



HAL
open science

Compréhension de l'énantiosélectivité de la lipase B de *Candida antarctica* : étude par modélisation moléculaire et expérimentation

Ludovic Chaput

► **To cite this version:**

Ludovic Chaput. Compréhension de l'énantiosélectivité de la lipase B de *Candida antarctica* : étude par modélisation moléculaire et expérimentation. Sciences agricoles. Université de La Rochelle, 2012. Français. NNT : 2012LAROS371 . tel-00825876

HAL Id: tel-00825876

<https://theses.hal.science/tel-00825876>

Submitted on 24 May 2013

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 7266**

THÈSE présentée par :

Ludovic CHAPUT

soutenue le : **28 septembre 2012**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de La Rochelle**

Discipline : **Biochimie**

**Compréhension de l'énantiosélectivité de la lipase B de
*Candida antarctica***

Étude par modélisation moléculaire et expérimentation

JURY :

Valérie THIERY
Catherine HUMEAU
Jürgen PLEISS
Marianne GRABER
Vinh TRAN

Professeur, Université de la Rochelle
Maître de conférences-HDR, Université de Lorraine, Rapporteur
Professeur, Université de Stuttgart, Rapporteur
Professeur, Université de La Rochelle, Co-directeur de thèse
Professeur, Université de Nantes, Co-directeur de thèse

Contributions scientifiques

En lien direct avec ce travail

Articles publiés dans des revues internationales à comité de lecture

Ludovic Chaput, Yves-Henri Sanejouand, Asma Balloumi, Vinh Tran et Marianne Graber (2012). Contribution of both catalytic constant and Michaelis constant to CALB enantioselectivity : Use of FEP calculations for prediction studies, *Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic* (76) 29-36.

Ludovic Chaput, Zsuzsanna Marton, Philippe Pineau, Lisianne Domon, Vinh Tran et Marianne Graber (2012). Enhancing the enantioselectivity of CALB by substrate imprinting : A combined experimental and molecular dynamics simulation model study, *Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic* (in press).

Communications orales et posters présentés lors de colloques

Ludovic Chaput, Yves-Henri Sanejouand, Vinh Tran et Marianne Graber. « Étude par modélisation moléculaire de l'énantiosélectivité de la lipase b de *Candida antarctica* » (communication orale). Journée de la section régionale Centre-Ouest Société Chimique de France, La Rochelle, France, 9-10 décembre 2010.

Ludovic Chaput, Yves-Henri Sanejouand, Vinh Tran et Marianne Graber. « Étude par modélisation moléculaire de l'énantiosélectivité de la lipase b de *Candida antarctica* » (communication orale). GGMM 2011, XVII^e congrès du Groupe de Graphisme et Modélisation Moléculaire, La Rochelle, France, 30 mai 2011.

Marianne Graber, **Ludovic Chaput** et Zsuzsanna Marton. « Substrate imprinting as a way to enhance lipase enantioselectivity » (poster). Biotrans 2011, Giardini Naxos, Italie, 2-6 octobre 2011.

Ludovic Chaput, Zsuzsanna Marton, Najla Fniter, Vinh Tran et Marianne Graber. « Amélioration de l'énantiosélectivité de la lipase B de *Candida antarctica* par l'effet d'empreinte : une étude modèle » (poster et courte communication orale), XXIV^e colloque du CSBO (Club Bioconversion en Synthèse Organique), Genoscope d'Évry, France, 27-29 juin 2012.

Autre travail

Zsuzsanna Marton, **Ludovic Chaput**, Guillaume Pierre et Marianne Graber (2010). Lipase hydration state in the gas phase : Sorption isotherm measurements and inverse gas chromatography, *Biotechnology Journal* (5) 1216–1225.

Je tiens à remercier ma co-responsable de thèse Marianne Graber pour ses nombreuses qualités que sont sa gestion rigoureuse du projet ANR Expenantio, ses vastes connaissances de la lipase B de *Candida antarctica* ainsi que ses connaissances plus générales de biochimiste, et enfin ses conseils précieux qui ont permis de guider mes travaux dans les bonnes directions au cours de ces trois années de recherche. Je remercie vivement mon co-responsable de thèse Vinh Tran, pour l'ensemble des connaissances en modélisation moléculaire qu'il a pu me transmettre, son expertise a permis de formidablement faire avancer mes travaux. Je le remercie également pour les nombreux débats d'idée sur la « mécanique » de l'enzyme que nous avons eu le plaisir d'avoir.

Je remercie Yves-Henri Sanejouand pour ses éclairages avisés de théoricien de la modélisation moléculaire. C'est toujours un grand plaisir d'écouter ses explications lumineuses.

Je tiens également à remercier l'ensemble des collaborateurs du projet ANR Expenantio pour la qualité de leur travail, tant sur le plan expérimental que théorique. Je les remercie pour les discussions passionnantes que l'on a pu avoir au cours de ces trois années. Parmi eux, je tiens à citer Karl Hult, professeur à l'Institut royal de technologie de Stockholm, ces connaissances encyclopédiques sur notre thème de recherche associées à sa grande capacité de réflexion ont été une bénédiction pour le projet ANR.

Je remercie les stagiaires pour le travail qu'elles ont réalisé au sein du laboratoire, ainsi que l'animation qu'elles ont apportée à la vie du laboratoire. Je garde également une pensée pour l'ensemble des chercheurs avec qui j'ai eu le privilège de discuter au cours de différents colloques. Je tiens aussi à remercier l'ensemble des professeurs et encadrants dont j'ai eu le plaisir de suivre les enseignements à l'université Paris Denis-diderot de 2004 à 2009, c'est aussi grâce aux connaissances qu'ils m'ont enseignées que j'ai pu mener à bien ces travaux de recherche.

Je remercie Manuel Dauchez et Nathalie Tarrat, qui ont permis au cours des comités de thèse, d'apporter un éclairage nouveau sur mes travaux. Enfin, je remercie tous les membres du laboratoire pour leur sympathie au quotidien, et l'ouverture sur leurs différents thèmes de recherche qu'ils ont eu l'occasion de me présenter. Je remercie enfin l'ensemble du personnel administratif et technique qui gravite autour des équipes de recherche et permet leur bon fonctionnement.

Table des matières

I	Introduction	5
II	Étude bibliographique	8
1	Généralités sur la CALB	9
1.1	Origine et utilisation de la CALB	9
1.2	Description de la structure de l'enzyme	10
1.2.1	Les structures cristallographiques	11
1.2.2	Flexibilité de la structure 3D et activation interfaciale	12
1.2.3	La conformation du site actif	15
1.2.4	Comparaison du site actif de la CALB avec d'autres enzymes	19
1.3	La catalyse enzymatique	20
1.3.1	Le rôle natif de la CALB	21
1.3.2	Le mécanisme réactionnel de transestérification	21
2	La sélectivité de la CALB et plus particulièrement l'énantiosélectivité	24
2.1	Sélectivité de la CALB	24
2.1.1	Chimiosélectivité chez la CALB	24
2.1.2	Régiosélectivité chez la CALB	24
2.2	Présentation générale de l'énantiosélectivité	25
2.2.1	La chiralité en chimie	25
2.2.2	L'énantiosélectivité et les enzymes	28
2.3	Étude de l'énantiosélectivité chez la CALB par modélisation moléculaire	32
2.3.1	L'orientation spatiale des substrats dans le site actif	32
2.3.2	Le modèle de reconnaissance des alcools secondaires chiraux	33
2.3.3	Prédiction de l'énantiosélectivité par différentes méthodes de modélisation moléculaire	35
3	Influence des différents paramètres de la réaction sur l'énantiosélectivité de la CALB	43
3.1	Influence du donneur d'acyle	43
3.1.1	Influence de la partie acyle du donneur d'acyle	43
3.1.2	Influence de la chaîne alkyle du donneur d'acyle	44
3.2	Influence de l'environnement	48
3.2.1	La température	48
3.2.2	Influence du solvant sur l'énantiosélectivité	52

3.2.3	L'activité thermodynamique de l'eau (a_w)	52
3.2.4	Effet de différents additifs ou de co-solvants	53
3.3	Effet des mutations de la CALB sur l'énantiosélectivité	56
3.3.1	Les mutations des résidus T42 et S47	56
3.3.2	Les mutations du résidu W104	57
 III Matériel et méthodes		58
 4 Les travaux expérimentaux		59
4.1	Mesure de l'énantiosélectivité	59
4.2	Détermination des constantes cinétiques pour les réactions de transestérification réalisées avec le butan-2-ol et le pentan-2-ol énantio-purs	60
4.2.1	Enzyme et réactifs pour la cinétique	60
4.2.2	Réaction enzymatique avec les alcools énantio-purs du butan-2-ol et du pentan-2-ol	60
4.2.3	Analyse en chromatographie en phase gazeuse	60
4.3	Expériences sur l'effet d'empreinte	61
4.3.1	Matériel et méthodes pour l'étude de l'effet d'empreinte par l'ester substrat	61
4.3.2	Matériel et méthodes pour l'étude de l'effet d'empreinte par des molécules co-immobilisées avec la CALB	64
4.3.3	Réaction enzymatique	65
 5 La modélisation moléculaire		67
5.1	La mécanique moléculaire	68
5.1.1	Le champ de forces	68
5.1.2	Le modèle de solvatation implicite	71
5.1.3	Minimisation	72
5.1.4	Les équations du mouvements	72
5.2	Trajectoire de l'enzyme seul avec le modèle EEF1	73
5.3	La perturbation de l'énergie libre	74
5.3.1	Principe général	74
5.3.2	La structure de l'enzyme et de l'intermédiaire tétraédrique	75
5.3.3	Les paramètres de la dynamique moléculaire	76
5.3.4	Le protocole de la perturbation de l'énergie libre	78
5.4	Étude de l'effet d'empreinte	80
5.4.1	Les trajectoires de dynamique moléculaire	80
5.4.2	L'étape de « clustering »	81
5.4.3	L'étude des structures extraites du « clustering »	82
5.5	Étude de différentes CALB ayant subi des mutations au niveau de la poche stéréospécifique	82
5.5.1	La dynamique moléculaire	82
5.5.2	L'étude du volume de la poche stéréospécifique	83
5.5.3	L'étude des liaisons hydrogène	83

IV	Résultats	85
6	Étude préliminaire de l'enzyme	86
6.1	Le pK_a des résidus de la CALB	86
6.2	Dynamique moléculaire de l'enzyme seul avec le modèle EEF1	89
6.3	Étude systématique de tous les conformères possibles au niveau de l'intermédiaire tétraédrique formé avec le pentan-2-ol	97
6.3.1	Énergie des 27 conformères pour la forme chirale S	98
6.3.2	Énergie des 27 conformères pour la forme chirale R	103
6.3.3	Comparaison de R et S	104
6.3.4	Étude complémentaire des énantiomères R et S	107
6.4	Conclusion sur l'étude préliminaire	114
7	Contribution des constantes catalytiques et de Michaelis pour la définition de l'énantiosélectivité de la CALB et prédiction de l'énantiosélectivité par la méthode de FEP	116
7.1	Détermination expérimentale des constantes cinétiques apparentes pour les formes énantiopures du butan-2-ol et du pentan-2-ol et calcul des ratios énantiomériques	117
7.2	Estimation du ratio énantiomérique par la méthode de FEP	122
7.2.1	L'intérêt du calcul de perturbation d'énergie libre	122
7.2.2	Résultats des calculs de FEP	124
7.2.3	L'orientation initiale des substrats utilisée pour les calculs de FEP et évolution de cette orientation au cours des trajectoires de FEP	127
7.2.4	Relation entre le profil de l'énergie libre de la réaction catalysée par l'enzyme et les résultats expérimentaux et théoriques	129
7.3	Conclusion sur l'évaluation du ratio énantiomérique et des calculs de FEP	131
8	Étude de l'effet d'empreinte	132
8.1	Étude théorique de la cinétique du mécanisme Bi-Bi Ping-Pong impliquant un mélange racémique d'alcools comme second substrat	133
8.1.1	Étude du modèle cinétique	133
8.1.2	Détermination des paramètres cinétiques et de l'expression du ratio énantiomérique	136
8.2	Étude de l'effet d'empreinte engendré par le premier substrat ester de la réaction par modélisation moléculaire	139
8.2.1	Résultats expérimentaux de Marton	139
8.2.2	RMSD et « clustering » des trajectoires	141
8.2.3	Affinage du « clustering » de la CALB	146
8.2.4	« Clustering » sur le site actif	149
8.2.5	Étude de la superposition du site actif de l'enzyme avec les deux formes énantiomériques de l'intermédiaire tétraédrique en alignant les structures de la CALB sur le feuillet de brins β	157
8.3	Résultats expérimentaux de l'étude de l'effet d'empreinte provoqué par des molécules co-substrats co-séchées ou co-immobilisées avec l'enzyme	159
8.4	Conclusion sur l'effet d'empreinte	164

9	Étude de variants de la CALB obtenus par mutation au niveau de la poche stéréospécifique	165
9.1	Les résultats expérimentaux	165
9.2	Analyse du volume de la poche stéréospécifique de la CALB sauvage et de ses variants	167
9.2.1	Analyse des variables d'ajustement de l'outil de mesure du volume de la poche stéréospécifique	167
9.2.2	Comparaison de la CALB sauvage et de ses variants	174
9.3	Le réseau de liaisons hydrogène entre les résidus de la poche stéréospécifique dans le site actif	175
9.4	Étude des conformères des résidus S47 et T42 chez la CALB sauvage et ses variants	177
9.5	Les liaisons hydrogène entre les résidus de la poche stéréospécifique et des molécules d'eau	181
9.6	Conclusion sur l'étude des mutants	186
V	Conclusion générale et perspectives	189
	Bibliographie	209
A	Étude cinétique du mécanisme Bi-Bi Ping-Pong	210
B	Annexe concernant les résultats du « clustering » dans les travaux sur l'effet d'empreinte	213
C	Publications	220

Première partie

Introduction

En 1848, Louis Pasteur réussit la séparation de deux formes de cristaux de l'acide tartrique, chaque type de cristaux déviant la lumière dans un sens opposé. Cette découverte capitale dans l'histoire de la chimie allait conduire à la définition d'une nouvelle notion : la chiralité. Elle caractérise de nombreux composés existant sous deux formes énantiomériques images l'une de l'autre dans un miroir et non-superposables, qui dévient la lumière dans des sens opposés et présentent des caractéristiques chimiques communes tandis que leurs propriétés biologiques peuvent être très différentes. Un mélange racémique définit un mélange équimolaire de deux énantiomères.

Le principe bioactif de nombreux médicaments se présente sous la forme d'un énantiomère pur, l'autre forme chirale étant soit inactive, ou pis encore, délétère pour le patient. La part de composés énantiopurs dans les molécules thérapeutiques nouvellement développées est croissante. Dans ce contexte, la chimie chirale connaît un très fort essor avec une croissance du chiffre d'affaires annuel du secteur à deux chiffres durant la dernière décennie.

Les enzymes, fantastiques ingéniosités du vivant, constituent un outil idéal pour l'obtention de molécules énantiopures par dédoublement cinétique d'un mélange racémique. Parmi les enzymes, les lipases sont les biocatalyseurs les plus utilisés pour le dédoublement de mélanges racémiques d'alcools, d'acides, d'amines, et d'autres composés. Elles sont capables de catalyser l'hydrolyse ou la synthèse énantiosélective d'une grande variété de substrats.

Ces travaux de thèse s'attachent à mieux comprendre l'origine de l'énantiosélectivité chez la lipase B de *Candida antarctica* (CALB). Un des ambitieux défis posés ici est celui de la prédiction *in silico* de l'énantiosélectivité de l'enzyme pour la résolution de cinq alcools secondaires linéaires et ramifiés. L'énantiosélectivité est directement liée à la différence d'énergie libre entre les barrières énergétiques des réactions pour chaque énantiomère, cette différence d'énergie est de l'ordre de seulement quelques kilocalories par mole et réussir à la mesurer avec une bonne précision pour discriminer deux substrats entre-eux est un travail délicat. Ici, on entreprend de prédire l'énantiosélectivité de la CALB et les outils de la modélisation moléculaire sont utilisés à cet égard. La prédiction est réalisée à l'aide d'une méthode de calculs de différences d'énergie libre : la perturbation de l'énergie libre. Cette méthode offre le moyen de calculer rigoureusement l'énergie libre,

incluant *de facto* les contributions enthalpiques et entropiques, ce point est très important car des travaux expérimentaux ont montré que l'entropie est une composante importante de l'énantiosélectivité, il semblait donc essentiel de l'inclure dans ces calculs de prédiction.

La réaction de transestérification étudiée présente deux étapes, la première faisant intervenir un ester et la deuxième étape l'alcool à résoudre. De récents travaux montrent que la nature du groupe partant, c'est-à-dire la chaîne alkyle du donneur d'acyle, qui intervient au cours de la première étape influence l'énantiosélectivité de la réaction qui intervient dans la seconde étape. L'hypothèse d'un « effet d'empreinte » dans le site actif résultant du passage du premier substrat est proposée pour expliquer ce résultat inattendu. Une étude théorique exhaustive du modèle cinétique pour valider la méthode de mesure expérimentale des ratios énantiomériques est réalisée. On cherche également à comprendre par une étude de modélisation moléculaire l'effet du passage du premier substrat dans le site actif, et à identifier un effet d'empreinte au niveau du site actif. Pour cela, une analyse conformationnelle de la structure à différentes échelles est réalisée, lorsque des molécules à effet putatif d'empreinte sont présentes dans le site actif.

La dernière partie se consacre à l'étude de trois différents mutants de la lipase B de *Candida antarctica* : T42V, S47A, et T42V/S47A. Ces mutations portent sur des résidus du site actif, des travaux expérimentaux montrent que ces mutations induisent une modification des propriétés sélectives de l'enzyme, notamment une augmentation de l'énantiosélectivité pour les simples mutants. On réalise des trajectoires de dynamique moléculaire des différents mutants et une étude détaillée de la conformation du site actif, des réseaux de liaisons hydrogène et des molécules d'eau afin de tenter de fournir une explication rationnelle aux résultats expérimentaux observés.

Deuxième partie

Étude bibliographique

Chapitre 1

Généralités sur la CALB

Ce premier chapitre donne une présentation générale de la lipase B de *Candida antarctica*. L'origine de cet enzyme, ses fonctions, sa structure, et son mode de catalyse des réactions étudiées y sont présentés.

1.1 Origine et utilisation de la CALB

La levure *Candida*¹ *antarctica*² produit deux lipases nommées A et B. Dans la nature, ces lipases catalysent l'hydrolyse d'esters. Classiquement, il s'agit de l'hydrolyse de triacylglycérol en di- et monoglycéride, acides gras et glycérol. Bien que présentant quelques caractéristiques fonctionnelles d'intérêt, la lipase A demeure moins explorée que la lipase B [1]. La lipase B de *Candida antarctica*, usuellement nommée sous la forme acronymique anglo-saxonne « CALB », est une protéine globulaire de type hydrolase d'ester carboxylique (EC³ 3.1.1.3, triacylglycérol-acylhydrolase). Elle se compose de 317 acides aminés et son poids moléculaire est de 33 kDa. Son pH isoélectrique se situe à 6.

Sa capacité à fonctionner avec une large gamme de substrats est amplement exploitée par les industriels des secteurs agroalimentaires et biotechnologiques [2], en particulier pour des réactions de synthèse dans des milieux à faible teneur en eau.

Les lipases catalysent une grande variété de réactions de synthèse qui sont présentées

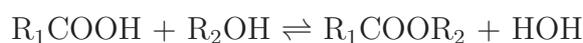
¹Du latin *candidus*, signifiant « blancheur » et faisant référence à l'aspect des colonies de levure du genre *Candida*.

²Nommée ainsi car elle fût découverte en Antarctique, dans les sédiments du lac Vanda.

³Enzyme Commission number.

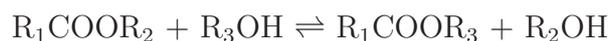
dans l'encadré ci-dessous.

-l'estérification :

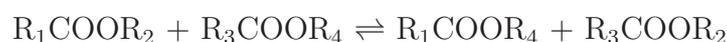


la transestérification :

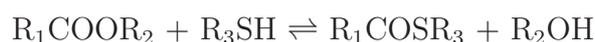
- alcoololyse (échange de groupements alcool) :



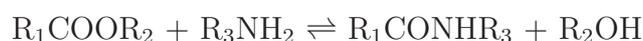
- interestérification (échange des groupements acyle et alcool) :



- thio-estérification (échange de groupement thiol) :



- l'aminolyse :



- l'amidation :



Parmi les nombreuses applications de la CALB, on peut citer la résolution d'alcools secondaires [3, 4], la production de polylactones [5, 6], ou encore la production de polyesters [7].

1.2 Description de la structure de l'enzyme

Les travaux de thèse portent pour une très grande partie sur des travaux de modélisation moléculaire. Dans ce contexte, il est essentiel de bien connaître la structure de l'enzyme.

1.2.1 Les structures cristallographiques

La première structure de la CALB fut déterminée en 1994 par Uppenberg *et al.* [8] avec la méthode de cristallographie aux rayons X (code PDB⁴ 1TCA). Cette structure présente une résolution de 1,55 Å. L'enzyme est co-cristallisé avec une molécule de *N*-acétyl-*D*-glucosamine et 286 molécules d'eau. Cette structure cristallographique comporte 317 acides aminés correspondant à la séquence de l'enzyme sauvage (*cf.* tableau 1.1) minorée des 25 premiers acides aminés composant la séquence propeptidique en position N-terminale. Les structures 1TCB et 1TCC déposées par Uppenberg *et al.* sur la Protein Data Bank sont des formes moins bien résolues de la CALB (résolutions de respectivement 2,10 et 2,50 Å).

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
MKLLSLTGVA	GVLATCVAAT	PLVKRLPSGS	DPAFSQPKSV	LDAGLTCQGA	SPSSVSKPIL
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
LVPGTGTTGP	QSFDSNWIPL	STQLGYTPCW	ISPPPFMLND	TQVNTEYMVN	AITALYAGSG
<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
NNKLPVLTWS	QGGLVAQWGL	TFFPSIRSKV	DRLMAFAPDY	KGTVLAGPLD	ALAVSAPSVW
<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>
QQTGTSALTT	ALRNAGGLTQ	IVPTTNLYSA	TDEIVQPQVS	NSPLDSSYLF	NGKNVQAQAV
<u>250</u>	<u>260</u>	<u>270</u>	<u>280</u>	<u>290</u>	<u>300</u>
CGPLFVIDHA	GSLTSQFSYV	VGRSALRSTT	GQARSADYGI	TDCNPLPAND	LTPEQKVA AAA
<u>310</u>	<u>320</u>	<u>330</u>	<u>340</u>		
ALLAPAAAAI	VAGPKQNCEP	DLMPYARPFA	VGKRTC SGIV	TP	

TAB. 1.1 – Séquence des acides aminés de la lipase B sauvage de *Candida antarctica*. La séquence propeptidique est grisée.

Uppenberg *et al.* ont également résolu la structure cristallographique de la CALB co-cristallisée avec une molécule de *N*-acétyl-*D*-glucosamine et de méthylpenta(oxyéthyl)heptadécanoate (code PDB 1LBT), sa résolution est de 2,50 Å.

On dispose aussi d'une structure de l'enzyme complexé avec un inhibiteur irréversible (code PDB 1LBS) : le *N*-hexylphosphonate-éthyl-ester formant une liaison covalente avec la sérine 105 du site actif. Le RMSD⁵, calculé sur les carbones α entre les structures 1TCA et 1LBS est de 0,33 Å. Les deux structures sont proches, la fixation covalente de

⁴Protein Data Bank.

⁵Le RMSD (Root Mean Square Deviation) permet de comparer la distance moyenne des atomes entre deux structures superposées. Sa formule est $\sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^n \delta_i^2}$ où δ_i est la distance entre N paires d'atomes présents dans les deux structures comparées.

l'inhibiteur n'entraîne pas de modification structurale importante de l'enzyme.

On trouve trois molécules d'eau dans le site actif de la structure cristallographique 1TCA. La structure cristallographique 1LBS comporte un inhibiteur lié de façon covalente avec la sérine de la triade catalytique, cette inhibiteur occupe la place des molécules d'eau dans la structure 1TCA, et l'on ne trouve donc pas de molécule d'eau dans le site actif de la structure 1LBS.

La lipase B de *Candida antarctica* est comme toutes les lipases une hydrolase α/β constituée d'une région centrale hydrophobe composée dans le cas de la CALB d'un feuillet de sept brins β dont six sont parallèles et un septième anti-parallèle, ce feuillet est entouré de dix hélices α . La structure et les motifs secondaires de l'enzyme sont représentés sur la figure 1.1. La longue hélice α orientée verticalement au premier plan sur la droite (*cf.* fig 1.1) de la structure est l'hélice α_{10} , elle vient directement border le site actif comme nous le verrons ultérieurement en détail.

Parmi les modifications post-traductionnelles, on note la présence de trois liaisons disulfure qui s'établissent entre les fonctions thiol des paires de cystéines suivantes : C22-C64, C216-C258, et C293-C311.

Le diagramme de Ramachandran [9] présenté figure 1.2 permet d'apprécier la distribution des couples d'angles φ et ψ chez la CALB (code PDB 1TCA), mettant en évidence le feuillet β parallèle ($\varphi = -120^\circ$ et $\psi = +115^\circ$) et les hélices α ($\varphi = -60^\circ$ et $\psi = -50^\circ$).

1.2.2 Flexibilité de la structure 3D et activation interfaciale

Facteur B

Le facteur d'agitation thermique (aussi appelé facteur B) des carbonnes α de la structure de la CALB (code PDB : 1TCA) présenté sur la figure 1.3 constitue un paramètre permettant en première approximation d'apprécier la « mobilité » des atomes au sein de la structure cristallographique. Les résidus du feuillet β sont les moins mobiles, tandis que les hélices α et les extrémités de la séquence sont davantage mobiles.

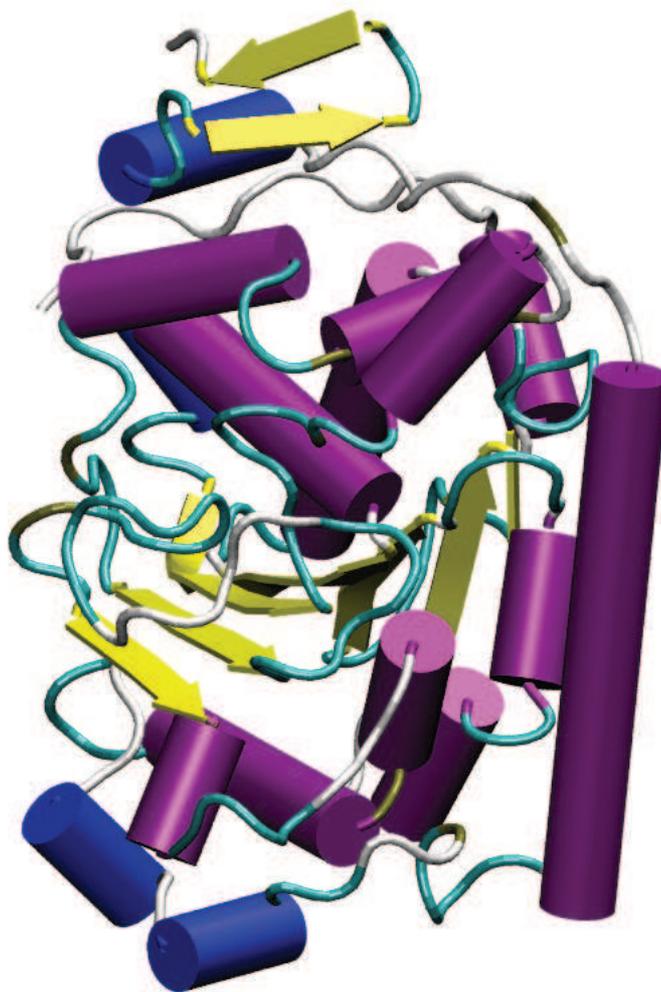


FIG. 1.1 – Représentation de la CALB (code PDB 1TCA). Le feuillet β est en jaune, les hélices α en violet, les hélices α_{310} en bleu, et les motifs « turn » en cyan.

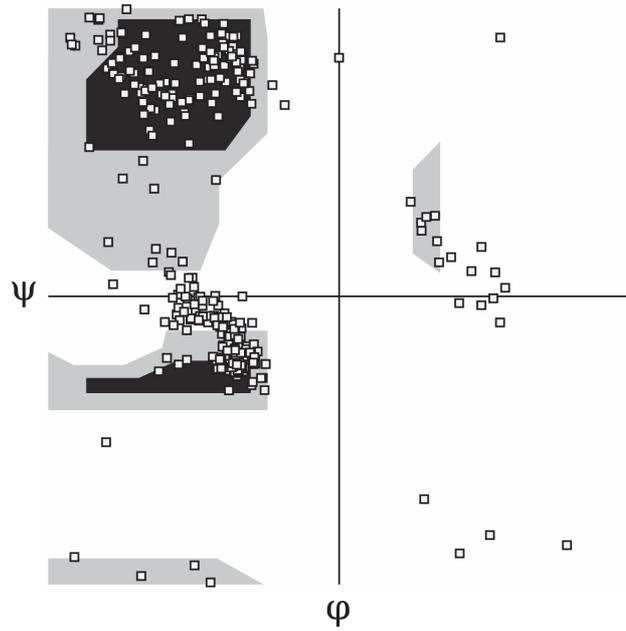


FIG. 1.2 – Diagramme de Ramachandran (angle φ et ψ) de la CALB (code PDB 1TCA).

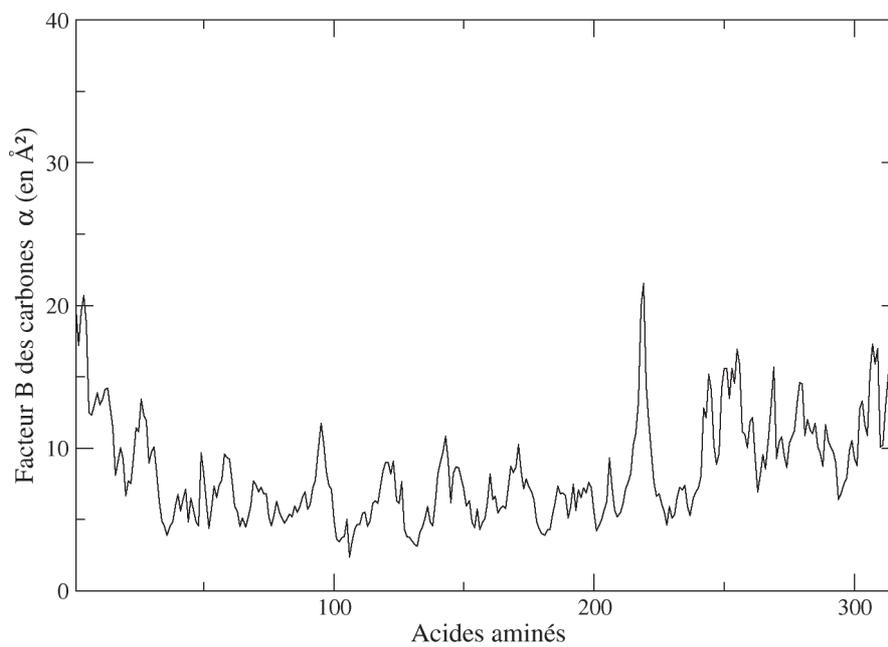


FIG. 1.3 – Facteur B de la structure cristallographique (code PDB : 1TCA) de la CALB.

L'activation interfaciale

La majorité des lipases sont caractérisées par le phénomène d'activation interfaciale [10] : lorsque la concentration micellaire critique⁶ est atteinte, les lipases situées à l'interface de la phase eau/lipide voient leur activité d'hydrolyse des acylglycérols fortement augmenter. Ce mécanisme d'activation interfaciale est attribué à l'existence d'une boucle amphiphile⁷ venant couvrir le site actif en position fermée dans un milieu aqueux, et s'ouvrant lorsque la lipase est à l'interface eau/lipide. Cette boucle est formée d'une ou deux hélices α flexibles. Bien que l'hélice $\alpha 5$ constitue une candidate idéale pour ce rôle chez la CALB du fait de sa proximité avec le site actif, des études ont montré que l'on ne retrouve pas ce phénomène chez cet enzyme [11, 12]. Les travaux de Uppenberg *et al.* [8, 13] sur la structure de l'enzyme concluent à l'absence de volet amphiphile.

La lipase A de *Candida antarctica* présente une activation interfaciale, mais de façon moins prononcée que chez la lipase de *Humicola lanuginosa* [12].

1.2.3 La conformation du site actif

La triade catalytique

Comme c'est généralement le cas pour les lipases (EC 3.1.1.3) et estérases (EC 3.1.1.1), la CALB est une protéase à sérine.

La triade catalytique est composée de la sérine 105, de l'histidine 224 et de l'aspartate 187 (figure 1.4). Le résidu nucléophile (S105) est situé dans un coude appelé « γ turn », situé entre le brin $\beta 4$ et l'hélice $\alpha 4$, cette localisation du coude nucléophile est caractéristique des hydrolases α/β (*cf.* figures 1.5 et 1.6).

La séquence consensus GXSXG très commune⁸ chez les lipases et les estérases diffère légèrement chez la CALB : TWSQG.

⁶Concentration en lipides à partir de laquelle la formation de micelle est spontanée.

⁷On parle de « lid domain » dans la littérature.

⁸On trouve néanmoins de nombreuses exceptions : acétylcholine esterase, haloalkane déshydrogénase, et thioesthérase.

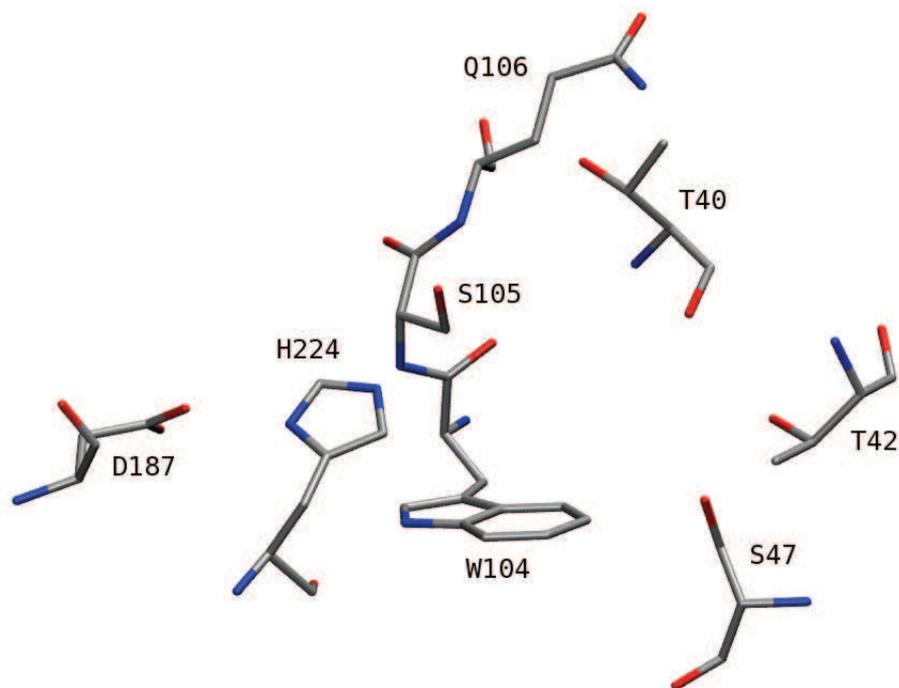


FIG. 1.4 – Triade catalytique (S105, H224, D187) de la CALB et acides aminés importants du site actif. Représentation des atomes lourds seuls.

Les acides aminés du site actif

Outre les acides aminés de la triade catalytique (S105, H224, et D187), on trouve le tryptophane 104 situé au fond du site actif. Les résidus thréonine 40 et glutamine 106 forment le trou oxyanionique stabilisant l'intermédiaire réactionnel abordé ultérieurement dans l'étude du mécanisme réactionnel (section 1.3.2). On trouve également dans le fond du site actif la sérine 47, la thréonine 42, et la glycine 39 limitant la taille d'une poche du site actif appelé « poche stéréospécifique » dont le rôle clef sera explicité dans la partie concernant le modèle de reconnaissance des alcools secondaires chiraux (section 2.3.2). L'entrée du site actif est bordée sur un côté par les résidus leucine 278, alanine 282 et isoleucine 285 faisant partie de l'hélice α_{10} (*cf.* figures 1.5 et 1.6). Sur l'autre bord, c'est le résidu histidine 224 qui limite essentiellement l'accès au site actif.

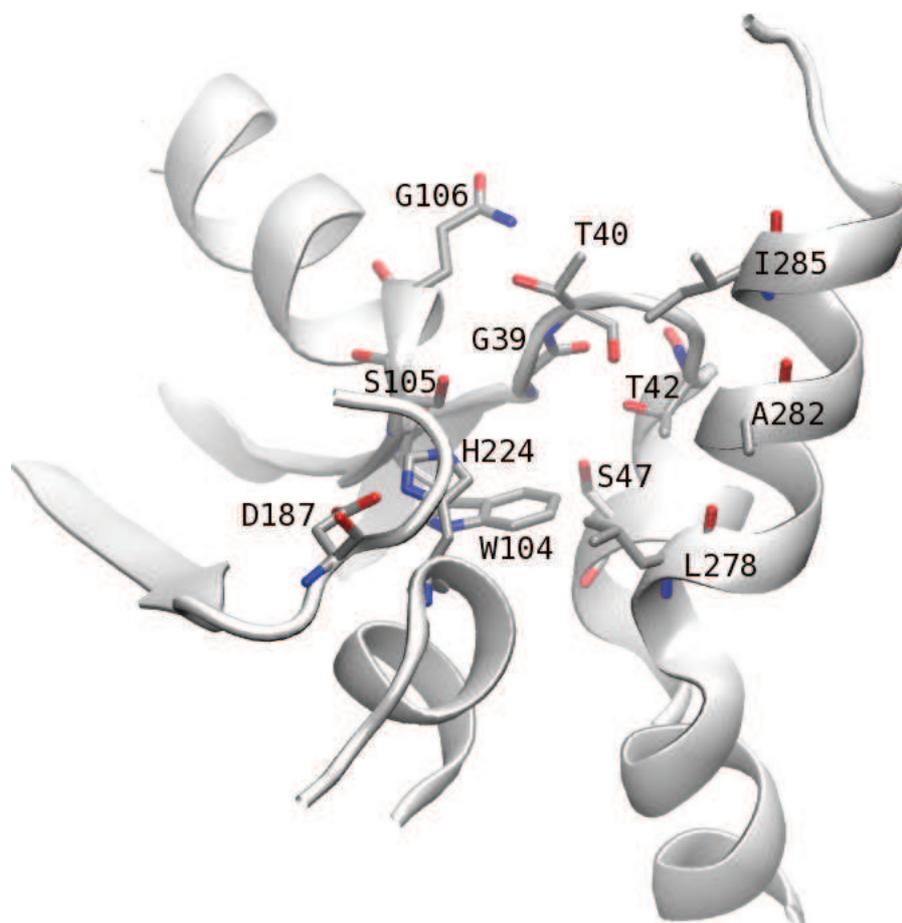


FIG. 1.5 – Site actif de la CALB (vue 1).

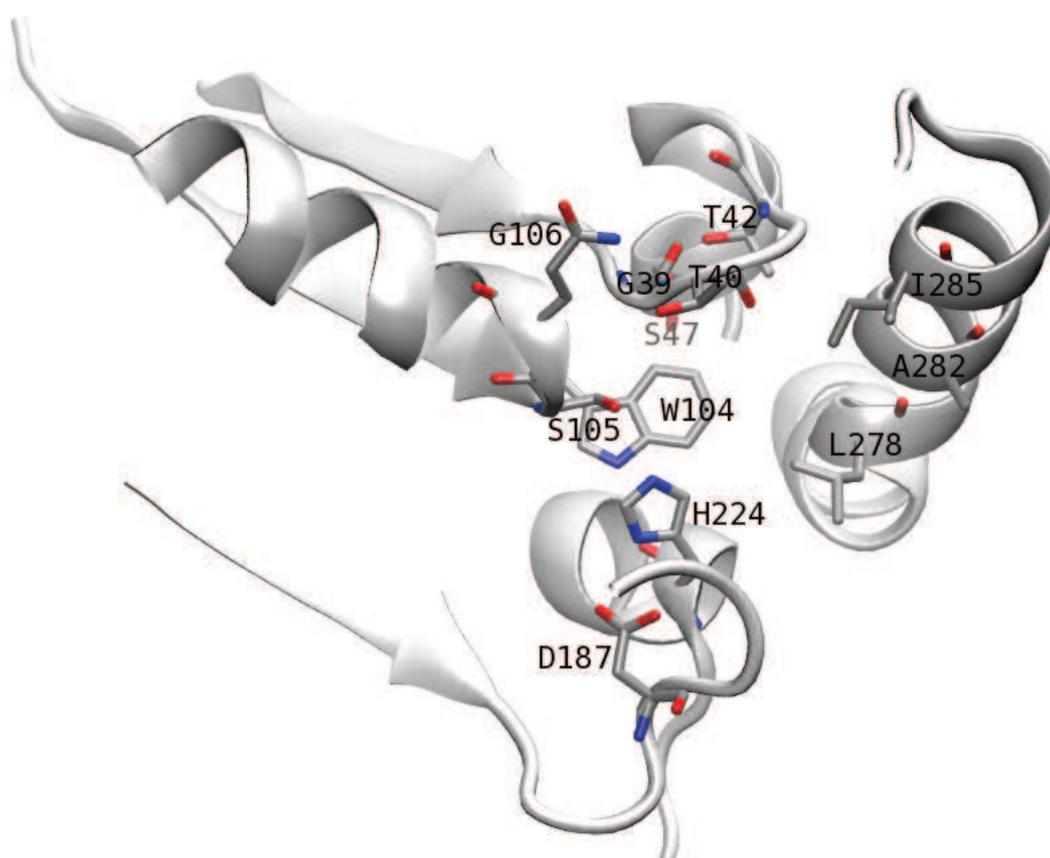


FIG. 1.6 – Site actif de la CALB (vue 2).

1.2.4 Comparaison du site actif de la CALB avec d'autres enzymes

À l'instar de la CALB, un certain nombre d'enzymes catalysent l'hydrolyse d'acides gras. Pleiss *et al.* [14] se sont intéressés à deux sérines estérases et huit lipases. Leurs architectures et mécanismes d'hydrolyse des esters sont similaires. La géométrie de leurs sites de liaison diffère. Les lipases ont un site de catalyse large et hydrophobe tandis que les estérases comme l'acétylcholinestérase et la bromopéroxydase ont une petite poche pour la partie acyle et la poche s'ajuste exactement avec leurs substrats naturels.

Les lipases et les estérases peuvent être divisées en trois groupes. (1) Les lipases telles que *Rhizomucor miehei* qui présente un site actif hydrophobe en crevasse localisé à la surface de la protéine. (2) La lipase B de *Candida antarctica*, celle de *Pseudomonas cepacia*, ainsi que celle du pancréas de mammifère et la cutinase de *Fusarium solani* présentent un accès au site actif en entonnoir. (3) Enfin, l'accès au site actif de la lipase de *Candida rugosa* forme un long tunnel de 22 Å. L'allure des sites actifs de ces différents enzymes est présentée sur les figures 1.7 et 1.8 .

Pour toutes les estérases à sérine et lipases, le site de liaison est situé dans une poche à l'extrémité d'un feuillet β central. Chez les lipases, la surface de l'enzyme au bord de la poche est hydrophobe permettant une bonne interaction avec les substrats.

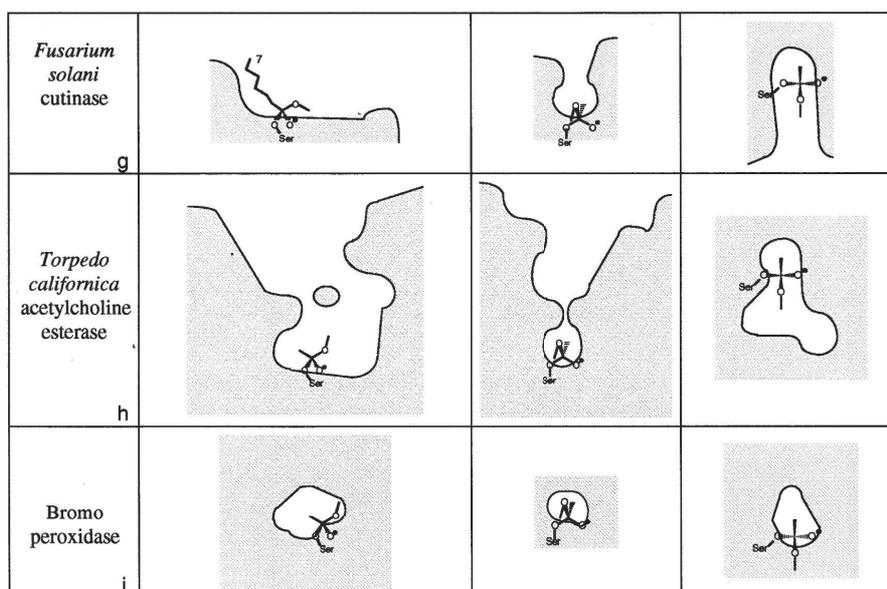


FIG. 1.7 – Sites catalytiques de deux estérases et une peroxydase (Pleiss *et al.*, 1998).

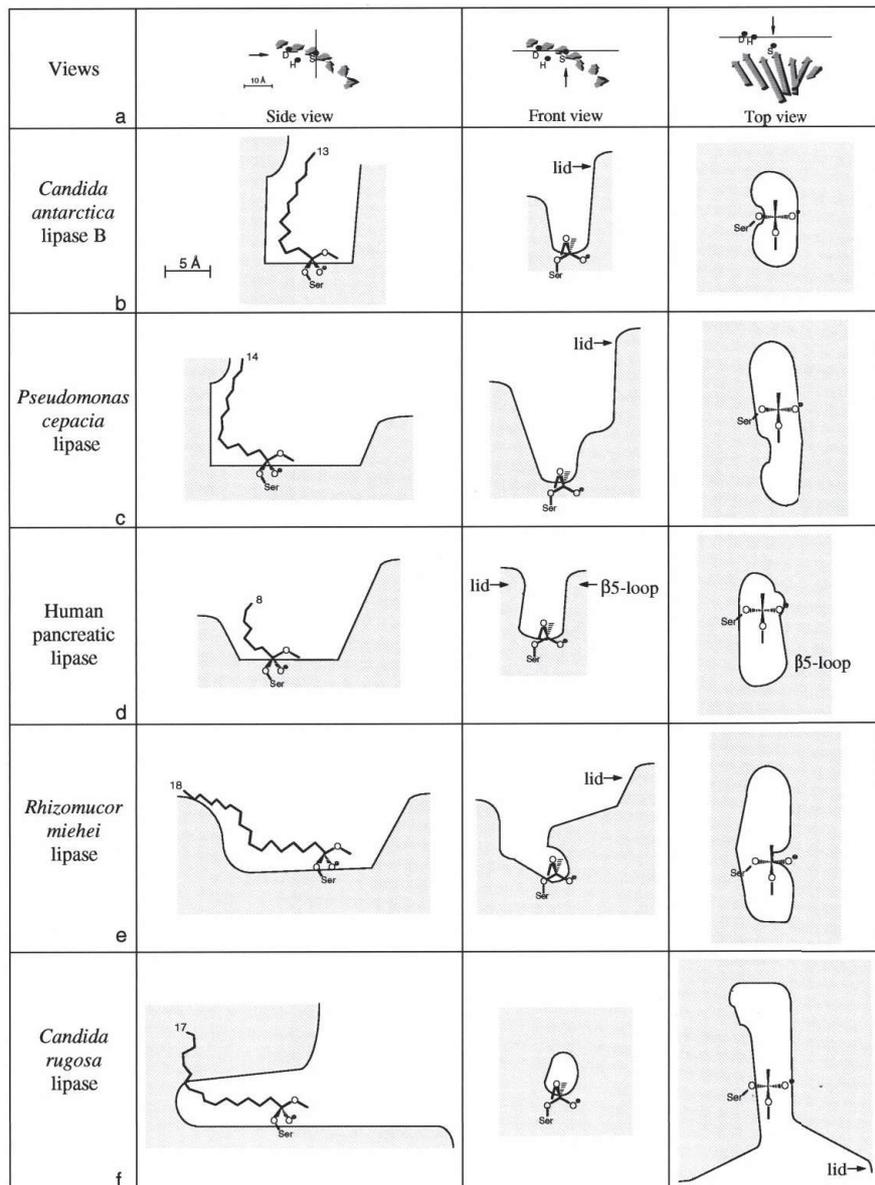


FIG. 1.8 – Sites catalytiques de cinq différentes lipases (Pleiss *et al.*, 1998).

1.3 La catalyse enzymatique

La lipase B de *Candida antarctica* peut être employée pour catalyser des réactions d'hydrolyse, d'estérification, et de transestérification, mais également de thioestérification, d'aminolyse et d'amidation.

1.3.1 Le rôle natif de la CALB

Dans la nature, la CALB catalyse des réactions d'hydrolyse. Comme de nombreuses lipases, elle assure préférentiellement l'hydrolyse des chaînes courtes en position 1 et 3 des triacylglycérides d'acides gras (*cf.* figure 1.9). Des travaux indiquent que l'hydrolyse en position 2 est également possible mais beaucoup moins efficace, à l'inverse des enzymes à régiosélectivité stricte tels que la lipase de *Rhizomucor mihei* [15].

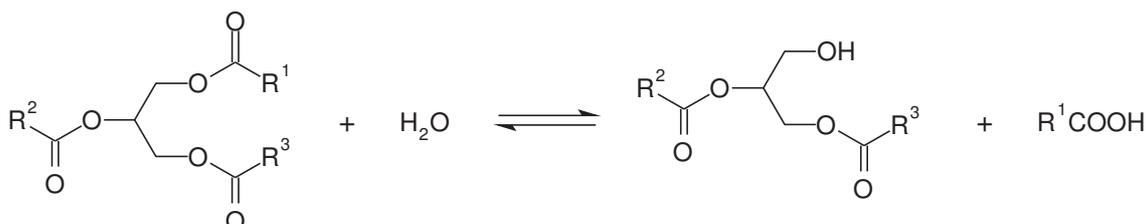


FIG. 1.9 – Hydrolyse d'un triacylglycéride en position 1.

La CALB possède une faible activité pour l'hydrolyse des triglycérides à chaînes longues.

1.3.2 Le mécanisme réactionnel de transestérification

Le mécanisme de la réaction de transestérification impliquant un ester et un alcool secondaire (*cf.* figure 1.10) est de type Bi-Bi Ping-Pong [16]. Il s'opère en deux étapes (figures 1.11). La figure 1.12 présente de façon détaillée le mécanisme de la réaction.

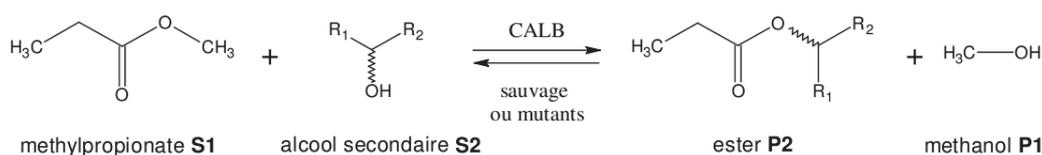


FIG. 1.10 – La réaction de transestérification des alcools secondaires.

Tout d'abord, la sérine 105 est déprotonnée par l'azote N_ϵ de H224, la charge positive du groupe imidazole de l'histidine est stabilisée par le partage d'un proton entre l'azote N_γ de H224 et la fonction carboxylate de l'aspartate 187. L'ester substrat est attaqué par la fonction alcoolate (attaque nucléophile) de la sérine 105. Puis s'ensuit la formation d'un intermédiaire tétraédrique (TS1) portant une charge négative stabilisée par le trou

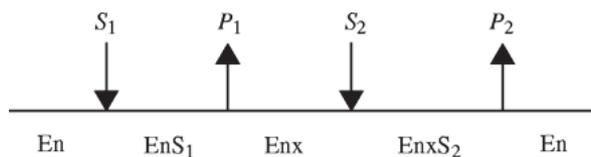


FIG. 1.11 – Représentation de Cleland du mécanisme Bi-Bi Ping-Pong. S_1 , S_2 , P_1 , et P_2 correspondent aux substrats et produits de la figure 1.10. En et Enx correspondent respectivement à l'enzyme et l'acyl-enzyme.

oxyanionique (thréonine 40 et glutamine 106), et la libération d'un alcool. Cette première étape dite étape d'acylation, conduit à la formation de l'acyl-enzyme (*cf.* figure 1.12, en bas à droite).

La deuxième étape est la désacylation de l'enzyme et la libération de l'ester produit, son mécanisme est analogue à celui de la première étape. Elle fait intervenir l'alcool substrat qui est déprotonné à son tour par l'histidine 224, la fonction alcoolate du substrat réalise l'attaque nucléophile de la sérine acylée au niveau de la fonction carbonyle, entraînant la formation d'un second intermédiaire tétraédrique (TS2). Finalement, l'ester produit est libéré et la fonction alcoolate de la sérine 105 récupère le proton porté par l'azote N_ϵ de H224. Les intermédiaires tétraédriques représentés sur la figure 1.12 sont des espèces chimiques instables dont les énergies sont proches des points hauts des barrières énergétiques associés aux états de transition de la réaction. Les intermédiaires tétraédriques comportent un atome d'oxygène chargé négativement dont la charge est stabilisée par le trou oxyanionique constitué des deux résidus T40 et Q106.

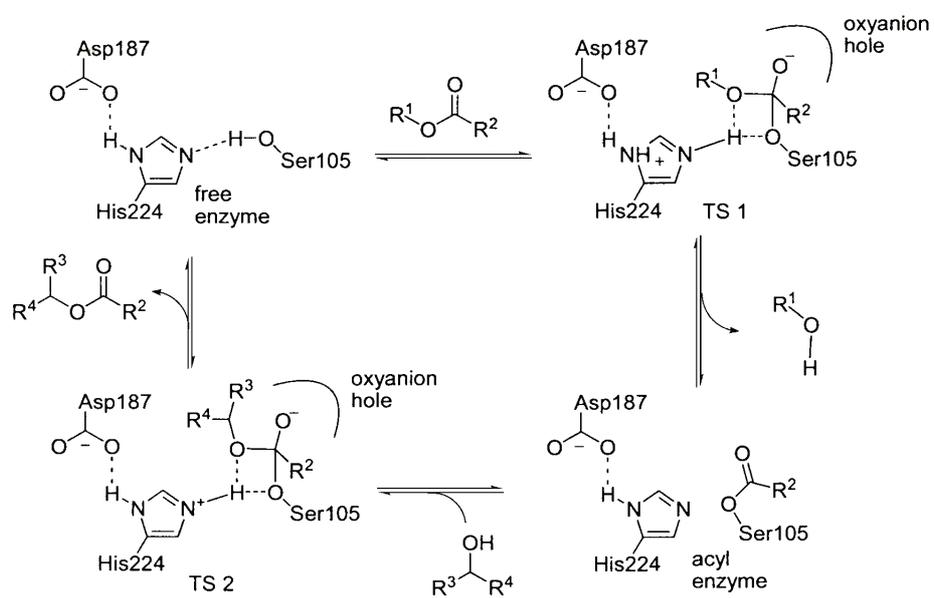


FIG. 1.12 – Mécanisme réactionnel de transestérification de la CALB (Nyhlén *et al.*, 2008).

Chapitre 2

La sélectivité de la CALB et plus particulièrement l'énantiosélectivité

L'énantiosélectivité est une des propriétés les plus intéressantes de la CALB et est au cœur des différentes études menées durant ces trois années de recherche. Ce chapitre explique la signification de ce terme et son expression chez la CALB. Enfin, les travaux tentant de rationaliser et de prédire cette propriété y sont présentés.

2.1 Sélectivité de la CALB

2.1.1 Chimiosélectivité chez la CALB

La CALB présente des propriétés de chimiosélectivité. Hedfords *et al.* ont étudié la chimiosélectivité de la CALB [17] vis-à-vis d'un alcool secondaire et d'un thiol. L'hexanol et le l'hexanolthiol sont utilisés comme accepteurs d'acyle dans la réaction de transacylation avec l'octanoate d'éthyle dans le cyclohexane. La chimiosélectivité de la CALB donne un ratio $\frac{(k_{cat}/K_M)_{OH}}{(k_{cat}/K_M)_{SH}}$ de 88 000, bien supérieur au ratio de la réaction non-catalysée où le ratio k_{OH}/k_{SH} est de 120.

2.1.2 Régiosélectivité chez la CALB

La lipase B est également douée de régiosélectivité. Outre le fait qu'elle catalyse préférentiellement l'hydrolyse des acides gras en position 1 ou 3 des triacylglycérols, on

trouve de nombreux exemples d'applications des propriétés régiosélectives de la CALB. Deux exemples sont présentés ici.

La CALB permet l'acylation régiosélection du 3-*O*-angeloylingenol [18], présentée figure 2.1.



FIG. 2.1 – Acylation régiosélective du 3-*O*-angeloylingenol (Teng *et al.*, 2009).

La CALB permet d'effectuer la propanoylation régiosélective des dihydroxybenzènes [19], présenté figure 2.2.



FIG. 2.2 – Propanoylation régiosélective de dihydroxybenzènes (Miyazawa *et al.*, 2008).

2.2 Présentation générale de l'énantiosélectivité

2.2.1 La chiralité en chimie

Une molécule et plus généralement tout objet est chiral¹ s'il ne possède aucun axe de symétrie impropre S_n ; en d'autres termes, aucune image obtenue par une rotation impropre appliquée à l'objet, consistant en la combinaison d'une rotation d'ordre n ($2\pi/n$) selon un axe et d'une réflexion par rapport à un plan perpendiculaire à cet axe, ne permet de superposer cette image à l'objet initial.

Les énantiomères sont des molécules isomères chirales, ou dit plus simplement, des molécules images l'une de l'autre dans un miroir, mais non-superposables.

¹Du grec $\chi\epsilon\iota\rho$, signifiant la « main » elle-même un objet chiral.

De nombreuses molécules du vivant, telles que l'acide désoxyribonucléique présentent cette propriété de chiralité. En chimie organique, la chiralité s'incarne souvent par l'existence d'un carbone portant quatre substituants différents, on parle alors de carbone chiral.

Deux molécules chirales ont les mêmes propriétés physiques (masse moléculaire, solubilité, température d'ébullition, ...), mais elles dévient avec un angle opposé le plan de polarisation d'une lumière polarisée. Une grande différence entre les deux formes énantiomériques concerne leur structure spatiale et leur fonction biologique. Par exemple, seuls les acides aminés naturels de forme L sont impliqués dans les protéines².

De nombreuses molécules thérapeutiques présentent une activité biologique résultant spécifiquement de l'action d'une des deux formes chirales, l'autre forme étant peu ou pas du tout active, et pouvant même parfois présenter d'autres propriétés délétères pour l'organisme. Quelques exemples de molécules chirales et les propriétés spécifiques de chaque énantiomère sont présentés dans le tableau 2.1.

Une illustration de ce phénomène est donnée par les molécules olfactives ; les énantiomères sollicitent différemment les récepteurs olfactifs selon la forme chirale de la molécule. Par exemple, le (*R*)-limonène donne une odeur d'orange tandis que le (*S*)-limonène donne celle du citron.

Un exemple tragique illustre bien la singularité propre à chaque énantiomère. Disponible en 1963, le thalidomide qui était prescrit à de nombreuses femmes enceintes comme sédatif se révéla plus tard être également tératogène ; des études réalisées sur les deux énantiomères montrèrent que seule la forme chirale *S* était responsable des effets tératogènes. Depuis 1992, des réglementations mises en place par la FDA³ et l'EMA⁴ exigent des tests plus sévères de la part des laboratoires pharmaceutiques et imposent de documenter les propriétés de chaque énantiomère séparément pour obtenir leur autorisation de mise sur le marché (AMM).

Les précurseurs chiraux constituent une part non négligeable du marché de la chimie fine, notamment sous l'impulsion de l'industrie pharmaceutique dont la demande en produits énantiopurs est croissante.

²Le « L » pour « lévogyre » signifie que les composés dévient le plan de polarisation de la lumière vers la gauche, par opposition aux composés dextrogyres qui le dévient vers la droite.

³Food and Drug Administration.

⁴European Medicines Agency.

TAB. 2.1 – Quelques exemples de molécules chirales avec leurs propriétés biologiques.

Molécule	Chiralité	
	<i>R</i>	<i>S</i>
Thalidomide	Propriété sédatrice	Tératogène
Ibuprofène	Inactif	Analgésique
Chloramphénicol	Antibactérien	Inactif
Warfarine	Peu actif	Anticoagulant
Albutérol	Bronchodilatateur	Spasmogène
Pénicillamine	Toxique	Antiarthrique

On retrouve également un grand nombre de molécules chirales avec des structures plus complexes dans la nature, dont certaines présentent des propriétés pharmacologiques d'intérêt comme le taxol extrait des aiguilles de l'if *Taxus baccata* et la vinblastine isolée de la pervenche de Madagascar *Catharanthus roseus*, tous deux des anticancéreux, ou bien encore la morphine, un analgésique extrait du pavot *Papaver somniferum* et la quinine, un antipaludéen, extrait des quinquinas *Cinchona officinalis*.

Les voies d'obtention de composés énantiopurs sont multiples.

Une première solution consiste à les obtenir à partir de précurseurs chiraux. Dans la nature, on trouve de nombreuses molécules sous une forme énantiopure, telles que les acides aminés et certains sucres. Ainsi, le *D*-glucose est utilisé pour synthétiser l'acide *L*-ascorbique⁵, qui est lui même un précurseur de la synthèse de certains β -bloquants.

Une autre voie d'obtention de molécules chirales énantiopures est la synthèse asymétrique, qui consiste à préparer un composé énantiopur en partant d'un substrat achiral.

La troisième voie d'obtention de composés énantiopurs est le dédoublement de mélanges racémiques, elle regroupe plusieurs méthodes :

- la cristallisation préférentielle,
- la cristallisation de sels de diastéréomères,
- le dédoublement cinétique,
- la séparation par chromatographie.

La voie biologique d'obtention de composés chiraux fait intervenir les enzymes [20] (on utilise parfois les micro-organismes directement) qui agissent par dédoublement cinétique ; les lipases constituent un outil très intéressant pour la résolution de mélanges racémiques [21].

⁵Communément appelé vitamine C.

2.2.2 L'énantiosélectivité et les enzymes

Un grand nombre d'enzymes présentent un caractère énantiosélectif, c'est-à-dire la catalyse préférentielle d'une des deux formes chirales d'un substrat et permettent donc le dédoublement cinétique de mélanges racémiques. Usuellement, les chimistes caractérisent l'énantiosélectivité au moyen de l'excès énantiomérique, noté ee . Dans le cas où c'est l'énantiomère R qui est préféré, les excès énantiomériques de substrat ee_S et de produit ee_P sont donnés par les formules suivantes :

$$ee_S = \frac{[S_S] - [S_R]}{[S_S] + [S_R]} \quad (2.1)$$

$$ee_P = \frac{[P_R] - [P_S]}{[P_R] + [P_S]} \quad (2.2)$$

$[S_R]$ et $[S_S]$ représentent les concentrations des deux formes chirales du substrat, et $[P_R]$ et $[P_S]$, les concentrations de produit.

Comme le montre la figure 2.3, l'excès énantiomérique varie en fonction du taux de conversion ξ de la réaction :

$$\xi = \left(1 - \frac{[S_R] + [S_S]}{[S_{R_0}] + [S_{S_0}]} \right) = \frac{ee_S}{ee_S + ee_P} \quad (2.3)$$

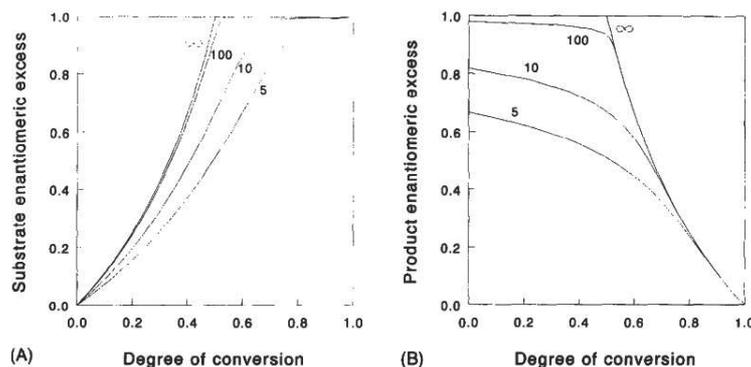


FIG. 2.3 – Excès énantiomérique du substrat (A) et du produit (B) en fonction du degré de conversion ξ de la réaction pour différents ratios énantiomériques E . (Chen *et al.*, 1982)

Pour caractériser les propriétés d'un enzyme, on utilise le ratio énantiomérique E qui est égal au ratio des efficacités catalytiques de l'enzyme vis-à-vis des deux formes chirales d'un substrat, et est donc une propriété intrinsèque de l'enzyme :

$$E = \frac{(k_{cat}/K_M)_R}{(k_{cat}/K_M)_S} \quad (2.4)$$

Dans le cas où R est l'énantiomère préféré, on représente l'énantiomère R au numérateur et le S au dénominateur. Les termes k_{cat} et K_M représente respectivement la constante catalytique et la constante de Michaelis.

Dans le cas d'une cinétique de type michaelienne classique, pour une réaction considérée comme irréversible et sans inhibition par le produit, Chen *et al.* [22] ont montré que :

$$\frac{v^R}{v^S} = \frac{V_{max}^R K_M^S [R]}{V_{max}^S K_M^R [S]} \quad (2.5)$$

Les termes $[R]$ et $[S]$ représentent la concentration des substrats de chiralité R et S . Nous aurons l'occasion de démontrer que cette formule reste, sous certaines conditions, valide dans le cas des réactions de transestérification de type Bi-Bi Ping-Pong, intervenant notamment dans la résolution d'alcools secondaires.

Chen *et al.* ont montré que :

$$\frac{\ln([R]/[R_0])}{\ln([S]/[S_0])} = \frac{V_{max}^R K_M^R}{V_{max}^S K_M^S} = E \quad (2.6)$$

Les termes $[R_0]$ et $[S_0]$ représentent la concentration initiale des substrats de chiralité R et S . Toujours dans les mêmes conditions que précédemment énoncées, Chen *et al.* [22] ont établi les formules définissant le lien entre le ratio énantiomérique E , le degré de conversion de la réaction ξ et les excès énantiomériques de substrat ee_S et de produit ee_P :

$$E = \frac{\ln((1 - \xi)(1 - ee_S))}{\ln((1 - \xi)(1 + ee_S))} \quad (2.7)$$

$$E = \frac{\ln(1 - \xi(1 + ee_P))}{\ln(1 - \xi(1 - ee_P))} \quad (2.8)$$

$$\xi = 1 - \frac{[R] + [S]}{[R_0] + [S_0]} \quad (2.9)$$

On peut également exprimer le ratio énantiomérique indépendamment du taux de conversion :

$$E = \frac{\ln\left(\frac{ee_P(1-ee_S)}{ee_P+ee_S}\right)}{\ln\left(\frac{ee_P(1+ee_S)}{ee_P+ee_S}\right)} \quad (2.10)$$

Explication générale sur l'origine de la stéréospécificité enzymatique

La synthèse par voie enzymatique constitue une méthode très efficace pour la préparation de composés énantiomériquement purs.

De nombreux enzymes présentent une stéréosélectivité. En 1964, Prelog⁶ [23] porta son attention sur la structure de l'état de transition formé au cours d'une réaction catalysée par des oxydo-réductases pour expliquer leur stéréosélectivité.

D'un point de vue thermodynamique, dans le cas d'une réaction réversible lorsque une réaction catalysée par un enzyme arrive à l'équilibre, et sur un temps suffisamment long, on retrouve autant de formes chirales *R* et *S* dans le produit. Pour tirer parti de l'énantiosélectivité d'un enzyme, on doit donc se placer sous contrôle cinétique. La catalyse enzymatique abaisse l'énergie d'activation de la réaction, et permet donc d'accélérer la vitesse de la réaction chimique quantifiée par *k* (la constante de vitesse de la réaction), selon l'équation d'Eyring (1935) :

$$k = \frac{k_B T}{h} e^{-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}} \quad (2.11)$$

Avec *T* la température, *k_B*⁷ la constante de Boltzmann, *h* la constante de Planck, *R* la constante des gaz parfaits et l'énergie ΔG^\ddagger correspondant à l'énergie libre d'activation, représentée par une barrière énergétique à fournir pour passer un état de transition.

On voit que la température permet d'accélérer la réaction, ceci est en fait vrai jusqu'à une certaine limite au-delà de laquelle l'enzyme perd en efficacité, la température affectant notamment la structure de la protéine. L'effet de la température sur la CALB est abordé ultérieurement.

Les enzymes abaissent l'énergie de la barrière énergétique (ΔG^\ddagger) de la réaction chimique qu'ils catalysent. L'origine de l'énantiosélectivité est due au fait que cette barrière

⁶Prix Nobel de chimie 1975.

⁷ $k_B \approx 1,38 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$.

n'est pas abaissée de façon équivalente pour les deux énantiomères, on comprend donc très bien que la vitesse de catalyse de l'énantiomère avec la barrière la plus basse est plus grande.

L'énantiosélectivité chez les lipases

En 1991, Kazlauskas *et al.* [24] édictèrent une règle empirique de l'énantiosélectivité basée sur une large étude de cent trente substrats. Elle permet de prédire la chiralité des alcools secondaires préférentiellement catalysés par l'estérase de cholestérol bovine, la lipase B de *Pseudomonas cepacia*, et la lipase de *Candida rugosa*. Cette règle est basée sur la taille des substituants portés par le stéréocentre de la molécule. Les résolutions enzymatiques les plus efficaces concernent les substrats dont la taille des substituants portés par le carbone chiral diffère significativement.

L'énantiosélectivité chez la CALB

Les propriétés énantiosélectives de la CALB en font un enzyme largement étudié.

La lipase B de *Candida antarctica* présente une énantiosélectivité significative pour les alcools secondaires, avec une énantiopréférence de la forme chirale *R* (*cf.* tableau 2.2). Rotticci *et al.* ont réalisé la résolution de plusieurs alcools secondaires avec la CALB. Les résultats sont présentés dans le tableau 2.2. Les ratios énantiomériques les plus importants sont obtenus lorsque le substituant moyen de l'alcool secondaire est plus petit que le *n*-propyle et que le substituant long est plus grand que le *n*-propyle.

TAB. 2.2 – Ratio énantiomérique de la CALB pour quelques alcools secondaires, avec une énantiopréférence pour la forme *R*. Il s'agit d'une réaction de transestérification, le donneur d'acyle est le thiooctanoate d'éthyle et la température est de 38°C (Rotticci *et al.*, 1998).

Substrat	E_R
butan-2-ol	9
3-methylbutan-2-ol	705
3,3-dimethylbutan-2-ol	350
pentan-2-ol	390
4-methylpentan-3-ol	109
hexan-3-ol	97

La plupart du temps, l'énantiosélectivité chez la CALB est mise à profit pour obtenir des synthons énantio-purs, on trouve aussi un exemple où la CALB est utilisée avec la

structure finale d'une molécule bioactive. Kamaruddin *et al.* ont réalisé l'estérification énantiosélective du (*R*)-kétoprofène par la CALB [25] avec un ratio énantiomérique *E* égale à 10. Le kétoprofène est un anti-inflammatoire non stéroïdien présentant des effets analgésiques, anti-inflammatoires et antipyrétiques principalement dus à la forme chirale *S*. La forme chirale *R* étant utilisée contre le mal de dents.

Faisant suite au modèle de prédiction empirique de Kazlauskas, Haeffner *et al.* [26] ont proposé une explication rationnelle de l'énantiosélectivité de la CALB. Ces travaux basés sur l'étude de la structure du site actif de l'enzyme par modélisation moléculaire sont présentés dans le sous-chapitre suivant.

2.3 Étude de l'énantiosélectivité chez la CALB par modélisation moléculaire

Les outils de la modélisation moléculaire sont employés pour la compréhension du fonctionnement de la CALB depuis le milieu des années 1990. Un grand nombre de travaux portent sur l'élucidation des origines de l'énantiosélectivité de cet enzyme.

2.3.1 L'orientation spatiale des substrats dans le site actif

Déterminer l'origine de l'énantiosélectivité passe nécessairement par une meilleure compréhension de l'orientation spatiale des substrats dans le site actif, notamment au niveau de l'intermédiaire tétraédrique.

Les premiers travaux de Uppenberg *et al.* sur la structure cristallographique ont permis de déterminer l'orientation des parties acyle et alcool du substrat de type ester. Ces travaux ont mis en évidence la présence de deux zones vers la serine 105 séparés par Ile189 et I285, l'une destinée à accueillir la partie acyle, et l'autre la partie alcool du substituant. Ceci est représenté sur la figure 2.4.

La région du site actif accueillant la partie acyle est localisée en direction de l'hélice $\alpha 5$.

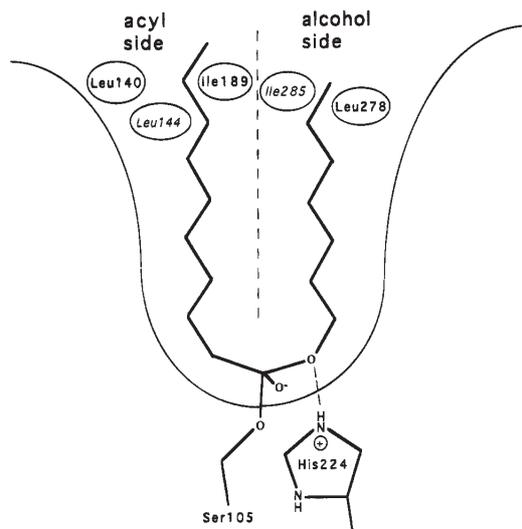


FIG. 2.4 – Orientation des parties alcool et acyle dans le site actif de la CALB (Uppenberg *et al.*, 1995).

2.3.2 Le modèle de reconnaissance des alcools secondaires chiraux

Le premier modèle rationnel permettant d'expliquer l'origine de l'énantiosélectivité chez la CALB fut proposé par Haeffner *et al.* en 1998 [26]. Le modèle part du constat que les alcools secondaires chiraux avec le substituant moyen au niveau du carbone asymétrique plus petit que le *n*-propyle et un substituant plus grand que le *n*-propyle présentent une énantiosélectivité importante (*cf.* tableau 2.2).

Pour chaque énantiomère, les deux orientations possibles concernant la position des chaînes latérales de la partie alcool sont présentées figure 2.5. On qualifie de mode I, l'orientation du substrat telle que le substituant encombrant de l'alcool soit dirigé vers la sortie du site actif et le mode II correspond au cas où ce même substituant est orienté dans la poche stéréospécifique. Haeffner *et al.* ont réalisé des simulations de dynamique moléculaire du complexe ES (enzyme-substrat). L'observation des paramètres géométriques et l'énergie potentielle du système montrent que des orientations distinctes sont privilégiées pour les deux énantiomères.

On parle de mode « productif » lorsque les éléments structuraux essentiels à la catalyse sont préservés, notamment la présence des liaisons hydrogène impliquées dans le mécanisme réactionnel. Les liaisons hydrogène essentielles sont celles permettant de

stabiliser l'oxygène chargé négativement de l'intermédiaire tétraédrique dans le trou oxyanionique avec les résidus T40 et Q106, ainsi que celles s'établissant entre l'azote de l'histidine 224 et l'oxygène de la partie alcool de l'intermédiaire ($H224-N_{\epsilon}-O_{alcool}$). Les conformations du complexe ES comportant ces éléments structuraux sont d'autant plus stables que leurs énergies libres sont basses. Avec l'énantiomère *S*, le mode I aboutit à la rupture de la liaison hydrogène (*cf.* figure 2.5) entre l'oxygène de l'alcool et l'azote N_{ϵ} porté par l'histidine 224 ($H224-N_{\epsilon}-O_{alcool}$) et n'est donc pas un mode productif.

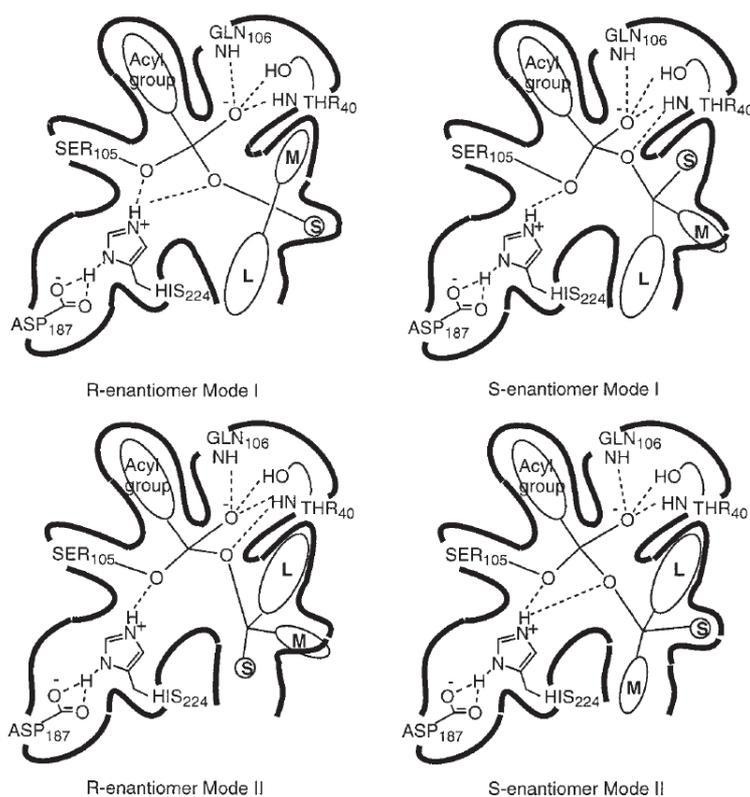


FIG. 2.5 – Modes d'orientation des alcools secondaires chiraux *R* et *S*. Les trois lettres « L, M et S » font références aux chaînes latérales « Large, Medium et Small » (Haefner *et al.*, 1998).

Dans le cas des modes productifs (*cf.* figure 2.6), l'énantiomère *R* pointe le substituant encombrant de la partie alcool vers la sortie du site actif tandis que l'énantiomère *S* oriente ce même substituant dans la poche stéréospécifique. Le mode productif des alcools secondaires de chiralité *R* se trouve donc être le mode I, tandis qu'il s'agit du mode II pour les alcools de chiralité *S*. L'énantiopréférence pour la forme *R* proviendrait du manque de place dans la poche stéréospécifique pour contenir le substituant encombrant de l'énantiomère *S*.

Haeffner *et al.* [27] se sont plus particulièrement intéressés à mettre en évidence l'énantiosélectivité pour les substrats suivants : 2-butanol, 3-méthyl-2-butanol, et 3,3-diméthyl-2-butanol. Ces travaux ont porté sur l'étude de l'énergie potentielle du système, mais également de la liaison hydrogène avec l'azote N_ϵ de l'histidine 224.

Le modèle défini par l'équipe de Karl Hult (Haeffner *et al.*, 1998) fournit une explication concordante avec les résultats expérimentaux.

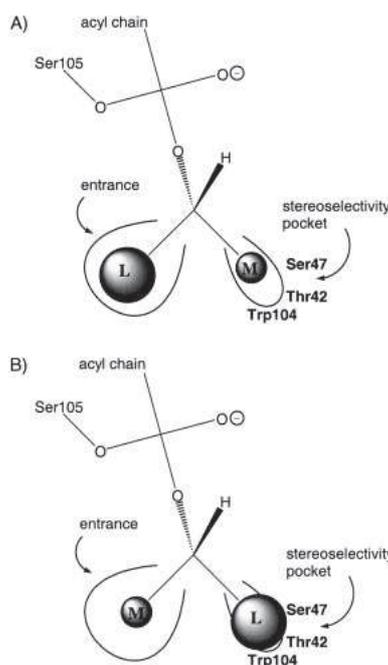


FIG. 2.6 – Orientation des alcools secondaires chiraux R (A) et S (B) dans le cas des modes « productifs » (Rotticci *et al.*, 2001).

2.3.3 Prédiction de l'énantiosélectivité par différentes méthodes de modélisation moléculaire

Le rôle de l'intermédiaire tétraédrique

D'après l'équation d'Eyring, la vitesse de catalyse d'une réaction est fonction de la barrière énergétique à franchir, qui passe par l'état de transition à son sommet. Dans le modèle de résolution des alcools secondaires, l'hypothèse la plus probable est de considérer que le passage de la barrière énergétique s'opère au niveau de la formation du second intermédiaire tétraédrique (*cf.* le mécanisme réactionnel) qui aurait une structure proche de l'état de transition de la réaction [28].

Otte *et al.* [29] ont déterminé de façon rigoureuse à l'aide de calcul *ab initio* les paramètres de cet intermédiaire tétraédrique pour qu'il puisse être étudié avec le champ de force Charmm22. Ces paramètres concernent les charges partielles des atomes et les constantes de raideur des mouvements d'élongation, de flexion et de torsion entre atomes.

Les contraintes stériques dans la poche stéréospécifique

García-Urdiales *et al.* [30] ont évalué les contraintes stériques générées par l'orientation des chaînes latérales des substrats dans la poche stéréospécifique. Ces travaux mettent en évidence des contraintes plus importantes pour la chaîne latérale de l'alcool *S* dans la poche stéréospécifique en comptant le nombre de chocs interatomiques relevés dès lors que la distance entre deux atomes est inférieure à 80 % de la distance d'équilibre énergétique de van der Waals. Un nombre important de contacts établis avec les chaînes latérales des résidus T40, Q157, et I189 est identifié de façon qualitative comme l'origine de l'importante énantiosélectivité observée dans des réactions d'aminolyse.

La liaison hydrogène entre l'oxygène de l'alcool substrat et l'azote de l'histidine 224 dans l'intermédiaire tétraédrique

Les travaux de Uppenberg *et al.* [8] sont les premiers à s'intéresser au positionnement du substrat dans le site actif. Ils ont étudié par modélisation l'octanoate de 1-phényléthyle. L'orientation du groupe phényle des formes chirales *R* et *S* vers la surface de la protéine est retenue. Le méthyle de l'énantiomère *R* s'ajuste bien à la poche, tandis que le méthyle de l'énantiomère *S* pointe vers G39 et T40, générant des contraintes stériques. Après minimisation, pour la forme *S* : le méthyle bascule dans la poche, et la liaison hydrogène entre H224- N_ϵ et $O_{alcohol}$ est rompue. On observe donc une difficulté pour la forme chirale *S* à « donner » son proton à l'histidine 224.

En 2000, Schulz *et al.* [31] ont montré indirectement l'instabilité de l'intermédiaire tétraédrique avec l'énantiomère *S* comparé au *R* en évaluant la distance de la liaison hydrogène H224- N_ϵ - $O_{alcohol}$ (entre l'atome d'oxygène de l'alcool libre dans le site actif et le proton porté par l'azote du groupe imidazole de l'histidine : H224- N_ϵ). Ces calculs montrent que l'instabilité de la liaison hydrogène pour l'énantiomère *S* est corrélée avec l'énantiosélectivité, suggérant que la barrière d'énergie d'activation de la réaction

est plus haute pour former l'intermédiaire tétraédrique avec l'énantiomère *S*. Les auteurs observent une corrélation entre la distance de la liaison hydrogène dans le cas de l'énantiomère *S* et le ratio énantiomérique pour une série d'alcools secondaires.

Dans un esprit similaire, Nyhlén *et al.* [32] ont étudié des alcools secondaires. Ces travaux ont mis en évidence par modélisation moléculaire l'établissement d'une liaison hydrogène avec la thréonine 40 stabilisant l'intermédiaire tétraédrique. Aussi, ils ont montré la rupture de la liaison hydrogène avec l'histidine 224 pour le (*S*)-hexan-2-ol par dynamique moléculaire, tandis que la liaison est maintenue pour la forme chirale *R* au cours de toute la trajectoire (1 ns). Ces observations sont en accord avec celles de Schulz *et al.* évoquées ci-dessus.

Les difficultés pour évaluer énergétiquement l'énantiosélectivité

Il est intéressant de voir que le ratio énantiomérique E peut être assimilé à une différence d'énergie libre correspondant à la différence entre les deux barrières d'énergie d'activation de la réaction entre les deux énantiomères, à partir de la formule suivante :

$$\Delta\Delta G_{R-S}^\ddagger = -RT\ln(E_{R-S}) \quad (2.12)$$

Certains travaux comparent l'énergie potentielle [33, 34, 35] du système pour les deux énantiomères. L'évaluation de l'énergie potentielle donne des résultats avec une précision limitée. Les calculs de petites différences d'énergie se basant sur l'énergie potentielle souffrent de plusieurs approximations. La première est le problème des *multi-minima*, notamment lorsque les calculs d'énergies sont basés sur des structures minimisées. La méthode du recuit-simulé ne résout que partiellement ce problème. Lorsque l'énergie potentielle est évaluée au cours de trajectoire de dynamique, elle présente une fluctuation importante due à l'agitation thermique qui rend délicate la comparaison des énergies en comparaison des différences d'énergie attendues entre les système avec les énantiomères *R* et *S*.

Un autre problème plus fondamentalement embarrassant est que les calculs basés sur l'énergie potentielle sous-entendent que la contribution entropique soit mineure dans le processus étudié. Malheureusement, plusieurs travaux ont montré l'importance de l'entro-

pie vis-à-vis de l'énantiosélectivité chez la CALB qui peut représenter en valeur absolue une contribution de l'ordre de 50 % de l'énergie totale [36, 37, 38].

Dans le cas qui nous intéresse, correspondant la recherche de la différence entre les deux barrières d'énergie d'activation entre les deux énantiomères, un problème se pose : la différence d'énergie entre les deux systèmes attendue est de l'ordre de seulement quelques kilocalories par mole. Par exemple, un ratio énantiomérique de 80 correspond à une différence d'énergie libre $\Delta\Delta G_{R-S}^\ddagger$ de seulement 2,61 kcal.mol⁻¹.

Méthode 3D-QSAR

Tomić et Kojić-Prodić ont développé un modèle prédictif de l'énantiosélectivité chez la lipase de *Burkholderia cepacia* avec la méthode du QSAR-3D⁸ [39], fournissant une bonne prédiction de l'énantiomère préféré par l'enzyme et une approximation du ratio énantiomérique.

Les travaux Braiuca *et al.* [40] ont porté sur l'adaptation de la méthode du QSAR-3D pour prédire l'énantiosélectivité de la lipase B de *Candida antarctica* pour une large gamme de substrats.

Le QSAR est une méthode visant à établir un modèle prédictif de l'activité de molécules à partir des propriétés chimiques et structurales de ces molécules. L'activité de la molécule est souvent caractérisée par sa constante d'affinité vis-à-vis du récepteur. C'est le cas pour les molécules thérapeutiques (en drug design). L'activité peut également être la mesure d'une toxicité, ou bien dans le cas de Braiuca *et al.* reliée à l'énantiosélectivité de l'enzyme pour un substrat et ses énantiomères.

Le 3D-QSAR couple la modélisation moléculaire avec une analyse statistique multivariée afin d'évaluer et de prédire l'énantiosélectivité. La première étape de Braiuca *et al.* consiste à définir la structure de l'enzyme et des substrats et trouver les conformères les plus actifs, notamment par docking puis une courte dynamique moléculaire de 300 ps en travaillant sur l'intermédiaire tétraédrique (une liaison covalente est définie entre la sérine 105 et le substrat entre l'étape de docking et la dynamique moléculaire). Ensuite, les descripteurs moléculaires sont générés pour un couple d'énantiomères au moyen d'une analyse de type « GRID » et de DMIF (Differential Molecular Interaction Fields). En-

⁸Quantitative Structure-Activity Relationship.

fin, une analyse statistique multivariée des données est réalisée afin de définir un modèle prédictif. Le modèle de régression utilisé par Braiuca *et al.* pour ajuster la contribution des descripteurs est la méthode des moindres carrés partiels. Comme on peut le constater sur la figure 2.7, la corrélation entre les valeurs prédictives et expérimentales est relativement bonne.

L'ensemble de molécules utilisé pour construire le modèle comporte sept amines secondaires et douze alcools secondaires avec leurs ratios énantiomériques extraits de trois travaux différents disponibles dans la littérature. Les substrats ont des structures variées et certains sont halogénées.

La méthode GRID [41] permet de dresser une carte dans l'espace autour de la protéine des sites de liaison énergétiquement favorables. Une sonde est utilisée pour explorer l'espace dans une grille avec un maillage de 0,5 à 0,3 Å pour les zones d'intérêt et définir une surface d'énergie dans l'espace tridimensionnelle. La sonde peut être un atome de différent type. Une fonction énergie empirique E_{xyz} intégrant un potentiel de Lennard-Jones, les effets électrostatiques et les liaisons hydrogène est utilisée :

$$E_{xyz} = \sum E_{lj} + \sum E_{el} + \sum E_{hb} \quad (2.13)$$

Le profil énergétique du contour de la protéine peut être utilisé pour étudier des interactions hôte-ligand.

Les travaux plus récents (2011) de Gu *et al.* [42] ont également donné de très bons résultats. Les méthodes CoMFA⁹ et CoMSIA¹⁰ y sont testées. La seconde méthode s'appuie sur un nombre supérieur de paramètres (stérique, électrostatique, hydrophobe, accepteur et donneur de liaison hydrogène) et donne de meilleures prédictions de l'énantio-sélectivité chez la CALB pour la résolution d'alcools.

Un élément intéressant concerne la contribution de chaque type d'interaction dans le modèle qui sont respectivement de 0,289, 0,309, 0,143, et 0,259 pour les effets stériques, électrostatiques, hydrophobes, et les accepteurs et donneurs de liaison hydrogène. Cela montre que les interactions électrostatiques sont importantes alors que les interactions hydrophobes le sont moins.

⁹Comparative Molecular Field Analysis.

¹⁰Comparative Molecular Similarity Index Analysis.

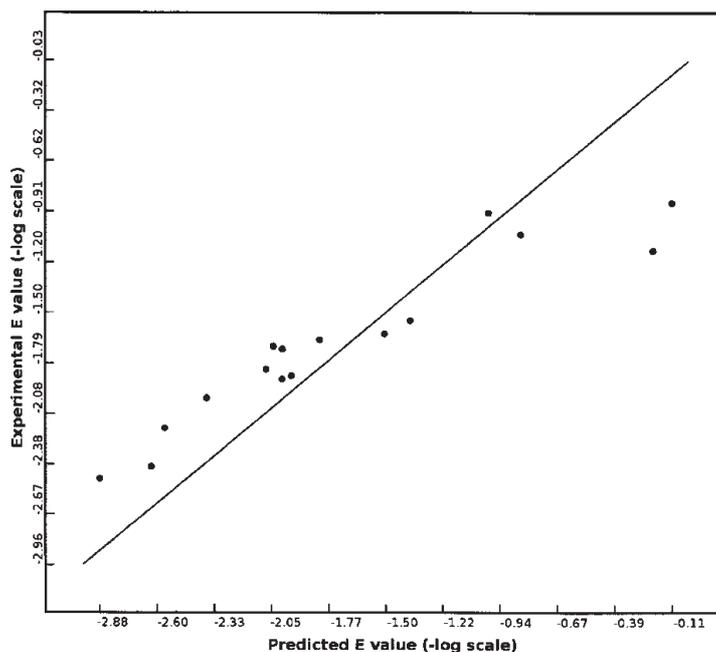


FIG. 2.7 – Corrélation entre le logarithme des ratios énantiomériques obtenus par la méthode 3D-QSAR et le logarithme des ratios énantiomériques déduits expérimentalement (Braiuca *et al.*, 2009).

Méthodes de docking

Le docking (littéralement « arrimage » en français) est une méthode développée pour prédire les positions et orientations les plus probables d'un ligand en interaction avec le site actif d'une protéine, ou plus généralement d'une molécule cible. Pour évaluer un grand nombre de positions, on peut par exemple utiliser la méthode de Monte Carlo ou bien un algorithme génétique. Une fonction de score est utilisée pour évaluer (en première approximation) si l'interaction du ligand avec le récepteur est bonne. La fonction de score dérive généralement de la mécanique moléculaire (*cf.* la partie « Matériel et méthodes » sur la mécanique moléculaire). L'avantage de cette méthode est qu'elle est relativement peu coûteuse en temps de calcul. Une des limites est que la structure de l'enzyme est fixe, limitant les possibilités d'ajustement de l'enzyme au ligand. Plus récemment, les calculs de docking incluent néanmoins la possibilité d'explorer les rotamères des chaînes latérales des résidus du site actif de l'enzyme, ce qui permet de recréer artificiellement une partie de la flexibilité de l'enzyme, bien que les mouvements plus amples (mouvements de domaines) ne soient pas pris en compte.

Ji *et al.* [43] ont réalisé des calculs de docking pour six enzymes (quatre lipases et

deux estérases) dont la CALB et 69 ligands chiraux.

Une réduction arbitraire du rayon de van der Waals de l'atome d'oxygène de la sérine et du carbone de la fonction ester du ligand attaqué par le nucléophile est paramétrée, afin d'obtenir des structures de docking proches de l'intermédiaire tétraédrique. Les différences d'énergie du docking entre les énantiomères $\Delta\Delta G_{docking}^\ddagger$ sont calculées.

La corrélation entre les résultats expérimentaux et ceux du modèle est présentée sur la figure 2.8.

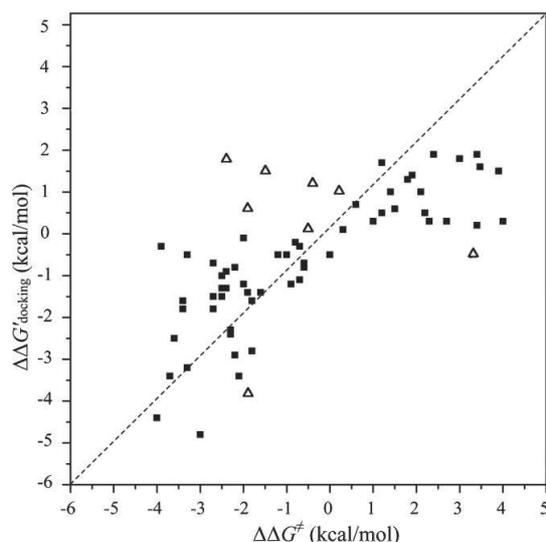


FIG. 2.8 – Corrélation entre les énergies obtenues par docking et les énergies déduites expérimentalement (Ji *et al.*, 2010).

Il faut noter que le $\Delta\Delta G_{docking}^\ddagger$ est calculé de la façon suivante :

$$\Delta\Delta G_{docking}^\ddagger = K \times (\Delta G_{docking}^\ddagger \text{ énantiomère favorisé} - \Delta G_{docking}^\ddagger \text{ énantiomère défav.})$$

Le coefficient K est optimisé par la méthode des moindres carrés pour minimiser les écarts entre les résultats expérimentaux et ceux fournis par le modèle.

Juhl *et al.* [44] ont également tenté d'expliquer l'énantiosélectivité en réalisant des calculs de docking. Une particularité du protocole qu'ils ont employé, est qu'il permet de prendre en compte la plasticité de l'enzyme vis-à-vis du substrat. Le protocole se découpe ainsi en plusieurs étapes. Il débute par un docking classique du substrat sur la structure cristallographique de l'enzyme, suivi d'une minimisation du complexe. Puis, un docking du substrat est effectué une seconde fois, ceci en utilisant la structure de l'enzyme

précédemment minimisée après le docking initial du substrat. Ils tentent notamment de prédire l'énantiosélectivité de la CALB et du mutant W104A pour le butyrate de 1-phényléthyle, ainsi que l'énantiosélectivité et la spécificité de substrat chez d'autres enzymes. Les résultats montrent que l'étape intermédiaire de minimisation du complexe améliore le modèle. Ce dernier est capable de quantitativement prédire avec 81 % de succès les sélectivités et les spécificités des enzymes testés.

Calcul de l'énergie libre

Une autre possibilité est de calculer les différences d'énergie libre au niveau de l'intermédiaire tétraédrique de façon exhaustive, c'est-à-dire l'énergie résultant des contributions enthalpiques et entropiques du système, est d'utiliser la méthode de l'intégration thermodynamique. Avec cette méthode, Yu Zhou [45] a calculé des différences d'énergie libre pour le butan-2-ol et quatre autres alcools secondaires avec un groupement encombrant ou un bromide. Ces calculs sont réalisés en modifiant la valeur de l'angle diédral défini autour du carbone chiral à transformer en plusieurs étapes, depuis la configuration *R* vers l'énantiomère *S*. Ces calculs fournissent une bonne prédiction qualitative de l'énantiopréférence, la prédiction quantitative est également assez probante, bien que la reproductibilité des calculs ne soit pas évaluée.

Chapitre 3

Influence des différents paramètres de la réaction sur l'énantiosélectivité de la CALB

Le comportement de la CALB, en particulier son énantiosélectivité, peut varier de façon considérable en fonction de la nature des substrats, de la conformation de l'enzyme et de son environnement. L'influence de l'ensemble de ces principaux paramètres est présentée dans ce chapitre.

3.1 Influence du donneur d'acyle

Des travaux ont montré que le donneur d'acyle dans les réactions de transesterification influence le ratio énantiomérique. Tant la partie acyle que la partie alkyle peuvent influencer l'énantiosélectivité de l'enzyme.

3.1.1 Influence de la partie acyle du donneur d'acyle

Ottosson et Hult se sont intéressés à l'influence de la partie acyle du donneur d'acyle [46]. Le ratio énantiomérique de la réaction de transesterification du 3-méthyl-2-butanol avec la CALB est influencé par la longueur de la chaîne acyle du donneur d'acyle. Parmi quatre donneurs d'acyle étudiés, le plus long, l'octanoate de vinyle donne le plus haut ratio

énantiomérique (810), contre seulement 390 pour le butanoate de vinyle. La longueur de la partie acyle modifie l'énantiosélectivité en influençant le positionnement du complexe.

3.1.2 Influence de la chaîne alkyle du donneur d'acyle

Comme nous l'avons vu dans le chapitre sur l'énantiosélectivité chez la CALB, la taille du substrat, en particulier des chaînes latérales de l'alcool secondaire jouent un rôle essentiel dans l'énantiosélectivité. Des travaux expérimentaux ont montré que dans la catalyse enzymatique des réactions de transestérification, la nature de la chaîne alkyle du donneur d'acyle influence l'énantiosélectivité intervenant dans la deuxième étape de la réaction, bien que le mécanisme catalytique de l'enzyme indique que le groupe partant ne soit pas présent dans cette seconde étape de la réaction (*cf.* figure 1.12). On pense que le groupe partant pourrait influencer la structure du site actif par un effet d'empreinte et avoir ainsi une influence sur la sélectivité de l'enzyme.

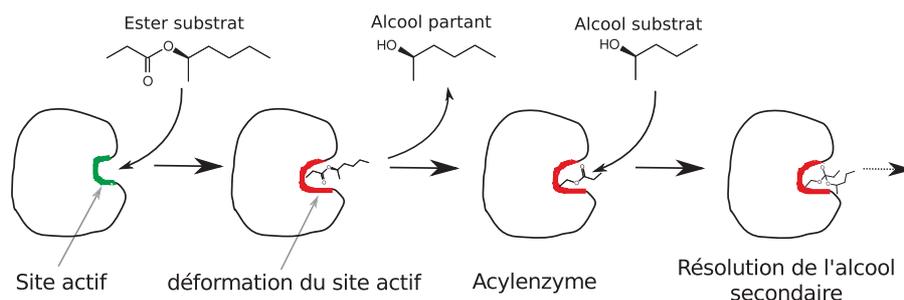


FIG. 3.1 – Schéma de l'effet d'empreinte par la partie alkyle du donneur d'acyle.

En 2000, Lee *et al.* [47] ont décrit une nouvelle approche pour augmenter l'énantiosélectivité de la lipase par une stratégie de « correspondance¹ » entre l'ester substrat et l'alcool à résoudre. La résolution de trois différents alcools secondaires avec trois différents donneurs d'acyle par transestérification catalysée par deux lipases (la lipase B de *Candida antarctica* et celle de *Pseudomonas cepacia*) est réalisée. Les résultats démontrent que l'énantiosélectivité des lipases est augmentée en utilisant un donneur d'acyle et un alcool substrat dont les structures sont proches. L'hypothèse d'un effet « mémoire de l'enzyme », c'est-à-dire le maintien d'une déformation du site actif induite par le donneur d'acyle pendant la première étape de la réaction est proposée.

¹On emploie usuellement le terme « matching » rapporté de l'anglais.

Les travaux de Hoff *et al.* [48] portent sur trois alcools 1-phénoxy-, 1-phénylméthoxy- et 1-(2-phényléthoxy)-2-propanol) qui sont résolus par transestérification avec quatre donneurs d'acyle différents (le butanoate de 2-chloroéthyle, le butanoate de 2,2,2-trichloroéthyle, le butanoate de vinyle et anhydride butanoïque) en utilisant la CALB dans un solvant peu polaire (hexane). Les résultats présentés dans le tableau 3.1 et la figure 3.2 montrent que la nature du donneur d'acyle influence significativement l'énantiosélectivité. Le donneur d'acyle butanoate de 2-chloroéthyle augmente fortement la sélectivité. À l'inverse, la sélectivité est faible avec l'anhydride butanoïque et le butanoate de vinyle.

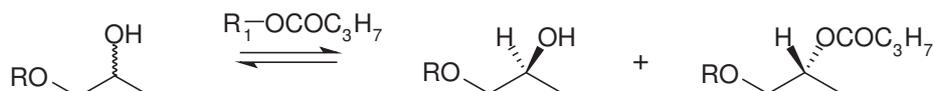


FIG. 3.2 – Réaction de transestérification avec la CALB dans l'hexane. R : Ph (1), CH₂Ph (2), CH₂CH₂Ph (3). R₁ : -CH₂CH₂Cl, -CH₂CCl₃, -COC₃H₇, -CH=CH₂ (Hoff *et al.*, 1996).

TAB. 3.1 – Influence du donneur d'acyle sur le ratio énantiomérique *E* dans la résolution de trois alcools **1**, **2** et **3** respectivement 1-phénoxy-, 1-phénylméthoxy- et 1-(2-phényléthoxy)-2-propanol) avec la CALB dans l'hexane à 30 °C (Hoff *et al.*, 1996).

Donneur d'acyle	<i>E</i> (alcool)		
	1	2	3
butanoate de 2-chloroéthyle	139	22	319
butanoate de 2,2,2-trichloroéthyle	26	3	26
anhydride butanoïque	8	2	25
butanoate de vinyle	4	1	7

Dans un second temps, afin d'écarter l'hypothèse d'une influence de l'alcool libéré par le donneur d'acyle, des expériences croisées de transestérification du 1-phénylméthoxy-2-propanol avec le donneur d'acyle butanoate de 2,2,2-trichloroéthyle en présence de différentes concentrations de 2-chloroéthanol (l'alcool libéré par le butanoate de 2-chloroéthyle), ainsi que de transestérification du même alcool (1-phénylméthoxy-2-propanol) avec le donneur d'acyle butanoate de 2-chloroéthyle en présence de différentes concentrations de 2,2,2-trichloroéthanol (l'alcool libéré par le butanoate de 2,2,2-trichloroéthyle) sont réalisées et montrent que l'addition des alcools chlorés n'augmente que légèrement l'énantiosélectivité, insuffisamment pour expliquer les modifications de ratio énantiomériques avec les différents donneurs d'acyle.

Les auteurs font ensuite varier la quantité de donneur d'acyle, la concentration de

butanoate de 2-chloroéthyle n'a que peu d'effet. En revanche, une réduction de la concentration en butanoate de 2,2,2-trichloroéthyle fait augmenter le ratio énantiomérique ; c'est donc bien le donneur d'acyle et non l'alcool libéré qui influence l'énantiosélectivité ici. Une observation similaire est faite avec le butanoate de vinyle.

L'effet d'empreinte n'est pas proposé par les auteurs. D'autres hypothèses ont été avancées pour expliquer les résultats observés. L'une d'elles est que le donneur d'acyle pourrait affecter la conformation de l'enzyme, tel un co-solvant. Hoff *et al.* font néanmoins remarquer que cette hypothèse est peu probable car les faibles concentrations de co-solvants n'affectent généralement pas la conformation d'un enzyme d'après les travaux de Hansen *et al.* [49]. Une autre hypothèse proposée par Hoff *et al.* est celle d'une modification chimique de l'enzyme telle que l'acylation des chaînes latérales des acides aminés en présence de l'anhydride butanoïque et du butanoate de vinyle.

González-Sabín *et al.* ont également mis en évidence l'importance du groupe partant dans l'énantiosélectivité [50] chez la CALB. L'acétylation du (\pm)-cis-2-phénylcyclopentanamine avec l'acétate d'éthyle se réalise avec un ratio énantiomérique E égal à 16. En modifiant le groupe partant, il est possible de fortement augmenter le ratio E . Les résultats suggèrent que le ratio énantiomérique E est plus fortement augmenté lorsque le groupe partant présente une structure proche de l'amine. González-Sabín *et al.* avancent également l'hypothèse d'un effet d'empreinte résultant d'une déformation du site catalytique lors de la formation de l'intermédiaire tétraédrique. Cette déformation se pérenniserait jusqu'à l'arrivée de l'amine lors de la deuxième étape de la réaction.

García-Urdiales *et al.* [51] ont montré que la résolution du (\pm)-1-phénylbutan-1-ol présente une énantiosélectivité plus élevée ($E = 50$) en procédant à l'aminolyse (figure 3.3) de son dérivé acétylé l'acétate de (\pm)-1-phénylbutyle avec le (\pm)-1-phényléthanamine comme nucléophile, bien que plus lente comparée à la réaction de transestérification (figure 3.4) du (\pm)-1-phénylbutan-1-ol avec l'acétate de vinyle comme donneur d'acyle ($E = 19$). L'enzyme réagit plus rapidement avec l'énantiomère R .

Concernant la réaction de transestérification, on observe une augmentation du ratio énantiomérique en présence de triéthylamine ($E = 43$) et d'acétanilide ($E = 38$). Le but de l'addition de ces deux molécules est de comprendre l'augmentation de l'énantiosélectivité observée avec la réaction d'aminolyse. García-Urdiales *et al.* suggèrent que l'augmenta-

tion de l'énantiosélectivité pour la réaction d'aminolyse pourrait être la conséquence de deux facteurs : le caractère basique de l'amine et la structure de l'amine (ou de l'amide résultante).

La résolution du (\pm)-1-phénylbutan-1-ol par aminolyse de l'acétate de (\pm)-1-phénylbutyle est réalisée avec différentes amines dont certaines chirales. Le taux de conversion c et le ratio énantiomérique E sont présentés dans le tableau 3.2.

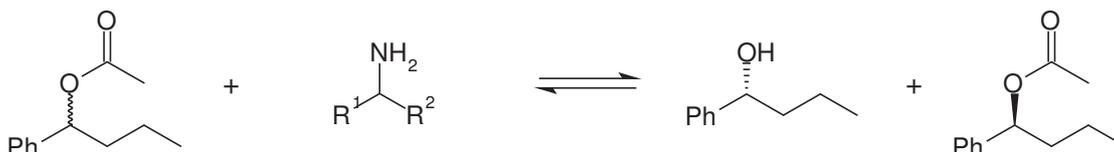


FIG. 3.3 – Résolution du (\pm)-1-phénylbutan-1-ol par aminolyse de l'acétate (\pm)-1-phénylbutyle avec différentes amines par la CALB. Les groupes chimiques R^1 et R^2 sont présentés dans le tableau 3.2 (García-Urdiales *et al.*, 2001).

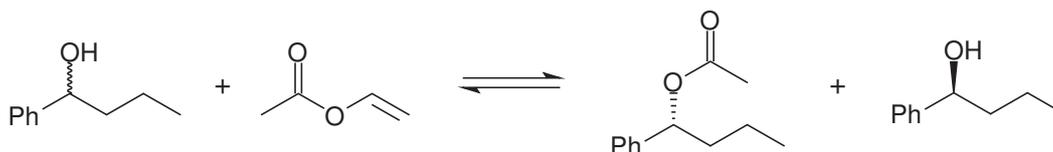


FIG. 3.4 – Résolution du (\pm)-1-phénylbutan-1-ol par transestérification en utilisant la CALB (García-Urdiales *et al.*, 2001).

TAB. 3.2 – Aminolyse de l'acétate de (\pm)-1-phénylbutyle par la CALB avec différentes amines. Le taux de conversion c et le ratio énantiomérique E (García-Urdiales *et al.*, 2001).

Entrée	Amine	R^1	R^2	c [%]	E
1	(\pm)-1	Ph	Me	6.5	49.7 \pm 3.2
2	(\pm)-2	Ph	H	5.1	34.7 \pm 1.3
3 ^[a]	(\pm)-3	Ph	Et	9.6	68.6 \pm 1.3
4	(\pm)-4	Ph	<i>n</i> -Pr	5.9	44.8. \pm 2.5
5	(\pm)-5	<i>n</i> -C ₆ H ₁₃	Me	4.2	33.7. \pm 1.8
6 ^[b]	(\pm)-3	Ph	Et	8.5	53.4 \pm 1.1
7 ^[c]	(\pm)-3	Ph	Et	7.6	51.4 \pm 1.3

^[a]^[b]^[c] Ratio des concentrations molaires d'amine vis-à-vis de l'ester de respectivement 3/1, 2/1 et 1/1.

L'amine (\pm)-1-phénylpropan-1-amine (3) du tableau 3.2 permet d'obtenir le ratio énantiomérique le plus élevé pour la réaction d'aminolyse. Lorsque l'on diminue la concentration de l'amine d'un ratio 3/1 à 2/1, le ratio énantiomérique diminue (entrées 3, 6 et 7).

Les auteurs suggèrent que des complexes non-réactifs enzyme-amine pourraient influencer le ratio énantiomérique.

Cas des substrats halogénés

On a vu précédemment que le modèle d'énantiosélectivité des alcool secondaires était basé sur des considérations d'encombrement stérique du site actif. Des effets électrostatiques peuvent également intervenir dans le cas des composés halohydrines comme l'ont montré Rotticci *et al.* [52]. Ces effets non-stériques peuvent entrer en jeu dans le mécanisme d'énantiosélectivité de la CALB : la résolution par transestérification du 3-chlorobutan-2-ol donne un E de 160, tandis que le 3-bromobutan-2-ol donne un E de 370. Le solvant est le dichlorométhane. Le donneur d'acyle est le thiooctanoate d'éthyle. La température est de 39 °C. Les auteurs suggèrent un effet de répulsion électrostatique entre une partie du site actif et l'alcool halogéné pour expliquer ces résultats.

3.2 Influence de l'environnement

3.2.1 La température

Les enzymes fonctionnent sur des plages de température plus ou moins étendues, l'activité d'une enzyme en fonction de la température est souvent représentée par une courbe de type gaussienne avec une température optimale de fonctionnement propre à chaque enzyme. Lorsque la température devient excessive, un phénomène de dénaturation de l'enzyme par une altération de sa conformation se produit et l'enzyme perd son activité.

La lipase B de *Candida antarctica* peut fonctionner à des températures relativement élevées. Lozano *et al.* ont utilisé la CALB libre ou immobilisé dans un liquide ionique (1-éthyl-3-méthylimidazolium bistriflimide et 1-butyl-3-méthylimidazolium bistriflimide) pour réaliser la catalyse en continu de la résolution du 1-phényléthanol [53]. Lozano *et al.* constatent que la CALB est pleinement fonctionnelle à une température de 150 °C.

Turner et Vulfson [54] se sont intéressés à la stabilité thermique de plusieurs enzymes, ainsi qu'à la quantité d'eau résiduelle sur les enzymes en fonction de la température.

Certaines molécules d'eau sont essentielles au bon fonctionnement et à la stabilité de l'enzyme. Ils montrent que la CALB est catalytiquement active jusqu'à 130 °C et ceci pour une durée significative dans le cas d'une réaction de transestérification d'octadécanol avec le stéarate de palmityle. La CALB est inactive à 180 °C, suggérant aux auteurs qu'à cette température, les molécules d'eau fortement liées essentielles au fonctionnement de la CALB finissent par quitter l'enzyme.

Quelques rappels de thermodynamique

L'énergie libre de Gibbs G est égale à l'énergie d'enthalpie H minorée du produit de la température et de l'entropie S :

$$G = H - TS \quad (3.1)$$

À pression constante, l'entropie S est égale à :

$$S = - \left(\frac{\delta G}{\delta T} \right)_P \quad (3.2)$$

Il est aussi possible de déterminer l'énergie libre de Helmholtz F . La différence avec l'énergie libre de Gibbs est que l'enthalpie H est remplacée par l'énergie interne U du système.

$$F = U - TS \quad (3.3)$$

L'entropie S qui s'exprime en kcal.mol⁻¹ mesure le niveau d'information du système à l'état microscopique. Selon Boltzmann : $S = k_B \ln(\Omega)$, où Ω représente le nombre de microétats accessibles pour le système à l'équilibre, et k_B la constante de Boltzmann.

Ainsi, dans un cristal à la température du zéro absolu (0 K), les particules sont parfaitement définies les unes aux autres et il n'existe qu'un seul état du système ($\Omega = 1$) et l'entropie est donc nulle : $S = k_B \ln(1) = 0$.

Effets de la température sur l'énantiosélectivité

Il est possible d'accéder aux différences d'énergie libre d'activation $\Delta\Delta G^\ddagger$ de la réaction entre les réactions catalysant les deux énantiomères à partir du ratio énantiomérique E en utilisant la formule suivante :

$$\Delta\Delta G^\ddagger = -RT \ln E \quad (3.4)$$

Autrement écrit :

$$E = e^{(-\Delta\Delta G^\ddagger/RT)} \quad (3.5)$$

Cette différence d'énergie libre entre les deux systèmes, avec l'énantiomère R et S s'écrit de la façon suivante :

$$\Delta\Delta G^{R-S} = \Delta\Delta H^{R-S} - T\Delta\Delta S^{R-S} \quad (3.6)$$

$$\Delta\Delta G^{R-S} = \Delta G^R - \Delta G^S \quad (3.7)$$

$\Delta\Delta G^{R-S}$ est négatif dans le cas où l'énantiomère R est préféré. Cette équation met notamment en évidence que l'énantiosélectivité diminue (donc le $\Delta\Delta G^{R-S}$ diminue) lorsque la température augmente si le terme $\Delta\Delta S^{R-S}$ est négatif, et inversement.

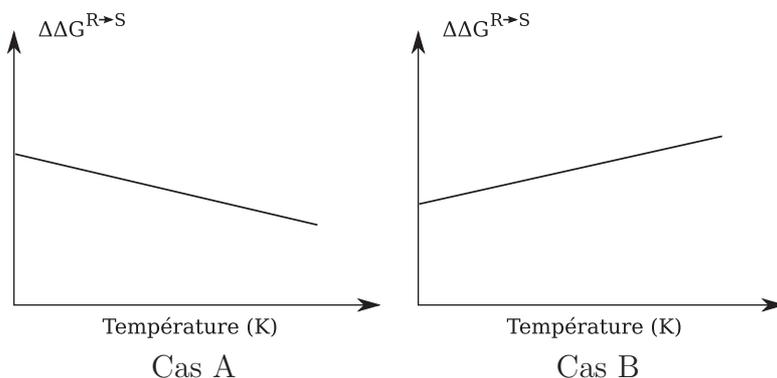


FIG. 3.5 – Dans le cas A, le terme $\Delta\Delta S^{R-S}$ est positif. Dans le cas B, le terme $\Delta\Delta S^{R-S}$ est négatif.

Des expériences de mesure du ratio énantiomérique E effectuées par Léonard-Nevers *et al.* [38] à différentes températures ont permis d'accéder aux composantes enthalpiques et entropiques de l'énergie libre de Gibbs d'activation des réactions de transestérification impliquant des alcools secondaires chiraux (butan-2-ol, pentan-2-ol, hexan-3-ol). Ces travaux ont montré que l'énantiomère préféré R est généralement favorisé par l'enthalpie ($\Delta\Delta H^{R-S} < 0$). Le rôle de l'entropie sur l'énantiosélectivité est plus contrasté et dépend de l'activité thermodynamique de l'eau et des substrats dans les travaux de Léonard-

Nevers *et al.* [38]. Par exemple, dans le cas de la résolution du butan-2-ol, le terme $\Delta\Delta S^{R-S}$ est négatif avec une activité d'eau proche de zéro et égale à 0,5, tandis qu'il devient positif dans le cas où l'activité d'eau est de 0,1 et 0,3.

Ottosson *et al.* ont également déterminé l'influence de l'enthalpie et de l'entropie vis-à-vis de l'énantiosélectivité [37], chez différents mutants de la CALB (T103G, W104H, T42V, S47A, T42V/S47A). Les résultats montrent qu'avec les substrats et les conditions utilisées dans ce travail, l'énantiopréférence pour la forme chirale *R* est à la fois favorisée par les contributions enthalpiques et entropiques.

Dans les travaux de Magnusson *et al.* [55], la CALB avec la mutation T104A présente une énantiosélectivité pour un alcool de chiralité *S* : le (*S*)-1-phényléthanol et le ratio énantiomérique augmente lorsque la température augmente, indiquant que l'énantiosélectivité envers la forme chirale *S* est favorisée par l'entropie.

La thermodynamique appliquée à la catalyse énantiosélective chez la CALB

Une catalyse enzymatique n'offrant au substrat que très peu de conformations permettant la poursuite de la réaction sera défavorisée par l'entropie. Généralement, la formation du complexe enzyme-substrat diminue le nombre de conformations accessibles pour le substrat et donc son entropie. Néanmoins, l'affinité du substrat pour le site actif est favorisée par un autre phénomène : la formation du complexe ES augmente l'entropie du solvant. Ceci est dû au fait que certaines molécules de solvant sont libérées du site actif et augmentent l'entropie du système. *A contrario*, le substrat en solution interagit avec un réseau de molécules d'eau organisé dont il diminue le nombre d'états accessibles et diminue donc l'entropie du système. La stabilisation du complexe enzyme-substrat est également sous le contrôle des contributions enthalpiques (l'établissement de liaisons hydrogène, l'énergie électrostatique et l'énergie de van der Waals principalement).

L'entropie joue un rôle non négligeable [56, 36, 37, 57, 58] dans la catalyse enzymatique.

D'après les lois de la physique statistiques, lorsque l'on chauffe le système, les micro-états énergétiquement défavorables vont voir leur probabilité d'apparition augmenter, ce phénomène participe à la modulation d'énantiosélectivité en fonction de la température observée chez les enzymes, dont la CALB. L'effet de la température sur la structura-

tion de l'enzyme participe également à la modulation de l'énantiosélectivité observée. La température aidant le repeuplement des microétats énergétiquement défavorisés, l'énantiosélectivité et son évolution en fonction de la température résultent du fait que le système réagit différemment avec l'énantiomère R et S , le système adopte une plus au moins grande variété de conformations, avec des niveaux énergétiques différents.

3.2.2 Influence du solvant sur l'énantiosélectivité

Ottosson *et al.* ont étudié l'effet du solvant sur la résolution du 3-méthyl-butan-2-ol catalysée par la lipase B de *Candida antarctica* [59]. Huit solvants (décane, hexane, cyclopentane, 1,4-dioxane, tétrahydrofurane, acétone, dichlorométhane et sulfure de carbone) ainsi que le dioxyde de carbone supercritique sont testés. Une corrélation positive entre le ratio énantiomérique E et le volume de van der Waals des molécules de solvant est observée. Pour expliquer ces résultats, les auteurs avancent que le nombre de molécules de solvant impliquées dans la solvatation du site actif est modifié pour chaque énantiomère. Une conséquence de cela est que l'énergie entropique d'activation dépendant de la taille des molécules de solvant influencerait donc l'énantiosélectivité.

3.2.3 L'activité thermodynamique de l'eau (a_W)

Leonard-Nevers *et al.* se sont intéressés à l'effet de l'activité de l' a_W sur l'énantiosélectivité de la CALB [38]. Ils ont évalué l'influence de l'activité d'eau (comprise entre une valeur proche de 0 et 0,5) sur l'énantiosélectivité de réaction d'acylation de quatre alcools secondaires dans un réacteur solide/gaz continu à une température de 45 °C. Le donneur d'acyle est le propanoate de méthyle. Avec a_W proche de 0, l'énantiosélectivité pour la résolution du butan-2-ol est de 4, l'énantiosélectivité augmente de façon régulière pour atteindre près de 9 à a_W égale 0,5. Avec a_W proche de 0, l'énantiosélectivité pour la résolution du pentan-2-ol est de 100, l'énantiosélectivité augmente jusqu'à 337 avec a_W égale 0,2, ensuite, l'énantiosélectivité descend régulièrement jusqu'au environ de 200 lorsque a_W est égale 0,5. On observe un profil similaire avec l'hexan-3-ol, avec une activité d'eau proche de 0, l'énantiosélectivité est proche de 67, l'énantiosélectivité augmente jusqu'à 119 avec a_W égale 0,05, ensuite, l'énantiosélectivité descend régulièrement jus-

qu'au environ de 20 lorsque a_W est égale 0,5. Enfin, pour l'octan-4-ol, à a_W proche de 0, l'énantiosélectivité est de 6,5. Lorsque l'on augmente l'activité d'eau, le ratio énantiomérique descend de façon régulière, il est proche de 3 lorsque a_W est égale 0,5. Dans le cas du pentan-2-ol et de l'hexan-3-ol, le rôle de l'eau s'expliquerait par un effet d'inhibition énantiosélective de celle-ci.

3.2.4 Effet de différents additifs ou de co-solvants

Certains additifs ou solvants ont la faculté de modifier les propriétés de l'enzyme par un phénomène considéré comme un effet d'empreinte.

Effet d'empreinte par co-lyophilisation d'additifs avec la subtilisine

Rich *et al.* se sont intéressés aux effets d'empreinte chez la subtilisine [60, 61]. Rich et Dordick ont réalisé la co-lyophilisation de la subtilisine en présence de thymidine (figure 3.6) avec une concentration massique en protéine et thymidine équivalente [60]. Suite à cette étape, l'enzyme présente une activité augmentée de plus de cinquante fois (tableau 3.3) pour l'acylation de la thymidine avec le butyrate de vinyle. Pour déterminer quel groupement chimique de la thymidine est impliqué dans ce phénomène, la lyophilisation en présence de la thymine et du ribose séparément conduit également à une activation de l'enzyme, néanmoins plus faible qu'avec la thymidine (tableau 3.3). La détermination des paramètres cinétiques montre que l'augmentation de l'activité de l'enzyme résulte principalement de l'augmentation de k_{cat} . L'addition d'eau au solvant organique diminue très fortement ce phénomène d'activation de l'enzyme, le ratio multiplicateur de l'activité n'est plus que de 1,48 lorsque le solvant tétrahydrofurane (THF) contient 5% d'eau. Rich et Dordick ont tenté de fournir une explication à ces résultats en réalisant des calculs de modélisation moléculaire portant sur l'étude de l'intermédiaire tétraédrique. Ils ont mis en évidence des modifications structurales de la conformation native de l'enzyme au niveau du site actif induites par la thymidine et le sucrose. Néanmoins, les calculs portent sur des trajectoires de dynamique moléculaire très courtes (10 ps) et aucune discussion n'est engagée par les auteurs sur la rémanence des changements de conformation induits par la présence des substrats dans le site actif.

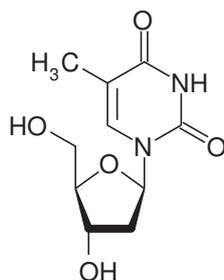


FIG. 3.6 – Structure de la thymidine.

TAB. 3.3 – Efficacité catalytique et paramètres cinétiques de l'acylation de thymidine avec le butyrate de vinyle par la subtilisine dans le THF à 30 °C avec pré-traitement par lyophilisation avec différentes molécules (Rich et Dordick, 1997).

pré-traitement	k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	ratio
aucun	104	0.694	6.66	1
ribose	2090	5.90	2.83	20.1
thymine	2870	13.3	4.63	27.6
thymidine	5390	26.5	4.93	51.8

L'hydrolyse du butanoate de 3-chloro-1-phénylméthoxy-2-propyle par la CALB et effet d'empreinte potentiel du substrat

Les travaux de Laudhaug *et al.* ont porté sur l'étude de l'effet d'un co-solvant sur l'énantiosélectivité de la CALB [62]. L'hydrolyse en milieu aqueux du butanoate de 3-chloro-1-phénylméthoxy-2-propyle par la CALB avec l'addition d'acétone de 0 à 30 % présente des ratios énantiomériques E allant de 50 à 180 (tableau 3.4). Laudhaug *et al.* se sont intéressés à la solubilité de l'alcool produit dans les différents solvants employés. Les résultats montrent que la solubilité de l'alcool produit dans un solvant et l'énantiosélectivité de la réaction dans ce même solvant sont corrélées. Ils suggèrent un phénomène d'inhibition énantiospécifique par l'alcool libéré. Pour démontrer cela, ils ont réalisé l'hydrolyse du butanoate de 3-chloro-1-phénylméthoxy-2-propyle catalysée par la CALB dans un solvant eau/hexane, avec différentes concentrations de l'alcool produits (*(S)*-3-chloro-1-phénoxy- 2-propanol). Les résultats montrent que le ratio énantiomérique E diminue lorsque la concentration de *(S)*-3-chloro-1-phénoxy- 2-propanol augmente. Le même effet est observé en utilisant l'alcool racémique. Pour expliquer ces résultats, Laudhaug *et al.* ont proposé un phénomène d'inhibition « énantiospécifique » par l'alcool libéré qui pourrait générer des effets allostériques en se fixant sur l'enzyme au niveau d'un site

différent du site actif, et modifier la conformation de l'enzyme et par conséquent son énantiosélectivité.

Une hypothèse alternative est celle de l'effet d'empreinte. Le donneur d'acyle générerait une déformation durable de la cavité du site actif. Cette déformation aurait pour conséquence de privilégier l'affinité et la réactivité d'un des deux énantiomères dans la deuxième étape de la réaction Bi-Bi Ping-Pong. Cette hypothèse est utilisée par Lee *et al.* pour expliquer les résultats obtenus pour des réactions de transestérification par la CALB qu'ils ont réalisées [63]. L'idée énoncée est que dans le cadre d'une réaction Bi-Bi Ping-Pong, l'enzyme rencontre un premier substrat qui influencerait la structuration de l'enzyme. L'enzyme mémoriserait donc ce passage. Dans la seconde étape du mécanisme, l'enzyme aurait une meilleure affinité pour les substrats avec une structure proche du premier substrat rencontré.

La validité de l'effet d'empreinte nécessite de poser l'hypothèse que les substrats ont réellement la faculté d'influencer la conformation d'un enzyme durablement, même après le départ du substrat du site actif quelques microsecondes plus tard.

TAB. 3.4 – Ratios énantiomériques E pour l'hydrolyse du butanoate de 3-chloro-1-phénylméthoxy-2-propyle par la CALB immobilisée dans différents solvants (Laudhaug *et al.*, 1998).

Solvant	Enzyme	
	immobilisé	libre
Tampon phosphate, pH 7,2	51	51
Acétone 10%	94	nd
Acétone 30%	158	180
Acétone 50%	103	nd
Hexane 10%	74	154

Concernant l'influence de l'état libre ou immobilisé de l'enzyme, les auteurs notent que le comportement de l'enzyme est similaire dans les deux cas, sans détailler les différences de E observées.

3.3 Effet des mutations de la CALB sur l'énantio-sélectivité

3.3.1 Les mutations des résidus T42 et S47

Rotticci *et al.* [64] se sont intéressés à la résolution cinétique de deux composés halohydrines : (1) 1-bromo-2-octanol et (2) 1-chloro-2-octanol dans l'hexane à 296 K (activité de l'eau de 0.1) avec les mutants T42V, S47A, et T42V/S47A. Avec l'enzyme sauvage, l'énantiosélectivité est de 6,5 pour le composé (1), et de 14 pour le composé (2). L'énantiosélectivité est presque inchangée avec le mutant T42V, en revanche, elle double avec le mutant S47A pour les deux composés. Le double mutant T42V/S47A présente une augmentation de l'énantiosélectivité de l'ordre de 50 % pour les deux composés. L'hypothèse proposée pour expliquer ces observations est que la mutation S47A diminue les interactions électrostatiques répulsives entre le substrat résolu rapidement (forme chirale *R* avec la chaîne latérale courte halogénée dans la poche stéréospécifique) et l'enzyme, soulignant l'importance des interactions non-stériques pour la résolution des composés halohydrines.

L'impact de ces mutations est évalué sur d'autres substrats. Avec le 1-bromobutan-2-ol, le ratio énantiomérique passe de 88 pour l'enzyme sauvage à environ 60 pour les mutants T42V, S47A, T42V/S47A. Avec le butan-2-ol, il n'y a pas d'effet sur l'énantiosélectivité avec les mutants T42V, S47A et T42V/S47A qui présentent un *E* d'environ 6.5 tout comme l'enzyme sauvage. Les mutations T42V, S47A, T42V/S47A ne modifient pas beaucoup le ratio énantiomérique ($E = 11$) de l'enzyme sauvage avec le substrat meso-butane-2,3-diol.

Ottosson *et al.* [58] ont également étudié les mutants T42V, S47A, et T42V/S47A. Ils ont réalisé la résolution du 3-méthyl-2-butanol à 296 K dans l'hexane avec une activité de l'eau de 0,11. Le ratio énantiomérique pour l'enzyme sauvage est de 970. Le ratio énantiomérique diminue pour les trois mutants : $E = 520$ pour T42V, $E = 340$ pour S47A, et $E = 390$ pour T42V/S47A. Il convient de prendre ces résultats avec précaution car on sait que le ratio énantiomérique est difficile à mesurer dès qu'il est supérieur à 200. Les travaux s'intéressent aux contributions enthalpiques et entropiques. Ils montrent que

la diminution du ratio énantiomérique pour le mutant T42V est due à la fois à une diminution du terme enthalpique et du terme entropique, tandis que la diminution du ratio énantiomérique pour les mutants S47A et T42V/S47A est principalement le fait d'une diminution du terme enthalpique.

3.3.2 Les mutations du résidu W104

Rotticci *et al.* [64] se sont également intéressés à la mutation du résidu W104. La mutation W104H agrandit la taille de la poche stéréospécifique et diminue fortement l'énantiosélectivité. Le ratio énantiomérique E passe respectivement de 6,5 et 14 pour le 1-bromooctan-2-ol et le 1-chlorooctan-2-ol à $E = 2$ pour ces deux substrats. Avec le butan-2-ol la mutation W104H diminue le ratio énantiomérique à 1,4 avec une préférence pour la forme chirale S , tandis que le ratio énantiomérique est de 6,5 en faveur du R pour l'enzyme sauvage. Avec le 1-bromobutan-2-ol, le ratio énantiomérique passe de 88 pour l'enzyme sauvage à $E = 1,7$ avec la mutation W104H. Avec le meso-butane-2,3-diol, la mutation W104H fait passer le ratio énantiomérique de 11 pour l'enzyme sauvage à $E = 2,0$ avec une préférence pour la forme chirale S .

Magnusson *et al.* ont constaté que la mutation W104A inverse l'énantiosélectivité pour certains alcools en faveur de la chiralité S [65]. Par exemple, le ratio énantiomérique très élevé en faveur de la forme R pour le 1-phényléthanol devient en faveur du S chez le mutant, bien que l'énantiopréférence soit faible dans le cas du mutant. Le tryptophane 104 est situé dans le fond du site actif. Ces résultats suggèrent que la mutation de ce résidu en alanine permet d'augmenter l'espace disponible pour l'orientation du substrat de forme chirale S dans la poche stéréospécifique. Parmi les nombreux mutants existants, la mutation du tryptophane 104 est celle qui impacte le plus l'énantiosélectivité.

Troisième partie

Matériel et méthodes

Chapitre 4

Les travaux expérimentaux

Les protocoles et le matériel employés dans les expériences de cinétique enzymatique pour la détermination des constantes spécifiques et des ratios énantiomériques, ainsi que le détail des travaux sur l'effet d'empreinte sont présentés ici.

4.1 Mesure de l'énantiosélectivité

Le ratio énantiomérique obtenu en milieu organique liquide est calculé à partir des paramètres cinétiques apparents avec le butan-2-ol et le pentan-2-ol énantiopurs, suivant l'équation $E = \frac{(k_{cat}/K_M)_R}{(k_{cat}/K_M)_S}$. Les valeurs des ratios énantiomériques pour le butan-2-ol, le pentan-2-ol et le hexan-3-ol reportées dans la partie Résultats (section 7.2.2) ont été préalablement obtenues à partir des excès énantiomériques de substrats et de produits [22] dans le réacteur solide/gaz présenté dans la section 4.3.1, avec le donneur d'acyle propa-noate de méthyle et la CALB immobilisée, comme précédemment décrit [38, 66]. Pour les substrats ramifiés, les valeurs sont reprises de la littérature [26], ces résultats sont obtenus à 39 °C dans l'hexane, avec le thiooctanoate d'éthyle comme donneur d'acyle.

4.2 Détermination des constantes cinétiques pour les réactions de transestérification réalisées avec le butan-2-ol et le pentan-2-ol énantiopurs

La façon dont sont calculées les paramètres cinétiques V_{max} et K_M pour la résolution des alcools énantiopurs butan-2-ol et pentan-2-ol est présentée ici.

4.2.1 Enzyme et réactifs pour la cinétique

Novozym[®] 435 (la lipase B de *Candida antarctica* immobilisée) est fourni par Novozymes A/S (Bagsvaerd, Danemark). Les énantiomères purs *R* et *S* (99 %) du butan-2-ol et du pentan-2-ol sont fournis par Sigma-Aldrich (St Louis, USA), et le propanoate de méthyle est fourni par Fluka.

4.2.2 Réaction enzymatique avec les alcools énantiopurs du butan-2-ol et du pentan-2-ol

La mesure des vitesses initiales est réalisée à 45 °C dans le 2-méthylbutan-2-ol. Le mélange réactionnel de 4 mL contient différentes concentrations de butan-2-ol (100-4 000 mM pour la forme *S* et 100-1 000 mM pour la forme *R*) ou de pentan-2-ol (100-900 pour la forme *S* et 100-1 500 mM pour la forme *R*) qui sont incubées dix minutes avant l'addition de 10 mg de Novozym[®] 435 pour l'acylation du butan-2-ol ou du (*R*)-pentan-2-ol avec 430 mM de propanoate de méthyle, ou 20 mg de Novozym[®] 435 dans le cas du (*S*)-pentan-2-ol. Un échantillon de 200 μ l est prélevé à intervalles de temps réguliers et centrifugé à 14 000 g. Le surnageant est analysé par chromatographie en phase gazeuse (GC) après une dilution d'un facteur deux avec du 2-méthylbutan-2-ol.

4.2.3 Analyse en chromatographie en phase gazeuse

L'analyse quantitative des produits de la réaction est réalisée à l'aide du système 7890 d'Agilent pour l'analyse du propanoate de 1-méthylpropyle (55 °C, 20 min) et du propanoate de 1-méthylbutyle (55 °C 15 min, 3 °C.min⁻¹, 85 °C 5 min), le flux

est de $1,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ dans une colonne Chirasil-Dex CB (25 m, 0.25 mm i.d., $0.25 \mu\text{m}$ β -cyclodextrin, Chrompack, France). Les produits sont détectés par FID et quantifiés avec le programme HP Chemstation. La calibration externe est réalisée avec les esters synthétisés par voie chimique avec l'alcool correspondant et l'anhydrique propionique dans la pyridine à température ambiante.

4.3 Expériences sur l'effet d'empreinte

4.3.1 Matériel et méthodes pour l'étude de l'effet d'empreinte par l'ester substrat

Synthèse chimique des esters produits par la réaction enzymatique

Les substrats et les autres espèces chimiques sont fournis par Sigma–Aldrich-Fluka Chemical Co. Ils sont de la plus haute pureté disponible (98 % minimum) et contrôlés en chromatographie gazeuse avant usage. Les substrats sont séchés par distillation et conservés sous argon et tamis moléculaire 3 Å avant usage. Les solvants sont fournis par Carlo Erba. Le racémique propanoate de 1-méthylpentyle est synthétisé avec l'alcool correspondant et l'anhydride propionique dans la pyridine à température ambiante [67].

Le propanoate de (*R*)-1-méthylpentyle est obtenu par résolution enzymatique à partir du propanoate de vinyle et de l'hexan-2-ol en utilisant la CALB Novozym[®] 435 dans le solvant heptane à 35 °C, ee_p l'excès énantiomérique de l'ester produit est de 99.3%. De l'hexan-2-ol enrichi en forme *S*, récupéré de la réaction précédente, est utilisé après purification par chromatographie sur gel de silice (éluant EP/AcOEt : 95/5), puis l'estérification avec l'anhydride propionique est réalisée pour obtenir le propanoate de (*S*)-1-méthylpentyle.

Enzyme

La CALB est fournie par le département de biotechnologie du KTH (Royal Institute of Technology) de Stockholm. Elle est produite dans la levure méthylotrophe *Pichia pastoris*, elle est exprimée extracellulairement et purifiée du milieu par chromatographie d'interaction hydrophobe, suivie d'une filtration sur gel [66, 68]. L'adsorption de l'en-

zyme est réalisée sur Chromosorb P Acid-washed, traité au diméthyl dichlorosilane (AW DMCS) 60-80 Mesh (VARIAN, France). Dans une procédure d'adsorption typique pour la catalyse en solide/gaz, l'enzyme (0,106 mg) est dissout dans un tampon sodium phosphate (pH 7.5, 10 mM) et du Chromosorb P AW DMCS (1 g) sec est ajouté à la solution. La quantité d'enzyme immobilisé est déterminée en mesurant l'absorbance à 280 nm, en utilisant un coefficient d'extinction molaire égale à $40\,690\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Après agitation, la préparation est laissée une semaine sous vide avec un dessicant à température ambiante.

Réaction enzymatique

La mesure des vitesses initiales est réalisée à $70\text{ }^\circ\text{C}$ dans le réacteur solide/gaz. Les activités thermodynamiques pour les substrats, esters et alcools, sont respectivement de $a_{ester}=0,1$ et $a_{alcool}=0,05$. La réaction est réalisée en condition anhydre.

La quantité d'enzyme est comprise entre 20 et 200 mg, en fonction du donneur d'acyle utilisé. Le flux total est égal à $900\ \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Le réacteur solide/gaz

Le réacteur solide/gaz est un bioréacteur en continu [69]. Le biocatalyseur, ici l'enzyme, est immobilisé sur un support solide, tandis que le solvant et les substrats constituent une phase gaz homogène. Un gaz vecteur, dans notre cas de l'azote, apporte les substrats jusqu'au biocatalyseur.

Le système est composé de deux étuves thermostatées comme cela est présenté sur la figure 4.1. Dans la première, les substrats et solvants sont portés à évaporation, ceux-ci sont placés dans des flacons de saturation, et le gaz vecteur (l'azote) est mis à buller dans les fioles sous un débit contrôlé. L'activité thermodynamique d'un composé est égale au ratio de sa pression partielle divisée par sa pression partielle de saturation, cette dernière valeur dépend de la température et de la pression :

$$a_x = \frac{Pp_x^n}{Pp_{x,sat}^n} \quad (4.1)$$

La pression partielle Pp_x^n du produit n est déterminée à partir de son débit molaire Q_x^n , du débit molaire des autres espèces chimiques et de la pression P_a dans le flux de gaz

à partir de l'équation suivante :

$$Pp_x^n = \frac{Q_x^n}{\sum_{i=1}^n (Q_{N_2}^n + Q_x^n)} P_a \quad (4.2)$$

Les différents gaz provenant des différentes fioles sont ensuite mélangés dans une chambre de mélange et dirigés vers la seconde étuve où est disposé le biocatalyseur, l'enzyme immobilisé sur un support dans notre cas. Ce dernier est disposé dans un tube de verre d'une section d'un demi-centimètre. Les gaz sortant du bioréacteur sont ensuite dirigés vers les appareillages de mesure tels que la chromatographie en phase gazeuse, ou bien simplement condensés pour être analysés ultérieurement.

Le système utilisé permet de contrôler l'activité thermodynamique de chaque substrat de façon indépendante, ainsi que l'activité thermodynamique de l'eau. On contrôle donc parfaitement la disponibilité des espèces chimiques. Un autre avantage est celui de pouvoir réaliser la catalyse sans solvant. Une des limitations du réacteur solide/gaz est qu'il ne peut être utilisé qu'avec des substrats vaporisables à des températures n'entraînant pas de détérioration du biocatalyseur, ce qui limite l'utilisation de certains substrats, tels que les sucres.

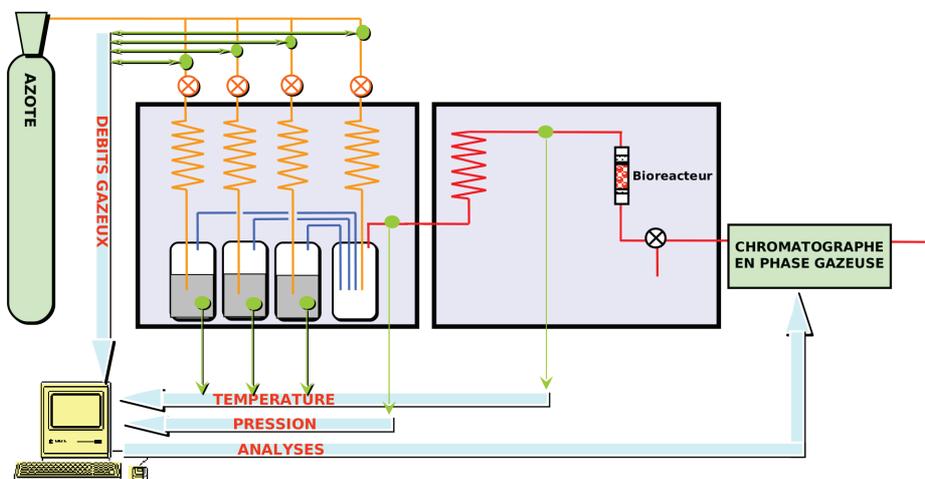


FIG. 4.1 – Schéma du réacteur continu solide/gaz.

Analyse en chromatographie en phase gazeuse

L'analyse quantitative des produits de réaction est réalisée par chromatographie en phase gazeuse (7890 CG Systemn, Agilent), pour les esters produits que sont les pro-

propanoate de (*R*)- et (*S*)-1-méthylbutyle (55 °C 15 min, 3 °C.min⁻¹, 85 °C 5 min), à un flux de 1,5 ml.min⁻¹ avec la colonne Chirasil-Dex CB (25 m, 0,25 mm i.d., 0,25 μm β-cyclodextrin, Chrompack, France). Les produits sont détectés par FID et quantifiés à l'aide du logiciel HP Chemstation.

Mesure de l'énantiosélectivité

Les valeurs des ratios énantiomériques des différentes cinétiques reportées dans la section Résultats sont obtenues en mesurant le ratio des vitesses initiales de synthèse d'ester produit [22] dans le réacteur solide/gaz avec différents donneurs d'acyle et la CALB immobilisée [38, 66].

4.3.2 Matériel et méthodes pour l'étude de l'effet d'empreinte par des molécules co-immobilisées avec la CALB

Synthèse chimique des esters produits

Les produits chimiques utilisés dans le cadre de ces travaux sont fournis par Sigma-Aldrich-Fluka Chemical Co, avec une pureté minimale de 98 %. Le produit formé lors de la réaction, non disponible dans le commerce, le propanoate de 1-méthylbutyle est synthétisé chimiquement à partir de l'anhydride propionique et du pentan-2-ol en présence d'un catalyseur chimique, la pyridine. Le produit est concentré sous vide partiel et purifié par chromatographie sur gel de silice.

Enzyme utilisé dans l'expérience d'inclusion de la molécule à effet d'empreinte par co-séchage

On utilise la lipase B de *Candida antarctica* commerciale (Novozym[®] SP 435). Cette lipase immobilisée sur une résine acrylique macroporeuse est fournie par la société Novo Nordisk (Danemark).

Enzyme utilisé dans l'expérience d'inclusion de la molécule à effet d'empreinte dans la matrice sol-gel

On utilise la lipase B de *Candida antarctica* commerciale (Lipozym) libre sous forme liquide. Après purification, l'enzyme est lyophilisé pour obtenir une forme poudreuse.

Cet enzyme est immobilisé dans une matrice de type solution-gélification (sol-gel) utilisant des précurseurs silanes, dont la méthode d'élaboration utilisée est celle décrite par Hellner *et al.* [70]

Après l'avoir purifié sur un tamis moléculaire (colonne en Séphadex G-25 M), la lipase B (Lipozym) est immobilisée seule et en présence d'une quantité équimolaire et mille fois supérieure (1 000 moles de la molécule pour 1 mole d'enzyme) de molécules à effet d'empreinte (*R*) ou (*S*)-2-aminohexane.

4.3.3 Réaction enzymatique

Les réactions d'acylation du pentan-2-ol sont réalisées dans le réacteur solide/gaz à 70 °C. Les activités thermodynamiques du pentan-2-ol et du propanoate de méthyle sont respectivement de 0,05 et 0,1. L'activité d'eau est proche de 0. L'activité enzymatique dans le cas de la CALB immobilisée seule et co-séchée est mesurée à 45 °C.

Analyse en chromatographie en phase gazeuse, mesure de l'énantiosélectivité et des activités

Les méthodes pour l'analyse quantitative des produits et la détermination des ratios énantiomériques sont les mêmes que celles décrites pour l'étude de l'effet d'empreinte par l'ester substrat.

On réalise une calibration interne et externe pour mesurer les activités de l'enzyme. Pour la calibration externe, une gamme d'activité d'ester et d'alcool croisée est utilisée pour catalyser la réaction à 70 °C. À partir des aires mesurées, et connaissant la pression partielle des composés donc leurs débits molaires, on réalise une courbe exprimant l'aire du pic d'ester en fonction de son débit molaire. La calibration interne permet de s'affranchir de la mesure des volumes injectés. On prépare des échantillons avec un mélange d'ester substrat et produit dont le rapport de masse est connu. Ces échantillons sont analysés

par chromatographie en phase gazeuse, ce qui permet d'établir la courbe exprimant le ratio des aires d'ester substrat et d'ester produit, en fonction du ratio du nombre de mole d'ester substrat sur l'ester produit. En pratique, on utilise donc la courbe de calibration externe pour connaître le débit molaire de l'ester substrat à partir de son aire, puis la calibration interne permet de déterminer le débit molaire de l'ester produit.

Chapitre 5

La modélisation moléculaire

Dès les débuts du développement de l'informatique vers la fin de la première moitié du XX^e siècle, les scientifiques commencèrent à développer des programmes intégrant les équations permettant de modéliser de petites molécules.

La première étude moléculaire du mouvement des atomes d'une protéine par dynamique moléculaire fut celle de la protéine BPTI¹ par le groupe de Karplus à Harvard (McCammon *et al.*, 1977).

Les modèles de représentation de molécules sont très vastes. Les modèles quantiques sont très précis, ils prennent en compte les électrons de valence et permettent entre autres de modéliser des réactions d'espèces chimiques en présence. Le grand nombre de variables considérées par le modèle et les équations à résoudre en font un outil très exigeant en puissance de calcul et par conséquent actuellement limité à l'étude de petits systèmes.

L'étude des macromolécules complexes telles que les protéines fait généralement appel à la mécanique moléculaire. Classiquement, le système traite explicitement les atomes de façon « unitaire », un atome est typiquement représenté par un point, une masse ponctuelle dans l'espace, et comporte une charge. Dans le cas de très gros systèmes, la macromolécule peut être représentée par groupes d'atomes, on parle alors de modèle « gros gains », utilisé dans certains cas pour des protéines. Un modèle intermédiaire intégrant tous les atomes exceptés les hydrogènes non-polaires était aussi en vogue lorsque la puissance de calcul était limitée, ce qui est de moins en moins le cas avec l'essor des supercalculateurs.

¹Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor.

Les protéines constituent des macromolécules d'une taille souvent trop importante pour être étudiées à l'aide de la mécanique quantique. La mécanique moléculaire est donc actuellement le modèle le plus couramment employé pour décrire des protéines. Plus récemment, des méthodes hybrides permettant de modéliser un même système en attribuant des niveaux de théories distincts pour les différentes parties du système étudié ont fait leur apparition. On peut par exemple modéliser la structure d'un enzyme par mécanique moléculaire et utiliser un modèle quantique pour décrire localement le site actif, on parle alors de méthode QM/MM (Quantum Mechanics/Molecular Mechanics), ce qui s'avère très utile pour comprendre les mécanismes réactionnelles des enzymes.

Dans ce chapitre, une revue détaillée des possibilités et limites de la mécanique moléculaire est présentée. Les programmes, les types de calculs, et les méthodologies développées y sont expliqués de façon exhaustive.

5.1 La mécanique moléculaire

La mécanique moléculaire est un modèle fournissant une représentation de la nature des interactions atomiques par des règles extrêmement simplifiées et éloignées des lois physiques régissant la nature à cette échelle. Il n'en demeure pas moins que ce modèle est efficace pour représenter des macromolécules telles que les protéines.

Les atomes sont considérés comme des masses ponctuelles dans l'espace, avec un potentiel de répulsion et d'attraction tel qu'il est défini par Lennard-Jones, ainsi qu'un potentiel modélisant les interactions électrostatiques. Les liaisons covalentes sont représentées par des potentiels d'énergie harmonique avec une distance d'équilibre définie en fonction des types d'atomes impliqués.

5.1.1 Le champ de forces

Le champ de forces définit un ensemble de paramètres permettant de modéliser un système. Il intègre notamment les charges partielles des atomes, et les constantes de force et d'équilibre des différentes interactions décrites par le modèle.

En mécanique moléculaire, le champ de force attribue un type atomique à chaque atome selon sa nature. Concrètement, le type atomique d'un atome est défini par les

atomes de son voisinage immédiat d'un point de vue covalent. Les types atomiques peuvent également être définis pour des types de molécules spécifiques (lipides, polypeptides, ADN, ...).

Les paramètres géométriques tels que la longueur des liaisons, les angles θ (angle de liaison entre trois atomes contigus), les angles dièdres (entre quatre atomes), et les angles impropres sont déterminés à partir de données expérimentales ou bien de calculs *ab initio*. Les charges partielles sont obtenues à partir de calculs *ab initio*.

Les champs de forces ne sont pas compatibles entre-eux. Chacun présente des spécificités. Par exemple, les charges partielles des atomes dans le champ de force Charmm22 sont paramétrées en intégrant l'effet de polarisation induit par des molécules d'eau au voisinage des groupements polaires, ce qui n'est pas le cas avec le champ de force Amber qui utilise une méthodologie pour l'ajustement des charges partielles n'incluant pas de molécules d'eau au voisinage des groupements polaires.

L'énergie potentielle U du système est de la forme suivante :

$$U = \sum (E_{liaison} + E_{angle} + E_{angle\ diedre} + E_{angles\ impr.} + E_{VDW} + E_{elec.}) \quad (5.1)$$

Les énergies de liaisons interatomiques sont classiquement représentées par un potentiel harmonique, qui constitue une approximation satisfaisante du potentiel énergétique de la liaison pour des distances r proches de la position d'équilibre r_0 . L'énergie évolue en r^2 (terme quadratique).

L'énergie de liaison $E_{liaison}$ est donc de la forme : $E_{liaison} = K_b(r - r_0)^2$, où K_b est appelé « constante de raideur ». L'énergie d'angle est de la forme : $E_{angle} = K_\theta(\theta - \theta_0)^2$. L'énergie d'un angle dièdre est de la forme : $E_{angle} = K_\chi(1 + \cos(n\chi - \sigma))$, où K_χ indique la hauteur de la barrière d'énergie de rotation de la liaison, n représente la périodicité de la liaison, c'est-à-dire le nombre de conformations stables par rotation de 360° , et enfin la phase σ conditionne la position des *minima* et *maxima* énergétiques. L'énergie des angles impropres est de la forme : $E_{impropre} = K_\psi(\psi - \psi_0)$. Ce terme permet notamment de maintenir quatre atomes dans un plan ou de contraindre la chiralité d'un carbone par exemple.

Les forces de van der Waals sont des interactions électriques de faible intensité résultant

de trois forces nommées : force de Keesom, force de Debye, et force de London. Le potentiel de Lennard-Jones comporte un terme attractif à la puissance six correspondant aux interactions de van der Waals et un terme répulsif empirique à la puissance douze rendant compte de l'impossibilité pour deux atomes de s'interpénétrer :

$$E_{Lennard-Jones} = \varepsilon_{i,j} \left(\left(\frac{R_{ij}^{min.}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{R_{ij}^{min.}}{r_{ij}} \right)^6 \right) \quad (5.2)$$

Les interactions électrostatiques entre deux charges q_i et q_j , en fonction de la distance r_{ij} qui les sépare :

$$E_{Electrostatique} = \frac{q_i q_j}{\varepsilon_D r_{ij}} \quad (5.3)$$

Certains champs de force incluent d'autres paramètres tels que le terme « Urey-Bradley » (interactions 1-3 non-liantes), présent dans le champ de force Charmm22.

Dans un modèle de champ de force « atomes polaires » tel que Charmm19, les hydrogènes portés par les carbones des chaînes alkyles ne sont pas explicitement représentés. Ainsi, les groupements CH_3 , CH_2 , ou CH ne sont représentés dans le modèle que par un seul élément. À l'inverse d'un modèle de champ de force « tout atome » comme Charmm22 où chaque atome est explicitement traité dans le système.

Le potentiel de Morse

Il existe des modèles d'équation représentant de façon plus fidèle le profil énergétique des différentes composantes de l'énergie potentielle d'un système, en particulier lorsque le système s'éloigne de sa position d'équilibre. C'est le cas du potentiel de Morse présenté ci-dessous qui décrit le profil énergétique d'un mouvement d'élongation entre deux atomes :

$$V(r) = D_e(1 - e^{-\alpha(r-r_0)})^2 + V(r_0) \quad (5.4)$$

avec r la distance interatomique, r_0 la distance d'équilibre, D_e l'énergie de dissociation. Un inconvénient du potentiel de Morse est qu'il requiert plus d'opérations pour calculer la fonction énergie, il est donc plus exigeant en temps de calcul.

Le potentiel harmonique présenté plus haut, bien que plus simple, convient lorsque le système modélisé est proche de sa situation d'équilibre.

5.1.2 Le modèle de solvation implicite

EEF1² est un modèle de champ de force où les hydrogènes non-polaires ne sont pas représentés explicitement, développé à partir de données expérimentales, il intègre un modèle de solvation [71] permettant de représenter les protéines et polypeptides en solution aqueuse. Le solvant est un paramètre essentiel et délicat à traiter en modélisation moléculaire.

Ce modèle de solvation repose sur l'hypothèse que l'énergie libre de solvation d'une protéine est la somme des énergies de solvation des contributions de groupes d'atomes, déterminées à partir des valeurs de petites molécules modèles :

$$\Delta G^{slv} = \sum_i \Delta G_i^{slv} \quad (5.5)$$

ΔG_i^{slv} représente l'énergie libre de solvation du groupe d'atome i .

$$\Delta G_i^{slv} = \Delta G_i^{ref} - \sum_j \int_{V_j} f_i(r) dr \quad (5.6)$$

ΔG_i^{ref} représente l'énergie libre de solvation de référence d'un groupe d'atome i de référence exposé au solvant. V_j représente le volume du groupe j . Pour simplifier le calcul, l'intégration de $f_i(r)$ est approximée au produit $f_i(r_{ij})V_j$:

$$\Delta G_i^{slv} = \Delta G_i^{ref} - \sum_{j \neq i} f_i(r_{ij})V_j \quad (5.7)$$

Concrètement, l'équation 5.7 indique que l'énergie libre de solvation du groupe i est égale à l'énergie libre de référence paramétrée dans le modèle pour le groupe d'atome (ΔG_i^{ref}) minorée de la réduction de solvation due aux groupements environnants, comme c'est le cas pour des résidus enfouis.

Il existe d'autres modèles de solvation implicite. Dans notre travail, EEF1 est utilisé dans l'étude préliminaire pour réaliser une trajectoire de l'enzyme seul.

²Effective Energy Function.

5.1.3 Minimisation

L'énergie du système est fonction des $3N$ coordonnées cartésiennes ($R \rightarrow R^{3N}$). On est donc dans une situation où l'énergie du système est fonction d'un grand nombre de variables, la détermination du *minimum* énergétique n'est donc pas aisément accessible. Accéder à l'énergie minimale du système requiert donc des méthodes spécifiques permettant de s'approcher de cette valeur. Minimiser la fonction énergie du système revient à optimiser la géométrie de la structure, il existe différents algorithmes couramment employés en modélisation moléculaire pour cela, parmi les plus communs, on peut citer :

- le gradient déterministe
- le gradient conjugué
- l'algorithme de Powell
- l'algorithme basé sur Newton-Raphson
- l'algorithme Newton-Raphson

Toutes ces méthodes font converger le système vers un état de plus basse énergie, mais il ne s'agit que d'un *minimum* énergétique local le plus proche et non global. Accéder à ce dernier est une tâche bien plus ardue.

En complément des méthodes d'optimisation par minimisation, d'autres méthodes permettent d'explorer la fonction énergie avec des approches différentes telles que les méthodes de Monte Carlo ou les algorithmes génétiques. Elles sont particulièrement utilisées pour explorer l'énergie d'un système lors de calcul de docking (exploration conformationnelle).

5.1.4 Les équations du mouvements

La dynamique des atomes en mécanique moléculaire est basée sur la mécanique newtonienne.

La force d'une particule \vec{F}_i est égale au produit de la masse m_i et de la vitesse \vec{a}_i de cette particule :

$$\vec{F}_i = m_i \vec{a}_i = m_i \ddot{r}_i \quad (5.8)$$

r représente la position d'une particule, et \ddot{r}_i sa dérivée seconde par rapport au temps,

soit son accélération.

Les macromolécules telles que les protéines présentent une large gamme de mouvements caractéristiques sur différentes échelles de temps. Les mouvements globaux tels que le répliage d'une protéine s'étendent sur plusieurs millisecondes. Les mouvements de domaines et de sous-unités peuvent s'étendre sur plusieurs microsecondes. Les mouvements structuraux plus locaux tels que l'adaptation de la conformation du site actif sont de l'ordre de la nanoseconde à la microseconde. Les mouvements de chaînes latérales sont de l'ordre de la picoseconde (10^{-12} s). Les fluctuations atomiques sont de l'ordre de la femtoseconde (10^{-15} s).

Afin de correctement modéliser la trajectoire d'un système, le pas d'intégration, c'est-à-dire le temps utilisé dans la résolution de l'équation du mouvement, ne doit pas être supérieur aux mouvements les plus rapides du système. En mécanique moléculaire, la vibration d'élongation d'une liaison impliquant un atome d'hydrogène est très rapide, et impose d'utiliser un pas d'intégration de 1 femtoseconde (10^{-15} s). Pour démarrer la trajectoire de dynamique, on procède à l'attribution de vitesses aléatoires à chaque atome selon une distribution normale puis ces vecteurs vitesses sont incrémentés lors de l'étape de chauffe, la température étant liée à la quantité de mouvement.

5.2 Trajectoire de l'enzyme seul avec le modèle EEF1

On utilise le modèle EEF1 pour réaliser une trajectoire de dynamique moléculaire de la CALB seule de 17 ns.

Le modèle EEF1 a montré des gages de fiabilité dans le passé [71, 72]. En outre, le fait que le solvant soit implicite et que le modèle fonctionne avec un champ de force « atomes polaires » permet de réaliser des trajectoires de dynamique de durées assez importantes.

Afin de pouvoir étudier l'enzyme avec une échelle de temps de plusieurs nanosecondes, on décide donc de réaliser une dynamique de l'enzyme avec le modèle de solvant implicite EEF1 combiné au champ de forces « atome polaire » CHARMM 19. On réalise une trajectoire de 10 ns, prolongée jusqu'à 17 ns, car comme nous le verrons, le système n'a pas cessé d'évoluer au cours de la trajectoire, au bout de 10 ns.

La liste des interactions non-liantes est mise à jour tous les vingt itérations. Sans

grande originalité, ces paramètres sont ceux proposés et préconisés dans la documentation de CHARMM pour le modèle de solvation EEF1³.

On minimise le système avec 10 000 itérations de l'algorithme du gradient conjugué, puis 2 000 itérations avec l'algorithme ABNR⁴. La dynamique est réalisée à une température de 300 K. Pour l'étape de dynamique moléculaire, on utilise l'intégrateur Verlet et le pas d'intégration est de 1 fs. L'étape de chauffe est réalisée en 100 ps au cours de laquelle la température est incrémentée de 1 K tous les 200 pas. Une étape d'équilibration de 500 ps est ensuite réalisée au cours de laquelle on contrôle les paramètres cinétiques du système toutes les 5 000 itérations. La dynamique de production est ensuite lancée jusqu'à 17 ns.

5.3 La perturbation de l'énergie libre

5.3.1 Principe général

La théorie de la perturbation de l'énergie libre présentée par Zwanzig [73] en 1954, permet de calculer la différence d'énergie libre entre un état initial et un état final d'un système ou entre deux systèmes proches, de la façon suivante :

$$\Delta F_{0 \rightarrow 1} = F_1 - F_0 = -\beta^{-1} \ln \langle e^{-\beta(E_1 - E_0)} \rangle \quad (5.9)$$

β est la température inverse égale à $1/k_B T$, où k_B est la constante de Boltzmann. Lorsque les différences d'énergies E_0 et E_1 sont importantes, et du fait de la sensibilité du terme exponentielle de la formule, il est intéressant de séquencer l'évaluation de la variation d'énergie en plusieurs étapes :

$$\Delta F_{0 \rightarrow 1} = F_1 - F_0 = \sum_{i=0}^{N-1} -\beta^{-1} \ln \langle e^{-\beta \Delta E_{n \rightarrow n+1}} \rangle_n \quad (5.10)$$

D'un point de vue pratique, un paramètre λ_i est utilisé pour échelonner linéairement la transformation du système initial vers son état final, $\lambda_i=0$ lorsque le système est dans

³Documentation de CHARMM disponible sur le site internet : <http://www.charmm.org>

⁴Basé sur l'algorithme de Newton Raphson (*cf.* section 5.1.3)

l'état initial et $\lambda_i=1$ à l'état final. Le chemin de la transformation ne correspond à aucune réalité physique, on parle de transformation « alchimique ».

La perturbation de l'énergie libre⁵ est une méthode largement employée pour évaluer de petites variations d'énergie libre dans divers systèmes, telles que l'énergie de liaison d'un complexe enzyme-ligand. Cet outil est utilisé ici pour prédire l'énantiosélectivité de la lipase B de *Candida antarctica* pour une série d'alcools secondaires en évaluant la différence d'énergie libre entre les intermédiaires tétraédriques formés avec les alcools énantiomères *R* et *S*, représentant un bon modèle pour accéder à la différence d'énergie $\Delta\Delta G^\ddagger$ libre entre les deux états de transition.

5.3.2 La structure de l'enzyme et de l'intermédiaire tétraédrique

La structure de départ pour l'enzyme est la structure cristallographique obtenue par Uppenberg *et al.* [8] (entrée PDB : 1TCA) avec une bonne résolution de 1.55 Å. La structure cristallographique avec l'inhibiteur irréversible (entrée PDB : 1LBS) est utilisée pour indiquer le positionnement correct de l'intermédiaire tétraédrique modélisé.

L'oxygène chargé négativement est orienté vers le trou oxyanionique pour établir des liaisons hydrogène avec les résidus T40 et Q106. Concernant la position initiale des substituants des alcools énantiomères *R* et *S* dans le site actif, les substrats sont orientés en accord avec le modèle postulé par Haeffner *et al.* [26] pour l'obtention de « modes productifs », avec la chaîne latérale longue de l'alcool *S* orientée dans la poche stéréospécifique et la chaîne latérale moyenne vers la sortie du site actif, comme cela est représenté sur la figure 5.1. À l'inverse, la chaîne latérale moyenne de l'alcool *R* est orientée dans la poche stéréospécifique et la chaîne longue vers la sortie du site actif.

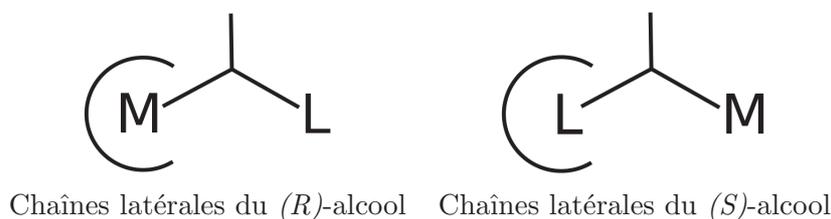


FIG. 5.1 – Orientation des chaînes latérales pour les énantiomères *R* et *S* avec le cercle tronqué représentant la poche stéréospécifique.

⁵On parle de méthode de FEP, abréviation de « Free Energy Perturbation ».

Le programme CHARMM version c35 [74] et le champ de forces Charmm22 « tout-atome » sont utilisés. Les paramètres du champ de forces pour la modélisation de l'intermédiaire tétraédrique sont ceux proposés par Otte *et al.* [29]. Ces paramètres ont été rigoureusement obtenus par des calculs *ab initio* et spécifiquement développés pour le champ de forces Charmm22. Les paramètres du champ de forces pour la partie concernant les chaînes latérales alkyle des alcools du système sont définis par homologie à partir des valeurs disponibles dans le champ de forces pour différents types d'atomes. La partie acyle de l'intermédiaire tétraédrique est un groupement propionyle.

5.3.3 Les paramètres de la dynamique moléculaire

Les molécules d'eau cristallographiques sont conservées et une couche d'eau de 7 Å entourant l'enzyme est ajoutée, permettant de correctement solvater la structure de l'enzyme et le site actif.

Le nombre de conformations accessibles au système augmente très rapidement avec le nombre d'atomes. Une façon d'augmenter les chances de succès pour faire converger les calculs de FEP consiste à réduire artificiellement l'espace de phase exploré. Aussi, cela permet de prévenir la contribution d'événements « parasites » risquant de perturber l'énergie du système, tels que les mouvements de chaînes latérales ou de domaines éloignés du site actif dans notre cas.

La liberté conformationnelle du système est réduite à une sphère d'un rayon de 22 Å centrée sur le site actif, cette réduction de l'espace de phase permet d'accélérer l'échantillonnage de ce dernier. Ce choix est un compromis entre la nécessité d'obtenir une bonne convergence des calculs, mais également de laisser assez de liberté au site actif pour s'ajuster autour de l'intermédiaire tétraédrique et les chaînes latérales des alcools. Le même type de restriction est utilisé par d'autres auteurs pour des calculs de FEP. Par exemple, Allouche *et al.* ont défini une zone avec des atomes libres dans un rayon de 9 Å centré sur la région d'intérêt : la transformation alchimique d'un cation Ca^{2+} en Mg^{2+} . Ici, la transformation alchimique concerne plus d'atomes et on décide que tous les atomes et carbones α au-delà de respectivement 24 et 22 Å du site de l'oxygène de l'alcool (centre du site actif) seront maintenus fixes, permettant de conserver ainsi l'enzyme dans

une structure proche de la structure cristallographique, et d'améliorer la convergence des calculs. Environ 75 % de la protéine est totalement libre de mouvement.

Ce choix peut être validé par les observations de Pleiss *et al.* qui ont montré par modélisation moléculaire [75] que la structure de la lipase B de *Candida antarctica* durant des simulations dans l'eau et cinq différents solvants présentait une faible déviation par rapport à sa structure cristallographique. Par ailleurs, McCabe *et al.* [76] ont réalisé des mesures par dichroïsme circulaire à l'aide de radiation synchrotron pour étudier les changements conformationnels de l'enzyme dans l'eau et différents solvants organiques, ils notent que la structure de la CALB dans l'eau est proche de la structure cristallographique. Ces deux dernières études permettent de penser que la CALB ne présente pas de mouvement significatif de domaines et que les restrictions de mouvement de certains atomes éloignés du site actif sont acceptables.

La liaison hydrogène essentielle à la catalyse impliquée dans l'état de transition entre l'azote $N\epsilon$ de H224 et l'oxygène de l'alcool de l'intermédiaire tétraédrique est contrôlée afin d'éviter sa rupture durant les simulations à l'aide d'une contrainte sous forme d'un potentiel harmonique de $100 \text{ kcal.mol}^{-1}$, appliquée lorsque la distance r entre les atomes lourds excède 2.8 \AA :

$$E_{\text{Contrainte}} = 100 \times (r - 2,8)^2 \quad (5.11)$$

Sans cette contrainte, la liaison hydrogène est rompue durant la dynamique, comme nos essais préliminaires l'ont montré. Lorsque la rupture de cette liaison pour l'énantiomère S est constatée, on peut conclure que cet énantiomère a plus de difficulté à atteindre la configuration permettant la poursuite de la réaction. Mais dans le travail présenté ici, l'objectif est justement de maintenir le système aussi proche que possible de l'état de transition dans le but de comparer l'énergie libre au niveau de la barrière énergétique pour les deux énantiomères. On fait donc le choix de prévenir la rupture de la liaison hydrogène entre l'oxygène de l'alcool et H224- $N\epsilon$ durant les simulations, cela permet en outre de réduire l'espace conformationnel dans la région d'intérêt et d'augmenter la probabilité de faire converger le système.

D'un point de vue pratique, on minimise premièrement les molécules d'eau avec

10 000 itérations de l'algorithme du gradient conjugué puis 2 000 itérations de l'algorithme ABNR (Adopted Basis Newton-Raphson). Ensuite, le système entier est minimisé avec les mêmes paramètres, exceptés les atomes éloignés du site actif mentionnés précédemment qui demeurent fixes. L'étape de chauffe initiale dure 50 ps pour passer de 100 à 300 K.

Il est important que le système soit très bien équilibré, on s'en assure en réalisant de longues étapes d'équilibration initiale de respectivement 0,8 ns et 1 ns pour les calculs numéros 1 et 2, et de 1 ns pour le calcul numéro 3. La vitesse des atomes est contrôlée tous les 5 000 pas.

Une succession de dynamiques d'équilibration et de production à différents λ (voir plus bas) sont réalisées avec une durée de 25 ps pour l'équilibration et 50 ps pour la phase de production.

5.3.4 Le protocole de la perturbation de l'énergie libre

La méthode de FEP est utilisée depuis plusieurs décennies [77, 78, 79] et reste de nos jours un outil puissant. Cette méthode est basée sur la transformation progressive du système d'un état initial vers un état final. Au cours de ce processus, la variation d'énergie libre du système est mesurée.

Dans notre étude, pour passer de l'état initial à l'état final, on construit un système dans lequel existe de façon simultanée et distincte les chaînes latérales pour les alcools secondaires R et S et le carbone chiral (l'atome d'oxygène est commun pour les deux énantiomères), on parle de système à « double topologie », cette construction permet de réaliser la transformation alchimique de l'énantiomère R en S .

Le système est défini avec une énergie potentielle hybride $U(r, \lambda)$, qui est fonction de r , les coordonnées atomiques et λ , un coefficient échelonnant les interactions des alcools énantiomères R et S avec le reste du système.

Une des difficultés de la méthode de FEP est d'obtenir une bonne convergence des calculs [80]. On considère que le protocole FEP est fiable lorsque les énergies calculées pour la transformation (R vers S) et le chemin inverse donnent avec plus ou moins de précision la même valeur avec évidemment un signe opposé, ce qui est loin d'être évident. En pratique, obtenir la convergence des calculs de FEP est un défi dépendant de beaucoup

de paramètres. La méthode de FEP suppose que les espaces de phase des deux systèmes évalués soient suffisamment explorés, ce qui nécessite un temps de trajectoire significatif pour échantillonner l'énergie des deux systèmes (avec respectivement les énantiomères R et S).

Un coefficient égal à 1 est appliqué pour définir le niveau d'interaction de chaque partie du système avec elle-même. Le coefficient λ est initialement placé à 0,975 et 0,025 pour les interactions entre respectivement les alcools R et S et l'enzyme. Le λ initial n'est pas défini exactement à 1 et 0, mais un peu en-dessous (0,975) et un peu au-dessus (0,025) pour prévenir la libre dérive des chaînes latérales de l'alcool loin du site actif en l'absence d'interaction, ce qui risquerait de générer une perturbation de l'énergie trop importante lorsque λ est incrémenté au pas suivant.

Au cours de vingt ($n = 20$) dynamiques d'équilibration et de production successives, λ_n est incrémenté linéairement de 0,05.

Le choix de segmenter la transformation du système en vingt étapes permet de calculer des petites perturbations de l'énergie libre à chaque pas et d'augmenter la précision. Néanmoins, un nombre plus important de trajectoires ne serait pas plus efficace pour autant car avec les λ proches de 0, les interactions faibles entre les chaînes latérales de l'alcool et l'enzyme génèrent des comportements non réalistes, caractérisés par des mouvements amples, et pouvant conduire à des problèmes d'échantillonnage conformationnel.

La transformation se termine avec un λ égal à 0,025 pour l'énantiomère R et 0,975 pour l'énantiomère S . Ainsi, on réalise la transformation de R en S , suivie d'une étape de 100 ps d'équilibration puis on réalise la transformation inverse S en R , dans le but de tester la convergence du calcul.

Vingt sous-trajectoires sont obtenues pour la transformation de l'énantiomère R vers S et autant dans le sens inverse. Le trajet aller-retour est réalisé deux fois avec chaque substrat.

La dynamique moléculaire de la transformation de l'énantiomère R en S , suivie du chemin inverse prend environ 18 heures avec 24 processeurs Bi-Xéon parallélisés.

La perturbation de l'énergie à chaque étape est calculée en utilisant le module FREE de CHARMM et la méthode « wide sampling ». La trajectoire à λ_n est utilisée pour calculer $\Delta\Delta F$ de $\lambda_n - 0.025$ vers λ_n et de λ_n vers $\lambda_n + 0.025$. La perturbation d'énergie

totale ΔF au cours des n successives perturbations est calculée en utilisant la formule exponentielle [73] suivante :

$$\Delta F_{R \rightarrow S} = F_S - F_R = \sum_{i=0}^{n-1} -\beta^{-1} \ln \langle e^{-\beta \Delta U_{n \rightarrow n+1}} \rangle_n \quad (5.12)$$

où F_S et F_R représentent l'énergie libre (de Helmholtz) de l'enzyme avec respectivement les alcools R et S liés à l'enzyme, $\langle \rangle_n$ représente l'ensemble canonique moyenné calculé à la n^{ieme} dynamique de production de la transformation, et β la température inverse.

La somme des n successives $\Delta \Delta F$ calculée au cours de la transformation donne la différence d'énergie libre totale entre les complexes avec les énantiomères R et S . La valeur obtenue avec la somme des $\Delta \Delta F$ calculée lors de la transformation inverse (S vers R) doit donner rigoureusement la valeur opposée à la transformation de R vers S . Cette comparaison des résultats est un indicateur de la qualité de la convergence. Pour réaliser les calculs de FEP, le module BLOCK du programme CHARMM est utilisé.

5.4 Étude de l'effet d'empreinte

Dans le cadre de l'hypothèse sur l'effet d'empreinte, on cherche à évaluer l'effet des formes énantiomériques R et S du premier intermédiaire tétraédrique de la réaction sur la structure de l'enzyme, et plus précisément celle de son site actif.

5.4.1 Les trajectoires de dynamique moléculaire

On réalise donc une trajectoire de l'enzyme seul qui sert de référence, et une trajectoire de l'enzyme avec chaque énantiomère R et S de l'intermédiaire tétraédrique formé avec le propanoate de (\pm)-1-méthylpentyle.

Les dynamiques moléculaires sont réalisées dans une boîte d'eau avec des conditions périodiques aux limites et la méthode Particle-Mesh Ewald pour calculer les énergies d'interaction (on définit une grille avec un maillage de 1 Å). La taille de la boîte (x y z) en Å est d'environ (83 78 83), ce qui correspond à une marge de 15 Å entre l'enzyme et le bord de la boîte.

On se place en condition isotherme-isobare (NTP) avec $T = 300$ K, et à pression atmosphérique ($1 \text{ atm} = 1,01325 \text{ bar}$). La pression est contrôlée par un ajustement isotropique des trois dimensions de la boîte, définissant son volume. Le pas d'intégration est de 2 fs, conséquemment, l'eau et les liaisons hydrogène-atomes sont maintenues rigides. L'évaluation des paramètres électrostatiques est réalisée un pas sur deux. Les molécules qui « traversent » les conditions périodiques de la boîte sont translatées au point opposé de la boîte.

On débute par une minimisation de l'eau seule avec 5 000 itérations de l'algorithme du gradient conjugué (enzyme fixe), puis une minimisation du système complet avec 10 000 itérations du même algorithme. L'étape de chauffe est réalisée en montant la température du système de 50 à 300 K en 600 ps en incrémentant la température de 1 K tous les 4 ps avec une contrainte harmonique de 5 kcal.mol^{-1} sur tous les atomes de l'enzyme. On réalise une libération progressive de l'enzyme au cours de l'étape d'équilibration, en commençant par 200 ps avec une contrainte harmonique de 5 kcal.mol^{-1} , puis 200 ps avec une contrainte harmonique de 3 kcal.mol^{-1} , 200 ps avec une contrainte de $0,5 \text{ kcal.mol}^{-1}$, 200 ps avec une contrainte de $0,1 \text{ kcal.mol}^{-1}$, et enfin 1 ns sans contrainte harmonique sur l'enzyme. L'étape de production dure 20 ns.

5.4.2 L'étape de « clustering »

On calcule la matrice des RMSD du squelette peptidique de toutes les structures⁶ de la phase de production de 20 ns. Une structure est échantillonnée tous les 10 ps, soit un total de 2 000 structures disponibles pour l'analyse. Il s'agit d'une matrice symétrique donc les valeurs sur la diagonales sont égales à zéro. Le maillage temporel de 10 ps est suffisamment faible pour correctement échantillonner toutes les structures de la trajectoire.

$$M_{2000,2000} = \begin{pmatrix} RMSD_{1,1} & RMSD_{1,2} & \cdots & RMSD_{1,2000} \\ RMSD_{2,1} & RMSD_{2,2} & \cdots & RMSD_{2,2000} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ RMSD_{2000,1} & RMSD_{2000,2} & \cdots & RMSD_{2000,2000} \end{pmatrix}$$

⁶À l'aide du script `rmsd_matrix.tcl` disponible sur le site du programme VMD.

Puis, on utilise le programme de statistique R [81] pour le traitement des données et la classification des structures des trajectoires. On parle bien ici de méthode de classification, traduction du « clustering » en anglais, et non de méthode de classement qui se nomme « classification » en anglais car on ne connaît pas *a priori* le nombre de « clusters ». Le module Hclust permet de mettre en œuvre une méthode de classification ascendante hiérarchique (Lance & Williams, 1967 [82]). Celle-ci consiste à regrouper les n éléments (ici 2000 structures échantillonnées sur la phase de production) définissant initialement n groupes, de façon itérative en rassemblant les deux groupes les plus proches en sous-ensembles jusqu'à l'obtention d'un ensemble unique. Il existe différentes méthodes pour mesurer la distance entre deux groupes. On utilise ici la méthode de Ward [83], disponible dans le module Hclust du programme R. C'est la méthode la plus courante et la plus performante d'après Griffiths *et al.* [84]. Cette méthode consiste à choisir le regroupement de clusters qui induit la plus faible augmentation de la variance intraclasse.

5.4.3 L'étude des structures extraites du « clustering »

La plupart des études portent sur l'alignement des structures et la comparaison du RMSD de différents sous-ensembles d'atomes. Les autres analyses concernent l'étude de rotamères, le programme VMD est utilisé pour cela.

5.5 Étude de différentes CALB ayant subi des mutations au niveau de la poche stéréospécifique

Pour étudier la poche stéréospécifique de la CALB sauvage et les variants présentant des mutations de cette poche (T42V, S47A, et T42V/S47A), on réalise des simulations de dynamique moléculaire afin d'obtenir un échantillonnage statistique des conformations adoptées par l'enzyme dans la région d'intérêt.

5.5.1 La dynamique moléculaire

On réalise quatre trajectoires de dynamique moléculaire : l'enzyme seul, et les trois variants T42V, S47A, et T42V/S47A.

Les dynamiques sont réalisées dans une boîte d'eau, avec des conditions périodiques aux limites, et la méthode Particle-Mesh Ewald pour calculer les énergies d'interaction (on définit une grille avec une maille d'environ 1 Å). La boîte d'eau est un cube dont les côtés font environ 80 Å de longueur. La marge est d'environ 15 Å entre l'enzyme et le bord de la boîte.

On se place en condition isotherme-isobare (NPT) avec $T = 300$ K et à pression atmosphérique (1 atm = 1,013 25 bar). La pression est contrôlée par un ajustement isotropique des trois dimensions de la boîte définissant son volume. Le pas d'intégration est de 2 fs, et les liaisons hydrogène-atome sont maintenues rigides.

Les interactions non-liantes et les étapes de chauffe, d'équilibration et de production sont gérées de la même façon que pour les trajectoires de dynamique moléculaire réalisées dans le cadre de l'étude de l'effet d'empreinte. L'étape de production dure 10 ns.

La dynamique moléculaire est ré-échantillonnée de façon à conserver 100 prises de vue de la trajectoire, soit une toutes les 100 picosecondes sur la trajectoire de 10 ns, pour l'analyse des résultats.

5.5.2 L'étude du volume de la poche stéréospécifique

Un système de sonde parcourant l'espace tridimensionnel faisant appel à la fonction « COORdinates SEARch » du programme CHARMM est utilisé pour évaluer l'espace libre dans la poche stéréospécifique. Cette commande reçoit différentes instructions concernant la position spatiale de la zone à explorer, la taille du maillage, et la sélection d'atomes à retenir. Dans notre cas, on sélectionne les atomes de la protéine, tandis que l'eau est supprimée afin de sonder spécifiquement l'espace que la sonde peut occuper dans la poche stéréospécifique. L'effet de l'ajustement de ces différentes variables est discuté dans la partie Résultats.

5.5.3 L'étude des liaisons hydrogène

On observe l'établissement de liaisons hydrogène entre les résidus et les molécules d'eau. Pour cela, l'utilitaire de mesure des liaisons hydrogène disponible dans les extensions du programme VMD est utilisée, cette fonction permet de comptabiliser et d'iden-

tifier les liaisons hydrogène entre deux groupes d'atomes, et de préciser les valeurs des critères d'acceptation de la liaison que sont l'angle (défini avec le donneur d'hydrogène, l'hydrogène et l'accepteur) et la distance (définie entre le donneur et l'accepteur d'hydrogène). Le choix des critères utilisés dans notre étude pour comptabiliser les liaisons est discuté dans la partie Résultats.

Quatrième partie

Résultats

Chapitre 6

Étude préliminaire de l'enzyme

L'étude préliminaire de la CALB comporte le calcul du pK_a des groupes ionisables, une trajectoire de l'enzyme seul, ainsi qu'une analyse systématique des conformères pour l'orientation du substrat de l'intermédiaire tétraédrique formé avec le pentan-2-ol dans le site actif. Cette dernière étude permet de valider les choix d'orientation des substrats pour l'étude FEP présentée dans le chapitre suivant.

6.1 Le pK_a des résidus de la CALB

Les protéines possèdent des groupes ionisables jouant un rôle important dans la structuration de l'enzyme et sa stabilité à différents pH. Le pK_a des groupes ionisables des acides aminés au sein de la protéine est affecté par l'environnement chimique proche du groupement (effet de charge, dipôle) ainsi que les effets de désolvatation.

Plusieurs programmes permettent d'évaluer le pK_a des groupements ionisables à partir des équations de Poisson-Boltzmann. Il est aussi possible de calculer la valeur d'un pK_a par dynamique moléculaire en évaluant la différence d'énergie libre entre les états protonés et déprotonés du système par des méthodes telles que la FEP.

Ici, une étude du pK_a des acides aminés de la CALB est réalisée à partir de la structure 1TCA (PDB) avec le modèle de prédiction empirique développé par Li *et al.* [85]. Dans ce modèle, le pK_a d'un groupe ionisable est défini à partir d'un pK_a de référence pK_{Model} (*cf.* tableau 6.1) auquel une perturbation ΔpK_a dépendant de l'environnement du résidu est calculée :

$$pK_a = pK_{Model} + \Delta pK_a \quad (6.1)$$

La perturbation ΔpK_a appliquée résulte de la contribution pondérée des effets de liaisons hydrogène, des effets de désolvation et des effets de charge. L'effet de liaisons hydrogène dépend de la distance et de l'angle de cette liaison. Un résidu est considéré comme enfoui lorsque plus de 400 atomes lourds sont présents dans un rayon de 15,5 Å autour du groupe ionisable.

L'algorithme de Propka, dont le principe est décrit ci-dessus, permet de réaliser la prédiction de pk_a pour une protéine en quelques secondes. Les pk_a des groupes ionisables de la CALB prédits sont présentés dans le tableau 6.1. La charge globale de la protéine en fonction du pH est présenté sur la figure 6.1.

On observe que le pK_a prédit du résidu D134 (7,90) est éloigné de son pK_{Model} (3,80). Cela suggère que ce résidu situé près du site actif est majoritairement protoné à pH 7. Dans une moindre mesure, le résidu Q294 présente également une valeur critique, le pK_a prédit est de 6,92 et son pK_{Model} de 4,50. À un pH proche de 7 (6,92), le résidu serait donc en proportion à peu près équivalente sous deux états de protonation.

Ces précieuses indications permettent de définir un état de protonation adéquat de l'enzyme dans les simulations de dynamique moléculaire. En l'occurrence, le résidu D134 devrait être protoné.

TAB. 6.1 – Valeurs de pK_a obtenues avec Propka (Li *et al.*, 2005)

Résidus	pK_a	pK_{Model}
ASP 6	3.37	3.80
ASP 17	2.59	3.80
ASP 49	4.97	3.80
ASP 75	4.81	3.80
ASP 126	3.24	3.80
ASP 134	7.90	3.80
ASP 145	4.91	3.80
ASP 187	3.55	3.80
ASP 200	2.92	3.80
ASP 223	3.69	3.80
ASP 252	2.56	3.80
ASP 257	3.74	3.80
ASP 265	4.07	3.80
ASP 296	1.92	3.80
GLU 81	5.05	4.50
GLU 188	4.75	4.50
GLU 269	4.60	4.50
GLU 294	6.92	4.50
C-term 317	3.31	3.20
HIS 224	6.92	6.50
TYR 61	11.07	10.00
TYR 82	11.18	10.00
TYR 91	10.12	10.00
TYR 135	13.93	10.00
TYR 183	13.94	10.00
TYR 203	10.46	10.00
TYR 234	10.94	10.00
TYR 253	10.51	10.00
TYR 300	13.04	10.00
LYS 13	10.98	10.50
LYS 32	9.87	10.50
LYS 98	10.46	10.50
LYS 124	10.19	10.50
LYS 136	8.73	10.50
LYS 208	10.60	10.50
LYS 271	10.20	10.50
LYS 290	10.05	10.50
LYS 308	10.05	10.50
ARG 122	11.52	12.50
ARG 127	12.78	12.50
ARG 168	12.09	12.50
ARG 238	12.83	12.50
ARG 242	12.45	12.50
ARG 249	13.10	12.50
ARG 302	12.39	12.50
ARG 309	12.36	12.50
N-term 1	7.64	8.00

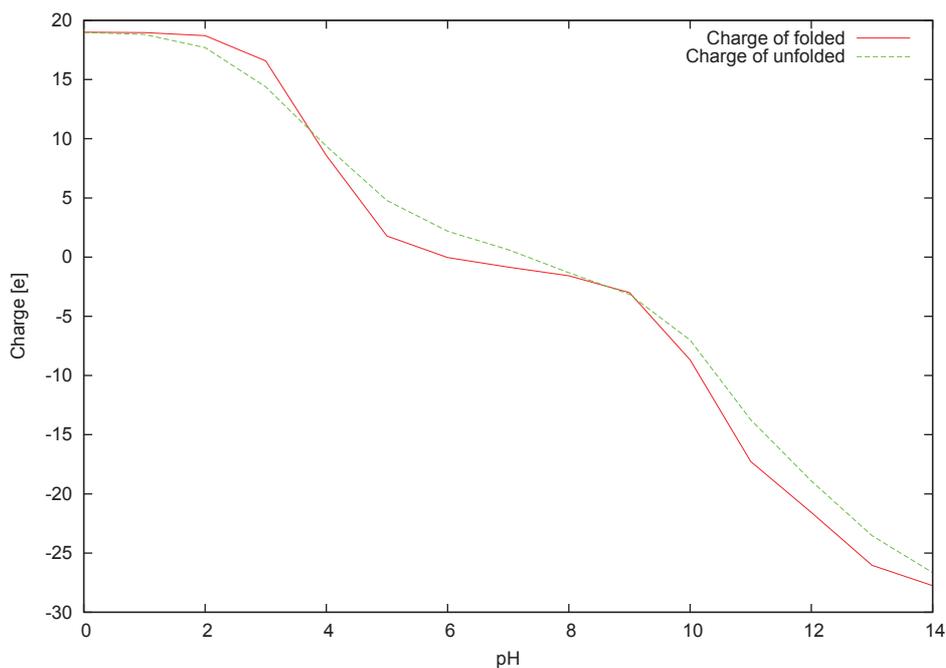


FIG. 6.1 – Charge globale de la CALB en fonction du pH, définie à partir des pK_a calculés par le modèle Propka (Li *et al.*, 2005).

6.2 Dynamique moléculaire de l'enzyme seul avec le modèle EEF1

On réalise une trajectoire de la CALB seule de 17 ns avec le modèle de solvation EEF1 et le champ de force Charmm19. L'ensemble des détails techniques de la dynamique sont présentés dans la partie Matériel et Méthodes.

La température du système est bien maintenue à 300 K et l'énergie cinétique est stable au cours de la trajectoire.

En revanche, on observe que l'énergie potentielle et conséquemment l'énergie totale du système diminuent au cours de la trajectoire (figures 6.2 et 6.3).

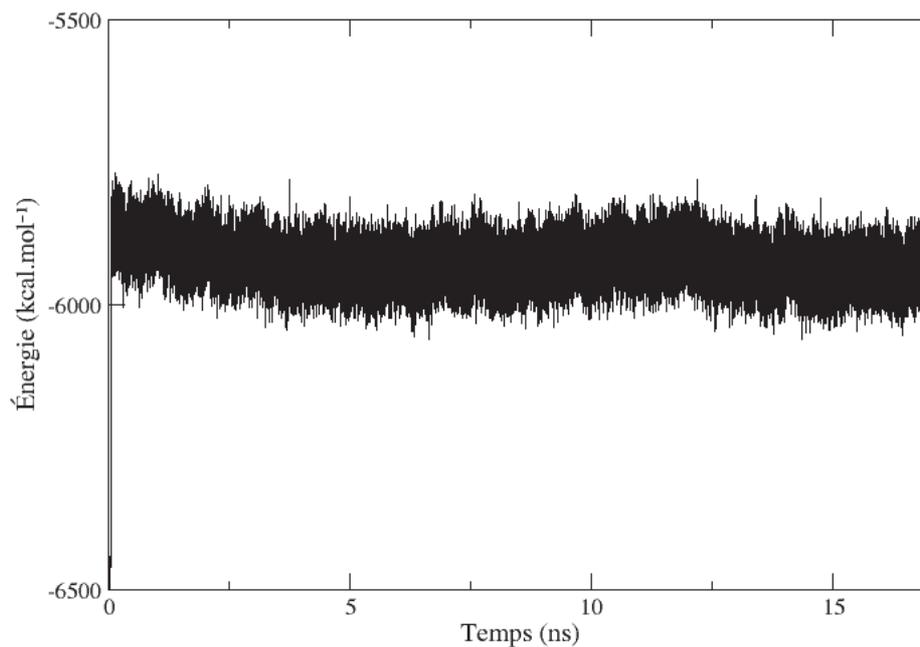


FIG. 6.2 – Énergie potentielle au cours de la trajectoire de l'enzyme seul avec le modèle de solvation EEF1.

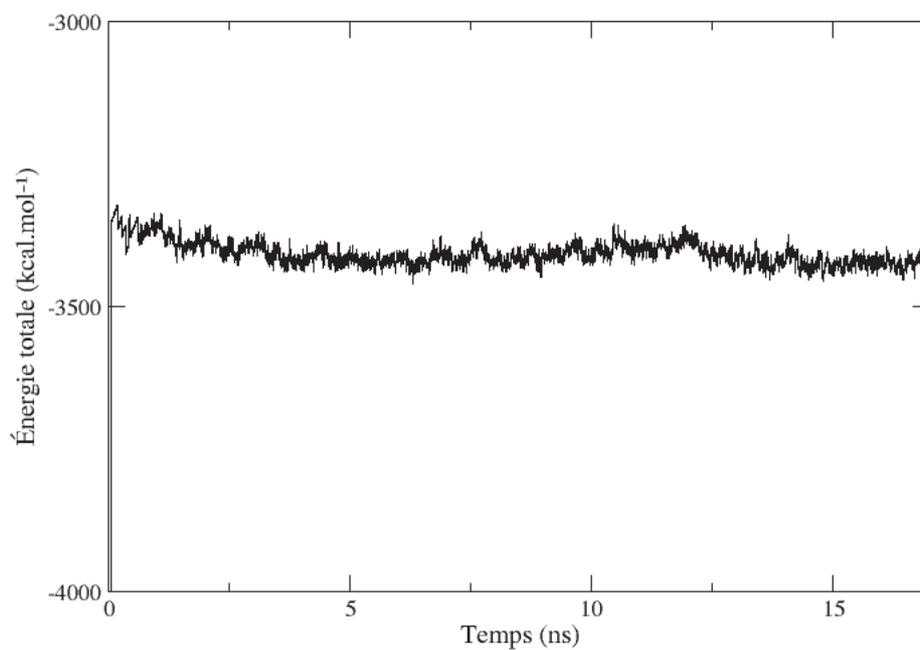


FIG. 6.3 – Énergie totale au cours de la trajectoire de l'enzyme seul avec le modèle de solvation EEF1.

L'énergie libre de solvation propre au modèle EEF1 a également tendance à diminuer (figure 6.4).

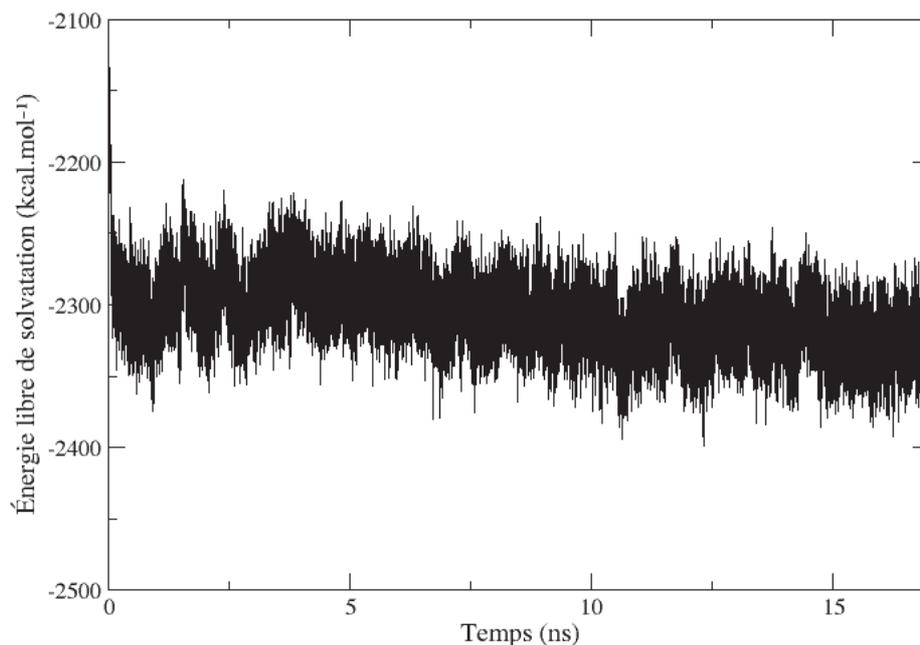


FIG. 6.4 – Énergie libre de solvation au cours de la trajectoire de l'enzyme seul avec le modèle de solvation EEF1.

Le RMSD des carbones α de la trajectoire de la CALB seule avec le modèle de solvation EEF1 est présenté figure 6.5. Le RMSD semble former un plateau entre 1 et 4 ns, mais on observe ensuite que la structure continue à dévier de sa conformation initiale. Ceci caractérise la déstructuration de plusieurs éléments tels que le dépliement progressif de l'hélice $\alpha 3$ à partir de son extrémité N-terminale, comme le montre les figures 6.6 et 6.7 représentant la structure de la CALB au début et à la fin de la trajectoire.

Le rayon de giration présenté figure 6.8 illustre la déstructuration progressive de la structure de la CALB au cours de la trajectoire de dynamique moléculaire, cohérente avec l'observation visuelle de l'altération des motifs structuraux et en particulier le dépliement de l'hélice $\alpha 3$.

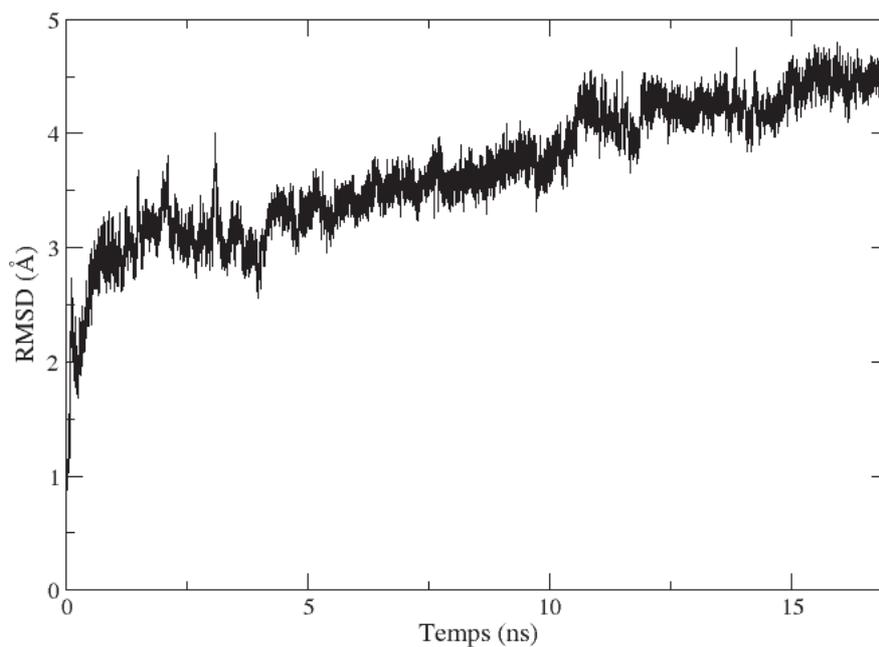


FIG. 6.5 – RMSD (en Å) des carbones α de la trajectoire de la CALB seule avec le modèle de solvationation EEF1.

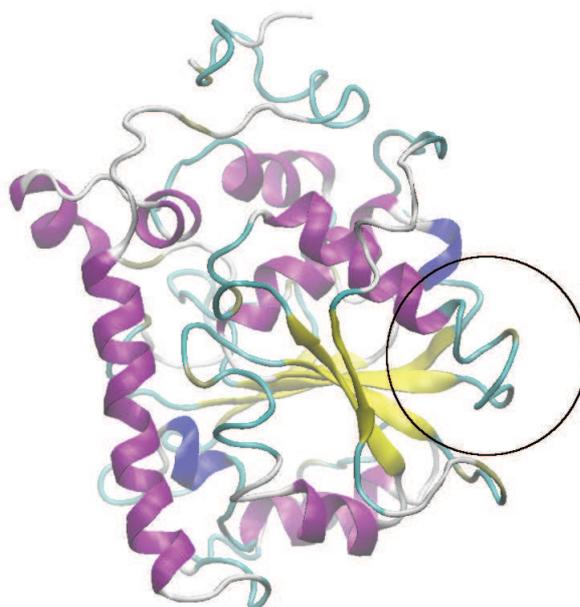


FIG. 6.6 – Représentation de la CALB au début de la trajectoire avec le modèle EEF1. Le feuillet β est en jaune, les hélices α en violet, les hélices $\alpha_{3_{10}}$ en bleu, et les motifs « turn » en cyan. La région N-terminale de l'hélice α_3 est représentée dans le cercle noir.

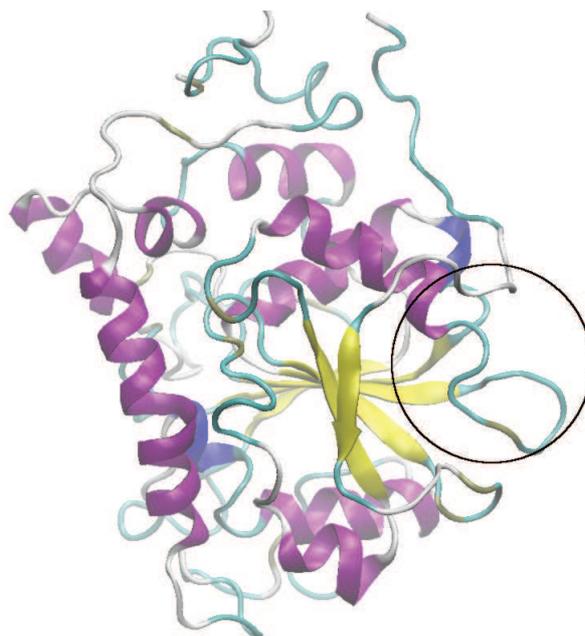


FIG. 6.7 – Représentation de la CALB à la fin (17 ns) de la trajectoire avec le modèle EEF1. Le feuillet β est en jaune, les hélices α en violet, les hélices α_{310} en bleu, et les motifs « turn » en cyan. La région N-terminale de l'hélice α_3 est représentée dans le cercle noir.

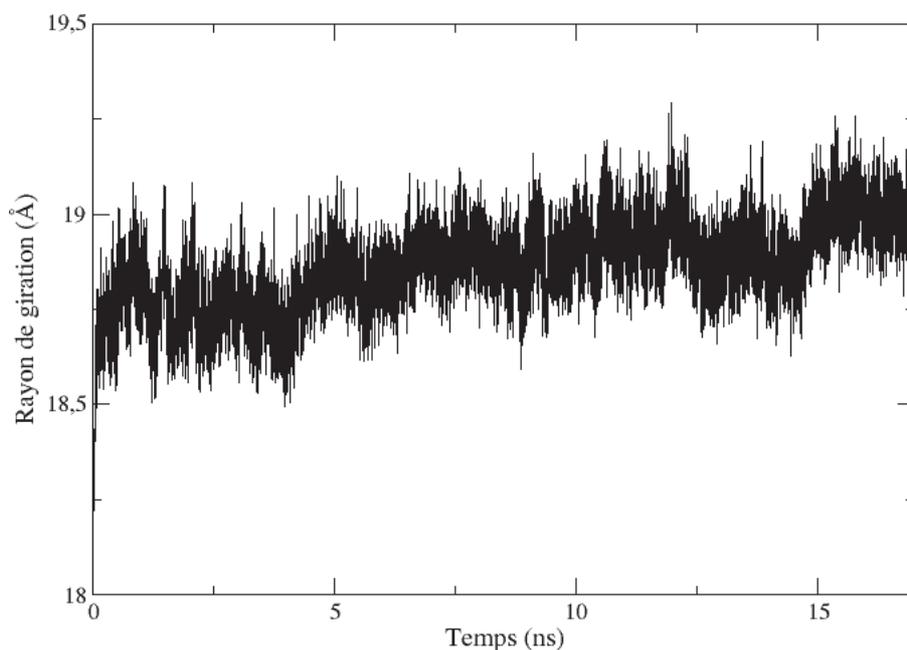


FIG. 6.8 – Rayon de giration (en Å) des carbones α de la trajectoire de la CALB seule avec le modèle de solvatation EEF1.

Le RMSF¹ permet de calculer la fluctuation de la position d'un atome, selon la formule

¹RMSF = Root Mean Square Fluctuation.

suivante :

$$RMSF_i = \langle \Delta r_i^2 \rangle^{1/2} = \left(\frac{1}{M} \sum_{i=1}^M (\vec{r}_i(t_k) - \langle \vec{r}_i \rangle)^2 \right)^{1/2} \quad (6.2)$$

où le terme \vec{r}_i représente la position de l'atome i à différent temps t_k .

La figure 6.9 présente la fluctuation (RMSF) des carbones α des 317 acides aminés de la CALB dans la trajectoire avec le modèle de solvation EEF1, ainsi que les facteurs B de la structure cristallographique 1TCA. La superposition des deux tracés met en évidence des zones communes de mobilité. Le début de la séquence est peu structuré et très mobile (résidus 1 à 20).

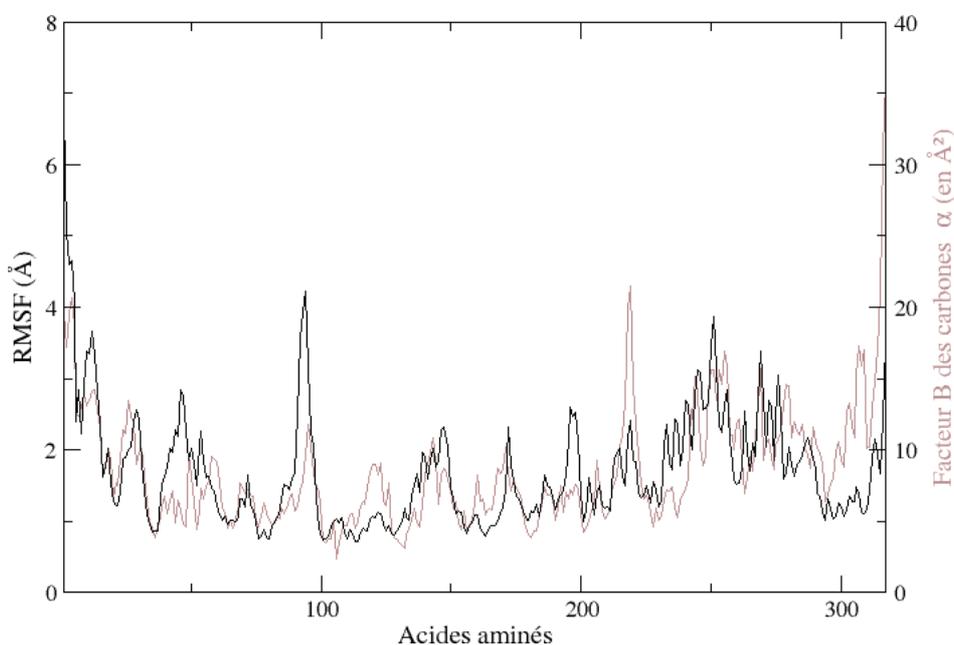


FIG. 6.9 – RMSF du squelette peptidique (en Å) des 317 acides aminés de la CALB dans la trajectoire avec le modèle de solvation EEF1 (en noir). Facteurs B de la structure cristallographique (code PDB : 1TCA) de la CALB (en brun rosé).

Lorsque l'on regarde les 100 premiers résidus, les zones les moins fluctuantes sont celles correspondant au feuillet β (20-22, 33-38, 62-66). L'hélice α_3 (76-94) est relativement peu mobile, sauf vers les résidus 91-94 et le motif « turn » adjacent (95-98) qui sont très fluctuants.

Les constatations sont similaires pour les 100 acides aminés suivant (101-200). Le brin β_4 (99-105) est peu flexible. La zone des acides aminés 135 à 151 est flexible. Elle comporte un motif « turn », puis l'hélice α_5 et un motif « coil ». La zone des acides aminés 155-170

est peu flexible. Elle comporte un motif « turn », puis l'hélice $\alpha 7$. La zone des acides aminés 185-200 comporte un motif « turn » puis un « coil » relativement mobiles.

Dans la zone qui s'étend entre le résidu 225 et 290, on remarque que la mobilité moyenne est plus importante que sur le reste de la structure. Cela s'explique par le fait que le feuillet β se termine dans cette partie de la séquence. La flexibilité est faible pour les résidus 293 à 310, cette faible mobilité n'est pas retrouvée dans la structure cristallographique.

Lorsque l'on observe plus particulièrement l'évolution de la structure du site actif au cours de la dynamique moléculaire, on observe une altération importante de ce dernier peu de temps après la onzième nanoseconde. Parmi les éléments importants pour la structuration du site actif, il y a la liaison hydrogène qui s'établit entre l'oxygène (OD1) du groupe carboxyle de l'aspartate 167 et l'azote (ND1) l'histidine 224. C'est un élément essentiel de la triade catalytique. Comme le montre la figure 6.10, la distance entre l'oxygène (OD1) du groupe carboxyle de l'aspartate 167 et l'azote (ND1) l'histidine 224 devient trop importante pour permettre le partage d'un proton qui stabilise l'histidine sous sa forme doublement protonée au cours du mécanisme de catalyse de la réaction.

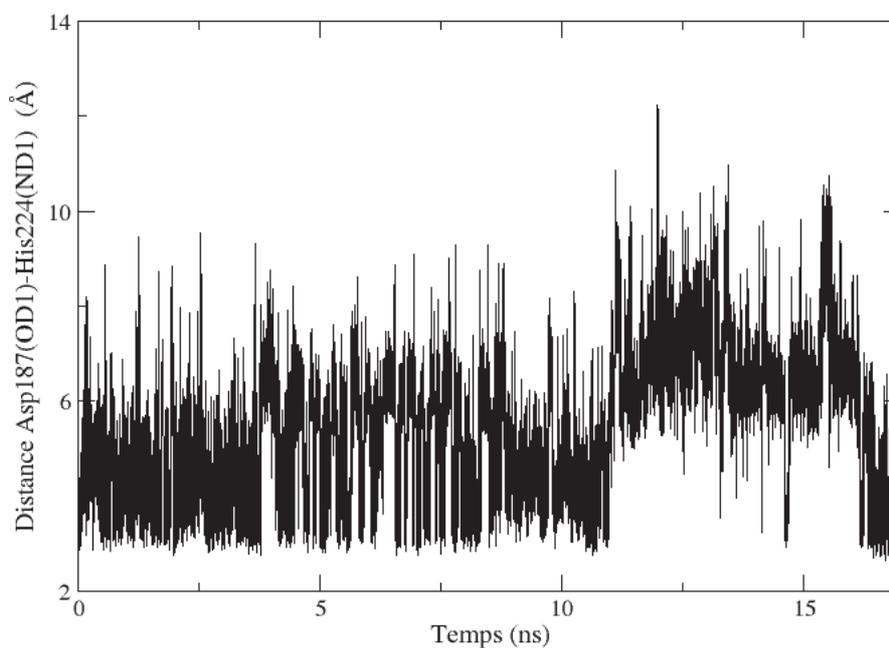


FIG. 6.10 – Distance D187(OD1)-H224(ND1) au cours de la trajectoire de la CALB seule avec le modèle de solvatation EEF1.

Une autre altération importante du site actif concerne l'orientation du tryptophane 104. On observe que peu de temps après la onzième nanoseconde, le « plancher » formé par la chaîne latérale de ce résidu bascule. Ceci est illustré par la figure 6.11, qui présente l'angle dièdre formé avec les atomes CG-CB-CA-C, définissant l'orientation de toute la chaîne latérale. La basculement de la chaîne latérale du tryptophane 104 entrave l'espace accueillant les substrats dans la poche stéréospécifique.

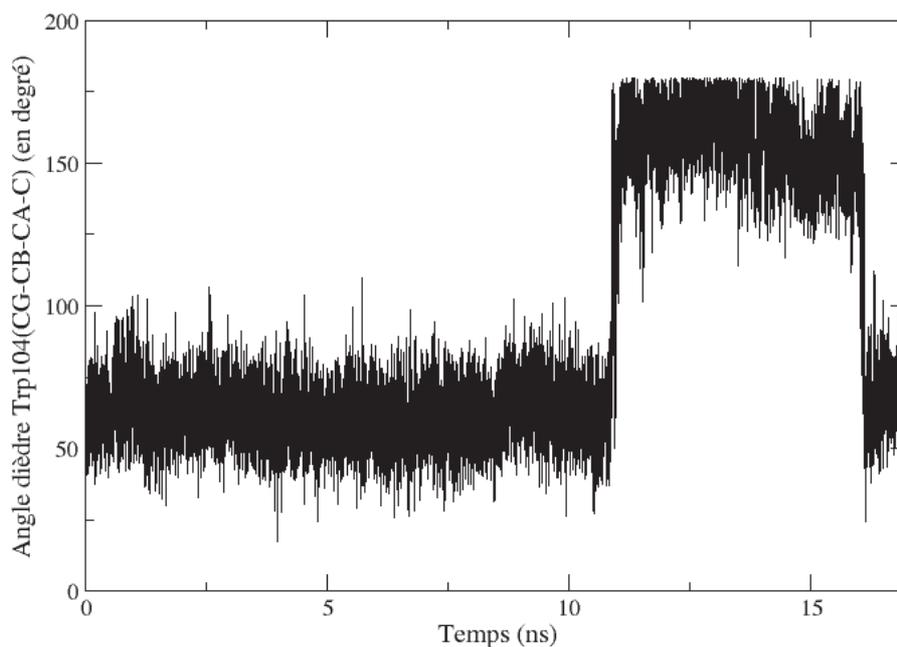


FIG. 6.11 – Angle dièdre W104(CG-CB-CA-C) au cours de la trajectoire de la CALB seule avec le modèle de solvation EEF1.

Pour cette étude préliminaire de l'enzyme seul en dynamique moléculaire, nous avons porté notre choix sur le modèle EEF1, dont la fiabilité avait été éprouvée dans plusieurs études [71, 72], afin de pouvoir obtenir des trajectoires d'une durée relative importante (17 ns), avec des moyens en puissance de calcul limités grâce à l'emploi d'un solvant implicite et d'un champ de force « atomes polaires ». Néanmoins, les résultats que nous avons obtenu, tels que le dépliement progressif de l'hélice $\alpha 3$, l'augmentation ininterrompue du RMSD et du rayon de giration et l'altération du site actif, suggèrent que le modèle de solvation EEF1 ne semble pas adapté au traitement de la CALB.

Pour tous les travaux qui suivent, nous avons donc décidé d'utiliser un modèle de champ de force beaucoup plus classique : Charmm22. C'est un modèle « tout atome ».

De plus, les paramètres du champ de force pour modéliser certaines structures chimiques telles que l'intermédiaire tétraédrique sont disponibles dans la littérature et adaptés spécifiquement à ce champ de force.

6.3 Étude systématique de tous les conformères possibles au niveau de l'intermédiaire tétraédrique formé avec le pentan-2-ol

On réalise une étude systématique de tous les conformères possibles concernant l'orientation des chaînes latérales de la partie alcool de l'intermédiaire tétraédrique formé avec le pentan-2-ol. Le but de ce travail est de déterminer quelle est l'orientation du substrat la plus propice lors de la catalyse de la réaction pour les deux formes énantiomériques du pentan-2-ol. Enfin, on compare dans un second temps l'énergie potentielle associée à ces orientations entre les énantiomères *R* et *S*.

La structure cristallographique de la CALB (code PDB : 1TCA) obtenue par Uppenberg et al. [8] est utilisée. On retire l'eau cristallographique. Le système est modélisé *in vacuum*.

Pour modéliser l'intermédiaire tétraédrique, on utilise les paramètres fonctionnant avec le champ de force « tout-atome » Charmm22 obtenus par Otte *et al.* [29].

Toutes les combinaisons de conformères possibles sont générées par incrémentation de 120 degrés des trois angles dièdres (α , β et γ) de la partie « alcool » de l'intermédiaire tétraédrique (*cf.* figure 6.12). On obtient donc 27 structures pour l'alcool.

On cherche à étudier l'adaptation de l'enzyme à tous les conformères. Dans cette optique, le protocole comporte plusieurs étapes. On minimise d'abord le conformère avec l'intermédiaire tétraédrique seul dans le vide. Ensuite, tous les atomes de l'intermédiaire tétraédrique sont fixés (parties « tétraèdre » et « alcool »), et l'on réalise une minimisation de l'enzyme (10 000 itérations de l'algorithme de la plus grande pente puis 5 000 itérations de l'algorithme basé sur Newton-Raphson). On mesure l'énergie du système des 27 structures après minimisation. On compare également le RMSD des structures générées avec la structure cristallographique. On regarde le rayon de giration des structures minimisées.

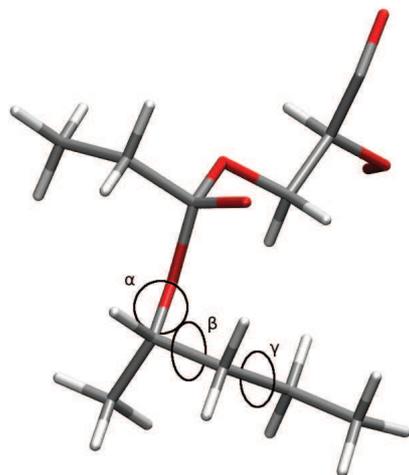


FIG. 6.12 – Angles dièdres de la partie « alcool » de l’intermédiaire tétraédrique, arbitrairement nommés α , β et γ qui sont incrémentés dans l’étude systématique des conformères.

Enfin, on vérifie la stabilité des liaisons hydrogène.

6.3.1 Énergie des 27 conformères pour la forme chirale S

L’énergie totale des 27 conformères pour la forme chirale S du pentan-2 est présentée dans le tableau 6.2 et la figure 6.13.

On voit que l’angle α n’explore pas des valeurs d’angles incrémentées exactement de 120 degrés (tableau 6.2 et figure 6.14). Le générateur de conformères incrémente strictement les angles de 120 degrés, mais lors de la minimisation de l’intermédiaire tétraédrique seul, il y a une légère déviation de l’angle α , ainsi que de l’angle dièdre adjacent (non mesuré ici) défini avec l’oxygène et le carbone central de l’intermédiaire.

Toutes les valeurs d’angles sont définies en valeurs positives pour une meilleure lisibilité sur la figure 6.14.

L’angle α est celui qui a le plus d’impact sur l’orientation globale de l’alcool dans le site actif. On voit que les conformères avec des valeurs d’angles proches de 295 degrés (équivalent à -65 degrés dans la tableau 6.13) semblent plus intéressants énergétiquement (conformères 19-27).

Le conformère numéro 2 est le plus intéressant énergétiquement, c’est un cas isolé parmi les conformères avec un angle α similaire. Sa chaîne latérale longue est orientée dans la poche stéréospécifique (figure 6.15).

TAB. 6.2 – Énergie totale (en kcal.mol⁻¹) du système minimisé pour le (*S*)-pentan-2-ol en fonction des angles dièdres (en degrés).

Conformère	Angle α	Angle β	Angle γ	Énergie
1	134, 19	-68, 06	90, 86	-4376,44
2	135, 00	-63, 03	-62, 81	-4382,09
3	134, 08	-65, 81	-176, 77	-4375,13
4	106, 79	-176, 26	66, 22	-4376,83
5	102, 09	-153, 48	-69, 35	-4376,87
6	112, 14	-175, 01	178, 29	-4373,06
7	132, 58	49, 38	69, 24	-4370,85
8	135, 24	61, 24	-91, 94	-4371,32
9	135, 42	61, 59	177, 01	-4366,88
10	93, 02	-70, 01	91, 71	-4366,14
11	94, 02	-67, 10	-64, 29	-4358,72
12	93, 18	-67, 88	-176, 77	-4359,65
13	81, 59	-172, 6	71, 70	-4363,28
14	83, 78	-169, 66	-78, 41	-4347,12
15	83, 65	-176, 19	179, 94	-4363,58
16	92, 05	51,535	69, 48	-4359, 4
17	91, 67	61, 11	-92, 77	-4367,55
18	92, 05	62, 24	177, 79	-4367,55
19	-71, 15	-70, 54	89, 66	-4373,98
20	-71, 09	-64, 80	-64, 98	-4381,17
21	-71, 25	-66, 89	-177, 00	-4379,55
22	-65, 66	-168, 82	69, 25	-4381, 6
23	-65, 66	-168, 82	69, 25	-4381, 8
24	-65, 95	-167, 26	-179, 27	-4380,73
25	-66, 50	36, 20	177, 80	-4379,93
26	-66, 38	36, 94	-90, 92	-4368,21
27	-66, 50	36, 20	177, 90	-4370,33

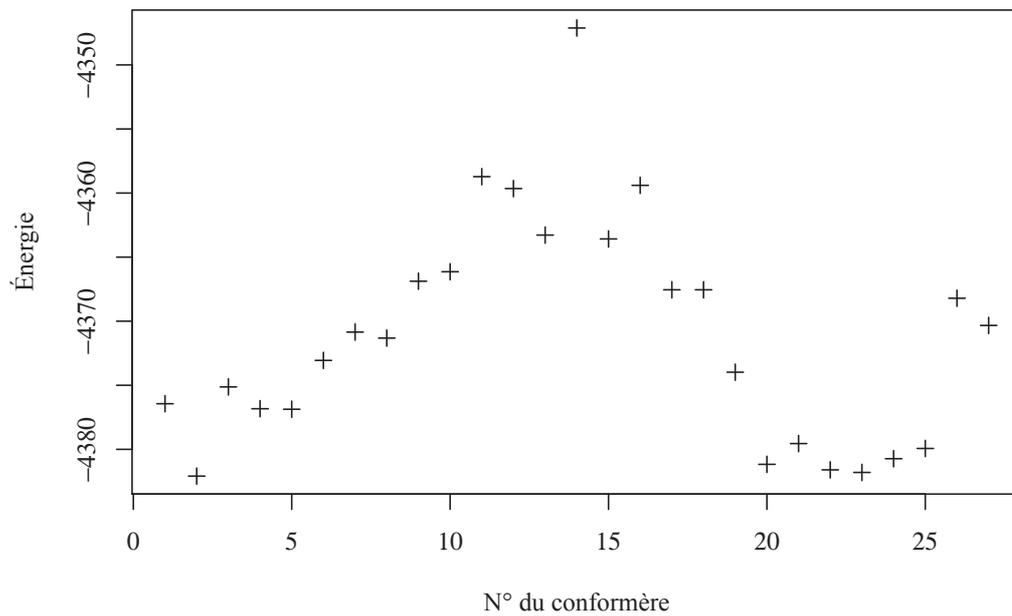


FIG. 6.13 – Énergie (en kcal.mol⁻¹) des 27 conformères pour le (*S*)-pentan-2-ol.

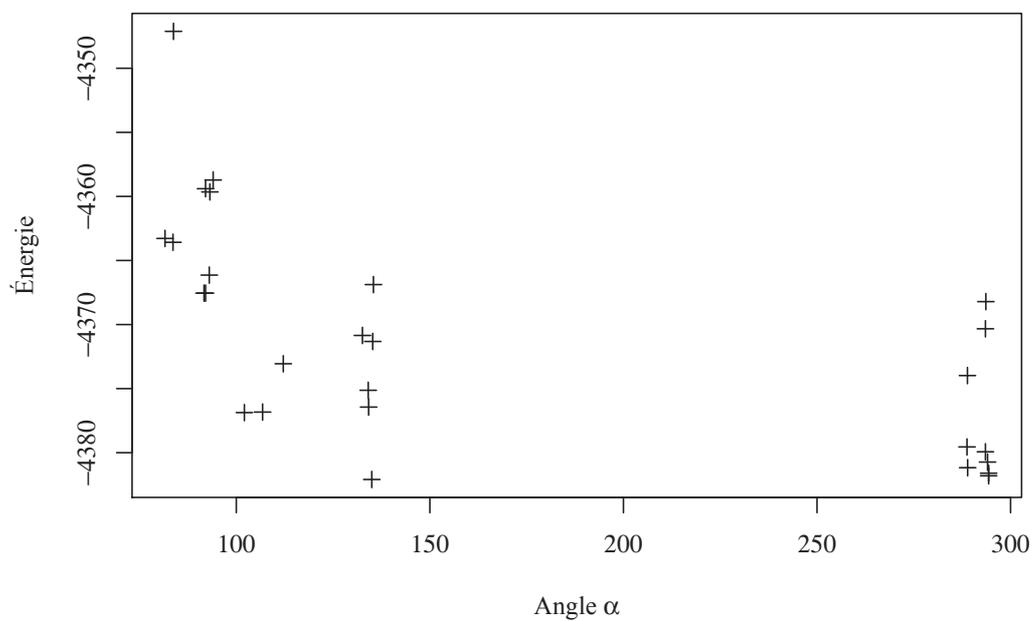


FIG. 6.14 – Énergie (en kcal.mol⁻¹) du système minimisé pour le (*S*)-pentan-2-ol en fonction de l'angle dièdre α .

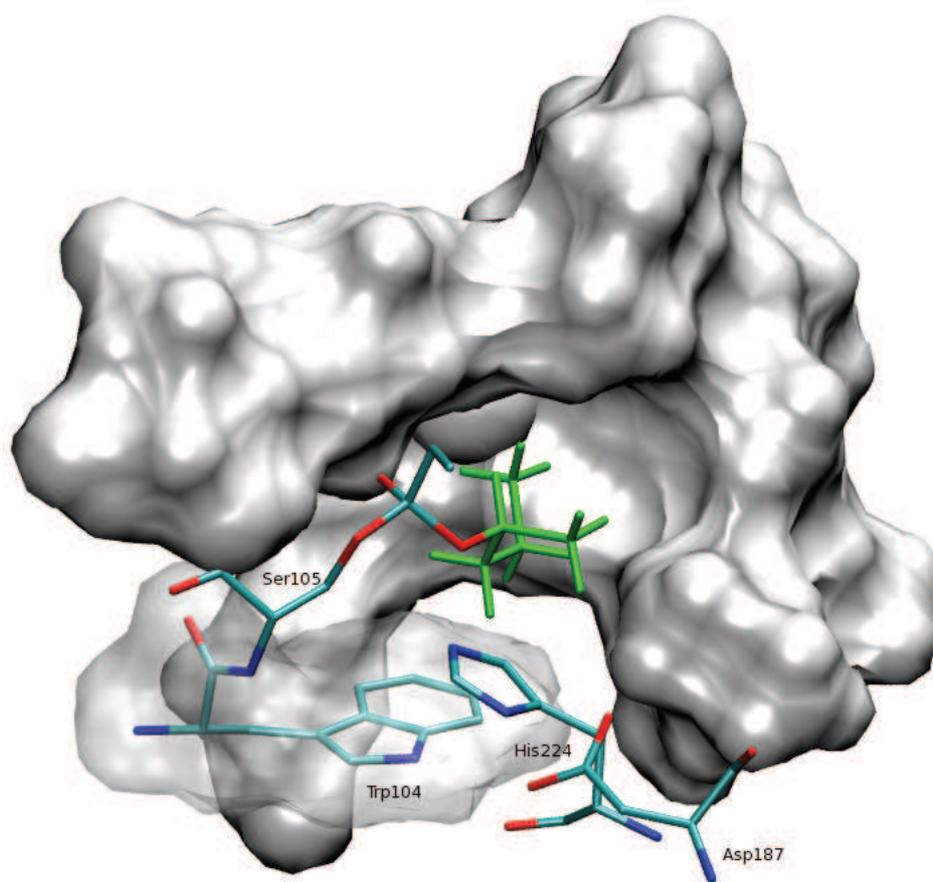


FIG. 6.15 – Conformère numéro 2 avec (*S*)-pentan-2-ol.

Concernant l'angle β , son impact sur l'énergie dépend fortement de l'angle α . Si l'on revient sur le tableau 6.2, parmi les conformères avec l'angle α proche de -65 degrés, l'angle β le plus intéressant énergétiquement est celui vers -168 degrés (conformères numéro 22, 23 et 24, les trois énergies sont inférieures à -4380 kcal.mol $^{-1}$). Le conformère numéro 23 a la meilleure énergie.

L'angle γ n'agit que sur l'orientation d'un groupement méthyle, son influence est limitée au regard de l'influence des deux autres angles.

Si l'on regarde l'orientation du substrat numéro 23 (figure 6.16), on retrouve l'orientation de la chaîne longue de *S* en dehors de la poche stéréospécifique.

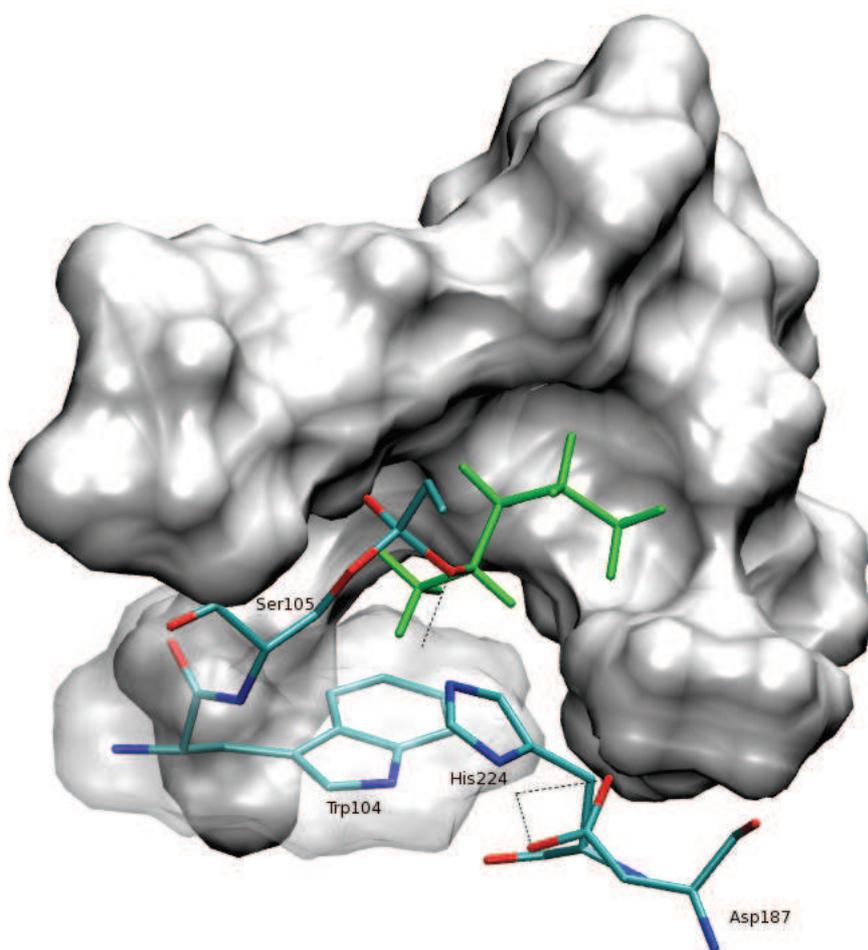


FIG. 6.16 – Conformère 23 avec le (*S*)-pentan-2-ol.

6.3.2 Énergie des 27 conformères pour la forme chirale *R*.

L'énergie totale des 27 conformères pour la forme chirale *R* du pentan-2 est présentée dans le tableau 6.3 et la figure 6.17.

TAB. 6.3 – Énergie totale (en kcal.mol⁻¹) du système minimisé pour le (*R*)-pentan-2-ol en fonction des angles dièdres (en degrés).

Conformère	Angle α	Angle β	Angle γ	Énergie
1	-102, 50	65, 22	64, 84	-4387, 7
2	-102, 59	68, 40	-93, 71	-4384,09
3	-102, 15	66, 92	176, 45	-4388, 4
4	-103, 21	-60, 97	94, 53	-4375,73
5	-106, 28	-54, 02	-73, 81	-4362,39
6	-103, 70	-62, 45	-177, 60	-4372,69
7	-90, 69	179, 31	97, 75	-4373,88
8	-92, 83	174, 75	-68, 56	-4385,04
9	-93, 58	174, 77	-177, 41	-4382,69
10	-144, 41	63, 02	63, 37	-4376,97
11	-143, 75	66, 88	-93, 83	-4372,52
12	-144, 15	65, 57	176, 34	-4371,53
13	-144, 12	-61, 40	94, 32	-4374,41
14	-144, 94	-51, 65	-70, 91	-4377,12
15	-144, 6	-62, 17	-177, 24	-4380,01
16	-133, 69	173, 63	-176, 70	-4372,69
17	-132, 80	170, 04	-70, 12	-4360,83
18	-133, 69	173, 63	-176, 70	-4372,67
19	53, 77	64, 33	65, 53	-4370,82
20	54, 89	70, 22	-91, 93	-4368, 4
21	54, 24	66, 95	176, 76	-4377,84
22	16, 74	-61, 09	94, 65	-4370,38
23	-106, 28	-54, 02	-73, 81	-4362,88
24	25, 22	-61, 28	179, 96	-4374,95
25	49, 06	142, 08	70, 08	-4361,24
26	48, 37	166, 54	-71, 70	-4368,29
27	48, 36	164, 80	178, 42	-4358, 9

La structure énergétiquement la plus intéressante est la numéro 3 (figure 6.18), suivie de la numéro 1 (figure 6.19) qui présente une conformation très proche de la numéro 3.

Les conformères avec l'angle α autour de 260 degrés (-100 degrés dans le tableau) sont les plus intéressants. Leur chaîne latérale longue est orientée vers la sortie du site actif. Les conformères les moins intéressants sont ceux avec l'angle α autour de 50 degrés. Leur chaîne latérale longue est orientée dans la poche stéréospécifique.

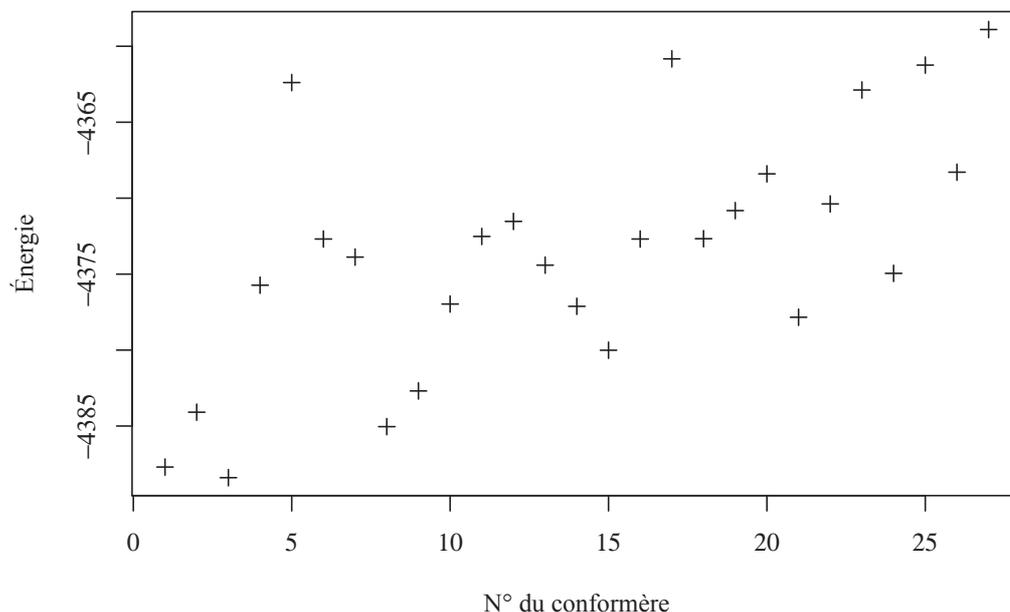


FIG. 6.17 – Énergie des 27 conformères pour le (*R*)-pentan-2-ol (en kcal.mol⁻¹).

Les conformères numéro 1 et 3 présentent un angle dièdre β d'environ 65 degrés.

L'influence de l'angle γ est naturellement très dépendante des deux autres angles α et β .

6.3.3 Comparaison de *R* et *S*

On constate tout d'abord que l'énergie potentielle la plus basse est observée pour le substrat de forme chirale *R* ($-4388,4$ kcal.mol⁻¹ pour le (*R*)-pentan-2-ol numéro 3 contre $-4382,09$ kcal.mol⁻¹ pour le (*S*)-pentan-2-ol numéro 2).

Le (*R*)-pentan-2-ol numéro 3 oriente sa chaîne latérale longue vers la sortie du site actif, tandis que le (*S*)-pentan-2-ol numéro 2 oriente sa chaîne latérale longue dans la poche stéréospécifique. Néanmoins, plusieurs structures de *S* avec la chaîne longue vers la sortie du site actif présentent également des énergies intéressantes.

Les structures employées pour les calculs d'énergie libre dans le chapitre suivant sont très proches des structures ayant l'énergie d'interaction la plus intéressante, puisqu'elles ne diffèrent que par l'angle γ .

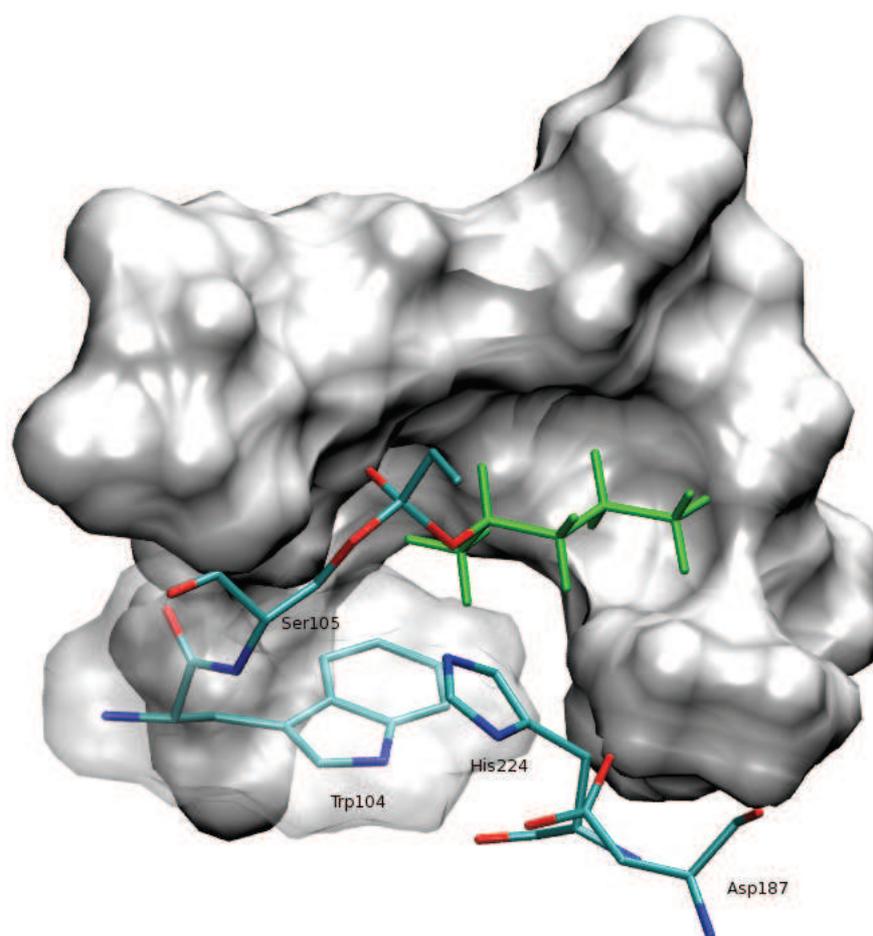


FIG. 6.18 – Conformère numéro 3 avec (*R*)-pentan-2-ol.

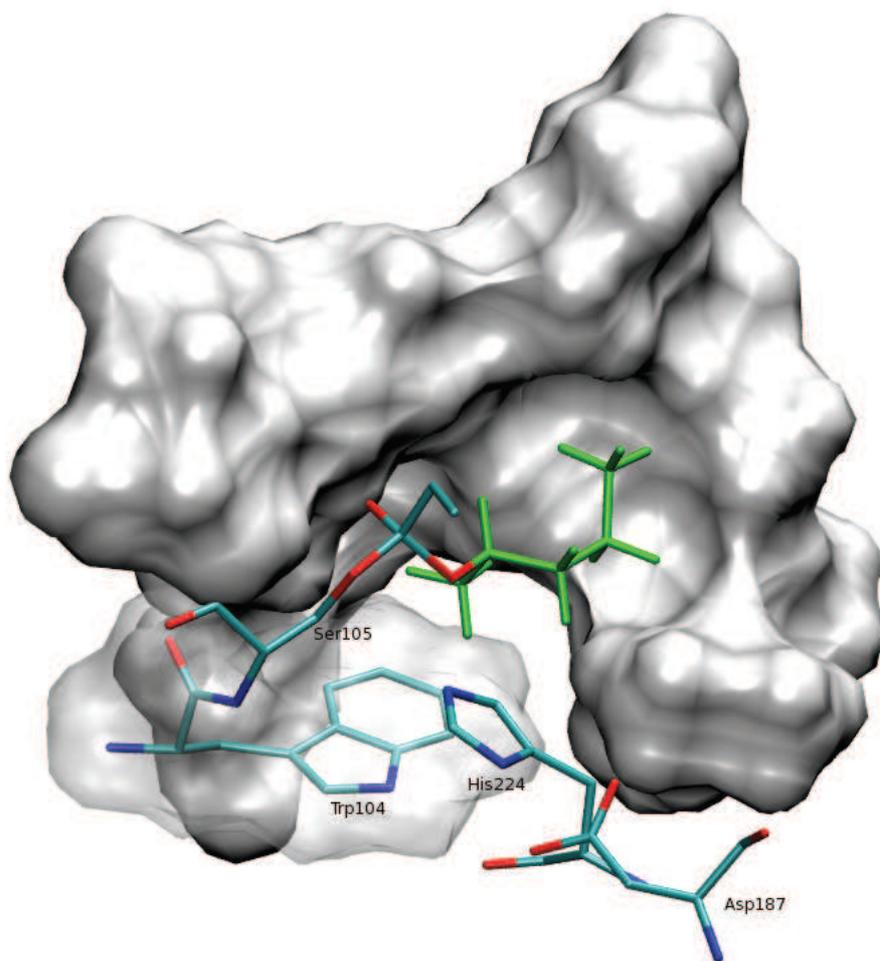


FIG. 6.19 – Conformère numéro 1 avec (*R*)-pentan-2-ol.

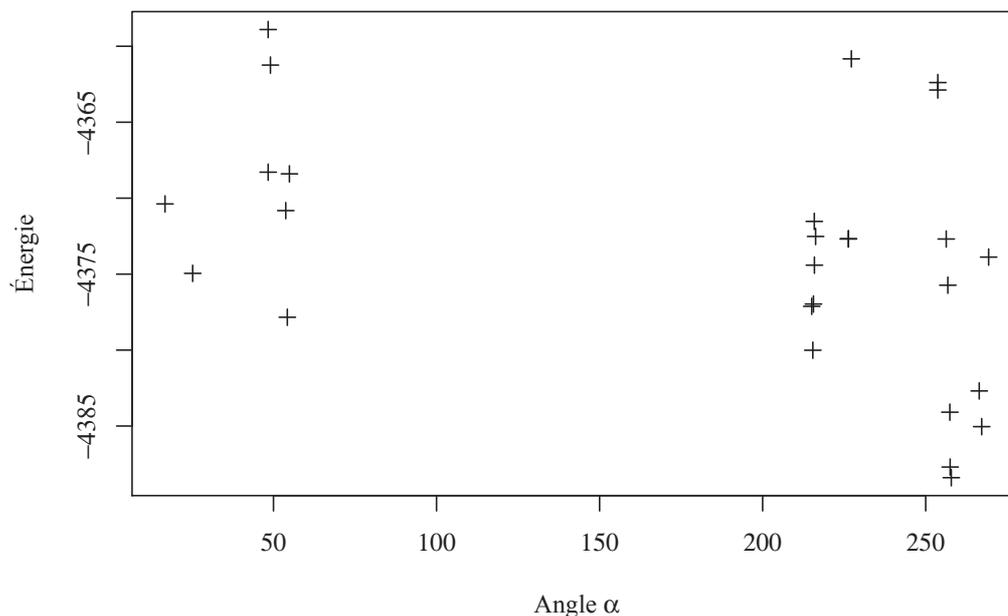


FIG. 6.20 – Énergie (en kcal.mol⁻¹) du système minimisé pour le (*R*)-pentan-2-ol en fonction de l'angle dièdre α .

L'histogramme présenté figure 6.21 montre le peuplement de différentes plages énergétiques par les conformations des deux énantiomères. En particulier, on voit que pour l'énantiomère *R*, trois conformères présentent une énergie comprise entre -4390 et -4380 kcal.mol⁻¹ tandis qu'aucune conformation de l'énantiomère *S* ne présente une énergie aussi basse.

6.3.4 Étude complémentaire des énantiomères *R* et *S*

Les liaisons hydrogène indispensables à la catalyse pour la forme chirale *S*

On note la présence de quatre liaisons hydrogène essentielles pour la catalyse de la réaction, permettant d'assurer le transfert d'un proton entre l'histidine 224 et la fonction hydroxyle de l'alcool, ainsi que la stabilisation de la charge négative de l'oxygène de l'intermédiaire tétraédrique dans le trou oxyanionique. Ces liaisons hydrogène sont présentées dans le tableau 6.22.

On observe que les distances des différentes liaisons hydrogène présentées dans le

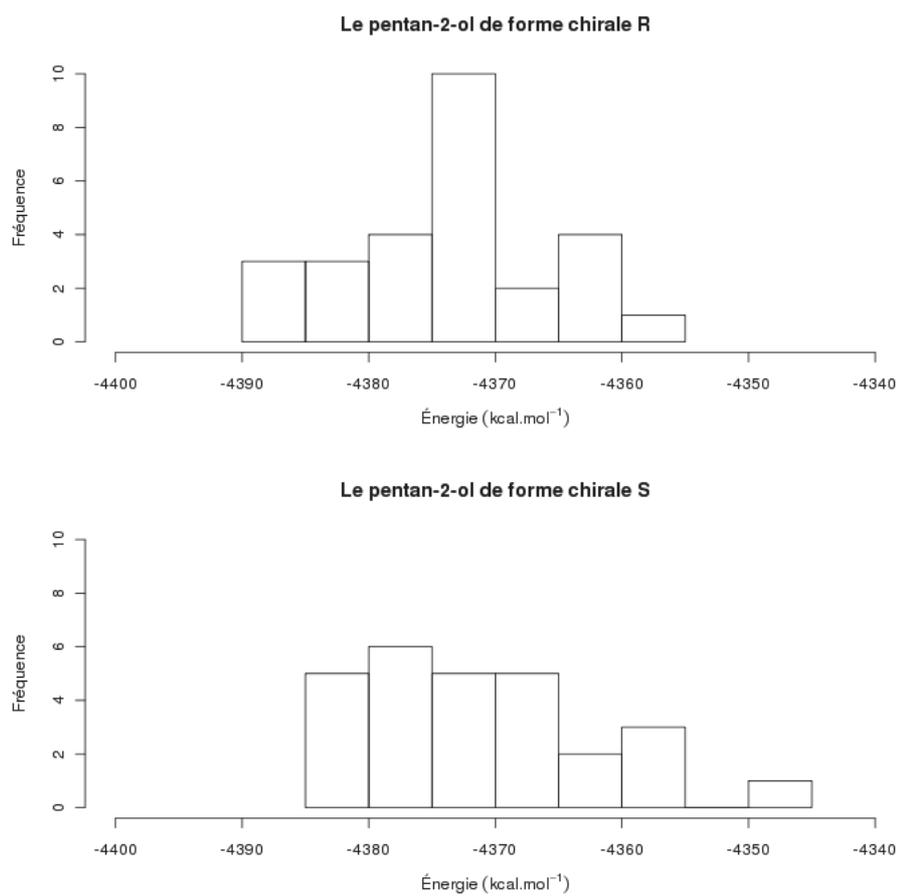


FIG. 6.21 – Histogramme représentant la distribution des énergies des conformères générés pour le (*R*)- et (*S*)-pentan-2-ol.

tableau 6.4 sont relativement homogènes après minimisation. La plus importante est celle qui est définie entre l'azote de l'histidine 224 et la fonction hydroxyle de l'alcool. Les trois autres liaisons hydrogène stabilisent l'intermédiaire tétraédrique. La thréonine 40 et la glutamine 106 forment le trou oxyanionique.

Les structures numéro 16,17, et 18 qui présentent les mêmes angles α et β , altèrent la liaison hydrogène avec l'histidine 224.

FIG. 6.22 – Définition des liaisons hydrogène indispensables à la catalyse.

Nom	Correspondance
L.H. 1	Entre l'azote de l'histidine 224 et la fonction hydroxyle de l'alcool
L.H. 2	Entre l'oxygène O ⁻ de l'IT* et l'azote (squelette peptidique) de la thréonine 40
L.H. 3	Entre l'oxygène O ⁻ de l'IT* et l'oxygène de la thréonine 40
L.H. 4	Entre l'oxygène O ⁻ de l'IT* et l'azote (squelette peptidique) de la glutamine 106

*intermédiaire tétraédrique

Les liaisons hydrogène indispensables à la catalyse pour la forme chirale *R*

Les distances des différentes liaisons hydrogène indispensables à la catalyse sont présentées dans le tableau 6.5.

Les conformations numéro 5 et 23 altèrent la liaison hydrogène avec l'histidine 224. Les longueurs des liaisons hydrogène établies avec les résidus du trou oxyanionique sont relativement homogènes.

Le RMSD pour la forme chirale *S*

On compare le RMSD des carbones α entre la structure cristallographique et les 27 structures minimisées, présenté figure 6.23. On remarque que les conformères 2, 22, et 23, qui présentent des énergies intéressantes ont une structure proche de la structure cristallographique (RMSD les plus faibles). Dans ces conformations, les positionnements du substrat ont induit les plus faibles déformations de la structure initiale de l'enzyme.

TAB. 6.4 – Longueur des liaisons hydrogène (en Å) entre atomes lourds pour le (*S*)-pentan-2-ol.

Conformère	L.H. 1	L.H. 2	L.H. 3	L.H. 4
1	2.86	2.79	2.64	3.82
2	2.85	2.77	2.65	3.87
3	2.86	2.75	2.66	3.83
4	2.87	2.78	2.67	3.82
5	2.86	2.76	2.64	3.87
6	2.88	2.79	2.64	3.82
7	2.96	2.77	2.64	3.84
8	2.88	2.77	2.63	3.81
9	2.92	2.80	2.62	3.87
10	3.02	2.80	2.63	3.88
11	3.10	2.81	2.61	3.92
12	3.03	2.83	2.63	3.87
13	3.00	2.81	2.66	3.82
14	2.80	2.71	2.63	3.85
15	3.19	2.73	2.63	3.88
16	4.05	2.73	2.63	3.89
17	3.34	2.75	2.64	3.86
18	3.80	2.73	2.63	3.89
19	2.84	2.84	2.62	3.79
20	2.84	2.76	2.63	3.77
21	2.83	2.77	2.64	3.77
22	2.86	2.73	2.64	3.79
23	2.86	2.73	2.64	3.79
24	2.87	2.75	2.65	3.78
25	2.89	2.79	2.75	3.80
26	2.88	2.85	2.70	3.80
27	2.89	2.79	2.74	3.80

TAB. 6.5 – Longueur des liaisons hydrogène (en Å) entre atomes lourds pour le (*R*)-pentan-2-ol.

Conformère	L.H. 1	L.H. 2	L.H. 3	L.H. 4
1	2.87	2.67	2.65	3.80
2	2.87	2.71	2.65	3.80
3	2.89	2.70	2.65	3.80
4	3.18	2.70	2.65	3.78
5	3.70	2.69	2.63	3.90
6	3.13	2.72	2.65	3.81
7	2.95	2.69	2.65	3.81
8	2.91	2.72	2.64	3.76
9	2.91	2.70	2.65	3.81
10	2.93	2.76	2.64	3.83
11	2.97	2.81	2.64	3.84
12	2.97	2.89	2.63	3.87
13	2.98	2.75	2.65	3.86
14	2.95	2.74	2.64	3.85
15	2.95	2.76	2.65	3.85
16	2.95	2.87	2.63	3.84
17	2.98	3.25	2.68	3.89
18	2.95	2.87	2.63	3.84
19	2.83	2.82	2.63	3.79
20	2.79	2.75	2.66	3.76
21	2.83	2.77	2.63	3.78
22	2.83	2.76	2.66	3.76
23	3.71	2.69	2.63	3.89
24	2.85	2.76	2.63	3.80
25	2.91	2.83	2.64	3.85
26	2.85	2.85	2.63	3.82
27	2.88	2.83	2.64	3.84

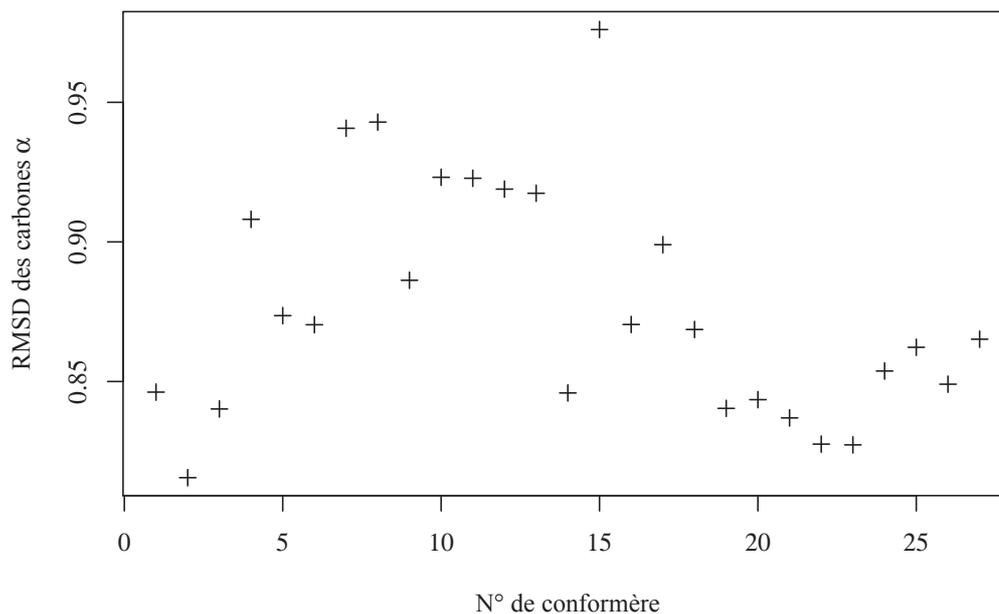


FIG. 6.23 – Comparaison du RMSD (en Å) entre les carbones α de la structure cristallographique et des 27 structures minimisées pour le (*S*)-pentan-2-ol.

Le RMSD pour la forme chirale *R*

On compare le RMSD des carbones α entre la structure cristallographique et les 27 structures minimisées, présenté figure 6.24.

La corrélation entre le RMSD et l'énergie des conformères est faible dans le cas de la forme chirale *R*. Les RMSD des structures numéro 1 et 3 (figure 6.24), qui correspondent aux conformères avec les meilleures énergies totales précédemment observées présentent néanmoins des RMSD parmi les plus faibles.

Le rayon de giration pour la forme chirale *S*

Le rayon de giration des 27 structures minimisées pour le (*S*)-pentan-2-ol est présenté sur la figure 6.25.

La barre horizontale à 18,057 Å représente le rayon de giration de la structure cristallographique. On remarque ici un phénomène de compaction de l'enzyme lors de la minimisation. Aussi, la présence de l'intermédiaire tétraédrique augmente la compaction de

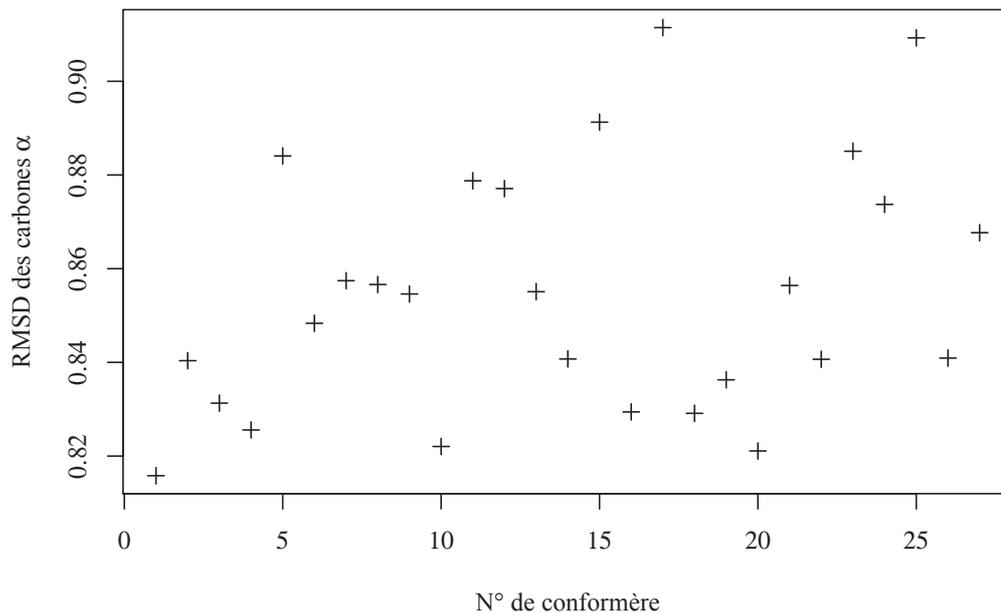


FIG. 6.24 – Comparaison du RMSD (en Å) entre les carbones α de la structure cristallographique et des 27 structures minimisées pour le (*R*)-pentan-2-ol.

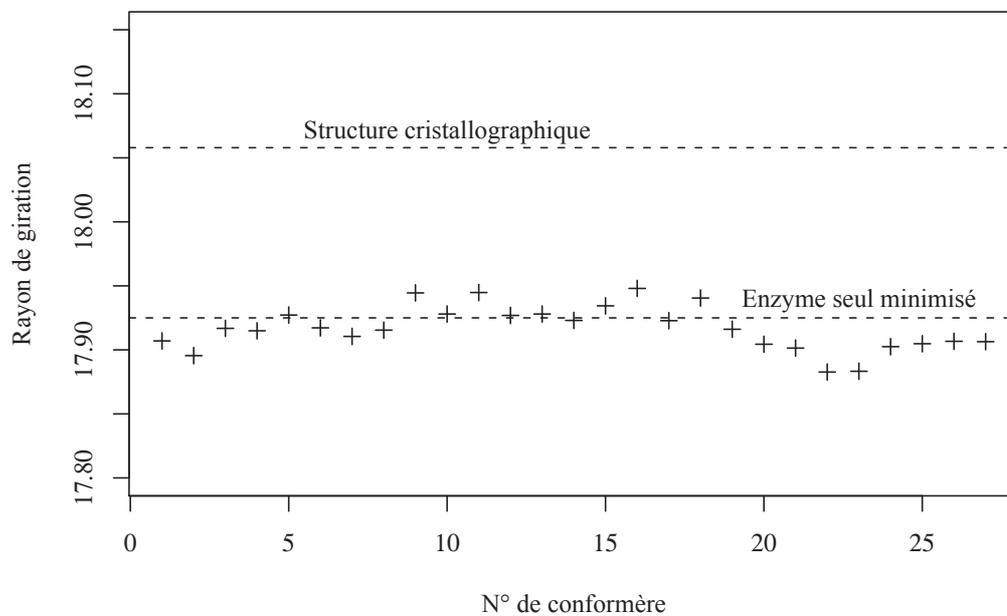


FIG. 6.25 – Rayon de giration (en Å) des 27 structures minimisées pour le (*S*)-pentan-2-ol.

l'enzyme. Les conformations numéro 2, 22 et 23, qui présentent des énergies intéressantes ont également les plus petits rayons de giration. Ces résultats sont données à titre indicatif et montrent comment l'absence d'eau influence la structure de l'enzyme

Le rayon de giration pour la forme chirale R

Le rayon de giration des 27 structures minimisées pour le (R)-pentan-2-ol est présenté sur la figure 6.26.

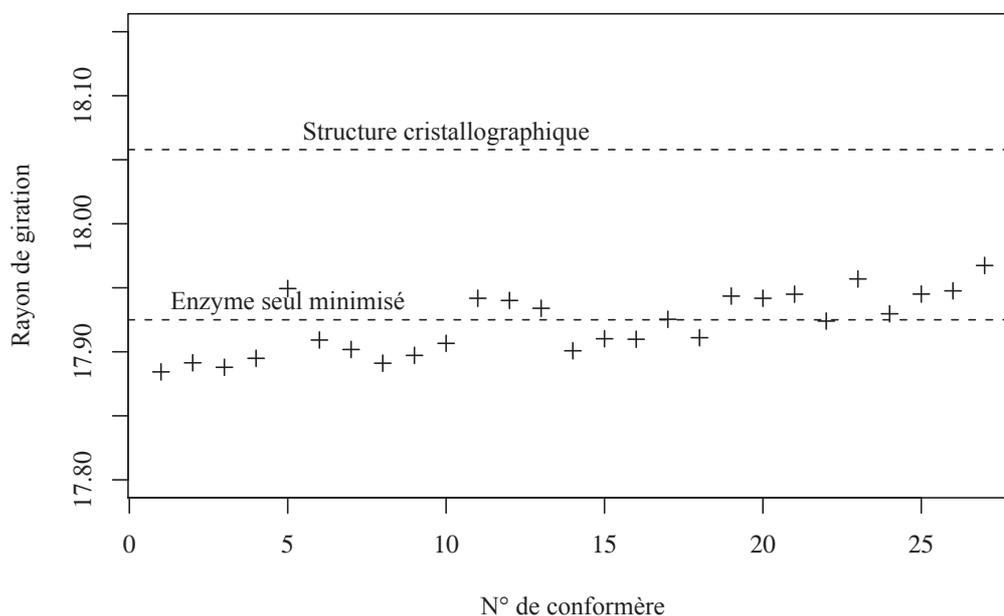


FIG. 6.26 – Rayon de giration (en Å) des 27 structures minimisées pour le (R)-pentan-2-ol.

Encore une fois, les conformations qui présentent des énergies intéressantes (1 et 3) ont également les plus petits rayons de giration.

6.4 Conclusion sur l'étude préliminaire

La dynamique moléculaire de l'enzyme seul montre que le modèle EEF1 en solvant implicite n'a pas fourni une trajectoire très stable. Les dynamiques moléculaires suivantes seront réalisées avec une méthode plus conventionnelle du fait que les paramètres pour

les intermédiaires tétraédriques modélisés sont définis pour le champ de force Charmm22.

En remarque générale sur l'étude des conformères, on observe que les résultats sont concordant avec le modèle d'orientation des alcools secondaires de chiralité R et S proposé par Haeffner *et al.* [26]. Ces résultats permettent de valider le choix de l'orientation des substrats dans les calculs de perturbation de l'énergie libre. Concernant l'orientation du pentan-2-ol de chiralité S , on peut se baser sur le conformère numéro 2 qui est le plus intéressant énergétiquement, sa chaîne latérale longue est orientée dans la poche stéréospécifique (figure 6.15) comme cela est proposé par Haeffner *et al.*. Concernant l'orientation du pentan-2-ol de chiralité R , on peut se baser sur une orientation de la chaîne latérale longue orientée vers la sortie de la poche stéréospécifique comme c'est le cas pour les conformères numéro 3 (figure 6.18) et numéro 1 (figure 6.19) dont les conformations sont très proches. C'est là aussi le modèle d'orientation proposé par Haeffner *et al.*.

Chapitre 7

Contribution des constantes catalytiques et de Michaelis pour la définition de l'énantiosélectivité de la CALB et prédiction de l'énantiosélectivité par la méthode de FEP

Ce chapitre se découpe en deux parties. La première partie concerne la détermination du ratio énantiomérique à partir des constantes cinétiques K_M^{app} et k_{cat} des alcools secondaires butan-2-ol et pentan-2-ol, sous forme énantiopure. Le but est d'obtenir la contribution respective du K_M^{app} et du k_{cat} pour la définition de l'énantiopréférence. La seconde partie du chapitre concerne les travaux de modélisation moléculaire sur la prédiction de l'énantiosélectivité d'une série d'alcools secondaires, dont le butan-2-ol et le pentan-2-ol, par la méthode de la perturbation de l'énergie libre, que l'on notera sous l'acronyme FEP (Free Energy Perturbation).

7.1 Détermination expérimentale des constantes cinétiques apparentes pour les formes énantiopures du butan-2-ol et du pentan-2-ol et calcul des ratios énantiomériques

On réalise la réaction de transestérification du butan-2-ol et du pentan-2-ol sous forme énantiopure avec l'ester propanoate de méthyle, à 45 °C dans le 2-méthylbutan-2-ol, en présence de la CALB immobilisée sur résine acrylique.

Les figures 7.1, 7.2, 7.3 et 7.4 présentent respectivement l'évolution de la vitesse initiale de réaction de transestérification entre le propanoate de méthyle et des concentrations croissantes de (*S*)-butan-2-ol, de (*R*)-butan-2-ol, de (*S*)-pentan-2-ol, et de (*R*)-pentan-2-ol, catalysée par la CALB immobilisée.

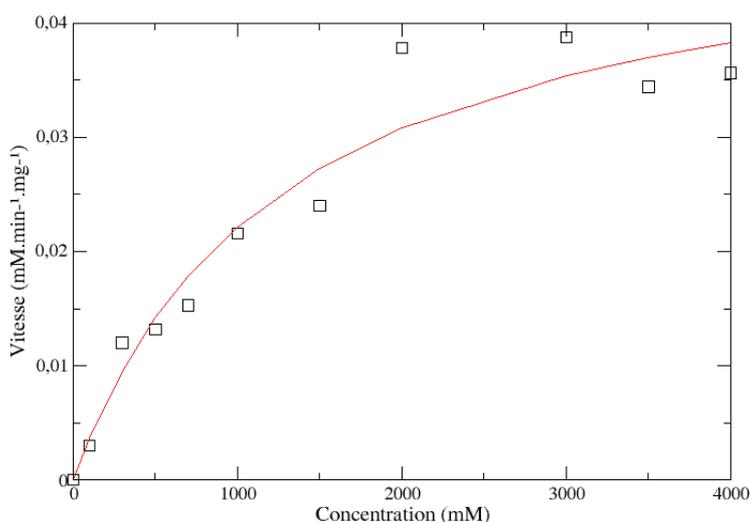


FIG. 7.1 – Courbe de saturation de la CALB avec le (*S*)-butan-2-ol. Réaction de transestérification à 45 °C dans le 2-méthylbutan-2-ol, en présence de 2,5 g.L⁻¹ de la CALB immobilisée.

Les paramètres cinétiques apparents obtenus pour les formes énantiopures du butan-2-ol et du pentan-2-ol sont présentés dans le tableau 7.1. Ces résultats sont obtenus par une régression non-linéaire de l'équation de Michaelis-Menten sur les courbes de saturation à l'aide du programme Xmgrace.

La constante de Michaelis apparente K_M^{app} pour la forme *R* du butan-2-ol est de 258 mM et pour la forme *S* de 1 284 mM. Dans le cas du pentan-2-ol, on obtient un K_M^{app} de

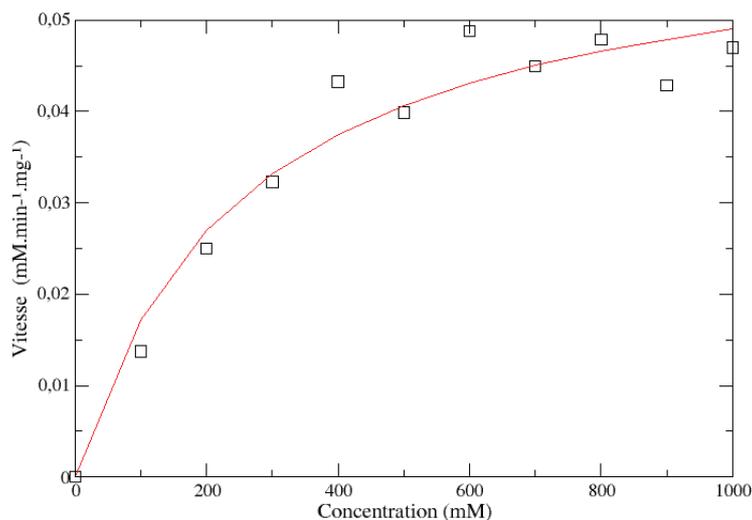


FIG. 7.2 – Courbe de saturation de la CALB avec le (*R*)-butan-2-ol. Réaction de transestérification à 45 °C dans le 2-méthylbutan-2-ol, en présence de 2,5 g.L⁻¹ de la CALB immobilisée.

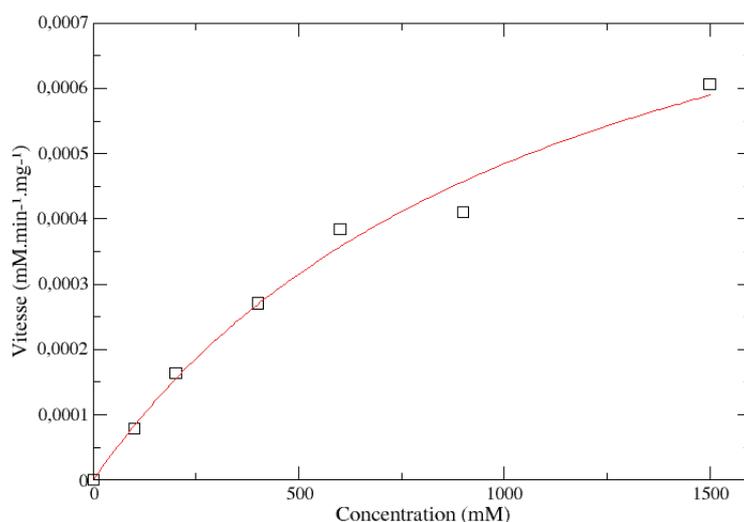


FIG. 7.3 – Courbe de saturation de la CALB avec le (*S*)-pentan-2-ol. Réaction de transestérification à 45 °C dans le 2-méthylbutan-2-ol, en présence de 5 g.L⁻¹ de la CALB immobilisée.

TAB. 7.1 – Constantes cinétiques pour les formes énantiopures *R* et *S* du butan-2-ol et du pentan-2-ol ($V_{max}^{app.}$ exprimé en $mmol.min^{-1}.mg^{-1}$ d'enzyme immobilisé).

Alcools	<i>R</i>		<i>S</i>		<i>E</i>
	K_M	$V_{max}^{app.}$	K_M	$V_{max}^{app.}$	
butan-2-ol	258 mM	0,062	1284 mM	0,051	6
pentan-2-ol	70 mM	0,048	>472 mM	≈0,001	>324

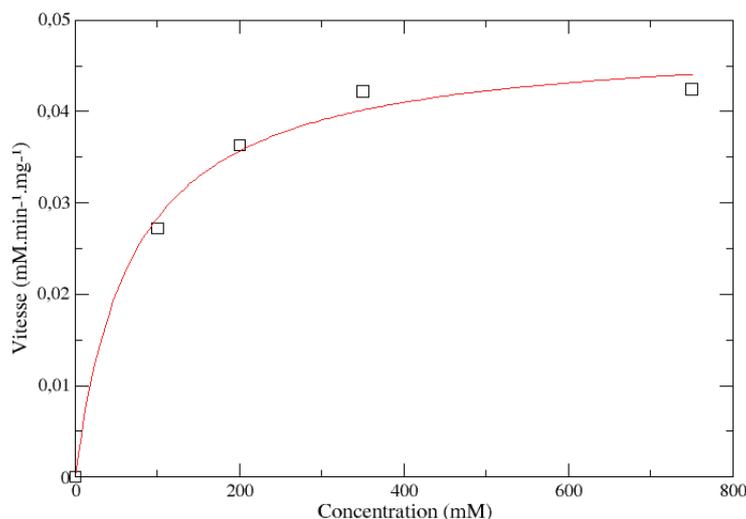


FIG. 7.4 – Courbe de saturation de la CALB avec le (*R*)-pentan-2-ol. Réaction de transestérification à 45 °C dans le 2-méthylbutan-2-ol, en présence de 2,5 g.L⁻¹ de la CALB immobilisée.

70 mM pour la forme *R*. Pour la forme *S*, il apparaît sur la figure 7.3 que la CALB n'est pas saturée avec les concentrations de (*S*)-pentan-2-ol jusqu'à 1 500 mM, en conséquence, la valeur du $K_M^{app.}$ est supérieure à 472 mM, qui est la concentration d'alcool donnant la vitesse maximale divisée par deux à 1 500 mM ; cette dernière concentration correspond à la valeur maximale utilisée. Les concentrations au-delà de 1 500 mM pour le (*S*)-pentan-2-ol n'ont pas été testées pour des raisons liées au coût excessif de ce substrat.

La $V_{max}^{app.}$ pour le butan-2-ol est de 0,062 $mmol.min^{-1}.mg^{-1}$ pour la forme *R* et de 0,051 $mmol.min^{-1}.mg^{-1}$ pour la forme *S* (par mg d'enzyme immobilisé). Le pentan-2-ol donne des valeurs de $V_{max}^{app.}$ de 0,048 $mmol.min^{-1}.mg^{-1}$ et autour de 0,001 $mmol.min^{-1}.mg^{-1}$ pour les formes *R* et *S* respectivement.

Ces résultats montrent que pour le butan-2-ol, l'énantiopréférence pour le substrat *R* peut être attribuée principalement aux différences de K_M , qui est plus bas (d'un facteur 5) pour l'alcool *R*, suggérant que l'affinité de l'enzyme pour le substrat *R* est meilleure que pour la forme *S*. Aussi, la V_{max} est un peu plus haute pour l'énantiomère *R*, par rapport à celle obtenue pour la forme *S* (0,062 contre 0,051 $mmol.min^{-1}.mg^{-1}$).

Dans le cas du pentan-2-ol, l'énantiopréférence est la résultante conjointe d'un K_M plus bas (d'un facteur supérieur à 6,7) et d'un V_{max} plus haut pour la forme *R* (d'un facteur environ égale à 48).

Hedfors *et al.* ont mesuré expérimentalement le nombre de sites actifs par gramme

de Novozym[®] 435 en utilisant un inhibiteur irréversible [17] : 1 g de Novozym[®] 435 contient 1 μ mole de la CALB active. En utilisant ces résultats, les k_{cat} peuvent être calculés à partir des valeurs de V_{max} et sont égales à 1 033 s⁻¹ and 850 s⁻¹ pour les formes R et S du butan-2-ol, et 800 s⁻¹ et 17 s⁻¹ pour les formes R et S du pentan-2-ol.

Ces résultats cinétiques peuvent être reliés aux paramètres thermodynamiques de la réaction. Un diagramme du profil énergétique de la réaction d'acylation catalysée par la CALB avec les énantiomères R et S pour le butan-2-ol et pentan-2-ol est proposé figure 7.5.

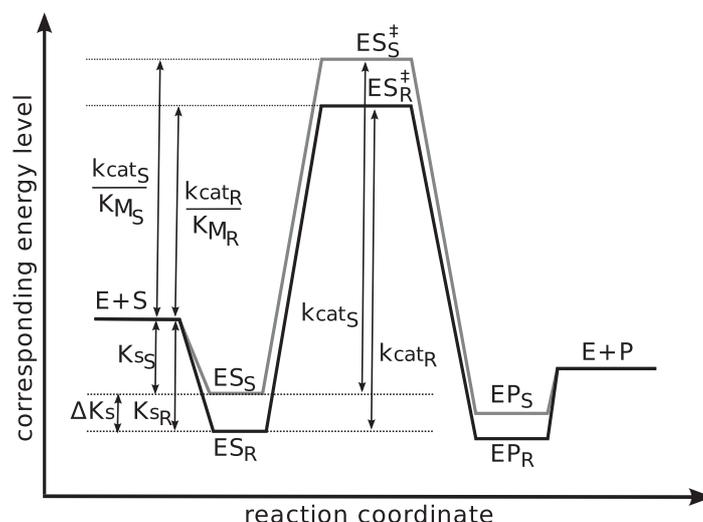


FIG. 7.5 – Diagramme du profil énergétique de la réaction d'acylation catalysée par la CALB pour l'énantiomère R (ligne noire) et S (ligne grise), avec E l'enzyme, S_S et S_R les substrats énantiopurs S et R , ES_S et ES_R , les complexes enzyme-substrat, ES_S^{\ddagger} et ES_R^{\ddagger} , les complexes enzyme-substrat à l'état de transition, P_S et P_R , les produits énantiopurs.

Les K_M apparents peuvent être assimilés à des constantes de dissociation apparentes K_s en faisant l'hypothèse d'état stable telle qu'elle est énoncée dans le modèle de Michaelis-Menten. Le plus petit K_M pour l'énantiomère R correspond à une stabilisation du complexe ES , avec une énergie plus basse qu'avec l'énantiomère S .

k_{catR} et k_{catS} correspondent à la différence entre l'état ES et ES^{\ddagger} pour les énantiomères R et S . Pour les deux substrats étudiés, le k_{catR} est supérieur au k_{catS} . La constante de second ordre pour la réaction enzymatique avec l'enzyme libre et le substrat est k_{cat}/K_M et correspond à la différence entre $E+S$ et ES^{\ddagger} . L'énantiopréférence pour la forme R est liée à la différence d'énergie entre les énantiomères associée à l'état de transition (ES_S^{\ddagger} - ES_R^{\ddagger}). Les résultats cinétiques obtenus précédemment montrent que cette différence est

principalement due aux différences de K_M entre R et S , plutôt que k_{cat} dans le cas du butan-2-ol. Dans le cas du pentan-2-ol, on voit que la différence de barrière d'énergie résulte à la fois du K_M et du k_{cat} .

On trouve très peu d'exemples dans la littérature d'études cinétiques réalisées avec des alcools secondaires énantiopurs pour des réactions catalysées par la CALB, en raison sans doute du coût excessif de ces substrats. Un exemple est l'étude de Magnusson *et al.* [55] (2005) pour la catalyse de l'acylation par la CALB d'énantiomères purs du 1-phényléthanol, un alcool secondaire avec un substituant très encombrant. Nos résultats sont significativement différents des précédents résultats expérimentaux obtenus par Magnusson *et al.*. Dans ce cas, le grand ratio énantiomérique ($E = 1\,300\,000$) est presque entièrement dû à la différence de k_{cat} apparent entre les deux énantiomères : 570 s^{-1} et $0,000\,53\text{ s}^{-1}$ respectivement pour la forme R et S .

On voit que les contributions respectives de K_M et k_{cat} à l'énantiosélectivité sont variables et dépendent de la structure du substrat. Ces résultats montrent la complexité des mécanismes régissant l'énantiosélectivité. Il n'est pas évident de définir de règle sur la contribution relative de K_M et k_{cat} , en fonction de la structure de l'alcool secondaire à résoudre.

Les valeurs de E (Tableau 7.1) calculées à l'aide de la formule $E = \frac{(k_{cat}/K_M)_R}{(k_{cat}/K_M)_S}$ donnent une valeur égale à 6 pour le butan-2-ol et une valeur de 324 pour le pentan-2-ol. Notons que dans ces travaux, le ratio énantiomérique est calculé en utilisant explicitement les termes K_M et k_{cat} des alcools énantiopurs, cette démarche contraste avec les expérimentations habituelles où le ratio est calculé à partir des excès énantiomériques de substrats et de produits, ou bien encore à partir du ratio des vitesses initiales de chaque énantiomère mesurées dans des conditions expérimentales où un mélange racémique du substrat est employé.

Ces valeurs sont similaires à celles obtenues précédemment dans le laboratoire à la même température, dans le réacteur solide/gaz avec le même donneur d'acyle à 20 % d'humidité relative, égales à 6 pour le butan-2-ol et 330 pour le pentan-2-ol [38] en utilisant les valeurs des excès énantiomériques de substrat et de produit pour calculer le E .

7.2 Estimation du ratio énantiomérique par la méthode de FEP

7.2.1 L'intérêt du calcul de perturbation d'énergie libre

L'énantiosélectivité est supposée être reliée à la différence entre les barrières énergétiques de la réaction catalysée par la CALB pour les deux énantiomères. Cette barrière est associée à l'état de transition formé durant la seconde étape du mécanisme enzymatique de type Bi-Bi Ping-Pong [16]. Le second intermédiaire tétraédrique correspondrait à une structure proche de cet état de transition formé durant le processus catalytique [28] et on utilise donc la modélisation de cette structure dans les études qui suivent.

De nombreux essais ont été réalisés afin d'évaluer le ratio énantiomérique E par modélisation moléculaire. Dans beaucoup d'études, l'énantiosélectivité est corrélée avec plus ou moins de succès à la différence d'énergie potentielle ΔU (à défaut de mesurer la différence d'énergie libre $\Delta\Delta G^\ddagger$) entre les deux intermédiaires tétraédriques avec chaque énantiomère [33, 34, 35]. Un problème rencontré lors de l'évaluation de l'énergie potentielle ΔU seule est que les calculs basés sur des structures minimisées génèrent des problèmes de *multi-minima*, bien que ces problèmes puissent être minorés par l'utilisation du recuit simulé [27]. Aussi, l'énergie potentielle présente une fluctuation importante due à l'agitation thermique durant une trajectoire de dynamique au regard des différences d'énergie attendues. Enfin, le calcul d'énergie potentielle part du principe que la contribution entropique est d'une importance mineure dans l'énantiosélectivité, or, beaucoup d'articles ont montré une contribution prononcée de l'entropie dans l'énantiosélectivité chez la CALB [36, 37]. En fait, cela peut représenter plus de 50 % de l'énergie libre en valeur absolue [38].

D'autres méthodes informatiques ont été développées pour tenter d'offrir une prédiction quantitative de l'énantiosélectivité plutôt que simplement prédire qualitativement l'énantio-préférence. Les principales tentatives sont présentées dans la partie Bibliographie.

La méthode de FEP (Free Energy Perturbation) est une approche alternative [77, 78, 79] basée sur la transformation progressive d'un système d'un état initial vers un état final au cours de laquelle on évalue l'énergie à fournir pour transformer le système. À chaque étape, la méthode fournit une évaluation de l'énergie libre incluant donc à la

fois la variation de l'énergie interne et de l'entropie entre les deux états du système. La méthode a été intensivement utilisée pour calculer des différences d'énergie libre dans de nombreuses applications [86], incluant la stéréospécificité enzymatique [87] et permet de calculer des différences d'énergie proche d'une kilocalorie par mole [80].

En pratique, néanmoins, la méthode de FEP est un défi technique avec des limitations bien connues [88]. Premièrement, le modèle du champ de force utilisé pour décrire le système thermodynamique doit fournir une bonne représentation des conformations accessibles au système. Deuxièmement, les mouvements de basse fréquence et les temps de relaxation lents (lors de la transformation notamment) du système doivent être correctement pris en compte pour obtenir un échantillonnage pertinent de l'espace conformationnel [89]. Pour cela, on peut réduire le nombre de degrés de liberté du système, un tel choix doit être réalisé judicieusement car il n'est pas sans effet sur l'espace conformationnel. La difficulté générale de la méthode de FEP est de réussir à obtenir une convergence des calculs [80]. De façon plus générale encore, la question de l'existence d'états méta-stables multiples n'est pas résolue avec ce genre de calcul.

Néanmoins, la méthode de FEP a été utilisée avec succès pour étudier l'énantio-sélectivité. Colombo *et al.* [90] ont obtenu des différences d'énergie libre en accord avec les résultats expérimentaux. Ils ont décrit l'énantiosélectivité de la subtilisine dans la résolution de mélange racémique de 1-phényléthanol par une réaction de transestérification avec de l'acétate de vinyle comme donneur d'acyle [90].

On utilise ici la méthode de FEP pour explorer l'énantiosélectivité de la CALB pour cinq alcools secondaires (butan-2-ol, 3-méthylbutan-2-ol, pentan-2-ol, 4-méthylpentan-3-ol, et hexan-3-ol) en utilisant une transformation alchimique inédite chez la CALB : le système est construit de façon à ce que les chaînes latérales des deux alcools énantiomères *R* et *S* existent simultanément. La transformation consiste à passer d'un système en interaction avec l'un des énantiomères vers une interaction avec l'autre énantiomère de façon progressive.

7.2.2 Résultats des calculs de FEP

On observe une grande similarités des résultats concernant les ratios énantiomériques obtenus à partir des constantes catalytiques et des constantes de Michaelis pour le butan-2-ol et le pentan-2-ol dans les calculs présentés plus haut, et les ratios énantiomériques précédemment obtenus à partir des excès énantiomériques de substrat et de produit pour l'acylation de ces mêmes alcools secondaires dans le réacteur solide/gaz [38] avec l'ester substrat propanoate de méthyle et la CALB immobilisée à la même température (45 °C). Nous avons donc choisi d'utiliser ces valeurs de ratios énantiomériques et d'ajouter l'hexan-3-ol en tant que candidat pour les calculs FEP, un substrat dont le E est de 80 avec les mêmes conditions que préalablement citées (Tableau 7.2).

Deux substrats supplémentaires avec des substituants ramifiés (3-méthylbutan-2-ol et 4-méthylpentan-3-ol) sont aussi testés avec la méthode de FEP. Pour ces deux derniers, les ratios énantiomériques E sont pris dans la littérature [26]. Ils sont obtenus à la même température mais avec un donneur d'acyle différent : le thiooctanoate d'éthyle (Tableau 7.2).

TAB. 7.2 – Calculs de $\Delta F_{R \rightarrow S}$ et $\Delta F_{S \rightarrow R}$ comparés aux résultats expérimentaux $\Delta \Delta G_{R \rightarrow S}^{\ddagger \text{exp.}}$ dérivés des ratios énantiomériques E déterminés expérimentalement. Toutes les différences d'énergie libre sont exprimées en kcal.mol^{-1} .

Substrat	E	$\Delta \Delta G_{R \rightarrow S}^{\ddagger \text{exp.}}$	Traj.	$\Delta F_{R \rightarrow S}$	$\Delta F_{S \rightarrow R}$	$ \Delta F^{avg.} \pm sd^{[a]}$
 butan-2-ol	6.0	1,07	1 2	+1,10 +0,78	-1,33 -2,30	$1,38 \pm 0,66$
 pentan-2-ol	330	3,46	1 2	+4,04 +3,57	-3,94 -2,94	$3,62 \pm 0,5$
 hexan-3-ol	80	2,61	1 2 3	+2,06 +4,90 +4,29	-3,09 -4,84 -4,79	$2,58$ $4,21 \pm 0,28$
 3-méthylbutan-2-ol	705	3,91	1 2	+3,50 +3,32	-2,03 -2,02	$2,72 \pm 0,8$
 4-méthylpentan-3-ol	109	2,80	1 2	+2,86 -0,07	-1,07 +1,60	$1,97$ nc ^[b]

^[a]déviati on standard, ^[b]non convergé

Les résultats sont présentés dans le tableau 7.2. On observe que le $\Delta F_{R \rightarrow S}$ présente une valeur positive lorsque l'on va d'un système avec l'énantiomère R vers le même système avec l'énantiomère S et négative pour le chemin inverse ($\Delta F_{S \rightarrow R}$), excepté pour

la deuxième trajectoire avec le 4-méthylpentan-3-ol. Ces résultats indiquent que l'énergie libre est plus basse avec la forme *R* qu'avec *S* et correspondent donc à une énantiopréférence de la CALB pour la forme *R*. D'un point de vue qualitatif, la méthode de FEP donne donc des résultats en accord avec les valeurs expérimentales (tableau 7.2), excepté pour le 4-méthylpentan-3-ol où le calcul de FEP ne converge pas et ne permet pas de prédire l'énantiopréférence pour la forme *R* dans le cas de la seconde trajectoire.

La différence d'énergie libre attendue entre les états de transition est de l'ordre de seulement quelques kilocalories par mole. En effet, la différence d'énergie libre $\Delta\Delta G^\ddagger$ est reliée au ratio énantiomérique *E*, selon la formule : $\Delta\Delta G^\ddagger = -RT\ln E$ [91, 92, 93]. Avant de comparer quantitativement les $\Delta\Delta G_{exp.}^\ddagger$ expérimentaux et les valeurs calculées par FEP, il faut savoir que des substrats avec des ratios énantiomériques très différents donnent des différences d'énergie entre les états de transition très petites, pour des *E* compris entre 6 et 705, la différence d'énergie libre attendue est d'environ 3 kcal.mol⁻¹, et un peu plus de 1 kcal.mol⁻¹ pour des valeurs de *E* entre 80 et 705.

Pour le butan-2-ol, le calcul de FEP donne des différences d'énergie libre proches des valeurs expérimentales, à la fois dans le sens *R* vers *S* puis *S* vers *R* dans le cas de la première trajectoire. Pour la seconde trajectoire, la valeur du $\Delta F_{R\rightarrow S}$ diffère du $\Delta F_{S\rightarrow R}$ de 1,5 kcal.mol⁻¹, ce qui est supérieur au $\Delta\Delta G_{R\rightarrow S}^\ddagger_{exp.}$ expérimental. Dans ce cas particulier, la précision n'est pas suffisante pour offrir une prédiction quantitative de l'énantiosélectivité. Néanmoins, la valeur moyenne calculée de l'énergie libre $|\Delta F^{avg.}|$ (1.38 ± 0.66 kcal.mol⁻¹) est très proche de la valeur expérimentale (1.07 kcal.mol⁻¹).

Pour le pentan-2-ol et le 3-méthylbutan-2-ol, les calculs de FEP donnent des valeurs moyennes plus hautes que pour le butan-2-ol (respectivement 3,62 et 2,72 kcal.mol⁻¹ pour le pentan-2-ol et le 3-méthylbutan-2-ol contre 1.38 kcal.mol⁻¹ pour le butan-2-ol), en accord avec les valeurs expérimentales, mais ne permettent pas de différencier ces deux substrats ayant tous les deux des ratios énantiomériques importants (respectivement 330 et 705 pour le pentan-2-ol et le 3-méthylbutan-2-ol). En effet, l'énergie libre expérimentale $\Delta\Delta G_{R\rightarrow S}^{\ddagger, exp.}$ est attendue légèrement inférieure pour le pentan-2-ol (3,46 kcal.mol⁻¹ pour le pentan-2-ol, et 3,91 kcal.mol⁻¹ pour le 3-méthylbutan-2-ol), hors, nous observons que l'énergie libre calculée $|\Delta F^{avg.}|$ est supérieure pour le pentan-2-ol de près d'une kilocalorie (respectivement 3,62 et 2,72 kcal.mol⁻¹ pour le pentan-2-ol et le 3-méthylbutan-2-ol).

Les calculs avec le 4-méthylpentan-3-ol donnent une moins bonne convergence que le reste de la série d'alcools étudiés. Le second calcul fournit une énergie libre $\Delta F_{R \rightarrow S}$ presque nulle (-0,07 kcal.mol⁻¹) tandis que l'énergie libre mesurée sur le chemin retour $\Delta F_{S \rightarrow R}$ est positive (+1.60 kcal.mol⁻¹), alors que nous attendons une valeur négative. Il est possible que cela résulte du fait que le 4-méthylpentan-3-ol comporte un gros substituant nécessitant un réarrangement plus important de la structure de l'enzyme.

Pour l'hexan-3-ol, les résultats obtenus avec la trajectoire 1 (l'énergie libre moyenne calculée $|\Delta F^{avg.}|$ est de 2,58 kcal.mol⁻¹) sont proches des résultats expérimentaux (le $\Delta\Delta G_{R \rightarrow S}^{\ddagger \text{exp.}}$ est de 2,61 kcal.mol⁻¹) et sont en-dessous des valeurs obtenues pour le pentan-2-ol, ce qui est en accord avec les ratios énantiomériques des deux substrats. Les résultats de la trajectoire 2 et 3 fournissent néanmoins des ΔF un peu supérieurs à ceux de la trajectoire 1 et plus élevés que pour le pentan-2-ol alors que l'on attend des valeurs plus basses (l'énergie libre expérimentale $\Delta\Delta G_{R \rightarrow S}^{\ddagger \text{exp.}}$ est de 3,46 kcal.mol⁻¹ pour le pentan-2-ol contre 2,61 kcal.mol⁻¹ pour l'hexan-3-ol). Pour les trajectoires 2 et 3, l'énergie libre moyenne calculée $|\Delta F^{avg.}|$ est de 4,21 kcal.mol⁻¹.

Pour ce même substrat hexan-3-ol, une étude de la structure globale de la CALB durant la dynamique avec les trois trajectoires indépendantes a donné des indications sur l'implication possible de la structure secondaire du site actif dans ces résultats.

Sur la première trajectoire 1 présentant le ΔF le plus proche des résultats expérimentaux, on observe un petit décalage de l'hélice $\alpha 10$ en comparaison avec la structure cristallographique. Ce décalage de l'hélice ne se reproduit pas dans les deux autres trajectoires. Cela résulte de l'aléa généré au départ de la simulation pour l'attribution des vitesses aux atomes. Le mouvement de l'hélice dans la première simulation induit probablement un meilleur ajustement de l'enzyme au substrat expliquant la plus petite différence d'énergie libre observée pour cette trajectoire.

Des mouvements au niveau de cette hélice α ont été décrits par plusieurs auteurs. Trodler et Pleiss ont ainsi mis en évidence la flexibilité de cette hélice par dynamique moléculaire [75]. Skjøt *et al.* [94] ont récemment montré que durant une dynamique de 10 ns dans une boîte d'eau en condition périodique, la CALB présente une mobilité élevée au niveau des hélices $\alpha 5$ et 10.

L'hélice $\alpha 5$ n'est pas très éloignée du site actif, mais au regard de la taille des substrats

étudiés ici, l'hélice $\alpha 5$ a un effet négligeable sur la conformation du substrat. L'hélice 10 est directement en contact avec la chaîne latérale de l'alcool, plus spécifiquement les résidus I189, A278 et A282.

On trouve dans la littérature un autre exemple de tentative de prédiction de l'énantio-sélectivité par des mesures d'énergie libre à partir de trajectoires de dynamique moléculaire. Il s'agit des travaux de Zhou [45] qui utilisent une méthode différente de la FEP : Zhou calcule l'énergie libre à l'aide de la méthode de l'intégration thermodynamique. Dans ces calculs, l'angle dièdre impropre définissant la chiralité de l'alcool substrat est progressivement incrémenté pour faire basculer le système de la forme énantiomérique R vers S . Le protocole utilisé par Zhou pour ces calculs d'énergie libre dans le but de prédire l'énantiosélectivité chez la CALB donne des résultats quantitativement en accord avec les valeurs expérimentales pour deux alcools chiraux avec des substituants encombrants et le butan-2-ol, mais échoue dans la prédiction de l'énantiosélectivité d'un alcool chiral avec un bromide. Pour les différents substrats, la reproductibilité des calculs n'est malheureusement pas évaluée, une seule trajectoire par substrat étant présentée [45].

7.2.3 L'orientation initiale des substrats utilisée pour les calculs de FEP et évolution de cette orientation au cours des trajectoires de FEP

L'orientation de départ des alcools substrats est définie en accord avec le modèle suggéré par Haeffner *et al.* [26]. Pour tous les substrats excepté le pentan-2-ol, l'orientation initiale est bien conservée au cours de la dynamique pour les chaînes latérales des deux alcools R et S .

Ainsi, la chaîne latérale longue (groupe éthyle) du (S)-butan-2-ol est logée dans la poche stéréospécifique vers les acides aminés G39, T40 et T42. Tandis que la chaîne longue de l'alcool R est orientée vers la sortie du site actif (figure 7.6).

Concernant l'orientation des chaînes latérales du pentan-2-ol, on observe un léger réarrangement de la chaîne longue de l'énantiomère S qui se produit dans les deux trajectoires réalisées. Cela peut être observé sur la figure 7.7. La chaîne longue a tendance à se courber légèrement vers la sortie du site actif. Cela résulte des contraintes stériques

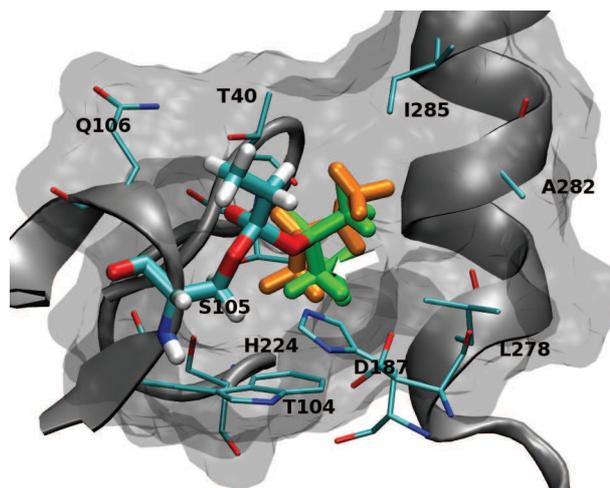


FIG. 7.6 – Intermédiaire tétraédrique (TI) et orientation des chaînes latérales des énantiomères du butan-2-ol. Énantiomère *S* en vert et *R* en orange. La flèche blanche pointe vers la poche stéréospécifique.

qui s'opèrent dans la poche stéréospécifique. Une telle orientation n'a pas été décrite précédemment.

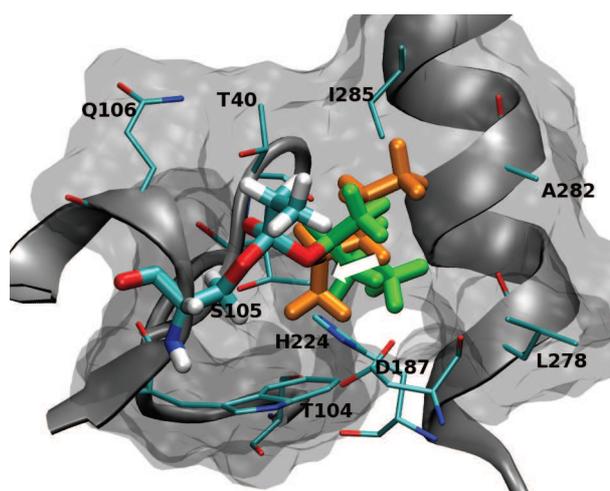


FIG. 7.7 – Intermédiaire tétraédrique (TI) et orientation des chaînes latérales des énantiomères du pentan-2-ol. Énantiomère *S* en vert et *R* en orange. La flèche blanche pointe vers la poche stéréospécifique.

L'orientation de l'hexan-3-ol est présentée sur la figure 7.8. La chaîne latérale longue est logée dans la poche stéréospécifique vers les acides aminés G39, T40 et T42, tandis que la chaîne longue de l'alcool *R* est orientée vers la sortie du site actif. On ne retrouve pas la même orientation que pour le pentan-2-ol.

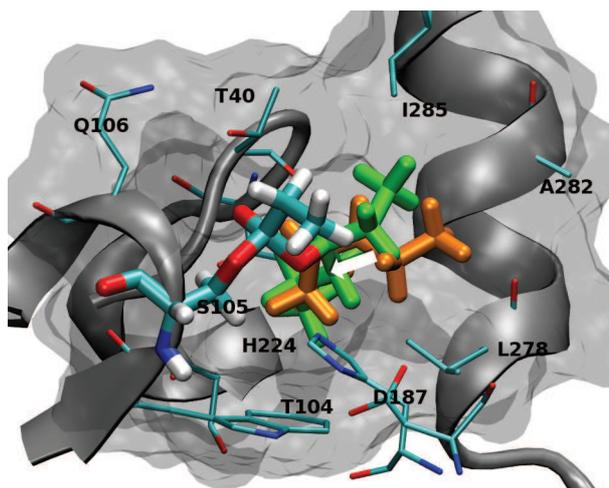


FIG. 7.8 – Intermédiaire tétraédrique (TI) et orientation des chaînes latérales des énantiomères de l’hexan-2-ol. Énantiomère *S* en vert et *R* en orange. La flèche blanche pointe vers la poche stéréospécifique.

7.2.4 Relation entre le profil de l’énergie libre de la réaction catalysée par l’enzyme et les résultats expérimentaux et théoriques

Les différences d’énergie calculées par la méthode de FEP s’intéressent à l’état de transition ES^\ddagger de la réaction et la vitesse de catalyse dépend de la barrière énergétique associée à la formation de l’état de transition.

Ici, les résultats expérimentaux montrent dans le cas du butan-2-ol, une V_{max} apparente un peu supérieure pour l’énantiomère *R* et montre que l’énantiosélectivité est surtout liée à la différence de K_M apparent. Ceci peut-être éclairé par l’explication suivante : dans la loi de Eyring, la constante de vitesse k de la réaction est définie en fonction de la température absolue T , de l’énergie d’activation ΔG^\ddagger de la réaction, et des constantes de Boltzmann k_B , de Planck h , et des gaz parfaits R , suivant la formule $k = \frac{k_B T}{h} e^{\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}}$. L’énergie d’activation ΔG^\ddagger correspond à la différence d’énergie libre entre l’état de base et la barrière énergétique du système. Dans le cas présent, le sommet de la barrière est modélisé par l’intermédiaire tétraédrique ES^\ddagger (une approximation raisonnable de l’état de transition). Concernant l’état de base, il peut être défini par le complexe enzyme-substrat ES . L’énergie d’activation correspond au ΔG_{kcat} (figure 7.9), et pour une concentration de complexe ES donnée, la vitesse catalytique est égale à

$k_{cat}[ES]$ comme cela est exprimé dans l'équation de Michaelis-Menten. Dans le modèle de Michaelis-Menten, la réaction s'opère au travers d'un modèle d'interaction classique enzyme-substrat, et le K_M peut-être assimilé à l'inverse d'une constante d'affinité, sous l'hypothèse de l'état stable. Un petit K_M correspond à une bonne affinité du substrat pour l'enzyme caractérisée par une plus basse énergie libre ΔG_{ES} stabilisant le complexe ES . Donc, comme présenté dans la figure 7.9, le K_M est lié à la différence d'énergie libre ΔG_{ES} entre le substrat libre et le substrat lié.

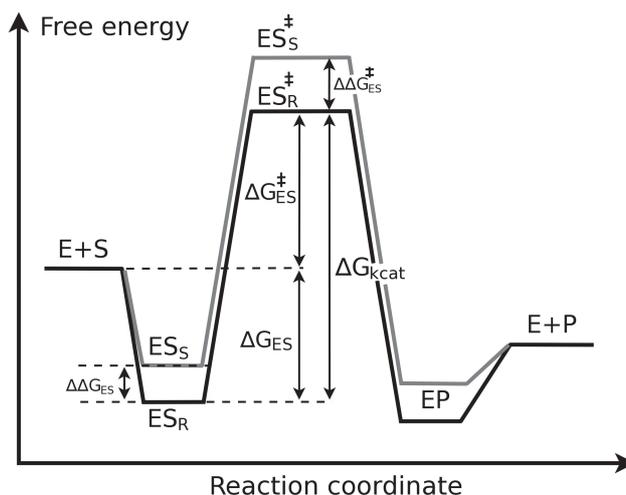


FIG. 7.9 – Profil énergétique de la catalyse enzymatique.

Les constantes de Michaelis apparentes $K_M^{app.}$ et les V_{max} pour les énantiopurs du butan-2-ol et du pentan-2-ol sont présentés dans le tableau 7.1. Ici, on observe expérimentalement que K_M est plus bas pour l'énantiomère R pour les deux substrats étudiés. Cela signifie que l'énergie du complexe ES est plus basse pour l'énantiomère R , et la différence d'affinité entre les deux énantiomères pour l'enzyme est caractérisée par la différence d'énergie libre $\Delta\Delta G_{ES}$.

Par ailleurs, les résultats expérimentaux montrent que le V_{max} apparent est beaucoup plus élevé pour l'énantiomère R dans le cas du pentan-2-ol (d'un facteur 48), indiquant que l'énergie libre ΔG_{kcat} est plus petite pour l'énantiomère R .

La différence d'énergie entre les états de transition $\Delta\Delta G^\ddagger$ dépend à la fois de $\Delta\Delta G_{ES}$ et de $\Delta\Delta G_{kcat}$, avec $\Delta\Delta G_{kcat} = \Delta G_{kcat} S - \Delta G_{kcat} R$.

En conséquence, l'énantiosélectivité est caractérisée par la différence d'énergie libre $\Delta\Delta G^\ddagger$ qui peut être exprimé comme $\Delta\Delta G^\ddagger = \Delta\Delta G_{ES} + \Delta\Delta G_{kcat}$, ces deux termes

correspondent respectivement à la différence de K_M et de V_{max} entre les énantiomères.

7.3 Conclusion sur l'évaluation du ratio énantiomérique et des calculs de FEP

Les résultats expérimentaux et théoriques présentés ici montrent que différents effets contribuent aux mécanismes complexes de l'énantiosélectivité chez la CALB.

Les résultats expérimentaux obtenus avec les formes énantiopures du butan-2-ol et du pentan-2-ol montrent que l'énantiopréférence de la CALB pour la forme R provient principalement du K_M apparent plus petit et dans une moindre mesure du V_{max} supérieur pour cet énantiomère dans le cas du butan-2-ol. À l'inverse, la contribution du V_{max} est particulièrement importante dans le cas du pentan-2-ol, suggérant qu'aucune règle ne peut être définie pour tous les substrats concernant la contribution des paramètres cinétiques à l'énantiosélectivité.

Les calculs de FEP présentés ici fournissent une prédiction qualitative de l'énantiopréférence de la CALB pour l'énantiomère R pour quatre des cinq substrats testés, néanmoins, la prédiction quantitative du ratio énantiomérique demeure difficile. La différence en valeur absolue entre les $\Delta\Delta G^\ddagger$ expérimentaux et théoriques peut être attribuée aux limitations de la méthode de modélisation concernant l'adaptation globale de l'enzyme aux substrats, en particulier pour les substrats encombrants comme l'hexan-3-ol. Néanmoins, la méthode demeure intéressante et peut être employée avec de nouveaux substrats sans l'aide d'un nombre significatif de données expérimentales pour ajuster le modèle, comme c'est le cas pour d'autres approches comme la méthode 3D-QSAR. De plus, la méthode de FEP employée ici permet de mieux connaître la géométrie de l'intermédiaire tétraédrique.

Chapitre 8

Étude de l'effet d'empreinte

L'effet d'empreinte est une hypothèse proposée pour expliquer des résultats expérimentaux dans lesquels on suppose qu'un additif (de type co-substrat par exemple) ou bien le premier substrat de la réaction, que l'on nomme « molécule à effet d'empreinte », aurait la faculté de modifier la conformation du site actif de la protéine lors de son passage, entraînant une modification des propriétés de l'enzyme, en particulier l'énantiosélectivité vis-à-vis d'un deuxième substrat et l'activité enzymatique.

Ce chapitre sur l'effet d'empreinte comporte trois parties majeures. La première partie concerne l'étude du modèle théorique de la cinétique Bi-Bi Ping-Pong et la validation de la méthode de mesure du ratio énantiomérique. La deuxième partie tente de mettre en évidence l'effet d'empreinte occasionné par le premier substrat de la réaction par modélisation moléculaire, dans le cas de la résolution d'alcools secondaires par transestérification catalysée par la CALB. La troisième partie comporte des travaux expérimentaux supplémentaires obtenus avec des molécules à effet d'empreinte ajoutées en plus des substrats, de type co-substrats.

8.1 Étude théorique de la cinétique du mécanisme Bi-Bi Ping-Pong impliquant un mélange racémique d'alcools comme second substrat

Les résultats expérimentaux présentés dans la partie 8.2 suivante montrent que dans le cadre de la résolution d'un alcool secondaire par une réaction de transestérification, la nature du premier substrat ester, en particulier sa partie alkoxylibérée au cours de la première étape de la réaction, a une influence importante sur l'énantiosélectivité de la CALB. Nous nous intéressons donc dans un premier temps au cas où l'effet d'empreinte serait provoqué par le premier substrat de la réaction, qui a donc un effet sur la résolution du deuxième substrat.

8.1.1 Étude du modèle cinétique

Une étude complète du modèle Bi-Bi Ping-Pong avec un ester et deux alcools énantiomères substrats est réalisée afin de valider la méthode de détermination du ratio énantiomérique utilisée au cours de ce travail. Cette étude cinétique fait écho à l'étude sur l'effet d'empreinte. En effet, afin de s'assurer que les différences d'énantiosélectivité obtenues sont bien dues à l'effet d'empreinte généré par l'alcool partant, il est nécessaire de vérifier qu'avec différents donneurs d'acyle, les différences de vitesse observées (et donc de ratios énantiomériques) ne sont pas dues à un effet cinétique limitant pendant l'étape d'acylation. Le modèle cinétique complet du mécanisme Bi-Bi Ping-Pong avec la compétition entre deux alcools substrats chiraux est présenté ici. Aussi, le ratio énantiomérique est exprimé en fonction des constantes de vitesse individuelles de la réaction, dans le but de déterminer si les constantes de vitesses de l'étape d'acylation peuvent influencer la valeur de E .

Le ratio énantiomérique est défini comme le ratio des constantes spécifiques pour les énantiomères R et S suivant la formule : $E = \frac{(k_{cat}^R/K_M^R)}{(k_{cat}^S/K_M^S)}$. La détermination des paramètres cinétiques est simple dans le cas d'une réaction monosubstrat suivant le mécanisme de

Michaelis-Menten :

$$v = \frac{k_{cat}[E]_t[S]}{(K_M + [S])} \quad (8.1)$$

Dans cette équation, on a l'égalité : $k_{cat}[E]_t = V_{max}$. Les réactions de transestérification catalysées par la CALB étudiées ici fonctionnent selon un modèle cinétique plus complexe. Elles impliquent un premier ester substrat, et deux alcools énantiomères en compétition : les formes R et S d'un alcool secondaire. Le modèle obéit à un mécanisme Bi-Bi Ping-Pong. Des expériences de cinétique classique, où l'on étudie la vitesse en fonction de la concentration en substrat fournissent des constantes apparentes K_M et V_{max} qui sont dépendantes des premières étapes du mécanisme, par exemple, la constante de Michaelis-Menten pour l'alcool R : K_M^R est égale à $\frac{k_2(k_3+k_4)}{k_3(k_4+k_2)}$ (figure 8.2), où k_2 dépend de l'alcool partant dans la première étape de la réaction. Ce genre d'observation pourrait expliquer les modifications du ratio énantiomérique observées lorsque le groupement alkoxy partant change. En conséquence, la relation entre les vitesses de l'étape d'acylation et le ratio énantiomérique mérite d'être étudiée.

Ici, le modèle cinétique complet pour le mécanisme Bi-Bi Ping-Pong avec un ester et deux alcools énantiomères est déterminé. Les équations cinétiques sont obtenues en utilisant la méthode de King-Altman [95] et les constantes spécifiques sont déterminées à l'aide de la méthode de Cleland [96].

Les travaux expérimentaux se focalisent sur la résolution d'un mélange racémique des formes R et S du pentan-2-ol, par le transfert d'acyle provenant d'un ester substrat. Le modèle de la transestérification est basé sur celui du mécanisme Bi-Bi Ping-Pong, où une seconde voie pour la réaction du second énantiomère est ajoutée, comme cela est illustré sur les figures 8.1 et 8.2, les représentations de Cleland et King-Altman.

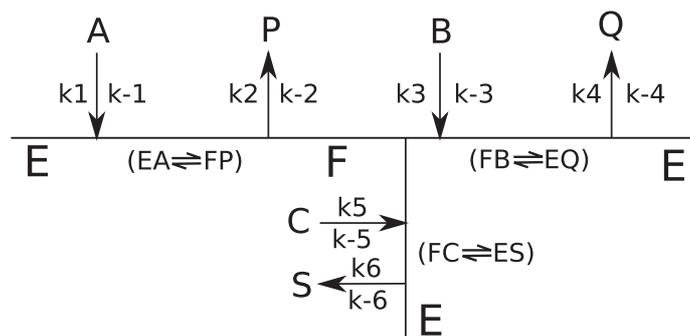


FIG. 8.1 – Représentation de Cleland avec l'enzyme (E), l'acyl-enzyme (F), l'ester (A), les alcools *R* et *S* (respectivement B and C), l'alcool partant produit (P), les esters produits *R* et *S* (respectivement Q and S).

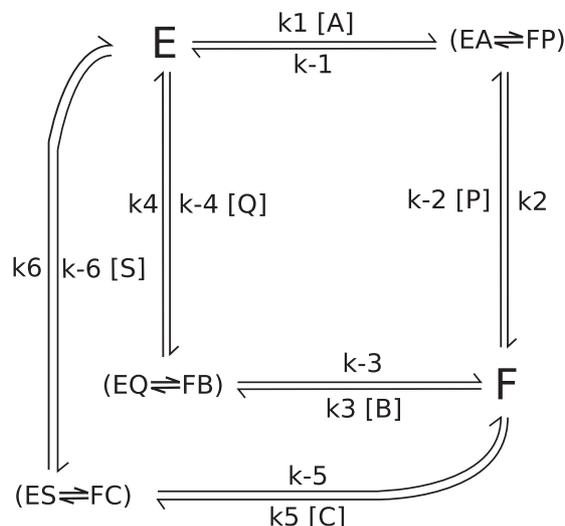


FIG. 8.2 – Représentation de King-Altman avec l'enzyme (E), l'acyl-enzyme (F), l'ester (A), les alcools *R* et *S* (respectivement B and C), l'alcool produit partant (P), les esters produits *R* et *S* (respectivement Q and S).

Le profil cinétique d'un système multisubstrat, tel que le système d'équations du modèle Bi-Bi Ping-Pong [95, 97] peut être résolu en utilisant la méthode de King-Altman.

Cette méthode a été implémentée sur un serveur par BioKin Ltd.¹ sous la forme d'un formulaire de requête dans lequel on renseigne le mécanisme et toutes les étapes de la réaction étudiée. Cet outil est utilisé pour obtenir la vitesse de formation des esters produits *R* et *S* en fonction de toutes les constantes catalytiques présentées dans les

¹Disponible à l'adresse internet suivante : <http://www.biokin.com/king-altman/>

représentations de Cleland et King-Altman.

Le modèle fournit des équations complètes dont les expressions détaillées sont données en annexe (Annexe A). L'équation est simplifiée en considérant que l'on se place dans un système aux conditions initiales, c'est-à-dire en l'absence de produit P, Q, et S. C'est notamment le cas dans les conditions expérimentales que nous avons choisies où le ratio énantiomérique est déterminé à partir du ratio des vitesses initiales. Ainsi, les vitesses initiales de formation des esters produits R et S sont obtenues :

$$\frac{v_{init.}^R}{[E]_t} = \frac{n_4[A][B]}{d_8[A][C] + d_9[A][B] + d_{13}[C] + d_{14}[B] + d_{15}[A]} \quad (8.2)$$

$$\frac{v_{init.}^S}{[E]_t} = \frac{n_6[A][C]}{d_8[A][C] + d_9[A][B] + d_{13}[C] + d_{14}[B] + d_{15}[A]} \quad (8.3)$$

Les formules complètes avec les valeurs de n_i et d_i sont reportées en annexe (Annexe A).

8.1.2 Détermination des paramètres cinétiques et de l'expression du ratio énantiomérique

La nomenclature de Cleland [96] permet de déterminer les constantes de Michaelis-Menten K_M pour les alcools (R) et (S) (respectivement K_M^R et K_M^S) et les vitesses maximales V_{max}^R et V_{max}^S . La détermination de ces paramètres est basée sur les coefficients des équations globales 8.2 et 8.3 comme cela est expliqué plus bas dans l'encart.

$$\frac{V_{max}^R}{[E]_t} = \frac{k_2 k_4}{k_4 + k_2} = k_{cat}^R \quad \frac{V_{max}^S}{[E]_t} = \frac{k_2 k_6}{k_6 + k_2} = k_{cat}^S \quad (8.4)$$

$$K_M^R = \frac{k_2 (k_{-3} + k_4)}{k_3 (k_4 + k_2)} \quad K_M^S = \frac{k_2 (k_{-5} + k_6)}{k_5 (k_6 + k_2)} \quad (8.5)$$

Les quatre paramètres K_M^R , K_M^S , V_{max}^R et V_{max}^S permettent de déterminer le ratio énantiomérique E , suivant la formule $E = (k_{cat}^R/K_M^R)/(k_{cat}^S/K_M^S)$:

$$E = \frac{k_3 k_4 (k_{-5} + k_6)}{k_5 k_6 (k_{-3} + k_4)} \quad (8.6)$$

Ainsi, on voit que la valeur de E n'est pas dépendante des constantes catalytiques impliquées dans l'étape d'acylation, la première partie de la réaction : k_1, k_{-1}, k_2, k_{-2} (voir les figures 8.1 et 8.2) indiquant que la nature de l'alcool partant n'influence par le ratio énantiomérique E , par des mécanismes purement cinétiques.

Par ailleurs, le ratio des vitesses initiales $v_{init.}^R/v_{init.}^S$ est égal à :

$$\frac{v_{init.}^R}{v_{init.}^S} = \frac{n_4[A][B]}{n_6[A][C]} = \frac{k_3 k_4 (k_{-5} + k_6) [B]}{k_5 k_6 (k_{-3} + k_4) [C]} \quad (8.7)$$

Donc, dans le cas de la mesure des vitesses de réaction dans les conditions initiales, où B et C les alcools énantiopurs sont en concentration équivalente, le ratio des vitesses $v_{init.}^R/v_{init.}^S$ est égal à :

$$\frac{v_{init.}^R}{v_{init.}^S} = \frac{k_3 k_4 (k_{-5} + k_6)}{k_5 k_6 (k_{-3} + k_4)} = E \quad (8.8)$$

Le ratio énantiomérique E est égal au ratio v^R/v^S dans les conditions de vitesse initiale (concentrations de produits insignifiantes) et avec un mélange racémique d'alcools au début de la réaction. Ce qui permet d'affirmer que la mesure du ratio des vitesses initiales v^R/v^S est une bonne méthode pour la détermination du ratio énantiomérique.

La relation d'égalité entre le ratio v^R/v^S dans les conditions initiales et le ratio énantiomérique E a précédemment été démontré par Chen (1982) dans le cas du modèle de Michaelis-Menten. Ici, on montre que cette égalité demeure correcte dans le cas d'un mécanisme Bi-Bi Ping-Pong avec deux alcools substrats énantiomères en compétition.

Les conclusions sont les suivantes, le E peut être correctement déterminé en mesurant le ratio des vitesses initiales pour la synthèse des esters énantiopures et E ne dépend pas des constantes catalytiques impliquées dans l'étape d'acylation.

Détermination des constantes de Michaelis et des vitesses maximales, (Segel [97], p. 523) :

"The $V_{max_{forward}}$ [...] will equal the numerator coefficient for that direction [...] divided by the coefficient of the denominator term which contains "the product of the concentrations of all substrates for the reaction in that direction".

"The Michaelis constant for any substrate or product will equal the ratio of two denominator coefficients. The denominator of the ratio is the same as that used in defining V_{max} for the given direction. The numerator of the ratio is chosen that, after canceling subscript letters, the only letter remaining as a denominator subscript is that corresponding to the substrate or the product in question."

En appliquant la définition citée ci-dessus dans notre cas, on obtient :

$$V_{max}^R = \frac{num_1^R}{CoeF_{AB}} \quad K_m^B = \frac{CoeF_A}{CoeF_{AB}} (= K_m^R) \quad (8.9)$$

$$V_{max}^S = \frac{num_1^S}{CoeF_{AC}} \quad K_m^C = \frac{CoeF_A}{CoeF_{AC}} (= K_m^S) \quad (8.10)$$

où A, B and C correspondent respectivement à l'ester, l'alcool R et S .

$$num_1^R = n_4^R = k_{+1}k_{+2}k_{+3}k_{+4}k_{-5} + k_{+1}k_{+2}k_{+3}k_{+4}k_{+6}$$

$$num_1^S = n_4^S = k_{+1}k_{+2}k_{-3}k_{+5}k_{+6} + k_{+1}k_{+2}k_{+4}k_{+5}k_{+6}$$

$$CoeF_A = d_{15}$$

$$CoeF_{AB} = d_9$$

$$CoeF_{AC} = d_8$$

Les expressions développées de d_8 , d_9 et d_{15} sont données en annexe (Annexe A).

8.2 Étude de l'effet d'empreinte engendré par le premier substrat ester de la réaction par modélisation moléculaire

La modélisation moléculaire est un outil formidable pour fournir une explication rationnelle aux résultats expérimentaux. En 2010, Lousa *et al.* ont fourni une explication structurale à l'effet d'empreinte [98] observé avec la subtilisine pré-traitée par co-lyophilisation avec un inhibiteur du site actif à l'aide de la modélisation moléculaire. Les résultats montrent qu'en présence de l'inhibiteur dans le site actif, ce dernier est maintenu dans une conformation ouverte, ceci de façon stable dans le solvant hexane, qui contraste avec la conformation présente dans les simulations réalisées avec l'enzyme non-traité.

Dans le cadre de l'hypothèse sur l'effet d'empreinte, on cherche à évaluer l'effet du premier substrat ester sur l'énantiosélectivité. L'hypothèse de départ est que la nature de cet ester, en particulier la nature de la chiralité du groupement alkoyle de l'ester propanoate de (\pm)-1-méthylpentyle aurait la capacité de modifier la conformation de l'enzyme qui s'adapterait à la forme de ce premier substrat, et influencerait donc l'énantiosélectivité de la CALB pour la résolution du mélange racémique de pentan-2-ol. On étudie donc par modélisation moléculaire l'influence des formes énantiomériques *R* et *S* du premier intermédiaire tétraédrique de la réaction formé avec le propanoate de (\pm)-1-méthylpentyle sur la structure de l'enzyme. Nous verrons ci-dessous que des résultats expérimentaux obtenus précédemment au laboratoire ont montré que la chiralité de l'ester substrat propanoate de (\pm)-1-méthylpentyle influence sur le ratio énantiomérique de la réaction.

On a donc réalisé une trajectoire de dynamique moléculaire de l'enzyme seul qui sert de référence, et une trajectoire de l'enzyme avec chaque énantiomère *R* et *S* de l'intermédiaire tétraédrique formé avec le propanoate de (\pm)-1-méthylpentyle.

8.2.1 Résultats expérimentaux de Marton

Des travaux réalisés par Marton [99] ont mis en évidence l'influence du groupe partant du donneur d'acyle pour la résolution du pentan-2-ol par la CALB dans le réacteur solide/gaz à 70 °C en condition anhydre (figure 8.3). La réaction de transestérification

implique un propanoate d'alkyle (donneur d'acyle) et le pentan-2-ol comme substrats et conduit à la formation du propanoate de (\pm)-1-méthylbutyle et d'un alcool. Les ratios énantiomériques obtenus avec différents groupes partant alkyle portés par le donneur d'acyle sont présentés dans le tableau 8.1.

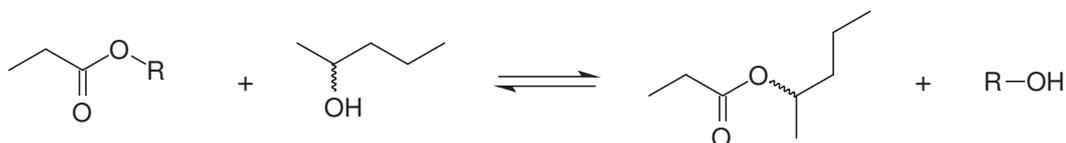


FIG. 8.3 – Réaction de transestérification entre un propanoate d'alkyle et le pentan-2-ol par la CALB dans le réacteur solide/gaz à 70 °C en condition anhydre. L'activité thermodynamique est de 0,1 pour l'ester et de 0,05 pour le pentan-2-ol (Marton, 2010).

TAB. 8.1 – Influence du donneur d'acyle sur le ratio énantiomérique E dans la résolution du pentan-2-ol catalysée par la CALB dans le réacteur solide/gaz à 70 °C en condition anhydre. L'activité thermodynamique est de 0,1 pour l'ester et de 0,05 pour le pentan-2-ol (Marton, 2010).

	Donneur d'acyle	E
	propanoate de méthyle	62
	propanoate d'éthyle	117
	propanoate de propyle	103
	propanoate de butyle	115
	propanoate de pentyle	105
	propanoate de 1-méthylpropyle	51
	propanoate de (\pm)-1-éthylbutyle	84
	propanoate de (\pm)-1-méthylpentyle	122
	propanoate de (R)-1-méthylpentyle	140
	propanoate de (S)-1-méthylpentyle	72

Ces résultats montrent une influence non négligeable du groupe partant sur l'énantio-sélectivité, le ratio énantiomérique E variant de 51 à 140. On observe que la chiralité du groupe partant influence également le ratio énantiomérique : avec le donneur d'acyle

propanoate de (*R*)-1-méthylpentyle, le *E* est de 140, tandis qu'avec la forme chirale *S*, le ratio *E* tombe à 72. Le ratio énantiomérique est égal à 122 avec le mélange racémique.

L'étude de l'influence de la longueur de la chaîne alkyle linéaire montre qu'avec un groupement méthyle, le ratio énantiomérique est d'environ 62 tandis qu'avec les autres groupements testés (jusqu'au pentyle), le *E* se situe entre 103 et 117. Concernant les esters ramifiés, le ratio énantiomérique s'étend de 51 pour le propanoate de 1-méthylpropyle, qui comporte le plus petit groupe alkoxy ramifié, à 140 pour le propanoate de (*R*)-1-méthylpentyle, le plus gros groupe alkoxy ramifié. Le mélange racémique de propanoate de (\pm)-1-méthylpentyle donne un ratio énantiomérique de 120. En revanche, le propanoate de (*S*)-1-méthylpentyle donne un ratio énantiomérique de seulement 72. Le propanoate de (\pm)-1-éthylbutyle comportant un groupement alkoxy de taille intermédiaire donne un ratio énantiomérique de 84. Il est difficile de fournir une explication rationnelle. On observe néanmoins que lorsque la structure du groupe partant se rapproche de celle de l'alcool préférentiellement transformé, l'énantiosélectivité augmente, en particulier dans le cas de l'étude réalisée avec les donneurs d'acyle énantio-purs.

Le but de ces travaux est de mettre en évidence une modification de la conformation de l'enzyme en présence des substrats *R* et *S* du propanoate de (\pm)-1-méthylpentyle dans l'intermédiaire tétraédrique. Dans ce but, nous étudions la structure de l'enzyme à l'aide de « clustering » des conformations adoptées par les trois différents systèmes étudiés, l'enzyme seul, l'enzyme avec la forme *R* du propanoate de (\pm)-1-méthylpentyle, et l'enzyme avec la *S* de ce même ester dans l'intermédiaire tétraédrique. Le « clustering » permet de mettre en évidence des conformations caractéristiques des trois systèmes étudiés et de les comparer entre-elles. Le « clustering » est basé sur la comparaison des structures à partir du RMSD du squelette peptidique de toute la séquence de l'enzyme dans un premier temps.

8.2.2 RMSD et « clustering » des trajectoires

Le RMSD des trois systèmes, l'enzyme seul (enz) et l'enzyme complexé à l'intermédiaire tétraédrique formé avec les énantiomères *R* (enz+IT-*R*) et *S* (enz+IT-*S*) du propanoate de 1-méthylpentyle, est présenté figure 8.4.

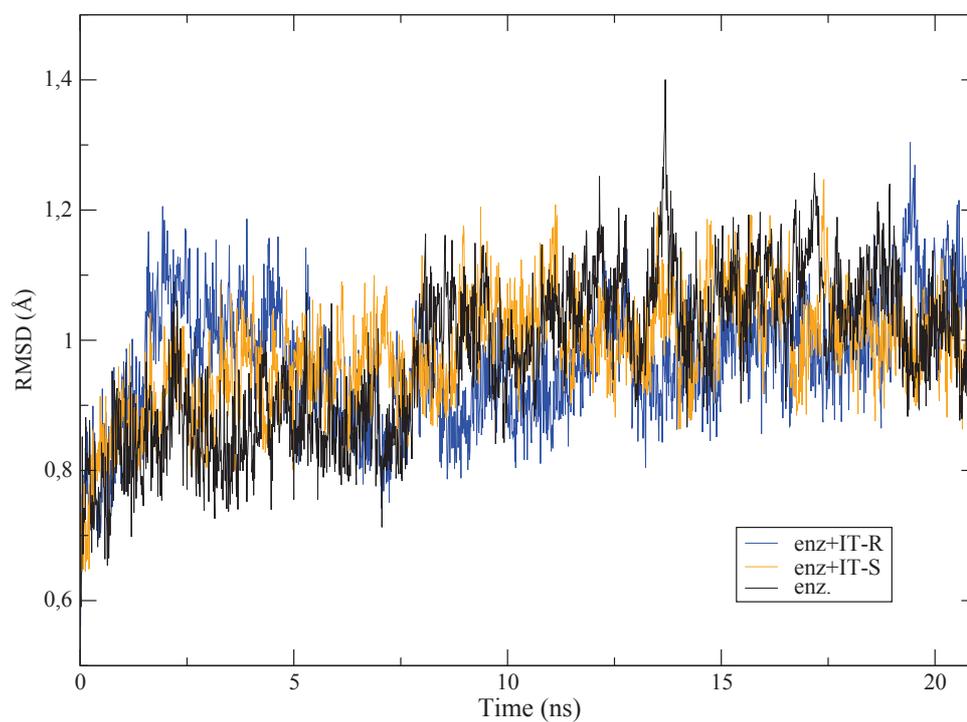


FIG. 8.4 – RMSD du squelette peptidique durant la dernière nanoseconde d'équilibration et les 20 ns de production pour l'enzyme seul (*enz*) et l'enzyme complexé à l'intermédiaire tétraédrique formé avec les énantiomères *R* (*enz+IT-R*) et *S* (*enz+IT-S*) du propanoate de 1-méthylpentyle.

Les matrices RMSD du squelette peptidique de toutes les structures sont présentées avec un code couleur figure 8.5.

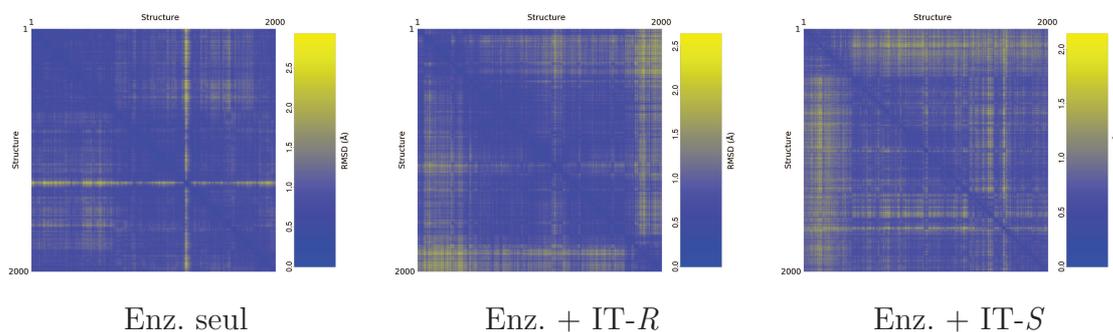


FIG. 8.5 – Matrices des RMSD calculées sur 2000 structures extraites de la dynamique de production représentées avec un code couleur pour l’enzyme seul et l’enzyme complexé à l’intermédiaire tétraédrique formé avec les énantiomères *R* et *S* du propanoate de 1-méthylpentyle.

L’étape de « clustering » par classification hiérarchique ascendante fournit des dendrogrammes, aussi appelés arbres de classification, tels que celui représenté figure 8.6. Les arbres de classification pour les systèmes avec les intermédiaires tétraédriques des énantiomères *R* et *S* du propanoate de 1-méthylpentyle sont présentées dans l’annexe B (figure B.1).

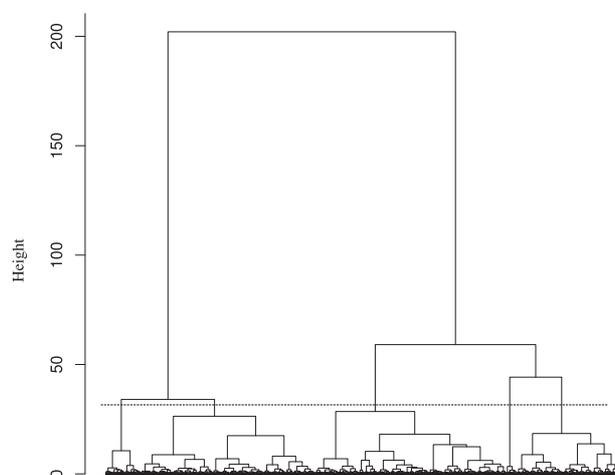


FIG. 8.6 – Dendrogramme défini à partir du « clustering » de la matrice RMSD pour l’enzyme seul. La barre horizontale en pointillé illustre la zone de coupure pour la définition de 5 clusters à partir de l’arbre de classification.

On peut ensuite définir un nombre de clusters arbitraires et représentatifs des différentes conformations du système et observer comment l’enzyme occupe ces clusters au cours du temps, comme cela est illustré sur la figure 8.7. Les figures équivalentes pour les

systèmes avec les intermédiaires tétraédriques des énantiomères R et S du propanoate de 1-méthylpentyle sont présentées dans l'annexe B (figures B.2 et B.3).

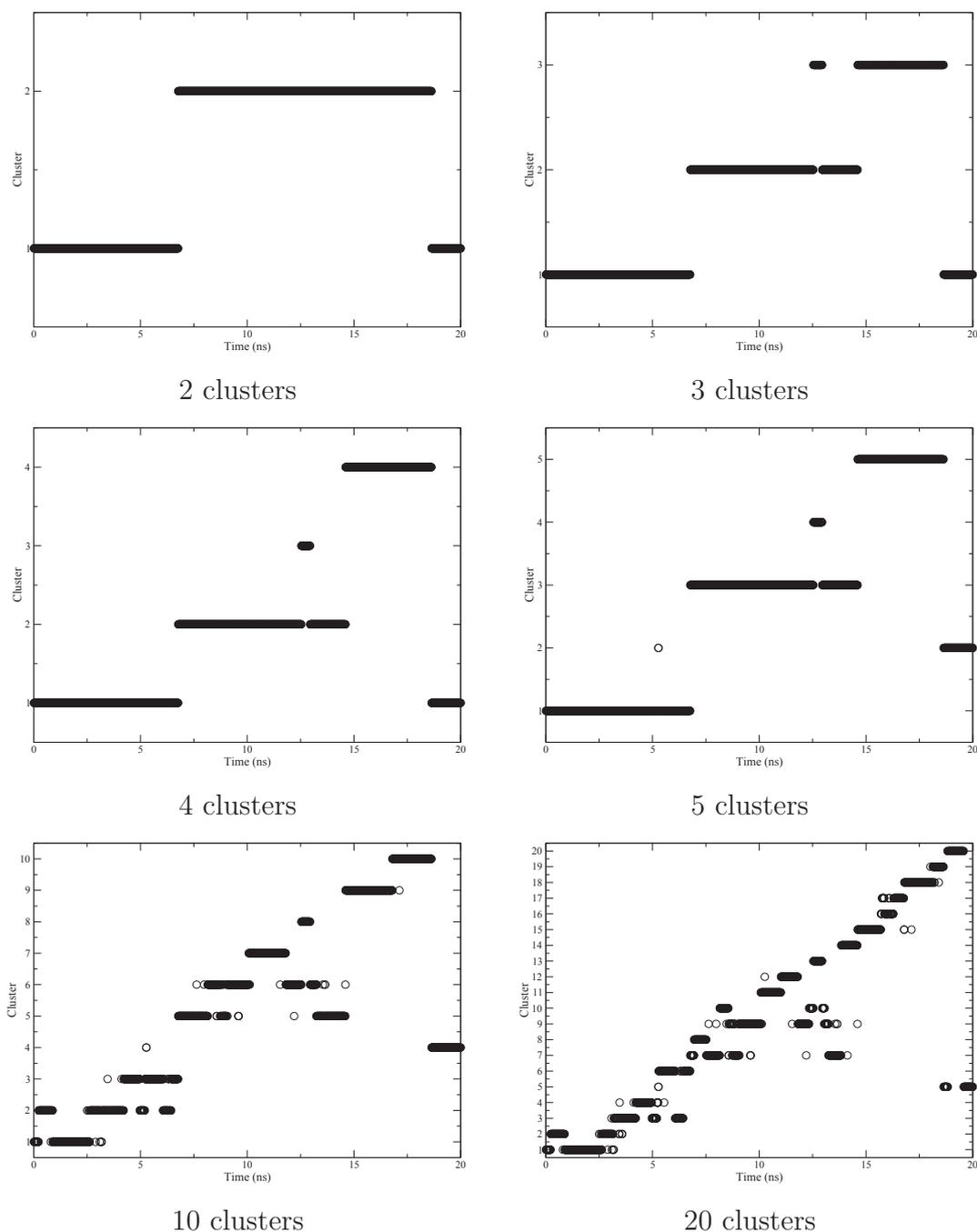


FIG. 8.7 – Appartenance des structures à 2, 3, 4, 5, 10 et 20 clusters au cours de la dynamique de 20 ns de production avec l'enzyme seul.

On peut choisir manuellement de couper à un niveau où les branches de l'arbre sont « longues », indiquant que les données contenues dans les clusters sont très différentes.

Nous nous contenterons ici d'extraire les deux clusters les plus représentatifs de chaque trajectoire. Les clusters choisis sont pris après 10 ns, lorsque la structure de l'enzyme est bien stabilisée.

Concernant l'enzyme seul, on calcule les structures moyennes pour les clusters numéro 2 et 5 présentés sur le découpage en cinq clusters du dendrogramme. Le cluster numéro 2 s'étend de 18,6 à 20,0 ns, le cluster numéro 5 s'étend de 14,6 à 18,6 ns

Pour l'enzyme avec l'intermédiaire tétraédrique formé avec le propanoate de (*R*)-1-méthylpentyle, on calcule les structures moyennes pour les deux clusters numéro 3 et 5 présentés sur le découpage en cinq clusters du dendrogramme. Le cluster numéro 3 s'étend de 12,4 à 17,7 ns, le cluster numéro 5 s'étend de 17,7 à 20,0 ns.

Enfin, pour l'enzyme avec l'intermédiaire tétraédrique formé avec le propanoate de (*S*)-1-méthylpentyle, on calcule les structures moyennes pour les deux clusters numéro 3 et 4 présentés sur le découpage en cinq clusters du dendrogramme. Le cluster numéro 3 s'étend de 8,3 à 13,8 ns, le cluster numéro 4 s'étend de 16,3 à 20,0 ns.

On calcule le RMSD après alignement des squelettes peptidiques pour les deux différentes structures moyennes obtenues à partir des clusters pour les trois systèmes étudiés, les résultats sont présentés tableau 8.2.

TAB. 8.2 – RMSD des clusters retenus pour les 3 systèmes étudiés.

		Enz		Enz+TI-R		Enz+TI-S	
		Av.2	Av.5	Av.3	Av.5	Av.3	Av.4
Enz	Av.2	0	0,926	1,057	1,057	0,982	1,020
	Av.5		0	1,112	1,112	0,986	0,987
Enz+TI-R	Av.3			0	0,802	1,192	1,028
	Av.5				0	1,192	1,028
Enz+TI-S	Av.3					0	0,843
	Av.4						0

On observe que les valeurs de RMSD sont comprises entre 0,802 et 1,192 Å. On n'observe pas de façon évidente de différences de RMSD marquées entre l'enzyme seul et l'enzyme complexé à l'intermédiaire tétraédrique, avec la forme *R* ou *S* de l'ester.

On s'intéresse maintenant à mieux comprendre les différences de RMSD lors de l'alignement des structures. Pour cela, on mesure la distance entre chaque atome dans les structures alignées, la distance mesurée est convertie en un code couleur (des faibles distances en bleu, aux distances plus importantes en rouge) appliqué à une des deux struc-

tures de l'enzyme. On visualise ainsi où se situe les différences structurales localement. Un exemple est présenté figure 8.8. Il met en évidence que les différences structurales entre les structures moyennées pour les clusters 2 et 5 de l'enzyme se portent essentiellement au niveau de l'hélice $\alpha 5$ (premier plan, en haut) et particulièrement au niveau des régions N-term et C-term de la séquence.

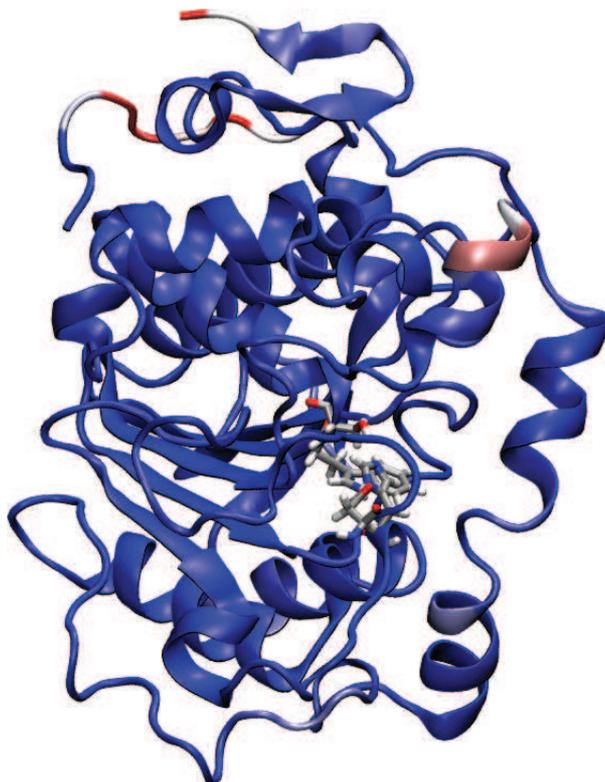


FIG. 8.8 – Mise en évidence (en rouge) des différences structurales entre les structures moyennées pour les clusters 2 et 5 de l'enzyme.

La figure 8.9 présente la structure du site actif et le positionnement de l'intermédiaire tétraédrique formé avec le propanoate de (*S*)-1-méthylpentyle.

8.2.3 Affinage du « clustering » de la CALB

On réalise un calcul de « clustering » sans les défauts du premier, c'est-à-dire en corrigeant la sur-représentation des effets de dérive des extrémités N-term et C-term et des mouvements importants de régions éloignées du site actif dans la matrice RMSD. Pour cela, on refait le « clustering » en alignant les structures sur un sous-ensemble en ne retenant que les résidus 35 à 80, 100 à 240 et 260 à 290.

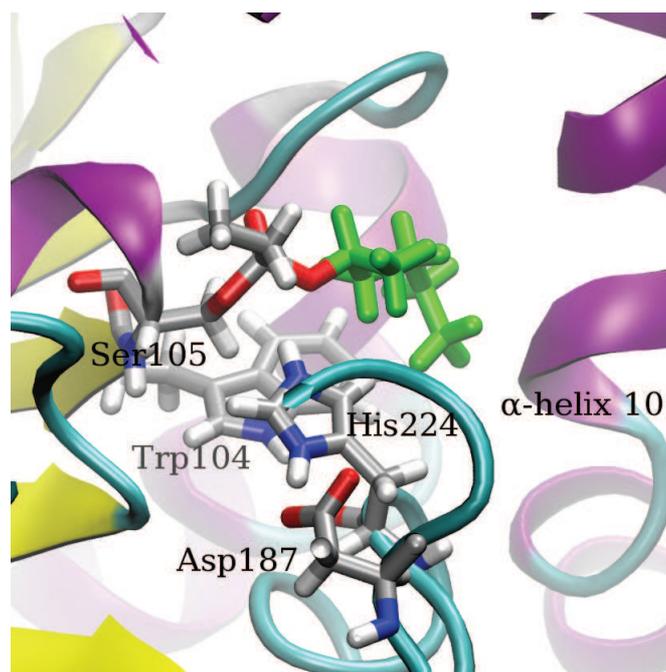


FIG. 8.9 – Snapshot de l’intermédiaire tétraédrique formé avec le propanoate de (*S*)-1-méthylpentyle.

Le RMSD des clusters retenus pour les 3 systèmes étudiés après alignement sur le squelette peptidique des résidus 35 à 80, 100 à 240 et 260 à 290 est présenté dans le tableau 8.3.

TAB. 8.3 – RMSD des clusters (basé sur les résidus 35 à 80, 100 à 240 et 260 à 290) retenus pour les 3 systèmes étudiés après alignement sur le squelette peptidique des résidus 35 à 80, 100 à 240 et 260 à 290

		Enz		Enz+TI-R		Enz+TI-S	
		Clust1	Clust2	Clust1	Clust2	Clust1	Clust2
Enz	Clust1	0	0,588	1,199	0,850	0,666	0,549
	Clust2		0	0,970	1,120	0,724	0,649
Enz+TI-R	Clust1			0	0,700	1,123	0,992
	Clust2				0	1,347	1,233
Enz+TI-S	Clust1					0	0,658
	Clust2						0

On observe sur les clusters présentés sur la figure 8.10 que le système considéré selon le sous-ensemble des résidus 35 à 80, 100 à 240 et 260 à 290 explore un ensemble de conformations qu’il revisite sans cesse au cours de la trajectoire de 20 ns, contrairement au premier « clustering » (figure 8.7) où la structure de l’enzyme prise sur son ensemble présentait en continu une exploration de nouveaux clusters, due principalement à la dérive

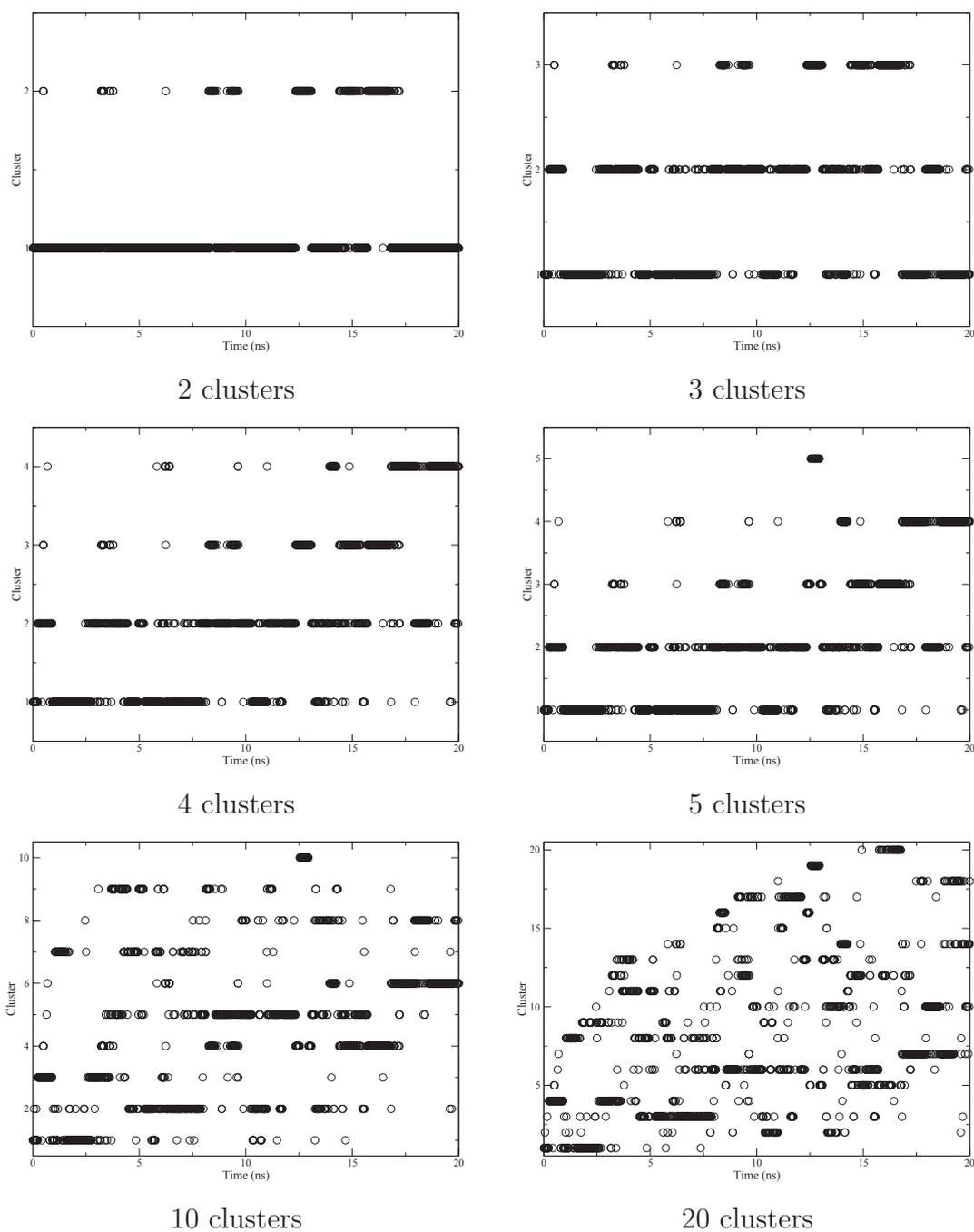


FIG. 8.10 – Appartenance des structures à 20, 10, 5, 4, 3, et 2 clusters au cours de la dynamique de 20 ns de production avec l'enzyme seul. « Clustering » basé sur les résidus 35 à 80, 100 à 240 et 260 à 290.

des extrémités N-term et C-term. Les figures équivalentes pour les systèmes avec les intermédiaires tétraédriques des énantiomères *R* et *S* du propanoate de 1-méthylpentyle sont présentées dans l'annexe B (figures B.4 et B.5). Ce nouveau « clustering » est donc beaucoup plus pertinent pour notre analyse.

La comparaison directe de la structure représentative des dix dernières nanosecondes pour les systèmes avec les énantiomères *R* et *S* est réalisée. Pour cela, on calcule une structure moyenne sur les dix dernières nanosecondes de la trajectoire de production (on échantillonne 1 000 structures prises à 10 ps d'intervalle). La figure 8.11 illustre visuellement les différences structurales globales entre les deux systèmes, tandis que la figure 8.12 illustre les zones de déviation des deux systèmes. Le positionnement de l'hélice $\alpha 5$ est la principale différence entre les deux systèmes.

L'étude de la conformation globale de la CALB n'a pas permis de mettre en évidence de modifications de la structure de l'enzyme résultant spécifiquement du positionnement des formes *R* et *S* du propanoate de 1-méthylpentyle dans le site actif. Les mouvements des hélices constatés précédemment n'étant pas dus à la présence des substrats dans l'intermédiaire tétraédrique. Dans le travail qui suit, nous focalisons l'étude de l'effet d'empreinte sur la conformation du site actif.

8.2.4 « Clustering » sur le site actif

Dans un troisième temps, les matrices des RMSD sont calculées en se focalisant sur les résidus du site actif, concrètement, le calcul RMSD est basé sur l'alignement de tous les atomes lourds des résidus 103, 104, 106, 224, 187, 40, 42, 47, 278, 282, 285 et du squelette peptidique du résidu 105 (les chaînes latérales de ce résidu étant spécifique à chacun des trois systèmes étudiés). Le travail d'extraction des clusters est réalisé comme précédemment.

Les graphiques présentant l'évolution du peuplement des clusters pour les systèmes avec les intermédiaires tétraédriques des énantiomères *R* et *S* du propanoate de 1-méthylpentyle sont présentées dans l'annexe B (figures B.6 et B.7). On observe dans le cas de l'énantiomère *R* une modification importante du peuplement des clusters aux environs de 9,5 ns. L'inspection visuelle du site actif met en évidence que cet événement est dû à la

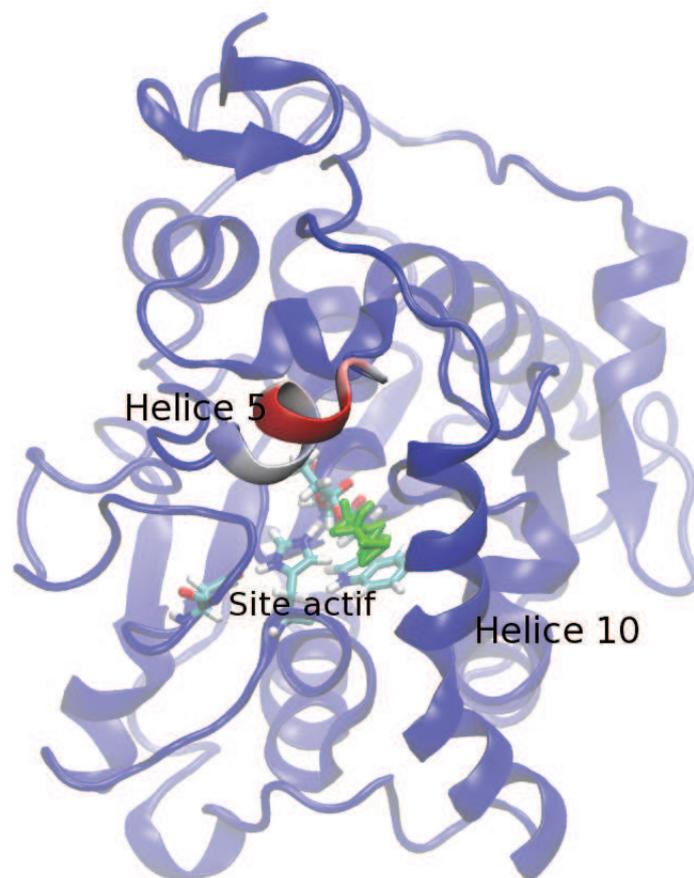


FIG. 8.11 – Comparaison directe de la structure représentative des dix dernières nanosecondes pour le système avec l'énantiomère *R* et *S*. Le code couleur indique en bleu les régions très bien superposées et en rouge les régions différentes.

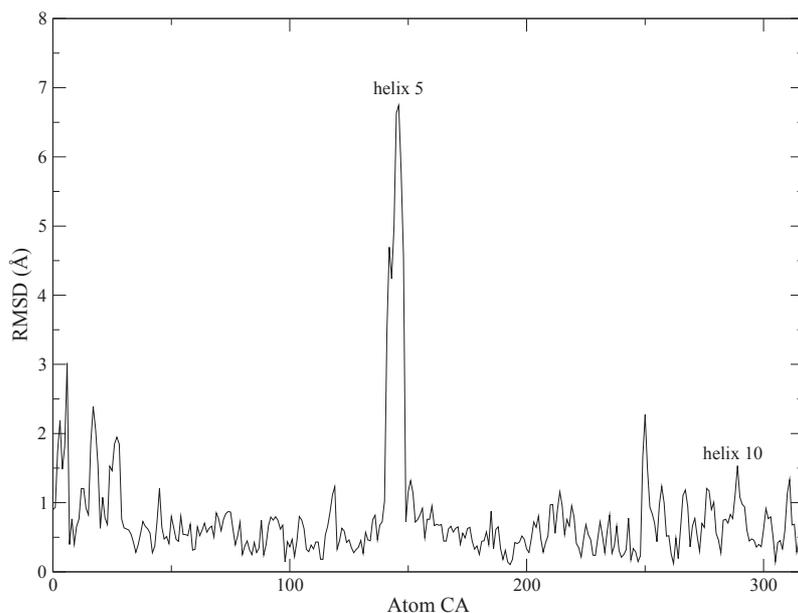


FIG. 8.12 – Mesure de la déviation (en Å) de chaque carbone α entre la structure représentative des dix dernières nanosecondes pour le système avec les énantiomères *R* et *S*.

rotation de la chaîne latérale du résidu I285 comme cela est présenté dans la figure 8.16.

On observe également une modification importante du peuplement des clusters aux environs de 10 ns dans le cas de la trajectoire avec l'énantiomère *S*. Cette modification correspond à une rotation de la chaîne latérale du résidu T42 (*cf.* figure 8.13). Le groupement hydroxyle et le groupement méthyle aux extrémités de la chaîne latérale échangeant leurs positions respectives.

On extrait finalement deux structures représentatives pour chaque système (extraction de deux clusters à partir du dendrogramme où l'on coupe l'arbre pour ne retenir que deux clusters). La confrontation des RMSD de ces structures représentatives est présentée dans le tableau 8.4.

Ces six structures alignées sont représentées figures 8.14 et 8.15. On voit que l'alignement est très bon pour les résidus 103-106. Globalement, l'alignement des acides aminés fournit des structures bien alignées, cette observation englobe également l'orientation des chaînes latérales, voir figure 8.15.

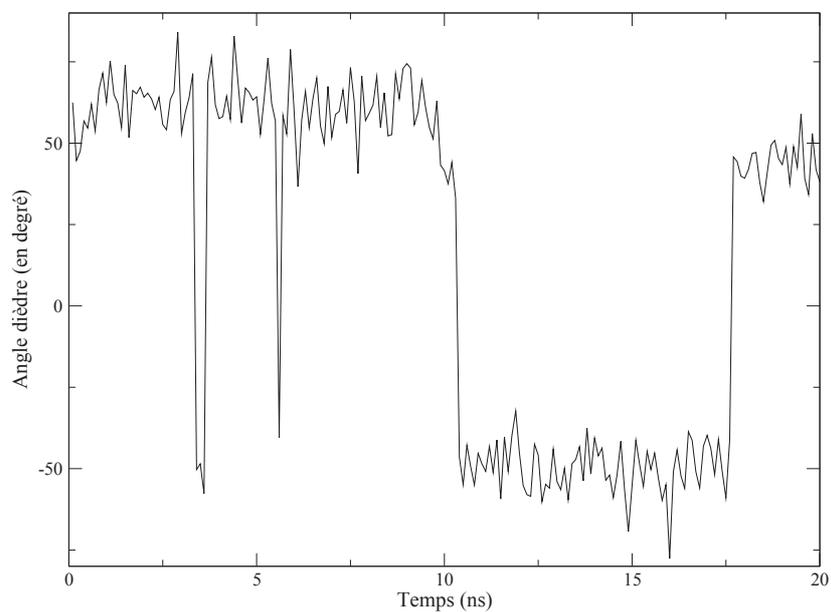


FIG. 8.13 – Angle dièdre définissant la rotation de toute la chaîne latérale du résidu T42 au cours de la trajectoire de 20 ns pour le système avec l'énantiomère *S*.

TAB. 8.4 – RMSD des clusters retenus pour les 3 systèmes étudiés après alignement sur le squelette peptidique des résidus 103, 104, 106, 224, 187, 40, 42, 47, 278, 282, 285 ainsi que du squelette peptidique du résidu 105, à l'exclusion des hydrogènes.

		Enz		Enz+TI-R		Enz+TI-S	
		Clust1	Clust2	Clust1	Clust2	Clust1	Clust2
Enz	Clust1	0	0,682	0,870	0,788	0,806	0,782
	Clust2		0	0,807	0,620	0,660	0,645
Enz+TI-R	Clust1			0	0,818	0,524	0,580
	Clust2				0	0,615	0,660
Enz+TI-S	Clust1					0	0,609
	Clust2						0

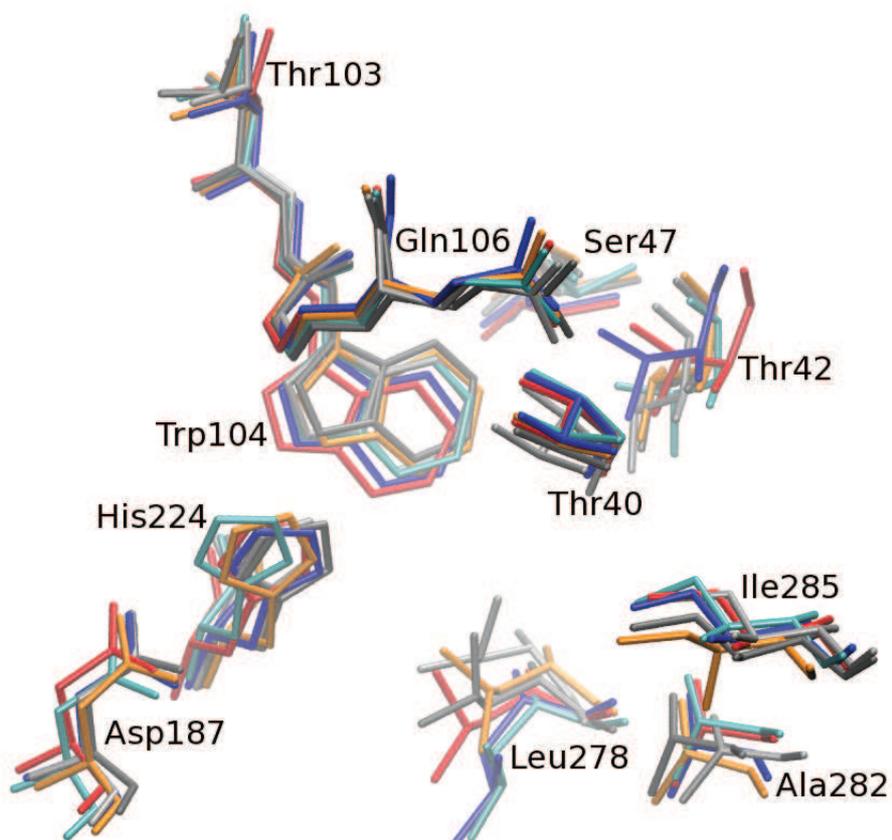


FIG. 8.14 – Vue 1. Site actif pour les six clusters retenus pour les trois systèmes étudiés après alignement sur le squelette peptidique des résidus 103, 104, 106, 224, 187, 40, 42, 47, 278, 282, 285 et du squelette peptidique du résidu 105, à l'exclusion des hydrogènes. Code couleur des clusters : S1 : bleu, S2 : bleu clair, R1 : rouge, R2 : orange, E1 : gris clair, E2 : gris foncé.

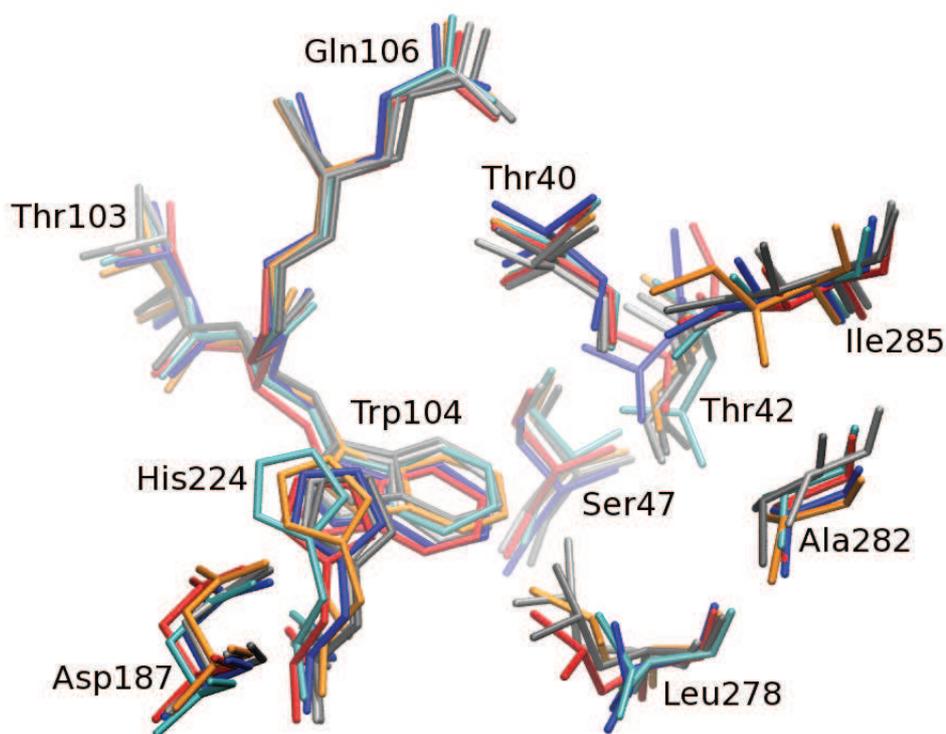


FIG. 8.15 – Vue 2. Site actif pour les six clusters retenus pour les trois systèmes étudiés après alignement sur le squelette peptidique des résidus 103, 104, 106, 224, 187, 40, 42, 47, 278, 282, 285 et du squelette peptidique du résidu 105, à l'exclusion des hydrogènes. Code couleur des clusters : S1 : bleu, S2 : bleu clair, R1 : rouge, R2 : orange, E1 : gris clair, E2 : gris foncé.

Néanmoins, l'orientation de la chaîne latérale du résidu I285 est différente pour le cluster 2 de TI-*R*. Cela peut être dû à la contrainte spécifiquement occasionnée par l'alcool énantiomère et l'orientation de sa chaîne latérale longue qui pointe vers le résidu I285. Ce résidu est situé sur l'hélice α numéro 10 qui vient border le site actif de la CALB. Dans le cas de l'énantiomère *R*, la chaîne latérale de I285 opère une rotation de 120 degrés vers 10 nanosecondes (figure 8.16), l'analyse de cluster est en accord avec cette observation, la trajectoire est séparée en deux clusters dominants : le premier avant la rotation et le second après. L'orientation de la chaîne latérale pour le système TI-*S* est la même que celle observée pour l'enzyme libre.

Marton *et al.* ont montré que des mutations des résidus portés par l'hélice α 10 affectent

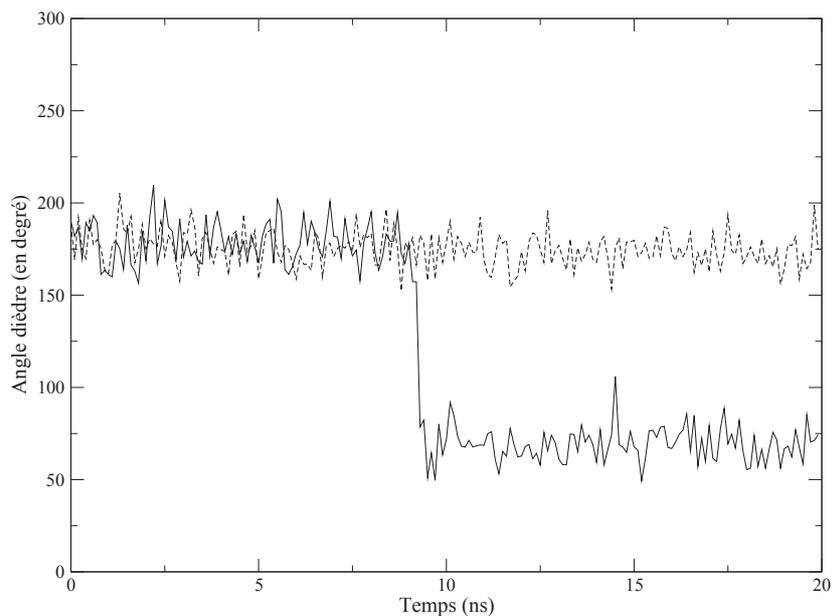


FIG. 8.16 – Angle dièdre définissant la rotation de toute la chaîne latérale du résidu I285. En trait plein pour le système avec l'énantiomère *R* et en pointillé pour l'énantiomère *S*.

taient l'énantiosélectivité [100]. Ainsi, on peut penser que la rotation de la chaîne latérale de I285 peut également influencer l'énantiosélectivité de la réaction.

D'autres auteurs ont réalisé des études de modélisation moléculaire pour explorer les changements structuraux de l'enzyme induits par l'effet d'empreinte. Rich et Dordick [60], dont les résultats sont présentés dans la partie Bibliographie, ont obtenu une augmentation significative de l'activité catalytique de la subtilisine et un meilleur contrôle de la spécificité enzymatique, avec la lyophilisation de la subtilisine en présence de différents substrats nucléophiles jouant le rôle de molécule à effet d'empreinte. Par des simulations de dynamique moléculaire, ils ont observé des modifications structurales au niveau de la triade catalytique qui pourraient contribuer à la modification de sélectivité induite par l'empreinte d'un ligand dans le site actif. Néanmoins, ces calculs portent sur des trajectoires de dynamique moléculaire très courtes de 10 ps, c'est-à-dire 2 000 fois plus courtes que les trajectoires que nous avons réalisées.

L'interrogation principale concerne l'échelle de temps de la rotation des chaînes latérales telles que celle de I285. L'échelle de temps de la rotation de chaînes enfouies est très vaste (10^{-4} à 1 s) [101]. La question est de savoir si la déformation du site actif provoquée au niveau du premier intermédiaire tétraédrique a une durée de vie suffisante

pour influencer la catalyse du second substrat ? Des résultats expérimentaux montrent que les chaînes latérales enfouies effectuent des rotations très lentement au regard de l'échelle de temps des simulations de dynamique moléculaire (de l'ordre de la ns). La résonance magnétique nucléaire a été employée par Skrynnikov *et al.* [102] pour la quantification de lents processus d'échange hydrogène-deuterium sur des chaînes latérales contenant des groupements méthyle dans des protéines. Cette méthode a été appliquée pour l'étude de la dynamique de l'ordre de la milliseconde de résidus méthionine dans une cavité enfouie. Ces auteurs ont observé que les résidus méthionine sont sensibles à des processus d'échange de l'ordre de $1\,200\text{ s}^{-1}$ à 20 °C , ces mouvements pourraient être liés à des processus qui permettent l'entrée et la sortie de ligands de la cavité. Des études similaires ont été conduites sur une protéase par Ishima *et al.* [103] mettant en évidence que l'échelle de temps des chaînes latérales méthyle enfouies était de l'ordre de 1 ms à l'aide de processus d'échange hydrogène-deuterium.

La chaîne latérale du résidu I285 est partiellement enfouie, elle est orientée vers le haut de la poche stéréospécifique dans le site actif, près de la chaîne latérale longue de l'alcool. Il est donc plausible que l'échelle de temps de la rotation de la chaîne latérale de I285 soit de l'ordre de 1 ms.

Précédemment, des ordres de grandeurs similaires ont été obtenus concernant la vitesse de catalyse de transestérification du pentan-2-ol dans le réacteur solide/gaz [104] : k_{cat} égale à 800 s^{-1} et 17 s^{-1} pour le (*R*)- et (*S*)-pentan-2-ol respectivement. La similarité de ces deux échelles de temps (rotation de chaîne latérale et catalyse des substrats) est compatible avec l'hypothèse de l'effet d'empreinte. La rotation de la chaîne latérale de I285 génère peut-être une conformation du site actif plus intéressante pour interagir avec le deuxième substrat qui ressemble à l'alcool énantiomère partant de forme *R*, expliquant ce qui est observé expérimentalement : l'énantiopréférence pour la forme *R* du pentan-2-ol augmente quand le propanoate de (*R*)-1-méthylpentyle est utilisé comme donneur d'acyle.

Les facteurs B des atomes du résidu I285 sont relativement élevés (tableau 8.5), ils sont compris entre 10,88 et 17,39 Å². De façon générale, les facteurs B de l'hélice $\alpha 10$ sont élevés, et ceux des atomes de la chaîne latérale du résidu I285 sont parmi les plus hauts de l'hélice $\alpha 10$. Cette observation amène à penser que l'hypothèse précédente sur

le rôle de I285 doit être considérée avec une grande prudence.

TAB. 8.5 – Facteur B des atomes du résidu I285 dans la structure PDB 1TCA.

N° (PDB)	Type d'atome	facteur B (Å^2)
2080	N	10,88
2081	CA	11,74
2082	C	11,72
2083	O	12,38
2084	CB	13,81
2085	CG1	14,09
2086	CG2	14,68
2087	CD1	17,39

8.2.5 Étude de la superposition du site actif de l'enzyme avec les deux formes énantiomériques de l'intermédiaire tétraédrique en alignant les structures de la CALB sur le feuillet de brins β

On s'intéresse à comparer la structure du site actif de l'enzyme avec les deux formes énantiomériques de l'intermédiaire tétraédrique après avoir aligné les structures de la CALB sur le feuillet β (figure 8.17), qui constitue une structure rigide de l'enzyme. Les résidus 20 à 22, 33 à 38, 62 à 66, 99 à 105, 126 à 131, 179 à 183 et 208 à 211 correspondent aux sept brins formant le feuillet. À partir des structures moyennées sur les dix dernières nanosecondes, on calcule le RMSD du squelette peptidique de ces résidus, il est de 0,518 Å. On ne constate pas de déformation du feuillet entre les deux structures.

Le RMSD du squelette peptidique sur les résidus du site actif (résidus 103, 104, 106, 224, 187, 40, 42, 47, 278, 282, 285) après alignement sur le feuillet β (résidus mentionnés plus haut) est de 0.772 Å. Ainsi, lorsque l'on aligne les structures sur le feuillet β , les résidus du site actif restent bien alignés. Ce nombre est dans la gamme de RMSD obtenue lorsque l'on aligne les structures directement sur le squelette peptidique des résidus du site actif (tableau 8.4), indiquant que le positionnement relatif du site actif par rapport au feuillet β n'est pas altéré par le positionnement des formes énantiomériques R et S de l'intermédiaire tétraédrique dans le site actif. La distance qui sépare le carbone α de I285 dans ces structures moyennées sur les 10 dernière nanosecondes pour l'intermédiaire

tétraédrique avec les formes *R* et *S* du propanoate de 1-méthylpentyle est de 1,40 Å.

La figure 8.17 illustre bien le fait que la chaîne latérale de I285 dans sa conformation initiale représente une gêne stérique (le cercle noir) pour le positionnement de la forme *R* du propanoate de 1-méthylpentyle.

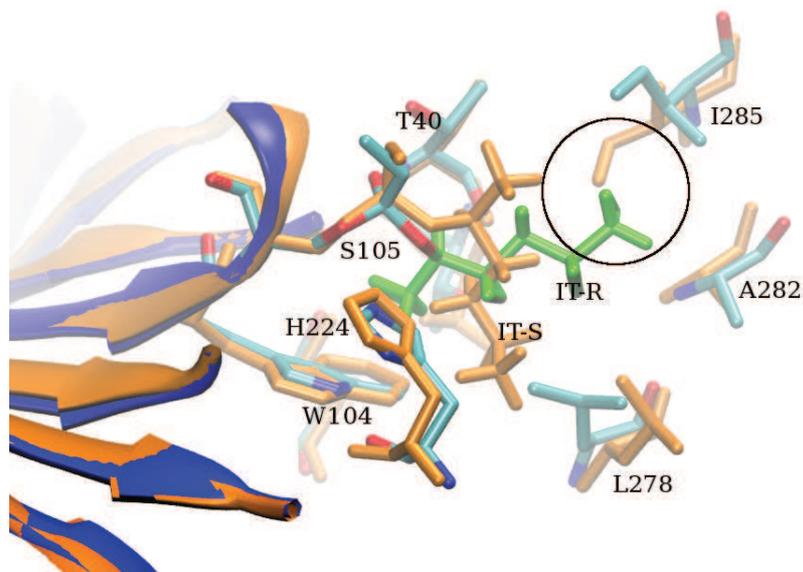


FIG. 8.17 – Représentation du feuillet β et du site actif avec enz-IT-*R* (feuillet en bleu, atomes de carbone en bleu ciel, atomes d'azote en bleu foncé, et atomes d'oxygène en rouge, groupe alkoyle du substrat en vert) et enz-IT-*S* (toute la structure en orange).

8.3 Résultats expérimentaux de l'étude de l'effet d'empreinte provoqué par des molécules co-substrats co-séchées ou co-immobilisées avec l'enzyme

Dans les travaux précédents, on a étudié le cas où l'effet d'empreinte serait dû au premier substrat, en particulier à la nature du groupement alkoxyde de l'ester substrat. Dans les travaux présentés ci-dessous, on étudie l'effet d'empreinte qui serait occasionné par des molécules de type co-substrat, incorporées à la préparation de l'enzyme. Nous nous intéressons à l'effet des deux formes énantiopures *R* et *S* du 2-aminohexane, ainsi que du 1-aminohexane, qui sont des substrats faiblement catalysés par l'enzyme. On réalise la résolution du pentan-2-ol par une réaction de transestérification présentée dans la figure 8.18. L'hypothèse sous-jacente est la même que précédemment, on cherche à voir si ces molécules peuvent influencer l'énantiosélectivité de l'enzyme, notamment en affectant la structure du site actif de la CALB.

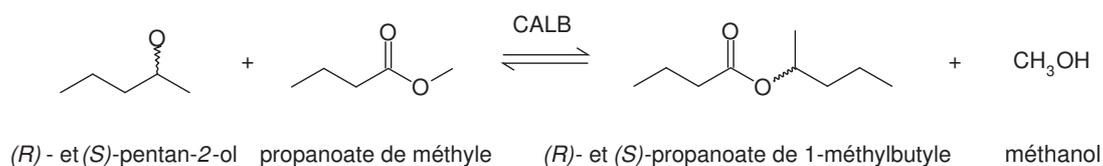


FIG. 8.18 – Réaction de transestérification pour la résolution du pentan-2-ol.

Deux méthodes de préparation de l'enzyme et d'inclusion des molécules à effet d'empreinte sont évaluées : la méthode du co-séchage, puis la co-immobilisation dans une matrice sol-gel. Les résultats présentés ci-dessous sont ceux utilisant la méthode du co-séchage.

Les résultats obtenus dans le réacteur solide/gaz à une température de 70 °C pour la résolution du pentan-2-ol sous forme de mélange racémique (formes *R* et *S*), par transestérification en présence de propanoate de méthyle comme donneur d'acyle, en utilisant la CALB immobilisée sur une résine acrylique (Novozym 435) seule ou co-séchée avec le (*R*)-, (*S*)-2-aminohexane ou 1-aminohexane (molécules à effet d'empreinte) utilisés dans différentes proportions (1, 10, 100 ou 1 000 mole d'amine par mole d'enzyme), sont présentés dans le tableau 8.6. Les activités enzymatiques sont présentées dans le

tableau 8.7. Notons que ces activités sont mesurées à température de 45 °C, tandis que les ratios énantiomériques sont mesurés à une température de 70 °C.

On observe une augmentation significative du ratio énantiomérique en présence du (*R*)-2-aminohexane, respectivement égale à 107, 109 et 77 avec les ratios de 1, 10 et 100 mole d'amine par mole d'enzyme. Avec le ratio de 1 000 (E=63), l'énantiosélectivité est proche de celle de l'enzyme seul (E=51).

En présence du (*S*)-2-aminohexane, et du 1-aminohexane, on observe un profil similaire à celui avec le (*R*)-2-aminohexane, l'énantiosélectivité est maximale lorsque le ratio de mole d'amine par mole d'enzyme est de 1, et diminue lorsque ce ratio augmente.

Le ratio de 1 pour le nombre de mole d'amine par mole d'enzyme fournit donc le plus grand ratio énantiomérique.

TAB. 8.6 – Ratios énantiomériques *E* pour la résolution du pentan-2-ol à une température de 70 °C avec le propanoate de méthyle par la CALB immobilisée seule et co-séchée avec le (*R*)-2-aminohexane, (*S*)-2-aminohexane et le 1-aminohexane avec des ratios du nombre de mole de molécule par nombre de mole d'enzyme compris entre 1 et 1 000. Les valeurs sont données avec un intervalle de confiance à 95 %.

Ratio ^[a]	Ratio énantiomérique			
	Enzyme seul	(<i>R</i>)-2-aminohexane	(<i>S</i>)-2-aminohexane	1-aminohexane
1		107±5	107±5	96±4
10	51±7	109±3	79±4	87±4
100		77±5	66±5	87±6
1 000		63±11	55±7	56±7

[a] Ratio de mole d'amine par mole d'enzyme.

La diminution du ratio énantiomérique lorsque la quantité de molécule à effet d'empreinte augmente est une observation plutôt étonnante. Ces résultats montrent que de petites quantités de molécule à effet d'empreinte présentent une influence importante et viennent donc conforter l'hypothèse avancée sur l'effet d'empreinte : la molécule à effet d'empreinte irait spécifiquement dans le site actif et déformerait ce dernier. Aussi, la diminution du ratio énantiomérique avec des quantités plus importantes de molécules tend à suggérer un mécanisme de réversion de l'effet d'empreinte dont la compréhension est incomplète. On observe cependant que l'augmentation du ratio énantiomérique s'accompagne d'une augmentation de la vitesse de catalyse de la forme *R* du pentan-2-ol. En effet, l'activité mesurée dans ces travaux est celle du produit de forme *R* car la production de

la forme *S* est négligeable par rapport à cette dernière. Ces observations suggèrent que les co-substrats améliorent l'énantiosélectivité en augmentant la vitesse de catalyse du *R* du pentan-2-ol, plutôt qu'en défavorisant la forme *S* du pentan-2-ol.

L'enzyme seul présente une activité de $0,26 \text{ mol.min}^{-1}.mg^{-1}$, on constate une augmentation de cette dernière avec l'ajout de molécules à effet d'empreinte dans des ratios de 1 à 100 mole d'amine par mole d'enzyme. La tendance générale semble indiquer que plus le ratio de mole d'amine par mole d'enzyme est faible, plus l'activité de la CALB est importante.

Avec le ratio de 1 000 mole de (*S*)-2-aminohexane par mole d'enzyme, la vitesse est de $0,29 \text{ mol.min}^{-1}.mg^{-1}$, ce qui est très proche de la vitesse de l'enzyme seul ($0,29 \text{ mol.min}^{-1}.mg^{-1}$). D'ailleurs, avec ce ratio de 1 000 mole de (*S*)-2-aminohexane par mole d'enzyme, le ratio énantiomérique (55) est également très proche de celui de l'enzyme seul (51).

TAB. 8.7 – Activités mesurées pour la résolution du pentan-2-ol à une température de 45 °C avec le propanoate de méthyle par la CALB immobilisée seule et co-séchée avec le (*R*)-2-aminohexane, (*S*)-2-aminohexane et le 1-aminohexane avec des ratios du nombre de mole de molécule par nombre de mole d'enzyme compris entre 1 et 1 000. Les valeurs sont données avec un intervalle de confiance à 95 %. Les vitesses sont exprimées en $\text{mol.min}^{-1}.mg^{-1}$ d'enzyme immobilisé.

Ratio ^[a]	Vitesse initiale de la réaction			
	Enzyme seul	(<i>R</i>)-2-aminohexane	(<i>S</i>)-2-aminohexane	1-aminohexane
1		0,36±0,05	0,36±0,07	0,46±0,07
10	0,26±0,02	0,44±0,07	0,39±0,06	0,45±0,07
100		0,39±0,03	0,35±0,04	0,42±0,04
1 000		0,37±0,02	0,29±0,05	0,39±0,08

^[a] Ratio de mole d'amine par mole d'enzyme.

Dans un deuxième temps, on s'intéresse aux résultats obtenus avec la CALB immobilisée seule ou co-immobilisée avec les co-substrats dans une matrice de type solution-gélification (sol-gel) formée en utilisant des précurseurs silanes.

Les résultats obtenus avec la CALB immobilisée seule en matrice sol-gel ou co-immobilisée avec différentes concentrations de (*R*)-, (*S*)-2-aminohexane ou 1-aminohexane (1 mole par mole d'enzyme ou 1 000 mole par mole d'enzyme) dans la matrice sol-gel sont présentés dans le tableau 8.8.

On constate que la valeur de *E* dans le cas de la CALB seule immobilisée dans une

matrice de type sol-gel n'est pas significativement différente des valeurs obtenues dans le cas de l'enzyme co-immobilisé avec les différents ratios de (*R*)-, (*S*)-2-aminohexane ou 1-aminohexane (tableau 8.8). En revanche, l'encapsulation de l'enzyme dans une matrice de type sol-gel a eu un effet très positif sur l'énantiosélectivité de la CALB. En effet, on obtient un *E* de 154 pour l'enzyme en matrice sol-gel. Cet même enzyme libre avant encapsulation présente un ratio énantiomérique de 109. On rappelle que le ratio énantiomérique n'est que de 51 dans le cas de la CALB immobilisée par adsorption sur la résine acrylique.

Concernant le rôle du support, Yang *et al.* ont réalisé la résolution du 4-hydroxy-3-méthyl-2-(2-propényl)-2-cyclopentèn-1-one (HMPC) à 30 °C par une acylation asymétrique avec la lipase de *Arthrobacter sp.* et l'acétate de vinyle en large excès comme donneur d'acyle [105]. La forme chirale *R* est préférentiellement catalysée. L'enzyme libre présente un ratio énantiomérique de 85. Yang *et al.* ont immobilisé l'enzyme sur des matériaux de type « terre de diatomée », greffés de divers groupes fonctionnels. L'immobilisation de l'enzyme permet d'augmenter sensiblement le ratio énantiomérique (*E* supérieur à 400) ainsi que l'activité enzymatique (d'un ratio 1,7 à 11,4). Le greffage de groupements fonctionnels méthacryloxypropyle, vinyle, octyle, dodécyle et γ -(aminopropyl)-glutaraldéhyde sur le support améliore davantage l'énantiosélectivité et l'activité de l'enzyme que le support de type « terre de diatomée » sans fonctionnalisation. Les auteurs suggèrent que l'augmentation de l'énantiosélectivité pourrait être due à une influence du support sur la conformation de l'enzyme, l'immobilisation de l'enzyme sur le support diminuerait notamment sa flexibilité.

Une même molécule agit de manière quasi-similaire pour les deux ratios étudiés (1/1 et 1 000/1). Une énantiosélectivité légèrement supérieure est obtenue en présence de (*R*)-2-aminohexane avec un ratio 1 000/1 pour lequel, la valeur de *E* est égale à 171, alors qu'elle n'est que de 154 pour l'enzyme témoin. à l'inverse, une énantiosélectivité légèrement inférieure est obtenue en présence de (*S*)-2-aminohexane avec un ratio 1 000/1 pour lequel, la valeur de *E* est égale à 123. Aucun effet n'est constaté en présence de 1-aminohexane.

Les activités enzymatiques sont présentées dans le tableau 8.9. Les valeurs obtenues pour l'enzyme seul et l'enzyme en présence des molécules à effet d'empreinte sont équivalentes. Ceci n'est pas surprenant au regard des ratios énantiomériques mesurées. La

TAB. 8.8 – Ratios énantiomériques E pour la résolution du pentan-2-ol à une température de 70 °C avec le propanoate de méthyle par la CALB immobilisée dans la matrice sol-gel avec le (*R*)-2-aminohexane, (*S*)-2-aminohexane et le 1-aminohexane avec des ratios du nombre de mole de molécule par nombre de mole d'enzyme égales à 1 et 1 000. Les valeurs sont données avec un intervalle de confiance à 95 %.

Ratio ^[a]	Enzyme seul	Ratio énantiomérique		
		(<i>R</i>)-2-aminohexane	(<i>S</i>)-2-aminohexane	1-aminohexane
1	154±3	152±6	123±7	152±3
1 000		171±1	140±8	153±2

^[a] Ratio de mole d'amine par mole d'enzyme.

méthode sol-gel n'a permis d'améliorer sensiblement ni l'énantiosélectivité, ni l'activité de la CALB.

TAB. 8.9 – Activités mesurées pour la résolution du pentan-2-ol à une température de 70 °C avec le propanoate de méthyle par la CALB immobilisée dans la matrice sol-gel avec le (*R*)-2-aminohexane, (*S*)-2-aminohexane et le 1-aminohexane avec des ratios du nombre de mole de molécule par nombre de mole d'enzyme égales à 1 et 1 000. Étant donné qu'il n'y a pas assez de répétitions de l'expérience, on ne peut pas fournir d'intervalle de confiance à 95 %. L'écart-type est de l'ordre de 1.10^{-3} . Les vitesses sont exprimées en $mol.min^{-1}.mg^{-1}$ d'enzyme immobilisé.

Ratio ^[a]	Enzyme seul	Vitesse initiale de la CALB		
		(<i>R</i>)-2-aminohexane	(<i>S</i>)-2-aminohexane	1-aminohexane
1	0,03	0,03	0,03	0,03
1 000		0,03	0,03	0,03

^[a] Ratio de mole d'amine par mole d'enzyme.

En conclusion, ces travaux ont montré que le co-séchage de la CALB avec des amines secondaires permet d'augmenter l'activité de l'enzyme et l'énantiosélectivité. Le phénomène sous-jacent est une réponse très spécifique et sensible de l'enzyme à ces molécules à effet d'empreinte puisque les petits ratios du nombre de mole d'amine par mole d'enzyme présentent les meilleures énantiosélectivités. En revanche, les expériences avec la matrice sol-gel n'ont entraîné que peu d'effet sur l'énantiosélectivité et aucun effet observable sur l'activité de l'enzyme. L'encapsulation de l'enzyme seul en milieu sol-gel a permis un gain substantiel d'énantiosélectivité.

8.4 Conclusion sur l'effet d'empreinte

L'étude théorique du modèle cinétique de façon exhaustive a permis de fournir l'expression du ratio énantiomérique en fonction des constantes catalytiques du modèle Bi-Bi Ping-Pong, et de valider la méthode d'évaluation expérimentale du ratio énantiomérique. Cette étude a montré de plus que le ratio énantiomérique n'est pas influencé par un effet cinétique au niveau de l'étape d'acylation. Les travaux de modélisation moléculaire ont tenté de mettre en évidence une perturbation de la structure de l'enzyme en présence des deux formes chirales du premier intermédiaire tétraédrique de la réaction dans le site actif. Aucune déformation globale de l'enzyme n'est mise en évidence, en revanche, des perturbations locales dans le site actif sont observées, en particulier la rotation de la chaîne latérale du résidu I285 avec la forme *R* de l'intermédiaire tétraédrique. La principale interrogation concerne la stabilité de cette perturbation entre la première et la seconde étape de la réaction. D'autres études sont nécessaires pour valider cette observation. Les travaux expérimentaux ont montré qu'il est possible d'améliorer l'énantiosélectivité de la CALB et son activité en co-séchant l'enzyme avec de très faibles quantités de (*R*)-2-aminohexane, de (*S*)-2-aminohexane ou de 1-aminohexane, 1 mole d'amine par mole d'enzyme suffit. Ces résultats sur l'énantiosélectivité de très petites quantités d'amine secondaire suggèrent un effet très spécifique, et une bonne affinité de ces co-substrats pour l'enzyme, ce qui vient conforter l'hypothèse de l'effet d'empreinte. Par ailleurs, l'immobilisation en milieu sol-gel apporte un gain d'énantiosélectivité substantiel par rapport à la forme libre de l'enzyme.

Chapitre 9

Étude de variants de la CALB obtenus par mutation au niveau de la poche stéréospécifique

On cherche ici à mieux comprendre le rôle joué par les résidus T42 et S47 et leur effet sur l'énantiosélectivité de la CALB. Pour cela, on étudie par modélisation moléculaire les trois mutants T42V, S47A, et T42V/S47A. L'étude se base sur des simulations de dynamique moléculaire de ces mutants et comporte notamment une analyse détaillée du volume de la poche stéréospécifique, une étude de la conformation des chaînes latérales des résidus de la poche stéréospécifique, et du réseau de liaisons hydrogène dans la poche stéréospécifique. Pourquoi s'intéresser de près à la poche stéréospécifique ? En raison du modèle de Haeffner [26] présenté dans la partie bibliographie qui confère à cette partie du site actif un rôle essentiel dans la définition de l'énantiosélectivité. En particulier, selon ce modèle, une diminution du volume de la poche stéréospécifique pourrait défavoriser le positionnement de l'alcool de chiralité *S* et donc sa catalyse, expliquant ainsi l'augmentation du ratio énantiomérique constatée pour les variants T42 et S47.

9.1 Les résultats expérimentaux

Les travaux de Marton *et al.* [100] ont mis en évidence une modification importante de l'énantiosélectivité de la CALB avec les mutants T42V, S47A, et T42V/S47A. Ces résidus

sont situés dans la poche stéréospécifique. L'énantiopréférence est pour la forme chirale *R* lors de la résolution d'alcools secondaires. Ces travaux portent sur l'acylation du pentan-2-ol avec le propanoate de méthyle comme donneur d'acyle, réalisée dans le réacteur solide/gaz à 318 K avec une activité de l'eau proche de zéro. Le ratio énantiomérique pour l'enzyme sauvage ($E = 101$) et le double mutant T42V/S47A ($E = 98$) sont proches. Les mutants T42V et S47A augmentent sensiblement l'énantiosélectivité (respectivement 236 et 198). L'énantiosélectivité augmente lorsque l'activité de l'eau augmente, jusqu'à un certain seuil, avant de diminuer à nouveau. Pour l'enzyme sauvage, l'énantiosélectivité maximale est atteinte pour une activité de l'eau égale à 0,2 ($E = 320$). Pour le double mutant T42V/S47A, l'énantiosélectivité atteint 289 avec une activité de l'eau de 0,3. Pour le mutant T42V, l'énantiosélectivité atteint 567 avec une activité de l'eau de 0,08. Pour le mutant S47A, l'énantiosélectivité atteint 449 avec une activité de l'eau de 0,1. Les auteurs suggèrent que les modifications du volume de la poche stéréospécifique sont marginales pour les mutations réalisées et que l'origine de la modification de l'énantiosélectivité pourrait provenir de la modification du réseau de liaisons hydrogène établies avec les résidus T42 et S47. L'augmentation du ratio énantiomérique pour les mutants T42V et S47A comparés à l'enzyme sauvage pourrait résulter d'une plus importante mobilité des chaînes latérales des résidus, n'étant plus impliqués dans des liaisons hydrogène. Leur mobilité supérieure pourrait selon Marton *et al.* rendre la poche stéréospécifique stériquement moins favorable au positionnement de l'énantiomère *S* et de ce fait augmenter l'énantiosélectivité. Rappelons que les travaux de Haeffner *et al.* [26], notre étude préliminaire ainsi que les trajectoires de dynamique moléculaire obtenues dans les calculs de FEP ont montré que l'alcool de chiralité *S* oriente sa chaîne latérale longue dans la poche stéréospécifique, tandis que l'alcool *R* oriente sa chaîne latérale moyenne dans la poche stéréospécifique, ceci étant stériquement moins contraignant et donc favorable pour la catalyse de cette forme chirale, expliquant ainsi l'énantiopréférence de l'enzyme pour la forme chirale *R*.

Dans ce chapitre, nous présentons des travaux de modélisation moléculaire visant à évaluer ces différentes hypothèses.

9.2 Analyse du volume de la poche stéréospécifique de la CALB sauvage et de ses variants

L'étude cherche à analyser le volume du site actif, et plus spécifiquement de la poche stéréospécifique pour la CALB sauvage et ses variants T42V, S47A, et T42V/S47A. Pour cela, on utilise l'étendue des fonctions du programme Charmm pour mettre au point une méthode de suivi du volume du site actif au cours de la trajectoire.

9.2.1 Analyse des variables d'ajustement de l'outil de mesure du volume de la poche stéréospécifique

La mesure du volume du site actif est une tâche délicate et de nombreux arbitrages sont nécessaires. Les principaux points critiques concernent la délimitation du volume à étudier et la notion d'espace libre dans le volume étudié.

La figure 9.1 représente le RMSD du squelette peptidique de la structure au cours de la trajectoire de production de 10 ns pour l'enzyme sauvage et les variants, comparé avec la structure cristallographique.

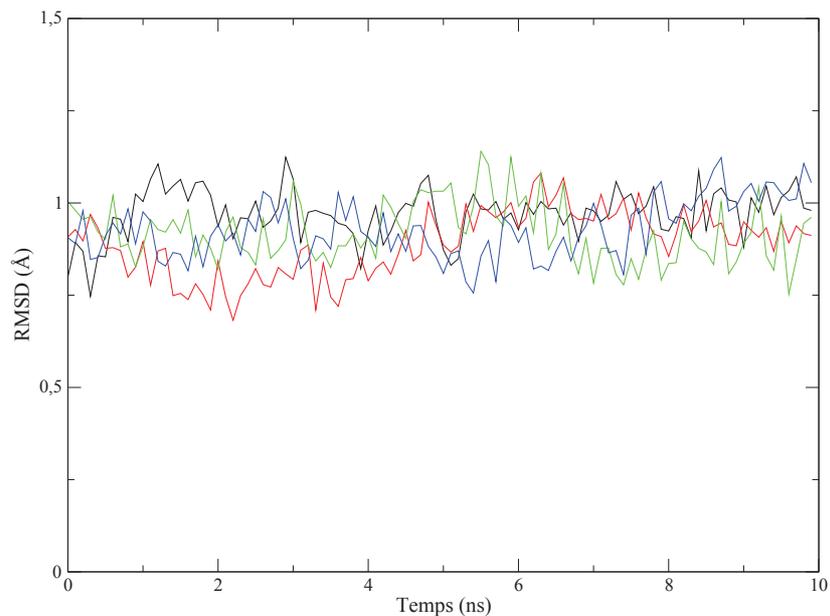


FIG. 9.1 – RMSD du squelette peptidique de la structure au cours de la trajectoire de production de 10 ns comparé avec la structure cristallographique. En noir, l'enzyme sauvage, en rouge le mutant T42V, en vert, le mutant S47A, en bleu le double mutant T42V/S47A.

Les quatre systèmes étudiés sont stables, leur RMSD oscille sur un plateau essentiellement autour de 0,8 à 1 Å.

L'approche utilisée ici consiste à définir un parallélépipède rectangle. Cette figure tridimensionnelle est positionnée au niveau du site actif à l'aide 6 coordonnées : X_{min} , X_{max} , Y_{min} , Y_{max} , Z_{min} et Z_{max} . Le volume du parallélépipède est : $|X_{max} - X_{min}| \times |Y_{max} - Y_{min}| \times |Z_{max} - Z_{min}|$.

Les valeurs de X_{min} , X_{max} , Y_{min} , Y_{max} , Z_{min} et Z_{max} sont définies à partir des positions des carbones α d'acides aminés encadrant le site actif : $X_{min} = X_{C\alpha/42}$, $X_{max} = X_{C\alpha/278}$, $Y_{min} = Y_{C\alpha/104}$, $Y_{max} = Y_{C\alpha/278}$, $Z_{min} = Z_{C\alpha/104}$ et $Z_{max} = Z_{C\alpha/40}$. Étant donné que les positions relatives des carbones α évoluent au cours de la trajectoire. Le volume du parallélépipède fluctue au cours du temps comme cela est présenté figure 9.2.

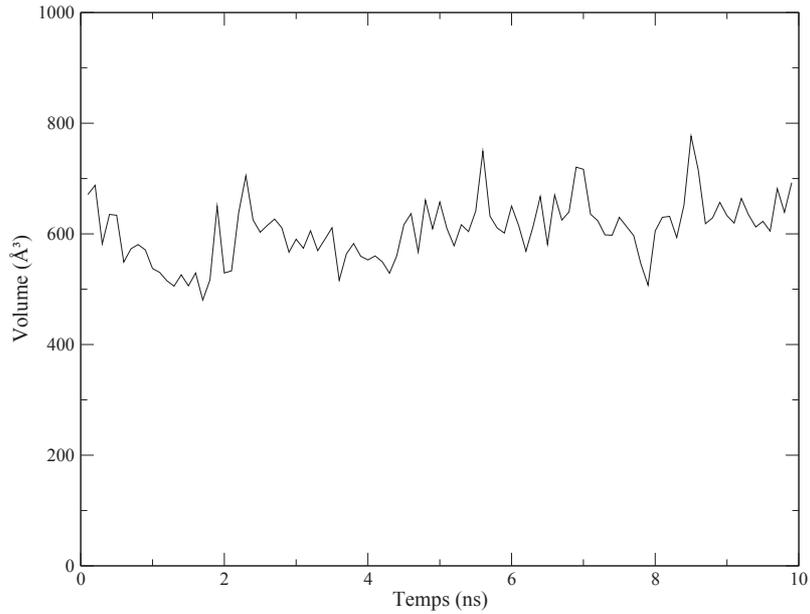


FIG. 9.2 – Fluctuation du volume (\AA^3) du parallélépipède au cours de la dynamique de 10 ns pour l'enzyme sauvage défini à partir des coordonnées suivantes : $X_{min} = X_{C\alpha/42}$, $X_{max} = X_{C\alpha/278}$, $Y_{min} = Y_{C\alpha/104}$, $Y_{max} = Y_{C\alpha/278}$, $Z_{min} = Z_{C\alpha/104}$, $Z_{max} = Z_{C\alpha/40}$.

On peut donc se demander s'il n'est pas judicieux de fixer la taille et l'emplacement du volume analysé une fois pour toute sur une structure de référence telle que la structure cristallographique. La figure 9.3 nous montre que les deux possibilités aboutissent à des résultats très similaires. Dans tous les cas, les structures de la trajectoire doivent être alignées (RMSD) sur une structure de référence pour ne pas biaiser l'axe de l'orientation du parallélépipède, cela est d'autant plus important que l'enzyme est sujet à de légers mouvements de translation et de rotation au cours de la trajectoire.

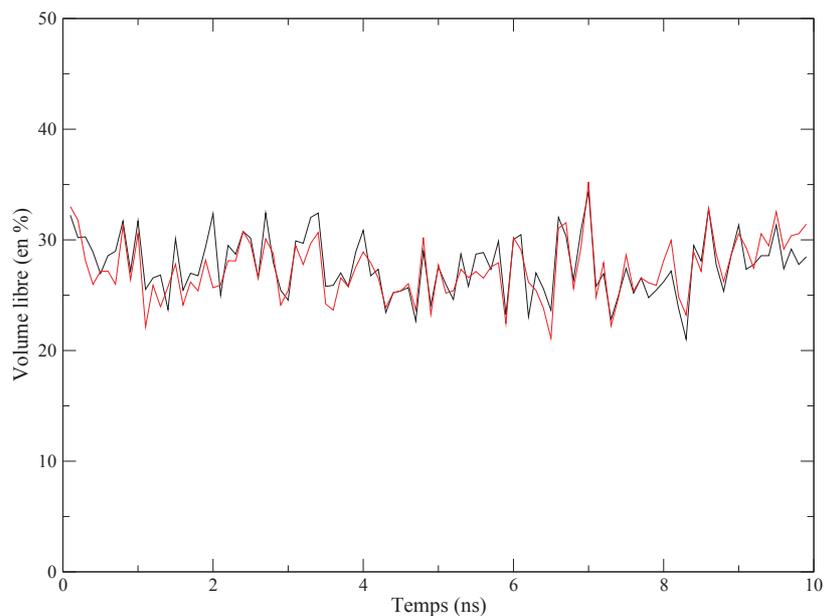


FIG. 9.3 – Fraction de volume libre au cours de la dynamique de 10 ns pour l'enzyme sauvage, en utilisant le critère d'espace libre dans un rayon équivalent à la distance de van der Waals. En noir, la taille du parallélépipède définie selon la position des carbones α clefs est recalculée sur chaque structure. En rouge, la taille et la position du parallélépipède sont calculées une fois pour toute sur la structure cristallographique 1TCA.

Au sein de ce volume, une grille avec un maillage (au choix) de 0,2 à 1 Å est définie, ensuite, une sonde parcourt chaque noeud du maillage et évalue s'il s'agit d'une zone « vide ». La fraction de volume libre calculée en utilisant un maillage de 0,2 et 1 Å sont relativement proches comme le montre la figure 9.4.

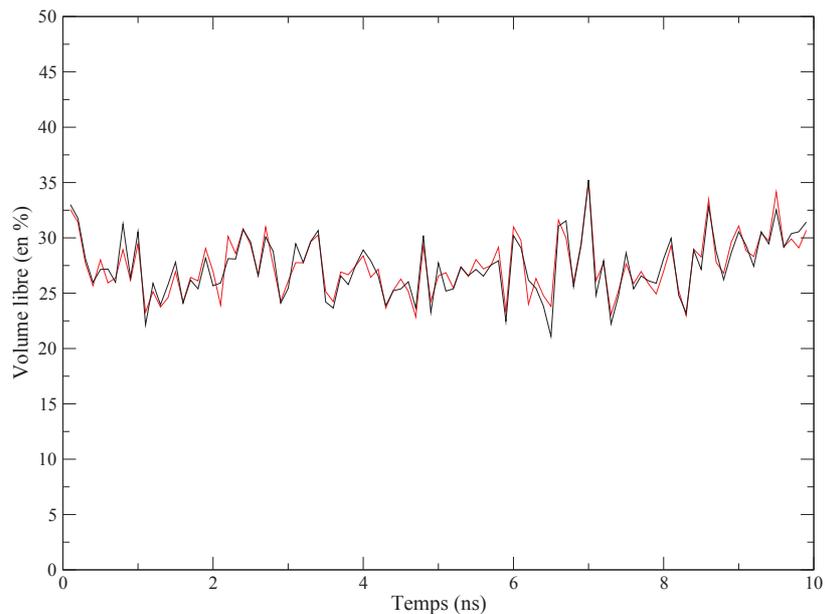


FIG. 9.4 – Fraction de volume libre au cours de la dynamique de 10 ns pour l’enzyme sauvage, en utilisant le critère d’espace libre dans un rayon équivalent à la distance de van der Waals, la taille et la position du parallélépipède sont calculées une fois pour toute sur la structure cristallographique 1TCA. La résolution du maillage de la grille explorée par la sonde est de 1 Å pour le tracé en noir, et de 0,2 Å pour le tracé en rouge.

La nature de la matière et sa représentation *in silico* étant lacunaire, définir un noeud de la grille comme « vide » implique de mesurer la distance qui sépare ce noeud de l’atome le plus proche. Très classiquement, on peut considérer qu’un point de l’espace correspond à un espace vide si aucun atome ne se trouve inclus dans un rayon arbitraire (de l’ordre de la distance de van der Waals par exemple) du point dans l’espace. La distance de van der Waals est le critère retenu pour les mesures présentées dans les figures 9.3 et 9.4.

Un autre critère pour explorer l’espace vide dans le site actif est de chercher les zones pouvant accueillir une molécule d’eau, pour cela, le manuel de Charmm¹ propose d’utiliser le rayon de van der Waals augmenté de 1,6 Å, le tout multiplié par 0,85. Cette opération uniformise et augmente le rayon des différents types d’atomes. Lorsque cette dernière option est choisie, un très faible nombre de points dans la grille peuvent laisser place à une molécule d’eau, moins de 5 % des points de la grille dans le cas présent comme le

¹La commande SEARCH est décrite sur le site de CHARMM (<http://www.charmm.org>) dans la rubrique des commandes pour la manipulation des coordonnées.

montre la figure 9.5.

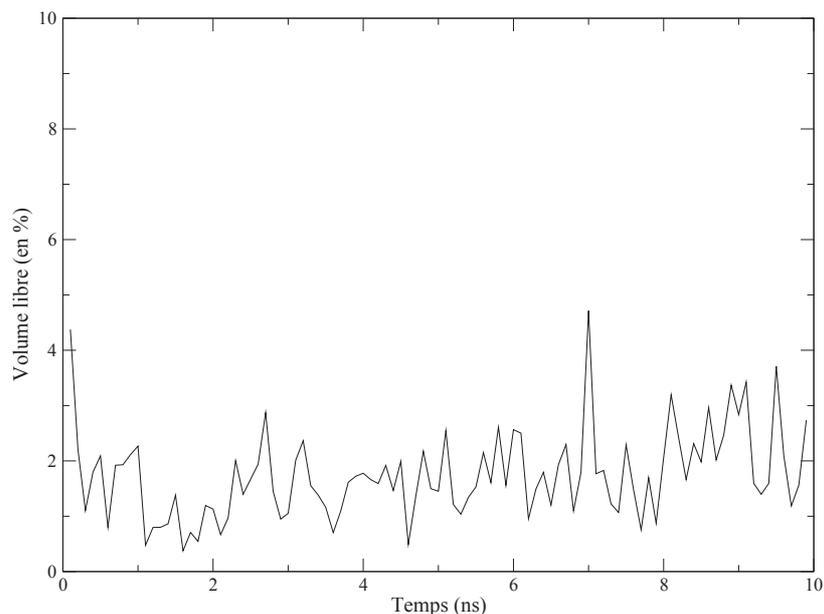


FIG. 9.5 – Fraction de volume libre au cours de la dynamique de 10 ns pour l’enzyme sauvage, en utilisant le critère d’espace libre dans un rayon équivalent à la distance de van der Waals augmenté de 1,6 Å, le tout multiplié par 0,85.

Les résultats présentés ici montrent que les paramètres tels que le choix de fixer ou non la taille et la position de la boîte au cours de la lecture de la trajectoire, et la taille du maillage pour l’exploration de l’espace ont peu d’influence sur le résultat. Ces paramètres sont donc faciles à choisir. Les deux paramètres restant à valider sont la taille du rayon d’« espace libre » et le positionnement du parallélépipède. Concernant le rayon d’« espace libre », on se rend compte sur la figure 9.6, que lorsque le rayon est équivalent au rayon de van der Waals, la sonde trouve des espaces libres dans des zones qui ne font pas partie du site actif et de la poche stéréospécifique (certains points sont situés sous le W104 par exemple). Ce problème est corrigé en redéfinissant le positionnement du parallélépipède et sa taille. La coordonnée pour définir Z_{min} remplace $Z_{C\alpha/104}$ par $Z_{C\alpha/47}$, afin d’éviter le problème signalé précédemment, à savoir la détection d’espace libre sous le résidu tryptophane 104, mais ne correspondant pas au volume de la poche stéréospécifique. Finalement, les études sont menées en conservant fixe la taille et l’emplacement du volume analysé une fois pour toute sur une structure de référence : la structure cristallographique

1TCA. Les structures obtenues au cours des trajectoires sont alignées sur la structure de référence. Le maillage retenu est de 0,2 Å. On fixe les dimensions du parallélépipède sur les coordonnées de carbones α de la structure cristallographique. Enfin, on privilégie le critère de distance du rayon de van der Waals pour prospecter les zones libre de la poche stéréospécifique.

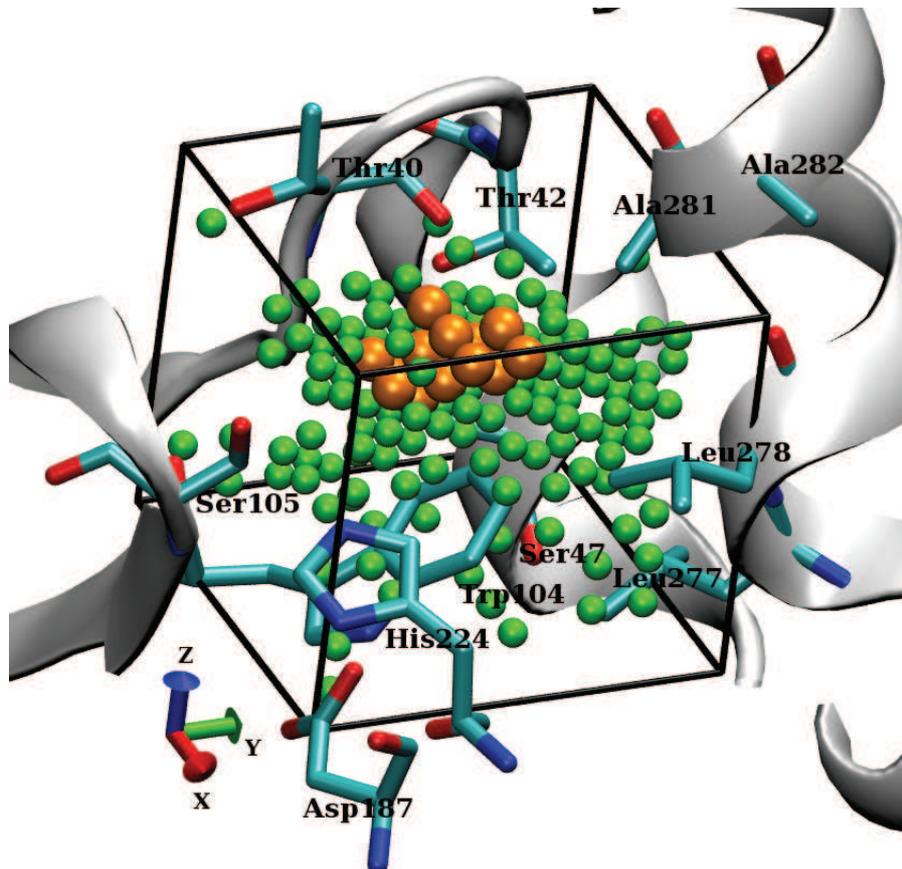


FIG. 9.6 – Représentation du parallélépipède au niveau du site actif pour la structure cristallographique 1TCA. Les petites sphères vertes correspondent aux points de l'espace vide dans un maillage de 1 Å selon le critère d'espace libre dans un rayon équivalent à la distance de van der Waals. Les petites sphères oranges correspondent aux points de l'espace vide dans un maillage de 1 Å selon le critère d'espace libre pouvant accueillir une molécule d'eau (le rayon équivalent à la distance de van der Waals augmenté de 1,6 Å, le tout multiplié par 0,85).

9.2.2 Comparaison de la CALB sauvage et de ses variants

On réalise la comparaison des fractions de volume libre pour l'enzyme sauvage et les différents mutants. Comme on peut le voir sur la figure 9.7, les fractions de volume libre au cours des trajectoires sont très proches avec les différents mutants. La fluctuation de ce volume au cours des trajectoires ne permet pas de mettre en évidence de différences entre l'enzyme sauvage et les différents mutants.

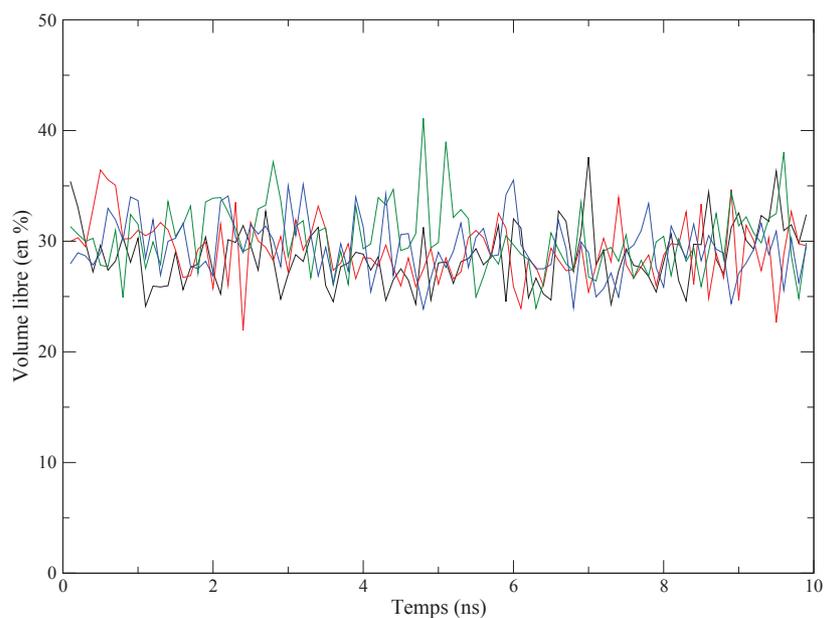


FIG. 9.7 – Fraction de volume libre au cours de la dynamique de 10 ns pour le parallélépipède défini à partir des coordonnées suivantes : $X_{min} = X_{C\alpha/42}$, $X_{max} = X_{C\alpha/278}$, $Y_{min} = Y_{C\alpha/104}$, $Y_{max} = Y_{C\alpha/278}$, $Z_{min} = Z_{C\alpha/47}$, $Z_{max} = Z_{C\alpha/40}$, en utilisant le critère d'espace libre dans un rayon équivalent à la distance de van der Waals, la taille et la position du parallélépipède sont calculées une fois pour toute sur la structure cristallographique 1TCA. La résolution du maillage de la grille explorée par la sonde est de 0,2 Å. En noir, l'enzyme sauvage, en rouge le mutant T42V, en vert, le mutant S47A, en bleu le double mutant T42V/S47A.

Il semble difficile de contourner le problème de fluctuation pour caractériser le volume du site actif. On peut néanmoins calculer le volume moyen (\pm l'écart type) de la poche stéréospécifique chez les différents mutants pour se faire une idée de l'impact des mutations sur le volume de la poche. On obtient pour l'enzyme sauvage une fraction moyenne de volume libre de $28,7 \pm 2,8$ %. Pour le mutant T42V, la fraction moyenne de volume

libre est de $29,1 \pm 2,7$ %. Pour le mutant S47A, la fraction moyenne de volume libre est de $30,2 \pm 3,0$ %. Pour le double mutant T42V/S47A, la fraction moyenne de volume libre est de $29,4 \pm 2,6$ %. On voit ici que le volume moyen de la poche stéréospécifique est sensiblement le même chez l'enzyme sauvage et les différents mutants.

Afin de mieux évaluer les différences structurales au niveau du site actif, on étudie le positionnement des résidus clefs et de leurs chaînes latérales dans la poche stéréospécifique, ainsi que le réseau de liaisons hydrogène.

9.3 Le réseau de liaisons hydrogène entre les résidus de la poche stéréospécifique dans le site actif

On s'intéresse aux liaisons hydrogène qui s'établissent dans la poche stéréospécifique au cours des trajectoires de dynamique avec les différents mutants. On a identifié les liaisons hydrogène impliquant les résidus T42 et S47, elles sont présentées dans le tableau 9.1 et la figure 9.8. Parmi les liaisons hydrogène listées, certaines sont observées sur de courtes durées et d'autres sont plus beaucoup stables. On observe dans le cas de l'enzyme sauvage, un nombre important de liaisons hydrogène impliquant les deux résidus T42 et S47. La plupart de ces liaisons hydrogène sont relativement faibles, la liaison hydrogène la plus stable entre la chaîne latérale de T42 et le squelette peptidique de G39 atteint seulement un taux d'occupation de 17 % selon le critère d'acceptation définissant que la liaison hydrogène est établie lorsque la distance interatome (donneur-accepteur) est de moins de 3 Å et l'angle impliquant les deux atomes lourds et l'hydrogène (D-H-A) s'écarte de moins de 20 degrés de l'angle optimal. On observe chez l'enzyme sauvage, la présence d'une liaison hydrogène entre les groupes hydroxyle des résidus T42 et S47, son temps d'occupation est de 10 % (5 % et 5 % où les deux groupements hydroxyle prennent tour à tour le rôle de donneur et d'accepteur d'hydrogène). Les mutants simples conduisent à une stabilisation de la liaison hydrogène entre le squelette peptidique du résidu 47 et du résidu 43 : le taux d'occupation passe de 9 % pour l'enzyme sauvage à 23 % pour le mutant T42V et 32 % pour le mutant S47A. Ce taux d'occupation retombe à 11 % chez le double mutant. La mutation T42V conduit à la stabilisation de la liaison

hydrogène entre la chaîne latérale du résidu 47 et le squelette peptidique du résidu 43 (taux d'occupation de 52 % avec le mutant T42V, contre 4 % avec le type sauvage).

TAB. 9.1 – Les liaisons hydrogène observables chez la CALB sauvage et les différents mutants. Le taux d'occupation est donné avec un critère d'angle (D-H-A) s'écartant de moins de 20 degrés de l'angle optimal et une distance (donneur-accepteur) inférieure à 3.0 Å entre les atomes lourds. Les liaisons hydrogène impossibles en raison de l'absence du donneur et/ou de l'accepteur sont indiquées par un « X ». La numérotation à gauche fait référence à celle de la figure 9.8. Concernant la liaison hydrogène numéro 3, les rôles de donneur et d'accepteur sont interchangeables entre les deux groupements hydroxyle, expliquant la double entrée dans le tableau.

Num.	Donneur	Accepteur	WT	T42V	S47A	T42V/S47A
(1)	39-Main	42-Side	1 %	X		X
(2)	42-Side	39-Main	17 %	X	10 %	X
(3)	42-Side	47-Side	5 %	X	X	X
(3)	47-Side	42-Side	5 %	X	X	X
(4)	47-Side	43-Main	4 %	52 %	X	X
(5)	47-Main	43-Main	9 %	23 %	32 %	11 %

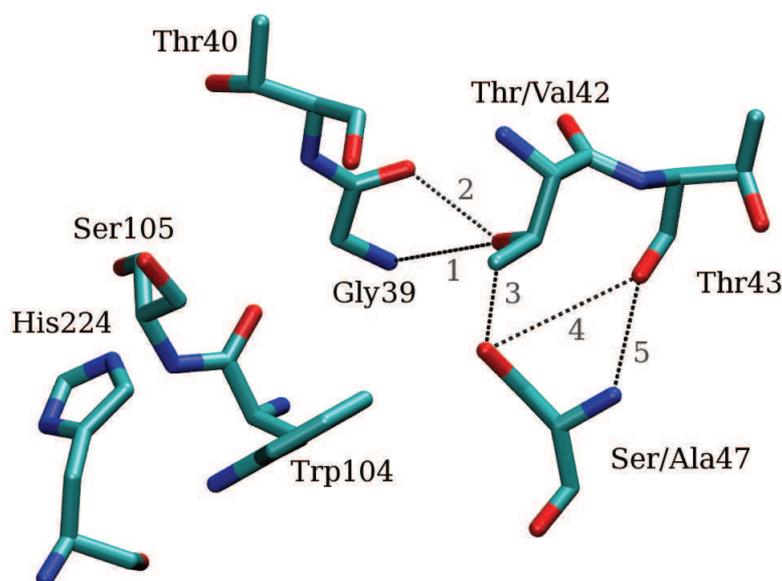


FIG. 9.8 – Les liaisons hydrogène du tableau 9.1 (numérotées de 1 à 5) sont ici représentées sur la structure cristallographique.

Ces résultats montrent que les variants T42V et S47A conduisent à un réarrangement important du réseau de liaisons hydrogène dans le site actif. La suppression du groupement hydroxyle porté par les chaînes des résidus mutés chez les variants T42 et S47A

entraîne la stabilisation d'autres liaisons hydrogène, en particulier la liaison hydrogène entre l'hydroxyle de la chaîne latérale de S47 et l'oxygène (fonction carbonyle) du squelette peptidique du résidu T43 chez le variant T42V (taux d'occupation de 52 %), et la liaison entre l'oxygène du squelette peptidique de S47 et l'oxygène (fonction carbonyle) du squelette peptidique du résidu T43 (taux d'occupation de 32 %). Le double mutant T42V/S47A est le plus pauvre en liaisons hydrogène.

9.4 Étude des conformères des résidus S47 et T42 chez la CALB sauvage et ses variants

L'inspection visuelle de la structure de l'enzyme chez les différents mutants ne met pas en évidence de différences de la conformation globale. Une analyse poussée met en évidence la grande flexibilité de l'hélice $\alpha 5$ comme cela a précédemment été observé dans l'étude sur l'effet d'empreinte. L'étude porte donc plus précisément sur des aspects locaux de la structure, au niveau du site actif de la CALB sauvage et des mutants.

Les « snapshots » du site actif présentés figure 9.9 montrent un bon alignement entre les résidus chez les mutants et l'enzyme sauvage, ainsi que la structure cristallographique. On peut rappeler que l'étude proposée ici repose sur l'hypothèse forte qu'à partir d'une trajectoire de 10 ns auxquelles s'ajoutent les 2,4 ns préliminaires de chauffage et d'équilibration ayant pour point de départ la structure cristallographique de l'enzyme sauvage, on puisse accéder à une dynamique exprimant les conformations réellement privilégiées par l'enzyme sauvage, mais également par les trois mutants. On peut être confronté à deux cas de figure : soit les structures de l'enzyme n'ont pas le temps (barrière énergétique à franchir) pour se réarranger vers une autre forme plus stable, soit ces structures sont stables et l'on peut considérer que la différence majeure entre les mutants et l'enzyme sauvage concernent des effets locaux sur la dynamique des chaînes latérales, ou bien la modification du réseau de liaisons hydrogène comme cela est présentée dans le tableau 9.1. Les mutations portent sur deux résidus qui sont substitués par des résidus avec un encombrement stérique très similaire, on peut faire l'hypothèse que les mutations n'engendrent pas de grands réarrangements de la conformation de l'enzyme et que le deuxième cas de

figure énoncé soit privilégié.

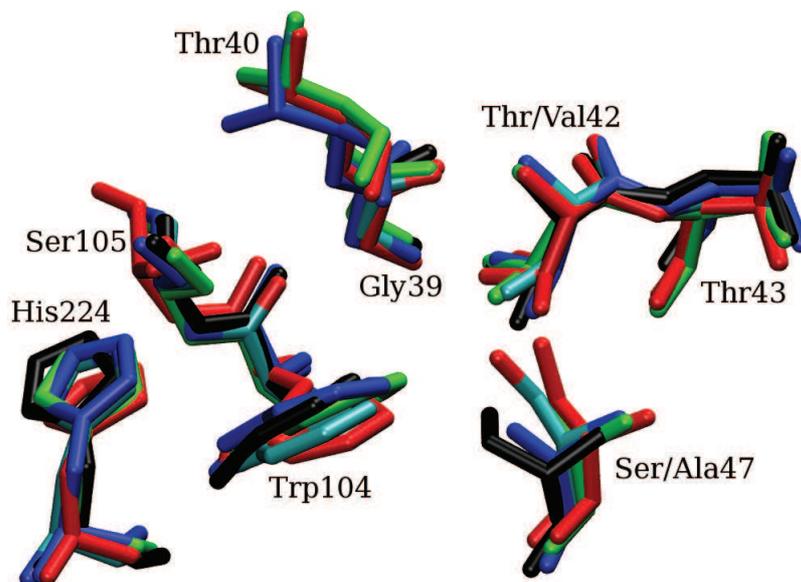


FIG. 9.9 – Snapshots du site actif des différentes structures aux environs de 5 ns. Le squelette peptidique des structures est aligné sur celui de la structure cristallographique. En bleu turquoise (carbone) et rouge (oxygène), la structure cristallographique, en noir, l'enzyme sauvage, en rouge le mutant T42V, en vert, le mutant S47A, en bleu le double mutant T42V/S47A.

Parmi les remaniements structuraux que l'on peut observer, le mutant T42V présente un réarrangement de la chaîne latérale du résidu V42 au cours de la trajectoire de dynamique, comme le montre la figure 9.10. Cette rotation n'est observée que de façon très furtive avec le double mutant T42V/S47A. Chez l'enzyme sauvage et le mutant S47A, la chaîne latérale s'oriente de façon analogue à celle du mutant T42V/S47A. Ce rotamère est stabilisé chez l'enzyme sauvage et le mutant S47A par les liaisons hydrogène numéro (1) et (2) présentées sur la figure 9.8 et dans le tableau 9.1, qui s'établissent entre les résidus T42 et G39.

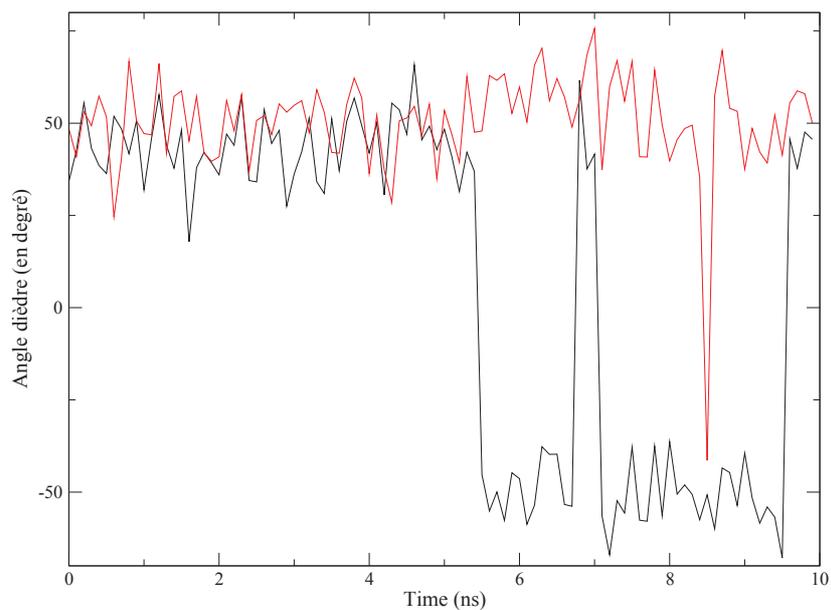


FIG. 9.10 – Angle dièdre de la chaîne latérale du résidu V42 formé par les atomes contigus N-C α -CB-CG2. La courbe pour le mutant T42V est noire, la courbe pour le mutant T42V/S47A est en rouge.

Cette comparaison entre l'orientation de la chaîne latérale des résidus T42 et V42 est possible dans la mesure où le nombre d'atomes lourds est identique, la différence portant sur la substitution d'un groupement méthyle par un groupement hydroxyle, ce qui n'est pas le cas avec la substitution de la sérine 47 par une alanine.

On observe une rotation de la chaîne latérale du résidu S47 dans la trajectoire de l'enzyme sauvage, qui acquiert une orientation qui contraste avec celle observée dans la structure cristallographique. Étonnamment, l'orientation de cette même chaîne latérale chez le mutant T42V est conforme à celle observée dans la structure cristallographique. La figure 9.11 illustre ces résultats.

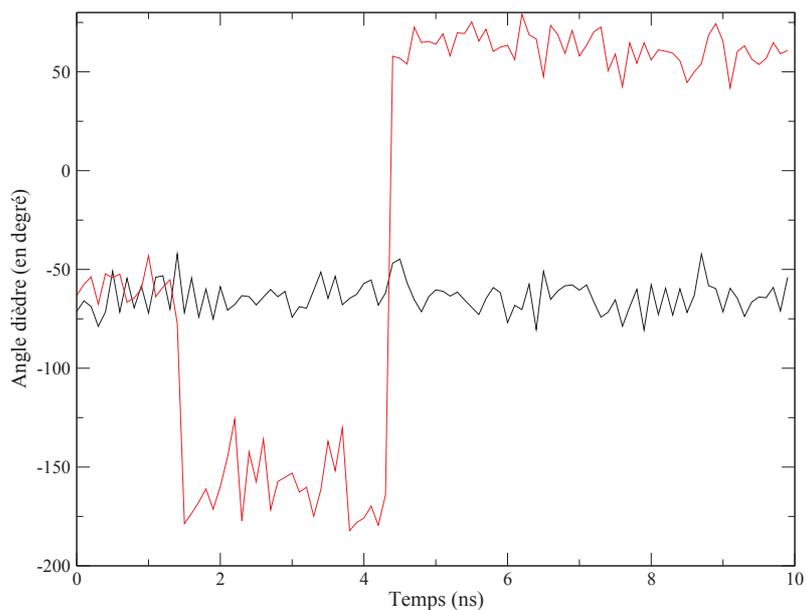


FIG. 9.11 – Angle dièdre de la chaîne latérale du résidu S47 formé par les atomes contigus N-C α -CB-OG. La courbe pour le mutant T42V est en noir, la courbe pour l'enzyme sauvage est en rouge.

Cette observation fait écho à l'étude des liaisons hydrogène, où l'on voit que la liaison hydrogène entre la chaîne latérale du résidu S47 et le squelette peptidique du résidu T43 est beaucoup plus faible chez l'enzyme sauvage (le taux d'occupation de cette liaison hydrogène est de 4 % chez l'enzyme sauvage contre 52 % chez le mutant T42V).

Dans la structure cristallographique 1TCA, le facteur B pour les atomes du résidu S47 est faible (figure 9.2), les valeurs sont comprises entre 4,82 et 6,54 Å². Les valeurs du facteur B pour les atomes du résidu T42 (figure 9.2) sont comprises entre 6,43 et 8,05 Å².

En conclusion, on observe des réarrangements des chaînes latérales : la rotation de la chaîne latérale du résidu V42 chez le variant T42V, et plus étonnant, la rotation de la chaîne latérale du résidu S47 chez l'enzyme sauvage. Il est difficile de proposer un lien entre ces observations et les modifications d'énantiosélectivité observées.

TAB. 9.2 – Facteur B des atomes des résidus T42 et S47 dans la structure PDB 1TCA.

N° (PDB)	Résidu	Type d'atome	facteur B (\AA^2)
278	T42	N	6.65
279	T42	CA	6.43
280	T42	C	6.48
281	T42	O	7.00
282	T42	CB	6.20
283	T42	OG1	6.74
284	T42	CG2	8.05
312	S47	N	4.84
313	S47	CA	4.82
314	S47	C	5.21
315	S47	O	5.62
316	S47	CB	6.54
317	S47	OG	5.67

9.5 Les liaisons hydrogène entre les résidus de la poche stéréospécifique et des molécules d'eau

Dans les précédents calculs, nous avons cherché à voir si le positionnement des chaînes latérales des résidus de la poche stéréospécifique pouvait défavoriser le positionnement de la forme *S* de l'alcool à résoudre. Une autre possibilité pour défavoriser le positionnement de la chaîne latérale longue du substrat de chiralité *S* dans la poche stéréospécifique, peut être la présence d'un ou plusieurs points d'ancrage forts de molécules d'eau liées dans la poche stéréospécifique des variants T42V et S47A, présentant une augmentation significative de l'énantiosélectivité. On s'intéresse donc aux liaisons hydrogène entre les résidus de la poche stéréospécifique et des molécules d'eau. D'un point de vue thermodynamique, la présence d'une molécule d'eau liée dans la poche stéréospécifique représente un coût en énergie enthalpique pour sa désolvatation, mais le phénomène est favorisé entropiquement (l'entropie du système augmente lors de la désolvatation d'une molécule d'eau), cet événement peut donc aussi être considéré comme énergétiquement intéressant. Une ou plusieurs molécules d'eau plus fortement ancrées dans la poche stéréospécifique (pénalité importante de l'énergie enthalpique) pourraient défavoriser la catalyse de la forme *S* de l'alcool, et augmenter l'énantiosélectivité pour la forme *R*.

Il existe dans le site actif différents groupements chimiques avec lesquels une molécule d'eau peut se fixer par une liaison hydrogène. On entreprend ici de lister ces résidus

susceptibles d'établir des liaisons hydrogène et d'observer, au cours des trajectoires de dynamique pour l'enzyme sauvage et les trois mutants, l'établissement de liaisons hydrogène entre ces résidus et des molécules d'eau. On considère qu'une liaison hydrogène avec une molécule d'eau est établie lorsque l'on a le critère d'angle (D-H-A) s'écartant de moins de 20 degrés de l'angle optimal et une distance (donneur-accepteur) inférieure à 3.0 Å entre les atomes lourds. Il s'agit des mêmes critères que ceux utilisés précédemment pour l'étude des liaisons hydrogène entre résidus.

Les atomes lourds suivants, accepteurs ou donneurs d'hydrogène, sont susceptibles d'établir des liaisons hydrogène avec l'eau dans la poche stéréospécifique : N_{G39} , O_{T40} , N_{T40} , $OG1_{T40}$, $OG1_{T42}$, N_{T42} , OG_{S105} , $NE2_{H224}$, et OG_{S47} (figure 9.12).

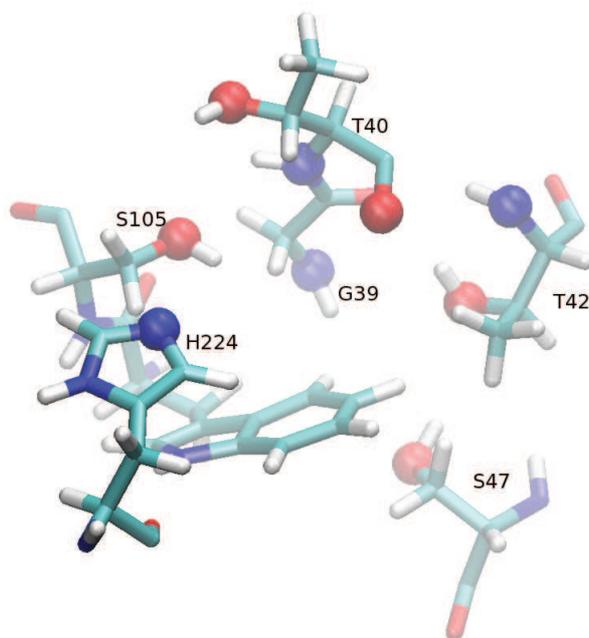


FIG. 9.12 – Les neuf atomes lourds susceptibles d'établir des liaisons hydrogène avec l'eau dans la poche stéréospécifique : N_{G39} , O_{T40} , N_{T40} , $OG1_{T40}$, $OG1_{T42}$, N_{T42} , OG_{S105} , $NE2_{H224}$, et OG_{S47} .

Il apparaît au cours des trajectoires que les atomes lourds N_{G39} et N_{T42} n'établissent aucune liaison hydrogène avec une molécule d'eau sur les 100 snapshots de chacune des trajectoires de 10 ns.

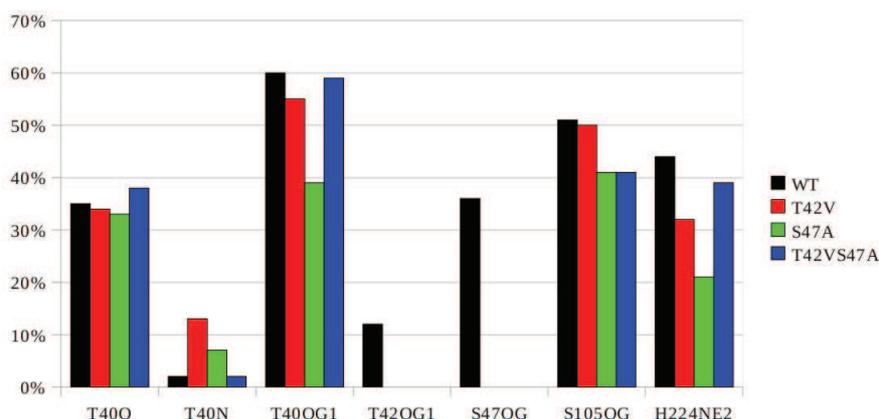


FIG. 9.13 – Proportion du temps où une liaison hydrogène avec l’eau est établie selon les mêmes critères de distance et d’angle donnés dans le tableau 9.1 concernant les sept atomes lourds susceptibles d’établir des liaisons hydrogène avec l’eau dans la poche stéréospécifique : O_{T40} , N_{T40} , $OG1_{T40}$, $OG1_{T42}$, OG_{S105} , $NE2_{H224}$, et OG_{S47} .

On peut calculer le nombre moyen de molécules d’eau ancrées aux résidus de la poche stéréospécifique par une liaison hydrogène telle que décrite précédemment. Dans le cas de l’enzyme sauvage, on observe 2,47 molécules d’eau en moyenne. Ce nombre diminue chez tous les mutants, dans le cas du mutant T42V on observe 1,9 molécule d’eau, et une valeur sensiblement équivalente chez le double mutant T42V/S47A égale à 1,91. Le mutant S47A présente le plus faible taux moyen de molécule d’eau ancrée : 1,45 en moyenne.

Une observation plus détaillée du positionnement de ces molécules d’eau montrent que plusieurs d’entre elles ne sont pas situées dans la poche stéréospécifique, et forment des liaisons hydrogène avec les résidus dans des cavités adjacentes au site actif. Par exemple, l’atome lourd $OG1_{T42}$ forme des liaisons hydrogène avec une molécule d’eau dans la poche stéréospécifique au début de la trajectoire, puis à partir de 4,4 ns, il forme une liaison hydrogène avec une molécule d’eau sur une autre face de l’enzyme, dans une cavité adjacente au site actif. L’atome lourd OG_{S47} forme également des liaisons hydrogène avec une molécule d’eau sur cette autre face de l’enzyme, derrière l’hélice $\alpha 10$.

On peut donc recalculer le nombre moyen de molécules d’eau ancrées spécifiquement dans la poche stéréospécifique par une liaison hydrogène telle que décrit précédemment. Dans le cas de l’enzyme sauvage, on observe 1,00 molécules d’eau en moyenne. Dans le cas du mutant T42V on observe 1,03 molécule d’eau, et une valeur sensiblement équivalente

chez le double mutant T42V/S47A égale à 1,07. Le mutant S47A présente le plus faible taux moyen de molécule d'eau ancrée : 0,79 en moyenne. Le nombre moyen de molécule d'eau dans la poche stéréospécifique est donc très similaire dans les quatre trajectoires.

TAB. 9.3 – Nombre moyen de molécules d'eau liées par une liaison hydrogène dans la poche stéréospécifique avec les critères définis précédemment.

Enzyme	Molécule d'eau
WT	1,00
T42V	1,03
S47A	0,79
T42V/S47A	1,07

La faiblesse du nombre moyen de molécules d'eau liées pour le mutant S47A s'explique par la plus faible propension à établir des liaisons hydrogène pour le groupement hydroxyle du résidu T40 (de l'ordre de 40 %) comparé aux autres mutants et à l'enzyme sauvage (de l'ordre 55 à 60 %).

On n'observe pas de liaisons hydrogène entre l'eau et le groupement hydroxyle porté par la chaîne latérale du résidu T42 chez le mutant S47A. L'étude du réseau de liaisons hydrogène entre résidus réalisée précédemment ne permet pas d'expliquer cela. Une observation visuelle de la chaîne latérale de T42 montre que chez le mutant S47A, le groupement hydroxyle pointe en direction de l'oxygène de la fonction carbonyle du squelette peptidique du résidu G39, sans toutefois être assez bien orienté en terme de distance et d'angle pour former une liaison hydrogène selon nos critères choisis pour l'étude du réseau de liaisons hydrogène.

On observe que l'établissement de liaisons hydrogène avec l'histidine est également plus faible pour le mutant S47A. Ce résidu n'est pas dans le fond de la poche stéréospécifique et se situe « devant » la fonction acyle dans la réaction de transestérification, cette observation n'est donc pas susceptible de perturber le positionnement de l'alcool substrat dans la poche stéréospécifique.

Jeffrey classe les liaisons hydrogène en 3 types : forte, moyenne, et faible [106]. Le tableau 9.4 reprend les éléments de classification des différents types de liaisons hydrogène.

Les conditions limites qui définissent une liaison moyenne (une distance de 3.2 Å et un angle de plus ou moins 50 degrés) sont utilisées pour étudier à nouveau le réseau de liaisons hydrogène entre les résidus de la poche stéréospécifique et les molécules d'eau.

TAB. 9.4 – Les différents types de liaisons hydrogène observables selon Jeffrey (1997).

	Forte	Moyenne	Faible
Énergie (kcal/mol)	14-40	4-14	0-4
Type d'interaction	covalent	électrostatique	électrostatique
Longueur de liaison (Å)	A-H = A-B	A-H < A-B	A-H << B-H
Distance A-B (Å)	2,2-2,5	2,5-3,2	3,2-4,0
Distance H-B (Å)	1,2-1,5	1,5-2,2	2,2-3,2
Angle (degrés)	175-180	130-180	90-150

La figure 9.14 présente la proportion du temps où une liaison hydrogène est établie selon ces critères de distance et d'angle moins stricts, pour les sept atomes lourds susceptibles d'établir des liaisons hydrogène.

La définition de la liaison hydrogène étant moins stricte que précédemment, le taux d'établissement des liaisons hydrogène est supérieur à celui du calcul précédent. Aussi, on observe un phénomène de saturation du taux d'établissement autour de 90 %. Avec cette nouvelle façon de calculer le taux d'établissement de liaisons hydrogène, on voit que la mesure perd en sensibilité. Les paramètres précédents sont donc plus adaptés. En effet, les contraintes précédentes sur la définition de la liaison hydrogène rendent mieux compte de la stabilité relative des liaisons avec des molécules d'eau pour les différents groupes chimiques de la poche stéréospécifique.

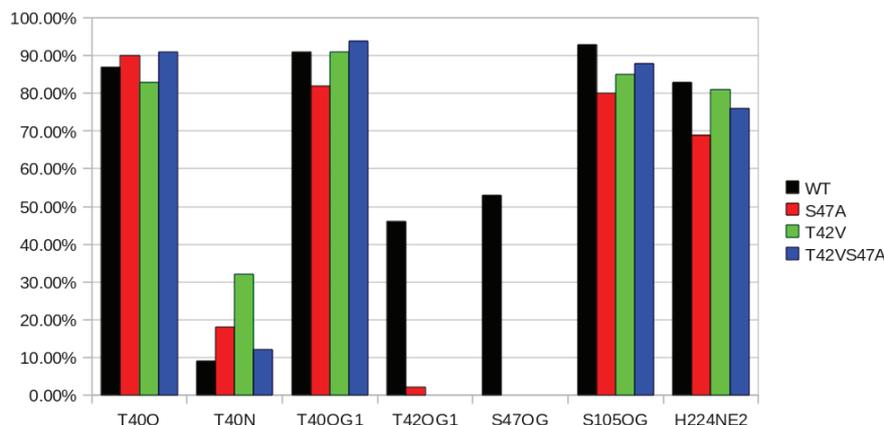


FIG. 9.14 – Proportion du temps où une liaison hydrogène est établie selon les critères de distance et d'angle moins stricts, pour les sept atomes lourds susceptibles d'établir des liaisons hydrogène avec l'eau dans la poche stéréospécifique : O_{T40} , N_{T40} , $OG1_{T40}$, $OG1_{T42}$, OG_{S105} , $NE2_{H224}$, et OG_{S47} .

On peut néanmoins recalculer le nombre moyen de molécules d'eau ancrées dans la poche stéréospécifique par une liaison hydrogène telle que définie avec les nouveaux paramètres. Dans le cas de l'enzyme sauvage, on observe 2,14 molécules d'eau en moyenne. Dans le cas du mutant T42V on observe 2,10 molécules d'eau, et une valeur légèrement plus élevée chez le double mutant T42V/S47A égale à 2,29. Le mutant S47A présente le plus faible taux moyen de molécules d'eau ancrées : 1,98 en moyenne. De façon générale, le nombre moyen de molécules d'eau ancrées dans la poche stéréospécifique est très similaire dans les quatre cas.

9.6 Conclusion sur l'étude des mutants

En conclusion générale de ce chapitre, notons que la rotation de la chaîne latérale V42 chez le mutant T42V que l'on ne retrouve pas chez le mutant T42V/S47A dirige un groupement méthyle de façon différente dans la poche stéréospécifique, et pourrait entraîner une contrainte plus importante sur le positionnement des énantiomères de chiralité *S* dans la poche et expliquer que l'énantiosélectivité soit plus importante.

Lorsque l'on compare la structure représentant un positionnement moyenné des atomes pour les quatre trajectoires, on observe que le groupement alkyle de la chaîne latérale de V42 s'écarte vers l'extérieur de la poche stéréospécifique dans le cas du mutant T42V en comparaison avec les autres mutants et l'enzyme sauvage. Ceci est plutôt en contradiction avec l'augmentation de l'énantiosélectivité avec ce variant, en effet, on s'attend à ce que la taille de la poche stéréospécifique diminue.

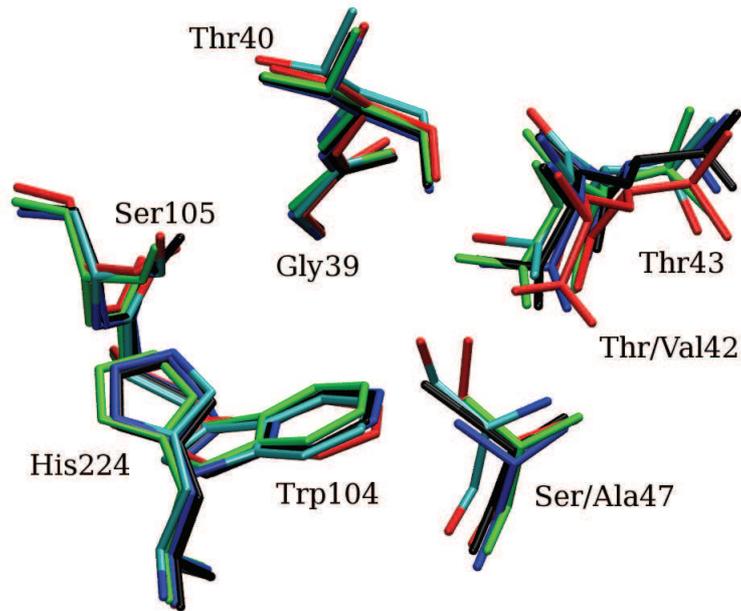


FIG. 9.15 – Structures représentant un positionnement moyenné des atomes lourds pour les quatre trajectoires, ainsi que la structure cristallographique. En bleu turquoise (carbone) et rouge (oxygène), la structure cristallographique, en noir, l'enzyme sauvage, en rouge le mutant T42V, en vert, le mutant S47A, en bleu le double mutant T42V/S47A.

On observe aussi une énantiosélectivité accrue avec le mutant S47A. Cette mutation raccourcit d'un atome lourd la chaîne latérale du résidu 47, on pourrait donc penser que la contrainte stérique sur la poche stéréospécifique est moins forte. Hors, on observe expérimentalement une augmentation de l'énantiosélectivité. Lorsque l'on compare la structure représentant un positionnement moyenné des atomes pour les quatre trajectoires (figure 9.15), on observe que la structure de l'enzyme sauvage et le mutant S47A, présentent un bon alignement. Ici encore, les résultats obtenus ne permettent pas d'apporter une explication structurale à l'effet d'augmentation de l'énantiosélectivité obtenu expérimentalement avec le variant S47A.

Au niveau des molécules d'eau, on en trouve un nombre très similaire dans le site actif pour l'enzyme sauvage et les mutants. Le réseau de liaisons hydrogène entre résidus met en évidence chez l'enzyme sauvage, la liaison hydrogène entre les groupements hydroxyle des résidus T42 et S47. Tandis qu'intuitivement, l'on pourrait penser que chez les simples mutants, le groupement hydroxyle « libéré » pourrait aller former davantage de liaisons

hydrogène avec des molécules d'eau, cela ne semble pas être le cas en pratique. Un tel événement aurait pourtant une importance considérable sur l'énergie de solvation du site actif et l'énantiosélectivité de l'enzyme.

Une autre approche pour étudier l'effet des mutations sur l'énantiosélectivité pourrait d'ailleurs consister à évaluer l'entropie du site actif des différents mutants résultant de la modification du réseau de liaisons hydrogène et des conformations. En effet, la différence d'entropie dans la résolution de mélange racémique d'alcools secondaires joue un rôle important [38].

Cette étude détaillée met en lumière les différents réarrangements se produisant dans la poche stéréospécifique, qui est le siège de l'énantiosélectivité. Néanmoins, l'origine de l'augmentation de l'énantiosélectivité pour les variants T42V et S47A n'a pu être clairement identifiée. Des études complémentaires incluant les substrats énantio-purs dans le modèle pourraient apporter un nouvel éclairage aux résultats expérimentaux.

Cinquième partie

Conclusion générale et perspectives

La lipase B de *Candida antarctica* est étudiée depuis quelques dizaines d'années. Ces travaux apportent quelques pierres à l'édifice de la compréhension de la sélectivité de la CALB, en particulier son énantiosélectivité qui en fait un enzyme remarquable.

Les travaux préliminaires portant sur l'étude conformationnelle de l'intermédiaire tétrédrique ont permis de confirmer les modèles d'orientation singulièrement différents pour les deux énantiomères de l'intermédiaire tétraédrique, formés avec le pentan-2-ol dans le site actif, et le rôle clef de la poche stéréospécifique.

Les travaux qui ont suivi se sont montrés plus ambitieux ; ils concernent la rationalisation et l'explication par modélisation moléculaire des résultats expérimentaux concernant le ratio énantiomérique obtenu avec la CALB pour la résolution d'alcools secondaires. Ces travaux portent sur le développement d'un modèle prédictif de l'énantiosélectivité, permettant de calculer des différences très fines d'énergie libre. Ils auront permis de mieux définir le potentiel de la méthode de FEP, ses qualités ainsi que ses faiblesses : le modèle donne des résultats qualitativement justes tandis que l'estimation quantitative peut être améliorée. Les travaux de QSAR et de docking réalisés par d'autres équipes, que nous avons présentés dans la bibliographie, donnent des résultats très encourageants et sont autant de pistes à poursuivre. Dans tous les cas, le choix de la structure globale de départ utilisée pour les simulations et l'appréhension des mouvements lents de l'enzyme sont des éléments à davantage prendre en compte.

L'étude complète du modèle cinétique de la réaction Bi-Bi Ping-Pong avec deux substrats alcools énantiomères dans la seconde étape de la réaction a permis de s'assurer que la méthode de détermination expérimentale des ratios énantiomériques utilisée dans ce travail est correcte, et d'écarter l'hypothèse que le ratio des vitesses initiales pour la synthèse des esters énantio-pures et donc le ratio énantiomérique E dépendent des constantes catalytiques impliquées dans l'étape d'acylation, ce qui n'est pas le cas.

Les travaux sur l'effet d'empreinte laissent à supposer que l'effet putatif de la molécule à « effet d'empreinte » sur la structure s'effectue *a priori* à un niveau local : le site actif. En effet, les simulations de dynamique moléculaire de 20 ns n'ont pas mis en évidence de réarrangement global de l'enzyme. Au cours des trajectoires, on observe la rotation de la chaîne latérale de l'isoleucine 285 en présence de la forme chirale R du premier intermédiaire tétraédrique. Il serait intéressant de relancer plusieurs trajectoires pour

confirmer la rotation observée. Des travaux expérimentaux pour valider ces points seraient nécessaires. On pense en particulier à des études de RMN (résonance magnétique nucléaire) permettant d'étudier la conformation de l'enzyme et de son site actif en particulier, en présence de la molécule à « effet d'empreinte ». Notons que la CALB est un enzyme de taille relativement importante (33 kDa) et l'étude de sa structure par RMN représente un travail très important. Concernant les travaux de modélisation réalisés, l'hypothèse de la présence d'une barrière énergétique pour basculer vers une autre conformation en présence de la molécule à « effet d'empreinte », mais accessible avec des simulations excédents quelques dizaines de nanosecondes n'est pas à exclure. Enfin, nous avons mis en évidence que de très faibles quantités de molécule putativement à « effet d'empreinte » avaient une influence importante sur l'énantiosélectivité de l'enzyme. On est donc en présence d'un effet très spécifique de l'action de ces molécules. Les amines secondaires utilisées comme co-substrats sont des substrats potentiels de l'enzyme, c'est pour cela que l'on pense spontanément que leur action se situe au niveau du site actif. Il me semble néanmoins que l'hypothèse d'un effet allostérique de ces molécules devrait être une piste à explorer.

Les derniers travaux ont porté sur l'étude des mutants T42V, S47A, et T42V/S47A dans la poche stéréospécifique. Le réarrangement du site actif y est décrit avec précision pour chacun des modèles. Rappelons que les différences d'énantiosélectivité observées chez les mutants correspondent à des différences d'énergies libres très faibles entre les barrières énergétiques de la réaction qui catalysent la résolution des formes *R* et *S* d'un alcool secondaire. Chaque évènement minime dans le site actif peut donc avoir des conséquences importantes sur l'énantiosélectivité. L'étude de l'énantiosélectivité chez ces variants, en introduisant le substrat dans les simulations seraient naturellement l'étape suivante pour permettre de mieux comprendre l'origine de la modulation de l'énantiosélectivité causée par les mutations des résidus. Une analyse des interactions entre les substrats énantiopurs et les résidus de la poche stéréospécifique pour un mutant et l'enzyme sauvage devrait fournir des éléments d'explication supplémentaires à ceux proposés ici.

Table des figures

1.1	Représentation de la CALB (code PDB 1TCA). Le feuillet β est en jaune, les hélices α en violet, les hélices α_{310} en bleu, et les motifs « turn » en cyan.	13
1.2	Diagramme de Ramachandran (angle φ et ψ) de la CALB (code PDB 1TCA).	14
1.3	Facteur B de la structure cristallographique (code PDB : 1TCA) de la CALB.	14
1.4	Triade catalytique (S105, H224, D187) de la CALB et acides aminés importants du site actif. Représentation des atomes lourds seuls.	16
1.5	Site actif de la CALB (vue 1).	17
1.6	Site actif de la CALB (vue 2).	18
1.7	Sites catalytiques de deux estérases et une peroxydase (Pleiss <i>et al.</i> , 1998).	19
1.8	Sites catalytiques de cinq différentes lipases (Pleiss <i>et al.</i> , 1998).	20
1.9	Hydrolyse d'un triacylglycéride en position 1.	21
1.10	La réaction de transestérification des alcools secondaires.	21
1.11	Représentation de Cleland du mécanisme Bi-Bi Ping-Pong. S1, S2, P1, et P2 correspondent aux substrats et produits de la figure 1.10. En et Enx correspondent respectivement à l'enzyme et l'acyl-enzyme.	22
1.12	Mécanisme réactionnel de transestérification de la CALB (Nyhlén <i>et al.</i> , 2008).	23
2.1	Acylation régiosélective du 3- <i>O</i> -angeloylingenol (Teng <i>et al.</i> , 2009).	25
2.2	Propanoylation régiosélective de dihydroxybenzènes (Miyazawa <i>et al.</i> , 2008).	25
2.3	Excès énantiomérique du substrat (A) et du produit (B) en fonction du degré de conversion ξ de la réaction pour différents ratios énantiomériques <i>E</i> . (Chen <i>et al.</i> , 1982)	28
2.4	Orientation des parties alcool et acyle dans le site actif de la CALB (Uppenberg <i>et al.</i> , 1995).	33
2.5	Modes d'orientation des alcools secondaires chiraux <i>R</i> et <i>S</i> . Les trois lettres « L, M et S » font références aux chaînes latérales « Large, Medium et Small » (Haefner <i>et al.</i> , 1998).	34
2.6	Orientation des alcools secondaires chiraux <i>R</i> (A) et <i>S</i> (B) dans le cas des modes « productifs » (Rotticci <i>et al.</i> , 2001).	35
2.7	Corrélation entre le logarithme des ratios énantiomériques obtenus par la méthode 3D-QSAR et le logarithme des ratios énantiomériques déduits expérimentalement (Braiuca <i>et al.</i> , 2009).	40
2.8	Corrélation entre les énergies obtenues par docking et les énergies déduites expérimentalement (Ji <i>et al.</i> , 2010).	41
3.1	Schéma de l'effet d'empreinte par la partie alkyle du donneur d'acyle.	44

3.2	Réaction de transestérification avec la CALB dans l'hexane. R : Ph (1), CH ₂ Ph (2), CH ₂ CH ₂ Ph (3). R ₁ : -CH ₂ CH ₂ Cl, -CH ₂ CCl ₃ , -COC ₃ H ₇ , -CH=CH ₂ (Hoff <i>et al.</i> , 1996).	45
3.3	Résolution du (±)-1-phénylbutan-1-ol par aminolyse de l'acétate (±)-1-phénylbutyle avec différentes amines par la CALB. Les groupes chimiques R ¹ et R ² sont présentés dans le tableau 3.2 (García-Urdiales <i>et al.</i> , 2001).	47
3.4	Résolution du (±)-1-phénylbutan-1-ol par transestérification en utilisant la CALB (García-Urdiales <i>et al.</i> , 2001).	47
3.5	Dans le cas A, le terme $\Delta\Delta S^{R-S}$ est positif. Dans le cas B, le terme $\Delta\Delta S^{R-S}$ est négatif.	50
3.6	Structure de la thymidine.	54
4.1	Schéma du réacteur continu solide/gaz.	63
5.1	Orientation des chaînes latérales pour les énantiomères R et S avec le cercle tronqué représentant la poche stéréospécifique.	75
6.1	Charge globale de la CALB en fonction du pH, définie à partir des pK _a calculés par le modèle Propka (Li <i>et al.</i> , 2005).	89
6.2	Énergie potentielle au cours de la trajectoire de l'enzyme seul avec le modèle de solvation EEF1.	90
6.3	Énergie totale au cours de la trajectoire de l'enzyme seul avec le modèle de solvation EEF1.	90
6.4	Énergie libre de solvation au cours de la trajectoire de l'enzyme seul avec le modèle de solvation EEF1.	91
6.5	RMSD (en Å) des carbones α de la trajectoire de la CALB seule avec le modèle de solvation EEF1.	92
6.6	Représentation de la CALB au début de la trajectoire avec le modèle EEF1. Le feuillet β est en jaune, les hélices α en violet, les hélices α ₃₁₀ en bleu, et les motifs « turn » en cyan. La région N-terminale de l'hélice α ₃ est représentée dans le cercle noir.	92
6.7	Représentation de la CALB à la fin (17 ns) de la trajectoire avec le modèle EEF1. Le feuillet β est en jaune, les hélices α en violet, les hélices α ₃₁₀ en bleu, et les motifs « turn » en cyan. La région N-terminale de l'hélice α ₃ est représentée dans le cercle noir.	93
6.8	Rayon de giration (en Å) des carbones α de la trajectoire de la CALB seule avec le modèle de solvation EEF1.	93
6.9	RMSF du squelette peptidique (en Å) des 317 acides aminés de la CALB dans la trajectoire avec le modèle de solvation EEF1 (en noir). Facteurs B de la structure cristallographique (code PDB : 1TCA) de la CALB (en brun rosé).	94
6.10	Distance D187(OD1)-H224(ND1) au cours de la trajectoire de la CALB seule avec le modèle de solvation EEF1.	95
6.11	Angle dièdre W104(CG-CB-CA-C) au cours de la trajectoire de la CALB seule avec le modèle de solvation EEF1.	96
6.12	Angles dièdres de la partie « alcool » de l'intermédiaire tétraédrique, arbitrairement nommés α, β et γ qui sont incrémentés dans l'étude systématique des conformères.	98

6.13	Énergie (en kcal.mol ⁻¹) des 27 conformères pour le (<i>S</i>)-pentan-2-ol.	100
6.14	Énergie (en kcal.mol ⁻¹) du système minimisé pour le (<i>S</i>)-pentan-2-ol en fonction de l'angle dièdre α	100
6.15	Conformère numéro 2 avec (<i>S</i>)-pentan-2-ol.	101
6.16	Conformère 23 avec le (<i>S</i>)-pentan-2-ol.	102
6.17	Énergie des 27 conformères pour le (<i>R</i>)-pentan-2-ol (en kcal.mol ⁻¹).	104
6.18	Conformère numéro 3 avec (<i>R</i>)-pentan-2-ol.	105
6.19	Conformère numéro 1 avec (<i>R</i>)-pentan-2-ol.	106
6.20	Énergie (en kcal.mol ⁻¹) du système minimisé pour le (<i>R</i>)-pentan-2-ol en fonction de l'angle dièdre α	107
6.21	Histogramme représentant la distribution des énergies des conformères générés pour le (<i>R</i>)- et (<i>S</i>)-pentan-2-ol.	108
6.22	Définition des liaisons hydrogène indispensables à la catalyse.	109
6.23	Comparaison du RMSD (en Å) entre les carbones α de la structure cristallographique et des 27 structures minimisées pour le (<i>S</i>)-pentan-2-ol.	112
6.24	Comparaison du RMSD (en Å) entre les carbones α de la structure cristallographique et des 27 structures minimisées pour le (<i>R</i>)-pentan-2-ol.	113
6.25	Rayon de giration (en Å) des 27 structures minimisées pour le (<i>S</i>)-pentan-2-ol.	113
6.26	Rayon de giration (en Å) des 27 structures minimisées pour le (<i>R</i>)-pentan-2-ol.	114
7.1	Courbe de saturation de la CALB avec le (<i>S</i>)-butan-2-ol. Réaction de transestérification à 45 °C dans le 2-méthylbutan-2-ol, en présence de 2,5 g.L ⁻¹ de la CALB immobilisée.	117
7.2	Courbe de saturation de la CALB avec le (<i>R</i>)-butan-2-ol. Réaction de transestérification à 45 °C dans le 2-méthylbutan-2-ol, en présence de 2,5 g.L ⁻¹ de la CALB immobilisée.	118
7.3	Courbe de saturation de la CALB avec le (<i>S</i>)-pentan-2-ol. Réaction de transestérification à 45 °C dans le 2-méthylbutan-2-ol, en présence de 5 g.L ⁻¹ de la CALB immobilisée.	118
7.4	Courbe de saturation de la CALB avec le (<i>R</i>)-pentan-2-ol. Réaction de transestérification à 45 °C dans le 2-méthylbutan-2-ol, en présence de 2,5 g.L ⁻¹ de la CALB immobilisée.	119
7.5	Diagramme du profil énergétique de la réaction d'acylation catalysée par la CALB pour l'énantiomère <i>R</i> (ligne noire) et <i>S</i> (ligne grise), avec <i>E</i> l'enzyme, <i>S_S</i> et <i>S_R</i> les substrats énantiopurs <i>S</i> et <i>R</i> , <i>ES_S</i> et <i>ES_R</i> , les complexes enzyme-substrat, <i>ES_S[‡]</i> et <i>ES_R[‡]</i> , les complexes enzyme-substrat à l'état de transition, <i>P_S</i> et <i>P_R</i> , les produits énantiopurs.	120
7.6	Intermédiaire tétraédrique (TI) et orientation des chaînes latérales des énantiomères du butan-2-ol. Énantiomère <i>S</i> en vert et <i>R</i> en orange. La flèche blanche pointe vers la poche stéréospécifique.	128
7.7	Intermédiaire tétraédrique (TI) et orientation des chaînes latérales des énantiomères du pentan-2-ol. Énantiomère <i>S</i> en vert et <i>R</i> en orange. La flèche blanche pointe vers la poche stéréospécifique.	128
7.8	Intermédiaire tétraédrique (TI) et orientation des chaînes latérales des énantiomères de l'hexan-2-ol. Énantiomère <i>S</i> en vert et <i>R</i> en orange. La flèche blanche pointe vers la poche stéréospécifique.	129

7.9	Profilé énergétique de la catalyse enzymatique.	130
8.1	Représentation de Cleland avec l'enzyme (E), l'acyl-enzyme (F), l'ester (A), les alcools <i>R</i> et <i>S</i> (respectivement B and C), l'alcool partant produit (P), les esters produits <i>R</i> et <i>S</i> (respectivement Q and S).	135
8.2	Représentation de King-Altman avec l'enzyme (E), l'acyl-enzyme (F), l'ester (A), les alcools <i>R</i> et <i>S</i> (respectivement B and C), l'alcool produit partant (P), les esters produits <i>R</i> et <i>S</i> (respectivement Q and S).	135
8.3	Réaction de transestérification entre un propanoate d'alkyle et le pentan-2-ol par la CALB dans le réacteur solide/gaz à 70 °C en condition anhydre. L'activité thermodynamique est de 0,1 pour l'ester et de 0,05 pour le pentan-2-ol (Marton, 2010).	140
8.4	RMSD du squelette peptidique durant la dernière nanoseconde d'équilibration et les 20 ns de production pour l'enzyme seul (enz) et l'enzyme complexé à l'intermédiaire tétraédrique formé avec les énantiomères <i>R</i> (enz+IT- <i>R</i>) et <i>S</i> (enz+IT- <i>S</i>) du propanoate de 1-méthylpentyle.	142
8.5	Matrices des RMSD calculées sur 2000 structures extraites de la dynamique de production représentées avec un code couleur pour l'enzyme seul et l'enzyme complexé à l'intermédiaire tétraédrique formé avec les énantiomères <i>R</i> et <i>S</i> du propanoate de 1-méthylpentyle.	143
8.6	Dendrogramme défini à partir du « clustering » de la matrice RMSD pour l'enzyme seul. La barre horizontale en pointillé illustre la zone de coupure pour la définition de 5 clusters à partir de l'arbre de classification.	143
8.7	Appartenance des structures à 2, 3, 4, 5, 10 et 20 clusters au cours de la dynamique de 20 ns de production avec l'enzyme seul.	144
8.8	Mise en évidence (en rouge) des différences structurales entre les structures moyennées pour les clusters 2 et 5 de l'enzyme.	146
8.9	Snapshot de l'intermédiaire tétraédrique formé avec le propanoate de (<i>S</i>)-1-méthylpentyle.	147
8.10	Appartenance des structures à 20, 10, 5, 4, 3, et 2 clusters au cours de la dynamique de 20 ns de production avec l'enzyme seul. « Clustering » basé sur les résidus 35 à 80, 100 à 240 et 260 à 290.	148
8.11	Comparaison directe de la structure représentative des dix dernières nanosecondes pour le système avec l'énantiomère <i>R</i> et <i>S</i> . Le code couleur indique en bleu les régions très bien superposées et en rouge les régions différentes.	150
8.12	Mesure de la déviation (en Å) de chaque carbone α entre la structure représentative des dix dernières nanosecondes pour le système avec les énantiomères <i>R</i> et <i>S</i>	151
8.13	Angle dièdre définissant la rotation de toute la chaîne latérale du résidu T42 au cours de la trajectoire de 20 ns pour le système avec l'énantiomère <i>S</i>	152
8.14	Vue 1. Site actif pour les six clusters retenus pour les trois systèmes étudiés après alignement sur le squelette peptidique des résidus 103, 104, 106, 224, 187, 40, 42, 47, 278, 282, 285 et du squelette peptidique du résidu 105, à l'exclusion des hydrogènes. Code couleur des clusters : S1 : bleu, S2 : bleu clair, R1 : rouge, R2 : orange, E1 : gris clair, E2 : gris foncé.	153

8.15	Vue 2. Site actif pour les six clusters retenus pour les trois systèmes étudiés après alignement sur le squelette peptidique des résidus 103, 104, 106, 224, 187, 40, 42, 47, 278, 282, 285 et du squelette peptidique du résidu 105, à l'exclusion des hydrogènes. Code couleur des clusters : S1 : bleu, S2 : bleu clair, R1 : rouge, R2 : orange, E1 : gris clair, E2 : gris foncé.	154
8.16	Angle dièdre définissant la rotation de toute la chaîne latérale du résidu I285. En trait plein pour le système avec l'énantiomère <i>R</i> et en pointillé pour l'énantiomère <i>S</i>	155
8.17	Représentation du feuillet β et du site actif avec enz-IT- <i>R</i> (feuillet en bleu, atomes de carbone en bleu ciel, atomes d'azote en bleu foncé, et atomes d'oxygène en rouge, groupe alkoyle du substrat en vert) et enz-IT- <i>S</i> (toute la structure en orange).	158
8.18	Réaction de transestérification pour la résolution du pentan-2-ol.	159
9.1	RMSD du squelette peptidique de la structure au cours de la trajectoire de production de 10 ns comparé avec la structure cristallographique. En noir, l'enzyme sauvage, en rouge le mutant T42V, en vert, le mutant S47A, en bleu le double mutant T42V/S47A.	168
9.2	Fluctuation du volume (\AA^3) du parallélépipède au cours de la dynamique de 10 ns pour l'enzyme sauvage défini à partir des coordonnées suivantes : $X_{min} = X_{C\alpha/42}$, $X_{max} = X_{C\alpha/278}$, $Y_{min} = Y_{C\alpha/104}$, $Y_{max} = Y_{C\alpha/278}$, $Z_{min} = Z_{C\alpha/104}$, $Z_{max} = Z_{C\alpha/40}$	169
9.3	Fraction de volume libre au cours de la dynamique de 10 ns pour l'enzyme sauvage, en utilisant le critère d'espace libre dans un rayon équivalent à la distance de van der Waals. En noir, la taille du parallélépipède définie selon la position des carbones α clefs est recalculée sur chaque structure. En rouge, la taille et la position du parallélépipède sont calculées une fois pour toute sur la structure cristallographique 1TCA.	170
9.4	Fraction de volume libre au cours de la dynamique de 10 ns pour l'enzyme sauvage, en utilisant le critère d'espace libre dans un rayon équivalent à la distance de van der Waals, la taille et la position du parallélépipède sont calculées une fois pour toute sur la structure cristallographique 1TCA. La résolution du maillage de la grille explorée par la sonde est de 1 \AA pour le tracé en noir, et de 0,2 \AA pour le tracé en rouge.	171
9.5	Fraction de volume libre au cours de la dynamique de 10 ns pour l'enzyme sauvage, en utilisant le critère d'espace libre dans un rayon équivalent à la distance de van der Waals augmenté de 1,6 \AA , le tout multiplié par 0,85.	172
9.6	Représentation du parallélépipède au niveau du site actif pour la structure cristallographique 1TCA. Les petites sphères vertes correspondent aux points de l'espace vide dans un maillage de 1 \AA selon le critère d'espace libre dans un rayon équivalent à la distance de van der Waals. Les petites sphères oranges correspondent aux points de l'espace vide dans un maillage de 1 \AA selon le critère d'espace libre pouvant accueillir une molécule d'eau (le rayon équivalent à la distance de van der Waals augmenté de 1,6 \AA , le tout multiplié par 0,85).	173

9.7	Fraction de volume libre au cours de la dynamique de 10 ns pour le parallélépipède défini à partir des coordonnées suivantes : $X_{min} = X_{C\alpha/42}$, $X_{max} = X_{C\alpha/278}$, $Y_{min} = Y_{C\alpha/104}$, $Y_{max} = Y_{C\alpha/278}$, $Z_{min} = Z_{C\alpha/47}$, $Z_{max} = Z_{C\alpha/40}$, en utilisant le critère d'espace libre dans un rayon équivalent à la distance de van der Waals, la taille et la position du parallélépipède sont calculées une fois pour toute sur la structure cristallographique 1TCA. La résolution du maillage de la grille explorée par la sonde est de 0,2 Å. En noir, l'enzyme sauvage, en rouge le mutant T42V, en vert, le mutant S47A, en bleu le double mutant T42V/S47A.	174
9.8	Les liaisons hydrogène du tableau 9.1 (numérotées de 1 à 5) sont ici représentées sur la structure cristallographique.	176
9.9	Snapshots du site actif des différentes structures aux environs de 5 ns. Le squelette peptidique des structures est aligné sur celui de la structure cristallographique. En bleu turquoise (carbone) et rouge (oxygène), la structure cristallographique, en noir, l'enzyme sauvage, en rouge le mutant T42V, en vert, le mutant S47A, en bleu le double mutant T42V/S47A.	178
9.10	Angle dièdre de la chaîne latérale du résidu V42 formé par les atomes contigus N-C α -CB-CG2. La courbe pour le mutant T42V est noire, la courbe pour le mutant T42V/S47A est en rouge.	179
9.11	Angle dièdre de la chaîne latérale du résidu S47 formé par les atomes contigus N-C α -CB-OG. La courbe pour le mutant T42V est en noir, la courbe pour l'enzyme sauvage est en rouge.	180
9.12	Les neuf atomes lourds susceptibles d'établir des liaisons hydrogène avec l'eau dans la poche stéréospécifique : N $_{G39}$, O $_{T40}$, N $_{T40}$, OG1 $_{T40}$, OG1 $_{T42}$, N $_{T42}$, OG $_{S105}$, NE2 $_{H224}$, et OG $_{S47}$	182
9.13	Proportion du temps où une liaison hydrogène avec l'eau est établie selon les mêmes critères de distance et d'angle données dans le tableau 9.1 concernant les sept atomes lourds susceptibles d'établir des liaisons hydrogène avec l'eau dans la poche stéréospécifique : O $_{T40}$, N $_{T40}$, OG1 $_{T40}$, OG1 $_{T42}$, OG $_{S105}$, NE2 $_{H224}$, et OG $_{S47}$	183
9.14	Proportion du temps où une liaison hydrogène est établie selon les critères de distance et d'angle moins stricts, pour les sept atomes lourds susceptibles d'établir des liaisons hydrogène avec l'eau dans la poche stéréospécifique : O $_{T40}$, N $_{T40}$, OG1 $_{T40}$, OG1 $_{T42}$, OG $_{S105}$, NE2 $_{H224}$, et OG $_{S47}$	185
9.15	Structures représentant un positionnement moyenné des atomes lourds pour les quatre trajectoires, ainsi que la structure cristallographique. En bleu turquoise (carbone) et rouge (oxygène), la structure cristallographique, en noir, l'enzyme sauvage, en rouge le mutant T42V, en vert, le mutant S47A, en bleu le double mutant T42V/S47A.	187
B.1	Dendrogrammes définis avec la méthode Ward à partir de la matrice RMSD calculée sur la trajectoire de 20 ns pour l'enzyme seul et l'enzyme avec l'intermédiaire tétraédrique formé avec les énantiomères <i>R</i> et <i>S</i> du propanoate de 1-méthylpentyle.	213

B.2	Appartenance des structures à 2, 3, 4, 5, 10, et 20 clusters au cours de la dynamique de 20 ns de production avec l'enzyme avec l'intermédiaire tétraédrique formé avec le propanoate de (<i>R</i>)-1-méthylpentyle. « Clustering » basé sur le squelette peptidique de toute la séquence.	214
B.3	Appartenance des structures à 2, 3, 4, 5, 10, et 20 clusters au cours de la dynamique de 20 ns de production avec l'enzyme avec l'intermédiaire tétraédrique formé avec le propanoate de (<i>S</i>)-1-méthylpentyle. « Clustering » basé sur le squelette peptidique de toute la séquence.	215
B.4	Appartenance des structures à 2, 3, 4, 5, 10, et 20 clusters au cours de la dynamique de 20 ns de production avec l'enzyme avec l'intermédiaire tétraédrique formé avec le propanoate de (<i>R</i>)-1-méthylpentyle. « Clustering » basé sur les résidus 35 à 80, 100 à 240 et 260 à 290.	216
B.5	Appartenance des structures à 2, 3, 4, 5, 10, et 20 clusters au cours de la dynamique de 20 ns de production avec l'enzyme avec l'intermédiaire tétraédrique formé avec le propanoate de (<i>S</i>)-1-méthylpentyle. « Clustering » basé sur les résidus 35 à 80, 100 à 240 et 260 à 290.	217
B.6	Appartenance des structures à 2, 3, 4, 5, 10, et 20 clusters au cours de la dynamique de 20 ns de production avec l'enzyme avec l'intermédiaire tétraédrique formé avec le propanoate de (<i>R</i>)-1-méthylpentyle. « Clustering » basé sur les résidus du site actif (incluant le squelette peptidique et atomes lourds des chaînes latérales).	218
B.7	Appartenance des structures à 2, 3, 4, 5, 10, et 20 clusters au cours de la dynamique de 20 ns de production avec l'enzyme avec l'intermédiaire tétraédrique formé avec le propanoate de (<i>S</i>)-1-méthylpentyle. « Clustering » basé sur les résidus du site actif (incluant le squelette peptidique et atomes lourds des chaînes latérales).	219

Liste des tableaux

1.1	Séquence des acides aminés de la lipase B sauvage de <i>Candida antarctica</i> . La séquence propeptidique est grisée.	11
2.1	Quelques exemples de molécules chirales avec leurs propriétés biologiques. . .	27
2.2	Ratio énantiomérique de la CALB pour quelques alcools secondaires, avec une énantiopréférence pour la forme <i>R</i> . Il s'agit d'une réaction de transestérification, le donneur d'acyle est le thiooctanoate d'éthyle et la température est de 38°C (Rotticci <i>et al.</i> , 1998).	31
3.1	Influence du donneur d'acyle sur le ratio énantiomérique <i>E</i> dans la résolution de trois alcools 1 , 2 et 3 respectivement 1-phénoxy-, 1-phénylméthoxy- et 1-(2-phényléthoxy)-2-propanol) avec la CALB dans l'hexane à 30 °C (Hoff <i>et al.</i> , 1996).	45
3.2	Aminolyse de l'acétate de (\pm)-1-phénylbutyle par la CALB avec différentes amines. Le taux de conversion <i>c</i> et le ratio énantiomérique <i>E</i> (García-Urdiales <i>et al.</i> , 2001).	47
3.3	Efficacité catalytique et paramètres cinétiques de l'acylation de thymidine avec le butyrate de vinyle par la subtilisine dans le THF à 30 °C avec pré-traitement par lyophilisation avec différentes molécules (Rich et Dordick, 1997).	54
3.4	Ratios énantiomériques <i>E</i> pour l'hydrolyse du butanoate de 3-chloro-1-phénylméthoxy-2-propyle par la CALB immobilisée dans différents solvants (Laudhaug <i>et al.</i> , 1998).	55
6.1	Valeurs de pK_a obtenues avec Propka (Li <i>et al.</i> , 2005)	88
6.2	Énergie totale (en kcal.mol ⁻¹) du système minimisé pour le (<i>S</i>)-pentan-2-ol en fonction des angles dièdres (en degrés).	99
6.3	Énergie totale (en kcal.mol ⁻¹) du système minimisé pour le (<i>R</i>)-pentan-2-ol en fonction des angles dièdres (en degrés).	103
6.4	Longueur des liaisons hydrogène (en Å) entre atomes lourds pour le (<i>S</i>)-pentan-2-ol.	110
6.5	Longueur des liaisons hydrogène (en Å) entre atomes lourds pour le (<i>R</i>)-pentan-2-ol.	111
7.1	Constantes cinétiques pour les formes énantiopures <i>R</i> et <i>S</i> du butan-2-ol et du pentan-2-ol (V_{max}^{app} exprimé en $mmol.min^{-1}.mg^{-1}$ d'enzyme immobilisé). . . .	118
7.2	Calculs de $\Delta F_{R \rightarrow S}$ et $\Delta F_{S \rightarrow R}$ comparés aux résultats expérimentaux $\Delta \Delta G_{R \rightarrow S}^{\ddagger}$ dérivés des ratios énantiomériques <i>E</i> déterminés expérimentalement. Toutes les différences d'énergie libre sont exprimées en kcal.mol ⁻¹	124

8.1	Influence du donneur d'acyle sur le ratio énantiomérique E dans la résolution du pentan-2-ol catalysée par la CALB dans le réacteur solide/gaz à 70 °C en condition anhydre. L'activité thermodynamique est de 0,1 pour l'ester et de 0,05 pour le pentan-2-ol (Marton, 2010).	140
8.2	RMSD des clusters retenus pour les 3 systèmes étudiés.	145
8.3	RMSD des clusters (basé sur les résidus 35 à 80, 100 à 240 et 260 à 290) retenus pour les 3 systèmes étudiés après alignement sur le squelette peptidique des résidus 35 à 80, 100 à 240 et 260 à 290	147
8.4	RMSD des clusters retenus pour les 3 systèmes étudiés après alignement sur le squelette peptidique des résidus 103, 104, 106, 224, 187, 40, 42, 47, 278, 282, 285 ainsi que du squelette peptidique du résidu 105, à l'exclusion des hydrogènes.152	152
8.5	Facteur B des atomes du résidu I285 dans la structure PDB 1TCA.	157
8.6	Ratios énantiomériques E pour la résolution du pentan-2-ol à une température de 70 °C avec le propanoate de méthyle par la CALB immobilisée seule et co-séchée avec le (R)-2-aminohexane, (S)-2-aminohexane et le 1-aminohexane avec des ratios du nombre de mole de molécule par nombre de mole d'enzyme compris entre 1 et 1000. Les valeurs sont données avec un intervalle de confiance à 95 %. 160	160
8.7	Activités mesurées pour la résolution du pentan-2-ol à une température de 45 °C avec le propanoate de méthyle par la CALB immobilisée seule et co-séchée avec le (R)-2-aminohexane, (S)-2-aminohexane et le 1-aminohexane avec des ratios du nombre de mole de molécule par nombre de mole d'enzyme compris entre 1 et 1000. Les valeurs sont données avec un intervalle de confiance à 95 %. Les vitesses sont exprimées en $mol.min^{-1}.mg^{-1}$ d'enzyme immobilisé.	161
8.8	Ratios énantiomériques E pour la résolution du pentan-2-ol à une température de 70 °C avec le propanoate de méthyle par la CALB immobilisée dans la matrice sol-gel avec le (R)-2-aminohexane, (S)-2-aminohexane et le 1-aminohexane avec des ratios du nombre de mole de molécule par nombre de mole d'enzyme égales à 1 et 1000. Les valeurs sont données avec un intervalle de confiance à 95 %. .	163
8.9	Activités mesurées pour la résolution du pentan-2-ol à une température de 70 °C avec le propanoate de méthyle par la CALB immobilisée dans la matrice sol-gel avec le (R)-2-aminohexane, (S)-2-aminohexane et le 1-aminohexane avec des ratios du nombre de mole de molécule par nombre de mole d'enzyme égales à 1 et 1000. Étant donné qu'il n'y a pas assez de répétitions de l'expérience, on ne peut pas fournir d'intervalle de confiance à 95 %. L'écart-type est de l'ordre de 1.10^{-3} . Les vitesses sont exprimées en $mol.min^{-1}.mg^{-1}$ d'enzyme immobilisé. 163	163
9.1	Les liaisons hydrogène observables chez la CALB sauvage et les différents mutants. Le taux d'occupation est donné avec un critère d'angle (D-H-A) s'écartant de moins de 20 degrés de l'angle optimal et une distance (donneur-accepteur) inférieure à 3.0 Å entre les atomes lourds. Les liaisons hydrogène impossibles en raison de l'absence du donneur et/ou de l'accepteur sont indiquées par un « X ». La numérotation à gauche fait référence à celle de la figure 9.8. Concernant la liaison hydrogène numéro 3, les rôles de donneur et d'accepteur sont interchangeables entre les deux groupements hydroxyle, expliquant la double entrée dans le tableau.	176
9.2	Facteur B des atomes des résidus T42 et S47 dans la structure PDB 1TCA. . .	181

9.3	Nombre moyen de molécules d'eau liées par une liaison hydrogène dans la poche stéréospécifique avec les critères définis précédemment.	184
9.4	Les différents types de liaisons hydrogène observables selon Jeffrey (1997). . .	185

Bibliographie

- [1] P. D. de María, C. Carboni-Oerlemans, B. Tuin, G. Bargeman, A. van der Meer, R. van Gemert. Biotechnological applications of *Candida antarctica* lipase A : State-of-the-art. *J. Mol. Catal. B : Enzym.* **2005.** *37*, 36–46.
- [2] A. Ghanem. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. *Tetrahedron* **2007.** *38*, 1721–1754.
- [3] C. Orrenius, N. Öhrner, D. Rotticci, A. Mattson, K. Hult, T. Norin. *Candida antarctica* lipase B catalysed kinetic resolutions : Substrate structure requirements for the preparation of enantiomerically enriched secondary alcohols. *Tetrahedron : Asymmetry* **1995.** *6*, 1217–1220.
- [4] C. Orrenius, F. Haeffner, D. Rotticci, N. Öhrner, T. Norin, K. Hult. Chiral recognition of alcohol enantiomers in acyl transfer reactions catalysed by *Candida antarctica* lipase B. *Biocatal. Biotransform.* **1998.** *16*, 1–15.
- [5] H. Uyama, S. Suda, H. Kikuchi, S. Kobayashi. Extremely efficient catalysis of immobilized lipase in ring-opening polymerization of lactones. *Chem. Lett.* **1997.** *11*, 1109–1110.
- [6] A. Córdova, A. Hult, K. Hult, H. Ihre, T. Iversen, E. Malmström. Synthesis of a poly(ϵ -caprolactone) monosubstituted first generation dendrimer by lipase catalysis. *J. Am. Chem. Soc.* **1998.** *120*, 13521–13522.
- [7] F. Binns, P. Harffey, S. M. Roberts, A. Taylor. Studies of lipase-catalyzed polyesterification of an unactivated diacid/diol system. *J. Polym. Sci., Part A : Polym. Chem.* **1998.** *36*, 2069–2079.
- [8] J. Uppenberg, M. T. Hansen, S. Patkar, T. A. Jones. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure* **1994.** *2*, 293–308.
- [9] G. N. Ramachandran, V. Sasisekharan, C. Ramakrishnan. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J. Mol. Biol.* **1963.** *7*, 95–99.
- [10] R. D. Schmid, R. Verger. Lipases : Interfacial enzymes with attractive applications. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1998.** *37*, 1608–1633.
- [11] P. L. A. Overbeeke, G. C. N. Khalaf, J. A. Jongejan, J. J. Heijnen. Influence of lid conformation on lipase enantioselectivity. *J. Mol. Catal. B : Enzym.* **2000.** *10*, 385–393.
- [12] M. Martinelle, M. Holmquist, K. Hult. On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase. *Biochim. Biophys. Acta* **1995.** *1258*, 272–276.

- [13] J. Uppenberg, N. Oehrner, M. Norin, K. Hult, G. J. Kleywegt, S. Patkar, V. Waagen, T. Anthonsen, J. T. Alwyn. Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols. *Biochemistry* **1995**. *34*, 16838–16581.
- [14] J. Pleiss, M. Fischer, R. D. Schmid. Anatomy of lipase binding sites : the scissile fatty acid binding site. *Chem. Phys. Lipids* **1998**. *93*, 67–80.
- [15] J. Pfeffer, A. Freund, R. Bel-Rhliid, C.-E. Hansen, M. Reuss, R. D. Rolf D. Schmid, S. C. Maurer. Highly efficient enzymatic synthesis of 2-monoacylglycerides and structured lipids and their production on a technical scale. *Lipids* **2007**. *42*, 947–953.
- [16] M.-P. Bousquet-Dubouch, M. Graber, N. Sousa, S. Lamare, M.-D. Legoy. 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. *Biochim. Biophys. Acta* **2001**. *26*, 90–99.
- [17] C. Hedfors, K. Hult, M. Martinelle. Lipase chemoselectivity towards alcohol and thiol acyl acceptors in a transacylation reaction. *J. Mol. Catal. B : Enzym.* **2010**. *66*, 120–123.
- [18] R. W. Teng, D. McManus, J. Aylward, S. Ogbourne, J. Johns, P. Parsons, A. Bacic. Regioselective acylation of 3-*O*-angeloylingenol by *Candida antarctica* lipase B. *Fitoterapia* **2009**. *80*, 233–236.
- [19] T. Miyazawa, M. Hamadaa, M. Ryohei, T. Murashimaa, T. Yamadan. Highly regioselective propanoylation of dihydroxybenzenes mediated by *Candida antarctica* lipase B in organic solvents. *Tetrahedron Lett.* **2008**. *49*, 175–178.
- [20] B. Schulze, M. G. Wubbolts. Biocatalysis for industrial production of fine chemicals. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**. *10*, 609–615.
- [21] C.-S. Chen, C. J. Sih. General aspects and optimization of enantioselective biocatalysis in organic solvents : The use of lipases. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1989**. *28*, 695–707.
- [22] C.-S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas, C. J. Sih. Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**. *104*, 1294–1299.
- [23] V. Prelog. Specification of the stereospecificity of some oxido-reductases by diamond lattice sections. *Pure Appl. Chem.* **1964**. *9*, 119–130.
- [24] R. J. Kazlauskas, A. N. E. Weissfloch, A. T. Rappaport, L. A. Cuccia. 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*. *J. Org. Chem.* **1991**. *56*, 2656–2665.
- [25] A. L. Onga, A. H. Kamaruddin, S. Bhatia, W. S. Long, S. T. Lima, R. Kumaria. Performance of free *Candida antarctica* lipase B in the enantioselective esterification of (*R*)-ketoprofen. *Enzyme Microb. Technol.* **2006**. *39*, 924–929.
- [26] F. Haeffner, C. Orrenius, T. Norin, K. Hult. Molecular recognition of *sec*-alcohol enantiomers by *Candida antarctica* lipase B. *J. Mol. Catal. B : Enzym.* **1998**. *5*, 267–272.

- [27] F. Haeffner, T. Norin, K. Hult. Molecular modeling of the enantioselectivity in lipase-catalyzed transesterification reactions. *Biophys. J.* **1998**. *74*, 1251–1262.
- [28] A. Warshel, G. Naray-Szabo, F. Sussman, J. K. Hwang. How do serine proteases really work? *Biochemistry* **1989**. *28*, 3629–3637.
- [29] N. Otte, M. Bocola, W. Thiel. Force-field parameters for the simulation of tetrahedral intermediates of serine hydrolases. *J. Comput. Chem.* **2009**. *30*, 154–62.
- [30] E. García-Urdiales, N. Ríos-Lombardía, J. Mangas-Sánchez, V. Gotor-Fernández, V. Gotor. Influence of the nucleophile on the *Candida antarctica* lipase B-catalysed resolution of a chiral acyl donor. *ChemBioChem* **2009**. *10*, 1830–1838.
- [31] T. Schulz, J. Pleiss, R. D. Schmid. Stereoselectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase toward secondary alcohols : A quantitative model. *Protein Sci.* **2000**. *9*, 1053–1062.
- [32] J. Nyhlén, B. Martín-Matute, A. G. Sandström, M. Bocola, J.-E. Bäckvall. Influence of δ -functional groups on the enantiorecognition of secondary alcohols by *Candida antarctica* lipase B. *ChemBioChem* **2008**. *9*, 1968–1974.
- [33] C. H. Kwon, D. Y. Shin, J. H. Lee, K. S. Wook, K. J. Won. Molecular modeling and its experimental verification for the catalytic mechanism of *Candida antarctica* lipase B. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2007**. *17*, 1098–1105.
- [34] C. Orrenius, C. van Heusden, J. van Ruiten, P. Overbeeke, H. Kierkels, J. A. Duine, A. J. Jongejan. Simple conformation space search protocols for the evaluation of enantioselectivity of lipases. *Protein Eng.* **1998**. *11*, 1147–1153.
- [35] S. Raza, L. Fransson, K. Hult. Enantioselectivity in *Candida antarctica* lipase B : A molecular dynamics study. *Protein Sci.* **2001**. *10*, 329–338.
- [36] A. P. L. Overbeeke, S. C. Orrenius, J. A. Jongejan, J. A. Duine. Enthalpic and entropic contributions to lipase enantioselectivity. *Chem. Phys. Lipids* **1998**. *93*, 81–93.
- [37] J. Ottosson, L. Fransson, K. Hult. Substrate entropy in enzyme enantioselectivity : An experimental and molecular modeling study of a lipase. *Protein Sci.* **2002**. *11*, 1462–1471.
- [38] V. Leonard-Nevers, Z. Marton, S. Lamare, K. Hult, M. Graber. Understanding water effect on *Candida antarctica* lipase B activity and enantioselectivity towards secondary alcohols. *J. Mol. Catal. B : Enzym.* **2009**. *59*, 90–95.
- [39] S. Tomić, B. Kojić-Prodić. A quantitative model for predicting enzyme enantioselectivity : application to *Burkholderia cepacia* lipase and 3-(aryloxy)-1,2-propanediol derivatives. *J. Mol. Graphics Modell.* **2002**. *21*, 241–252.
- [40] P. Braiuca, K. Lorena, V. Ferrario, C. Ebert, L. Gardossi. A three-dimensional quantitative structure-activity relationship (3D-QSAR) model for predicting the enantioselectivity of *Candida antarctica* lipase B. *Adv. Synth. Catal.* **2009**. *351*, 1293–1302.
- [41] P. J. Goodford. A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. *J. Med. Chem.* **1985**. *28*, 849–857.

- [42] J. Gu, J. Liu, H. Yu. Quantitative prediction of enantioselectivity of *Candida antarctica* lipase B by combining docking simulations and quantitative structure–activity relationship (QSAR) analysis. *J. Mol. Catal. B : Enzym.* **2011.** *72,* 238–247.
- [43] L. Ji, T. Xiaoling, Y. Hongwei. Prediction of the enantioselectivity of lipases and esterases by molecular docking method with modified force field parameters. *Biotechnol. Bioeng.* **2010.** *105,* 687–696.
- [44] P. B. Juhl, P. Trodler, S. Tyagi, J. Pleiss. Modelling substrate specificity and enantioselectivity for lipases and esterases by substrate-imprinted docking. *BMC Struct. Biol.* **2009.** *9,* 39–55.
- [45] Y. Zhou. Computational study of enzyme enantioselectivity. Ph.D. thesis, University of Delft, Netherlands **2006.**
- [46] J. Ottosson, K. Hult. Influence of acyl chain length on the enantioselectivity of *Candida antarctica* lipase B and its thermodynamic components in kinetic resolution of sec-alcohols. *J. Mol. Catal. B : Enzym.* **2001.** *11,* 1025–1028.
- [47] D. Lee, Y. K. Choi, M.-J. Kim. Enhancing the enantioselectivity of lipase in transesterification by substrate matching : An enzyme memory based approach. *Org. Lett.* **2000.** *2,* 2553–2555.
- [48] B. H. Hoff, H. W. Anthonsen, T. Anthonsen. The enantiomer ratio strongly depends on the alkyl part of the acyl donor in transesterification with lipase B from *Candida antarctica*. *Tetrahedron : Asymmetry* **1996.** *7,* 3187–3192.
- [49] T. V. Hansen, V. Waagen, V. Partali, H. W. Anthonsen, T. Anthonsen. Co-solvent enhancement of enantioselectivity in lipase-catalysed hydrolysis of racemic esters. a process for production of homochiral C-3 building blocks using lipase B from *Candida antarctica*. *Tetrahedron : Asymmetry* **1995.** *6,* 499–504.
- [50] J. González-Sabín, V. Gotor, F. Rebolledo. 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* **2004.** *15,* 481–488.
- [51] E. García-Urdiales, F. Rebolledo, V. Gotor. 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. *Adv. Synth. Catal.* **2001.** *343,* 646–654.
- [52] D. Rotticci, C. Orrenius, K. Hult, T. Norin. Enantiomerically enriched bifunctional sec-alcohols prepared by *Candida antarctica* lipase B catalysis. evidence of non-steric interactions. *Tetrahedron : Asymmetry* **1997.** *8,* 359–362.
- [53] P. Lozano, T. De Diego, D. Carrié, M. Vaultier, J. L. Iborra. Lipase catalysis in ionic liquids and supercritical carbon dioxide at 150 °C. *Biotechnol. Prog.* **2003.** *19,* 380–382.
- [54] N. A. Turner, E. N. Vulfson. At what temperature can enzymes maintain their catalytic activity? *Enzyme Microb. Technol.* **2000.** *27,* 108–113.
- [55] A. O. Magnusson, M. Takwa, A. Hamberg, K. Hult. An *S*-selective lipase was created by rational redesign and the enantioselectivity increased with temperature. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005.** *44,* 4582–4585.

- [56] P. L. A. Overbeeke, J. Ottosson, K. Hult, J. A. Jongejan, J. A. Duine. The temperature dependence of enzymatic kinetic resolutions reveals the relative contribution of enthalpy and entropy to enzymatic enantioselectivity. *Biocatal. Biotransform.* **1999.** *17,* 61–79.
- [57] T. Sakai, I. Kawabata, T. Kishimoto, T. Ema, M. Utaka. Enhancement of the enantioselectivity in lipase-catalyzed kinetic resolutions of 3-phenyl-2H-azirine-2-methanol by lowering the temperature to -40 °C. *J. Org. Chem.* **1997.** *62,* 4906–4907.
- [58] J. Ottosson, J. C. Rotticci-Mulder, D. Rotticci, K. Hult. Rational design of enantioselective enzymes requires considerations of entropy. *Protein Sci.* **2001.** *10,* 1769–1774.
- [59] J. Ottosson, L. Fransson, J. W. King, K. Hult. Size as a parameter for solvent effects on *Candida antarctica* lipase B enantioselectivity. *Biochim. Biophys. Acta* **2002.** *1594,* 325–334.
- [60] J. O. Rich, J. S. Dordick. Controlling subtilisin activity and selectivity in organic media by imprinting with nucleophilic substrates. *J. Am. Chem. Soc.* **1997.** *119,* 3245–3252.
- [61] J. O. Rich, V. V. Mozhaev, J. S. Dordick, D. S. Clark, Y. L. Khmelnitsky. Molecular imprinting of enzymes with water-insoluble ligands for nonaqueous biocatalysis. *J. Am. Chem. Soc.* **2002.** *124,* 5254–5255.
- [62] K. Lundhaug, P. L. A. Overbeeke, J. A. Jongejan, T. Anthonsen. Organic co-solvents 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* **1998.** *9,* 2851–2856.
- [63] D. Lee, Y. K. Choi, M.-J. Kim. Enhancing the enantioselectivity of lipase in transesterification by substrate matching : An enzyme memory based approach. *Org. Lett.* **2000.** *2,* 2553–2555.
- [64] D. Rotticci, J. C. Rotticci-Mulder, S. Denman, T. Norin, K. Hult. Improved enantioselectivity of a lipase by rational protein engineering. *ChemBioChem* **2001.** *2,* 766–770.
- [65] A. O. Magnusson, J. C. Rotticci-Mulder, A. Santagostino, K. Hult. Creating space for large secondary alcohols by rational redesign of *Candida antarctica* lipase B. *ChemBioChem* **2005.** *6,* 1051–1056.
- [66] V. Leonard, S. Lamare, M.-D. Legoy, M. Graber. Enantioselective acylation of *R*-2-pentanol in a solid/gas reactor catalysed by lipase B from *Candida antarctica*. *J. Mol. Catal. B : Enzym.* **2004.** *32,* 53–59.
- [67] M. B. Smith, J. March. *Advanced Organic Chemistry : Reactions, Mechanisms, And Structure.* Wiley-Interscience **2001.**
- [68] A. Ducret, M. Trani, R. Lortie. Lipase-catalyzed enantioselective esterification of ibuprofen in organic solvents under controlled water activity. *Enzyme Microb. Technol.* **1998.** *22,* 212–216.
- [69] S. Lamare, M. D. Legoy. Working at controlled water activity in a continuous process : the gas/solid system as a solution. *Biotechnol. Bioeng.* **1995.** *45,* 387–397.

- [70] G. Hellner, Z. Boros, A. Tomin, L. Poppe. Novel sol-gel lipases by designed bioimprinting for continuous-flow kinetic resolutions. *Adv. Synth. Catal.* **2011.** 353, 2481–2491.
- [71] T. Lazaridis, M. Karplus. Effective energy function for proteins in solution. *Proteins : Struct., Funct., Genet.* **1999.** 35, 133–152.
- [72] T. Lazaridis, M. Karplus. Discrimination of the native from misfolded protein models with an energy function including implicit solvation. *J. Mol. Biol.* **1999.** 288, 477–487.
- [73] R. W. Zwanzig. Hight-temperature equation of state by a perturbation method. I. Nonpolar gases. *J. Chem. Phys.* **1954.** 22, 1420–1426.
- [74] B. R. Brooks, C. L. Brooks III, A. D. Mackerell, L. Jr Nilsson, R. J. Petrella, B. Roux, Y. Won, G. Archontis, B. C, S. Boresch, A. Caffisch, L. Caves, Q. Cui, A. R. Dinner, M. Feig, S. Fischer, J. Gao, M. Hodoscek, W. Im, K. Kuczera, T. Lazaridis, J. MA, V. Ovchinnikov, E. Paci, R. W. Pastor, C. B. Post, J. Z. Pu, M. Schaeffer, B. Tidor, R. M. Venable, H. L. Woodcock, X. Wu, W. Yang, D. M. York, M. Karplus. Charmm : The biomolecular simulation program. *J. Comput. Chem.* **2009.** 30, 1545–1614.
- [75] P. Trodler, J. Pleiss. Modeling structure and flexibility of *Candida antarctica* lipase B in organic solvents. *BMC Struct. Biol.* **2008.** 8.
- [76] R. McCabe, A. Rodger, A. Taylor. A study of the secondary structure of *Candida antarctica* lipase B using synchrotron radiation circular dichroism measurements. *Enzyme Microb. Technol.* **2005.** 36, 70–74.
- [77] W. L. Jorgensen. Free energy calculations : a breakthrough for modeling organic chemistry in solution. *Acc. Chem. Res.* **1989.** 22, 184–189.
- [78] J. Aqvist. Ion-water interaction potentials derived from free energy perturbation simulations. *J. Phys. Chem.* **1990.** 94, 8021–8024.
- [79] T. Simonson, G. Archontis, M. Karplus. Free energy simulations come of age : Protein-ligand recognition. *Acc. Chem. Res.* **2002.** 35, 430–437.
- [80] A. Aleksandrov, D. Thompson, T. Simonson. Alchemical free energy simulations for biological complexes : powerful but temperamental. *J. Mol. Recognit.* **2010.** 23, 117–127.
- [81] R Development Core Team. *R : A Language and Environment for Statistical Computing.* R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria **2011.** ISBN 3-900051-07-0.
- [82] G. N. Lance, W. T. Williams. A general theory of classificatory sorting strategies : I. Hierarchical systems. *Comput. J.* **1967.** 9, 373–380.
- [83] J. H. Ward. Hierarchical grouping to optimize and objective function. *J. Am. Stat. Assoc.* **1963.** 58, 236–244.
- [84] A. Griffiths, L. A. Robinson, P. Willett. Hierarchic agglomerative clustering methods for automatic document classification. *J. Doc.* **1984.** 40, 175–205.
- [85] H. Li, A. D. Robertson, J. H. Jensen. Very fast empirical prediction and rationalization of protein pK_a values. *Proteins* **2005.** 61, 704–721.

- [86] D. Q. McDonald, W. C. Still. Application of free energy perturbation calculations to the enantioselective binding of peptides to C_3 -symmetric synthetic receptors. *J. Comput. Chem.* **1996**. *118*, 2073–2077.
- [87] C. de Graaf, C. Oostenbrink, P. H. J. Keizers, B. M. A. van Vugt-Lussenburg, J. N. M. Commandeur, N. P. E. Nico P E Vermeulen. Free energies of binding of *R*- and *S*-propranolol to wild-type and F483A mutant cytochrome P450 2D6 from molecular dynamics simulations. *Eur. Biophys. J.* **2007**. *36*, 589–599.
- [88] C. D. Christ, A. E. Mark, W. F. van Gunsteren. Basic ingredients of free energy calculations : A review. *J. Comput. Chem.* **2010**. *31*, 1569–1582.
- [89] A. Di Nola, A. T. Brünger. Free energy calculations in globular proteins : methods to reduce errors. *J. Comput. Chem.* **1998**. *19*, 1229–1240.
- [90] G. Colombo, S. Toba, J. K. M. Merz. Rationalization of the enantioselectivity of subtilisin in DMF. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**. *121*, 3486–3493.
- [91] H. Eyring, M. Polanyi. Uber einfache gasreaktionen. *Z. Phys. Chem.* **1931**. *12*, 279.
- [92] R. S. Philipps. Temperature effects on stereochemistry of enzymatic reactions. *Enzyme Microb. Technol.* **1992**. *14*, 417–419.
- [93] R. S. Philipps. Temperature modulation of the stereochemistry of enzymatic catalysis : Prospects for exploitation. *Trends Biotechnol.* **1996**. *14*, 13–16.
- [94] M. Skjøt, L. D. Maria, R. Chatterjee, A. Svendsen, S. A. Patkar, P. R. Østergaard, J. Brask. Understanding the plasticity of the α/β hydrolase fold : Lid swapping on the *Candida antarctica* lipase B results in chimeras with interesting biocatalytic properties. *ChemBioChem* **2009**. *10*, 520–527.
- [95] E. L. King, C. Altman. A schematic method of deriving the rate laws for enzyme-catalyzed reactions. *J. Phys. Chem.* **1956**. *60*, 1375–1378.
- [96] W. Cleland. The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products : I. nomenclature and rate equations. *Biochim. Biophys. Acta* **1963**. *67*, 104–137.
- [97] I. H. Segel. *Enzyme kinetics*, pages 606–625. Wiley, New York **1993**.
- [98] D. Lousa, A. M. Baptista, C. M. Soares. Structural determinants of ligand imprinting : A molecular dynamics simulation study of subtilisin in aqueous and apolar solvents. *Protein Sci.* **2011**. *20*, 379–386.
- [99] Z. Marton. Modélisation moléculaire et expérimentation en réacteur solide/gaz pour la compréhension de la sélectivité de la lipase B de *Candida antarctica*. Ph.D. thesis, Université La Rochelle, France **2010**.
- [100] Z. Marton, V. Léonard-Nevers, P.-O. Syrén, C. Bauer, S. Lamare, K. Hult, V. Tran, M. Graber. Mutations in the stereospecificity pocket and at the entrance of the active site of *Candida antarctica* lipase B enhancing enzyme enantioselectivity. *J. Mol. Catal. B : Enzym.* **2010**. *65*, 11–17.
- [101] S. J. Benkovic, S. Hammes-Schiffer. A perspective on enzyme catalysis. *Science* **2003**. *301*, 1196–1202.

- [102] N. R. Skrynnikov, F. A. A. Mulder, B. Hon, F. W. Dahlquist, L. E. Kay. Probing slow time scale dynamics at methyl-containing side chains in proteins by relaxation dispersion NMR measurements : Application to methionine residues in a cavity mutant of T4 lysozyme. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**. *123*, 4556–4566.
- [103] R. Ishima, J. M. Louis, D. A. Torchia. Transverse ^{13}C relaxation of CHD_2 methyl isotopomers to detect slow conformational changes of protein side chains. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**. *121*, 11589–11590.
- [104] L. Chaput, Y.-H. Sanejouand, A. Balloumi, V. Tran, M. Graber. Contribution of both catalytic constant and Michaelis constant to CALB enantioselectivity : Use of FEP calculations for prediction studies. *J. Mol. Catal. B : Enzym.* **2012**. *76*, 29–36.
- [105] G. Yang, J. Wu, G. Xu, L. Yang. Enhancement of the activity and enantioselectivity of lipase in organic systems by immobilization onto low-cost support. *J. Mol. Catal. B : Enzym.* **2008**. *57*, 96–103.
- [106] G. A. Jeffrey. *An introduction to hydrogen bonding*. Oxford University Press, New York **1997**.

Annexe A

Étude cinétique du mécanisme Bi-Bi Ping-Pong

Les équations de la vitesse de synthèse v^R et v^S pour les énantiomères produits R et S :

$$v^R = d[Q]/dt = k_{+4}[FB] - k_{-4}[Q][E] \quad (\text{A.1})$$

$$v^S = d[S]/dt = k_{+6}[FC] - k_{-6}[S][E] \quad (\text{A.2})$$

$$\frac{v^R}{[E]_t} = \frac{N_R}{D} \quad (\text{A.3})$$

$$\frac{v^S}{[E]_t} = \frac{N_S}{D} \quad (\text{A.4})$$

L'expression des numérateurs et du dénominateur, N_R , N_S , et D :

$$N_R = +n_1[Q][P] + n_2[C][Q] + n_3[B][S] + n_4[A][B] \quad (\text{A.5})$$

$$N_S = +n_5[S][P] + n_2[C][Q] + n_3[B][S] + n_6[A][C] \quad (\text{A.6})$$

$$D = +d_1[P][S] + d_2[Q][P] + d_3[C][S] + d_4[C][Q] + d_5[B][S] + d_6[B][Q] + d_7[A][P] \\ + d_8[A][C] + d_9[A][B] + d_{10}[S] + d_{11}[P] + d_{12}[Q] + d_{13}[C] + d_{14}[B] + d_{15}[A] \quad (\text{A.7})$$

$$n_1 = -k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-4}k_{-5} - k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-4}k_{+6} \quad (\text{A.8})$$

$$n_2 = -k_{-1}k_{-3}k_{-4}k_{+5}k_{+6} - k_{+2}k_{-3}k_{-4}k_{+5}k_{+6} \quad (\text{A.9})$$

$$n_3 = +k_{-1}k_{+3}k_{+4}k_{-5}k_{-6} + k_{+2}k_{+3}k_{+4}k_{-5}k_{-6} \quad (\text{A.10})$$

$$n_4 = +k_{+1}k_{+2}k_{+3}k_{+4}k_{-5} + k_{+1}k_{+2}k_{+3}k_{+4}k_{+6} \quad (\text{A.11})$$

$$n_5 = -k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-5}k_{-6} - k_{-1}k_{-2}k_{+4}k_{-5}k_{-6} \quad (\text{A.12})$$

$$n_6 = +k_{+1}k_{+2}k_{-3}k_{+5}k_{+6} + k_{+1}k_{+2}k_{+4}k_{+5}k_{+6} \quad (\text{A.13})$$

$$d_1 = k_{-2}k_{+4}k_{-5}k_{-6} + k_{-2}k_{-3}k_{-5}k_{-6} + k_{-1}k_{-2}k_{+4}k_{-6} + k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-6} \quad (\text{A.14})$$

$$d_2 = k_{-2}k_{-3}k_{-4}k_{+6} + k_{-2}k_{-3}k_{-4}k_{-5} + k_{-1}k_{-2}k_{-4}k_{+6} + k_{-1}k_{-2}k_{-4}k_{-5} \quad (\text{A.15})$$

$$d_3 = k_{-1}k_{+4}k_{+5}k_{-6} + k_{-1}k_{-3}k_{+5}k_{-6} + k_{+2}k_{+4}k_{+5}k_{-6} + k_{+2}k_{-3}k_{+5}k_{-6} \quad (\text{A.16})$$

$$d_4 = k_{-1}k_{-4}k_{+5}k_{+6} + k_{+2}k_{-4}k_{+5}k_{+6} + k_{-1}k_{-3}k_{-4}k_{+5} + k_{+2}k_{-3}k_{-4}k_{+5} \quad (\text{A.17})$$

$$d_5 = k_{-1}k_{+3}k_{-5}k_{-6} + k_{+2}k_{+3}k_{-5}k_{-6} + k_{-1}k_{+3}k_{+4}k_{-6} + k_{+2}k_{+3}k_{+4}k_{-6} \quad (\text{A.18})$$

$$d_6 = k_{-1}k_{+3}k_{-4}k_{+6} + k_{-1}k_{+3}k_{-4}k_{-5} + k_{+2}k_{+3}k_{-4}k_{+6} + k_{+2}k_{+3}k_{-4}k_{-5} \quad (\text{A.19})$$

$$d_7 = k_{+1}k_{-2}k_{+4}k_{+6} + k_{+1}k_{-2}k_{+4}k_{-5} + k_{+1}k_{-2}k_{-3}k_{+6} + k_{+1}k_{-2}k_{-3}k_{-5} \quad (\text{A.20})$$

$$d_8 = k_{+1}k_{+4}k_{+5}k_{+6} + k_{+1}k_{-3}k_{+5}k_{+6} + k_{+1}k_{+2}k_{+4}k_{+5} + k_{+1}k_{+2}k_{-3}k_{+5} \quad (\text{A.21})$$

$$d_9 = k_{+1}k_{+3}k_{+4}k_{+6} + k_{+1}k_{+3}k_{+4}k_{-5} + k_{+1}k_{+2}k_{+3}k_{+6} + k_{+1}k_{+2}k_{+3}k_{-5} \quad (\text{A.22})$$

$$d_{10} = k_{-1}k_{+4}k_{-5}k_{-6} + k_{-1}k_{-3}k_{-5}k_{-6} + k_{+2}k_{+4}k_{-5}k_{-6} + k_{+2}k_{-3}k_{-5}k_{-6} \quad (\text{A.23})$$

$$d_{11} = k_{-1}k_{-2}k_{+4}k_{+6} + k_{-1}k_{-2}k_{+4}k_{-5} + k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{+6} + k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-5} \quad (\text{A.24})$$

$$d_{12} = k_{-1}k_{-3}k_{-4}k_{+6} + k_{-1}k_{-3}k_{-4}k_{-5} + k_{+2}k_{-3}k_{-4}k_{+6} + k_{+2}k_{-3}k_{-4}k_{-5} \quad (\text{A.25})$$

$$d_{13} = k_{-1}k_{+4}k_{+5}k_{+6} + k_{-1}k_{-3}k_{+5}k_{+6} + k_{+2}k_{+4}k_{+5}k_{+6} + k_{+2}k_{-3}k_{+5}k_{+6} \quad (\text{A.26})$$

$$d_{14} = k_{-1}k_{+3}k_{+4}k_{+6} + k_{-1}k_{+3}k_{+4}k_{-5} + k_{+2}k_{+3}k_{+4}k_{+6} + k_{+2}k_{+3}k_{+4}k_{-5} \quad (\text{A.27})$$

$$d_{15} = k_{+1}k_{+2}k_{+4}k_{+6} + k_{+1}k_{+2}k_{+4}k_{-5} + k_{+1}k_{+2}k_{-3}k_{+6} + k_{+1}k_{+2}k_{-3}k_{-5} \quad (\text{A.28})$$

Annexe B

Annexe concernant les résultats du « clustering » dans les travaux sur l'effet d'empreinte

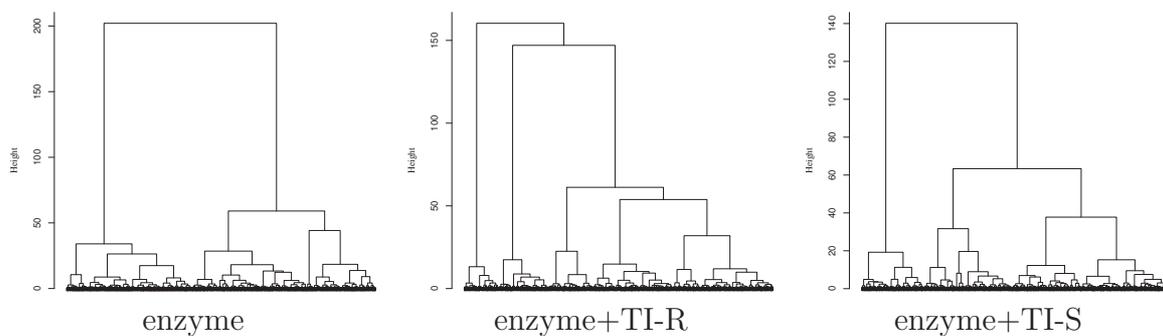


FIG. B.1 – Dendrogrammes définis avec la méthode Ward à partir de la matrice RMSD calculée sur la trajectoire de 20 ns pour l'enzyme seul et l'enzyme avec l'intermédiaire tétraédrique formé avec les énantiomères *R* et *S* du propanoate de 1-méthylpentyle.

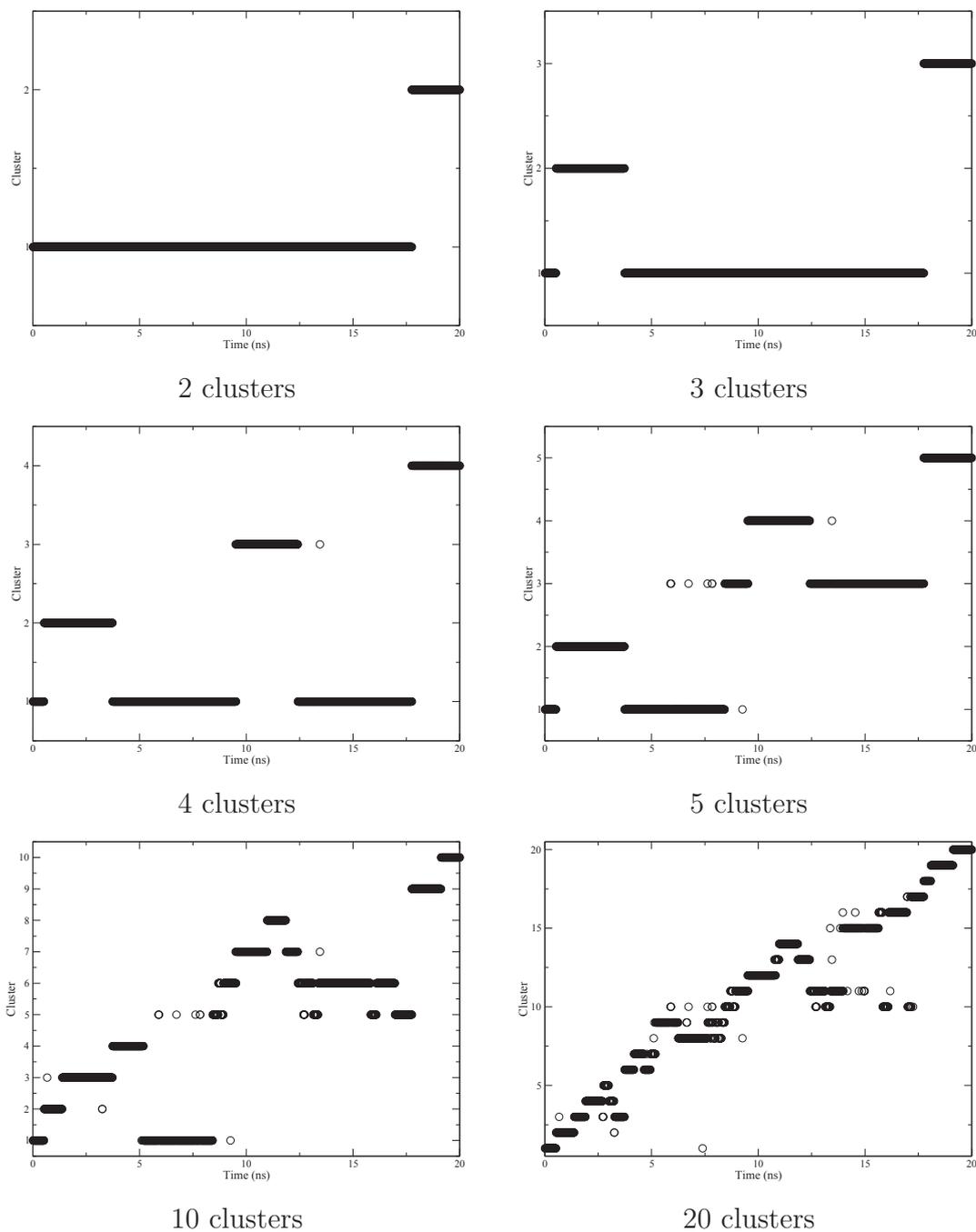


FIG. B.2 – Appartenance des structures à 2, 3, 4, 5, 10, et 20 clusters au cours de la dynamique de 20 ns de production avec l'enzyme avec l'intermédiaire tétraédrique formé avec le propanoate de (*R*)-1-méthylpentyle. « Clustering » basé sur le squelette peptidique de toute la séquence.

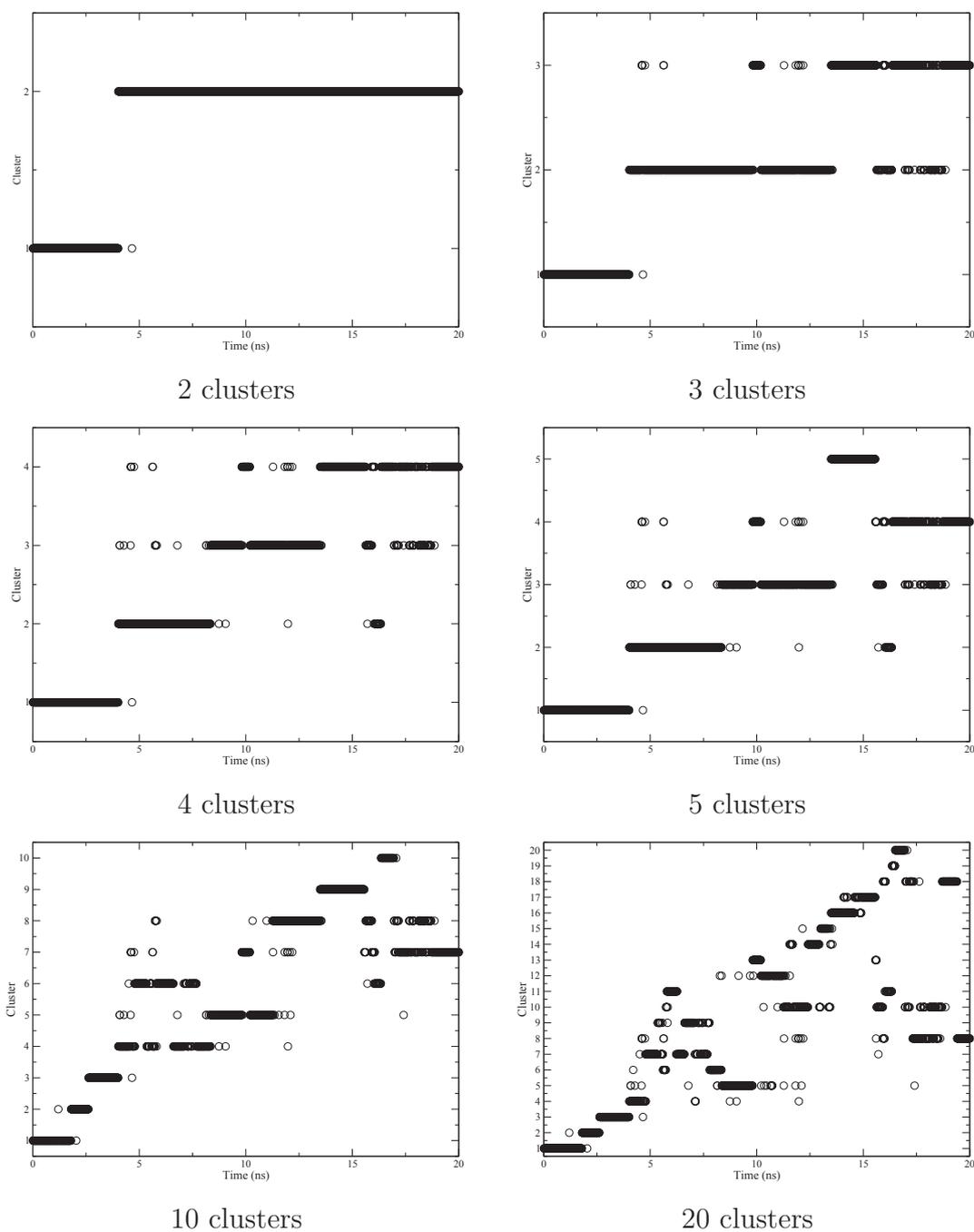


FIG. B.3 – Appartenance des structures à 2, 3, 4, 5, 10, et 20 clusters au cours de la dynamique de 20 ns de production avec l'enzyme avec l'intermédiaire tétraédrique formé avec le propanoate de (*S*)-1-méthylpentyle. « Clustering » basé sur le squelette peptidique de toute la séquence.

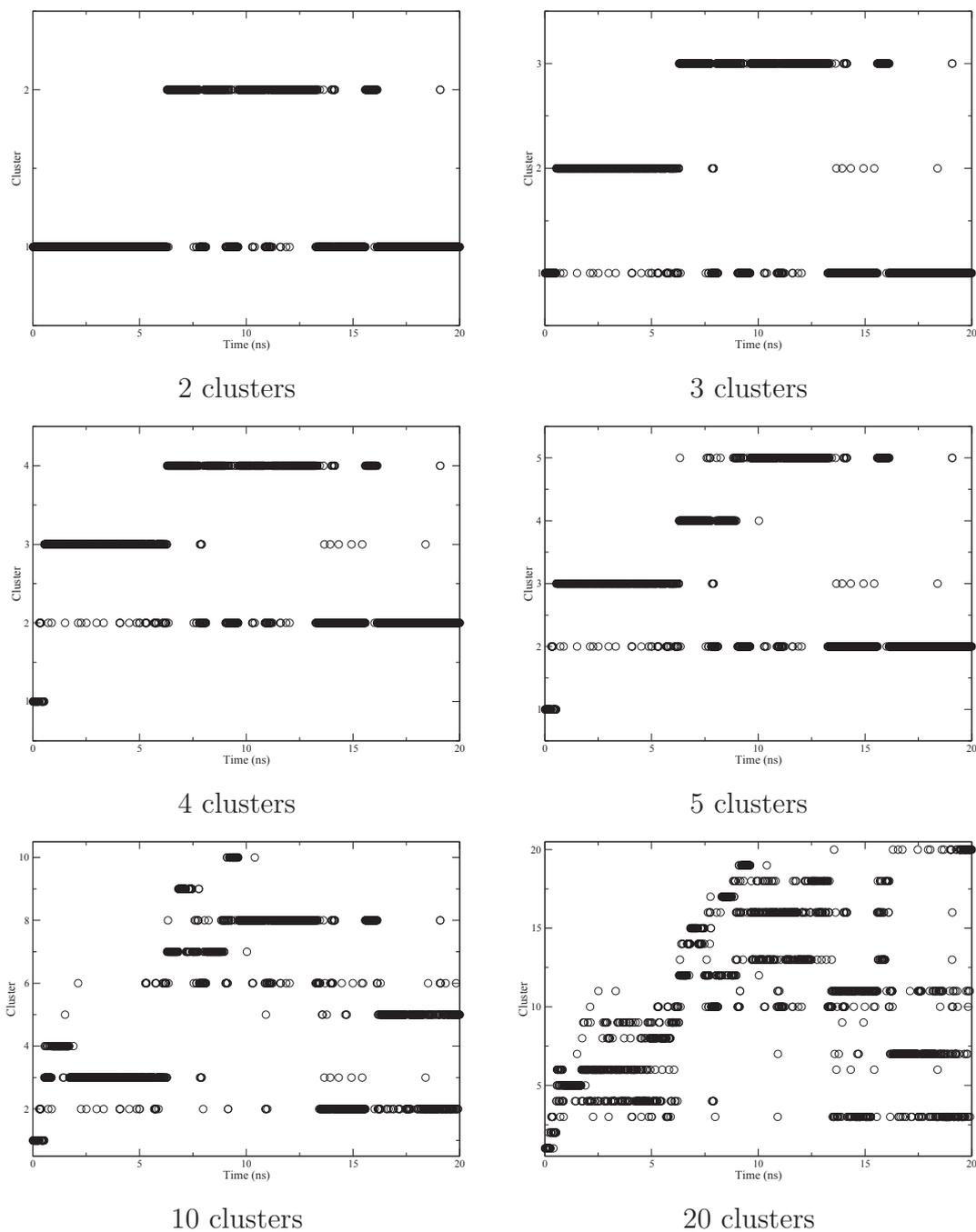


FIG. B.4 – Appartenance des structures à 2, 3, 4, 5, 10, et 20 clusters au cours de la dynamique de 20 ns de production avec l'enzyme avec l'intermédiaire tétraédrique formé avec le propanoate de (*R*)-1-méthylpentyle. « Clustering » basé sur les résidus 35 à 80, 100 à 240 et 260 à 290.

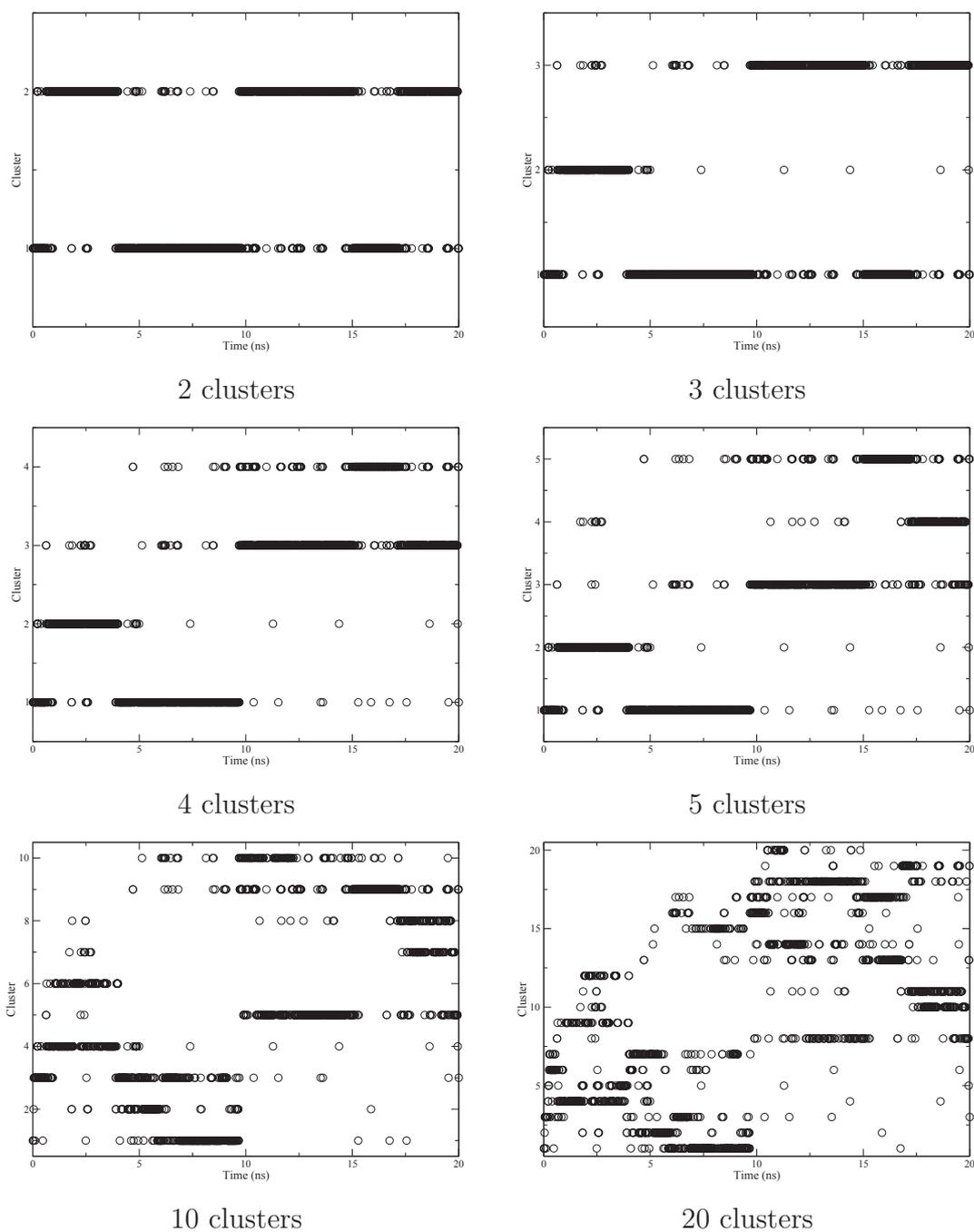


FIG. B.5 – Appartenance des structures à 2, 3, 4, 5, 10, et 20 clusters au cours de la dynamique de 20 ns de production avec l'enzyme avec l'intermédiaire tétraédrique formé avec le propanoate de (*S*)-1-méthylpentyle. « Clustering » basé sur les résidus 35 à 80, 100 à 240 et 260 à 290.

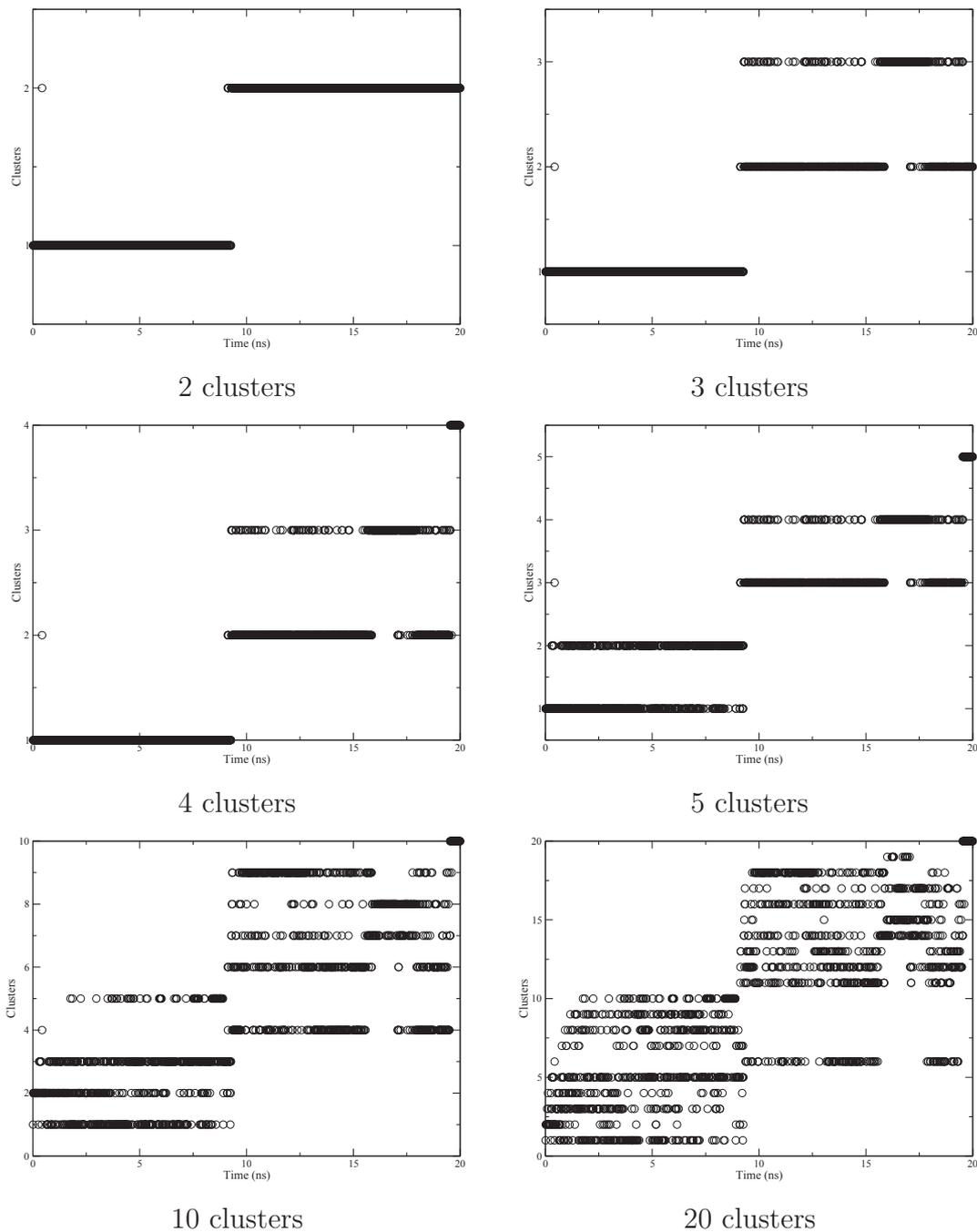


FIG. B.6 – Appartenance des structures à 2, 3, 4, 5, 10, et 20 clusters au cours de la dynamique de 20 ns de production avec l'enzyme avec l'intermédiaire tétraédrique formé avec le propanoate de (*R*)-1-méthylpentyle. « Clustering » basé sur les résidus du site actif (incluant le squelette peptidique et atomes lourds des chaînes latérales).

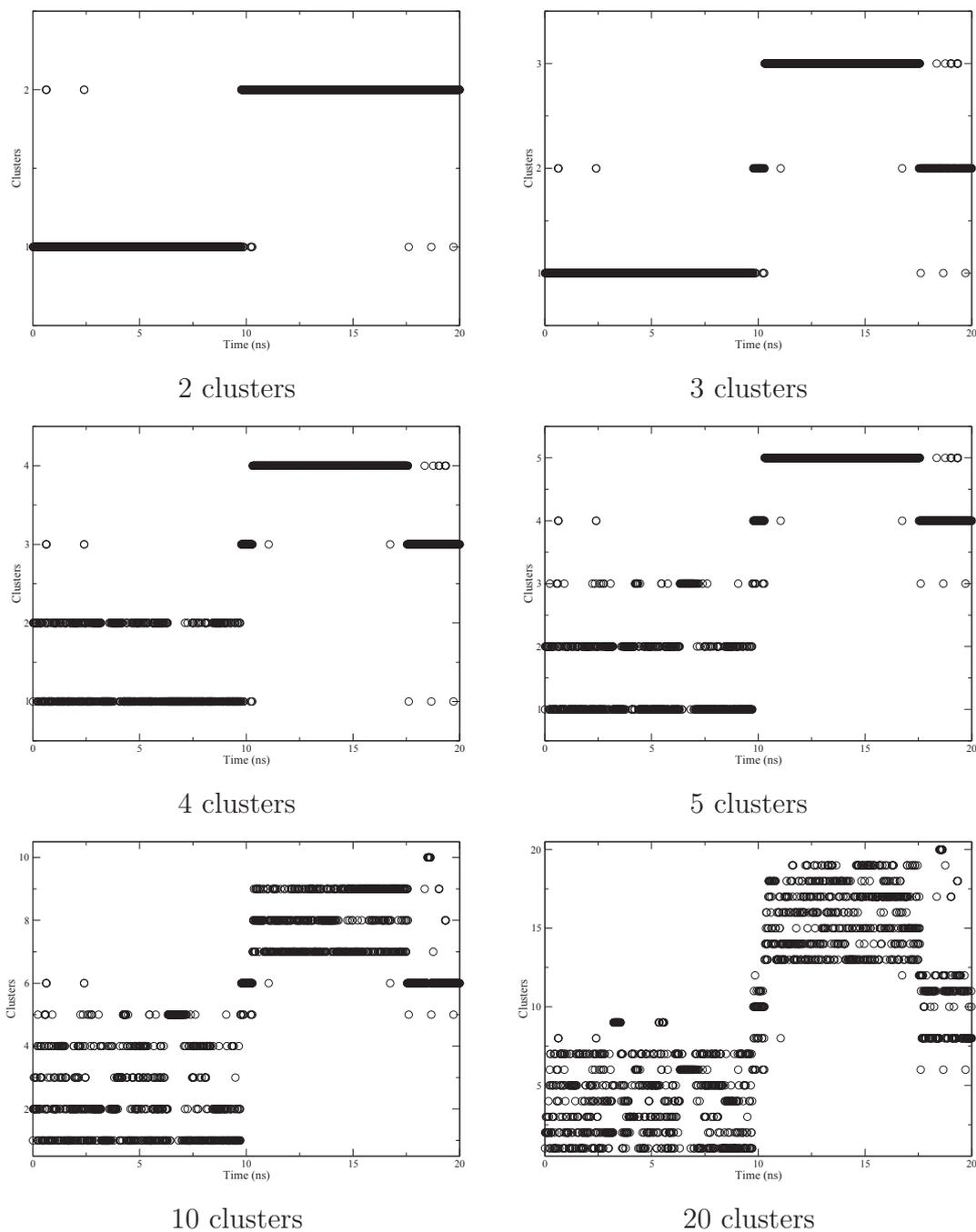


FIG. B.7 – Appartenance des structures à 2, 3, 4, 5, 10, et 20 clusters au cours de la dynamique de 20 ns de production avec l'enzyme avec l'intermédiaire tétraédrique formé avec le propanoate de (*S*)-1-méthylpentyle. « Clustering » basé sur les résidus du site actif (incluant le squelette peptidique et atomes lourds des chaînes latérales).

Annexe C

Publications

Ludovic Chaput, Yves-Henri Sanejouand, Asma Balloumi, Vinh Tran et Marianne Graber (2012). Contribution of both catalytic constant and Michaelis constant to CALB enantioselectivity : Use of FEP calculations for prediction studies, *Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic* (76) 29-36.

Ludovic Chaput, Zsuzsanna Marton, Philippe Pineau, Lisianne Domon, Vinh Tran et Marianne Graber (2012). Enhancing the enantioselectivity of CALB by substrate imprinting : A combined experimental and molecular dynamics simulation model study, *Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic* (in press).



Contribution of both catalytic constant and Michaelis constant to CALB enantioselectivity: Use of FEP calculations for prediction studies

L. Chaput^{a,b}, Y.-H. Sanejouand^b, A. Balloumi^a, V. Tran^b, M. Graber^{a,*}

^a Université La Rochelle, UMR 6250 LIENSs CNRS – ULR, Pôle Sciences et Technologies, Bâtiment Marie Curie, Avenue Michel Crépeau, 17042 La Rochelle, France

^b Unité Biotechnologie, Biocatalyse et Biorégulation (U3B), UMR CNRS 6204 – Faculté des Sciences et des Techniques de Nantes, 2, rue de la Houssinière, BP 92208, 44322 Nantes Cedex 3, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 July 2011

Received in revised form

29 November 2011

Accepted 30 November 2011

Available online 16 December 2011

Keywords:

Enantioselectivity

Enzyme catalysis

Free energy perturbation

Candida antarctica lipase B

Molecular modelling

ABSTRACT

Candida antarctica lipase B (CALB) is characterized by its stability and ease of production and is widely used in the pharmaceutical industry. Here we report on the enantioselectivity of the enzyme using both experimental and computational methods. The apparent kinetic parameters were first experimentally determined for enantiopure butan-2-ol and pentan-2-ol substrates. We demonstrate that enantiopreference for the *R* form of butan-2-ol arises mainly from a lower apparent K_M . This corresponds to a major contribution of $\Delta\Delta G_{ES}$, the free energy difference between the *ES* complex formed with the *R* and *S* enantiomers, to $\Delta\Delta G^\ddagger$, the free energy difference between both transition states, in comparison with $\Delta\Delta G_{kcat}$, the activation free energy difference. In the case of pentan-2-ol, we show that the enantiopreference for the *R* form comes from both a lower K_M and a higher k_{cat} . In addition, we used, for the first time, the free energy perturbation method to evaluate the free energy difference between tetrahedral intermediates formed with *R* and *S* alcohol enantiomers for a series of secondary alcohols. This is a valid model for $\Delta\Delta G^\ddagger$. Computational results were found to be in qualitative agreement with experimental data, and enable the determination of substrate orientation in the active site with fair confidence.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Lipase B from *Candida antarctica*, CALB, is α/β hydrolase (EC 3.1.1.3) which catalyses *in vivo* the hydrolysis of triglycerides. It also has a high activity and specificity for a wide range of synthetic esters of primary and secondary alcohols [1]. Due to its stability in organic media and its large-scale availability, it has found widespread applications in the enantioselective synthesis of molecules of pharmaceutical interest and in the resolution of racemic mixtures [2]. CALB displays an enantiopreference for the *R* form, according to Kazlauskas rules [3], and its enantioselectivity towards secondary alcohols is a property that has often been explored [4]. Enantioselectivity is considered to be related to the energy barrier difference between enantiomers, associated with the transition states formed during the second step of the bi-bi ping pong enzymatic mechanism [5]. The energetic determinants of CALB enantioselectivity is presently incompletely understood, despite many attempts to rationalize selectivity.

An initial explanation of CALB enantioselectivity was provided in 1998 by the team of Hult [4,6–9], who suggested that the orientation of *R* and *S* enantiomers are significantly different in the

alcohol-binding part of the active site, which contains the stereospecificity pocket [10], defined by Thr42, Ser47 and Trp104. More precisely, the model assumes that the slow-reacting *S* enantiomer has to orient its large substituent into the stereospecificity pocket in order to conserve the hydrogen bond between the oxygen of the alcohol moiety and His224-N ϵ , which is essential for catalysis. Although the large substituent does not fit easily into the stereospecificity pocket, this is the only binding mode which allows all the essential hydrogen bonds to form in the *S* enantiomer transition state and which leads to catalysis. The *R* enantiomer, on the other hand, positions its large substituent towards the surface of the protein and this does not lead to steric limitation. As a consequence, CALB has an enantiopreference for the *R* form.

In the past, there have been many other attempts to evaluate enantiomeric ratio by molecular modelling. For instance, enantioselectivity has been correlated, with more or less success, to the difference in the potential energy part ΔU of the free energy difference $\Delta\Delta G^\ddagger$ between the two enantiomer transition states [11–13]. One of the obvious limitations of this kind of calculation is that, whilst the potential energy of a protein in explicit solvent is typically of the order of several thousand kilocalories per mole, the energy difference between *R* and *S* tetrahedral intermediates, which are good models for the transition states [14], is expected to be $<5 \text{ kcal mol}^{-1}$, as the difference in free energy $\Delta\Delta G^\ddagger$ is related to the enantioselectivity, expressed by the enantiomeric ratio *E*,

* Corresponding author. Tel.: +33 5 46 45 86 30; fax: +33 5 46 45 82 65.
E-mail address: mgrab@univ-lr.fr (M. Graber).

as follows: $\Delta\Delta G^\ddagger = -RT \ln E$ [15–17]. In addition, when the calculations are based on energy-minimized structures, they face the multi-minima problem, although this may be partly overcome by simulated annealing protocols [6]. Finally potential energy calculations assume that the entropy contribution to enantioselectivity is of minor importance, whereas a pronounced contribution of entropy to CALB enantioselectivity has been demonstrated in several cases [18,19]. Indeed it can represent as much as 50 % of the differential activation free energy in absolute value [20].

Other types of computational approaches have also been used for quantitative prediction of lipase enantioselectivity. For instance, Braiuca et al. [21] adapted the 3D-QSAR to quantitatively predict CALB enantioselectivity towards a wide set of substrates with relatively good accuracy. In 2000, Schultz et al. indirectly assessed the instability of the tetrahedral intermediate formed by the lipase from *Pseudomonas cepacia* with the *S* enantiomer of different secondary alcohols, compared to the *R* form, by measuring the hydrogen bond distance between the oxygen atom of the free alcohol in the active site and His224-N ϵ [22]. It appeared that the *S* enantiomer has greater difficulty to form this essential-to-catalysis hydrogen bond, suggesting that the energy for the reaction to proceed towards the formation of the tetrahedral intermediate is higher for the *S* substrate. Moreover, a correlation was established between the length of the *S* enantiomer hydrogen bond and the enantiomeric ratio [22]. More recently, Juhl et al. [23] used a customised docking method, where enzyme induced-fit was included by minimization of the enzyme–substrate complex to predict CALB and W104A mutant enantioselectivities for 1-phenylethyl butyrate. García-Urdiales et al. [24] used a different strategy and measured the steric constraints due to the nucleophile observed during standard molecular dynamics simulations. They showed that, in the case of the *S* form, higher CALB enantioselectivity correlates with a higher number of van der Waals unfavourable contacts [24].

There are existing methods to calculate free energy differences. One possibility is to use the thermodynamic integration method to quantitatively predict CALB enantioselectivity. Zhou [25] calculated free energy differences for butan-2-ol and four other *sec*-alcohols with either a bulky group or a bromide as substituent. Calculations were performed by modifying the dihedral angle value defined around the chiral carbon to transform, in a stepwise manner, from the *R* enantiomer to the *S* enantiomer. The free energy perturbation (FEP) method is an alternative approach. It has been applied for several decades [26–28] and remains a powerful tool today. This method is based on measurements of the progressive transformation of the system from an initial state to a final state, usually by following a non-physical (often coined alchemical) path. Throughout this process, free energy variation is measured. As a consequence, FEP calculations provide both internal energy and entropy contributions to the free energy. FEP has been extensively employed to compute free energy differences in numerous applications [29], including enzymatic stereospecificity [30] and allows for the calculation of differences as small as 1 kcal mol⁻¹ [31]. In practice, however, FEP calculations remain a difficult challenge, with well-known limitations [32]. Firstly, the molecular model and the force field used to describe the system thermodynamics must yield realistic probabilities for its most representative conformations. Secondly, low frequency motions and long time relaxations of the system must be handled properly to obtain a fair sampling of the relevant conformational space [33]. This is often done by restricting the number of degrees of freedom chosen to model the system but such a choice then affects the sets of sampled conformations. Another difficulty is finding a good convergence for the calculations [31].

Nevertheless, the FEP method has been successfully used to study enzyme enantioselectivity. Colombo et al. [34] obtained free energy differences in good agreement with experimental results.

They described the enantioselectivity of subtilisin in the resolution of a racemic mixture of *sec*-phenethyl alcohol by a transesterification reaction with vinyl acetate acyl donor [34].

In addition to these computational studies, there has been a lot of experimental work showing enantiopreference of wild type CALB for the *R* form of secondary alcohols. The classical method to quantify enantioselectivity is to measure enantiomeric ratio *E*, by using a formula with enantiomeric excess of substrates and products and conversion ratio [35], instead of using the original definition of $E = (k_{cat}/K_M)_R / (k_{cat}/K_M)_S$, which involves expensive and fastidious kinetic studies with enantiopure substrates. *E* values obtained by these rapid methods are useful for optimizing reaction yield and product purity, but fail to give information about the reaction step at which the enantiopreference occurs.

In the present work, we have highlighted the contribution of both catalytic constant and Michaelis constant to CALB enantioselectivity. Kinetic parameters for CALB-catalysed acylation of enantiopure butan-2-ol and pentan-2-ol were first experimentally determined. This allows the determination of the difference in reaction free energy profile for the two enantiomers, which leads to a better understanding of the origin of enantioselectivity. FEP calculations were then performed for tetrahedral intermediates formed with CALB and five different secondary alcohols with relatively high structural similarity (butan-2-ol, pentan-2-ol, hexan-3-ol, 3-methylbutan-2-ol, and 4-methylpentan-3-ol). A system in which the side chains of both *R* and *S* alcohols simultaneously exist was therefore built and the alchemical transformation consisted of going step by step from an interaction of the enzyme with the *R* form to an interaction with the *S* enantiomer. It is worthwhile stating that such an approach also provides concrete predictions of the substrate orientation within the CALB active site.

2. Experimental

2.1. Enantioselectivity measurements

Enantiomeric ratio *E* was calculated from apparent kinetic parameters obtained with enantiopure butan-2-ol and pentan-2-ol, according to the equation $E = (k_{cat}/K_M)_R / (k_{cat}/K_M)_S$. Enantiomeric ratio values for butan-2-ol, pentan-2-ol and hexan-3-ol, reported in Section 4, were previously obtained in our laboratory, from enantiomeric excess of substrates and products [35], in a continuous solid–gas reactor with methylpropanoate as acyl donor, and immobilized CALB, as previously described [20,36]. For branched substrates, values were picked from the literature [4], which were obtained at 39 °C in hexane, with *S*-ethyl thiooctanoate as acyl donor.

2.2. Enzyme and chemicals for kinetics

Novozym[®] 435 (immobilized *C. antarctica* lipase B) was kindly provided by Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark. *R* and *S* pure enantiomers (99 %) of butan-2-ol and pentan-2-ol were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, USA), whilst methylpropanoate was from Fluka (St. Quentin-Fallavier, Switzerland).

2.3. Enzymatic reactions with enantiopure butan-2-ol and pentan-2-ol

Initial rate measurements were performed at 45 °C in 2-methylbutan-2-ol. 4 ml of the reaction mixtures containing various amounts of butan-2-ol (100–4000 mM for the *S* form and 100–1000 mM for the *R* form) or pentan-2-ol (100–900 mM for the *S* form and 100–1500 mM for the *R* form) were incubated for 10 min prior to addition of 10 mg of Novozym[®] 435 for the acylation of butan-2-ol or *R* pentan-2-ol with 430 mM methylpropanoate, or

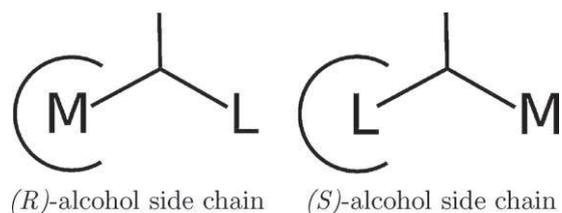


Fig. 1. Orientation of the *R* and *S* side chain of a pair of enantiomers within the stereospecificity pocket of CALB, sketched as a truncated circle. L and M are the large and medium chains of the substrate, respectively.

20 mg of Novozym[®] 435 for reaction with *S* pentan-2-ol. 200 μ l samples were taken at intervals and centrifuged at 14,000 \times *g*. The supernatant was analysed by gas chromatography (GC), after two times dilution with 2-methylbutan-2-ol.

2.4. GC analysis

Quantitative analysis of reaction products were conducted using a 7890 GC system from Agilent for the analysis of 1-methylpropyl propanoate (55 $^{\circ}$ C, 20 min) and of 1-methylbutyl propanoate (55 $^{\circ}$ C 15 min, 3 $^{\circ}$ C min⁻¹, 85 $^{\circ}$ C 5 min), at a flow rate of 1.5 ml min⁻¹ with a Chirasil-Dex CB (25 m, 0.25 mm i.d., 0.25 μ m β -cyclodextrin, Chrompack, France) column. Products were detected by FID and quantified using HP Chemstation software. External calibration was performed with chemically synthesized esters from the corresponding alcohol and propanoic anhydride in pyridine at room temperature.

3. Computational methods

3.1. Enzyme and tetrahedral intermediate structures

The starting CALB enzyme was the $R=1.55$ \AA crystallographic structure solved by Uppenberg et al. [37] (PDB entry 1TCA). A transition state analogue crystal structure, obtained with phosphonate irreversible inhibitor (PDB entry 1LBS) was used to build the tetrahedral part of the reaction intermediate. The acyl part is a propanoyl group, to allow for the correct location of the central part of the tetrahedral intermediate. The negatively charged oxygen was oriented towards the oxyanion hole to establish hydrogen bonds with Thr40 and Gln106. The position of the substituents of *R* and *S* alcohol enantiomers in the active site were orientated according to the model postulated by Haefner et al. [4], so that the large chain of the *S* alcohol was oriented into the stereospecificity pocket, and the medium chain towards the active site entry, as shown in Fig. 1. Inversely, the medium chain of the *R* alcohol was located in the stereospecificity pocket, and the large chain was oriented towards the active site entry. Note that this was done in order to, firstly, define a starting point for the simulations and, secondly, during the course of the calculations, the substrates were thus free to reorient themselves in a different way.

However, the essential hydrogen bond involved in the transition state between His224-N ϵ and the alcohol oxygen of the tetrahedral intermediate, was prevented from disruption during the molecular dynamics simulations by a harmonic constraint of 100 kcal mol⁻¹ applied on the distance between heavy atoms exceeding 2.8 \AA . Without this constraint, the hydrogen bond would probably have been disrupted during the dynamics. When hydrogen bond disruption is observed in the case of the *S* enantiomer [38], it is usually considered as a measure of the difficulty this enantiomer experiences before reaching an orientation which allows the reaction to proceed. In the present work, our choice has been to maintain the system as close to the transition state as possible, in order to obtain estimates for free energy differences at the top of the

rate-limiting energy barrier. From a technical point of view, the energy restraint was included in the potential energy of the system, and was effective all along the simulation. Free energy was calculated as the summation of energy differences, therefore the energetic restraint was balanced. The only way, then, for the restraint to affect the free energy is by modifying the conformation sampling, and that is exactly the point which was improved by using H-bond restraint, which enhances the sampling around the transition state conformation.

3.2. Molecular dynamics simulations

CHARMM c35 program [39] and the CHARMM22 all-atom force field were used. Force field parameters for the tetrahedral intermediate were taken from the literature [40]. These parameters were obtained from *ab initio* calculations and were specifically developed for CHARMM22 force field. Other parameters required for modelling the alkyl side chains of alcohols were defined by homology with available CHARMM22 parameters.

In order to mimic our experimental conditions, within a solid-gas reactor, a 7 \AA water layer was added to the CALB structure, all crystallographic water molecules were retained for correct solvation of the active site. Then all water molecules were energy-minimized, with 10,000 steps of conjugated gradient followed by 2000 steps with the ABNR (Adopted Basis Newton-Raphson) algorithm.

Next, the whole system was energy-minimized again, except for atoms kept fixed throughout this study, namely, all atoms more than 24 \AA away from the oxygen of the alcohol moiety, and all α -carbon atoms more than 22 \AA away. As a result, 75% of the protein was left totally free to move. Our criterium is expected to maintain the enzyme closer to the crystallographic structure, as well as to improve the convergence of FEP calculations by preventing the unwanted contribution of remote events, such as drifts of loops or of residues far from the active site. It is, therefore, a compromise between having a good convergence whilst leaving significant possibility for the active site to freely accommodate the tetrahedral intermediate and the side chains of the substrates. In addition, the protocol was designed to evaluate small conformational rearrangements such as those occurring when going from the *R* to the *S* enantiomer. Sampling larger conformation movements, like α -helix would require much longer sampling duration at each λ , which was not the aim of the article. Other authors introduced similar types of restraints on atoms far from the region where the study focuses on FEP methods [41,42]. In another example, Allouche et al. [43] defined free atoms in a radius of 9 \AA centred on the alchemical transformation of one cation to another (Ca^{2+} towards Mg^{2+}). In our study, however, alchemical transformations concern more atoms, hence the choice of a much larger radius for the free part of the system. On the other hand, Trodler and Pleiss [44] showed by molecular modelling that the structure of *C. antarctica* lipase B during molecular dynamics simulations, in water or in five different organic solvents, exhibits a low deviation from the crystal structure. Finally, McCabe et al. [45] made circular dichroism measurements, using synchrotron radiation, to study conformational changes in water and various organic solvents and concluded that the secondary structure of CALB in aqueous buffer is close to its crystal structure. These studies suggest that CALB does not exhibit significant domain movements and that fixing atoms far away from the active site may not perturb CALB significantly.

An initial heating stage of 50 ps, from 100 to 300 K, was performed before every FEP calculation and then the temperature was increased by 1 K every 100 steps. For accurate results, the system must be well equilibrated with long initial equilibration periods, corresponding to 800 ps (trajectory 1) and 1000 ps (trajectories 2 and 3). During all molecular dynamics simulations, the non-bonded

pairs list was updated every 20 steps and the temperature was checked every 5000 steps.

3.3. Free energy perturbation protocol

A system was built with distinct, and simultaneously existing, side chains of both *R* and *S* secondary alcohols, including the chiral carbon, also called the dual topology approach. In accordance with the alchemical transformation principle, the oxygen atom is shared by the two enantiomers. A hybrid potential energy $U(r, \lambda)$ is associated with such a system, which is a function of r , the atom coordinates, and λ , a coefficient scale to quantify the interaction energy of the *R* enantiomer with the rest of the enzyme. The corresponding coefficient for the *S* enantiomer is $1 - \lambda$. The free energy difference, ΔF along the path starting at $\lambda_i = 0$ and ending at $\lambda_i = 1$ was calculated using the exponential formula [46]:

$$\Delta F_{R \rightarrow S} = F_S - F_R = \sum_{i=0}^{n-1} -\beta^{-1} \ln \langle e^{-\beta \Delta U_{\lambda_i \rightarrow \lambda_{i+1}}} \rangle_{\lambda_i}$$

where F_S and F_R represent the free energy of the enzyme with, respectively, the *R* and *S* alcohol moiety linked to the tetrahedral intermediate. $\langle \cdot \rangle_{\lambda_i}$ represents the canonical ensemble average obtained with λ_i , where β is the inverse of the thermal energy, namely, $k_B T$, k_B being the Boltzmann constant and T , the temperature. The sum of the n successive terms calculated along the *R* to *S* transformation leads to the total free energy difference between the complex with *R* and *S* enantiomers. The value obtained with the sum computed for the reverse transformation of *S* to *R* should rigorously give the opposite value to the *R* to *S* transformation. Such a comparison is a standard indicator of the quality of a FEP calculation.

In practice, λ_i was linearly incremented by steps of 0.05, along twenty ($n = 20$) successive equilibration and productive dynamics, of 25 and 50 ps each. The decision to divide the transformation into twenty steps yields a small free energy perturbation at each step and, as a consequence, better accuracy. Too high a number of sub-trajectories is not useful because if λ_i is too close to 0 (or to 1), weak interactions between alcohol side chains and the enzyme yield unrealistic behaviour characterized by wide movements of the side chains and, therefore, by a poor sampling of the conformational space. This is why the λ_i value was initially set at 0.975 and 0.025 for the interaction between, respectively, the *R* and *S* alcohol side chain and the enzyme. The transformation of the substrate from *R* to *S* was followed by a 100 ps equilibration step and, then, by the reverse transformation (*S* to *R*), in order to assess the convergence of each FEP calculation. Twenty productive sub-trajectories were thus obtained for each transformation of an *R* enantiomer to an *S* enantiomer, and the same number obtained for the reverse path. In addition, each FEP calculation was made twice, starting from two sets of initial conditions.

The free energy perturbation (FEP) protocol is presumed to be reliable when the energy computed for the *R* to *S* transformation and for the reverse path give similar values with opposite signs. This presumption cannot, in fact, be taken for granted. Indeed, reaching convergence in free energy perturbation calculations is a challenge that depends on several parameters involved in the process. The FEP method assumes that the part of the phase space where the energies of both compared systems are significantly different can be extensively explored. This can only be achieved by using enough computer time to sample the conformations with significant energy differences between two neighbouring states along the path followed during each transformation. In practice, FEP calculations were performed using the BLOCK command available in CHARMM [39], which allows one to set the value of λ_i . The

Table 1

Kinetic constants for *R* and *S* enantiopure butan-2-ol and pentan-2-ol (V_{\max}^{app} expressed in $\text{mmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ of immobilized enzyme, and K_M expressed in mM).

	Butan-2-ol	Pentan-2-ol
K_M		
<i>R</i>	258	70
<i>S</i>	1284	>472
V_{\max}^{app}		
<i>R</i>	0.062	0.048
<i>S</i>	0.051	≈0.001
<i>E</i>	6	>324

perturbation at each step was then calculated using the FREE module of CHARMM and the wide sampling method. Moreover, the trajectory at λ_i was used to compute incremental ΔF values from $\lambda_i - 0.025$ to λ_i and from λ_i to $\lambda_i + 0.025$. The molecular dynamics transformation of *R* to *S*, followed by the reverse path, took about 18 h when run on 24 parallelized Bi-Xeon processors.

4. Results and discussion

4.1. Experimental determination of apparent kinetic constants for enantiopure butan-2-ol and pentan-2-ol

Experimental apparent kinetic parameters obtained for enantiopure butan-2-ol and pentan-2-ol are presented in Table 1. The K_M^{app} for the *R* form of butan-2-ol is 258 mM and for the *S* form is 1284 mM. In the case of pentan-2-ol, we obtained a K_M^{app} of 70 mM for the *R* form. However, CALB was not saturated when using *S* pentan-2-ol concentrations up to 1500 mM, consequently the K_M^{app} value was above 472 mM, the alcohol concentration giving half of the reaction rate obtained at 1500 mM. Concentrations above 1500 mM of *S* pentan-2-ol were not used owing to the exorbitant price of this enantiopure alcohol. The V_{\max}^{app} for butan-2-ol is 0.062 for the *R* form and 0.051 for the *S* form, in $\text{mmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ of immobilized enzyme. Pentan-2-ol gave values of 0.048 and around 0.001 mmol min^{-1} , for the *R* and *S* forms respectively, results obtained by non linear regression of the Michaelis–Menten equation. The data demonstrate that for butan-2-ol, the enantio-preference for the *R* substrate can be attributed mainly to the K_M difference, which is lower, by a factor of 5 for the *R* alcohol, suggesting that the enzyme affinity for the *R* alcohol is greater than for the *S* form. In contrast, the apparent V_{\max} is only slightly higher for the *R* enantiomer. However, in the case of pentan-2-ol, the enantio-preference arises from both a lower K_M and a much higher V_{\max} for the *R* form. Assuming that 1 g of Novozym® 435 contains 1 μmol of active CALB [47], k_{cat} can be calculated from V_{\max} values and are equal to 1033 s^{-1} and 850 s^{-1} for the *R* and *S* form of butan-2-ol, and to 800 s^{-1} and 17 s^{-1} for the *R* and *S* form of pentan-2-ol.

Hypothetical energy profile diagrams for the CALB-catalysed acylation reactions acting on *R* and *S* enantiomers for both butan-2-ol and pentan-2-ol are shown in Fig. 2.

Apparent K_M can be used as an apparent dissociation constant, K_s , under conditions of steady state assumption. The lower K_M for the *R* enantiomer corresponds to a ground state stabilization of the *ES*-complex, which has a lower energy compared to *S* enantiomer. k_{catR} and k_{catS} correspond to the difference between *ES* and *ES*[‡] for *R* and *S* enantiomers. In the case of both pentan-2-ol and butan-2-ol, k_{catR} is higher than k_{catS} . The second order rate constant for the enzymatic reaction, starting with free enzyme and substrate is given by k_{cat}/K_M and corresponds to the difference between *E* + *S* and *ES*[‡]. The enantio-preference for the *R* form is linked to the energy barrier difference between enantiomers, associated with the transition states (*ES*_{*S*}[‡]–*ES*_{*R*}[‡]). We demonstrate here that this difference is primarily due to the K_M difference between the *R* and *S* form,

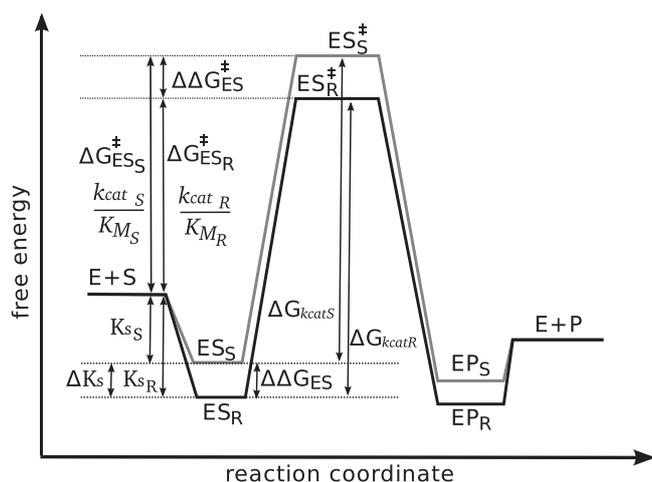


Fig. 2. Energy profile diagrams for the CALB-catalysed acylation reaction acting on R (black line) and S (grey line), with E the enzyme, S_S and S_R the S and R enantiopure substrates, ES_S and ES_R , the enzyme–enantiopure substrate complexes, ES_S^{\ddagger} and ES_R^{\ddagger} , the enzyme–enantiopure substrate transition state complexes, P_S and P_R , the S and R enantiopure products. ΔG_{ES}^{\ddagger} represents the energy difference between bound enantiopure substrates, ΔG_{kcatS} and ΔG_{kcatR} represent the energy activation for each enantiomer, $\Delta\Delta G_{ES}^{\ddagger}$ represents the free energy difference between R and S enzyme–enantiopure substrate transition state complexes.

rather than to the k_{cat} in the case of butan-2-ol. In contrast, the energy barrier difference for pentan-2-ol is associated with both K_M and k_{cat} .

These results are significantly different from previous experimental results obtained by Magnusson et al. [48] (2005) for CALB catalysed acylation of pure enantiomers of 1-phenylethanol, a very bulky secondary alcohol. The large enantiomeric ratio ($E = 1, 300, 000$) was almost entirely due to the difference in apparent k_{cat} between the enantiomers, 570 s^{-1} and 0.00053 s^{-1} for the R and S forms, respectively. We find that the respective contributions of K_M and k_{cat} to enantioselectivity are highly variable and probably depend on substrate structure. In the particular case of a secondary alcohol with a very bulky large substituent, like 1-phenylethanol, Magnusson et al. obtained an enantioselectivity almost entirely due to the difference in k_{cat} . The inverse trend was obtained in the present work, with another particular case: butan-2-ol which has only an ethyl as “large” substituent and for which enantioselectivity is almost entirely due to the difference in K_M . In case of pentan-2-ol an intermediate result was obtained: enantioselectivity arises from both a lower K_M and a much higher k_{cat} for the R form.

E values (Table 1) calculated using the formula $E = (k_{cat}/K_M)_R / (k_{cat}/K_M)_S$ give a value of 6 for butan-2-ol and a value above 324 for pentan-2-ol. These values are similar to those obtained previously in our laboratory at the same temperature, in a continuous solid–gas reactor with the same acyl donor at 20 % relative humidity, 6 for butan-2-ol and 330 for pentan-2-ol [20], using enantiomeric excess to calculate E . Due to the similarity of the results obtained using different approaches, we chose to add hexan-3-ol as an additional substrate for our computer simulations, a substrate for which we had previously determined an E value of 80 under the same conditions (Table 2). Two supplementary substrates containing branched substituents (3-methylbutan-2-ol and 4-methylpentan-3-ol) were also added as extra challenges for our computational modelling. For these last substrates, E values were taken from the literature [4]. They were obtained at the same temperature but with a different acyl donor: S-ethyl thiooctanoate (Table 2).

4.2. Comparison of FEP results from this study with experimental data

Table 2 represents the values obtained by FEP methods from calculations of $\Delta F_{R \rightarrow S}$ and $\Delta F_{S \rightarrow R}$, the free energy difference going from the R form of the enzyme to the S form of the enzyme and the reverse path. We obtained positive values for ΔF when going from the R to the S enantiomer, except for one trajectory, and obtained consistently negative values along the reverse path. This corresponds to a lower free energy with the R form than with the S form, as expected from experimental data. Thus from a qualitative point of view, FEP results correctly predict the enantioselectivity of CALB for the R form. From a quantitative point of view and for linear secondary alcohols, average ΔF values are equal to $1.38 \text{ kcal mol}^{-1}$ for butan-2-ol, $3.62 \text{ kcal mol}^{-1}$ for pentan-2-ol and $2.58 \text{ kcal mol}^{-1}$ for the first trajectory of hexan-3-ol (the exclusion of trajectories 2 and 3 is explained below). These values are in good agreement with experimental $\Delta\Delta G^{\ddagger}$. For ramified alcohols, the average ΔF value is equal to 2.72 for 3-methylbutan-2-ol and the unique ΔF value obtained with correct signs for 4-methylpentan-3-ol is equal to $1.97 \text{ kcal mol}^{-1}$. FEP calculations correctly rank these two substrates, but fail to rank linear and ramified alcohols. The ΔF values of branched alcohols are lower than experimental $\Delta\Delta G^{\ddagger}$, and the standard deviation obtained for 3-methylbutan-2-ol is higher than for linear alcohols. Calculations with 4-methylpentan-3-ol gave the weakest convergence, perhaps due to the large bulky substituent of this alcohol, which may require a pronounced rearrangement of the enzyme structure in order to accommodate both enantiomers.

It is worth noticing that substrates with very different enantiomeric ratios are expected to have transition states with small free energy differences between both enantiomers, an important point when comparing experimental and calculated free energy differences, $\Delta\Delta G_{exp}^{\ddagger}$. Indeed, for experimental E values ranging between 6.0 and 705 (Table 2), calculated free energy differences are expected to range between 1 and 4 kcal mol^{-1} , which is far less than the energy of a typical hydrogen bond, which is about $4.8 \text{ kcal mol}^{-1}$.

Hexan-3-ol is a special case in point, in the case of trajectory 1, FEP results are close to the experimental data ($2.61 \text{ kcal mol}^{-1}$), but trajectory 2 had significantly higher ΔF values, therefore a third trajectory was performed. Trajectories 2 and 3 both yield an average ΔF value equal to $4.21 \text{ kcal mol}^{-1}$, instead of $2.58 \text{ kcal mol}^{-1}$ found from trajectory 1. Comprehensive analysis of the global structure of CALB during the three independent trajectories provides a good indication of the putative implication of secondary structure elements surrounding the active site. During the first trajectory, which displays better ΔF , a small shift of the α -helix 10 occurred, compared to the crystallographic structure. This shift was not observed during the two other trajectories. This α -helix shift may be involved in a better fit between the enzyme and the substrate, explaining the smaller free energy change during the first trajectory. Interestingly, several groups previously observed the movement of this helix during molecular dynamics simulations. Skjøt et al. [49] also demonstrated that during a 10 ns dynamic trajectory in a water box with periodic conditions, α -helix 5 and 10 of CALB displayed significant mobilities. α -helix 5 is far from the active site, therefore, in the case of the substrates described here, it can be assumed that this helix has a negligible effect on substrate conformation, contrary to α -helix 10, which is directly in contact with the side chain of the alcohol, particularly through residues Ile189, Ala278 and Ala282. Unfortunately, the FEP/MD protocol was not designed to handle events like α helix movement, as observed by Zhao et al. [50]. These authors assessed the free energies for antidepressant binding to protein receptor by FEP/MD and mentioned that the receptor was sampled in only one conformation, due to the fact that large

Table 2
 Calculated $\Delta F_{R \rightarrow S}$ and $\Delta F_{S \rightarrow R}$ compared to the experimentally determined $\Delta \Delta G_{R \rightarrow S}^{\ddagger \text{exp}}$, as derived from the experimentally determined enantioselectivity E . All free energy differences are expressed in kcal mol⁻¹.

Substrate	E	$\Delta \Delta G_{R \rightarrow S}^{\ddagger \text{exp}}$	Traj.	$\Delta F_{R \rightarrow S}$	$\Delta F_{S \rightarrow R}$	$ \Delta F^{\text{avg}} \pm \text{sd}^{\text{a}}$
	6.0	1.07	1	+1.10	-1.33	1.38 ± 0.66
			2	+0.78	-2.30	
	330	3.46	1	+4.04	-3.94	3.62 ± 0.5
			2	+3.57	-2.94	
	80	2.61	1	+2.06	-3.09	2.58
			2	+4.90	-4.84	
			3	+4.29	-4.79	
	705	3.91	1	+3.50	-2.03	2.72 ± 0.8
			2	+3.32	-2.02	
	109	2.80	1	+2.86	-1.07	1.97
			2	-0.07	+1.60	

^a Standard deviation.

^b No convergence.

movements occurred during a larger time scale, exceeding the time frame used in the protocol.

Our results are in concordance with the alternative protocol of thermodynamic integration used by Zhou [25] for his free energy calculations for two bulky chiral alcohols as well as for butan-2-ol. He failed, however, to predict enantioselectivity for chiral alcohols containing bromide and the reproducibility of his results was not addressed, as only a single trajectory per substrate was performed [25].

4.3. Substrate orientations

In our study, the starting orientation of the alcohol substrates was defined according to the model suggested by Haeffner et al. [6]. For all substrates, except pentan-2-ol, this orientation was well conserved all along the dynamic trajectory for both S and R alcohol side chains. So we think that initial orientations we used for the substrates are acceptable, because we did not observe any rearrangement for them, even when substrates get the opportunity to reorient themselves, when they are weakly interacting with the enzyme (λ near 0 and 1 for S and R enantiomers, respectively). As seen in Fig. 3A, in the case of butan-2-ol, the large chain (ethyl group) of the S alcohol is located in the stereospecificity pocket, close to amino acids Gly39, Thr40 and Thr42. The large chain of the R alcohol is oriented towards the entry of the active site. In the case of pentan-2-ol, a re-orientation of the large substituent of the S enantiomer alcohol occurs for both trajectories 1 and 2. It can be observed in Fig. 3B that the large chain bends towards the active site entry. This is probably due to steric constraints within the stereospecificity pocket. To our knowledge, this orientation was not observed previously. Kwon et al. [11] did demonstrate, however, that for some alcohols, side chains may adopt other orientations than those described by the Haeffner model.

4.4. Relation between free energy profile of enzymatic catalysis and experimental and computational results

The free energy differences calculated here, using the FEP method, are expected to match those for the transition states ES^{\ddagger} of the reaction, as catalytic rates depend on the energy barrier associated with the formation of the transition state. The

experimental data display slightly higher apparent k_{cat} for the R enantiomer in the case of butan-2-ol and high apparent k_{cat} in the case of pentan-2-ol, and show that enantioselectivity is also linked to the difference between apparent K_M . The data can be understood by detailing the energy profile diagram of the reaction (Fig. 2) by using Eyring's transition state theory, which links the reaction rate to the activation energy. The Eyring law defines the rate k of a reaction as a function of temperature and of the activation energy: $k = k_B T / h e^{-\Delta G^{\ddagger} / RT}$.

This energy corresponds to the free energy difference between a ground state and the top of the energy barrier. In the present case, the top of this barrier has been modelled by the tetrahedral intermediate ES^{\ddagger} . The ground state can be defined as the complex enzyme–substrate ES . Activation energy is equal to ΔG_{kcat} , corresponding to k_{cat} (see Fig. 2), and for given concentrations of E and S , the rate constant for the enzymatic reaction, starting with free enzyme and substrate, is given by k_{cat}/K_M and corresponds to the energy ΔG^{\ddagger} . In the Michaelis–Menten model, the reaction proceeds through a classical ligand–enzyme interaction model, and the K_M can be assimilated with the inverse of the affinity constant, under conditions of steady state. A small K_M corresponds to a good affinity of the substrate for the enzyme, characterized by a low free energy ΔG_{ES} stabilizing the complex ES . Therefore, as shown in Fig. 2, the K_M is linked to the energy difference ΔG_{ES} between free substrate and bound substrate.

Here, it was experimentally observed that the K_M is much lower for the R enantiomer. This means that the energy of the ES complex is lower for the R enantiomer, and the difference in affinity for the enzyme between the two enantiomers is characterized by the free energy difference $\Delta \Delta G_{ES}$. In addition, experimental data demonstrate that the apparent V_{max} is higher for the R enantiomer, indicating that the free energy, ΔG_{kcat} , is smaller for the R enantiomer. Thus, the difference between transition state energy $\Delta \Delta G^{\ddagger}$ depends on both $\Delta \Delta G_{ES}$ and $\Delta \Delta G_{kcat}$, with $\Delta \Delta G_{kcat} = \Delta G_{kcatS} - \Delta G_{kcatR}$. Consequently, enantioselectivity is characterized by the free energy difference $\Delta \Delta G^{\ddagger}$ that can be expressed as $\Delta \Delta G^{\ddagger} = \Delta \Delta G_{ES} + \Delta \Delta G_{kcat}$. The resolution of butan-2-ol by CALB-catalysed acylation demonstrates that the contribution of the first energetic term ΔG_{ES} is predominant compared to $\Delta \Delta G_{kcat}$, whereas for pentan-2-ol, the two factors are important.

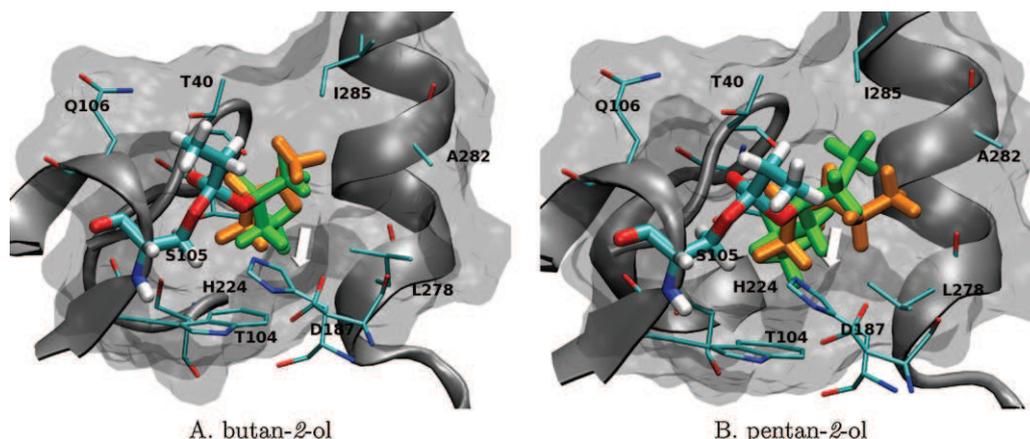


Fig. 3. Tetrahedral intermediate (TI) and side chains orientation of butan-2-ol and pentan-2-ol enantiomers. *S* enantiomer in green and *R* enantiomer in orange. The white arrow points out the stereospecificity pocket.

4.5. Conclusions

Experimental data obtained with enantiopure butan-2-ol shows that enantioselectivity of CALB for the *R* form arises mainly from a lower apparent K_M and, to a much lesser extent, from a higher k_{cat} for this enantiomer. With pentan-2-ol, enantioselectivity arises from both a lower K_M and a much higher k_{cat} for the *R* enantiomer, suggesting that no general rule can be defined for all substrates, as far as the contribution of the various kinetic parameters to enantioselectivity is concerned. FEP calculations presented in this study successfully provided qualitative prediction of the enantioselectivity of CALB for *R* enantiomers in the case of four of the five substrates tested. However, the quantitative prediction of the enantiomeric ratio itself proved challenging. In the best cases, namely, butan-2-ol and pentan-2-ol, the corresponding free energy difference was overestimated by 0.2–0.3 kcal mol⁻¹, on average. For hexan-3-ol, only one trajectory amongst the three which were performed, gave almost the same result as the experimental result. This corresponds also to the only case where a small shift of the α -helix 10 occurs, and this is certainly a case where a better accommodation of the enzyme occurred. On the whole, FEP calculations provide a much more efficient evaluation of energy difference between enantiomers than potential energy evaluation. Differences in absolute values between calculated and experimental $\Delta\Delta G^\ddagger$ may be attributed to the limitations of our approach for modelling global enzyme accommodation, including, for example, the possible movement of the α -helix 10 which may allow CALB to adapt the shape of its active site to large substrates like hexan-3-ol. We are fully aware of the fact that the protocol can be improved, in order to give a better reproducibility and enabling at the same time, a global enzyme accommodation during simulation. Another possible source of error is the approximate description of the transition state of the reaction as a tetrahedral intermediate. In this respect, QM/MM calculations may prove useful, to better define both the geometry of the transition state and the distribution of charges around the chiral centre and also perhaps including a few key neighbouring amino acid residues [51–53]. Notwithstanding, FEP calculations can provide results for novel substrates, without the need for a significant number of experimental data to adjust the model, as is the case, for instance, with 3D-QSAR methods. Moreover, FEP calculations can provide clues about tetrahedral intermediate geometries. Indeed, the analysis of the trajectories performed during this study strongly supports Haeflner's model of the orientation of the *S* substrates within the active site of CALB: the *S* orientation was preserved in all cases, except that of pentan-2-ol. The data presented here help in understanding the origin of

enantioselectivity through differences in energetic pathways between enantiomers. This is a first attempt to quantify free energy difference using the FEP method to study CALB enantioselectivity. In the future this could become a very interesting tool for the pharmaceutical industry.

Acknowledgements

This study was supported by the French ANR (National Research Agency) through the EXPENANTIO project (program CP2D). CINES and IDRIS from GENCI (Grand Equipement National de Calcul Intensif) are acknowledged for giving access to super-computing facilities. The manuscript was corrected by a native English scientific translator (<http://traduction.lefevere-laoide.net>).

References

- [1] R.D. Schmid, R. Verger, *Angew. Chem. Int. Ed.* 37 (1998) 1608–1633.
- [2] M.T. Reetz, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6 (2002) 145–150.
- [3] R.J. Kazlauskas, A.N.E. Weissfloch, A.T. Rappaport, L.A. Cuccia, *J. Org. Chem.* 56 (1991) 2656–2665.
- [4] D. Rotticci, F. Haeflner, C. Orrenius, T. Norin, K. Hult, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 5 (1998) 267–272.
- [5] M.-P. Bousquet-Dubouch, M. Graber, N. Sousa, S. Lamare, M.-D. Legoy, *Biochim. Biophys. Acta* 26 (2001) 90–99.
- [6] F. Haeflner, T. Norin, K. Hult, *Biophys. J.* 74 (1998) 1251–1262.
- [7] C. Orrenius, F. Haeflner, D. Rotticci, N. Öhrner, T. Norin, K. Hult, *Biocatal. Biotransform.* 16 (1998) 1–15.
- [8] F. Haeflner, T. Norin, *Chem. Pharm. Bull.* 47 (1999) 591–600.
- [9] D. Rotticci, J.C. Rotticci-Mulder, S. Denman, T. Norin, K. Hult, *ChemBioChem* 2 (2001) 766–770.
- [10] J. Uppenberg, N. Öhrner, M. Norin, K. Hult, G.J. Kleywegt, S. Patkar, V. Waagen, T. Anthonsen, J.T. Alwyn, *Biochemistry* 34 (1995) 16581–16838.
- [11] C.H. Kwon, D.Y. Shin, J.H. Lee, K.S. Wook, K.J. Won, *J. Microbiol. Biotechnol.* 17 (2007) 1098–1105.
- [12] C. Orrenius, C. van Heusden, J. van Ruiten, P. Overbeeke, H. Kierkels, J.A. Duine, A.J. Jongejan, *Protein Eng.* 11 (1998) 1147–1153.
- [13] S. Raza, L. Fransson, K. Hult, *Protein Sci.* 10 (2001) 329–338.
- [14] A. Warshel, G. Naray-Szabo, F. Sussman, J.K. Hwang, *Biochemistry* 28 (1989) 3629–3637.
- [15] H. Eyring, M. Polanyi, *Z. Phys. Chem.* 12 (1931) 279.
- [16] R.S. Philipps, *Enzyme Microb. Technol.* 14 (1992) 417–419.
- [17] R.S. Philipps, *Trends Biotechnol.* 14 (1996) 13–16.
- [18] A.P.L. Overbeeke, C. Orrenius, J.A. Jongejan, J.A. Duine, *Chem. Phys. Lipids* 93 (1998) 81–93.
- [19] J. Ottosson, L. Fransson, K. Hult, *Protein Sci.* 11 (2002) 1462–1471.
- [20] V. Leonard-Nevers, Z. Marton, S. Lamare, K. Hult, M. Graber, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 59 (2009) 90–95.
- [21] P. Braiucă, K. Lorena, V. Ferrario, C. Ebert, L. Gardossi, *Adv. Synth. Catal.* 351 (2009) 1293–1302.
- [22] T. Schulz, J. Pleiss, R.D. Schmid, *Protein Sci.* 9 (2000) 1053–1062.
- [23] P.B. Juhl, P. Trodler, S. Tyagi, J. Pleiss, *BMC Struct. Biol.* 9 (2009) 39–55.
- [24] E. García-Urdiales, N. Ríos-Lombardía, J. Mangas-Sánchez, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *ChemBioChem* 10 (2009) 1830–1838.

- [25] Y. Zhou, Ph.D. thesis, Computational Study of Enzyme Enantioselectivity, University of Delft, NL, 2006.
- [26] W.L. Jorgensen, *Acc. Chem. Res.* 22 (1989) 184–189.
- [27] J. Aqvist, *J. Phys. Chem.* 94 (1990) 8021–8024.
- [28] T. Simonson, G. Archontis, M. Karplus, *Acc. Chem. Res.* 35 (2002) 430–437.
- [29] D.Q. McDonald, W.C. Still, *J. Comput. Chem.* 118 (1996) 2073–2077.
- [30] C. de Graaf, C. Oostenbrink, P.H.J. Keizers, B.M.A. van Vugt-Lussenburg, J.N.M. Commandeur, N.P.E. Vermeulen, *Eur. Biophys. J.* 36 (2007) 589–599.
- [31] A. Aleksandrov, D. Thompson, T. Simonson, *J. Mol. Recognit.* 23 (2010) 117–127.
- [32] C.D. Christ, A.E. Mark, W.F. Van Gunsteren, *J. Comput. Chem.* 31 (2009) 1569–1582.
- [33] A. Di Nola, A.T. Brünger, *J. Comput. Chem.* 19 (1998) 1229–1240.
- [34] G. Colombo, S. Toba, J.K.M. Merz, *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 3486–3493.
- [35] C.-S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas, C.J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 7294–7299.
- [36] V. Leonard, S. Lamare, M.-D. Legoy, M. Graber, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 32 (2004) 53–59.
- [37] J. Uppenberg, M.T. Hansen, S. Patkar, T.A. Jones, *Structure* 2 (1994) 293–308.
- [38] J. Nyhln, B. Martn-Matute, A.G. Sandstrm, M. Bocola, J.-E. Bckvall, *ChemBioChem* 9 (2008) 1968–1974.
- [39] B.R. Brooks, C.L. Brooks III, A.D. Mackerell, L. Nilsson Jr., R.J. Petrella, B. Roux, Y. Won, G. Archontis, B. C. S. Boresch, A. Caffisch, L. Caves, Q. Cui, A.R. Dinner, M. Feig, S. Fischer, J. Gao, M. Hodoscek, W. Im, K. Kuczera, T. Lazaridis, J. MA, V. Ovchinnikov, E. Paci, R.W. Pastor, C.B. Post, J.Z. Pu, M. Schaeffer, B. Tidor, R.M. Venable, H.L. Woodcock, X. Wu, W. Yang, D.M. York, M. Karplus, *J. Comput. Chem.* 30 (2009) 1545–1614.
- [40] N. Otte, M. Bocola, W. Thiel, *J. Comput. Chem.* 30 (2009) 154–162.
- [41] R. Mutyala, R.N. Reddy, M. Sumakanth, P. Reddanna, M.R. Reddy, *J. Comput. Chem.* 28 (2007) 932–937.
- [42] J. Wang, Y. Deng, B. Roux, *Biophys. J.* 91 (2006) 2798–2814.
- [43] D. Allouche, J. Parello, Y. Sanejouand, *J. Mol. Biol.* 285 (1999) 857–873.
- [44] P. Trodler, J. Pleiss, *BMC Struct. Biol.* 8 (2008) 1–10.
- [45] R. McCabe, A. Rodger, A. Taylor, *Enzyme Microb. Technol.* 36 (2005) 70–74.
- [46] R.W. Zwanzig, *J. Chem. Phys.* 22 (1954) 1420–1426.
- [47] C. Hedfors, K. Hult, M. Martinelle, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 66 (2010) 120–123.
- [48] A.O. Magnusson, M. Takwa, A. Hamberg, K. Hult, *Angew. Chem. Int. Ed.* 44 (2005) 4582–4585.
- [49] M. Skjøt, L. De Maria, R. Chatterjee, A. Svendsen, S.A. Patkar, P.R. Østergaard, J. Brask, *ChemBioChem* 10 (2009) 520–527.
- [50] C. Zhao, D.A. Caplan, S.Y. Noskov, *J. Chem. Theory Comput.* 6 (2010) 1900–1914.
- [51] R. Murphy, D. Philipp, R. Friesner, *J. Comput. Chem.* 21 (16) (2000) 1442–1457.
- [52] Y. Zhang, J. Kua, J. McCammon, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (35) (2002) 10572–10577.
- [53] C. Hensen, J. Hermann, K. Nam, S. Ma, J. Gao, H. Holtje, *J. Med. Chem.* 47 (27) (2004) 6673–6680.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic

journal homepage: www.elsevier.com/locate/molcatb



Enhancing the enantioselectivity of CALB by substrate imprinting: A combined experimental and molecular dynamics simulation model study

L. Chaput^{a,b}, Z. Marton^a, P. Pineau^a, L. Domon^a, V. Tran^b, M. Graber^{a,*}

^a Université La Rochelle, UMR 6250 LIENSs CNRS – ULR, Pôle Sciences et Technologies, Bâtiment Marie Curie, Avenue Michel Crépeau, 17042 La Rochelle, France

^b Unité Biotechnologie, Biocatalyse et Biorégulation (U3B), UMR CNRS 6204 – Faculté des Sciences et des Techniques de Nantes, 2, rue de la Houssinière, BP 92208 44322 Nantes Cedex 3, France

ARTICLE INFO

Article history:
Available online xxx

Keywords:
Enantioselectivity
Imprinting effect
Kinetics
Candida antarctica lipase B
Molecular modeling

ABSTRACT

Kinetic resolution of pentan-2-ol by CALB catalyzed enantioselective transesterification, with various alkylpropanoate acyl donors, was studied in a solid-gas reactor. Results show that the leaving alkoxy group influences the enantiomeric ratio of the reaction. Resolution of pentan-2-ol with methyl propanoate gives an enantiomeric ratio of 62. Esters with longer linear alkyl chains, from ethyl to pentyl propanoate give higher enantiomeric ratios, comprised between 103 and 117. Enantiopure ester (*R*)-1-methylpentyl propanoate increases the enantiomeric ratio to 140 compared with *E* = 120 for the racemic mixture. In contrast, enantiopure (*S*)-1-methylpentyl propanoate decreases the enantiomeric ratio to 72. Our data support the notion of an imprinting effect or “ligand-induced enzyme memory” caused by the shape of the leaving alcohol.

To simulate the imprinting effect caused by the alkoxy part of the acyl donor, molecular modeling studies were performed with both (*R*)- and (*S*)-enantiopure 1-methylpentyl propanoate. To investigate how the first step of the reaction, through the first tetrahedral intermediate, affects the enzyme conformation depending on the enantiopure ester substrate used, 20 ns molecular dynamics simulations were carried out. Clustering analysis was done to study relevant conformations of the systems. Differences in the global conformation of the enzyme between systems with *R* or *S* enantiomers were not observed. Interestingly however, orientation of the partially buried side chain for Ile285 was affected. This could explain the increased enantiomeric ratio observed with the substrate ester (*R*)-1-methylpentyl propanoate due to an improved (*R*)-pentan-2-ol/enzyme interaction.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Lipases are α/β hydrolases (EC 3.1.1.3) which catalyze the hydrolysis of triglycerides *in vivo*. They can also form ester bonds under reverse hydrolytic conditions, which enables them to catalyze esterification and transesterification reactions. Furthermore, they are enantioselective catalysts useful in the synthesis of pharmaceutical intermediates and fine chemicals. Lipase B from *Candida antarctica*, CALB, has found widespread applications in the enantioselective synthesis of bioactive molecules and in the resolution of racemic mixtures, due to its high stability in organic media and its large-scale availability [1].

CALB catalyzed resolution of secondary alcohols by transesterification with esters as acyl donors, occurs through a Ping Pong Bi Bi mechanism, which includes two steps. The first is the acylation of the enzyme by the ester substrate, to yield the acyl-enzyme

intermediate and the release of the first product, an alcohol formed with the alkoxy group. In the second step, the chiral alcohol interacts with the acyl-enzyme to form a new binary complex and the second product ester.

In the active site of CALB, the acyl and alcohol substrate moieties bind in a hairpin orientation. It is thus not surprising that the acyl chain of the ester interacts with the alcohol and consequently influences the chiral discrimination of alcohols. However it is unexpected that the leaving group, which is the alkoxy part of the ester, also influences the enantiomeric ratio.

The hypothesis of “molecular imprinting effect” has been proposed by several authors to explain such modification of enzyme selectivity or activity [2–4]. In these studies the enzyme is brought together with an “imprinting” molecule (substrate mimics for example) and then co-immobilized on solid support or by sol-gel encapsulation. The enzyme molds its active site structure around the imprint molecule and remains “trapped” in this conformation until the substrate enters.

In 2000, Lee et al. [5] described a new approach to enhance lipase enantioselectivity by the “substrate matching” strategy.

* Corresponding author. Tel.: +33 5 46 45 86 30; fax: +33 5 46 45 82 65.
E-mail address: mgrab@univ-lr.fr (M. Graber).

Resolution of three different secondary alcohols with three different acyl donors by lipase-catalyzed transesterification with *C. antarctica* and *Pseudomonas cepacia* lipases were performed. Results demonstrated that the enantioselectivity of lipases was maximized by using acyl donor and alcohol substrates which matched well. The hypothesis of the “enzyme memory” induced by the acyl donors active site moulding in the first step of the reaction was proposed. This work differs from previous studies in that the “imprinting” molecule is consistently in contact with the enzyme during the reaction, because it is the first substrate of the reaction.

Here we used this “imprinting” method and experimentally highlight the significant influence of the alkoxy part of the ester acyl donor on the enantiomeric ratio, for the resolution of pentan-2-ol by CALB. We then established the full kinetic model for a Ping Pong Bi Bi mechanism with two competing chiral alcohol substrates, in order to verify that the differences in enantiomeric ratio, obtained with different acyl donors, did not simply arise from differences in reaction rates occurring during the acylation step, with the different esters. Our data from both experimental and kinetic studies support the hypothesis of molecular imprinting. We then looked for structural changes using molecular modeling methods.

Molecular modeling is a useful tool to provide a rational explanation of experimental data. In 2010, Lousa et al. provided a structural explanation for the imprinting effect [6] observed with pre-treated subtilisin by co-lyophilization with an inhibitor in the active site, using a molecular modeling approach. Results showed that in the presence of the inhibitor, the active site was maintained in an open conformation which was stable in hexane solvent, in contrast to simulation with “untreated” enzyme. Here, 20 ns molecular dynamics simulations were carried out to study how the first step of the reaction, through the first tetrahedral intermediate, affects the enzyme conformation, depending on the enantiopure ester substrate used.

2. Experimental

2.1. Chemicals

Substrates and other chemicals were purchased from Sigma–Aldrich–Fluka Chemical Co. They were of the highest purity available (98% minimum) and checked by gas chromatography before use. Substrates were dried by distillation under argon prior to use and stored under argon atmosphere and over molecular sieves. Solvents were purchased from Carlo Erba. Racemic 1-methylpentyl propanoate was synthesized from the corresponding alcohol and propanoic anhydride in pyridine at room temperature [7].

(*R*)-1-methylpentyl propanoate was obtained by enzymatic resolution from vinyl propionate and hexan-2-ol using CALB Novozym® 435 in heptane solvent at 35 °C, ee_p enantiomeric excess of ester product was 99.3%. Enriched hexan-2-ol in *S* form taken from the previous reaction was used after purification by chromatography on silica gel (eluent EP/AcOEt: 95/5), then esterification with anhydride propionic was done to obtain 1-(*S*)-methylpentyl propanoate.

2.2. Enzyme used for kinetic studies

CALB was produced in the methylotropic yeast *Pichia pastoris* and was expressed extracellularly and purified from the medium by hydrophobic interaction chromatography, followed by gel filtration [8,9]. Enzyme adsorption was performed onto 60/80 mesh Chromosorb P AW DMCS (acid washed dimethylchlorosilanized) (Varian, France). In a typical adsorption procedure for solid/gas catalysis, enzyme (0.106 mg) was dissolved in sodium phosphate

buffer (pH 7.5, 10 mM), and dry Chromosorb P AW DMCS (1 g) was added to the solution. The amount of immobilized enzyme was determined by measuring absorbance at 280 nm, by taking a molar extinction coefficient equal to 40,690 M⁻¹ cm⁻¹. After vigorous shaking, the preparation was left for 1 week under vacuum and over P₂O₅ at room temperature.

2.3. Enzymatic reactions

Initial rate of reaction measurements were performed at 70 °C in a solid-gas reactor as previously described [10]. Thermodynamic activities for ester and alcohol substrates were respectively $a_{ester} = 0.1$ and $a_{alcohol} = 0.05$. Reactions were carried out in anhydrous conditions. The amount of enzyme comprised between 20 and 200 mg, depending on the acyl donor used. The total flow was equal to 900 μmol mol⁻¹.

2.4. GC analysis

Quantitative analysis of reaction products were conducted using a 7890 GC system from Agilent for the analysis of ester products (*R*)-1- and (*S*)-1-methylbutyl propanoate (55 °C 15 min, 3 °C min⁻¹, 85 °C 5 min), at a flow rate of 1.5 ml min⁻¹ with a Chirasil-Dex CB (25 m, 0.25 mm i.d., 0.25 μm β-cyclodextrin, Chrompack, France) column. Products were detected by FID and quantified using HP Chemstation software.

2.5. Enantioselectivity measurements

Enantiomeric ratio values for the different kinetics reported in Section 4, were obtained in our laboratory, by measuring the ratio of initial reaction rates for ester products synthesis [11], in a continuous solid-gas reactor with different acyl donors, and immobilized CALB, as previously described [9,12].

3. Computational methods

3.1. Setup of the system

The starting CALB enzyme was the $R = 1.55 \text{ \AA}$ crystallographic structure solved by Uppenberg et al. [13] (PDB entry 1TCA). To evaluate the effect of the ester substrate on the enzyme structure during the first step of the reaction path, the two tetrahedral intermediates, obtained in the reaction with *R* or *S* 1-methylpentyl propanoate were modeled. The choice of studying the intermediates, instead of free substrates, in the active site was done in order to prevent the substrates from getting out of active site, observed several times in the case of subtilisin by Lousa et al. [6]. Furthermore, the formation of the tetrahedral intermediate may have more impact on the structure conformation, because its formation requires the crossing of the energy barrier. Thus, three systems were modeled: free enzyme, enzyme with *R* and *S* tetrahedral intermediates.

A transition state analog crystal structure, obtained with phosphate irreversible inhibitor (PDB entry 1LBS) was used to build the tetrahedral part of the reaction intermediate, to allow for the correct location of the central part of the tetrahedral intermediate. The acyl part is a propanoyl group. The negatively charged oxygen was oriented toward the oxyanion hole to establish hydrogen bonds with Thr40 and Gln106.

NAMD 2.7 program and the CHARMM22 all-atom force field were used. Calculations were done in an explicit water box (model TIP3P) with boundary conditions (15 Å between the enzyme and the edge of the box). A waterbox was used for the calculations because it is in accordance with the CHARMM force field parameters definition. It is supposed to increase the flexibility of the enzyme,

therefore offering the possibility to make enzyme “deformation” easier, due to the ester substrate in the active site in the 20 ns trajectories done for each system. The thermodynamic ensemble is “isotherm-isobar” (NTP). The timestep was 2 fs and the SHAKE algorithm was used to freeze bonds involving hydrogen atoms.

Force field parameters for the tetrahedral intermediate were taken from the literature [14]. These parameters were obtained from *ab initio* calculations and were specifically developed for CHARMM22 force field. Other parameters required for modeling the alkyl side chains of alcohols were defined by homology with available CHARMM22 parameters.

First, water molecules surrounding the enzyme were minimized by 5000 iterations of the conjugate gradient, then the whole system was minimized with 10,000 iterations using the same algorithm. The heat steps were carried out in 600 ps, starting from 50 K and going up to 300 K, with a temperature incrementation of 1 K every 4 ps. An harmonic constraint of 5 kcal mol⁻¹ was set up on the enzyme. The equilibration step is the succession of four short dynamics of 200 ps with a decreasing harmonic constraint (5, 3, 0.5 and 0.1 kcal mol⁻¹) followed by one nanosecond without constraint. Then, the production dynamic lasted for 20 ns.

3.2. Clustering analysis

Clustering analysis provides a good overview of enzyme conformations. 2000 structures, extracted from the productive dynamics (one every 10 ps), were used for the dynamic analysis. Using the VMD program [15], RMSD (root-mean-square-deviation) matrices were calculated for the 2000 structures, one diagonal matrix with a size of 2000 by 2000 was obtained for each of the three systems.

RMSD was calculated on the backbone for residues 35–80, 100–240 and 260–290. Residues far from the active site were not included, because their mobility is not supposed to influence the active site conformation, which is the region putatively involved in the imprinting effect. In addition, terminal regions are highly mobile (and far from the active site for CALB) and over-influenced the RMSD matrix, therefore, they were not included. In the manner, we aimed to obtain conformational information specific to the rest of the structure and more particularly near the active site.

In a second step, RMSD matrix was calculated to focus on the residues of the active site. RMSD were based on every heavy atom, including side chains, of residues 103, 104, 106, 224, 187, 40, 42, 47, 278, 282, 285, and the backbone of residue 105 (due to the fact that the side chain changes for each system for this residue). This RMSD matrix was then used to process a hierarchical ascendant classification (HAC). The Ward method [16] was applied to the agglomerative steps used to build the dendrogram. Clustering analysis was carried out using the R statistical software. The average structure of the two most representative structures from productive dynamics was chosen. Then, the closest structures to the average structure were extracted and used for analysis.

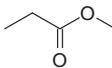
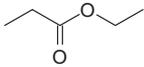
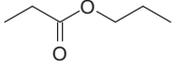
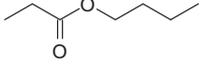
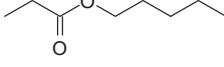
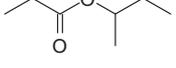
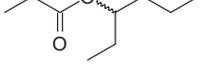
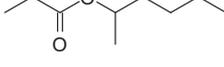
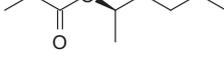
4. Results and discussion

4.1. Experimental results

Enantiomeric ratios experimentally determined for the resolution of pentan-2-ol by transesterification with various alkoxy propanoates as acyl donors are presented in Table 1. Resolution of pentan-2-ol with methyl propanoate displays an enantiomeric ratio of 62. Esters with longer linear alkyl chains, from ethyl to pentyl propanoate give higher enantiomeric ratios up to 117. Enantiomeric ratios equal to 117, 103, 115 and 105 were found for ethyl propanoate, propyl propanoate, butyl propanoate and pentyl propanoate, respectively. Enantiomeric ratios for chiral

Table 1

Enantiomeric ratio for CALB catalyzed transesterification involving pentan-2-ol with different alkyl propanoate esters, in solid-gas reactor at 70 °C.

	Acyl donor ester	<i>E</i>
	Methyl propanoate	62
	Ethyl propanoate	117
	Propyl propanoate	103
	Butyl propanoate	115
	Pentyl propanoate	105
	1-Methylpropyl propanoate	51
	1-(±)-Ethylbutyl propanoate	84
	1-(±)-Methylpentyl propanoate	122
	1-(<i>R</i>)-Methylpentyl propanoate	140
	1-(<i>S</i>)-Methylpentyl propanoate	72

esters with branched alkyl chains were also evaluated. The racemate 1-methylpropyl propanoate gives an *E* value of 51, which is quite close to the *E* value (62) for methyl propanoate. Higher enantiomeric ratios were obtained with the longer racemate 1-ethylbutyl propanoate (ratio of 84) and with 1-methylpentyl propanoate, (ratio of 122).

Enantiomeric ratios with the enantiopure (*R*)-1-methylpentyl propanoate and (*S*)-1-methylpentyl propanoate, were measured and found to be 140 and 72, respectively. Thus, the enantiomeric form of the chiral ester substrate is essential for determining the enantioselectivity of the reaction. CALB displays enantioselectivity for the *R* alcohol [9,17], and using an ester with the *R* chiral form for the alkyl part increases the enantioselectivity compared to the racemate. In contrast, an ester with the *S* chiral form for the alkyl part, results in decreased enantioselectivity. Therefore, the more the alkyl part of the chiral ester resembles the preferred enantiomer, (*R*)-pentan-2-ol, the higher the enantioselectivity attained. A similar observation was made by González-Sabina et al. [18], who obtained higher enantioselectivity when the alkoxy group of the acyl donor was structurally close to the amine to be resolved. As a consequence, an improved resolution of (±)-cis-2-phenylcyclopentanamine was obtained with the acyl donor phenylmethyl ethanoate (*E* value = 37), compared to ethyl ethanoate (*E* value = 17).

4.2. Kinetic equation study

To confirm whether the differences in enantioselectivity are due to an “imprinting effect” caused by the leaving alcohol, it was

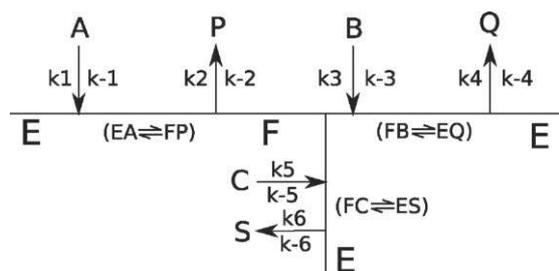


Fig. 1. Cleland representation. The enzyme (E), the acyl enzyme (F), the ester (A), the (R) and (S) alcohols (respectively B and C), the leaving alcohol product (P), the (R) and (S) ester products (respectively Q and S).

necessary to check that these differences, obtained using different acyl donors, do not simply arise from differences in reaction rates occurring during the acylation step with the different esters. The complete kinetic model for the Ping Pong Bi Bi mechanism, with two competing chiral alcohol substrates, was established. The enantiomeric ratio was then expressed as a function of individual catalytic rate constants of the reaction, in order to investigate whether the catalytic rate constants involved in the acylation step influence the E value.

4.2.1. Kinetic model determination

The enantiomeric ratio is defined as the ratio of specificity constants for R and S enantiomers, according to the following formula: $E = (k_{cat}^R/K_M^R)/(k_{cat}^S/K_M^S)$. The kinetic parameter determination is straightforward in the case of a monosubstrate reaction following the classic Michaelis–Menten mechanism. The transesterification studied here corresponds to a much more complex kinetics system. It involves a first substrate ester and two competing second substrates, R and S forms of the secondary alcohol. It obeys a Ping Pong Bi Bi mechanism. Classic kinetic experiments provide apparent constants K_M and V_{max} , which are dependent on the catalytic rate constant of the first step of the mechanism. The Michaelis–Menten constant for the R alcohol K_M^R is thus equal to $k_2(k_3 + k_4)/k_3(k_4 + k_2)$ (Fig. 2), where k_2 depends on the leaving alcohol in the first reaction step. This observation could explain the enantiomeric ratio modification observed when the leaving alkoxy group changes. Therefore, the relationship between the acylation step rate and enantiomeric ratio is worth considering. Here, the full kinetic model for a Ping Pong Bi Bi mechanism involving one ester and two competing alcohols substrates was defined. The kinetic equation was calculated using the King–Altman method and specificity constants were determined with the Cleland method.

We focused on the resolution of a racemic mixture of R and S enantiomeric forms of pentan-2-ol, through acyl transfer from an ester substrate. In the reaction model a second pathway for the reaction with the second enantiomer was added, as shown in Figs. 1 and 2, for Cleland and King–Altman representations.

The kinetic profiles of multisubstrate systems can be resolved using the King–Altman method [19,20], which, in the present work, has been devised as an interactive web form by BioKin Ltd. (available at: <http://www.biokin.com/king-altman/>). It was used to obtain the reaction velocity as a function of individual catalytic rate constants presented above in Cleland and King–Altman representations.

The model provides complex equations, whose detailed expression is given in Appendix A. Equations were simplified by considering the system in the absence of products P, Q and S. Indeed, all reaction velocities were measured under conditions of initial rate of reaction, i.e. with negligible product concentrations. Thus,

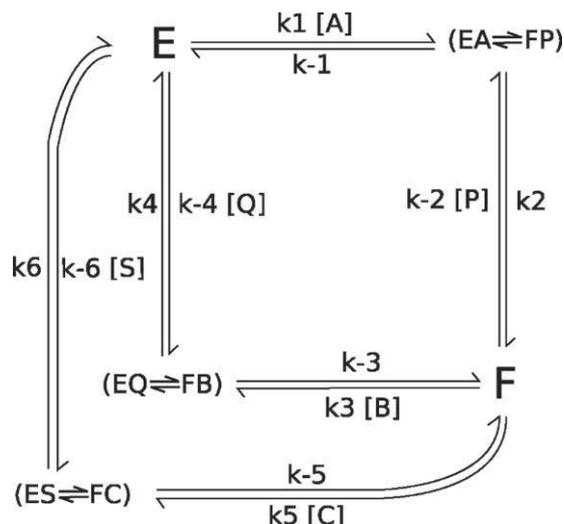


Fig. 2. King–Altman representation. The enzyme (E), the acyl enzyme (F), the ester (A), the (R) and (S) alcohols (respectively B and C), the leaving alcohol product (P), the (R) and (S) ester products (respectively Q and S).

the forward velocities for the R and S ester products synthesis (v_{init}^R and v_{init}^S) were obtained:

$$\frac{v_{init}^R}{[E]_t} = \frac{n_4[A][B]}{d_8[A][C] + d_9[A][B] + d_{13}[C] + d_{14}[B] + d_{15}[A]} \quad (4.1)$$

$$\frac{v_{init}^S}{[E]_t} = \frac{n_8[A][C]}{d_8[A][C] + d_9[A][B] + d_{13}[C] + d_{14}[B] + d_{15}[A]} \quad (4.2)$$

The complete formulas, with detailed values of n_i and d_i are reported in Appendix A.

4.2.2. Kinetic parameter determination

The Cleland nomenclature [21] allowed the calculation of the Michaelis–Menten constant K_M for (R) and (S) alcohols (respectively K_M^R and K_M^S) and maximum reaction rates V_{max}^R and V_{max}^S . The parameters determination was based on coefficients from the global equations (4.1) and (4.2).

$$\frac{V_{max}^R}{[E]_t} = \frac{k_2 k_4}{k_4 + k_2} = k_{cat}^R \quad \frac{V_{max}^S}{[E]_t} = \frac{k_2 k_6}{k_6 + k_2} = k_{cat}^S \quad (4.3)$$

$$K_M^R = \frac{k_2(k_{-3} + k_4)}{k_3(k_4 + k_2)} \quad K_M^S = \frac{k_2(k_{-5} + k_6)}{k_5(k_6 + k_2)} \quad (4.4)$$

The four parameters K_M^R , K_M^S , V_{max}^R and V_{max}^S enabled the calculation of the enantiomeric ratio E , according to the following formula $E = (k_{cat}^R/K_M^R)/(k_{cat}^S/K_M^S)$:

$$E = \frac{k_3 k_4 (k_{-5} + k_6)}{k_5 k_6 (k_{-3} + k_4)} \quad (4.5)$$

Thus, it appears that the E value is not controlled by catalytic rate constants involved in the acylation step, the first part of the reaction (k_1 , k_{-1} , k_2 , k_{-2}), (c.f. Figs. 1 and 2), indicating that the nature of the leaving alcohol did not influence the enantiomeric ratio E , through kinetic effects.

In addition, the ratio of initial reaction rates v_{init}^R/v_{init}^S was equal to:

$$\frac{v_{init}^R}{v_{init}^S} = \frac{n_4[A][B]}{n_8[A][C]} = \frac{k_3 k_4 (k_{-5} + k_6)[B]}{k_5 k_6 (k_{-3} + k_4)[C]} \quad (4.6)$$

Therefore, when reaction velocity is measured under conditions of initial rate, where *B* and *C* are enantiopure alcohols in racemic mixture, then the ratio of forward velocities $v_{init.}^R/v_{init.}^S$ is equal to:

$$\frac{v_{init.}^R}{v_{init.}^S} = \frac{k_3 k_4 (k_{-5} + k_6)}{k_5 k_6 (k_{-3} + k_4)} = E \quad (4.7)$$

Thus, the enantiomeric ratio *E* is equal to the ratio v^R/v^S in conditions of initial rate (insignificant concentration of products) and with a racemic mixture of alcohols at the initial step of the reaction. We can conclude that measuring the ratio of initial reaction rates v^R/v^S is a valid method to determine the enantiomeric ratio *E*.

Similarly, the relationship between the ratio v^R/v^S in conditions of initial reaction and *E* was demonstrated by Chen [11] in the case of the simple Michaelis Menten model. Furthermore, Chen's proposition remains correct in case of the Ping Pong Bi Bi system with *R* or *S* as competitive alcohol substrates.

We have confirmed here, then, that (1) *E* values can be correctly determined by measuring the ratio of initial reaction rates for enantiopure ester synthesis, (2) *E* values do not depend on catalytic rate constants involved in the acylation step.

4.3. Molecular modeling results

The results presented above suggest that there is an imprinting effect: the first substrate of the reaction and in particular the alkoxy part of the ester causes a conformation change of the enzyme, which is "memorized" by the enzyme and modifies its ability to discriminate between enantiomers of the second alcohol substrates. Interesting results, concerning the sensitivity of the enantioselectivity in relation to the enantiomeric form of the leaving alcohol, indicate that the imprinting effect involves modifications near the active site (Table 1): *E* obtained with (*R*)-1-methylpentyl propanoate as acyl donor is equal to 140, whereas it is equal to 72 with (*S*)-1-methylpentyl propanoate. Our attempts to confirm this hypothesis by molecular modeling are presented below.

In the first clustering study we focused on global enzyme conformation. None of the clusters display global enzyme conformation rearrangement. The only difference between clusters concerns the position of a helix above the active site: results reveal flexibility of the α helix 5, which has already been described by Skjøt et al. [22] and is not due to the presence of the substrate in the active site.

We then focused on amino acids near the active site, in order to compare active site structures of free enzyme, enzyme + *R* ester and enzyme + *S* ester first tetrahedral intermediates. Cluster analysis based on amino acids of the active site was done as described in Section 3. Amino acids alignment gave good superimposed structures, including side chains orientation (*c.f.* Fig. 3).

Interestingly however, the orientation of the side chain of residue Ile285 was different for the cluster 2 of TI-*R*. This may be due to the specific constraint generated by the alcohol enantiomer on the side chain orientation which pointed toward Ile285. In the case of the *R* enantiomer, the side chain of Ile285 rotated by 120° in around 10 ns (Fig. 4). The cluster analysis was consistent with this fact, and split the trajectory into two dominant clusters, one before the rotation, and the second after it. Side chain orientation in the TI-*S* system is the same as that observed with free enzyme. Residue Ile 285 belongs to α helix 10. Marton et al. demonstrated that mutations of residues Leu282 and Ile282 of the α helix 10 affected enantioselectivity [23]. Thus, side chain rotation of Ile285 may also influence the enantioselectivity of the reaction.

A major question concerns the timescale of side chain rotation, such as of the branched-chain of Ile285. The time scale for the rotation of a buried side chain can be very large (10^{-4} to

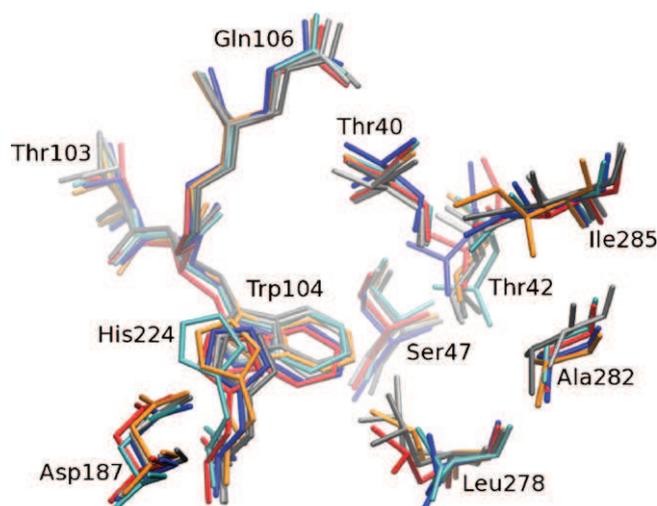


Fig. 3. View of the active site for the six clusters obtained for the three studied systems after alignment based on the heavy atoms of residues 103, 104, 106, 224, 187, 40, 42, 47, 278, 282, 285 and the backbone of residues 105. The color code for the clusters is Clust1 for Enz-IT-*S* in blue, Clust2 for Enz-IT-*S* in light blue, Clust1 for Enz-IT-*R* in red, Clust2 for Enz-IT-*R* in orange, Clust1 for enzyme free in gray and Clust2 for enzyme free in dark gray. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

1 s) [24]. Experimental results show that buried side chains rotate very slowly compared with the time scale of molecular dynamics. NMR was used by Skrynnikov et al. [25] to quantitate slow hydrogen–deuterium exchange processes at methyl-containing side chains in proteins. This method was also applied to the study of ms time scale side-chain dynamics of methionine residues in a buried cavity. These authors observed that the methionine residues were sensitive to an exchange event with a rate of the order of 1200 s^{-1} at 20°C and that the corresponding motions may be linked to a process which allows entry and exit of ligands to and from the cavity. Similar NMR studies on a protease, by Ishima et al. [26], demonstrated that the hydrogen–deuterium exchange time of buried methyl side chains was above 1 ms.

The side chain of residue Ile285 is partially buried, as it is oriented toward the top of the stereospecificity pocket in the active site, and near the side chain of the alcohol. The time scale of Ile285 side chain rotation can thus be considered to be around 1 ms. Previously the same order of magnitude was obtained for pentan-2-ol

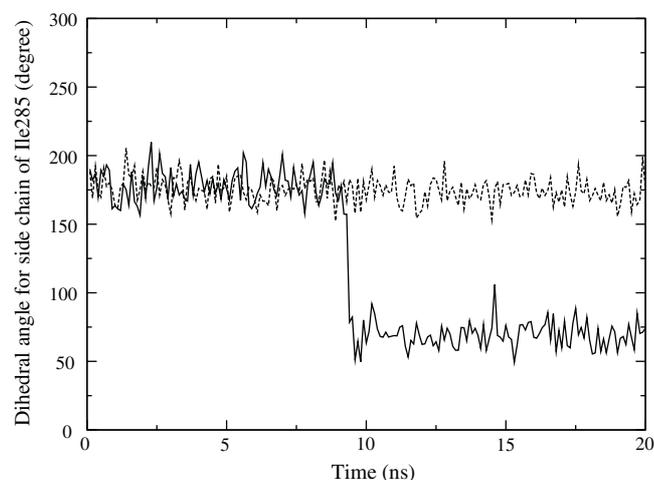


Fig. 4. Dihedral angle (atoms CA–CB–CG1–CD) defining the side chain rotation of residue Ile285. Solid line for the system with the *R* enantiomer and dashed line with the *S* enantiomer.

Compréhension de l'énantiosélectivité de la lipase B de *Candida antarctica*, étude par modélisation moléculaire et expérimentation.

Résumé :

La lipase B de *Candida antarctica* (CALB) est un enzyme présentant des propriétés énantiosélectives très intéressantes pour l'obtention de molécules énantio-pures par dédoublement cinétique de mélanges racémiques, molécules utilisées comme synthons dans l'industrie pharmaceutique. En effet, le principe actif de nombreux médicaments est efficace sous une forme énantio-pure, l'autre forme chirale pouvant se révéler délétère pour l'organisme. Les travaux de la thèse s'intéressent à mieux comprendre l'origine de l'énantiosélectivité de la lipase B de *Candida antarctica*, en particulier pour la résolution d'alcools secondaires par des réactions de transestérification. Nous utilisons pour la première fois la méthode de la perturbation de l'énergie libre pour estimer la différence d'énergie libre entre les intermédiaires tétraédriques obtenus avec les formes *R* et *S* d'alcools énantio-mères pour une série d'alcools secondaires, dans le but de prédire *in silico* l'énantiosélectivité de la CALB. Les paramètres cinétiques apparents d'une réaction avec deux alcools substrats énantio-purs sont expérimentalement déterminés et permettent de définir la contribution respective du K_m et du k_{cat} de chaque énantio-mère pour la définition de l'énantiosélectivité. L'étude expérimentale de l'effet d'empreinte par des molécules co-substrats est réalisée, ainsi qu'une étude par modélisation moléculaire de l'effet d'empreinte par le premier ester substrat de la réaction qui pourrait modifier la conformation du site actif de la CALB. La troisième partie porte sur l'étude de la CALB et de trois variants (T42V, S47A et T42V/S47A) chez lesquels les acides aminés dans la poche stéréospécifique sont mutés. T42V et S47A permettent d'obtenir une augmentation de l'énantiosélectivité. L'étude propose une étude détaillée de la conformation du site actif à partir de simulations de trajectoires de dynamique moléculaire.

Mots clés : Lipase B de *Candida antarctica*, énantiosélectivité, biocatalyse, modélisation moléculaire, intermédiaire tétraédrique, perturbation de l'énergie libre, effet d'empreinte, mutant, T42V, S47A, T42V/S47A

Comprehensive study of *Candida antarctica* lipase B enantioselectivity, using experimental and molecular modeling approaches

Summary :

The lipase B from *Candida antarctica* is an enzyme displaying enantioselective properties which are interesting to obtain enantiopure compounds by kinetic resolution of racemic mixtures, which are used as pharmaceutical intermediates and fine chemicals. Indeed, for most of the drugs, only one of the two chiral forms is efficient as bioactive compound, whereas the other chiral form may display deleterious effects. Present work concerns the understanding of the origin of *Candida antarctica* lipase B enantioselectivity, and more especially in case of the resolution of secondary alcohols by transesterification. We used, for the first time, the free energy perturbation method to evaluate the free energy difference between tetrahedral intermediates with *R* and *S* alcohol enantiomers for a series of secondary alcohols in order to predict *in silico* enantiomeric ratio of CALB-catalyzed reactions. The apparent kinetic parameters were experimentally determined for two enantiopure substrates and allow to evaluate the relative contribution of both K_m and k_{cat} for *R* and *S* enantiomers in the enantiomeric ratio of CALB-catalyzed reactions. Experimental study of imprinting effect hypothesis by co-substrate molecules was done. Molecular modeling studies of imprinting effect hypothesis were performed, in which the first substrate ester of the reaction could mould the active site. At least, the third part of this thesis concerns the study of wild-type CALB and three different variants (T42V and S47A which allow to increase enantioselectivity and T42/S47A) of CALB by molecular modeling. A detailed study of the conformation of the stereospecificity pocket in the active site is presented, based on molecular dynamics simulations.

Keywords : Lipase B from *Candida antarctica*, enantioselectivity, biocatalysis, molecular modeling, tetrahedral intermediate, free energy perturbation, imprinting effect, mutant, T42V, S47A, T42V/S47A



UMR 7266 CNRS-LIENSs, bâtiment Marie Curie,
avenue Michel Crépeau

17042 LA ROCHELLE