons contenant les différentes sondes (à droite) et l'eau (à gauche)..... 103

Photographie 6 : Intérieur de la deuxième étuve contenant deux colonnes en verre..... 103

Publications
