



**HAL**  
open science

# Étude de la sélectivité d'acylation enzymatique de peptides : prédiction de la sélectivité de la lipase B de *Candida antarctica* par modélisation moléculaire et recherche de nouvelles enzymes spécifiques de type aminoacylases

Florent Ferrari

## ► To cite this version:

Florent Ferrari. Étude de la sélectivité d'acylation enzymatique de peptides : prédiction de la sélectivité de la lipase B de *Candida antarctica* par modélisation moléculaire et recherche de nouvelles enzymes spécifiques de type aminoacylases. Alimentation et Nutrition. Université de Lorraine, 2014. Français. NNT : 2014LORR0252 . tel-01614465

**HAL Id: tel-01614465**

**<https://theses.hal.science/tel-01614465>**

Submitted on 11 Oct 2017

**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.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITÉ DE LORRAINE  
École Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires  
École Doctorale **Ressources, Procédés, Produits et Environnement**  
Laboratoire **Réaction et Génie des Procédés**

---

**THÈSE**

Présentée à l'UL par

**Florent FERRARI**

*en vue de l'obtention du titre de*

***DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE***  
**Spécialité Procédé Biotechnologique et Alimentaire**

---

*Sujet*

**Etude de la sélectivité d'acylation enzymatique de peptides : prédiction de la sélectivité de la lipase B de *Candida antarctica* par modélisation moléculaire et recherche de nouvelles enzymes spécifiques de type aminoacylases**

---

*Soutenue publiquement le 10 octobre 2014*

**Membre du jury**

<b>Rapporteurs :</b>	Mme. Marianne GRABER	Professeur, Université de la Rochelle, La Rochelle
	Mr. Eric DUBREUCQ	Professeur, Montpellier SupAgro, Montpellier
<b>Examineurs :</b>	Mme. Isabelle CHEVALOT	Professeur, Université de Lorraine, Nancy
	Mme. Catherine HUMEAU	Professeur, Université de Lorraine, Nancy
	Mr. Eric HUSSON	M. d. C., Université de Picardie Jules Verne, Amiens
	Mr. Jean-Luc BLIN	Professeur, Université de Lorraine, Nancy
<b>Invité :</b>	Mr Stéphane DELAUNAY	Professeur, Université de Lorraine, Nancy









*A Simone, Annie, René et Robert*



Cher lecteur,

Je vous souhaite un agréable moment et j'espère que vous trouverez les informations que vous cherchez dans ce manuscrit. Avant de commencer à vous exposer les études qui ont été menées, je souhaite remercier Isabelle CHEVALOT, Stéphane DELAUNAY et Catherine HUMEAU pour m'avoir encadré pendant ces 4 années de recherche.

Ces années de doctorat ont été mon premier emploi et mon entrée officielle dans le monde de la recherche. L'acquisition de ce diplôme implique un investissement personnel important, ce qui induit des périodes difficiles comme des moments de joie. Je voudrais donc remercier tous ceux qui m'ont accompagné dans ma vie privée comme dans ma vie professionnelle et qui ont vécu avec moi ces temps forts. Je pense que sans eux, je n'aurais jamais réalisé le même travail, aussi je souhaite partager le mérite que l'on m'accorde pour ce diplôme avec eux.

Merci à vous tous !

Nous avons tissé des liens forts et je m'appliquerai à les entretenir à la hauteur, j'espère de l'attention que vous avez su m'accorder.

Je ne citerai pas de noms pour ne pas alourdir ces remerciements et par trop grande peur d'oublier quelqu'un. Je souhaite tout de même mettre à l'honneur celle qui m'a supporté, consolé, aidé, soutenu et encouragé plus que je ne pourrai jamais le lui rendre, la bien nommée « jolie Léna » EMILE.

Bonne lecture encore une fois,

Elorent FERRARI  




## **TABLE DES MATIERES**

---

# 1 Sommaire

<b>Table des matières</b> .....	<b>7</b>
<b>1 Sommaire</b> .....	<b>8</b>
<b>2 Liste des figures</b> .....	<b>16</b>
<b>3 Liste des tableaux</b> .....	<b>24</b>
<b>4 Liste des sigles et abréviations</b> .....	<b>27</b>
<b>Introduction générale</b> .....	<b>29</b>
<b>Étude bibliographique</b> .....	<b>33</b>
<b>1 Les peptides</b> .....	<b>34</b>
1.1 Principaux modes d'action de peptides à activité biologique.....	34
1.1.1 Peptides associés à des récepteurs membranaires.....	35
1.1.2 Peptides amphiphiles .....	35
1.1.3 Peptides à structure particulière.....	35
1.1.4 Peptides ayant des interactions physico-chimiques avec les membranes.....	36
<b>2 Acylation de peptides</b> .....	<b>38</b>
2.1 Augmentation de la lipophilie.....	39
2.2 Changement de structure secondaire .....	40
2.3 Influence de la sélectivité d'acylation sur les propriétés des peptides .....	40
2.4 Influence de la chaîne grasse .....	41
2.5 Peptides acylés bioactifs .....	42
2.6 Stratégies d'acylation de peptides .....	42
2.6.1 Acylation peptidique par voie chimique .....	43
2.6.2 Acylation peptidique par voie enzymatique.....	44
<b>3 Acylation enzymatique en milieux non-aqueux</b> .....	<b>45</b>
3.1 Enzymes catalysant l'acylation en milieux non-aqueux.....	45
3.1.1 Les lipases.....	45
3.1.2 Les autres estérases .....	47
3.1.3 Les protéases / peptidases.....	47
3.2 Milieux non aqueux utilisés pour l'acylation enzymatique.....	48
3.2.1 Les solvants organiques .....	48
3.2.2 Autres milieux réactionnels non-conventionnels .....	49
3.2.2.1 Les liquides ioniques.....	50
3.2.2.2 Les milieux fondus .....	51
3.2.2.3 Le CO <sub>2</sub> supercritique : .....	51



3.2.2.4 Les milieux bi-phasiques : .....	52
3.3 Influence des conditions opératoires en milieux non-aqueux sur la réaction d'acylation .....	52
3.3.1 Nature du solvant organique.....	52
3.3.2 Influence de la structure du substrat .....	55
3.3.3 Influence du ratio molaire.....	56
3.3.4 Influence de la nature du donneur d'acyle.....	56
3.3.5 Ionisation du substrat.....	56
<b>4 Acylation enzymatique en milieux aqueux.....</b>	<b>57</b>
4.1 Enzymes catalysant l'acylation en milieux aqueux .....	57
4.1.1 Les aminoacylases .....	58
4.1.1.1 Les pénicillines acylases .....	60
4.1.1.2 Les acylases I .....	61
4.1.1.3 L'aspartoacylase ou acylase II:.....	62
4.1.1.4 L'acyl-lysine désacylase:.....	63
4.1.1.5 L'acylase III : .....	64
4.2 Caractérisation d'acylases catalysant l'acylation en milieu aqueux. Exemple : les acylases produites par <i>S. mobaraensis</i> .....	64
4.2.1 Les caractéristiques et spécificités des acylases issues de <i>S. mobaraensis</i> .....	65
4.2.1.1 Sm-AA issue de <i>S. mobaraensis</i> .....	65
4.2.1.2 Aminoacylase issue de <i>S. mobaraensis</i> .....	66
4.2.1.3 $\epsilon$ -lysine acylase issue de <i>S. mobaraensis</i> (Sm-eLA) .....	68
4.2.1.4 Pénicilline V acylase de <i>S. mobaraensis</i> .....	69
4.3 Les autres enzymes catalysant l'acylation en milieux aqueux .....	71
4.3.1 Les carboxyl-estérases.....	71
4.3.2 Les acyl-transférases .....	72
4.4 Paramètres réactionnels influençant l'hydrolyse ou la synthèse de molécules acylées en milieux aqueux.....	72
4.4.1 La nature des milieux réactionnels aqueux .....	73
4.4.1.1 Le couple pH/Température .....	73
4.4.1.2 Les co-activateurs.....	75
4.4.1.3 Les inhibiteurs .....	76
<b>5 Sélectivité d'acylation enzymatique en solvants organiques. Exemple : CALB .....</b>	<b>77</b>
5.1 Étude de la sélectivité d'acylation enzymatique de CALB .....	78
5.1.1 Mécanisme d'action de CALB .....	81
5.1.2 Sélectivité et spécificité de substrat de CALB .....	83
5.1.2.1 Influence de l'état d'ionisation du substrat sur la spécificité de CALB.....	83
5.1.2.2 Influence de la structure de l'accepteur d'acyle :.....	84
5.1.3 Etude de la sélectivité de CALB par modélisation moléculaire.....	90

5.1.3.1 Introduction .....	90
5.1.3.2 Etude de l'effet des solvants réactionnels sur l'activité catalytique de CALB .....	91
5.1.3.3 Analyses structurales et mécanisme d'acylation catalysée par CALB .....	91
5.1.3.4 Etude de la sélectivité de CALB pour la O- ou N-acylation .....	92
5.1.3.5 Etude du positionnement de la chaîne grasse du donneur d'acyle dans le site actif de CALB .....	95
5.1.3.6 Etude de la régio-sélectivité de CALB .....	97
<b>Matériel et méthodes .....</b>	<b>101</b>
<b>1 Partie expérimentale .....</b>	<b>102</b>
1.1 Production de protéines de type aminoacylases.....	102
1.1.1 Souches microbiennes utilisées .....	102
1.1.2 Milieux de culture : .....	102
1.1.3 Conditions de cultures pour la production de protéines de type aminoacylases.....	103
1.1.4 Conservation des souches : .....	104
1.2 Traitement des surnageants de culture .....	104
1.2.1 Purification partielle de protéines.....	104
1.2.1.1 Lyse des cellules .....	104
1.2.1.2 Précipitation des protéines .....	105
1.2.1.3 Dialyse .....	105
1.2.2 Concentration des protéines .....	106
1.2.3 Séparation des protéines .....	106
1.3 Obtention des mutants de <i>S. ambofaciens</i> .....	107
1.3.1 Construction de mutants : .....	107
1.3.2 Cultures pour l'obtention de mutants .....	108
1.3.3 Manipulation ADN.....	109
1.3.4 Délétion en phase de gènes codant pour des acylases chez <i>S. ambofaciens</i> .....	109
1.4 Expression hétérologue.....	110
1.4.1 Souches bactériennes utilisées.....	110
1.4.2 Milieux de culture utilisés .....	111
1.4.3 Transfert du gène <i>samL1383</i> chez <i>P.pastoris</i> .....	112
1.4.3.1 Optimisation du gène <i>samL1383</i> et construction du vecteur plasmidique .....	112
1.4.3.2 Amplification de pPICZ $\alpha$ A- <i>samL1383</i> .....	113
1.4.3.3 Extraction, linéarisation et concentration du plasmide pPICZ $\alpha$ A- <i>samL1383</i> .....	113
1.4.3.4 Transformation de <i>P. pastoris</i> X33 .....	115
1.4.3.5 Sélection des cellules de <i>P. pastoris</i> de phénotype Mut <sup>+</sup> .....	116
1.4.3.6 PCR sur colonie.....	116
1.4.3.7 Electrophorèse.....	117
1.4.4 Expression hétérologue de l'acylase chez <i>P. pastoris</i> .....	118
1.4.4.1 Conditions de culture.....	118

---

1.5 Mise en oeuvre des réactions enzymatiques.....	119
1.5.1 Réactifs utilisés .....	119
1.5.2 Réactions enzymatiques en milieux organiques et aqueux.....	119
1.5.2.1 Procédure expérimentale de synthèse :.....	120
1.5.2.2 Procédure expérimentale d'hydrolyse :.....	120
1.6 Méthodes analytiques .....	121
1.6.1 Mesure de la concentration protéique.....	121
1.6.2 Estimation des poids moléculaires des protéines.....	122
1.6.3 Analyse des produits de réactions enzymatiques.....	124
1.6.3.1 Chromatographie sur couche mince (CCM) .....	124
1.6.3.2 Chromatographie liquide haute performance .....	124
1.6.3.3 Spectrométrie de masse .....	125
1.6.4 Détermination de l'activité spécifique des aminoacylases.....	126
<b>2 Modélisation moléculaire .....</b>	<b>127</b>
2.1 Ressources informatiques .....	127
2.1.1 Ordinateurs.....	127
2.1.2 Logiciels de modélisation moléculaire.....	127
2.2 Préparation des structures .....	128
2.2.1 Structure de CALB.....	128
2.2.2 Structure des ligands .....	129
2.2.3 Construction de la structure « acyl-enzyme ».....	129
2.3 Simulations de dynamique moléculaire .....	129
2.3.1 Paramètres des simulations .....	129
2.3.1.1 La température .....	129
2.3.1.2 Le pas d'intégration .....	130
2.3.1.3 L'algorithme SHAKE .....	130
2.3.1.4 Les ensembles thermodynamiques .....	131
2.3.1.5 Distance de troncation et méthode « Particule Mesh Ewald ».....	131
2.3.2 Conditions périodiques frontières.....	132
2.3.3 Conditions des simulations de dynamique moléculaire .....	133
2.3.4 Protocole des simulations de dynamique moléculaire .....	134
2.3.4.1 Minimisation des systèmes .....	135
2.3.4.2 Equilibration des systèmes .....	135
2.3.4.3 Production des trajectoires de dynamique moléculaire.....	136
2.3.4.4 Analyses des résultats .....	136
2.4 Docking et scoring .....	138
2.4.1 Considérations générales .....	138
2.4.2 Simulation de docking.....	138
2.4.2.1 Définition du site actif.....	139

---

2.4.2.2 Site actif de CALB.....	140
2.4.3 Génération des complexes peptides-CALB .....	140
2.4.4 Scoring .....	143
2.4.4.1 Docking des peptides .....	143
2.4.5 Identification des complexes productifs .....	144
<b>Chapitre 1 : Identification des règles de régio- et de chimio-sélectivité pour l'acylation de peptides catalysée par CALB en solvant organique.....</b>	<b>147</b>
<b>1 Introduction .....</b>	<b>148</b>
<b>2 Molecular rules for chemo- and regio-selectivity of <i>Candida antarctica</i> lipase B in peptide acylation reactions .....</b>	<b>149</b>
2.1 Abstract.....	150
2.2 Introduction.....	150
2.3 Materials and methods .....	153
2.3.1 Enzymatic reactions.....	153
2.3.1.1 Syntheses.....	153
2.3.1.2 Analyses of reaction media.....	153
2.3.2 Molecular modeling simulations .....	154
2.3.2.1 Computational resources .....	154
2.3.2.2 Acyl-enzyme construction .....	155
2.3.2.3 Molecular dynamics simulations .....	157
2.3.2.4 Peptide docking and scoring.....	159
2.4 Results and discussion.....	160
2.4.1 Theoretical study of CALB selectivity toward KS acylation:.....	160
2.4.1.1 Acyl-enzyme building .....	161
2.4.1.2 Analyses of molecular dynamics trajectories:.....	163
2.4.1.3 KS docking: .....	165
2.4.2 Influence of the peptidic sequence on CALB selectivity:.....	167
2.4.2.1 Theoretical study of KYX and SYK acylation:.....	168
2.4.2.2 Experimental validation of KYS and SYK acylation: .....	170
2.4.3 Study of CALB selectivity towards a sterically hindered peptide .....	172
2.4.3.1 Theoretical study of LQKW acylation: .....	172
2.4.3.2 Experimental validation of LQKW acylation: .....	173
2.5 Conclusion .....	174
2.6 Acknowledgements .....	174
2.7 Complementary data .....	174
2.8 References .....	178
<b>3 Contribution de l'article .....</b>	<b>180</b>
<b>4 Résultats complémentaires .....</b>	<b>182</b>

4.1 Identification de la localisation de l'acylation minoritaire de SYK par CALB avec de l'acide oléique : .....	182
4.2 Etude de la chimio-sélectivité de CALB pour l'acylation du 6-amino-1-hexanol. ....	186
4.2.1 Etude par modélisation moléculaire de la chimio-sélectivité de CALB pour l'acylation du 6-amino-1-hexanol.....	187
4.2.2 Etude par modélisation moléculaire de l'acylation du O-oléoyl-6-amino-1-hexanol catalysée par CALB.....	188
<b>5 Conclusion.....</b>	<b>191</b>
<b>Chapitre 2 : Recherche de nouvelles protéines de type aminoacylases produites par <i>Streptomyces</i>.....</b>	<b>195</b>
<b>1 Recherche d'enzymes capables de catalyser l'acylation de peptides en milieu aqueux. ....</b>	<b>196</b>
1.1 Etude de l'activité hydrolytique des surnageants de culture de <i>S. ambofaciens</i> et de <i>S. pristinaespiralis</i> .....	196
1.2 Etude de l'activité de synthèse d'acyl-lysine par des surnageants de culture de <i>S. ambofaciens</i> et de <i>S. pristinaespiralis</i> . ....	198
1.3 Conditions de cultures de <i>S. ambofaciens</i> .....	200
1.3.1 Sélection d'un milieu de culture pour la production de protéines de type aminoacylase par <i>S. ambofaciens</i> .....	201
1.3.2 Recherche du temps optimal de culture de <i>S. ambofaciens</i> pour la production de protéines ayant une activité aminoacylase. ....	203
1.4 Étude de la purification partielle des enzymes de type aminoacylases de <i>S. ambofaciens</i> . ....	204
1.4.1 Etude de l'étape de dialyse : choix du tampon.....	205
1.4.2 Identification du couple pH/température optimal.....	205
1.5 Etude de la capacité de synthèse de peptides acylés des protéines issues de surnageants de culture de <i>S. ambofaciens</i> : .....	207
1.5.1 Acylation de Lys-Ser : .....	207
1.5.2 Acylation de Lys-Tyr-Ser, Ser-Tyr-Lys et Leu-Gln-Lys-Trp par les protéines issues du surnageant de culture de <i>S. ambofaciens</i> ATCC 23877 .....	210
1.5.2.1 Peptides Lys-Tyr-Ser et Ser-Tyr-Lys.....	210
1.5.2.2 Peptide Leu-Gln-Lys-Trp : .....	214
1.6 Comparaison des spécificités d'acylation des protéines de <i>S. ambofaciens</i> ATCC 23877 et de CALB.....	216
<b>2 Conclusion.....</b>	<b>218</b>

<b>Chapitre 3 : Identification des gènes responsables de l'activité aminoacylase du surnageant de culture de <i>Streptomyces ambofaciens</i>.....</b>	<b>221</b>
<b>1 Introduction .....</b>	<b>222</b>
<b>2 Identification of original aminoacylases in <i>S. ambofaciens</i>.....</b>	<b>222</b>
2.1 Abstract .....	223
2.2 Introduction.....	223
2.3 Materials and methods .....	225
2.3.1 Bacterial strains and plasmids .....	225
2.3.2 DNA manipulation .....	227
2.3.3 In-frame deletion of the acylase encoding genes in <i>S. ambofaciens</i> .....	227
2.3.4 Media and culture conditions for aminoacylase production.....	228
2.3.5 Preparation of enzyme solution.....	229
2.3.6 Enzyme assays.....	229
2.3.7 Analysis of the reaction media .....	230
2.4 Results and discussion.....	231
2.4.1 Research for an aminoacylase activity in a crude extract of <i>Streptomyces ambofaciens</i> ATCC23877 .....	231
2.4.2 Partial purification of aminoacylases from <i>S. ambofaciens</i> ATCC23877 .....	236
2.4.3 Analysis of the <i>S. ambofaciens</i> ATCC23877 acylase encoding genes .....	238
2.4.4 Correlation between the putative <i>S. ambofaciens</i> acylases and the observed enzymatic activities .....	243
2.5 Conclusion .....	245
2.6 Acknowledgements .....	246
2.7 References .....	246
<b>3 Contribution de l'article .....</b>	<b>249</b>
<b>4 Résultats complémentaires .....</b>	<b>251</b>
<b>5 Conclusion.....</b>	<b>255</b>
<b>Conclusions et perspectives.....</b>	<b>257</b>
<b>1 Quelles sont les règles de régio- et de chimio-sélectivité pour l'acylation de peptides catalysée par CALB en solvant organique ? Peut-on expliquer et prédire ces propriétés de sélectivité enzymatique par des approches de modélisation moléculaire ? .....</b>	<b>258</b>
<b>2 Des bactéries appartenant au genre <i>Streptomyces</i> peuvent-elles constituer une source de nouvelles protéines de type aminoacylase capables de catalyser l'acylation de peptides en milieux aqueux ?.....</b>	<b>260</b>
<b>3 Quelles sont les protéines responsables de l'activité aminoacylase observée dans le surnageant de culture de <i>Streptomyces ambofaciens</i>, espèce sélectionnée parmi plusieurs <i>Streptomyces</i> ?.....</b>	<b>262</b>

**Références.....267**

## 2 Liste des figures

Figure 1 : Illustration schématique des différentes stratégies utilisées par les peptides pour se lier, s'ancrer, s'enfoncer ou pénétrer les membranes lipidiques. (a) Peptide amphiphile dimérique transmembranaire. (b) Liaison électrostatique. (c) Liaison non-spécifique par de faibles forces physiques. (d) Ancrage via une extension lipidique membranaire. (e) Ancrage par une chaîne acyle attachée au peptide. (f) Peptide amphiphile pénétrant partiellement la bicouche phospholipidique. (Khandelia <i>et al.</i> , 2008).....	36
Figure 2 : Schéma général de la réaction de Shotten-Baumann.....	43
Figure 3 : Schéma général de la réaction d'acylation catalysée par une enzyme. ....	45
Figure 4 : Influence de la nature des solvants sur l'activité enzymatique de CALB (Graber <i>et al.</i> , 2007). ....	54
Figure 5 : Hydrolyse de pénicilline catalysée par les pénicillines acylases. A : Spécificité de substrat des différentes pénicillines acylases. B : Réaction catalysée par les pénicillines acylases (Arroyo <i>et al.</i> , 2003). ....	60
Figure 6 : Réaction catalysée par l'acylase I avec un acide aminé N- $\alpha$ -acylé. R: alkyl, aromatique ou groupe aralkyle. R': méthyle ou groupe chlorométhyle (Anders and Dekant, 1994).....	61
Figure 7 : Réaction catalysée par l'acylase II (Anders and Dekant, 1994).....	63
Figure 8 : Réaction catalysée par l'acyl-lysine désacylase. (Anders and Dekant, 1994) .....	63
Figure 9 : Réaction catalysée par l'acylase III (Anders and Dekant, 1994). ....	64
Figure 10 : Caractéristiques de l' $\epsilon$ -lysine acylase de <i>S. mobaraensis</i> . A : Influence du pH sur l'activité hydrolytique du N- $\epsilon$ -acétyl-L-lysine à 37°C. B : Stabilité de l'enzyme après une incubation pendant une heure à différents pH à 37°C. C : Stabilité thermique de l'enzyme après une incubation de une heure à différentes températures. D : recherche de température optimale pour une réaction d'hydrolyse de N- $\epsilon$ -acétyl-L-lysine à pH8. (Koreishi <i>et al.</i> , 2005a).....	74



Figure 11 : Structure moléculaire de CALB. En rouge sont représentées les structures secondaires en hélices $\alpha$ , en vert les hélices $\pi$ et en bleu les feuillets $\beta$ (Uppenberg <i>et al.</i> , 1994a).....	78
Figure 12 : Diagramme de la structure secondaire de CALB (Uppenberg <i>et al.</i> , 1994a). .....	79
Figure 13 : Schéma de la poche catalytique du cristal 1LBS de CALB contenant l'inhibiteur compétitif N-ester hexylphosphonate d'éthyle (en rouge). A : Vue de profil. B : Vue de dessus. ....	80
Figure 14 : Mécanisme de catalyse d'acylation de CALB. A : Conformation native de l'enzyme et approche du substrat donneur d'acyle ; B : Formation du 1er intermédiaire tétraédrique ; C : Relargage du coproduit et formation de l'acyl-enzyme ; D : Attaque de l'accepteur d'acyle ; E : Formation du 2nd intermédiaire tétraédrique ; F : Libération du produit acylé et retour à la conformation initiale de l'enzyme. ....	82
Figure 15 : Mécanisme de N-acylation de l'éthanolamine avec de l'acide myristoyl catalysé par une lipase spécifique de la O-acylation : Lipase QL de <i>Alcaligenes</i> sp. (Furutani <i>et al.</i> , 1996). ....	86
Figure 16 : Mécanisme « proton navette » pour la N-acylation d'amino-alcools catalysée par CALB. A : état transitoire « proton navette ». B : intermédiaire tétraédrique (Syren <i>et al.</i> , 2013).....	94
Figure 17 : Structure chimique des flavonoïdes quercitrine (A), isoquercitrine (B) et rutine (C).....	97
Figure 18 : Schéma des conditions structurales de placement des substrats dans la cavité du site actif de CALB à remplir pour aboutir à une acétylation fonctionnelle. Le donneur d'acyle est représenté en rouge et le donneur d'acyle en vert.....	98
Figure 19 : Chromatogramme de désorption de protéines par paliers de NaCl. ....	107
Figure 20 : Carte plasmidique de pPIC $\alpha$ A- <i>sam</i> L1383 .....	113
Figure 21 : Protocole de récupération du plasmide pPICZ $\alpha$ A- <i>sam</i> L1383 .....	114
Figure 22 : Dialyse de la solution plasmidique concentrée.....	114

---

Figure 23 : Représentation graphique du potentiel de Lennard-Jones 6-12.....	131
Figure 24 : Potentiel de van der Waals en présence (trait continu) et en absence (trait discontinu) de la fonction ‘switchdist’. L’application de la fonction ‘switchdist’ réduit progressivement le potentiel à 0 entre la distance ‘switch’ et la distance de troncation (Bhandarkar <i>et al.</i> , 2003).....	132
Figure 25 : Représentation en 2D des conditions périodiques frontières.....	133
Figure 26 : Représentation schématique du protocole des simulations de dynamique moléculaire.....	135
Figure 27 : Représentation schématique de la grille étendue à travers la protéine. A : les points de la grille ‘occupés’ par la protéine sont représentés par des cercles noirs tandis que les points ‘libres’ sont représentés par des cercles bleus. B : les cercles blancs représentent des points de la grille qui ont été effacés et qui laissent apparaître des cercles ombragés identifiés comme des points de cavités (Venkatachalam <i>et al.</i> , 2003).....	139
Figure 28 : Représentation schématique des 4 orientations du ligand dans le site actif du récepteur (Venkatachalam <i>et al.</i> , 2003). .....	141
Figure 29 : Critères de distance pour une réaction d’acylation fonctionnelle catalysée par CALB. ....	145
Figure 30 : Schéma général de la démarche de modélisation mise en oeuvre pour l’étude de la sélectivité de CALB vis-à-vis de différents peptides. ....	149
Figure 31 : Input structures for molecular dynamics simulations. The initial placement of the oleoyl chain is colored in blue and green in OCALB1 and OCALB2 respectively. Lateral view (A). Top view (B). ....	157
Figure 32 : Functional conformation of CALB active site (A). Distances required for the stabilization of the acyl-enzyme by the oxyanion hole residues (B).....	159
Figure 33 : Molecular structures of KS (A), KYS (B), SYK (C), LQKW (D). ....	161
Figure 34 : A: Lateral views of CALB catalytic pocket showing the placement of the oleoyl chain in the conformations CF1 (blue), CF1’ (red) and CF2 (green). B: Lateral view of	

---

the selected docking target after minimization. Carbon atoms of the oleoyl chain are colored in green. Other atoms are colored according to standard color code. Water molecules interacting with hydrophilic residues are shown.....	164
Figure 35 : Lateral view showing peptide binding modes within oleoyl-CALB catalytic pocket. A: KS, B: KYS, C: SYK, D: LQKW, carbon atoms of the oleoyl chain are colored in green, carbon atoms of the lysine side chain are colored in purple. Other atoms are colored according to standard color code. ....	166
Figure 36 : Distance criteria for CALB-catalyzed acylation reactions. ....	167
Figure 37 : Interactions between SYK tyrosine side chain and the hydrophobic alcove of CALB. A and B represent the alcove top views and side view, respectively (sticks and balls representation). Carbon atoms of the alcove are colored in green and carbon atoms of the oleoyl chain are colored in purple. SYK is represented with sticks. The Van der Waals surface of the alcove is shown in C. Atoms are colored according to the standard color code. ....	169
Figure 38 : Mass analyses of N- $\epsilon$ -oleoyl KYS. A: single ion chromatogram (SIC) of acylated product $[M+H]^+$ parent ion ( $m/z=661$ ) . B: MS2 spectrum after fragmentation of the parent ion.....	170
Figure 39 : Mass analyses of N- $\epsilon$ -oleoyl SYK. A: SIC of acylated product $[M+H]^+$ parent ion ( $m/z=661$ ). B: MS2 spectrum after fragmentation of the parent ion.....	171
Figure 40 : Mass analyses of N- $\epsilon$ -oleoyl LQKW. A: SIC of acylated product $[M+H]^+$ parent ion ( $m/z=839$ ). B: MS2 spectrum after fragmentation of the parent ion.....	173
Complementary data figure 41 : VMD Timeline graphics of molecular dynamic trajectories of OCALB1 (A) and OCALB2 (B) (Pink: $\alpha$ -helix, blue: 3-10 helix, yellow: $\beta$ -sheet, green: turn, red: $\pi$ -helix, white: undetermined).....	175
Complementary data figure 42 : RMSD heat map of molecular dynamic trajectories of OCLAB1 (A) and OCALB2 (B). (White arrows point acyl-enzyme stable conformations) .....	176

---

Complementary data figure 43 : Position of the serine-bound carbonyl group with the oxyanion hole residue of OCALB1 (A) and OCALB2 (B). .....	177
Figure 44 : Structure moléculaire du peptide SYK avec entourés en rouge, les deux sites d'acylation potentiels de la sérine.....	183
Figure 45 : Chromatogramme et spectres MS <sup>2</sup> de standards de Ser-N/O-oléoyl-Tyr-Lys. A: Chromatogramme d'un échantillon comprenant le standard Ser-O-oléoyl-Tyr-Lys (A, 1) et le standard Ser-O-oléoyl-Tyr-Lys (A, 2). B : Profil MS2 du standard Ser-O-oléoyl-Tyr-Lys. C : Profil MS2 du standard Ser-N-oléoyl-Tyr-Lys. D : Spectre MS <sup>2</sup> du composé minoritaire oléoyl-Ser-Tyr-Lys obtenu expérimentalement avec CALB. ....	184
Figure 46 : Représentation en bâtonnets du 6-amino-1-hexanol.....	186
Figure 47 : Vue latérale du site actif montrant le positionnement du 6-amino-1-hexanol dans la cavité catalytique de l'acyl-enzyme. Les atomes de carbone de la chaîne oléoyl sont colorés en vert, les atomes de carbone des résidus catalytiques du site actif sont en jaune. Les autres atomes sont colorés selon le code couleur standard.....	188
Figure 48 : Vue latérale du site actif montrant le positionnement du O-oléoyl-6-amino-1-hexanol dans la cavité catalytique de l'acyl-enzyme. Les atomes de carbone de la chaîne oléoyl sont colorés en vert, les atomes de carbone des résidus du site actif sont en jaune. Les autres atomes sont colorés selon le code couleur standard.....	189
Figure 49 : Vue frontale du site actif montrant le positionnement du O-oléoyl-6-amino-1-hexanol dans la cavité catalytique de l'acyl-enzyme. Les atomes de carbone de la chaîne oléoyl sont colorés en vert, les atomes de carbone des résidus du site actif sont en jaune. Les autres atomes sont colorés selon le code couleur standard. Les surfaces bleues représentent les résidus hydrophiles et les surfaces marron les résidus hydrophobes. ..	190
Figure 50 : Réaction d'hydrolyse de N- $\alpha/\epsilon$ -acétyl-L-lysine.....	197
Figure 51 : Hydrolyse de N- $\alpha/\epsilon$ -acétyl-L-lysine par les protéines issues des surnageants de culture de <i>S. ambofaciens</i> (A) et de <i>S. pristinaespiralis</i> (B) après 24 h de réaction à 37°C. ....	197

Figure 52 : Synthèse de N-oléoyl-L-lysine par les protéines issues du surnageant de culture de <i>S. ambofaciens</i> et <i>S. pristinaespiralis</i> après 96 h de réaction à 45°C. ....	199
Figure 53 : Analyse par spectrométrie de masse du milieu réactionnel en présence de lysine, d'acide oléique et des protéines issues du surnageant de culture de <i>S. ambofaciens</i> (45°C pendant 72 h).....	200
Figure 54 : Activité spécifique d'hydrolyse de N- $\alpha/\epsilon$ -acétyl-L-lysine du surnageant de culture de <i>S. ambofaciens</i> au cours du temps.....	203
Figure 55 : Identification du couple pH/température d'hydrolyse optimal des molécules N- $\alpha/\epsilon$ -acétyl-L-lysine pour le surnageant de culture de <i>S. ambofaciens</i> . A : détermination du pH optimal ; B : détermination de la température optimale.....	206
Figure 56 : Chromatogramme et spectre MS <sup>2</sup> après fragmentation d'oléoyl-Lys-Ser produit par les protéines issues du surnageant de culture de <i>S. ambofaciens</i> ATCC 23877. 1 : Oléoyl-Lys-Ser acylé sur la sérine, 2 : Oléoyl-Lys-Ser acylé sur la lysine. ....	208
Figure 57 : (A) Chromatogramme et spectre MS <sup>2</sup> après fragmentation d'oléoyl-Lys-Ser produit par CALB. (B) Spectre MS <sup>2</sup> issu de la fragmentation d'oléoyl-Lys-Ser acylé sur la lysine produit par les protéines issues du surnageant de culture de <i>S. ambofaciens</i> ATCC 23877. ....	209
Figure 58 : Chromatogramme et spectres MS <sup>2</sup> après fragmentation d'oléoyl-Lys-Tyr-Ser produit par les protéines issues du surnageant de culture de <i>S. ambofaciens</i> ATCC 23877. 1 : Spectre de masse des ions fils issus de la fragmentation du pic détecté à 4,45 min correspondant à de l'oléoyl-Lys-Tyr-Ser acylé sur la sérine, 2 : Spectre de masse des ions fils issus de la fragmentation du pic détecté à 4,45 min correspondant à de l'oléoyl-Lys-Tyr-Ser acylé sur la lysine. ....	211
Figure 59 : Chromatogramme et spectre MS <sup>2</sup> après fragmentation d'oléoyl-Ser-Tyr-Lys produit par les protéines issues du surnageant de culture de <i>S. ambofaciens</i> ATCC 23877.....	212
Figure 60 : Chromatogramme et spectres MS <sup>2</sup> de standards de Ser-N/O-oléoyl-Tyr-Lys. A: Chromatogramme d'un échantillon comprenant le standard Ser-O-oléoyl-Tyr-Lys (A, 1) et le standard Ser-O-oléoyl-Tyr-Lys (A, 2). B : Profil MS <sup>2</sup> du standard Ser-O-oléoyl-	

---

Tyr-Lys. C : Profil MS2 du standard Ser-N-oléoyl-Tyr-Lys. D : Spectre MS <sup>2</sup> du composé oléoyl-Ser-Tyr-Lys obtenu expérimentalement avec l'extrait protéique issu du surnageant de culture de <i>S. ambofaciens</i> (C). .....	213
Figure 61 : Chromatogramme et spectre MS <sup>2</sup> après fragmentation d'oléoyl-Leu-Gln-Lys-Trp catalysée par les protéines issues du surnageant de culture de <i>S. ambofaciens</i> ATCC 23877. ....	215
Figure 62 : Mass analysis of oleoyl-lysine synthesized using crude extract of <i>S. ambofaciens</i> (A and A2) and CALB (B1 and B2). A1: single ion chromatogram of acylated product [M+H] <sup>+</sup> parent ion (m/z=410); A2: and MS2 spectrum after fragmentation of ion parent synthesized; B1: single ion chromatogram of acylated product [M+H] <sup>+</sup> parent ion (m/z=410); B2: MS2 spectrum after fragmentation of ion parent synthesized. ....	234
Figure 63 : Mass analysis of oleoyl-SYK. A: single ion chromatogram of enzymatic acylated product [M+H] <sup>+</sup> parent ion (m/z=661); B: MS2 spectrum after fragmentation of ion parent; C: MS2 spectrum after fragmentation of a standard of N- $\alpha$ -oleoyl-SYK. ....	235
Figure 64 : Separation of the hydrolytic activities of <i>S. ambofaciens</i> crude extract. A: chromatogram corresponding to protein fractions separated by anionic exchange low pressure chromatography with NaCl gradient; B: Hydrolytic activity of each fraction toward N- $\alpha$ / $\epsilon$ -acetyl-L-lysine. ....	237
Figure 65 : Sequence alignments between <i>S. ambofaciens</i> and <i>S. mobaraensis</i> proteins. A: Sam-AA and Sm-AA; B: SamL1383 and Sm-eLA; C: SamL0890 and Sm-PVA. ....	242
Figure 66 : Séquence <i>samL1383</i> optimisée pour une expression hétérologue chez <i>P. pastoris</i> fournies par GeneArt. Les sites de restrictions ajoutés sont surlignés en jaune et soulignés en rouge. ....	252
Figure 67 : Electrophorèse des produits de PCR des clones 2, 8 et 9 avec les amorces spécifiques de <i>samL1383</i> .....	253
Figure 68 : Variation du pourcentage d'oxygène dissous ainsi que de la DO <sub>600</sub> au cours du temps lors de la culture du clone 8 de <i>P. pastoris</i> transformée dans le milieu BMGY en bioréacteur instrumenté. ....	254

Figure 69 : Hydrolyse de N- $\alpha/\epsilon$ -acétyl-L-lysine par l'extrait protéique issu du surnageant de culture du clone 8 de *P. pastoris* modifié pour la production de SamL1383 après 24 h de réaction à 37°C..... 254

### 3 Liste des tableaux

Tableau 1 : Quelques exemples de peptides présentant une activité biologique intéressante.....	34
Tableau 2 : Organites intracellulaires cibles de peptides antimicrobiens (Teixeira <i>et al.</i> , 2012). .....	37
Tableau 3 : Peptides bioactifs acylés (Zhang and Bulaj, 2012). .....	42
Tableau 4 : Exemple de réactions d'acylation catalysées en milieux non-conventionnels autres que les solvants organiques. ....	50
Tableau 5 : Influence de la variation de paramètres réactionnels sur le rendement de réaction d'acylation de lysine avec l'acide palmitique et acide oléique catalysée par Lipozyme. [S] : concentration en donneur d'acyle, T : température, Log(P) : constante caractérisant l'hydrophobicité du solvant réactionnel, [E] : concentration de l'enzyme (Soo <i>et al.</i> , 2004).....	55
Tableau 6 : Liste d'aminacylases, leur organisme source et leur taille.....	58
Tableau 7 : Classification des aminacylases. ....	59
Tableau 8 : Spécificité de substrat de Sm-AA pour différentes méthionine N-acylées (Koreishi <i>et al.</i> , 2009a).....	66
Tableau 9 : Spécificité de substrat de l'activité hydrolytique de l'aminacylase de <i>S.</i> <i>mobaraensis</i> (Koreishi <i>et al.</i> , 2005b). ....	67
Tableau 10 : Rendement de synthèse de L-lysine acylée avec différents dérivés d'acide férulique (Koreishi <i>et al.</i> , 2005b). ....	68
Tableau 11 : Taux de conversion de la lysine en N-acyl-lysine avec Sm-eLA selon la nature du donneur d'acyle (Koreishi <i>et al.</i> , 2005a).....	69
Tableau 12 : Rendement de synthèse de L-acides aminés et de dipeptides N-lauroylés par la pénicilline V acylase de <i>S. mobaraensis</i> (Koreishi <i>et al.</i> , 2006, 2007).....	70
Tableau 13 : Caractéristiques des différentes acylases produites par <i>S. mobaraensis</i> . ....	71
Tableau 14 : Acylases métallo-enzymes et leurs ions associés.....	75
Tableau 15 : Effet des ions métalliques sur l'activité de <i>PhoACY</i> (Nishioka <i>et al.</i> , 2008). ....	76



---

Tableau 16 : Constante catalytique de CALB pour la O- ou la N-acylation de substrats polyfonctionnels dans différents milieux réactionnels (Le Joubioux <i>et al.</i> , 2013a). .....	84
Tableau 17 : Activités spécifiques de CALB pour de la N- ou O-acylation dans du M <sub>2</sub> B <sub>2</sub> à 55°C avec de l'acide myristique comme donneur d'acyle (Syren <i>et al.</i> , 2013). .....	85
Tableau 18 : Activités spécifiques d'acylation de CALB pour des substrats polyfonctionnels (Le Joubioux <i>et al.</i> , 2013b). .....	87
Tableau 19 : Quelques exemples d'acylations chimio- et régio-sélectives de molécules polyfonctionnelles catalysées par CALB. DA : donneur d'acyle, AA : accepteur d'acyle. ....	89
Tableau 20 : Exemple d'étude de modélisation moléculaire avec CALB. ....	90
Tableau 21 : Energies et abondances relatives des conformères d'alaninol et de 4-amino-1-pentanol formant une liaison hydrogène intramoléculaire (Syren <i>et al.</i> , 2013). ....	93
Tableau 22 : Représentation schématique du site actif de CALB. A : Orientation des vues en coupe par rapport aux feuilletts $\beta$ de l'enzyme (représentés en bleu). B : Les zones en gris foncé sont identifiées par la sonde METYL et les zones en gris clair sont identifiées par la sonde DRY (Pleiss <i>et al.</i> , 1998). ....	96
Tableau 23 : Milieux de culture utilisés pour la production de protéines de type aminoacylase. ....	103
Tableau 24 : Liste des souches, plasmides et BACs utilisés .....	108
Tableau 25 : Amorces utilisées dans ces travaux .....	110
Tableau 26 : Milieux de cultures utilisés pour la production de protéines par voie hétérologue. ....	111
Tableau 27 : Amorces utilisées pour la détection du gène <i>samL1383</i> . ....	116
Tableau 28 : Composition du mélange réactionnel de PCR. ....	117
Tableau 29 : Protocole de PCR. ....	117
Tableau 30 : Descriptif des réactifs utilisés pour les réactions enzymatiques. ....	119
Tableau 31 : Composition des tampons utilisés pour la recherche de pH optimal d'hydrolyse. ....	121
Tableau 32 : Composition du réactif de Bradford. ....	122

Tableau 33 : Gels, tampons et solutions utilisées pour les SDS-PAGE.....	123
Tableau 34 : Paramètres appliqués pour la spectrométrie de masse. ....	126
Tableau 35 : Paramètres utilisés lors des simulations de docking. ....	144
Table 36: Interatomic distances between catalytic residues and between the oxyanion holes residues and the serine-bound carbonyl in the conformations CF1, CF1' and CF2 after a 6000 steps Conjugate Gradient minimization. ....	165
Tableau 37 : Milieux testés pour la culture de <i>S. ambofaciens</i> . ....	201
Tableau 38 : Comparaison de la teneur en protéines et de l'activité spécifique d'hydrolyse du surnageant de différentes cultures de <i>S. ambofaciens</i> . ....	202
Tableau 39 : Comparaison d'activités spécifiques d'hydrolyse de N- $\alpha/\epsilon$ -acétyl-L-lysine entre le surnageant de culture <i>S. ambofaciens</i> à 7 jours de culture et un lysat de <i>S. ambofaciens</i> à partir de cellules obtenues à 7 jours de culture.....	204
Tableau 40 : Molécules et masses molaires moléculaires correspondant aux ions fils caractéristiques d'une N-acylation du peptide Lys-Ser sur la lysine.....	210
Tableau 41 : Récapitulatif de la sélectivité d'acylation de peptides par CALB et les protéines produites par <i>S. ambofaciens</i> ATCC 23877. ....	217
Table 42 : List of strains, plasmids and BACs used in this work. ....	226
Table 43 : Oligonucleotide primers used in this work. ....	228
Table 44 : Hydrolysis of N- $\epsilon$ -acetyl-L-lysine in selected fractions resulting from the separation of the proteins of the crude extracts of <i>S. ambofaciens</i> wild type strain and mutants. ....	243
Table 45 : Hydrolysis of N- $\alpha$ -acetyl-L-lysine in selected fractions resulting from the separation of the proteins of the crude extracts of <i>S. ambofaciens</i> wild type strain and mutants. ....	244
Table 46 : Hydrolysis of N- $\alpha$ - or N- $\epsilon$ -acetyl-L-lysine by the crude extracts of <i>S. ambofaciens</i> wild-type strain and $\Delta$ SamL1383 $\Delta$ Sam-AA mutant. ....	245

#### 4 Liste des sigles et abréviations

CALB	<i>Candida antarctica</i> Lipase B
PCR	Polymerase chain reaction
M <sub>2</sub> B <sub>2</sub>	2-méthyl-2-butanol
CCM	Chromatographie sur couche cince
HPLC	High performance liquid chromatography
MS	Mass spectrometry
MS <sup>2</sup>	Fragmentation mass spectrometrie
RMN	Résonance magnétique nucléaire
[Bmim] <sup>+</sup>	1-Butyl-3-méthylimidazolium
[PF <sub>6</sub> ] <sup>-</sup>	Hexafluorophosphate
HEE	Ethyl-hexyl-phosphonate
PDB	Protein data bank
RMSD	Root mean square deviation
a <sub>w</sub>	Activité de l'eau
TEA	Triéthylamine
TFA	acide trifluoroacétique
Sm-AA	<i>Streptomyces mobaraensis</i> aminoacylase
Sm-eLA	<i>Streptomyces mobaraensis</i> ε-lysine acylase
Sm-PVA	<i>Streptomyces mobaraensis</i> penicillin V acylase
G, Gly	Glycine
S, Ser	Sérine
T, Thr	Thréonine
N, Asn	Asparagine
Q, Gln	Glutamine
E, Glu	Acide glutamique
D, Asp	Acide aspartique
K, Lys	Lysine
R, Arg	Arginine
H, His	Histidine
M, Met	Méthionine

C, Cys	Cystéine
W, Trp	Tryptophane
F, Phe	Phénylalanine
Y, Tyr	Tyrosine
A, Ala	Alanine
V, Val	Valine
L, Leu	Leucine
I, Ile	Isoleucine
P, Pro	Proline

## **INTRODUCTION GENERALE**

---

Les peptides sont utilisés depuis de nombreuses années pour leurs propriétés biologiques. Le premier peptide bioactif a été découvert il y a plus de 80 ans, par Bauring et Macleod qui obtinrent le prix Nobel de médecine en 1923 pour la découverte de l'insuline. Les peptides ont cependant une durée d'action limitée en raison de leur temps de demi-vie court et leur caractère hydrophile limite leur transfert à travers les membranes biologiques. Pour pallier ces problèmes, il est possible de modifier des parties N- et C- terminales des peptides, par exemple en y fixant un acide gras. La fixation de cette chaîne carbonée protège les peptides de leur dégradation occasionnée par des endo- et exo-peptidases et permet d'augmenter leur lipophilie, ce qui facilite le franchissement de la membrane cellulaire. Aujourd'hui les peptides acylés sont obtenus par voie chimique. Il existe cependant une alternative qui consiste à utiliser des catalyseurs naturels tels que les enzymes.

Actuellement, les lipases telles que la lipase B de *Candida antarctica* (CALB) constituent les principales enzymes utilisées en milieu organique pauvre en eau pour le greffage covalent de groupements acyles sur des substrats de type alcool, amine, alcools aminés et acides aminés. D'autres classes de biocatalyseurs peuvent également présenter des aptitudes intéressantes comme la catalyse de la réaction d'acylation en milieu aqueux. Parmi ces enzymes on trouve les acylases et les acyl-transférases.

A l'heure actuelle, peu d'études portent sur l'acylation de peptides par voie enzymatique et sur la recherche de nouveaux biocatalyseurs adaptés pour cette réaction. L'objectif de cette thèse est de développer une stratégie d'acylation sélective de peptides par une approche rationnelle en déterminant le tryptique adapté : substrats - milieu réactionnel – enzyme, s'intégrant dans le développement de procédés verts. Il s'agit de caractériser et de maîtriser les processus mis en jeu lors de l'acylation enzymatique de peptides de structures variées.

Dans des travaux antérieurs au sein du Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, il a été montré que CALB pouvait catalyser des réactions de N-acylation comme de O-acylation de molécules polyfonctionnelles, une chimio- et une régio-sélectivité lors de réactions d'acylation de dipeptides ont également été mises en évidence.

Cependant, les potentialités d'acylation de CALB, souvent utilisée en solvant organique apolaire, sont limitées par la faible solubilité des peptides dans ces milieux. Koreishi et al. (2005a, 2005b, 2006, 2009a, 2009b) ont mis en évidence la présence d'aminoacylases, produites par *Streptomyces mobaraensis*, capables de catalyser l'acylation d'acides aminés avec différents acides gras en milieux aqueux. Il serait donc intéressant de savoir si de

---

nouvelles acylases sont produites chez d'autres espèces de *Streptomyces*, et si ces enzymes sont capables de catalyser l'acylation de peptides, auquel cas il sera nécessaire d'identifier les gènes responsables de leur synthèse afin d'envisager leur production puis de les caractériser.

Ce travail a donc eu pour objectif de répondre à plusieurs questionnements scientifiques :

- Quelles sont les règles de régio- et de chimio-sélectivité pour l'acylation de peptides catalysée par CALB en solvant organique ? Peut-on expliquer et prédire ces propriétés de sélectivité enzymatique par des approches de modélisation moléculaire ?
- Des bactéries appartenant au genre *Streptomyces* peuvent-elles constituer une source de nouvelles protéines de type aminoacylase capables de catalyser l'acylation de peptides en milieux aqueux ?
- Quelles sont les protéines responsables de l'activité aminoacylase observée dans le surnageant de culture de *Streptomyces ambofaciens*, espèce sélectionnée parmi plusieurs *Streptomyces* ?

Dans une première phase, une étude bibliographique permettra de mettre en exergue l'intérêt de l'acylation de peptides, de détailler les acylations enzymatiques catalysées en milieux aqueux et non-aqueux et de décrire les propriétés de sélectivité d'acylation de biomolécules de CALB en solvant organique à l'aide d'études expérimentales complétées par des approches de modélisation moléculaire.

Une deuxième partie fera une description des méthodologies et des protocoles utilisés au cours de ces travaux, que se soit au cours de l'approche expérimentale ou au cours des simulations de modélisation moléculaire.

Les résultats de ce travail seront présentés en trois parties. La première vise à comprendre les mécanismes de la sélectivité réactionnelle de CALB pour l'acylation de peptides : une approche de modélisation combinant docking et dynamique moléculaire aidera à l'identification des interactions enzyme - substrats impliquées dans la sélectivité enzymatique. Des réactions modèles d'acylation par l'acide oléique seront choisies pour cette étude et validées par des acylations enzymatiques expérimentales.

Une deuxième phase concernera la recherche et la caractérisation de nouvelles enzymes capables de catalyser des réactions d'acylation en milieu aqueux, telles que des acylases produites par des bactéries du genre *Streptomyces*. Ces travaux ont pour objectif d'évaluer les capacités d'acylation de ces acylases vis-à-vis de peptides. En particulier, la chimio- et la régio-sélectivité seront étudiées vis-à-vis de différents groupes fonctionnels de di- et tri-peptides.

La dernière partie visera à étudier les nouvelles acylases précédemment identifiées avec une identification des gènes codant pour ces protéines. Une validation de la fonction de ces gènes par une construction de mutants sera également réalisée.



## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

## 1 Les peptides

Les peptides sont des polymères d'acides aminés reliés entre eux par une liaison peptidique. Il existe 20 acides aminés distincts dans la nature. Le nombre de peptides différents formés de dix acides aminés est donc de  $20^{10}$ , soit deux cents mille milliards de possibilités. Un peptide peut être composé de 2 à 500 acides aminés, ce qui augmente le nombre de combinaisons de peptides à une infinité. Les peptides peuvent présenter différentes fonctionnalités ou activités biologiques intéressantes. Les plus connus sont probablement les édulcorants alimentaires tels que aspartame et alitame, mais de nombreux peptides présentent d'autres propriétés (Tableau 1).

**Tableau 1 : Quelques exemples de peptides présentant une activité biologique intéressante.**

Peptide	Activité biologique	Références
Calcitonine, BPP 10c, LQKW	Anti-hypertensive	Deng et al 2005 ; Silva et al 2008 ; Hernandez-Ledesma et al 2011
VEGF (facteur de croissance endothéliale), carnosine	Neuroprotectrice	Verheyen et al 2013 ; Shen 2007
Labyrinthopeptin A1 (LabyA1), carnosine	Antivirale	Féirir et al 2013 ; Fouad et al 2007, 2008
Magainin, peptides isolés de <i>Triticum kiharae</i> ,	Antimicrobienne	Khandelia et al 2008 ; Egorov et al 2005
Dérivés du collagène, carnosine, LQKW	Antioxydant	Togashi et al 2002 ; Babizhayev et al 2006 ; Del Mar Conreras et al 2011

Le mécanisme d'action des peptides n'est connu que pour une petite partie d'entre eux. Généralement, les peptides interagissent avec la membrane cellulaire des cellules cibles, c'est le cas des neuropeptides ou des peptides antimicrobiens. Il convient donc de déterminer quelles interactions ces peptides ont avec ces membranes cellulaires afin d'augmenter leurs activités biologiques (Calvez *et al.*, 2009).

### 1.1 Principaux modes d'action de peptides à activité biologique.

La plupart des peptides bioactifs répertoriés, exceptés les peptides antioxydants, doivent leurs activités à des interactions avec les membranes de leurs cellules cibles. Certains sont associés à des récepteurs membranaires spécifiques, d'autres interagissent simplement grâce à des caractéristiques particulières liées à leur structure ou leur polarité.

### 1.1.1 Peptides associés à des récepteurs membranaires

Les peptides qui se lient à des récepteurs spécifiques ont une activité biologique due à des interactions entre une petite partie de leur surface et leurs récepteurs membranaires (Cardillo *et al.*, 2010). Par exemple, le peptide Arg-Gly-Asp permet d'augmenter la capacité d'adhésion des cellules sur le titane (Ryu *et al.*, 2013). Ce peptide réagit avec les intégrines  $\alpha v \beta 3$  et  $\alpha 5 \beta 1$  (glycoprotéines transmembranaires) principalement par des interactions électrostatiques associant des régions ayant des charges opposées (Marinelli *et al.*, 2005). L'arginine du peptide interagit avec deux aspartates de la sous-unité  $\alpha$  de la protéine transmembranaire et l'aspartate avec le cation métallique de la sous-unité  $\beta$  (Xiong *et al.*, 2002). Toutes les hormones peptidiques sont également des peptides ayant une action biologique liée à un récepteur membranaire spécifique comme l'adrénomédulline et l'amyline qui sont des peptides ayant une activité anti-hypertensive (Deng and Li, 2005).

### 1.1.2 Peptides amphiphiles

Les peptides appartenant à la famille des peptides amphiphiles sont généralement chargés. Ils agissent comme des détergents et perturbent l'intégrité de la membrane plasmique de la cellule, ce qui provoque sa lyse (Khandelia *et al.*, 2008). La magainine par exemple, est un peptide composé de 23 acides aminés (GIGKF LHS AK KFGKA FVGEI MNS) produit par la grenouille africaine *Xenopus laevis*. Ce peptide amphiphile provoque une perturbation des bicouches phospholipidiques, ce qui lui confère des propriétés antibactériennes, antifongiques, antivirales et anti-cancéreuses. Les effets des peptides amphiphiles sur l'organisation lipidique dépendent de plusieurs facteurs : la forme de la molécule, ses interactions électrostatiques et la position du peptide dans la membrane phospholipidique.

### 1.1.3 Peptides à structure particulière

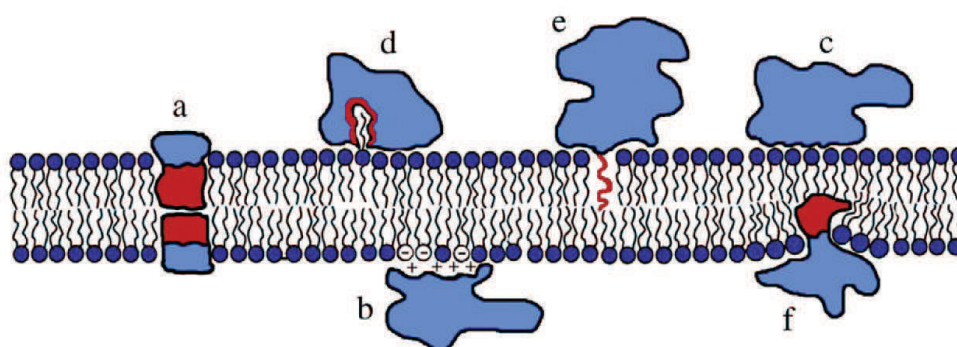
D'autres peptides possèdent une activité biologique liée à leur structure. Les dicynthaurines sont des peptides à structure secondaire en hélice  $\alpha$  ayant une activité antimicrobienne. Ces peptides de 30 acides aminés peuvent former des homo-dimères (Lee *et al.*, 2001). Au contact d'une couche phospholipidique, cette structure hélicoïdale vient se placer à l'interface avec

l'axe de l'hélice  $\alpha$  incliné de  $40^\circ$ . Cette inclinaison permet le passage d'ions au travers de la membrane lipidique et induit la dépolarisation de la cellule (Bringezu *et al.*, 2007).

#### 1.1.4 Peptides ayant des interactions physico-chimiques avec les membranes

Enfin, certains peptides comme les peptides antimicrobiens ont une activité qui résulte d'interactions électrostatiques et hydrophobes avec les membranes des bactéries cibles (Zweytick *et al.*, 2006). C'est le cas pour des dérivés de la lactoferricine humaine.

Les différents types d'interactions entre les peptides et les membranes cellulaires sont présentés dans la Figure 1.



**Figure 1 : Illustration schématique des différentes stratégies utilisées par les peptides pour se lier, s'ancrer, s'enfoncer ou pénétrer les membranes lipidiques. (a) Peptide amphiphile dimérique transmembranaire. (b) Liaison électrostatique. (c) Liaison non-spécifique par de faibles forces physiques. (d) Ancrage via une extension lipidique membranaire. (e) Ancrage par une chaîne acyle attachée au peptide. (f) Peptide amphiphile pénétrant partiellement la bicouche phospholipidique. (Khandelia *et al.*, 2008)**

Récemment, plusieurs études ont fait émerger de nouvelles hypothèses quant au mécanisme de destruction cellulaire par des peptides antimicrobiens. Le principe d'action de ces peptides était décrit comme la formation de pores transmembranaires entraînant le relargage d'ions et de métabolites intracellulaires ; mais de plus en plus d'études démontrent que la perméabilisation de la membrane seule ne suffit pas à causer le décès cellulaire. De nouveaux mécanismes complémentaires ou non de la perforation membranaire ont été décrits. Certains peptides antimicrobiens auraient une action ciblée sur des organites cellulaires (Teixeira *et al.*,

2012). Par exemple, PR-39 est un peptide riche en proline et arginine qui inhibe la réplication de gènes de protéines membranaires impliquées dans la formation de septum chez *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. La déficience dans la formation de septum est caractéristique d'une élévation morphologique extrême qui induit la forme filamenteuse (Shi *et al.*, 1996). Plus récemment, Su *et al.*, (2010) ont démontré qu'un hexa-peptide WRWYCR était capable d'inhiber la croissance de *Salmonella typhimurium*. Ce peptide agit sur les mécanismes de réparation d'ADN et notamment sur les enzymes intervenant au niveau des jonctions de Holliday. Ce peptide et son stéréo-isomère induisent des ruptures d'ADN, des anomalies de séparations du chromosome et une élévation en filament des cellules. Une liste non exhaustive de peptides antimicrobiens intervenant sur des organites intracellulaires est donnée dans le Tableau 2.

**Tableau 2 : Organites intracellulaires cibles de peptides antimicrobiens (Teixeira *et al.*, 2012).**

Organites intracellulaires cibles	Peptides antimicrobiens
<i>ADN et division cellulaire</i>	
Liaisons ADN	Buforine II, tachyplesine I, ABP-CM4, polyphemusine, pleurocidine, magainine 2
Enzyme de réparation d'ADN	L'hexapeptide WRWYCR
Inhibition de formation d'acide nucléique	Dermaseptine, HNP -1 et -2, PR-39, indolicidine, certains tanins de plantes
Formation de septum	PR-39, PR-26, indolicidine and microcine 25
<i>Activité enzymatique et synthèse de protéines</i>	
Ribonucléotide réductase	Purothionine
Inhibition de la chaperonne DnaK	Pyrrhocoricine, Bac7
Inhibition de la synthèse de protéines	Pleurocidine, dermaseptine, HNP -1 et -2, PR-39, indolicidin, certains tanins de plantes
<i>Membrane cellulaire</i>	
Précurseur de membrane cellulaire lipide II	Nisine Z, plectasine, mesarcidine
Activité de liaison de la chitine	Tachycitine, penaeidines
<i>Organites eucaryotes</i>	
Mitochondries	Histatin-5, hLF(1-11), ABP-CM4, BMAP-28
Mécanisme d'apoptose	Neuropeptide cationique à hélice $\alpha$

Les peptides sont cependant des molécules à activité limitée. Ils sont facilement hydrolysés par des protéases ou des peptidases présentes dans le sérum d'organismes supérieurs et sont rapidement dégradés *in vivo*. Leur polarité limite également leurs interactions avec les membranes cellulaires (Khandelia *et al.*, 2008; Segura-Campos *et al.*, 2011). Ainsi, la carnosine injectée ou ingérée, par exemple, n'est pas assimilée par les tissus du corps humain et est rejetée dans les urines ou détruite par des protéases présentes dans le plasma sanguin, le foie ou les reins (Babizhayev *et al.*, 1996; Jackson *et al.*, 1991). De même, l'utilisation de Arg-Gly-Asp est limitée par une faible résistance aux enzymes protéolytiques et par son instabilité métabolique (Kubota *et al.*, 2006). Le peptide Glycine-Histidine-Lysine (GHK) possède différentes activités biologiques, principalement liées aux traitements de la peau ou du cuir chevelu. Son utilisation permettrait une reconstruction de la peau plus rapide après

une blessure et accélérerait la croissance d'implants capillaires. Il possède également des propriétés anti-inflammatoires (Zhai *et al.*, 1999). Ces activités biologiques pourraient être intéressantes pour des industries médicales mais la petite taille de GHK et sa conformation en « L » le rendent instable en milieu biologique. L'utilisation de GHK au sein de matrice grasse (crème) n'est pas envisageable du fait de sa forte hydrophilie qui rend instable les émulsions.

Pour pallier ces problèmes, plusieurs solutions sont possibles : la glycosylation, la lipidation, la cyclisation, ou encore la modification de la chaîne des carbones  $\alpha$  des peptides par la substitution de certains acides aminés par des D-acides aminés ou des acides aminés non-naturels (Renukuntla *et al.*, 2013; Segura-Campos *et al.*, 2011; Zhang and Bulaj, 2012). Une autre solution, lorsque le mécanisme d'action est bien connu, consiste à remplacer le peptide par des molécules de synthèse non-peptidiques. Le peptide Arg-Gly-Asp par exemple, où les motifs de la chaîne latérale de Arg et la fonction carboxylique de Asp ont été identifiés comme étant à l'origine de l'activité antiplaquettaire du peptide est remplacé par une molécule aromatique de synthèse (Kubota *et al.*, 2006). Cette méthode n'est cependant possible que lorsque le mécanisme d'action du peptide est bien connu.

Parmi toutes ces solutions, il a été prouvé que la lipidation était l'une des stratégies parmi les plus efficaces et les plus robustes pour la production de nouveaux peptides thérapeutiques (Zhang and Bulaj, 2012).

## **2 Acylation de peptides**

L'acylation est une réaction au cours de laquelle un groupement acyle est ajouté à une molécule, ce groupement étant transféré depuis un agent acylant. Les liaisons ainsi construites peuvent être de natures différentes : amide, ester, thioester, di-sulfide. Les liaisons amides et esters sont des liaisons covalentes fortes. Tandis que les liaisons thioester ou disulfides sont plus faibles. L'acylation de peptides ou de protéines est une modification post-traductionnelle naturelle. Son rôle reste mal défini mais elle permet d'augmenter leurs interactions avec les membranes cellulaires en changeant leur structure secondaire et/ou leur hydrophobie. La greffe d'un donneur d'acyle sur un peptide peut également moduler son activité biologique.

## 2.1 Augmentation de la lipophilie

La plupart des peptides sont naturellement hydrophiles. Cette caractéristique physico-chimique influe sur l'absorbance, la distribution, l'activité ou l'excrétion de nombreux peptides bioactifs. La greffe d'un acide gras par la réaction d'acylation permet de moduler la polarité des peptides et de les rendre plus hydrophobes. Les lipopeptides sont une famille de peptides possédant une chaîne alkyle de longueur variable qui agit comme une ancre membranaire. Les lipopeptides ont généralement une forte activité tensioactive et des activités biologiques antimicrobiennes, antivirales ou encore hémolytiques (Vollenbroich *et al.*, 1997). La présence d'une chaîne grasse sur un peptide permet d'augmenter sa capacité à pénétrer les membranes biologiques (Calvez *et al.*, 2009). Le peptide BPTI (inhibiteur de la trypsine pancréatique bovine) a une hydrophobie plus marquée et une affinité plus grande avec les membranes cellulaires une fois acylé (Pool and Thompson, 1998). Almiñana *et al.*, (2007) ont développé des dérivés hydrophobes du peptide Glycine-Histidine-Lysine en fixant un acide gras saturé sur l'extrémité N-terminale du peptide. Trois acides gras ont été testés: les acides hexanoïque, décanoïque et myristique. Ces dérivés peptidiques forment des liposomes présentant les tri-peptides à leur surface et semblent très bien s'incorporer à la couche cornée de la peau. L'acylation de Tyr-Leu par l'acide myristique permet, d'une part, d'augmenter sa lipophilie et donc d'améliorer son affinité pour les constituants membranaires, et, d'autre part, d'induire une accumulation dans les tissus cibles de la muqueuse buccale (Veuillez *et al.*, 1999). Le couplage d'un acide gras à un peptide permet donc de faciliter son insertion dans une membrane biologique.

L'association d'un acide aminé ou d'un peptide polaire et d'un composé à longue chaîne non polaire est également utilisée pour construire des structures amphiphiles, permettant l'obtention de molécules ayant une activité de surface élevée (Infante *et al.*, 1997, 2004). Leurs propriétés permettent leur utilisation dans les produits pharmaceutiques, cosmétiques, ménagers et alimentaires. Ils sont dérivés d'acides aminés basiques, neutres ou acides ou d'hydrolysats de protéine. Les méthodes de préparation incluent des procédés chimiques, enzymatiques et chimio-enzymatiques, avec un net avantage pour les procédés chimiques, en raison de leur coût de production relativement faible. Rondel *et al.* (2011), par exemple, ont développé un procédé de synthèse de bio-surfactants à partir d'hydrolysats de protéines de pois. Celles-ci sont hydrolysées par une combinaison d'alcalase et de Flavourzyme® (exopeptidases), afin d'obtenir des peptides composés en moyenne de 3 à 5 acides aminés. La N-acylation de ces peptides est ensuite effectuée en milieu aqueux, en présence de chlorure

d'acides gras (C12 et C16). Ce procédé permet l'obtention de lipopeptides ayant des activités de surface performantes évitant l'utilisation de molécules issues de la pétrochimie.

## 2.2 Changement de structure secondaire

L'acylation peptidique avec un acide gras peut également induire des changements de structure secondaire. Lorsque la calcitonine de saumon est acylée, des interactions hydrophobes entre la chaîne grasse et le peptide induisent la formation d'une structure en hélice  $\alpha$  (Cheng and Lim, 2008). Une acylation de la lysine située à la 16<sup>ième</sup> ou 18<sup>ième</sup> position du peptide  $\beta$ -amyloïde humain avec l'acide octanoïque induit la formation d'une structure en feuillet  $\beta$  (Qahwash *et al.*, 2007). La fixation d'une chaîne grasse peut aussi stabiliser le peptide. Le peptide SMOI2-9 (Ac-LTYAWHTSFKAL-NH<sub>2</sub>) présente une conformation aléatoire en solution aqueuse. Une fois acylé, il se stabilise et adopte une conformation en feuillet  $\beta$  (Johannessen *et al.*, 2011). Plus la chaîne grasse est longue (>C<sub>18</sub>) plus l'influence du donneur d'acyle sur la structure secondaire du peptide est grande. Mais plus la chaîne est insaturée et hydrogénée, plus les interactions hydrophobes avec la chaîne peptidique sont faibles, induisant une influence moindre sur la structure peptidique (Zhang and Bulaj, 2012).

## 2.3 Influence de la sélectivité d'acylation sur les propriétés des peptides

Une acylation peut lier le donneur d'acyle à la chaîne principale du peptide ou à la chaîne latérale d'un des résidus. Ce positionnement sur le peptide est un facteur clef à contrôler. En effet, le greffage de la chaîne grasse module l'activité biologique du peptide. Ainsi, l'acylation du groupement amine en position N-terminale du peptide  $\alpha$ -conotoxine-MII avec l'acide 2-amino-D,L-dodécanoïque induit une structuration du peptide en hélice. Une acylation sur un résidu au milieu de la chaîne peptidique empêchera la formation de cette hélice et fera perdre l'activité neuro-protectrice de ce peptide (Blanchfield *et al.*, 2003). L'extrémité C-terminale de l'endomorphine-1 est responsable du maintien de son activité biologique. Une acylation sur ce groupement avec de l'acide laurique ou octanoïque diminue fortement l'affinité de ce peptide pour les récepteurs opioïdes alors qu'une acylation sur la fonction N-terminale n'affecte pas cette reconnaissance.



Il est admis qu'une acylation préférentielle du groupement amine en position N-terminale permet généralement d'augmenter l'affinité membranaire des peptides (Avrahami and Shai, 2004; Chu-Kung *et al.*, 2004; Majerle *et al.*, 2003; Mak *et al.*, 2003; Malina and Shai, 2005; Zweytick *et al.*, 2006). Cependant, cette remarque n'est pas systématique pour tous les peptides. Ainsi, la di-C<sub>10</sub>-Leu-enképhaline une fois acylée sur le groupement amine en position N-terminale perd en grande partie son affinité pour ses récepteurs membranaires spécifiques (Koda *et al.*, 2008). De plus, une acylation sur ce groupement amine fait perdre au peptide une charge positive. Cette charge, en association avec une séquence riche en lysine et arginine permet au peptide d'avoir une forte affinité membranaire surtout avec les membranes des bactéries qui sont chargées négativement (Zweytick *et al.*, 2006).

## 2.4 Influence de la chaîne grasse

La nature de la chaîne grasse peut aussi entraîner une modulation de l'activité biologique. L'agent acylant, par ses propriétés intrinsèques peut améliorer l'activité biologique du peptide auquel il est rattaché. C'est le cas de l'acide docosahexaénoïque (DHA) qui apporte une activité anti-neurodégénérative au peptide auquel il est greffé (Florent *et al.*, 2006). La longueur de la chaîne carbonée peut également modifier l'activité ou la biodisponibilité du peptide acylé. Ainsi, des travaux ont montré que plus la chaîne carbonée est longue :

- plus l'activité antibactérienne des lipopeptides est forte (Findlay *et al.*, 2012).
- plus la protection contre la protéolyse est grande. Pour l'insuline par exemple, plus la chaîne carbonée de l'agent acylant est longue, plus le temps de demi-vie de l'insuline est grand (Asada *et al.*, 1994).
- plus un lipopeptide pénètre facilement une membrane lipidique, qui est un modèle utilisé par Eeman *et al.*, (2006) pour représenter une membrane biologique. Des lipopeptides ayant une chaîne carbonée tronquée présentent, en outre, une perte considérable d'affinité membranaire (Counter *et al.*, 1990).

Cependant, la longueur de la chaîne peut avoir une influence négative sur l'activité ou sur l'affinité de certains peptides pour leurs récepteurs membranaires. Pour le peptide Glycine-Histidine-Lysine, une acylation avec une chaîne carbonée trop grande (acide myristique : C<sub>14</sub>) induit une activité hémolytique forte (Almiñana *et al.*, 2007). L'affinité du peptide RC-160 pour les récepteurs somatostatines diminue d'un facteur 10 par rapport à celle du peptide natif lorsqu'il est acylé avec l'acide butyrique (C<sub>4</sub>) et elle diminue d'un facteur 30 quand ce

dernier est lié à de l'acide stéarique (C18) (Dasgupta *et al.*, 2000). La même observation a été faite pour le peptide Gal-(K)4 et les récepteurs hGalR1 (Zhang *et al.*, 2009a).

## 2.5 Peptides acylés bioactifs

Aujourd'hui, quatre peptides acylés avec un acide gras sont couramment utilisés comme médicaments. Deux sont des antidiabétiques (NN2211, Victoza<sup>®</sup> et (N<sup>ε</sup>,B<sup>29</sup>-tétradécanoyl)-des-(B30)-insuline, Levemir<sup>®</sup>), les deux autres sont des antibiotiques (daptomycine et polymixine B). D'autres peptides acylés sont actuellement au stade d'essai clinique comme le vaccin Lymerix<sup>™</sup> traitant la maladie de Lyme (Zhang and Bulaj, 2012). Quelques peptides acylés reconnus comme bioactifs sont présentés dans le Tableau 3.

**Tableau 3 : Peptides bioactifs acylés (Zhang and Bulaj, 2012).**

Donneur d'acylé		Peptide acylé
Acide gras	Linéaire	Amide Enkephalin; Galanin; GIP; GLP-1; hPP; inhibiteur IGF1R JM; Insuline; NPW; NPY; NT; RC-160; STAT3; Tetragastrine
		Ester Angiotensine II; BBI; Desmopressine; Ghreline; Calcitonine de saumon; THR; Octreotide
Acide aminé gras		Conotoxine SIIIA, Ghreline, Met-Enkephaline, TAN-1511A, Tenecine-1

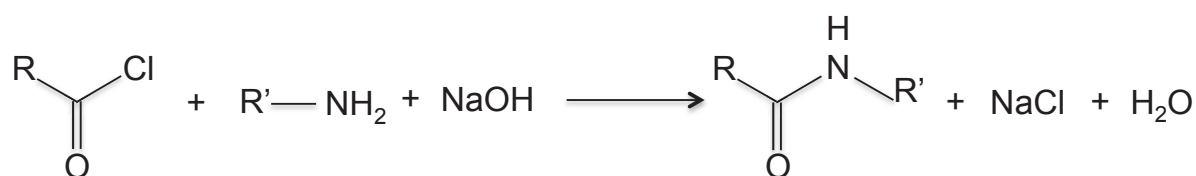
Généralement, les réactions d'acylation d'acides aminés ou de peptides s'effectuent par voie chimique. Elles peuvent cependant être catalysées par des enzymes.

## 2.6 Stratégies d'acylation de peptides

Il existe deux voies principales pour l'acylation de peptides. La première est la voie chimique qui est classiquement utilisée en industrie car bien maîtrisée. L'autre voie consiste à utiliser des enzymes comme catalyseur. Cette voie, actuellement en cours de développement est abordée plus en détail dans la suite de l'étude

### 2.6.1 Acylation peptidique par voie chimique

L'acylation de biomolécules fonctionnelles par voie chimique est aujourd'hui bien connue. Plusieurs brevets ont été déposés pour la synthèse de cétones aromatiques, de polyglycérols partiellement acylés, d'alanines ou de flavonoïdes acylés. (Bourgeois D, FR2877341 (A1) — 2006-05-05, Mouloungui Z, FR2880025 (A1) — 2006-06-30, Lopez J, FR2874010 (A1) — 2006-02-10, Hakkinen S.H, US 20010006978A1) – USA 2001). La synthèse de peptides acylés peut se faire sur support solide comme la synthèse des peptides classiques. Les acides aminés modifiés comme la N-ε-acyl-L-lysine et autres lipo-acides aminés peuvent être synthétisés par voie chimique et directement assemblés sur une résine par la méthode de synthèse peptidique Fmoc (Lee *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009a, 2009b). Cependant, la réaction la plus utilisée pour une acylation peptidique est la réaction de Schotten-Baumann. Cette réaction a été découverte en 1883 par deux chimistes allemands : Carl Schotten et Eugen Baumann. C'est une méthode de synthèse d'amides (ou d'ester) à partir de chlorure d'acyle et d'amine (ou d'alcool). Dans une première étape, un chlorure d'acyle réagit avec un groupement amine (ou ester) libérant un proton. Lors d'une seconde étape, une base vient capter le proton qui pourrait diminuer le rendement réactionnel. Un coproduit chloré est formé au cours de la réaction lors de la libération de ce proton (Figure 2).



**Figure 2 : Schéma général de la réaction de Schotten-Baumann.**

L'intérêt des peptides acylés a été mis en évidence par des travaux utilisant cette voie de synthèse (Almiñana *et al.*, 2007; Belsito *et al.*, 2007; Rondel *et al.*, 2011; Veuillez *et al.*, 1999; Zweytick *et al.*, 2006). Cette réaction a un rendement élevé (70% à 80%) mais les conditions de réaction extrêmes, comme une température élevée et un pH alcalin, peuvent poser problème quant à l'acylation de molécules couteuses et fragiles comme les peptides. Cette réaction chimique est, de plus, rarement sélective. L'acylation de molécules polyfonctionnelles comme les acides aminés ou les peptides avec la réaction de Schotten-Baumann engendre des étapes de protection/dé-protection de groupements acylables. Ces

étapes supplémentaires entraînent une baisse de rendement et une augmentation des coûts de production. L'utilisation de la réaction de Schotten-Baumann a d'autres inconvénients comme l'utilisation de solvants toxiques (DMF, DMSO, toluène, acétone...) et la formation de coproduits (sels) qui ne répondent plus de nos jours aux exigences en matière de production de molécules pharmaceutiques dans des conditions respectueuses de l'environnement (Husson *et al.*, 2008).

### 2.6.2 Acylation peptidique par voie enzymatique

Les principaux avantages de l'utilisation d'enzymes sont les conditions douces de réaction et la forte sélectivité des biocatalyseurs (Jiang *et al.*, 2002; Schmid *et al.*, 2001). Plusieurs études s'intéressent à l'utilisation d'enzymes pour la synthèse de dérivés acylés d'alcools aminés, d'acides aminés, de peptides ou de carbohydrates (Ardhaoui *et al.*, 2004; Furutani *et al.*, 1996; Gremos *et al.*, 2011; Husson *et al.*, 2009, 2010; Kim *et al.*, 2003). Quelques brevets ont également été déposés pour des procédés d'acylation enzymatique. Voici quelques exemples :

- Martin J. FR2963362 (A1) — 2012-02-03 : Acylation biocatalysée comprenant un donneur d'acyl-organophosphoré.
- Barba C.V. WO2013001126 (A1) — 2013-01-03 : Méthode d'acylation de produits issus d'industrie pharmaceutique et alimentaire par des estérases de champignons.
- Biqian L. CN102492672 (A) — 2012-06-13 : Acylation enzymatique de diacylglycérol.
- Brammer H.L CA 2361830 – 2006-01 : Acylation de fonction amine libre de peptide.
- Duenwerber D.L CA 2500123 – 2003-09-25 : Procédé de production de peptide acylé.

Chaque enzyme a une sélectivité qui lui est propre. Pour catalyser une réaction précise, les biocatalyseurs doivent être choisis en fonction de leur nature, de leur activité et de leur spécificité de substrat. Parmi les enzymes catalysant la réaction d'acylation, on trouve les lipases, les acylases et d'autres enzymes comme les acyl-transférases, les protéases et les carboxyl-estérases. Les travaux concernant l'acylation de peptides ou d'acides aminés se focalisent essentiellement sur le rendement et la régio-/chimio-sélectivité de la réaction. Ces deux facteurs sont dépendants de trois paramètres réactionnels interconnectés :

- la nature du milieu réactionnel dans lequel a lieu la réaction

- la nature du biocatalyseur utilisé
- des propriétés du substrat

Les réactions d'acylation enzymatiques de peptides peuvent être décrites selon deux critères : les acylations catalysées en milieux aqueux et les acylations s'effectuant en milieux non-aqueux.

### 3 Acylation enzymatique en milieux non-aqueux

Le principe de l'acylation enzymatique en milieu non-aqueux est d'utiliser une enzyme hydrolytique comme les lipases ou les acyl-hydrolases. Dans ces conditions, la réaction inverse de l'hydrolyse est favorisée ce qui permet l'attachement covalent d'un groupe acyl sur une fonction nucléophile (Figure 3)

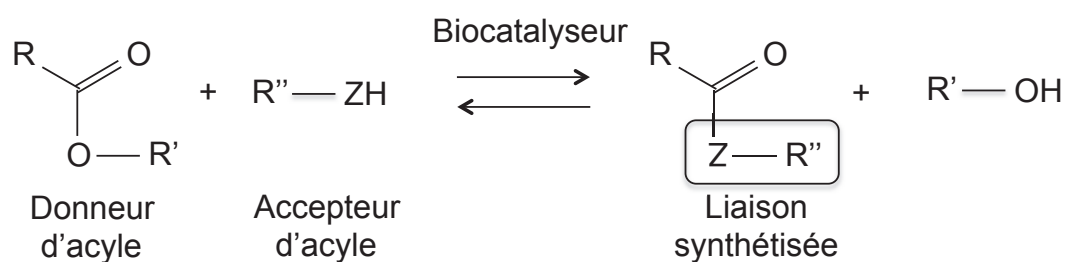


Figure 3 : Schéma général de la réaction d'acylation catalysée par une enzyme.

#### 3.1 Enzymes catalysant l'acylation en milieux non-aqueux

Plusieurs familles d'enzymes sont utilisées pour catalyser la réaction d'acylation dans ces milieux comme les protéases ou peptidases et les estérases, parmi lesquelles figurent les lipases qui forment la famille la plus étudiée et la plus utilisée à l'échelle industrielle. Ces familles d'enzymes sont décrites brièvement ci-dessous.

##### 3.1.1 Les lipases

Les lipases sont des tryacylglycérol hydrolases (EC 3.1.1.3) fréquemment utilisées dans les procédés biotechnologiques enzymatiques. Elles sont définies comme des enzymes capables

d'hydrolyser de longues chaînes triglycérides, monoacylglycérol, diacylglycérol et autres esters d'acides gras. Les lipases peuvent également catalyser la réaction inverse en milieu non aqueux à savoir l'acylation de groupement alcool, amine ou thiol. D'autres potentialités plus atypiques ont également été reportées comme la synthèse de liaisons C-C, C-N et C-S. Ces larges champs d'activités ont fait des lipases une des familles d'enzymes les plus étudiées tant dans le monde industriel que dans le monde universitaire. Chaque année, 10<sup>4</sup> tonnes de lipases immobilisées sont produites dans le monde (DiCosimo *et al.*, 2013). Une liste non exhaustive des procédés utilisant les lipases est donnée ci-dessous.

- production de bioéthanol (Fan *et al.*, 2013; Gog *et al.*, 2012; Moussavou Mounquengui *et al.*, 2013)
- synthèse de polyesters (Garcia Linares and Baldessari, 2013; Naves *et al.*, 2013)
- fabrication de papier (Gutiérrez *et al.*, 2001; Karn *et al.*, 2013)
- production d'ingrédients en industrie alimentaire (Bloomer *et al.*, 1990; Couto and Sanromán, 2006)
- fabrication de détergents (Hasan *et al.*, 2010)
- traitement des eaux usées (Cammarota and Freire, 2006)
- résolution de mélange racémique (Siódmiak *et al.*, 2013)
- préparation de médicaments chiraux (Gotor-Fernández *et al.*, 2006)

CALB est souvent utilisée pour catalyser des réactions en solvants organiques, la lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) est utilisée pour la synthèse de molécules dans des détergents et celle de *Rhizomucor miehei* (RML) est utilisée pour la conversion d'acides gras et d'huiles. (Adlercreutz, 2013)

Aujourd'hui, les lipases constituent les hydrolases les plus utilisées en milieu organique pour la synthèse de molécules acylées (Klibanov, 1989, 2001; Wescott and Klibanov, 1994; Zaks and Klibanov, 1985). En effet, leur utilisation en solvants organiques leur confère une grande stabilité thermique, déplace l'équilibre thermodynamique de la réaction vers la synthèse de molécules acylées et facilite la récupération et le recyclage de l'enzyme. Les solvants organiques permettent quant à eux une meilleure solubilité de substrats non polaires (Doukyu and Ogino, 2010; Hudson *et al.*, 2005; Ogino and Ishikawa, 2001).

### 3.1.2 Les estérases

Les estérases (EC 3.1.1) autre que les lipases ont le même repliement conformationnel que les lipases ainsi que la même machinerie catalytique (Fischer and Pleiss, 2003; Pleiss *et al.*, 1998). Ce sont aussi des sérines estérases mais leur sélectivité pour les substrats donneurs d'acyle est beaucoup plus stricte. La partie de la poche du site actif accueillant le substrat donneur d'acyle des acétylcholine-estérases ou des bromopéroxydases par exemple, est plus petite et correspond parfaitement à leur substrat favori (Pleiss *et al.*, 1998). Il est cependant possible de moduler leur spécificité en changeant la composition du milieu réactionnel. L'estérase de foie de porc, par exemple, qui est une des estérases les plus utilisées pour l'hydrolyse énantio-sélective d'esters en solution aqueuse, ne présente aucune spécificité pour l'acylation d'alcool avec les esters de vinyloxy en solvant organique. Toutefois, en ajoutant du méthoxypoly(éthylène-glycol), de l'albumine de sérum bovin ou du polystyrène d'aminométhyle, cette estérase catalyse une estérification énantio-sélective ( $E > 100$ ) de mélanges racémiques de 1-alkoxy-, 1-éthylsulfanyl-, et 1-fluoro-3-aryl-2-propanols. Ces ajouts de co-activateurs permettent, d'une part, de capter et de neutraliser les aldéhydes et les acides coproduits pendant la réaction et, d'autre part, d'approvisionner en molécules d'eau la réaction d'hydrolyse du donneur d'acyle (Gais *et al.*, 2001).

### 3.1.3 Les protéases / peptidases

Les protéases sont, par définition, des enzymes hydrolysant des liaisons peptidiques, mais elles catalysent également la synthèse de molécules acylées en milieux organiques. Leur haute spécificité de substrat limite cependant leur utilisation. Le mécanisme catalytique des protéases diffère de celui des hydrolases à sérine, ce qui, dans certains cas, peut constituer un choix intéressant (Bordusa, 2002). Xiao *et al.* (2005) ont démontré que la protéase alcaline de *Bacillus subtilis* peut synthétiser efficacement des esters de glucose en comparant la transestérification du glucose avec différents donneurs d'acyles, dans différents solvants, avec plusieurs biocatalyseurs. Un taux de conversion du substrat supérieur à 80% a été obtenu dans la pyridine après optimisation de l'homogénéité du milieu par ultrasons. Les protéases peuvent synthétiser des liaisons amides (Bordusa, 2002) comme les liaisons esters. Chinsky et son équipe (1989) ont étudié l'acylation du 2-chloréthylbutyrate avec le 6-amino-hexanol en présence de Subtilisine Carlsberg<sup>®</sup> dans du 2-méthyl-2-butanol. Il a été montré que la vitesse

initiale d'acylation était 37 fois supérieure pour le groupement hydroxyle de l'amino-alcool que pour la fonction amine.

### 3.2 Milieux non aqueux utilisés pour l'acylation enzymatique

L'influence des milieux sur les réactions enzymatiques est complexe. Le potentiel d'action des enzymes peut être considérablement amélioré en utilisant des solvants réactionnels autres que leurs milieux aqueux originels. L'étude de Klivanov (1985) révèle que ce changement d'environnement réactionnel est réalisable et qu'il permet de surcroît de catalyser des réactions thermodynamiquement impossibles en milieux aqueux. De plus, la régio-/stéréo ou chimio-sélectivité de l'enzyme peut être modifiée en fonction de la nature du solvant réactionnel. Le milieu réactionnel est aussi un facteur important à prendre en compte tant sur le plan économique (utilisation de CO<sub>2</sub> supercritique) que sur le plan écologique (utilisation de liquides ioniques et de solvants organiques) (Wescott and Klivanov, 1994).

#### 3.2.1 Les solvants organiques

Il a longtemps été admis que les solvants organiques avaient des effets dénaturants sur la stabilité des enzymes. Cette notion était issue de l'observation du comportement des enzymes en milieux mélangés aqueux et organiques (Lapanje, 1978). Sachant que les solvants naturels des enzymes sont des milieux aqueux et en observant une dénaturation enzymatique en milieux mixtes aqueux et organiques, il était naturel de penser que dans un milieu purement organique, les enzymes sont dénaturées. Aujourd'hui, cette affirmation a été, de nombreuses fois, démontrée comme étant fautive (Griebenow and Klivanov, 1996). En milieu organique, les enzymes expriment de nouvelles propriétés. Les avantages liés à l'utilisation de ces milieux sont les suivants (Sheldon, 1996) :

- augmentation de la solubilité des substrats apolaires,
- augmentation de la thermo-stabilité de l'enzyme,
- modification de la spécificité pour les substrats,
- récupération facile du produit par évaporation du solvant,
- récupération aisée de l'enzyme par filtration ou centrifugation,
- intégration facile d'enzyme à des procédés de chimie conventionnelle,
- élimination des risques de contamination bactérienne,



Le plus grand avantage reste cependant la capacité à catalyser des réactions impossibles cinétiquement et thermodynamiquement en milieux aqueux.

La plupart des réactions d'acylation enzymatiques en milieu non-aqueux sont réalisées en solvants organiques. Cependant, elles peuvent être catalysées dans d'autres milieux de nature différente tels que le CO<sub>2</sub> supercritique, les milieux bi-phasiques, les milieux fondus ou les liquides ioniques.

### 3.2.2 Autres milieux réactionnels non-conventionnels

Des milieux autres que les solvants organiques sont en cours d'étude pour l'acylation enzymatique. Ces milieux octroient aux enzymes des propriétés nouvelles et permettent d'observer des sélectivités différentes (Tableau 4). Ces différents milieux sont brièvement décrits ci-dessous.

**Tableau 4 : Exemple de réactions d'acylation catalysées en milieux non-conventionnels autres que les solvants organiques.**

Milieux réactionnels	Nature du milieu	Enzyme	Type de réaction d'acylation	références
Liquides ioniques	[Bmim] <sup>+</sup> [PF <sub>6</sub> ] <sup>-</sup>	Lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i>	Trans-estérification d'acools secondaires avec l'anhydride succinique	Rasalkar et al 2004
	[Bmim] <sup>+</sup> [PF <sub>6</sub> ] <sup>-</sup>	CALB	Acylation du di-peptide Lys-Ser avec l'acide oléique	Husson et al 2009
	[Bmim] <sup>+</sup> [BF <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	CALB	Acylation du 6-amino-1-hexanol avec l'acide oléique	Husson et al 2008
Milieux fondus	Acide oléique	CALB	Acylation du di-peptide Lys-Ser avec l'acide oléique	Husson et al 2009
	Oléate d'éthyle	CALB	Acylation du 6-amino-1-hexanol avec l'acide oléique	Husson et al 2008
	Acétate de vinyle	Amino-acylase de <i>Bacillus stearothermophilus</i>	Acylation de D,L-acide aminés avec l'acétate de vinyle	Dion et al 1995
CO <sub>2</sub> super critique	-	CALB	Estérification de citronellol avec l'acide laurique	Habulin et al 2007
	-	Lipase B de <i>Candida rugosa</i>	Trans-estérification de 6-O-trityl β-D- glucopyranoside avec de l'acétate de vinyle	Palocci et al 2008
	-	Lipase B de <i>P. cepacia</i>	Trans-estérification de 1-phényl-1-éthanol avec de l'acétate de vinyle	Celiaet al 2005
Milieux biphasiques	Acide gras/ tampon phosphate de potassium	Lipase de <i>Candida deformans</i>	Estérification d'ester de méthyle avec des acide gras	Vaysse et al., 2002
	Heptane/ tampon phosphate	Lipase B de <i>Rhizomucor miehei</i>	Estérification de butanol avec l'acide oléique	Kraai et al., 2008
	CO <sub>2</sub> supercritique / méthylketone d'éthyle	CALB	Estérification de citronellol avec l'acide laurique	Habulin et al 2007

### 3.2.2.1 Les liquides ioniques

Les liquides ioniques sont des sels organiques constitués d'un cation organique et d'un anion organique ou inorganique. Ils sont caractérisés par une température de fusion inférieure à 100 °C et une température d'ébullition souvent comprise entre 300 et 400 °C. Les liquides ioniques peuvent augmenter considérablement l'activité et la stabilité enzymatique en comparaison avec les milieux réactionnels classiques et permettent une meilleure solubilité

des composés polaires (Gordon, 2001; Jain *et al.*, 2005; Kaar *et al.*, 2003; Lozano *et al.*, 2001; van Rantwijk *et al.*, 2003; Sheldon *et al.*, 2002). Ils peuvent induire, de plus, une amélioration de l'énantio-sélectivité et de la régio-sélectivité des biocatalyseurs. L'utilisation des liquides ioniques à des échelles industrielles est cependant limitée par leur coût élevé, leur emploi ne pourrait être envisagé que pour la synthèse de molécules à très haute valeur ajoutée (Villeneuve, 2007).

### 3.2.2.2 *Les milieux fondus*

Les milieux fondus consistent à utiliser le donneur d'acyle en tant que solvant réactionnel. De tels procédés permettent donc d'obtenir un large excès d'agents acylants qui permet de déplacer l'équilibre thermodynamique de la réaction, catalysée généralement par des lipases, vers la synthèse de molécules acylées. La majorité des études concernant les réactions enzymatiques en milieu fondu décrivent des bioconversions de type estérification et amidification. Les exigences environnementales concernant la synthèse de biomolécules à intérêt thérapeutique, agroalimentaire et cosmétologique, encouragent, de plus, l'utilisation de ce type de milieux réactionnels (Hobbs and Thomas, 2007; Lancaster, 2008).

### 3.2.2.3 *Le CO<sub>2</sub> supercritique :*

L'utilisation de biocatalyseurs en fluide supercritique a été réalisée pour la première fois en 1985 par Hammond *et al.* (1985). Depuis, en raison de la recherche de procédés verts, l'utilisation de biocatalyseurs combinés à des fluides supercritiques et, en particulier, le dioxyde de carbone émerge de plus en plus. Le dioxyde de carbone, d'après son diagramme de phases, possède un point critique au-delà duquel les phases liquide et vapeur deviennent indissociables. Les paramètres définissant le point critique du dioxyde de carbone sont la température critique (T<sub>c</sub>) de 31,1 °C et la pression critique (P<sub>c</sub>) de 7,38 MPa. Pour des valeurs supérieures, le CO<sub>2</sub> existe dans un état dit supercritique et possède des propriétés intermédiaires entre celles d'un liquide et celles d'un gaz. Les propriétés de transport de fluides sensiblement supérieures à celles des liquides induisent alors une meilleure diffusion des molécules dans ce milieu. L'une des différences notables entre le CO<sub>2</sub> supercritique et des solvants organiques réside dans le fait que les fluides supercritiques peuvent être considérés comme des fluides à géométrie variable ; une simple variation de la pression modifie

significativement leur masse volumique, leur capacité à dissoudre les produits et la vitesse de réaction enzymatique (Beckman, 2004; Celia *et al.*, 2005; Yasmin *et al.*, 2006). Cette possibilité de modulation offre des perspectives intéressantes pour les réactions d'acylation. Un autre avantage lié à l'utilisation du CO<sub>2</sub> supercritique est l'absence de solvant résiduel dans les produits formés liée à la dissipation du CO<sub>2</sub> sous forme de gaz en fin de réaction.

#### 3.2.2.4 *Les milieux bi-phasiques :*

Des travaux ont été développés concernant la combinaison de 2 milieux non-miscibles pour la mise en oeuvre de réactions d'acylation enzymatique : ces systèmes sont appelés systèmes bi-phasiques. Des réactions d'hydrolyse comme de synthèse de molécules acylées y sont possible (Vaysse *et al.*, 2007), grâce aux propriétés thermodynamiques complexes des milieux bi-phasiques qui minimisent le rôle des molécules d'eau. Les avantages de ces systèmes pour les réactions enzymatiques d'acylation sont nombreux. Ils permettent notamment une séparation facilitée des substrats, produits et biocatalyseurs, une minimisation des effets inhibiteurs des substrats ou des produits, un cumul des avantages spécifiques de chaque milieu constitutif.

### 3.3 Influence des conditions opératoires en milieux non-aqueux sur la réaction d'acylation

#### 3.3.1 Nature du solvant organique

Le retrait des molécules d'eau du milieu permet de déplacer l'équilibre réactionnel vers la synthèse de molécules acylées et permet à des enzymes telles que les hydrolases de catalyser l'acylation (Klibanov, 2001). L'un des principaux facteurs à contrôler pour une acylation en solvant organique est donc l'activité de l'eau du milieu. Afin d'orienter l'équilibre thermodynamique de la réaction vers une activité de synthèse plutôt qu'une activité hydrolytique, plusieurs études ont montré que l'activité de l'eau du milieu ( $a_w$ ) devait être maintenue autour de 0,1 (Humeau *et al.*, 1998a, 1998b; Ma *et al.*, 2002; Wehtje *et al.*, 1997). Cette condition permet à la fois de conserver un minimum d'eau au sein du système nécessaire à la flexibilité conformationnelle de l'enzyme (Furutani *et al.*, 1996; Klibanov,

2001) et de limiter une diffusion de substrats hydrophobes vers l'enzyme ce qui augmenterait drastiquement l'activité hydrolytique (Valivety *et al.*, 1993). Pour retirer les molécules d'eau produite au cours de la réaction, plusieurs méthodes existent comme l'ajout de tamis moléculaire ou la réduction de la pression pour piéger ou évaporer les molécules d'eau (Ardhaoui *et al.*, 2004; Chamouleau *et al.*, 2001; Husson *et al.*, 2009).

L'acylation de la lysine en milieux organiques a été étudiée par plusieurs équipes. La synthèse de N-acylation de la lysine a été réalisée en solvants organiques avec des acides gras (ou des triglycérides) et catalysée par la lipase de *Rhizomucor miei* (ou CALB). Un rendement exceptionnel de 75% de conversion a été trouvé (Montet *et al.*, 1990) mais la plupart des autres études effectuant la même transformation obtiennent un rendement autour de 10% (Valivety *et al.*, 1997). Soo *et al.*, (2004) démontre que l'optimum est obtenu après 96h et atteint 33% de conversion. L'acylation des peptides en milieux organiques anhydres est, en effet, limitée par leur solubilité. Il est possible cependant d'améliorer celle-ci en jouant sur la température de réaction ou la dispersion du substrat en fines particules dans le milieu. De meilleurs rendements d'acylation de carnosine ( $\beta$ -Ala-His) avec de l'acide oléique dans du 2-méthyl-2-butanol ont été obtenus en augmentant la température de 55°C (9,5%  $\pm$  1,5% de conversion) à 80°C (16%  $\pm$  2% de conversion). Ce rendement a encore été augmenté en améliorant la dispersion du substrat hydrophile dans le milieu en passant le solvant et le substrat dans une presse de French (Husson *et al.*, 2009). Husson *et al.*, (2009, 2011) ont également montré que l'acylation de Lys-Ser et de Ser-Leu dans du 2-méthyl-2-butanol par CALB atteint respectivement des rendements de 36%  $\pm$  5% et de 45%  $\pm$  3%.

De hauts rendements réactionnels peuvent être atteints avec des solvants organiques hydrophobes et avec certains solvants hydrophiles. Ces rendements peuvent toutefois varier considérablement d'un solvant à un autre. Des analyses de modélisations moléculaires ont montré que la nature des solvants organiques peut avoir des effets non-négligeables sur la flexibilité de l'enzyme (Wedberg *et al.*, 2012). Sur 28 solvants organiques testés pour la synthèse de biodiesel par CALB, des rendements allant de 1% à 83% ont été obtenus (Fu and Vasudevan, 2009). Graber et son équipe (2007) montre également que le choix du solvant réactionnel a un effet marqué sur les résultats d'une réaction enzymatique. Dans cette étude, six solvants différents ont été utilisés pour la réaction d'acylation du 1-propanol avec du propanoate de méthyle utilisant CALB. Les solvants testés sont les suivants : 2-pentanone, 3-pentanone, 2-méthyl-2-pentanol, 3-méthyl-3-pentanol, 2-méthylpentane et 3-méthylpentane. Il a été montré que les cétones inhibaient la réaction enzymatique contrairement aux milieux hydrocarbonés et aux alcools tertiaires (Figure 4).

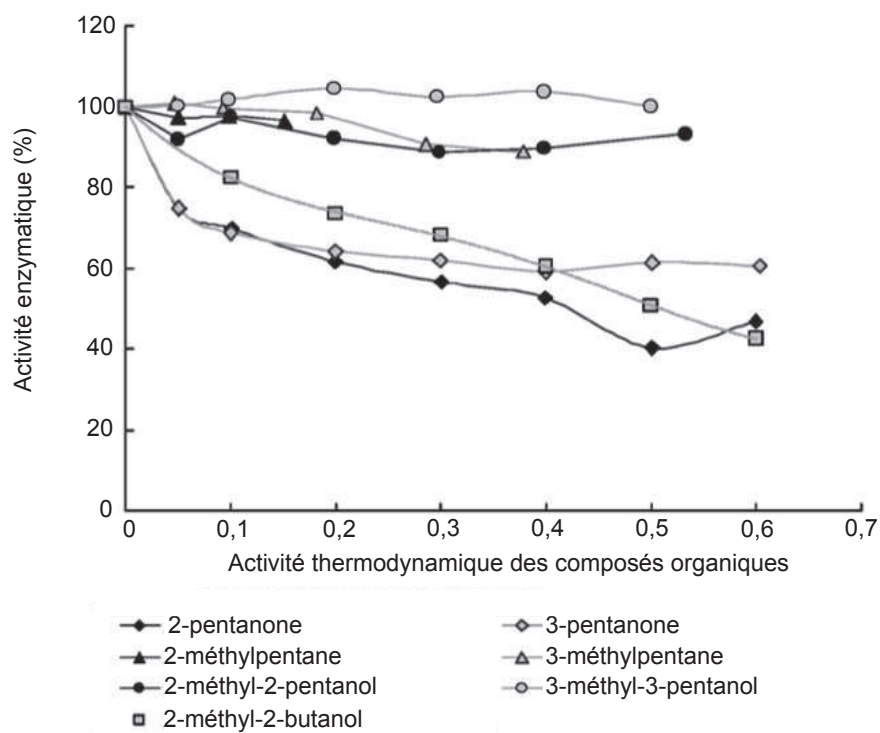


Figure 4 : Influence de la nature des solvants sur l'activité enzymatique de CALB (Graber *et al.*, 2007).

Une analyse de modélisation moléculaire a montré que la conformation de l'enzyme ne changeait pas selon ces différents milieux mais qu'il pouvait se former des complexes entre les molécules de solvant organique et le propanoate de méthyle. Ces solvants agiraient comme des inhibiteurs compétitifs du premier substrat pour CALB.

La polarité du solvant est également un paramètre clef pour une réaction en solvant organique. La plupart des acylations enzymatiques sont effectuées en milieux organiques apolaires et anhydres. Contrairement aux solvants polaires, ils permettent la préservation de la couche d'hydratation de l'enzyme, essentielle au maintien de son activité. Cependant, les acides aminés et les peptides qui sont des molécules polaires s'y dissolvent peu. Soo *et al.*, (2004) a réalisé une optimisation par planification expérimentale (MSR) sur la réaction d'acylation de la lysine avec de l'acide oléique et de l'acide palmitique catalysée par la lipase de *R. miehei* (Lipozyme) (Tableau 5). Les paramètres testés sont la température, la concentration en substrat, la concentration en enzyme et la nature du solvant organique caractérisé par son hydrophobicité ( $\log(P)$ ).

**Tableau 5 : Influence de la variation de paramètres réactionnels sur le rendement de réaction d'acylation de lysine avec l'acide palmitique et acide oléique catalysée par Lipozyme. [S] : concentration en donneur d'acyle, T : température, Log(P) : constante caractérisant l'hydrophobicité du solvant réactionnel, [E] : concentration de l'enzyme (Soo *et al.*, 2004).**

Paramètres étudiés	Rendement de production de lysine acylée	
	Acide laurique	Acide oléique
[S] / T	++	+++
Log(P) / T	++	+++
[E] / T	+	++
[S] / Log(P)	+++	++++
[E] / Log(P)	+	+++
[S] / [E]	+	+++

Cette étude démontre que les deux facteurs influençant majoritairement la synthèse de dérivés acylés d'acides aminés en solvant organique sont la nature du solvant et la concentration des substrats. L'utilisation de solvants organiques comprend cependant quelques inconvénients comme leur volatilité ou leur toxicité pour l'environnement (Irimescu and Kato, 2004).

### 3.3.2 Influence de la structure du substrat

La solubilité des substrats peptidiques peut être également améliorée par une modification de leur structure. La O-acylation de la sérine ou de la thréonine catalysée par les lipases dans des solvants organiques (acétone, acétonitrile, 2-méthyl-2-butanol ou 2-méthyle-2-propanol) n'est possible qu'à de très faibles rendements. Cette faible réactivité des fonctions hydroxyles a été imputée à la solubilité de ces acides aminés en milieux organiques. Afin de palier ces problèmes, un groupement amine a été fixé sur leur fonction carboxylique. Ce greffon a permis une meilleure solubilisation des acides aminés et a rendu possible l'acylation enzymatique de sérinamide et de thréoninamide avec l'acide laurique (Zhang *et al.*, 2005).

### 3.3.3 Influence du ratio molaire

Généralement, lors de la greffe d'une molécule hydrophobe à une espèce hydrophile, c'est le substrat lipidique qui est en excès. La réaction d'acylation est alors favorisée et l'hydrolyse limitée (Villeneuve, 2007).

Une influence du ratiomolaire a également été observée pour la synthèse d'acides aminés acylés avec des acides gras. Soo *et al.*, (2004) montre qu'un excès d'agent acylant tend à favoriser la synthèse de N- $\epsilon$ -palmitoyl-lysine et de N- $\epsilon$ -oléoyl-lysine, le ratiomolaire optimal donneur d'acyle/accepteur d'acyle étant de 3/1. Une autre étude (Husson *et al.*, 2009) montre que l'acylation du 6-amino-1-hexanol avec l'éthyle oléate par CALB conduit à des taux de conversion élevés avec des ratio molaires donneur/accepteurs d'acyle de 2/1 ou 4/1.

### 3.3.4 Influence de la nature du donneur d'acyle

Lors d'une acylation avec des acides gras, les molécules d'eau coproduites doivent être continuellement retirées du milieu pour garder l'équilibre réactionnel orienté vers la synthèse de molécules acylées. Cette élimination s'effectue souvent par ajout de tamis moléculaire, par évaporation ou par adsorption sur une résine. Une autre solution consiste à utiliser des esters de méthyle, éthyle ou vinyle comme donneurs d'acyles. Les molécules coproduites seront de l'éthanol ou du méthanol pour les esters d'éthyle et de méthyle, respectivement. Ces coproduits pourront être facilement éliminés par évaporation en travaillant à pression atmosphérique. Dans le cas des esters de vinyloxy, l'alcool de vinyle coproduit transformé en acétaldéhyde par effet de tautomérisation prévient de tout effet réversible de la réaction. Cet acétaldéhyde a de plus une faible température d'ébullition, et peut donc être facilement éliminé du milieu réactionnel par évaporation (Villeneuve, 2007).

### 3.3.5 Ionisation du substrat

L'état d'ionisation du substrat peut avoir un rôle considérable sur le rendement de la réaction. Cet état d'ionisation induit par le milieu réactionnel module la réactivité nucléophile des fonctions amines ou hydroxyles pour une acylation enzymatique (Husson *et al.*, 2008; Maugard *et al.*, 1997, 1998). En effet, pendant la réaction un complexe ionique peut se créer



entre un acide aminé et un acide gras. La fonction amine protonée d'un substrat aminé peut interagir avec la fonction carboxylique de l'acide gras par le biais d'interactions électrostatiques. Cet état d'ionisation a été démontré par Maugard et son équipe (1997) entre le N-méthyl-glucamine et plusieurs acide gras dans de l'hexane. La formation de ce complexe ionique est influencée par le ratio molaire donneur d'acyle/ accepteur d'acyle. Plus ce ratio est élevé, plus la population de molécules aminées est impliquée dans la paire d'ions (Maugard *et al.*, 1998). La formation de ce complexe ionique peut permettre d'augmenter la solubilité du substrat aminé polaire dans le solvant organique anhydre, augmentant ainsi sa disponibilité pour la réaction. Cependant, il se peut que ce complexe ionique n'influe pas sur la solubilité du substrat, comme pour le 6-amino-1-hexanol dans du 2-méthyl-2-butanol (Husson *et al.*, 2008), voir diminue considérablement le rendement de la réaction lorsque le complexe formé est insoluble (Fernández-Pérez and Otero, 2001, 2003).

L'état de protonation des fonctions amines peut aussi diminuer la réactivité de groupement amine de substrats polyfonctionnels comme les acides aminés ou les peptides. L'étude de Husson *et al.*, (2009) l'a prouvé en ajoutant un excès de base forte (triéthylamine) à la réaction d'acylation du peptide Lys-Ser,HCl avec de l'acide oléique dans du 2-méthyl-2-butanol. Cet ajout augmente le rendement de la réaction jusqu'à  $36\% \pm 5\%$ .

## **4 Acylation enzymatique en milieux aqueux**

L'acylation de protéines ou de peptides est une réaction naturelle retrouvée chez les bactéries, les plantes ou les mammifères. Il existe donc des enzymes capables de catalyser l'acylation en milieu aqueux où les substrats peptidiques ont une bonne solubilité. Ces biocatalyseurs sont décrits ci-dessous.

### **4.1 Enzymes catalysant l'acylation en milieux aqueux**

Les principales enzymes capables de catalyser une réaction d'acylation en milieu aqueux appartiennent aux familles des aminoacylases (EC 3.5.1), des carboxyl-estérases (EC 3.1.1) ou des acyl-transférases (EC 2.3.1). La réaction d'hydrolyse d'une liaison ester ou amide est souvent choisie pour caractériser l'activité et la spécificité d'une aminoacylase ou d'une estérase. L'hydrolyse est en effet plus rapide que la réaction inverse de synthèse.

#### 4.1.1 Les aminoacylases

Les aminoacylases représentent une importante classe d'enzymes capables de catalyser l'hydrolyse ou la synthèse d'acides aminés acylés. Certaines ont une large gamme de substrats comme l'acylase I d'origine porcine et d'autres ont une haute spécificité comme l'acylase II, d'origine porcine également, qui n'hydrolyse que le N-acyl-L-aspartate. Ces caractéristiques font des aminoacylases des enzymes à hauts potentiels biotechnologiques. En 1990, les aminoacylases étaient parmi les 10 enzymes les plus utilisées en biotechnologie, notamment pour la conversion de pénicilline G en acide 6-amino-penicillinique, la conversion du glucose en fructose ou la transformation de la L-histidine en acide urocanique (Tewari, 1990). Les aminoacylases sont d'origines variées. Certaines sont d'origines animales (rein, foie) d'autres proviennent de végétaux ou de micro-organismes. Quelques aminoacylases ainsi que leurs sources sont répertoriées dans le Tableau 6.

**Tableau 6 : Liste d' aminoacylases, leur organisme source et leur taille.**

Nom de l'enzyme	Source	Taille (kDa)	Références
Aminoacylase bifonctionnelle/ carboxypeptidase (DR ACY/CP)	<i>Deinococcus radiodurans R1</i>	43	Lin <i>et al</i> ; 2007
Aminoacylase Amd1	<i>Lactococcus lactis MG1363</i>	42	Curley <i>et al</i> ; 2003
Aminoacylase	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	43	Sakanyan <i>et al</i> ; 1993
Aminoacylase	<i>Thermococcus litoralis</i>	43	Toogood <i>et al</i> ; 2002
Aminoacylase	<i>Pyrococcus furiosus</i>	42	Story <i>et al</i> ; 2001
AAIII of rat kidney	<i>Mus musculus</i>	35	Suzuki <i>et al</i> ; 1981
Aminoacylase (AcylaseI)	<i>Sus scrofa</i>	43	Kordel <i>et al</i> ; 1976
Aminoacylase	<i>Streptomyces mobaraensis</i>	100	Koreishi <i>et al</i> ; 2005b
E-lysine acylase (Sm-eLA)	<i>Streptomyces mobaraensis</i>	56	Koreishi <i>et al</i> ; 2005a
Pénicilline V acylase (Sm-PVA)	<i>Streptomyces mobaraensis</i>	Sous-unité $\alpha$ : 19 Sous-unité $\beta$ : 61	Koreishi <i>et al</i> ; 2006
Sm-AA	<i>Streptomyces mobaraensis</i>	55	Koreishi <i>et al</i> ; 2009a
Aminoacylase <i>PhoACY</i>	<i>Pyrococcus horikoshii</i>	42	Tanimoto <i>et al</i> ; 2008
Aminoacylase <i>pAcy1</i>	Rein de porc	45	Wardenga <i>et al</i> ; 2009

La classification des aminoacylases est complexe mais leurs activités catalytiques sont décrites depuis longtemps (Tableau 7). Leur rôle physiologique reste cependant méconnu. Certaines aminoacylases interviendraient chez les bactéries dans le mécanisme de protection d'acides aminés contre leur métabolisation ou dans la construction d'acyl-peptides impliqués dans la croissance (Endo, 1980; Gade and Brown, 1981). D'autres joueraient un rôle dans la détection et détoxification de molécules xénobiotiques chez les mammifères (Anders and Dekant, 1994; Boogaard *et al.*, 1989).

Les travaux de recherche sur cette famille d'enzymes comprennent essentiellement des études cinétiques. Les détails structuraux fournis par des études de cristallographie ne sont aujourd'hui disponibles que pour les pénicillines V acylases, les aminoacylases I et les céphalosporines acylases. Une stabilisation de ces enzymes a été recherchée en les immobilisant, ou en caractérisant des aminoacylases produites par des organismes extrémophiles. Aujourd'hui, seules les pénicillines acylases et quelques céphalosporines C acylases sont immobilisées. Et l'utilisation d'une aminoacylase de *Pyrococcus furiosus*, une archae extrémophile considérée comme hyperthermophile, permet de catalyser l'hydrolyse de N-acétyl-L-méthionine à 100°C et à un pH de 6,5 (Story *et al.*, 2001).

Les principales familles d'acylases sont décrites ci-dessous.

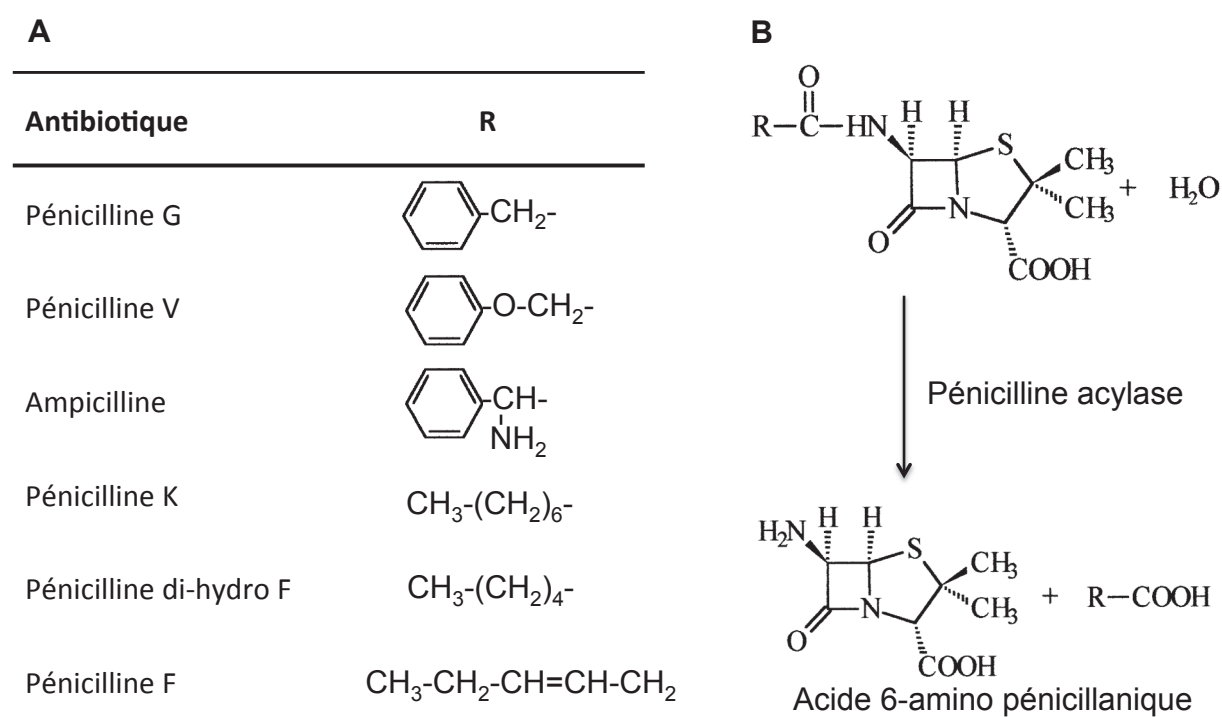
**Tableau 7 : Classification des aminoacylases.**

Numéro	Nom	Réactions catalysées
EC 3.5.1.11	Pénicilline amidohydrolase ; pénicilline acylase ; ampicilline acylase.	Pénicilline + H <sub>2</sub> O ⇌ carboxylate + 6-aminopénicillanate
EC 3.5.1.14	Acylase I ; L-aminoacylase ; acylase ; aminoacylase I.	N-acyl-L-amino acide + H <sub>2</sub> O ⇌ carboxylate + L-amino acide
EC 3.5.1.15	Aminoacylase II ; acylase II ; aspartoacylase.	N-acyl-L-aspartate + H <sub>2</sub> O ⇌ carboxylate + L-aspartate
EC 3.5.1.17	Acyl-lysine désacylase ; N-acyl-L-amidohydrolase.	N-acyl-L-lysine + H <sub>2</sub> O ⇌ carboxylate + L-lysine
EC 3.5.1.60	N-(longue chaîne acyle) éthanolamine désacylase ; N-(longue chaîne acyle) éthanolamine amidohydrolase.	N-(longue chaîne acyle)-éthanolamine + H <sub>2</sub> O ⇌ carboxylate à longue chaîne + éthanolamine
EC 3.5.1.71	N-féruloglycine désacylase ; N-féruloglycine amidohydrolase.	N-féruloglycine + H <sub>2</sub> O ⇌ férulate + glycine
EC 3.5.1.81	N-acyl-D-acide aminé désacylase ; N-acyl-D-acide aminé amidohydrolase.	N-acyl-D-amino acide + H <sub>2</sub> O ⇌ acide + D-amino acide
EC 3.5.1.82	N-acyl-D-glutamate désacylase ; N-acyl-D-glutamate amidohydrolase	N-acyl-D-glutamate + H <sub>2</sub> O ⇌ carboxylate + D-glutamate
EC 3.5.1.83	N-acyl-D-aspartate désacylase ; N-acyl-D-aspartate amidohydrolase.	N-acyl-D-aspartate + H <sub>2</sub> O ⇌ carboxylate + D-aspartate
EC 3.5.1.93	Céphalosporine C acylase ; glutaryl-7-ACA acylase ; caphalosporine acylase	(7R)-7-(4-carboxybutanamido) céphalosporanate + H <sub>2</sub> O ⇌ aminocéphalosporanate + glutarate
EC 3.5.1.55	N-acyl-D-glutamate désacylase ; acide gras à longue chaîne-L-glutamate amidohydrolase.	N-acyl à longue chaîne-L-glutamate + H <sub>2</sub> O ⇌ carboxylate à longue chaîne + L-glutamate
EC 3.5.1.97	Acyl-homosérine-lactone acylase ; AHL-acylase.	N-acyl-L-homosérine lactone + H <sub>2</sub> O ⇌ L-homosérine lactone + carboxylate

Les familles d'aminocyclases les plus étudiées sont brièvement détaillées ci-dessous.

#### 4.1.1.1 Les pénicillines acylases

Les aminocyclases les plus connues, les plus étudiées et les plus utilisées à l'échelle industrielle sont les pénicillines acylases (pénicillines amidohydrolases, EC 3.5.1.11). Cent mille tonnes de pénicillines acylases immobilisées sont produites chaque année (DiCosimo *et al.*, 2013). Cette famille d'enzymes est constituée de sous-groupes identifiés en fonction de leurs substrats. La pénicilline G acylase hydrolyse la pénicilline G, la pénicilline V acylase hydrolyse la pénicilline V, la pénicilline K acylase hydrolyse la pénicilline K, etc... Les pénicilline-acylases clivent spécifiquement les chaînes acyles des pénicillines pour produire les acides 6-amino-penicillaniques et les acides organiques correspondants (Figure 5).



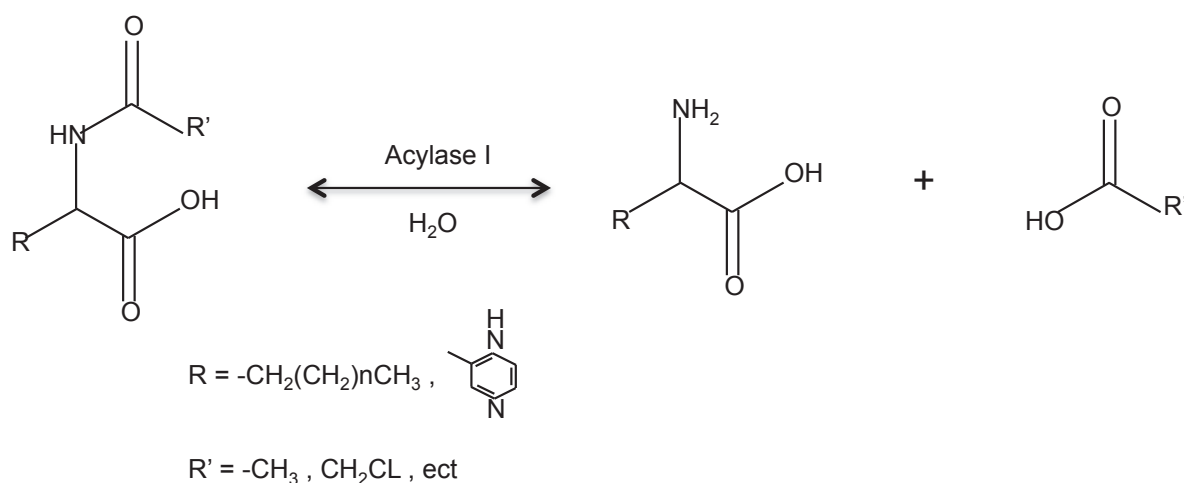
**Figure 5 : Hydrolyse de pénicilline catalysée par les pénicillines acylases. A : Spécificité de substrat des différentes pénicillines acylases. B : Réaction catalysée par les pénicillines acylases (Arroyo *et al.*, 2003).**

Le rôle *in vivo* de ces enzymes n'est pas clairement élucidé mais il semblerait qu'elles soient impliquées dans le métabolisme de dégradation de composés aromatiques en substrat carboné (Arroyo *et al.*, 2003). Les pénicillines acylases sont essentiellement étudiées et utilisées en industrie pour la production d'acide 6-aminopenicillanique et pour la synthèse d'antibiotiques

$\beta$  lactames semi-synthétiques, aussi nous ne développerons pas plus leurs potentialités dans ces travaux. Les pénicilline-acylases peuvent également être utilisées pour la synthèse de peptides et la résolution de solution racémique de composés chiraux (Arroyo *et al.*, 2003; van Langen *et al.*, 2000).

#### 4.1.1.2 Les acylases I

Une autre famille d'acylases très étudiée est constituée des enzymes de type acylase I (L-acide aminés N-acylés amido-hydrolase, EC 3.5.1.14). Ces enzymes catalysent spécifiquement le clivage de la partie acyl de plusieurs N $\alpha$ -acyl-acides aminés (Figure 6).



**Figure 6 : Réaction catalysée par l'acylase I avec un acide aminé N- $\alpha$ -acylé. R: alkyl, aromatique ou groupe aralkyle. R': méthyle ou groupe chlorométhyle (Anders and Dekant, 1994).**

L'acylase I a été découverte en 1881 grâce à sa capacité d'hydrolyser l'acide hippurique. L'acylase I la plus utilisée aujourd'hui est issue de reins de porc et a été caractérisée par Bruns et Schulze en 1962 avec pour substrat du N-acétyl-DL-méthionine. La vitesse d'hydrolyse de l'acylase I varie en fonction de la nature de l'acide aminé. Lorsque la concentration en acides aminés acétylés est maintenue constante, la vitesse d'hydrolyse la plus rapide est observée avec les acides aminés N-chloroacétylés. De grandes vitesses de réactions sont généralement observées avec les acides aminés présentant une chaîne latérale linéaire. La vitesse augmente de la glycine à la valine, mais des chaînes latérales plus longues diminuent la vitesse de réaction. Les chaînes latérales ramifiées sont hydrolysées plus lentement (Birnbaum *et al.*, 1952). L'acylase I montre une plus grande affinité pour les acides

aminés N- $\alpha$ -acylés, neutres et aliphatiques comme la N-acyl alanine, l'acide 2-aminobutanoïque, la valine, la leucine ou encore l'acide 2-aminoheptanoïque (Birnbaum *et al.*, 1952; Fones and Lee, 1953).

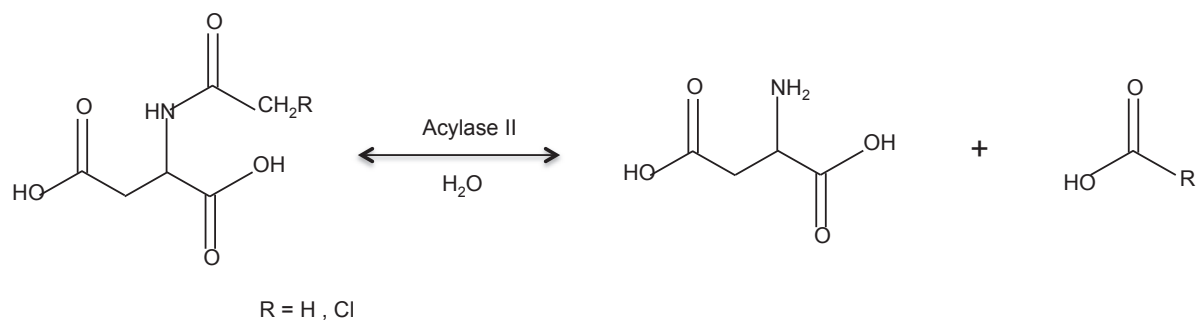
Certains dipeptides peuvent également être hydrolysés sur leur extrémité C-terminale par l'acylase I, comme la glycyl-L-alanine, la glycyl-L-norvaline ou la L-norvaline-L-norvaline (Moravcsik *et al.*, 1977). L'acylase I est classée comme appartenant à la famille des métallopeptidases M20 (Rawlings *et al.*, 2004). Elle possède quelques inhibiteurs comme les acides aminés N- $\alpha$ -hydroxylés, le N-hydroxy-2-aminobutanoate et le N-hydroxy-2-aminoheptanoate. Ce sont des inhibiteurs compétitifs avec des valeurs de  $K_i$  entre 1 et 10  $\mu$ M (Löffler *et al.*, 1988). Ces inhibiteurs ont été testés lors d'expériences *in vitro* avec une acylase I purifiée issue de reins de porcs.

La haute stéréo-sélectivité de cette enzyme permet également la résolution de mélanges racémique. En 2002, l'acylase I a été utilisée dans un procédé permettant la résolution de L-méthionine et de L-valine à des échelles de production excédant 100 t/an (Bommarius, 2002). Les acylases I peuvent catalyser la synthèse d'acides aminés acylés en milieux bi-phasiques. Wada *et al.*, (2002) décrivent l'acylation d'acides aminés avec des chaînes carbonées de moyennes et longues tailles (C8 à C18) en tampon aqueux glycérolé avec l'acylase I issue de rein de porc. Cette enzyme catalyse efficacement la N-acylation de tous les acides aminés avec l'acide laurique excepté dans le cas de la proline et de la tyrosine. Sous des conditions réactionnelles optimales, la synthèse de N-lauroyl-L-arginine atteint un taux de conversion de 82%. L'acylase I porcine peut également être utilisée pour la synthèse d'acides aminés N-acylés avec des chaînes carbonées plus courtes comme le N-acétyl-L-méthionine (Ferjancic-Biagini *et al.*, 1997; Kimura *et al.*, 1992; Kosáry *et al.*, 1994; Yokoigawa *et al.*, 1994).

#### 4.1.1.3 *L'aspartoacylase ou acylase II:*

Des études sur la sélectivité des aminoacylases ont montré que des fractions de reins de porcs ont une activité hydrolytique sur de nombreux acides aminés acylés y compris pour les N-acétyl ou N-chloroacétyl-DL-aspartate. Cette activité est essentiellement due à l'acylase I mais des études complémentaires ont montré que l'acylase I n'hydrolyse pas l'aspartate N-acétylé ou N-chloroacétylé (Birnbaum, 1955; Birnbaum *et al.*, 1952). La présence d'une nouvelle acylase a ainsi été mise en évidence. Cette autre aminoacylase n'hydrolyse en revanche qu'avec de très faibles vitesses de réaction d'autres acides aminés N-chloroacétylés

comme le N-chloroacétyl-DL-glutamate, la N-chloroacétyl-DL-alanine, la N-chloroacétyl-DL-leucine, la N-chloroacétyl-DL-sérine ou encore la N-chloroacétyl-DL-méthionine. Cette enzyme a été appelée aspartoacylase, acylase II ou encore N-acyl-L-aspartate amidohydrolase (EC 3.5.1.15). La réaction catalysée par cette enzyme est présentée Figure 7.

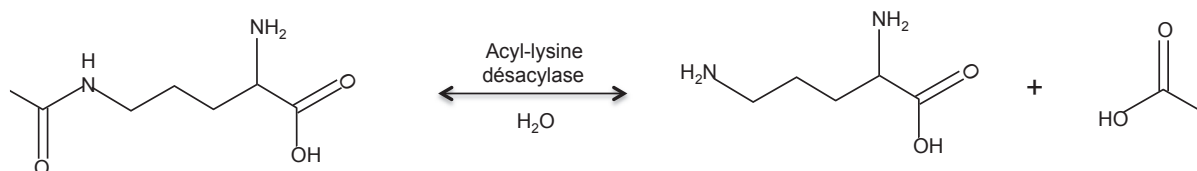


**Figure 7 : Réaction catalysée par l'acylase II (Anders and Dekant, 1994).**

In vivo, l'acylase II ou aspartoacylase, agirait sur le fonctionnement du cerveau. Une déficience en aspartoacylase et une accumulation d'acide N-acétyl-L-aspartate sont les marqueurs de la maladie de Canava, une maladie génétique caractérisée par la dégénérescence spongieuse du cerveau (Matalon *et al.*, 1988). Aucune capacité de synthèse n'a été mise en évidence avec cette enzyme.

#### 4.1.1.4 L'acyl-lysine désacylase:

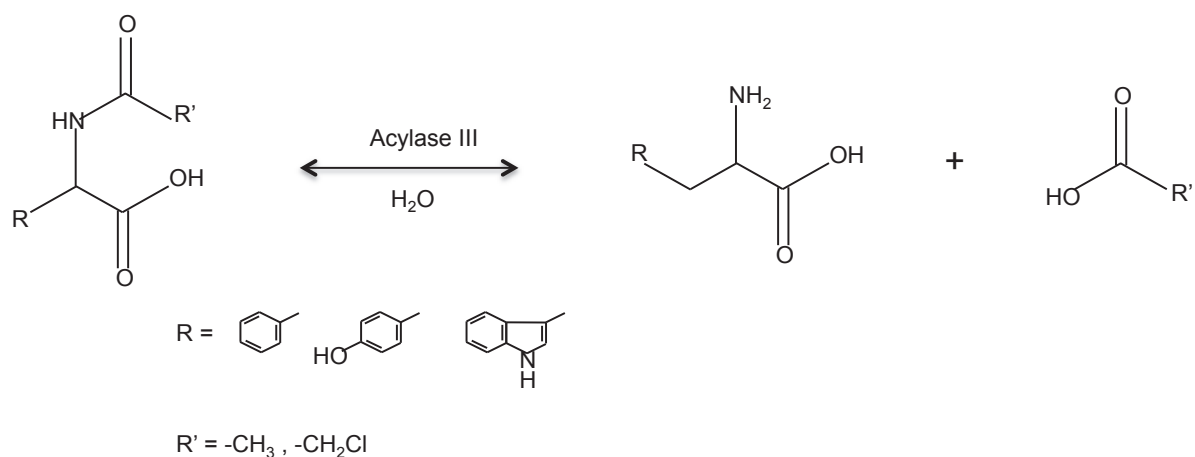
Une expérience a montré qu'un traitement à la N-ε-acétyl-L-lysine permet d'augmenter le poids de rats tout comme l'apport de L-lysine dans l'alimentation. Cela est dû à la présence, dans le foie et les reins du rat d'une acylase capable de catalyser l'hydrolyse de la N-ε-acétyl-L-lysine (Figure 8). Cette acétyl-lysine désacylase (EC 3.5.1.17) ne peut cependant pas cliver la N-α-acétyl-L-lysine.



**Figure 8 : Réaction catalysée par l'acyl-lysine désacylase. (Anders and Dekant, 1994)**

#### 4.1.1.5 L'acylase III :

Le nom acylase III, aussi appelée aspartoacylase-2, (EC 3.5.1.-), était à l'origine donné aux enzymes capables de désacyler les acides aminés aromatiques acylés (Figure 9) (Anders and Dekant, 1994).



**Figure 9 : Réaction catalysée par l'acylase III (Anders and Dekant, 1994).**

A l'heure actuelle, seules quelques aminoacylases partiellement purifiées ont été décrites avec une spécificité de substrat correspondant aux acylases III. Une aminoacylase partiellement purifiée provenant de reins de rats catalyse l'hydrolyse du N-acétyl-S-(2,2-dibromo-1,1difluoroéthyl)-L-cystéine et du N-acétyl-S-benzyl-L-cystéine (Uttamsingh and Anders, 1999). Le poids moléculaire de cette enzyme est de 55 kDa (Endo, 1978; Uttamsingh and Anders, 1999). Une autre acylase III similaire de 145kDa a été extraite du foie de rat (Suzuki and Tateishi, 1981). La nature moléculaire des acylases III n'a pas été caractérisée avant le clonage d'un gène d'acylase III dans des cellules HEK293T de souris (Pushkin and Kurtz, 2008). Le poids moléculaire de l'acylase III produite était alors de 140 kDa et sa structure était homotétramérique.

## 4.2 Caractérisation d' aminoacylases catalysant l'acylation en milieu aqueux.

### Exemple : les acylases produites par *S. mobaraensis*

Les microorganismes sont considérés comme les producteurs d'enzymes les plus intéressants pour des raisons de facilité et de coûts de production. *Streptomyces* est un genre bactérien



dont 2 espèces sont capables de produire plusieurs types d'acylases. Aujourd'hui, cinq acylases différentes ont été décrites par deux équipes de recherche :

- L'équipe de Koreishi *et al.*, a décrit 4 acylases produites avec l'espèce *S. mobaraensis* (2005a, 2005b, 2006, 2009a, 2009b)
- L'équipe de Ueda *et al.*, (2011) a purifié, caractérisé et produit par voie hétérologue une pénicilline V acylase issue de *Streptomyces* sp no 6907

#### 4.2.1 Les caractéristiques et spécificités des acylases issues de *S. mobaraensis*

##### 4.2.1.1 *Sm-AA* issue de *S. mobaraensis*

Cette aminoacylase découverte par Koreishi *et al.* (2009a) est un monomère de 55 kDa. Cette enzyme possède un couple pH/température optimal autour de 7,5 pour une température de 50°C. Elle reste stable à des pH de 8 ou 9 à 37°C et pour des températures inférieures à 45°C, à un pH de 7,5. Sm-AA est une métalloenzyme. Un traitement au 1,10-phénanthroline lui fait perdre 90% de son activité. Un excès d'ion  $Fe^{2+}$  induit également une forte perte d'activité. A l'inverse, l'ajout d'ions  $Zn^{2+}$  ou  $Ni^{2+}$  permet de recouvrir la quasi-totalité de l'activité enzymatique. Sm-AA présente une forte activité hydrolytique pour plusieurs L-acides aminés N-acétylés ainsi que pour des acides aminés N-lauroylés. Les plus fortes activités ont été observées pour les dérivés de méthionine, d'alanine et de cystéine. Globalement, les activités spécifiques d'hydrolyse sont plus fortes pour les acides aminés N-acétylés que pour les acides aminés lauroylés correspondant, sauf pour la lysine et la glycine N-lauroylées où le contraire est observé. Souvent les acylases sont capables d'hydrolyser les molécules acylées soit lorsqu'elles présentent de courtes chaînes carbonées comme les acylases produites par *Aspergillus oryzae* (Chibata *et al.*, 1976; Sato and Tosa, 1993), soit lorsqu'elles présentent des chaînes moyennes voire de longues chaînes comme les aminoacylases de *Mycobacterium smegmatis* (Matsumoto and Nagai, 1972; Nagai and Matsomoto, 1964) ou celles de *Pseudomonas diminuta* (Fukuda *et al.*, 1982; Shintani *et al.*, 1984). Sm-AA possède la rare capacité d'hydrolyser à la fois les acides aminés acylés avec des acides à courtes chaînes carbonées que ceux acylés avec des acides à longues chaînes ( $C_2$  à  $C_{16}$ ) (Tableau 8).

**Tableau 8 : Spécificité de substrat de Sm-AA pour différentes méthionine N-acylées (Koreishi *et al.*, 2009a).**

Substrat	Activité spécifique d'hydrolyse (U <sup>a</sup> .mg <sup>-1</sup> )
N-acétyl-L-méthionine	173
N-butyryl-L-méthionine	169
N-hexanoyl-L-méthionine	175
N-octanoyl-L-méthionine	251
N-decanoyl-L-méthionine	89
N-lauroyl-L-méthionine	72
N-myristoyl-L-méthionine	106
N-palmitoyl-L-méthionine	105

<sup>a</sup>Une unité est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire à l'hydrolyse d'1 µmol de substrat pendant 1 minute à 37°C.

Une comparaison de séquences nucléiques a révélé que Sm-AA appartient à la famille des peptidases M20. L'absence de séquence signal en amont du gène Sm-AA suggère que celle-ci n'est pas excrétée, bien qu'elle soit présente dans le surnageant de culture de *S. mobaraensis*. Une explication possible fournie par Koreishi *et al.*, (2009a) est que Sm-AA suit la même voie d'excrétion que Sm-eLA. Le gène Sm-AA codant la N-acyl-L-acide aminé amidohydrolase a été retrouvé chez *S. mobaraensis*. Une production hétérologue de N-acyl-L-acide aminé amidohydrolase a été effectuée chez *Streptomyces lividans* TK24. Le rendement de production de l'enzyme chez les cellules recombinantes était 42 fois plus important que celui obtenu chez la souche sauvage d'origine (Koreishi *et al.*, 2009a).

#### 4.2.1.2 Aminoacylase issue de *S. mobaraensis*

Cette acylase de 100 kDa est la première à avoir été découverte chez *S. mobaraensis* par Koreishi *et al.* (2005b). Cette enzyme est inhibée jusqu'à 60% en présence de 1,10-phenanthroline et activée à 320% par l'ajout d'ions Co<sup>2+</sup>. Elle appartient donc à la famille des métalloenzymes. Elle reste stable jusqu'à des températures proches de 60°C pendant une heure à pH 7,2.

Contrairement à des acylases issues d'autres microorganismes, cette aminoacylase présente une activité hydrolytique spécifique pour tous les L-acides aminés N- $\alpha$ -acétylés excepté pour la N-acétyl-proline. De même, cette aminoacylase ne catalyse pas l'hydrolyse la L-lysine acétylée sur le carbone en position  $\epsilon$ . Les acides aminés acylés avec des acides gras à courte

chaîne sont hydrolysés plus rapidement que leurs homologues acylés avec des acides gras à longue chaîne. De même, les acides aminés tryptophane et phénylalanine N-acétylés sont hydrolysés plus rapidement que leurs homologues N-chloroacétylés. Enfin, cette aminoacylase catalyse la désacétylation de l'acide 7-aminocéphalosporanique et de la céphalosporine C (Tableau 9).

**Tableau 9 : Spécificité de substrat de l'activité hydrolytique de l'aminacylase de *S. mobaraensis* (Koreishi *et al.*, 2005b).**

Substrat	Activité spécifique d'hydrolyse (U <sup>a</sup> .mg <sup>-1</sup> )	Substrat	Activité spécifique d'hydrolyse (U <sup>a</sup> .mg <sup>-1</sup> )
N-acétyl-L-arginine	181	N-acétyl-L-proline	0
N-acétyl-L-histidine	238	N-acétyl-L-tryptophane	200
N- $\alpha$ -acétyl-L-lysine	41	N-acétyl-L-tyrosine	158
N- $\epsilon$ -acétyl-L-lysine	0	N-acétyl-L-valine	128
Acide N-acétyl-L-aspartique	38	N-acétyl-D-méthionine	0
Acide N-acétyl-L-glutamique	110	N-lauroyl-L-méthionine	12
N-acétyl-L-analine	124	N-chloroacétyl-L-phénylalanine	90
N-acétyl-L-asparagine	172	N-chloroacétyl-L-tryptophane	118
N-acétyl-L-cystéine	15	L-méthionyl-L-phénylalanine	<1
N-acétyl-L-glutamine	201	Glycyl-L-phénylalanine	65
N-acétyl-L-glycine	24	Z-L-méthionine	1.1
N-acétyl-L-leucine	188	Z-L-histidine	<1
N-acétyl-L-méthionine	209	7-aminocephalosporanique	35
N-acétyl-L-phénylalanine	198	Céphalosporine C	8

<sup>a</sup>Une unité est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire à l'hydrolyse d'1  $\mu$ mol de substrat pendant 1 minute à 37°C

L'équilibre réactionnel est naturellement dirigé vers l'hydrolyse, cependant, en ajoutant 70% de glycérol à un tampon TrisHCl, l'aminacylase est capable de catalyser la condensation entre des dérivés d'acide férulique et des acides aminés en tampon aqueux à 37°C et à pH 7. Le taux de conversion de chaque acide aminé est compris entre 0 et 12% mais Koreishi *et al.*, (2005b) ont montré qu'une optimisation du ratio molaire entre les substrats augmente jusqu'à quinze fois le taux de conversion de la L-lysine en N- $\alpha$ -féruloyl-lysine. Plusieurs dérivés d'acide férulique ont été testés comme donneurs d'acyle avec la L-lysine comme accepteur d'acyle ; le donneur d'acyle permettant la meilleure conversion est l'acide hydrocinnamique avec 43,3% de conversion (Tableau 10).

**Tableau 10 : Rendement de synthèse de L-lysine acylée avec différents dérivés d'acide férulique (Koreishi et al., 2005b).**

Donneur d'acyle	Rendement <sup>a</sup> (%)
Acide benzoïque	5,0
Acide vanillique	4,0
Acide phénylacétique	9,1
Acide homovanillique	6,6
Acide hydrocinnamique	43,2
Acide cinnamique	32,0
Acide férulique	35,5
Acide caféique	24,6

<sup>a</sup>Rendements de synthèse obtenus après 48h de réaction.

#### 4.2.1.3 $\epsilon$ -lysine acylase issue de *S. mobaraensis* (*Sm-eLA*)

*Sm-eLA* est une  $\epsilon$ -lysine acylase (N<sub>6</sub>-acyl-L-lysine amidohydrolase ; EC 3.5.1.17) issue du surnageant de culture de *S. mobaraensis*. C'est une enzyme extracellulaire de 60 kDa qui est activée en présence d'ions Co<sup>2+</sup> et Zn<sup>2+</sup> et désactivée par le 1,10-phénanthroline. *Sm-eLA* a un pH optimal autour de 8 et reste stable jusqu'à des températures de 50°C. L'enzyme *Sm-eLA* est l'aminoacylase qui a été la plus étudiée pour la synthèse de N-acyl-L-acides aminés. Elle catalyse notamment la synthèse de lysine acylée sur le groupement amine porté par le carbone en position  $\epsilon$  avec des donneurs d'acyle gras ou aromatiques en tampon aqueux (Tableau 11).

**Tableau 11 : Taux de conversion de la lysine en N-acyl-lysine avec Sm-eLA selon la nature du donneur d'acyle (Koreishi *et al.*, 2005a).**

Donneur d'acyle	Durée de réaction (h)	Taux de conversion (%)
Acide octanoïque	72	58,7
Acide décanoïque	24	100
Acide laurique	4	100
Acide myristique	24	100
Acide palmitique	72	<5
Acide stéarique	72	<5
Acide linoléique	72	58,9
Acide benzoïque	24	<1
Acide cinnamique	2	5,2

Les hauts rendements obtenus pour la synthèse de L-lysine N- $\epsilon$ -décanoyle (C9), N- $\epsilon$ -lauroylée (C11) et N- $\epsilon$ -myristoylée (C14) s'expliquent par la précipitation de ces derniers, qui induit un déplacement de l'équilibre réactionnel vers la synthèse de lysine acylée. Les rendements pour les synthèses de N- $\epsilon$ -octanoyl-L-lysine (C8) et de N- $\epsilon$ -linoléoyl-L-lysine (C18) sont d'environ 60%, en raison d'une solubilité plus élevée du produit. Les rendements de N- $\epsilon$ -palmitoyl-L-lysine (C16) et de N- $\epsilon$ -stéaroyl-L-lysine (C18) sont très faibles, probablement parce que les vitesses de réaction sont retardées par la très faible solubilité du substrat donneur d'acyle. En 2009, le gène *sm-eLA* codant la  $\epsilon$ -lysine acylase a été identifié par l'équipe de Koreishi. Une production hétérologue de  $\epsilon$ -lysine acylase issue de *S. mobaraensis* a ensuite été réalisée chez *S. lividans* TK24 : le rendement de production de l'enzyme a été multiplié par 300 (Koreishi *et al.*, 2009b).

#### 4.2.1.4 Pénicilline V acylase de *S. mobaraensis*

Une autre acylase isolée de *S. mobaraensis* catalyse l'hydrolyse des acides aminés et de dipeptides N-lauroylés. Elle catalyse également leur synthèse avec une spécificité d'acylation pour le groupement amine situé sur le carbone en position  $\epsilon$  de la lysine des peptides. Ces réactions de synthèses sont réalisées dans un tampon aqueux supplémenté ou non de glycérol (Tableau 12).

**Tableau 12 : Rendement de synthèse de L-acides aminés et de dipeptides N-lauroylés par la pénicilline V acylase de *S. mobaraensis* (Koreishi *et al.*, 2006, 2007).**

Substrat	Rendement <sup>a</sup> (%)	
	Tampon TrisHCl, CoCl <sub>2</sub>	Tampon Tris HCl, CoCl <sub>2</sub> + Glycérol (78%)
N- $\alpha$ -lauroyl-lysine	-	5
N- $\epsilon$ -lauroyl-lysine	-	42
N-lauroyl-arginine	-	32
N-lauroyl-histidine	-	9
N-lauroyl-isoleucine	-	5
N-lauroyl-valine	-	3
N-lauroyl-methionine	-	4
N-lauroyl-glycine	-	14
N-lauroyl-cystéine	-	12
N-lauroyl-thyrosine	-	30
N-lauroyl-sérine	-	5
N-lauroyl-asparagine	-	5
N-lauroyl-glutamine	-	2
N- $\alpha$ -lauroyl-L-lysyl-glycine	<10	<10
N- $\epsilon$ -lauroyl-L-lysyl-glycine	58	40
N- $\alpha$ -lauroyl-L-lysyl-isoleucine	<10	<10
N- $\epsilon$ -lauroyl-L-lysyl-isoleucine	60	35
N- $\alpha$ -lauroyl-L-glycyl-lysine	<10	<10
N- $\epsilon$ -lauroyl-L-glycyl-lysine	30	30

Cette enzyme est composée de deux sous-unités de 61 kDa et 19 kDa, caractéristiques des pénicillines acylases. Koreishi *et al.*, (2007) ont identifié cette enzyme comme appartenant à la famille des pénicillines V acylases (Sm-PVA). Elle possède la capacité d'hydrolyser des antibiotiques de type  $\beta$ -lactame et est activée en présence d'ions Co<sup>2+</sup>. Sm-PVA a un pH optimal d'hydrolyse autour de 8 et reste stable jusqu'à 55°C.

Les caractéristiques des 4 aminoacylases de *S. mobaraensis* ont été reportées dans le Tableau 13.

Tableau 13 : Caractéristiques des différentes acylases produites par *S. mobaraensis*.

Nom de l'acylase	Aminoacylase (Sm-AA)	Aminoacylase	$\epsilon$ -lysine acylase (Sm-eLA)	Pénicilline V acylase (Sm-PVA)
<b>Famille</b>	Peptidase M20	-	-	$\beta$ -lactam acylases
<b>Structure</b>	Monomère	Monomère	Monomère	Dimère
<b>Taille (kDa)</b>	55	100	55,816	Sous-unité $\alpha$ : 19 Sous-unité $\beta$ : 61
<b>Inhibiteurs</b>	- 1,10-phénanthroline - Excès de $Fe^{2+}$	1,10-phénanthroline	- 1,10-phénanthroline - Excès de $Zn^{2+}$ - Excès d'acide laurique	- Acide 6-aminopénicillanique (non-compétitif) - Acide phénoxyacétique (compétitif)
<b>Co-activateur</b>	$Zn^{2+}$ ; Ni	$Co^{2+}$	$Zn^{2+}$ ; $Co^{2+}$	$Co^{2+}$
<b>Température optimale (°C)</b>	50	60	55	55
<b>pH optimal</b>	7-8	5,5-7,5	8-9	7,5-8,5
<b>Références</b>	Koreishi <i>et al</i> 2009b	Koreishi <i>et al</i> 2005b	Koreishi <i>et al</i> 2005a	Koreishi <i>et al</i> 2006

En 2007, le gène de *sm-PVA* a été cloné et séquencé (Zhang *et al.*, 2007). Le gène cloné a été exprimé chez *S. lividans* mais pas chez *Escherichia coli* en raison de la structure polypeptidique hétérodimérique de l'enzyme.

### 4.3 Les autres enzymes catalysant l'acylation en milieux aqueux

D'autres enzymes sont capables de catalyser la synthèse de molécules acylées dans des tampons aqueux. Elles seront évoquées dans ces travaux à titre de comparaison mais ne constituant pas le cœur du sujet, elles ne seront pas d'avantage développées.

#### 4.3.1 Les carboxyl-estérases

Les estérases sont capables de catalyser la synthèse de liaisons esters. L'équipe de Kremnický (2004) a mis en évidence une acétyl-estérase produite par *Trichoderma reesei*. Cette estérase est capable de réaliser une trans-acylation régio-sélective de  $\beta$ -D-xylopyranoside avec de l'acétate de vinyle dans de l'eau pure. Une autre carboxyl-estérase issue d'*Aspergillus niger*

catalyse une O-acylation régio-sélective de la catéchine mais en milieu organique (Sakai *et al.* 1994).

#### 4.3.2 Les acyl-transférases

Les acyl-transférases sont considérées comme des cas particuliers de lipases capables de catalyser la synthèse de molécules acylées en milieu tamponé aqueux ( $a_w > 9$ ). La structure des acyl-transférases change significativement d'une enzyme à l'autre, ce qui rend leur spécificité de substrat difficilement prédictible (Neang *et al.*, 2013). Cependant, leur conformation est hétéro-tétramérique avec une organisation typique, « en sandwich »,  $\alpha\beta\beta\alpha$ . L'agencement des résidus du site actif est relativement similaire chez toutes les acyl-transférases bien que certaines puissent fonctionner avec l'intervention d'une stabilisation oxyanionique (Elkins *et al.*, 2005). L'acyl-transférase issue de *Candida parapsilosis* possède 31% d'homologie avec CALA. La différence structurale majeure provient de la zone servant de « volet » chez la lipase A (Neang *et al.*, 2013). Cette acyl-transférase est capable de catalyser la synthèse de liaisons esters en tampon phosphate en présence de différents acides gras (ou de différents esters de méthyle d'acides gras) sous forme d'émulsion stabilisée avec l'hydroxyamine comme accepteur d'acyle (Lecointe *et al.*, 1996; Vaysse *et al.*, 1997). Mais elle peut également catalyser la N- $\alpha$ -acylation, comme le montre Husson *et al.*, (2011) avec la carnosine et l'oléate d'éthyle. Un rendement de 48% de conversion est atteint en 48h.

#### 4.4 Paramètres réactionnels influençant l'hydrolyse ou la synthèse de molécules acylées en milieux aqueux

Une réaction en milieu aqueux nécessite la prise en compte de certains paramètres influençant le taux de conversion comme le pH, la température, le choix du biocatalyseur et les effets d'activation ou d'inhibition de l'enzyme. L'influence de ces différents paramètres est discutée ci-après.



#### 4.4.1 La nature des milieux réactionnels aqueux

Les milieux aqueux utilisés pour les réactions d'acylation enzymatique sont souvent des solutions tamponnées comme des tampons borate, Clark & Lubs (Lin *et al.*, 2007), phosphate, acétate (Guranda *et al.*, 2004) ou TrisHCl (Koreishi *et al.*, 2005b). Ces milieux tamponnés permettent le maintien du pH malgré la libération d'espèces acides ou basiques pendant la réaction d'acylation. Cependant, en milieux aqueux, les acides gras qui sont hydrophobes se solubilisent difficilement, contrairement aux peptides ou aux acides aminés. Une solution envisageable consiste à ajouter des tensioactifs dans le milieu réactionnel pour favoriser la formation de micelles, petits et stables. Ces tensioactifs permettent d'augmenter la surface d'échange entre milieux hydrophobes et hydrophiles et favorisent les interactions entre l'enzyme et ses substrats. Une autre solution pour aider à la solubilisation des acides gras consiste à ajouter des solvants organiques dans le milieu. Wada *et al.* (2002) met en évidence une activité optimale pour la synthèse de N-lauroyl-acide aminés par l'acylase I porcine dans un milieu constitué de 12,5% d'eau et de glycérol.

##### 4.4.1.1 Le couple pH/Température

Le pH et la température sont des paramètres importants à maîtriser pour la mise en oeuvre de réactions de bioconversion en milieu aqueux. Le couple pH/température optimal d'une enzyme pour un milieu donné doit être établi afin d'éviter de travailler dans des conditions dénaturantes pour l'enzyme et pour atteindre le rendement maximum d'hydrolyse ou de synthèse de molécules acylées. Ces paramètres varient d'un biocatalyseur à l'autre. L'acylase I porcine a un pH optimal de 7-7,5 pour la réaction de synthèse de N-lauroyl-acide aminés (Wada *et al.*, 2002), l'aminoacylase issue de *Pyrococcus furiosus* a une activité maximale d'hydrolyse du N-acétyl-L-méthionine à 100°C, à un pH de 6,5 (Story *et al.* 2001) et l' $\epsilon$ -lysine acylase de *S. mobaraensis* atteint son activité maximale d'hydrolyse de N- $\epsilon$ -acétyl-L-lysine à un pH de 8 et à une température de 60°C (Koreishi *et al.*, 2005a) (Figure 10).

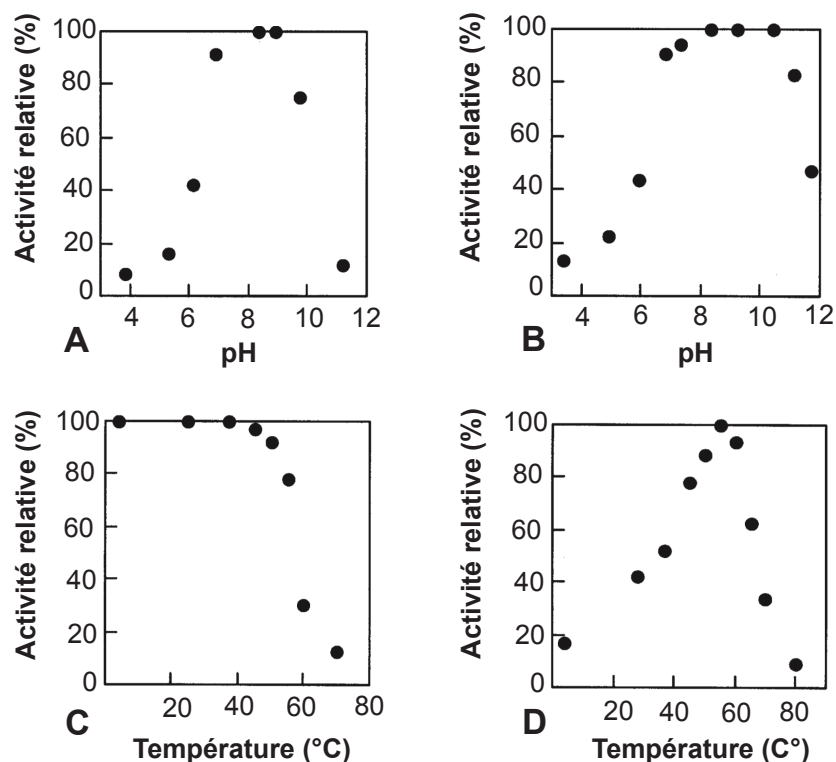


Figure 10 : Caractéristiques de l'ε-lysine acylase de *S. mobaraensis*. A : Influence du pH sur l'activité hydrolytique du N-ε-acétyl-L-lysine à 37°C. B : Stabilité de l'enzyme après une incubation pendant une heure à différents pH à 37°C. C : Stabilité thermique de l'enzyme après une incubation de une heure à différentes températures. D : recherche de température optimale pour une réaction d'hydrolyse de N-ε-acétyl-L-lysine à pH8. (Koreishi *et al.*, 2005a)

Le pH et la température ont également une influence sur les substrats. Le pH conditionne leur état d'ionisation. La réactivité de molécules telles que les peptides sera favorisée si le groupement intervenant dans la réaction a un caractère nucléophile. Il est donc nécessaire d'ajuster le pH afin d'éviter une protonation des fonctions réactives. La température influe, elle, sur la conformation des substrats. Dans le cas des lipides, leur conformation change en fonction de leur température de fusion. Cette température de fusion recouvre une large gamme de températures (-37°C à +70°C) et dépend de la taille de la chaîne carbonée et de la position et du nombre d'insaturations. Une élévation de température de réaction augmente la flexibilité des acides gras à longue chaîne (C<sub>14</sub>-C<sub>18</sub>) et, de fait, leur réactivité (Vaysse *et al.*, 2002).

#### 4.4.1.2 Les co-activateurs

Des familles d'enzymes peuvent nécessiter la présence de certaines molécules pour être actives. C'est le cas des aminoacylases qui sont, pour la plupart, des métallo-enzymes. Ce type d'enzymes est caractérisé par une activité améliorée en présence d'ions métalliques. Souvent, il s'agit d'ion zinc et d'ion cobalt, mais les ions manganèse et nickel peuvent aussi être réactifs (Koreishi *et al.*, 2005a, 2005b; Lin *et al.*, 2007; Story *et al.*, 2001; Toogood *et al.*, 2002). Les métallo-enzymes ont comme point commun la présence d'un ion métallique coordonné à la protéine permettant la fixation du substrat lors de la réaction enzymatique. Le ou les ions métalliques sont trouvés dans le site actif de la protéine, étant, en effet, impliqué dans la réaction enzymatique. La fonction exacte de cet ion métallique n'est pas clairement établie mais il semblerait qu'il ait un rôle structural et parfois catalytique. Quelques exemples de métallo-acylases sont présentés ci-dessous (Tableau 14).

**Tableau 14 : Acylases métallo-enzymes et leurs ions associés.**

Enzyme	Organisme source	Ions métallique associé à l'enzyme	pH optimal	Température optimale (°C)	Source
Aminoacylase	<i>S. mobarensis</i>	Co <sup>2+</sup> /Zn <sup>2+</sup>	5,5/8	60	Koreishi <i>et al</i> (2005b)
ε-lysine acylase	<i>S. mobarensis</i>	Mg <sup>2+</sup> /Co <sup>2+</sup>	8/9	55	Koreishi <i>et al</i> (2005a)
Aminoacylase (Sm-AA)	<i>S. mobarensis</i>	Zn <sup>2+</sup>	7,5	50	Koreishi <i>et al</i> (2009a)
L-aminoacylase	<i>Pyrococcus horikoshii</i>	Zn <sup>2+</sup> /Mn <sup>2+</sup>	8	95	Nishioka <i>et al</i> (2008)
L-aminoacylase	<i>Thermococcus litoralis</i>	Zn <sup>2+</sup>	8	85	Toogood <i>et al</i> (2002)
Aminoacylase carboxylas	<i>Deinococcus radiodurans</i> R1	Co <sup>2+</sup>	8	40	Lin <i>et al</i> (2007)
Aminoacylase	<i>P. furiosus</i>	Co <sup>2+</sup> /Zn <sup>2+</sup>	6,5	100	Story <i>et al</i> (2001)

Les ions métalliques peuvent également avoir un rôle de co-activateurs et améliorer l'activité enzymatique de la réaction des métallo-enzymes. Pour la caractérisation de métallo-enzymes telles que les aminoacylases, la recherche d'ions métalliques permettant une amélioration du rendement réactionnel est fréquente (Koreishi *et al.*, 2005a, 2005b; Lin *et al.*, 2007; Nishioka *et al.*, 2008; Story *et al.*, 2001; Toogood *et al.*, 2002). L'équipe de Nishioka *et al.* (2008) a mené une étude sur l'activité d'une aminoacylase issue de *Pyrococcus horikoshii* (*PhoACY*) (Tableau 15). Cette enzyme semble, en effet, avoir une activité améliorée en présence d'ions zinc et cobalt.

**Tableau 15 : Effet des ions métalliques sur l'activité de *PhoACY* (Nishioka *et al.*, 2008).**

Ions métallique ajoutés	Activité spécifique (U.mg <sup>-1</sup> )	
	wt- <i>PhoACY</i>	apo- <i>PhoACY</i> *
Pas d'ajout	121 ± 1.5	N.D.
Cu <sup>2+</sup>	24 ± 2	37 ± 3
Co <sup>2+</sup>	95 ± 3	92 ± 3
Zn <sup>2+</sup>	130±2.5	97±4
Mn <sup>2+</sup>	113±2	242±5
Ni <sup>2+</sup>	189±2	276±3.5

N.D : Non détectés.

\* l'acylase sans ion métallique constitutif (apo-*PhoACY*) a été préparée par dialyse contre le tampon TrisHCl 50mM, EDTA 20mM à pH8. Les activités enzymatiques ont été mesurées séparément pour chaque ion métallique 1mM. Une unité (U) correspond à la quantité d'enzyme nécessaire à la formation de 1µmol de L-méthionine par minute à une température de 90°C à partir de N-acétyl-L-méthionine.

#### 4.4.1.3 Les inhibiteurs

Les enzymes peuvent être inhibées de manière réversible ou irréversible. Toujours dans le cas de métallo-enzymes, les solvants de type détergents, ou ayant de fortes affinités pour les ions métalliques, peuvent dé-métalliser l'enzyme et l'inactiver. Lin *et al.*, (2007) inactivent l'acetylase de *D. radiodurans* en dialysant un extrait protéique contenant l'enzyme contre une solution contenant 10mM d'acide dipicolinique ou d'EDTA. Koreishi *et al.*, (2005a) utilisent du 1,10-phénanthroline pour inactiver la N-ε-acyl-L-lysine issue de *S. mobaraensis*. Cet acide est un agent chélatant qui peut former des complexes ioniques avec les ions métalliques et provoquer une perte d'activité d'environ 90% d'une métallo-enzyme.

L'équipe de Koreishi *et al.* (2009b) a également montré qu'un excès de donneur d'acyle pouvait conduire à la diminution des vitesses initiales de la réaction de synthèse de N-ε-lauroyl-L-lysine par l'acylase recombinée Sm-eLA de *S. mobaraensis*. Cette inhibition est constatée avec différentes réactions de synthèse de lysine lauroylée lors desquelles la concentration initiale d'agent acylant est augmentée. Cette hypothèse est confirmée lors de la mise en oeuvre de la réaction en mode semi-continu. L'ajout progressif d'acide laurique tout au long de la réaction permet de limiter la concentration résiduelle en agent acylant dans le milieu réactionnel, ce qui induit une amélioration de la vitesse initiale de l'enzyme et du taux de production de N-ε-lauroyl-L-lysine. Enfin, malgré une activation de l'enzyme possible par

le zinc, un excès du même ion peut entraîner une inactivation de l'enzyme en raison d'interactions non spécifiques (Koreishi *et al.*, 2005a).

## **5 Sélectivité d'acylation enzymatique en solvants organiques. Exemple : CALB**

Les principaux atouts des enzymes sont leurs propriétés de sélectivité et spécificité vis-à-vis de leurs substrats. Ces propriétés suscitent l'intérêt de nombreuses études car elles permettent d'éviter des étapes de protection/déprotection de groupements chimiques. La spécificité d'une enzyme correspond à l'aptitude de l'enzyme à catalyser la synthèse d'un produit à partir d'un substrat unique. La sélectivité correspond, quant à elle, à la capacité des enzymes à catalyser la synthèse d'un produit donné quand la formation de plusieurs produits est possible. Il existe différents types de sélectivité :

- La régio- sélectivité : les enzymes sont capables d'agir sur un groupement spécifique parmi plusieurs groupements de même nature se différenciant uniquement par leur positionnement dans une même molécule.
- La chimio-sélectivité : les enzymes peuvent agir spécifiquement, par un même mécanisme, sur un type de groupement parmi différents groupements fonctionnels contenu dans une même molécule ou dans plusieurs molécules en compétition.
- La stéréo-sélectivité : les enzymes sont capables de favoriser la formation d'un produit à stéréochimie spécifique. Quand les stéréo-isomères sont des énantiomères, le phénomène est appelé énantio-sélectivité.

La sélectivité et la spécificité varient beaucoup d'une enzyme à l'autre. Elles dépendent avant tout de la nature du biocatalyseur, mais aussi d'autres facteurs comme la structure des substrats ou leur état d'ionisation. Pour aborder cette spécificité des enzymes, la suite de l'étude sera focalisée sur l'enzyme CALB.

## 5.1 Étude de la sélectivité d'acylation enzymatique de CALB

La sélectivité enzymatique peut être étudiée par modélisation pour les enzymes de structure connue. Les lipases sont des protéines de taille comprise entre 20 et 60 kDa et appartiennent à la famille des  $\alpha/\beta$ -hydrolases. Leur structure se compose d'un feuillet  $\beta$  central hydrophobe entouré d'hélices  $\alpha$  amphiphiles (Figure 11).



**Figure 11 : Structure moléculaire de CALB. En rouge sont représentées les structures secondaires en hélices  $\alpha$ , en vert les hélices  $\pi$  et en bleu les feuillets  $\beta$  (Uppenberg *et al.*, 1994a).**

La cavité catalytique de certaines lipases peut être recouverte par une hélice  $\alpha$  appelée volet, « lid » ou encore « flap ». Ce volet peut littéralement ouvrir et fermer l'ouverture de la cavité catalytique dans un mouvement de type charnière, rendant totalement inaccessible le site actif de la lipase lorsque celui-ci est dans sa conformation dite « fermée ». Généralement, les lipases adoptent la conformation « fermée » dans les milieux aqueux. L'ouverture se fait lorsque la lipase se situe à une interface hydrophile/hydrophobe. Ce phénomène est appelé « activation interfaciale » (Derewenda, 1994). Le site actif des lipases est constitué de trois résidus complété par deux autres formant le « trou oxyanionique ». La triade de résidus catalytiques des lipases est formée d'une sérine, d'une histidine et d'un acide aspartique ou d'un acide glutamique. Ce triplet d'acides aminés est situé au fond de la cavité catalytique et conserve une géométrie similaire d'une lipase à l'autre. Le trou oxyanionique est constitué de deux résidus, dont la nature varie selon la lipase, qui stabilisent, par des liaisons hydrogènes, l'intermédiaire tétraédrique formé par le substrat dans la poche catalytique. Cette poche

catalytique est composée de deux parties. Une partie plutôt hydrophobe qui accueille le substrat donneur d'acyle et une seconde partie hydrophile qui accueille l'accepteur d'acyle. La taille et la forme de la poche du site actif diffèrent énormément d'une lipase à l'autre. Cette variation peut expliquer les différences de spécificité et de sélectivité des lipases (De Oliveira *et al.*, 2009). La plupart des lipases sont caractérisées par une haute énanti-sélectivité. Elles sont d'ailleurs fréquemment utilisées pour la racémisation de solutions d'énantiomères (Csomos *et al.*, 2000; Gill *et al.*, 2007; Lafaquière *et al.*, 2009; Vongvilai *et al.*, 2011). Les lipases ont, de plus, des propriétés de régio- et de chimio-sélectivité qui leur permettent d'acyler spécifiquement un groupement ou une position particulière d'un groupement dans une molécule polyfonctionnelle.

Parmi les lipases, l'enzyme la plus étudiée et la plus utilisée est CALB. C'est une hydrolase de type  $\alpha/\beta$  élucidée par cristallographie et diffraction aux rayons X par Uppenberg *et al.*, (1994b). C'est une enzyme d'un poids moléculaire de 33 kDa formée de 317 résidus aminoacides. Sa structure centrale est composée de 7 brins  $\beta$  dont le premier est antiparallèle aux six autres. Ces brins  $\beta$  centraux sont séparés par 10 hélices  $\alpha$  et 15 segments de boucle. 2 autres brins  $\beta$  sont situés à l'extrémité C-terminale de la protéine et adoptent une conformation en épingle à cheveux (Figure 12).

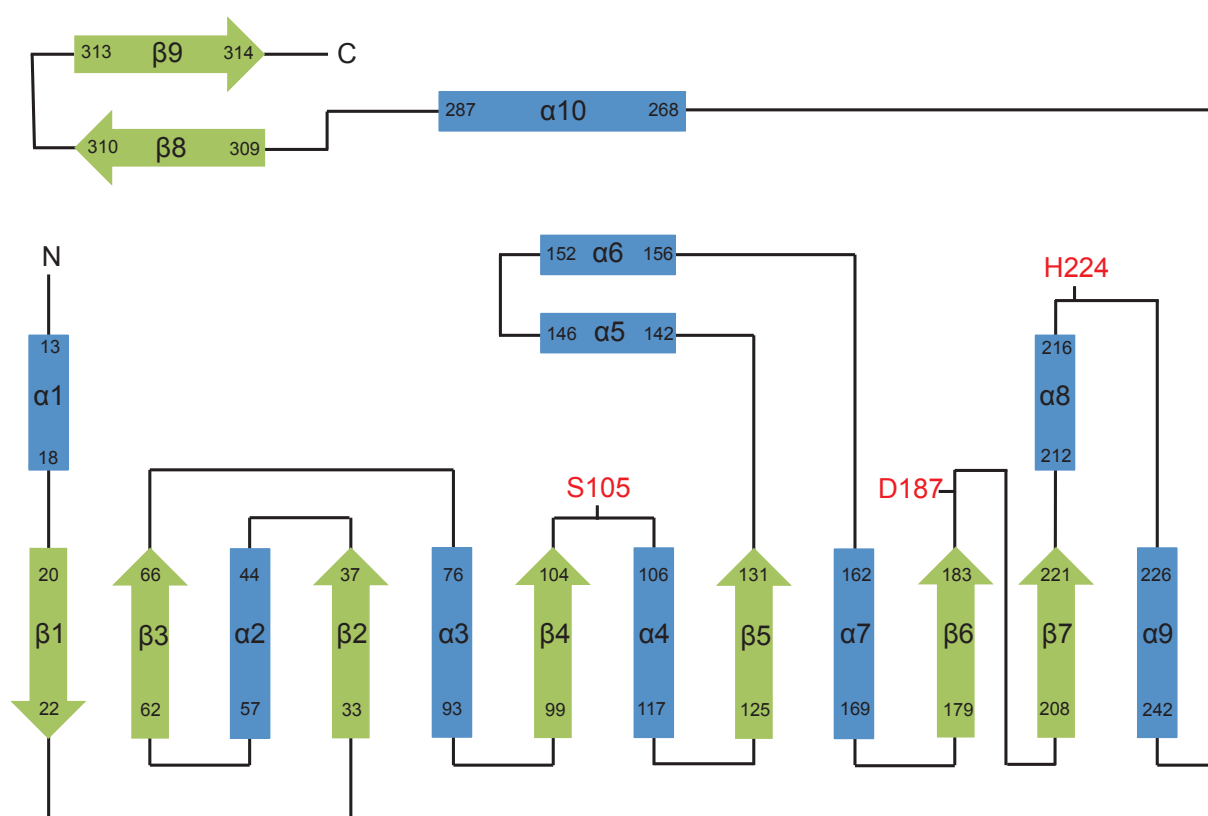
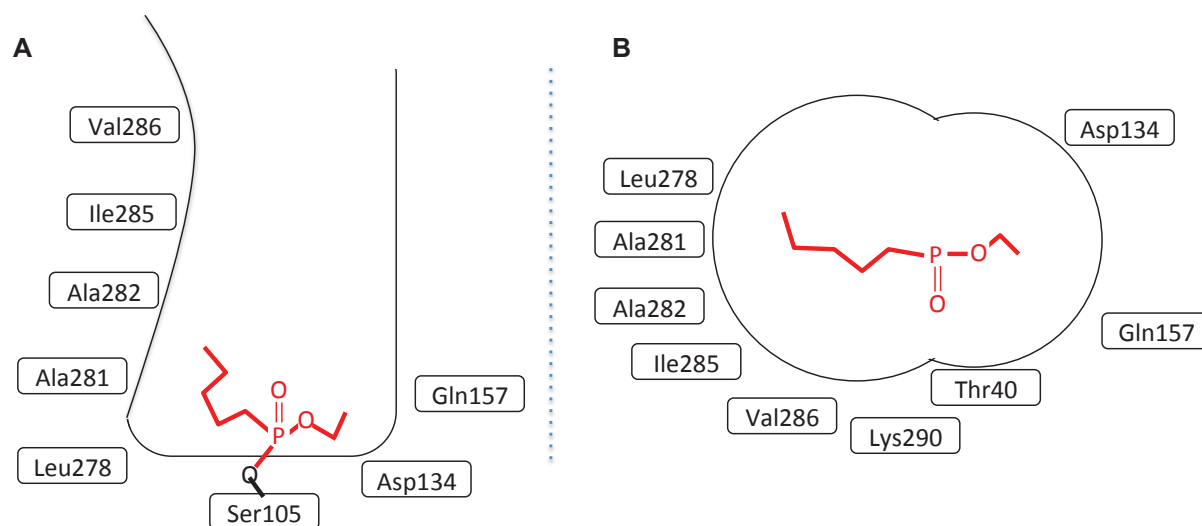


Figure 12 : Diagramme de la structure secondaire de CALB (Uppenberg *et al.*, 1994a).

La structure de CALB contient 6 cystéines qui forment les ponts disulfures suivants : Cys22-Cys64, Cys216-Cys258 et Cys293- Cys311. Le site actif de l'enzyme est composé de deux ensembles : une triade catalytique comprenant les résidus Ser105-His 224-Asp187 et un groupe de 2 résidus constituant le trou oxyanionique (Gln106-Thr40). Ces derniers interviennent dans le mécanisme de catalyse de CALB en orientant correctement le carbonyle du donneur d'acyle de manière à favoriser l'attaque nucléophile de l'accepteur d'acyle ; ils induisent un arrangement spatial spécifique en créant 2 ou 3 liaisons hydrogènes provenant des amides du squelette peptidique des résidus Thr40 et Gln106. La sérine catalytique (Ser 105) est située au fond d'une profonde et étroite cavité de 10 Å x 4 Å de large et de 12 Å de profondeur (Uppenberg *et al.*, 1994a, 1995). Cette cavité est composée de 2 régions destinées à accueillir le donneur d'acyle d'une part et l'accepteur d'acyle d'autre part. Les résidus constituant la région recevant le donneur d'acyle sont les suivants : Leu140, Ala141, Leu144, Val149, Ser150, Ala151, Val154, Ile189, Lys290, Leu278, Ala281, Ala282, Ile285 et Ala286. Ils sont hydrophobes et ne contiennent pas de résidus aromatiques. L'autre partie de la cavité catalytique correspond à une petite région polaire proche de la Ser 105, constituée des résidus Thr40, Asp134 et Gln157 (Figure 13) (Pleiss *et al.*, 1998).



**Figure 13 : Schéma de la poche catalytique du cristal 1LBS de CALB contenant l'inhibiteur compétitif N-ester hexylphosphonate d'éthyle (en rouge). A : Vue de profil. B : Vue de dessus.**

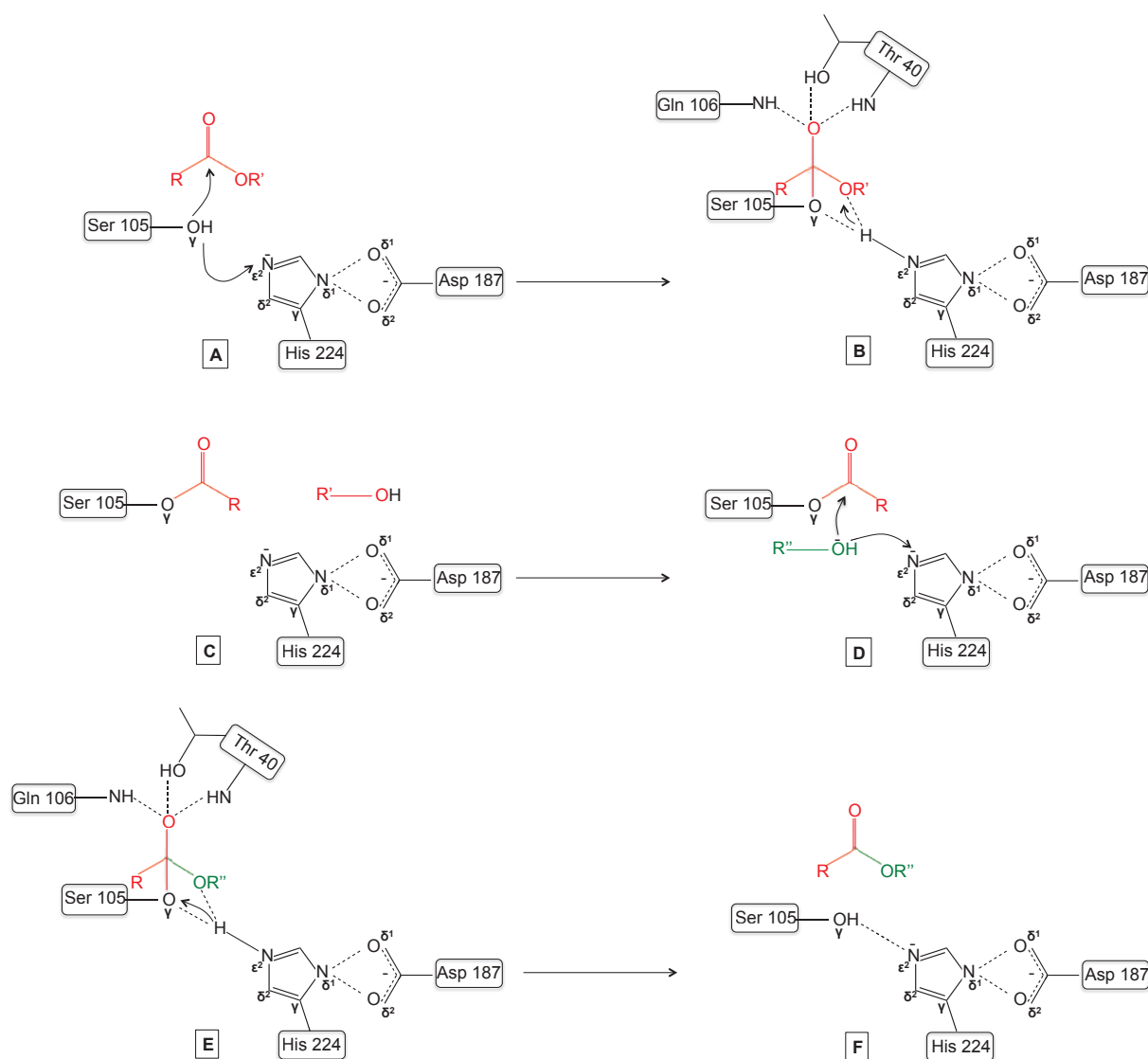
Une étude de Fuentes (2004) s'intéressant à la plasticité de CALB et à son rôle dans le mécanisme de catalyse avance une autre hypothèse. L'étude porte sur le suivi de l'évolution



de la modification des distances interatomiques entre les atomes du site actif, de la distribution des atomes dans l'espace du site actif et du changement de géométrie de la poche catalytique suite à l'insertion d'un sucre et d'une chaîne grasse (C11 : acide laurique). Les résultats de cette étude suggèrent qu'il serait plus juste de considérer la cavité catalytique de CALB comme une unique poche capable de changer sa conformation en fonction des substrats par des réarrangements locaux (Fuentes *et al.*, 2004). Dans cette même étude, il est décrit que, contrairement à la plupart des lipases, CALB ne possède pas un volet mobile clairement identifié capable de réguler l'accès au site actif. Cette hypothèse avait été avancée en 1995 par Martinelle and Hult, dans une étude sur la vitesse de réaction de CALB pour l'hydrolyse de l'acétate de p-nitrophényle à différentes concentrations en milieu aqueux. Pour de faibles concentrations en substrat où les molécules sont trop peu nombreuses pour former des agrégats (concentration micellaire critique), CALB conserve une cinétique de réaction de type Michaelis-Mentens, là où d'autres enzymes possédant un couvercle ont été inactivées. CALB ne présente donc pas d'activation interfaciale caractéristique des enzymes possédant un volet. Toutefois, des études ont montré que les hélices  $\alpha 5$  et  $\alpha 10$  situées à la surface de l'enzyme et au bord de la poche sont des régions flexibles de la protéine pouvant constituer un volet potentiel (Trodler and Pleiss, 2008). L'hélice  $\alpha 5$  possède d'ailleurs une conformation non définie dans la structure 1TCC (Uppenberg *et al.*, 1994a, 1995). Cette mobilité pourrait permettre à cette dernière de recouvrir partiellement la cavité du site actif (Kumaresan *et al.*, 2011). D'autre part, une étude menée par Skjot *et al.*, (2009) a montré que des mutations des séquences autour de l'hélice  $\alpha 5$  avaient un impact significatif sur l'activité et l'énantio-sélectivité de l'enzyme. Il a été observé par dynamique moléculaire que l'hélice se déroulait et que la boucle résultante se déplaçait vers l'hélice  $\alpha 10$ , bloquant ainsi l'accès au site actif. Toutefois, aucune donnée expérimentale n'a confirmé cette théorie. Les hélices  $\alpha 5$  et  $\alpha 10$  ne semblent pas adopter la dynamique d'un volet mais sont néanmoins d'une importance capitale pour expliquer les propriétés catalytiques de CALB.

### 5.1.1 Mécanisme d'action de CALB

Le mécanisme de catalyse des lipases est proche de celui des sérine-protéases, appelé mécanisme bi bi ping-pong. Il est communément admis que l'état de transition enzyme/substrats/produits des lipases passe par la constitution d'intermédiaires tétraédriques (Fuentes *et al.*, 2004). Ce mécanisme est schématisé Figure 14:



**Figure 14 : Mécanisme de catalyse d'acylation de CALB. A : Conformation native de l'enzyme et approche du substrat donneur d'acyle ; B : Formation du 1er intermédiaire tétraédrique ; C : Relargage du coproduit et formation de l'acyl-enzyme ; D : Attaque de l'accepteur d'acyle ; E : Formation du 2nd intermédiaire tétraédrique ; F : Libération du produit acylé et retour à la conformation initiale de l'enzyme.**

Le substrat donneur d'acyle entre dans la cavité catalytique et le proton du groupement hydroxyle est transféré à l'atome d'azote en position  $\epsilon^2$  de l'imidazole de l'histidine 224 (Figure 14A). Le donneur d'acyle réalise alors une attaque nucléophile sur la sérine 105 formant ainsi le premier intermédiaire tétraédrique (Figure 14B). L'oxyanion est orienté et stabilisé par trois liaisons hydrogènes établies avec les résidus du trou oxyanionique (thréonine 40 et glutamine 106). Le coproduit de la réaction de type alcool est ensuite relargué,

quittant le complexe alors appelé acyl-enzyme (Figure 14C). Le substrat accepteur d'acyle entre ensuite dans le site actif et transfère un proton de la fonction à acyler à l'azote en position  $\epsilon^2$  de l'histidine 224 augmentant ainsi sa nucléophilie (Figure 14D). Ce groupement activé effectue à son tour une attaque nucléophile sur le carbonyle de l'acyl-enzyme formant ainsi le second intermédiaire tétraédrique (Figure 14E). Le produit acylé est alors relargué, lorsque le proton de l'azote en position  $\epsilon^2$  de l'imidazole de l'histidine 224 est transféré à la sérine 105 et CALB se retrouve à nouveau dans son état initial (Figure 14F).

Le rôle de l'aspartate 187 est d'augmenter la basicité de l'histidine 224 grâce au champ électrique de sa chaîne latérale. Celle-ci active à son tour le groupement hydroxyle de la chaîne latérale de la sérine catalytique via une liaison hydrogène (Figure 14F).

### 5.1.2 Sélectivité et spécificité de substrat de CALB

#### 5.1.2.1 Influence de l'état d'ionisation du substrat sur la spécificité de CALB

La nature du milieu est l'un des paramètres réactionnels influant sur l'état d'ionisation et sur la nucléophilie des groupements acylables. Par conséquent, la sélectivité de la réaction catalysée par CALB varie selon les milieux réactionnels. Husson *et al.* (2008) le démontrent en étudiant l'acylation du 6-amino-1-hexanol dans différents milieux réactionnels. Il a été montré qu'en solvant organique, dans des liquides ioniques et dans des milieux fondus composés d'esters d'acide gras, la réaction favorisée est la formation de produits di-acylés (N-O, diacyl-6-amino-1-hexanol). En revanche, en milieu fondu composé d'acides gras, seule l'acylation de la fonction alcool du substrat est catalysée (O, monoacyl-6-amino-1-hexanol), la fonction amine se trouvant dans un état protoné non-réactif. De même, Le Joubioux et son équipe (2013a) ont étudié la sélectivité de CALB pour trois amino-alcools dans trois milieux réactionnels différents. Il a été mis en évidence que la nature du milieu de réaction induit une modification de la sélectivité de la réaction catalysée par l'enzyme (Tableau 16).

**Tableau 16 : Constante catalytique de CALB pour la O- ou la N-acylation de substrats polyfonctionnels dans différents milieux réactionnels (Le Joubioux *et al.*, 2013a).**

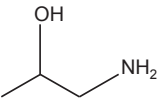
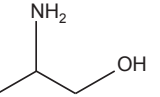
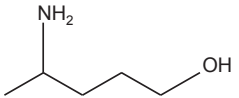
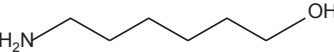
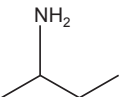
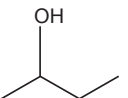
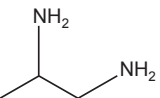
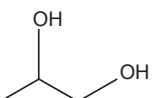
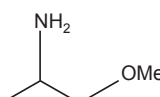
Accepteur d'acyle	Solvant	Constante catalytique de production de substrat O-acylé (min <sup>-1</sup> )	Constante catalytique de production de substrat N-acylé (min <sup>-1</sup> )
Alaninol	N-Hexane	14	114
	alcool tert-amylique	Non détecté	51
	Bmim[PF <sub>6</sub> ]	2	27
4-amino-pentanol	N-Hexane	231	0 <sup>a</sup>
	alcool tert-amylique	86	13
	Bmim[PF <sub>6</sub> ]	27	0 <sup>a</sup>
6-amino-hexanol	N-Hexane	539	1
	alcool tert-amylique	126	12
	Bmim[PF <sub>6</sub> ]	41	0 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>: Produit acylé en trop faible concentration pour être quantifié.

#### 5.1.2.2 Influence de la structure de l'accepteur d'acyle :

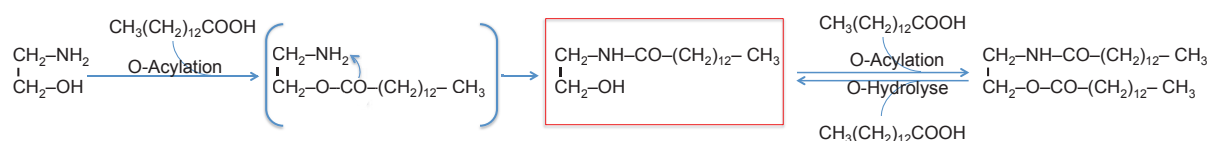
En milieu organique, plusieurs études ont montré que la spécificité d'acylation de molécules linéaires présentant plusieurs sites potentiels d'acylation de nature différente, comme les amino-alcools, dépend de la structure de l'accepteur d'acyle (Furutani *et al.*, 1996; Gotor *et al.*, 1988; Maugard *et al.*, 1998; Tawaki and Klivanov, 1993). Plus précisément, il a été montré que le nombre de carbone constituant la chaîne carbonée séparant un groupe OH et un groupe NH<sub>2</sub> influe sur la chimio-sélectivité de CALB. Une chaîne carbonée courte (inférieure ou égale à trois carbones) comme celle de l'alaninol ou de l'éthanolamine induit majoritairement une N-acylation, alors qu'une chaîne carbonée plus longue (4 atomes de carbone et plus) comme celle du 4-amino-1-pentanol ou du 6-amino-1-hexanol induit une catalyse plus importante d'O-acylation (Tableau 17) (Le Joubioux *et al.*, 2013b; Syren *et al.*, 2013; Tufvesson *et al.*, 2007).

**Tableau 17 : Activités spécifiques de CALB pour de la N- ou O-acylation dans du M<sub>2</sub>B<sub>2</sub> à 55°C avec de l'acide myristique comme donneur d'acyle (Syren *et al.*, 2013).**

	Accepteur d'acyle	Constante catalytique de N-acylation (min <sup>-1</sup> )	Constante catalytique de O-acylation (min <sup>-1</sup> )
Amino-alcool		29	N.D
	1-amino-2-propanol		
		50	N.D
	alaninol		
Amino-alcool		13	85
	4-amino-1-pentanol		
		12	130
Substrat mono-fonctionnel		2,3	-
	2-butylamine		
Substrat mono-fonctionnel		-	54
	2-butanol		
Diol- et Diamine-		89	-
	1,2-diaminopropane		
Diol- et Diamine-		-	320
	1,2-propanediol		
Contrôle négatif		19	N.D
	méthoxy-2-propylamine		

N.D : non détecté.

Ce comportement est, à première vue, surprenant car les lipases sont plus spécifiques des liaisons esters (Kanerva *et al.*, 1992). Cependant, dans la littérature, une hypothèse est émise comme quoi CALB ne catalyse qu'une acylation du groupement hydroxyle et que la N-acylation observée pour les substrats à courte chaîne résulte d'un transfert d'acyle intramoléculaire de la fonction alcool à la fonction amine (Furutani *et al.*, 1996; Kanerva *et al.*, 1992). Selon cette hypothèse, ce transfert d'acyle se ferait de plus en plus lentement à mesure que la longueur de la chaîne carbonée du substrat augmente. Furutani *et al.*, (1996) ont étudié ce transfert intramoléculaire d'acyle avec la lipase QL de *Alcaligenes* sp. et l'acylation d'éthanolamine avec de l'acide myristique (C14). La lipase QL possède une activité forte d'estérification ou de transestérification en solvant organique et une activité hydrolytique également forte en tampon aqueux. Lors de la synthèse de myristoyl-éthanolamine dans du M<sub>2</sub>B<sub>2</sub> catalysée par la lipase QL, Furutani *et al.*, (1996) n'observent que la formation d'éthanolamine monoacylé sur la fonction amine de l'amino-alcool. La formation d'un tel produit est expliquée par une estérification du substrat, suivie immédiatement d'un transfert intramoléculaire O-N de la chaîne myristoyle du groupement hydroxyle au groupement amine (Figure 15). L'absence de di-acylation du substrat peut s'expliquer de deux façons. Premièrement, il est possible que l'éthanolamine une fois acylé ne soit pas disponible pour une seconde acylation du fait de la présence de la chaîne carbonée liée à son groupement amine. Et deuxièmement, si une seconde O-acylation est possible, la libération de molécules d'eau lors des premières estérifications favorise l'activité hydrolytique de la lipase QL qui clive uniquement les liaisons esters (Furutani *et al.*, 1996) (Figure 15).



**Figure 15 : Mécanisme de N-acylation de l'éthanolamine avec de l'acide myristoyl catalysé par une lipase spécifique de la O-acylation : Lipase QL de *Alcaligenes* sp. (Furutani *et al.*, 1996).**

Plus récemment, des études ont discuté cette théorie de transfert intramoléculaire en s'intéressant à l'acylation de l'alaninol et de ses dérivés avec de l'acide myristique, catalysée par CALB (Le Joubioux *et al.*, 2013b; Syren *et al.*, 2013). Il a été observé, d'une part, que le taux de conversion d'alaninol N-acylé est inférieur à celui d'une molécule structurellement

identique mais ne comprenant pas de groupement hydroxyle, le 2-butylamine. CALB est donc capable de catalyser une N-acylation. La même équipe montre, d'autre part, que le transfert naturel d'acyle du groupement hydroxyle au groupement amine d'un amino-alcool a une vitesse de transfert inférieure d'un ordre de magnitude 1 ou 2 à la vitesse de production d'alaninol N-acylé. Dans ces conditions, une forte accumulation de O-acyl-alaninol devrait être observée, mais malgré une analyse des constituants du milieu réactionnel par chromatographie LC/MS-ES, aucune O-acylation n'est détectée. La N-acylation de l'alaninol ne peut donc pas être expliquée par un transfert intramoléculaire d'acyle.

La proposition avancée par l'équipe de Le Joubioux (2013b) est qu'un groupe nucléophile en position  $\beta$  par rapport au groupement amine augmente la vitesse spécifique d'acylation de ce dernier par une interaction intramoléculaire de type liaison hydrogène. Cette interaction ne peut se créer lorsque l'espacement est trop grand entre les deux groupements pour des problèmes d'énergie entropique. Cette hypothèse est vérifiée par le calcul des activités spécifiques d'acylation des dérivés d'alaninol (Tableau 18).

**Tableau 18 : Activités spécifiques d'acylation de CALB pour des substrats polyfonctionnels (Le Joubioux *et al.*, 2013b).**

	Accepteur d'acyle	Activité spécifique de N-acylation (mmol.h <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> )	Activité spécifique de O-acylation (mmol.h <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> )
Amino-alcool	1-amino-2-propanol	2,5	-
	alaninol	4,3	-
	4-amino-1-pentanol	1,1	7,3
	6-amino-1-hexanol	1	10
Substrat mono-fonctionnel	2-butylamine	0,2	-
Diamine-	1,2-diaminopropane	7,6	-
Contrôle négatif	méthoxy-2-propylamine	1,6	-

Les activités spécifiques de N-acylation sont plus élevées pour les molécules portant plusieurs sites d'acylation que pour les molécules n'en comportant qu'un seul, qui ne peuvent pas former de liaison hydrogène intramoléculaire. Un groupement amine étant plus nucléophile

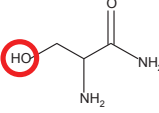
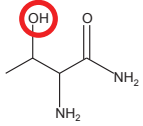
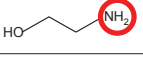
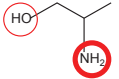
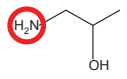
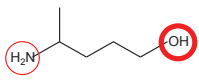
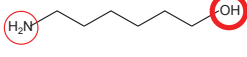
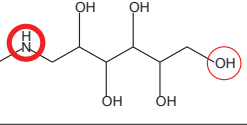
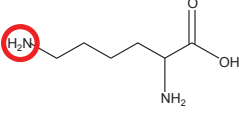
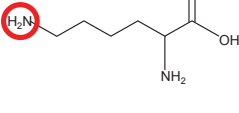
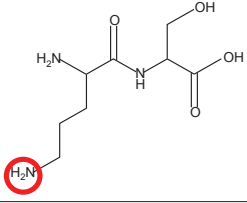
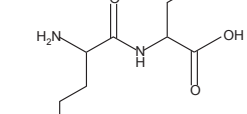
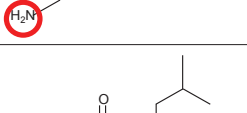
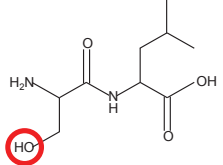
qu'un groupement hydroxyle qui est lui même plus nucléophile qu'un groupement méthyle, il est logique d'observer ce classement des activités spécifiques ( $V_{\max}$ ) croissantes :  $V_{\max}$  1,2-diaminopropane ( $7,6 \text{ mmol.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ )  $>$   $V_{\max}$  alaninol ( $4,3 \text{ mmol.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ )  $\approx$   $V_{\max}$  isopropanolamine ( $2,5 \text{ mmol.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ )  $>$   $V_{\max}$  11-méthoxy-2-propylamine ( $1,6 \text{ mmol.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ )  $>$   $V_{\max}$  butylamine ( $2,5 \text{ mmol.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ ).

Concernant des molécules polyfonctionnelles structurellement plus complexes comme les acides aminés ou les peptides, des études montrent que leur structure influe également sur la sélectivité de CALB. La sélectivité de la réaction d'acylation de la lysine en solvant organique est exclusivement orientée vers l'acylation du groupement amine de la chaîne latérale de la lysine (Montet *et al.*, 1990; Soo *et al.*, 2004; Valivety *et al.*, 1997). Cette régio-/chimio-sélectivité s'explique, d'une part, par la forte nucléophilie de ce groupement, d'autre part, par la faible réactivité des groupements N-terminaux des acides aminés en solvants organiques pour les réactions catalysées par les lipases (Izumi *et al.*, 1997). D'autres études démontrent que CALB acyle spécifiquement le groupement hydroxyle de la chaîne latérale de la sérine si elle est structurellement modifiée sur ses extrémités N- ou C-terminales : CALB catalyse la O-acylation du L-sérinamide avec l'acide laurique avec un rendement de plus de 93% (Zhang *et al.*, 2005) et la O-acylation du N-carbobenzyloxy-L-sérine avec l'acide myristique avec un rendement de 92% (Valivety *et al.*, 1997). Cependant, lorsque la lysine et la sérine sont liées au sein d'un même dipeptide, seule la fonction amine de la chaîne latérale de la lysine est acylée. La chaîne latérale de la sérine n'est jamais acylée. Cette même tendance a été observée dans du 2-méthyl-2-butanol, de l'acide oléique et dans le liquide ionique  $[\text{Bmim}]^+[\text{PF}_6]^-$ . Cette sélectivité peut être expliquée par une restriction due à la forme longue et étroite de la cavité catalytique de CALB ou par la proximité du groupement carboxylique de l'extrémité C-terminale du peptide. Ce groupement possédant une forte propriété électro-attractrice peut diminuer la réactivité du groupement hydroxyle de la chaîne latérale de la sérine (Husson *et al.*, 2009).

CALB possède donc une chimio-sélectivité pour les groupements amines et hydroxyles de molécules polyfonctionnelles et une régio-sélectivité qui empêche l'acylation de certains groupements comme les groupes  $\text{NH}_2$  en position N-terminale des peptides. Différentes spécificités d'acylation sont présentées dans le Tableau 19. Il serait, dès lors, intéressant d'étudier la structure de CALB pour expliquer cette sélectivité.



**Tableau 19 : Quelques exemples d'acylations chimio- et régio-sélectives de molécules polyfonctionnelles catalysées par CALB. DA : donneur d'acyle, AA : accepteur d'acyle.**

Accepteur d'acyle	Donneur d'acyle	Paramètres réactionnels				Références
		Solvant	Ratio molaire DA/AA	Température de réaction (°C)	Temps de réaction (h)	
	Acide laurique	M <sub>2</sub> P <sub>2</sub>	5	50	96	Zhang <i>et al.</i> , 2005
	Acide laurique	M <sub>2</sub> B <sub>2</sub>	7	50	96	
	Acide laurique	Acide laurique	1	90	12	Tufvesson <i>et al.</i> , 2007
	Acide myristique	Acide tret-aluminique	1	55	96	Le Joubioux <i>et al.</i> , 2013b
	Acide myristique	N-Hexane	2	55	96	Le Joubioux <i>et al.</i> , 2013a
	Acide myristique	N-Hexane	2	55	96	
	Acide myristique	N-Hexane	2	55	96	
	Acide oléique	M <sub>2</sub> B <sub>2</sub>	0,5	90	10	Maugard <i>et al.</i> , 1998
	Acide palmitique	Hexane	3	70	96	Soo <i>et al.</i> , 2004
	Acide oléique	Hexane	3	57	96	
	Acide oléique	M <sub>2</sub> B <sub>2</sub>	2	55	96	Husson <i>et al.</i> , 2009
		Acide oléique	2	55	96	
		[Bmim] <sup>+</sup> [PF <sub>6</sub> ] <sup>-</sup>	2	55	96	
	Acide oléique	M <sub>2</sub> B <sub>2</sub>	2	55	96	

### 5.1.3 Etude de la sélectivité de CALB par modélisation moléculaire

#### 5.1.3.1 Introduction

La modélisation moléculaire est une discipline récente qui regroupe un ensemble de techniques permettant de modéliser ou d'imiter le comportement de molécules. Les outils qu'elle propose sont très utilisés pour obtenir des détails structuraux sur le fonctionnement de la catalyse enzymatique, non-accessibles par les outils expérimentaux classiques de l'enzymologie. CALB a été étudiée à travers différentes études avec des objectifs variés (Tableau 20).

**Tableau 20 : Exemple d'étude de modélisation moléculaire avec CALB.**

Accepteur d'acyle	Objectif	Outils de modélisation moléculaire	Références
-	Etude du comportement de CALB en solvant organiques	Dynamique moléculaire, simulation hybride (QM/MM)	Li <i>et al.</i> , 2010
-	Etude de la plasticité de l'hélice 5 et 10 de CALB	Dynamique moléculaire	Skojt <i>et al.</i> , 2009
Prostaglandine	Etude de l'acétylation de prostaglandine stéréo-isomériques.	Dynamique moléculaire	Vallikivi <i>et al.</i> , 2005
Propanoate de méthyl, 1-propanol	Etude de l'influence de solvant comme inhibiteurs compétitif pour CALB	Dynamique moléculaire	Graber <i>et al.</i> , 2007
2',3',5'-tri-O-acétyluridine	Etude de la désacétylation régio-sélective de 2',3',5'-tri-O-acétyluridine par CALB.	Dynamique moléculaire	Gudino <i>et al.</i> , 2012
Thymidine	Etude de la régio-sélectivité de l'acylation de thymidine catalysée par CALB	Placement géométrique optimisés	Lavandera <i>et al.</i> , 2005
Dioléine	Etude de l'effet du solvant sur la sélectivité de CALB pour la synthèse de dioléine.	Dynamique moléculaire	Duan <i>et al.</i> , 2011
Phényléthanamine	Etude de la N-acylation sélective de phényléthanamine par CALB	Minimisation, observations	Cammeberg <i>et al.</i> , 2006
Amino-alcools	Etude prédictive d'entio-sélectivité de CALB	Dynamique moléculaire	Raza <i>et al.</i> , 2001
Acides gras fissibles	Etude du site de fixation d'acide fissible dans le site actif de lipases	Docking et METYL PROBE	Pleiss <i>et al.</i> , 1998
Amino-alcools	Etude de l'intermédiaire tétraédrique du mécanisme d'acylation de CALB	Analyse d'énergie libre d'activation, DFT	Syren <i>et al.</i> , 2013

Les études de modélisation moléculaire ont permis d'élaborer de nouvelles approches quant à la compréhension du mécanisme de catalyse de CALB. Ces études peuvent être classées en trois domaines d'investigation : les études s'intéressant à l'impact du solvant sur l'activité catalytique de l'enzyme, les études analysant la structure et le mécanisme d'acylation de CALB et enfin, les études sur la sélectivité de CALB envers la N- ou la O-acylation. Ces études sont brièvement décrites ci-dessous.

### 5.1.3.2 *Etude de l'effet des solvants réactionnels sur l'activité catalytique de CALB*

Plusieurs équipes ont étudié l'effet du solvant réactionnel sur l'activité enzymatique de CALB. Graber *et al.* (2007) ont identifié avec des analyses de trajectoires de dynamiques moléculaires, les raisons pour lesquelles des solvants tels que les cétones et les alcools tertiaires inhibent la catalyse de la réaction d'acylation. Pour la trans-acylation du propanoate de méthyle avec du 1-propanol catalysée par CALB dans différents mélanges gaz/liquide (2-pentanone, 3-pentanone, 2-méthyl-2-pentanol, 3-méthyl-3-pentanol, 2-méthylpentane et 3-méthylpentane), l'inhibition observée en présence de cétones ou d'alcools tertiaires n'est pas due à une déformation de la protéine. Bien que cette hypothèse ait été admise pendant longtemps, l'inhibition serait due à des interactions de type « inhibiteur compétitif » des molécules de solvant avec l'enzyme. En effet, au cours des dynamiques moléculaires, les molécules de solvant viennent se positionner dans le site actif de l'enzyme pour y rester fixées et jouer un rôle d'inhibiteurs compétitifs.

L'équipe de Duan (2011) montre en utilisant les mêmes outils de modélisation moléculaire que l'augmentation de la polarité du solvant réactionnel permet d'orienter l'acylation du glycérol avec l'acide oléique vers une sélectivité du groupement hydroxyle  $sn^2$  au détriment du groupement hydroxyle  $sn^1$ .

Enfin, Gudino *et al.* (2012) démontrent toujours avec des analyses de dynamique moléculaire l'effet allostérique de l'éthanol sur la catalyse de la désacétylation du 2', 3', 5'-tri-O-acetyluridine à partir d'un certain rapport (enzyme)/(éthanol).

### 5.1.3.3 *Analyses structurales et mécanisme d'acylation catalysée par CALB*

L'utilisation d'outils de modélisation moléculaire a permis d'observer certains comportements conformationnels de CALB en solvant et d'identifier les conditions nécessaires au placement d'un ligand pour une acylation fonctionnelle.

A travers des dynamiques moléculaires de 10 ns réalisées avec le cristal 1TCA de CALB, Skjot *et al.*, (2009) ont mis en évidence la grande mobilité des hélices  $\alpha 5$  et  $\alpha 10$  situées autour de site actif de CALB. Ils confirment ainsi la présence d'un volet chez CALB identifié comme l'hélice  $\alpha 5$  par sa mobilité, par l'absence d'interaction entre les résidus qui la composent et ceux de la protéine et par sa séquence similaire aux volets de 7 autres lipases.

Grâce à des analyses RMN (spectroscopie par résonance magnétique nucléaire) couplées à des dynamiques moléculaires, Vallikivi *et al.* (2005) ont prédit correctement l'acétylation de 16 groupements hydroxyles de 5 prostaglandines de type F. Ces prédictions ont permis d'identifier 13 complexes enzyme-substrat réactifs pour une réaction d'acétylation. La comparaison de ces complexes a permis, à son tour, d'identifier des conditions nécessaires à une acétylation fonctionnelle. Ces conditions sont les suivantes :

- la différence conformationnelle entre la structure initiale du cristal de CALB 1LBS et celle de l'enzyme-substrat doit être minimale. Cette différence de conformation est calculée par le « root mean square deviation » (RMSD) et ne doit pas dépasser la valeur de 3.
- le complexe enzyme-substrat doit avoir au moins 2 liaisons hydrogènes sur les 3 possibles entre l'oxygène de l'acétate et les résidus Thr40 et Gln106 du trou oxyanionique (Vallikivi *et al.*, 2005). Ces liaisons hydrogènes stabilisent l'oxyanion de l'acétate lors de la construction du second intermédiaire tétraédrique dans une orientation fonctionnelle (Uppenberg *et al.*, 1994a).

#### 5.1.3.4 Etude de la sélectivité de CALB pour la O- ou N-acylation

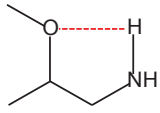
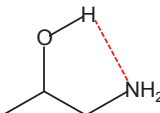
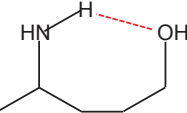
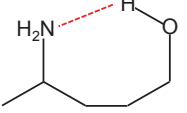
Il a été observé que CALB possède une moins grande affinité pour la catalyse des groupements amines que pour les groupements hydroxyles (Nakagawa *et al.*, 2007; Zaks and Klibanov, 1985). Ceci peut paraître surprenant car les protéases et les amidases qui sont des familles d'enzymes possédant le même mécanisme de catalyse avec la construction d'un intermédiaire tétraédrique ainsi qu'un site actif identique aux lipases (triade catalytique Ser/His/Asp) catalysent très bien l'hydrolyse et la synthèse de groupements amides. Certaines protéases ont, de plus, la même organisation structurale en hélices  $\alpha$  et feuillets  $\beta$  que les lipases (Syren *et al.*, 2013). L'explication de cette différence de spécificité a été fournie par des analyses de dynamiques moléculaires. Il a été démontré qu'il existe une liaison hydrogène supplémentaire condensée chez les protéases et amidases entre le groupement amine du substrat et le site actif de l'enzyme. Cette liaison hydrogène permet notamment de capter un proton de la fonction amine et d'améliorer la stabilité de l'état transitoire de la réaction. Elle a été observée chez 16 amidases/protéases et son absence constatée chez 8 estérases. La création de cette liaison hydrogène par mutation de CALB permet, de plus, d'augmenter d'un facteur 100 la réactivité de cette dernière pour l'hydrolyse de liaisons amides (Syren *et al.*,

2013). Cammenberg *et al.*, (2006) émettent la même hypothèse lorsqu'ils étudient l'augmentation de l'aminolyse du 1-phenylethanamine en changeant la composition du solvant réactionnel constitué de butyrate d'éthyle par du méthoxyacétate d'éthyle. Des analyses de dynamiques moléculaires et l'étude de l'intermédiaire tétraédrique ont montré qu'une liaison hydrogène se créait entre l'atome d'oxygène en position  $\beta$  de l'acétate et le groupement amine du ligand, augmentant la sélectivité de l'enzyme pour une aminolyse.

Toujours avec des analyses de modélisation moléculaires, l'équipe de Syren (2013) s'est focalisée sur la théorie de Le Joubioux *et al.* (2013a) quant à la formation d'une liaison hydrogène intramoléculaire chez les amino-alcools facilitant leur N-acylation par CALB. Il a été mis en évidence que deux liaisons hydrogènes différentes peuvent se créer au sein des amino-alcools (Tableau 21) :

- la première, entre un des atomes d'hydrogène du groupement amine et l'atome d'oxygène du groupement alcool ;
- la deuxième, entre le proton de la fonction alcool et l'azote du groupement amine.

**Tableau 21 : Energies et abondances relatives des conformères d'alaninol et de 4-amino-1-pentanol formant une liaison hydrogène intramoléculaire (Syren *et al.*, 2013).**

Substrat	Conformère	Energie relative (kcal.mol <sup>-1</sup> )	Abondance relative
Alaninol		0,2	0,44
		0	0,56
4-amino-2-pentanol		4,7	0,0007
		0	0,9993

Grâce à des calculs liés à la théorie fonctionnelle de la densité (DFT), il a été démontré que pour l'alaninol, les deux conformères sont probables avec une légère préférence pour celui où la liaison hydrogène est donnée par le proton de la fonction hydroxyle. Pour l'amino-alcool 4-amino-1-pentanol, une seule liaison est possible, révélant une liaison hydrogène  $-OH \cdots N$  presque parfaite.

Ces résultats sont en accord avec ceux présentés dans le Tableau 17 où l'activité spécifique de la N-acylation de l'alaninol est supérieure à celle du 2-butylamine et où l'activité spécifique de la O-acylation du 4-amino-1-pentanol est supérieure à celle de la N-acylation. Cependant, cette répartition de conformères ne permet pas d'expliquer la N-acylation minoritaire du 4-amino-1-pentanol, ni la N-acylation stricte de l'alaninol.

Syren *et al* (2013) proposent alors un mécanisme de « proton navette » qui permettrait la N-acylation de l'alaninol. Une attaque nucléophile de l'acyl-enzyme par le groupement amine de l'amino-alcool coïnciderait avec le transfert de 2 protons de ce dernier, l'un vers le groupement hydroxyle du substrat et l'autre vers l'histidine catalytique His224 (Figure 16).

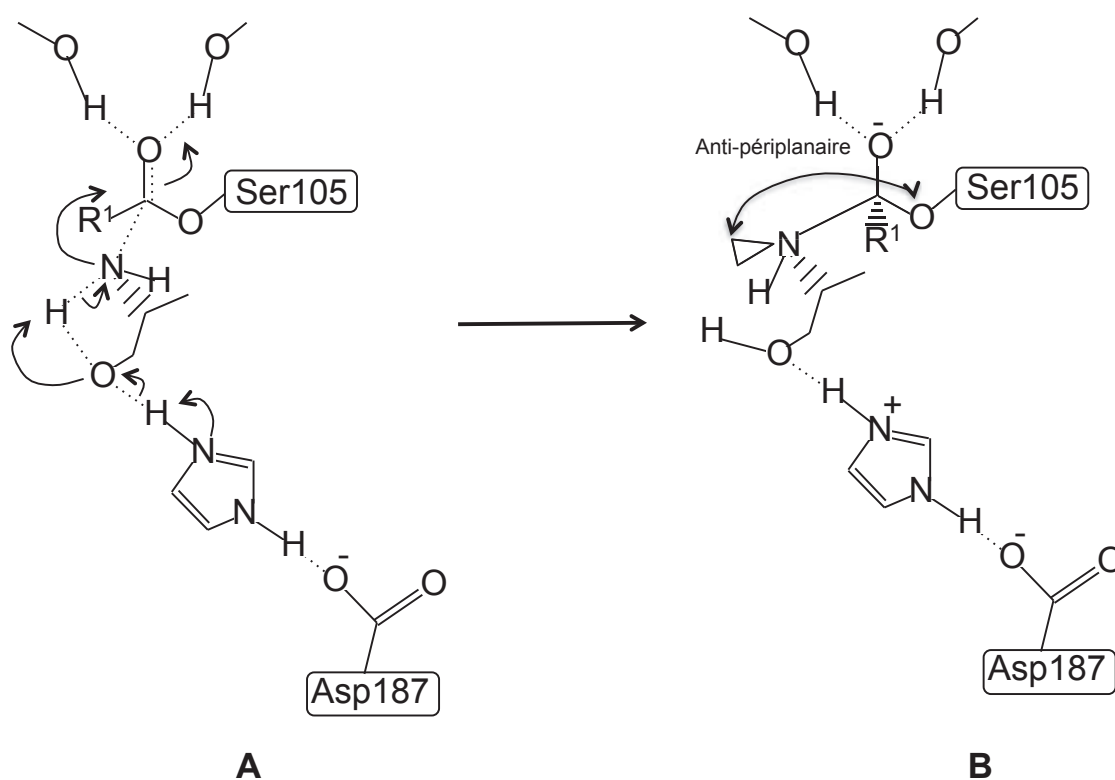


Figure 16 : Mécanisme « proton navette » pour la N-acylation d'amino-alcools catalysée par CALB. A : état transitoire « proton navette ». B : intermédiaire tétraédrique (Syren *et al.*, 2013).

Ce mécanisme de « proton navette » est facilité par la présence d'une liaison intramoléculaire entre un proton de la fonction amine et l'oxygène de l'hydroxyle qui pré-organise le substrat pour la catalyse. Des calculs d'énergie libre d'activation pour l'acylation de groupements amines avec ce nouveau mécanisme « proton navette » ont été effectués et comparés à l'énergie libre d'activation du mécanisme « classique » de la littérature, décrit dans la Figure 14. Une différence énergétique de  $1,1 \text{ kcal.mol}^{-1}$  en faveur du nouveau mécanisme a été calculée. Le mécanisme « proton navette » est donc énergétiquement plus facile à réaliser que le mécanisme « classique » de N-acylation. Ce nouveau mécanisme a été testé avec différentes molécules. Il en ressort les observations suivantes:

- l'énergie d'activation la plus basse a été observée avec le 1,2-diaminopropane qui possède la liaison hydrogène la plus forte par rapport à celles synthétisées par les amino-alcools. Ce résultat concorde avec la constante catalytique qui est la plus élevée observée (Tableau 17).
- ce mécanisme défavorise la O-acylation de l'alaninol avec une énergie libre d'activation de  $39 \text{ kcal.mol}^{-1}$  contre  $19,6 \text{ kcal.mol}^{-1}$  pour le mécanisme « classique ». La O-acylation catalysée par CALB ne semble pas utiliser ce mécanisme de « proton navette ».
- le 2-butylamine ne pouvant établir une liaison hydrogène intramoléculaire ne peut fonctionner avec ce nouveau mécanisme. Ceci est en accord avec la faible constante catalytique observée (Tableau 17).
- le mécanisme de « proton navette » ne fonctionne pas avec le 4-amino-1-pentanol car l'unique conformère généré par ce dernier n'a pas la liaison hydrogène intramoléculaire, adéquate pour ce mécanisme (Tableau 21). De même, la forme la plus probable des amino-alcools à longue chaîne est une structure « ouverte », une liaison hydrogène nécessitant une énergie entropique importante. Le mécanisme « proton navette » ne peut donc pas être appliqué, ce qui explique leur O-acylation majoritaire ainsi que leur faible N-acylation. (Syren *et al.*, 2013)

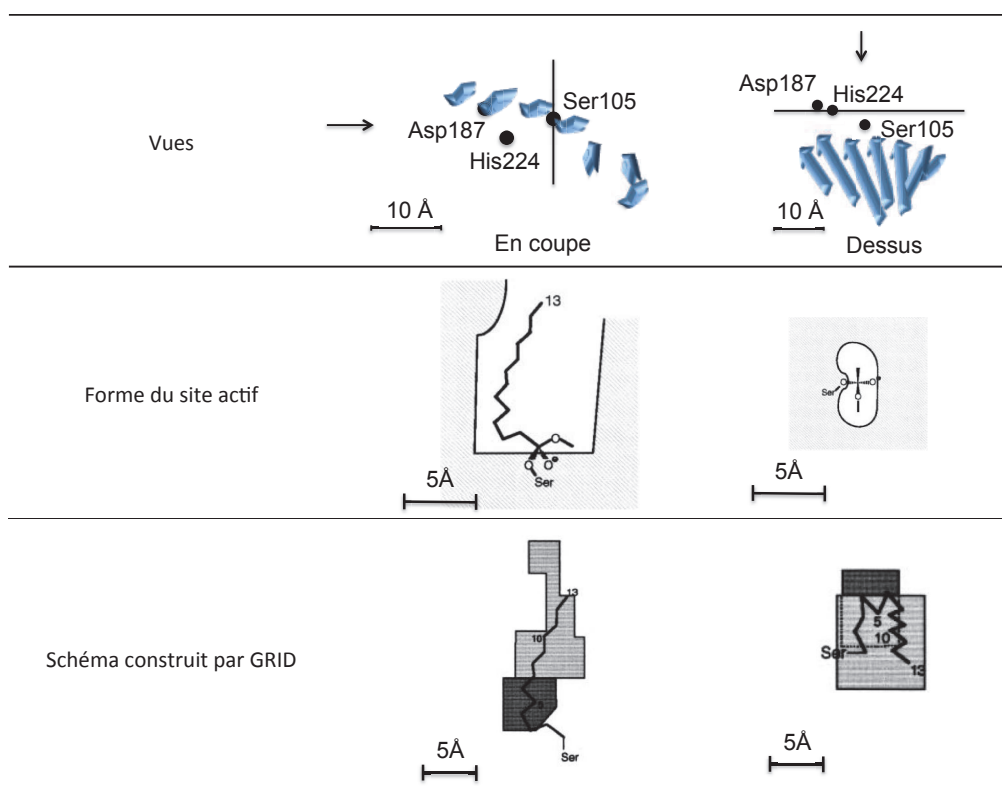
#### 5.1.3.5 *Etude du positionnement de la chaîne grasse du donneur d'acyle dans le site actif de CALB*

L'équipe de Pleiss (1998) a étudié le placement de la chaîne grasse du donneur d'acyle dans la cavité catalytique du cristal 1LBS de CALB. Le donneur d'acyle utilisé pour la simulation est l'acide tridécanoïque ( $C_{13}$ ). Les différents résidus en interaction avec la chaîne carbonée ont été identifiés en utilisant les sondes METHYL et DRY implémentées dans le logiciel

GRID. Ces sondes permettent d'identifier respectivement les passages étroits et les régions hydrophobes du site actif de CALB par des calculs d'interactions de potentiel. Ces interactions résultent d'une combinaison de répulsions stériques, d'interactions électrostatiques et de liaisons hydrogènes (Goodford, 1985).

Le site actif de CALB est identifié comme étant un entonnoir profond de forme elliptique de 9,5 Å x 4,5 Å. Le substrat donneur d'acyle est lié de façon covalente à Ser105 et placé contre l'une des parois de la cavité catalytique. La chaîne suit jusqu'au 4<sup>ème</sup> carbone le positionnement de la partie hydrophile de l'inhibiteur HEE présent dans le site actif du cristal 1LBS entourés par les résidus Asp134 et Ser105. De C<sub>4</sub> à C<sub>7</sub>, la chaîne est bordée par les résidus Thr138, Ile189 et Val190 sur la gauche et par les résidus Gln157 et Thr40 sur la droite. A partir de C<sub>7</sub>, au niveau du résidu Gln157, la chaîne carbonée se plie brusquement pour atteindre la paroi hydrophobe constituée des résidus V154, I285, L144 et V149 (Tableau 22).

**Tableau 22 : Représentation schématique du site actif de CALB. Les orientations des vues en coupe par rapport aux feuillets β de l'enzyme sont représentées en bleu. Les zones en gris foncé sont identifiées par la sonde METYL et les zones en gris clair sont identifiées par la sonde DRY (Pleiss *et al.*, 1998).**





## 5.1.3.6 Etude de la régio-sélectivité de CALB

Bidouil *et al.* (2011) et De Oliveira *et al.* (2009) ont étudié la régio-sélectivité de CALB pour l'acétylation des flavonoïdes rutine, quercitrine et isoquercitrine (Figure 17) combinant des approches de docking et de dynamiques moléculaires.

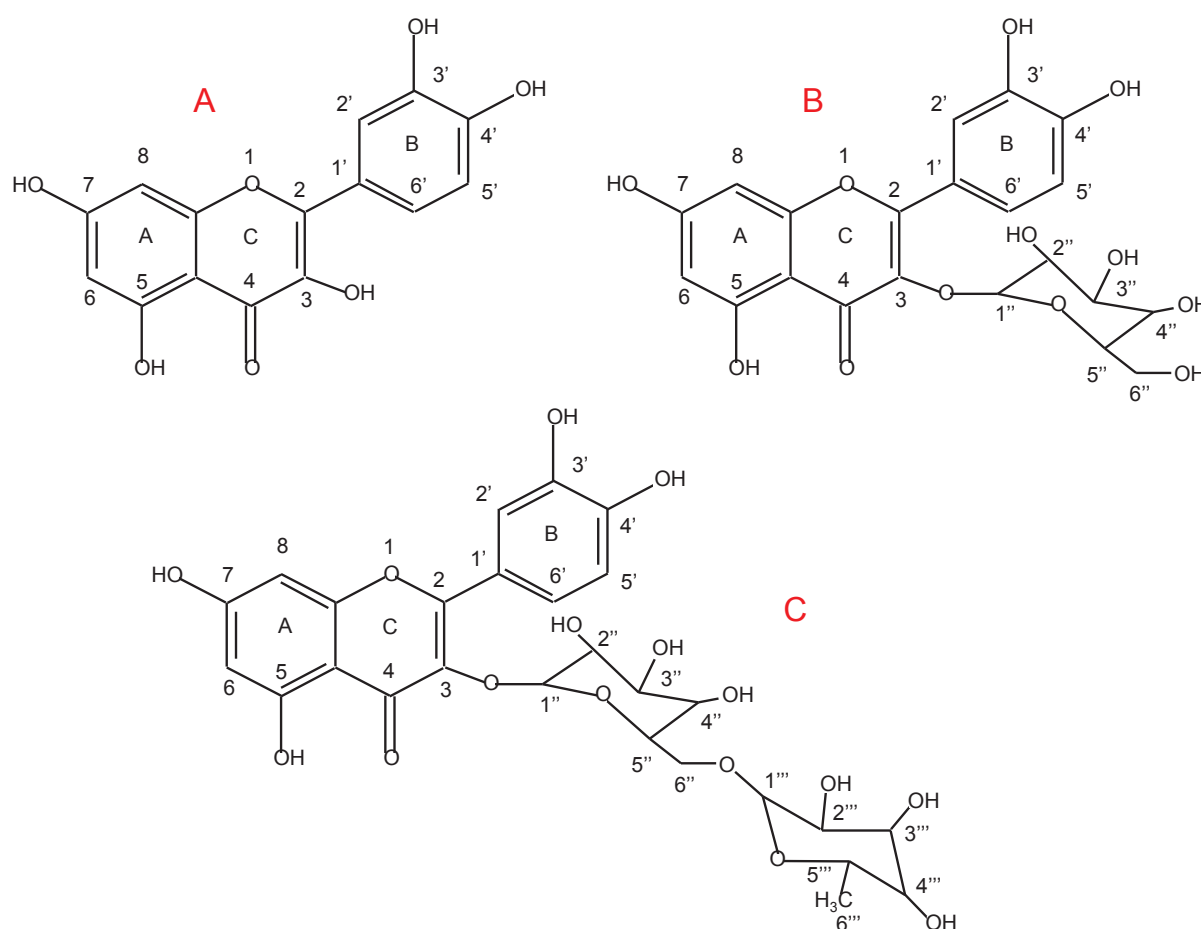


Figure 17 : Structure chimique des flavonoïdes quercitrine (A), isoquercitrine (B) et rutine (C).

Le protocole suivi est le suivant : dans un premier temps, le donneur d'acyle, un acétate, est lié par une liaison covalente à la sérine catalytique dans la cavité du site actif de l'enzyme. Dans un deuxième temps, l'enzyme est relaxée pour permettre une réorganisation conformationnelle de l'enzyme due à la présence de l'acétate dans sa cavité catalytique. Dans un troisième temps, une analyse de docking est réalisée sur la structure enzyme-acétate avec les différents flavonoïdes et des poses de ligand menant à des acétylations fonctionnelles sont identifiées. Une analyse de dynamique moléculaire est réalisée, dans un quatrième temps ; sur chacune de ces poses pour attester du maintien du flavonoïde dans le site actif de la lipase.

Enfin, dans un cinquième temps, une acétylation expérimentale est effectuée pour valider les résultats prévus par l'analyse de modélisation. Trois critères ont été suivis pour valider une pose de ligand menant à une acétylation fonctionnelle :

- La différence de RMSD entre le cristal 1LBS et la structure de la pose ne doit pas dépasser la valeur de 3. Cette valeur a également été identifiée par Vallikivi *et al* (2005) et décrite ci-dessus (§5.1.3.3 ).
- Le complexe enzyme-acétate doit avoir au moins 2 liaisons hydrogènes sur les 3 possibles entre l'oxygène de l'acétate et les résidus Thr40 et Gln106 du trou oxyanionique (Figure 18) (Vallikivi *et al.*, 2005).
- Deux critères de distance doivent être respectés entre un groupement hydroxyle du ligand et le carbone  $sp^2$  de l'acétate, d'une part, et entre le proton de ce groupement hydroxyle et l'azote en position  $\epsilon^2$  de l'His224, d'autre part (Figure 18). Ces deux distances doivent être inférieures à 4 Å pour conduire à une acylation du ligand. Ces distances ont été également identifiées par Palocci *et al.* (2007) pour l'acylation de glucosides par la lipase de *Candida rugosa*.

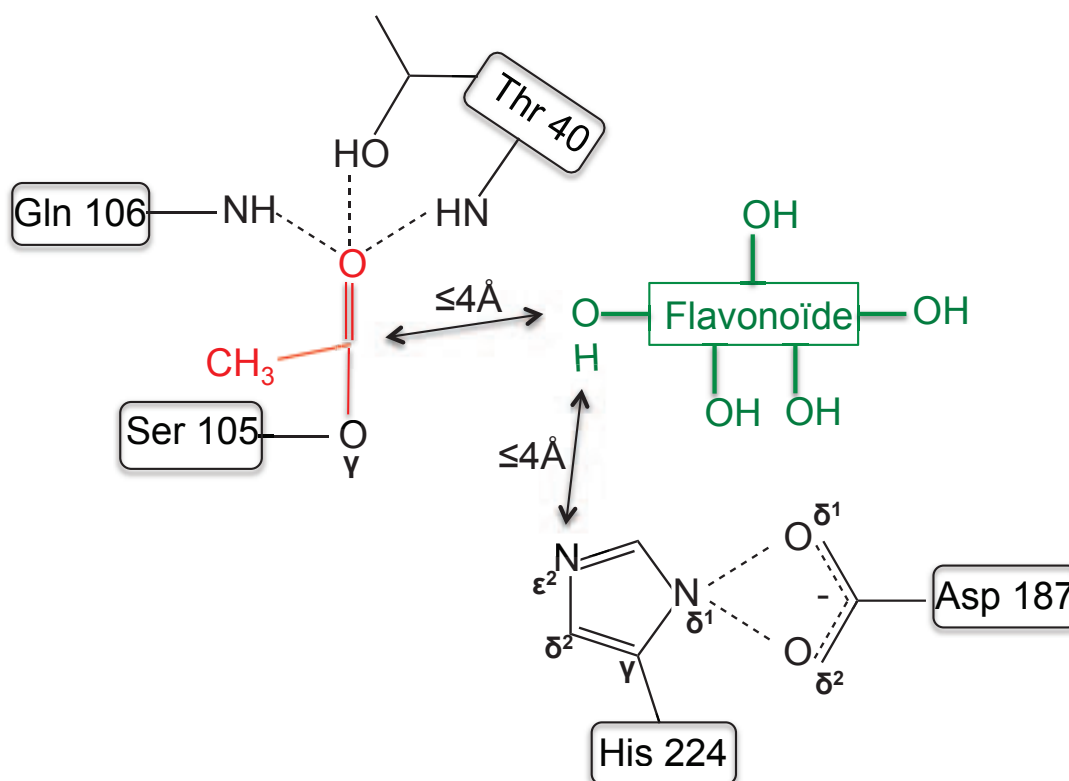


Figure 18 : Schéma des conditions structurales de placement des substrats dans la cavité du site actif de CALB à remplir pour aboutir à une acétylation fonctionnelle. Le donneur d'acyle est représenté en rouge et l'accepteur d'acyle en vert.

Le non-respect de l'une de ces conditions indique que le complexe ligand/enzyme-acétate ne conduit pas à une acétylation fonctionnelle.

Les résultats obtenus par ces analyses montrent que le flavonoïde quercitrine n'est pas acylable par CALB. Au cours des trajectoires des dynamiques moléculaires, l'acétate n'est jamais stabilisé correctement par les résidus du trou oxyanionique. Cette instabilité est due à la présence de la quercitrine dans le site actif qui repousse les résidus du trou oxyanionique, les empêchant d'interagir avec l'acétate (Bidouil *et al.*, 2011). En revanche, la rutine et l'isoquercitrine sont acétylés sur leur partie sucre, seule structure des flavonoïdes orientée vers le fond de la cavité catalytique. Les groupements acétylés sont le groupement alcool primaire 6''-OH du glucose de l'isoquercitrine et l'alcool secondaire 4'''-OH du ramnose porté par la rutine. La régio-sélectivité d'acétylation de CALB prédite par les approches de modélisation moléculaire pour ces deux flavonoïdes a été confirmée par une régio-sélectivité expérimentale identique (De Oliveira *et al.*, 2009). Il ressort de ces études que l'acétylation des flavonoïdes est limitée par leur faible flexibilité ainsi que par l'hydrophilie de leur partie aglycone. En effet, l'étroit tunnel du site actif de CALB est constitué de résidus hydrophobes. Ces résidus maintiennent la partie aglycone des flavonoïdes au bord de la cavité catalytique, ce qui explique l'absence de réaction pour le flavonoïde quercitrine. Pour deux autres flavonoïdes, la partie « sucre » peut atteindre le fond de la cavité catalytique. Le caractère hydrophile induit par les résidus Ser105, Thr40 et Asp137 stabilise l'orientation des parties « sucres » des flavonoïdes vers la triade catalytique, ce qui favorise une acétylation fonctionnelle.



## **MATERIEL ET METHODES**

---

## 1 Partie expérimentale

### 1.1 Production de protéines de type aminoacylases

#### 1.1.1 Souches microbiennes utilisées

Les souches utilisées au cours de ces travaux sont les suivantes :

*Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877 : souche sauvage obtenue à partir de l'américain type culture collection (ATCC);

*Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877  $\Delta$ *samL1383* : souche construite au cours de ces travaux, pour laquelle le gène *samL1383* a été délété ;

*Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877  $\Delta$ *sam-AA* : souche construite au cours de ces travaux, pour laquelle le gène *sam-AA* a été délété ;

*Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877  $\Delta$ *samL1383*  $\Delta$ *sam-AA* : souche construite au cours de ces travaux, pour laquelle les gènes *samL1383* et *sam-AA* ont été éliminés en respectant la phase de lecture.

#### 1.1.2 Milieux de culture :

Les milieux de cultures utilisés au cours de ces travaux ont été listés dans le Tableau 23:

**Tableau 23 : Milieux de culture utilisés pour la production de protéines de type aminoacylase.**

<b>Milieu ICS (pH 6,8)</b>	Saccharose	15 g.L <sup>-1</sup>
	(NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>	10 g.L <sup>-1</sup>
	NaCl	3 g.L <sup>-1</sup>
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g.L <sup>-1</sup>
	MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,2 g.L <sup>-1</sup>
	CaCO <sub>3</sub>	1,25 g.L <sup>-1</sup>
	Solution Cornsteep	400 mL.L de solution ICS <sup>-1</sup>
Solution Cornsteep	Cornsteep	12,5 g.L <sup>-1</sup>
	Stériliser par autoclavage.	
	Centrifugation à 10 000 rpm pendant 15min.	
	Filtration sur filtre plissé.	
<b>Milieu de pré-culture « Koreishi » (pH 6,5)</b>	Glucose	10 g.L <sup>-1</sup>
	Dextrines blanches	10 g.L <sup>-1</sup>
	Extrait de levure	5 g.L <sup>-1</sup>
	Hydrolysate de caséine	5 g.L <sup>-1</sup>
	CaCO <sub>3</sub>	1 g.L <sup>-1</sup>
<b>Milieu de culture « Koreishi » (pH 7)</b>	Extrait de viande	40 g.L <sup>-1</sup>
	Amidon soluble	40 g.L <sup>-1</sup>
	Hydrolysate de caséine	20 g.L <sup>-1</sup>
	MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	20 g.L <sup>-1</sup>
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 g.L <sup>-1</sup>
<b>Milieu Czapeck-Dox Yeast (pH 7)</b>	Saccharose	30 g.L <sup>-1</sup>
	NaNO <sub>3</sub>	3 g.L <sup>-1</sup>
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g.L <sup>-1</sup>
	KCl	0,5 g.L <sup>-1</sup>
	MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,5 g.L <sup>-1</sup>
	FeSO <sub>4</sub>	0,1 g.L <sup>-1</sup>
	Extrait de levure	5 g.L <sup>-1</sup>
<b>Milieu basal (pH 7)</b>	Peptone de viande	20 g.L <sup>-1</sup>
	Extrait de levure	2 g.L <sup>-1</sup>
	MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	1 g.L <sup>-1</sup>
	Amidon de pomme de terre	20 g.L <sup>-1</sup>
	Glucose	5 g.L <sup>-1</sup>
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g.L <sup>-1</sup>
<b>Bouillon nutritif</b>	Hydrolysate de caséine	10 g.L <sup>-1</sup>
	NaCl	3 g.L <sup>-1</sup>
	Extrait de levure	3 g.L <sup>-1</sup>

### 1.1.3 Conditions de cultures pour la production de protéines de type aminoacylases

Afin d'obtenir les protéines qui seront étudiées dans ces travaux, les différentes souches de *S. ambofaciens* utilisées ont été mises en culture selon le protocole suivant :

· Initialement, sous forme de spores, une étape de germination est réalisée. Un volume de 100 $\mu$ L de spores est introduit dans 40mL de milieu ICS contenu dans une fiole d'Erlenmeyer stérile. Cette étape de germination s'effectue pendant 48 heures.

· Une pré-culture est ensuite effectuée afin d'obtenir une croissance cellulaire importante pendant la culture. Dans une fiole d'Erlenmeyer de 250 mL, un volume de 2,50 mL de milieu ICS est mis dans 25mL de milieu de pré-culture « Koreishi » stérile correspondant à 10% (v/v) de bactéries germées. La pré-culture se déroule pendant 48 heures.

· Pour produire les aminoacylases, une culture des bactéries est réalisée dans 95 mL de milieu de culture « Koreishi » dans des fioles d'Erlenmeyers de 500mL. L'inoculation se fait à 3% (v/v) et la culture dure 7 jours.

Chaque culture est incubée à une température de 28°C, sous une agitation à 250 rpm.

#### 1.1.4 Conservation des souches :

Pour la conservation à long terme des souches celles-ci sont gardées à -18°C en présence de 15 à 20% (v/v) de glycérol (Glycérol stock). A la suite d'une pré-culture en fiole d'Erlenmeyer, la croissance des bactéries est arrêtée et un volume de glycérol est ajouté à la suspension cellulaire. La suspension bactérienne glycérolée est aliquotée dans des tubes de 15 mL puis congelée à -18°C. Ces tubes constituent la banque qui permettra de disposer des cellules dans le même état physiologique tout au long de ce travail.

## 1.2 Traitement des surnageants de culture

### 1.2.1 Purification partielle de protéines

#### 1.2.1.1 *Lyse des cellules*

##### 1.2.1.1.1 Presse de French

Les acylases peuvent être excrétées ou demeurer dans le volume cytoplasmique. Pour récupérer un maximum d'enzymes, les cellules sont lysées grâce à 3 passages successifs dans



une Presse de French (Constant Cell Disruption Systems) à une pression de 2,5 Kbar. Les débris cellulaires sont ensuite éliminés par centrifugation à 8200 g, à 4 °C pendant 15 min (Avanti 30, Beckman).

#### 1.2.1.1.2 Sonication

Le protocole de sonication consiste à placer un volume de suspension cellulaire dans un bécher de 10 mL. Le bécher est placé dans l'enceinte de sonication dans un bac de glace pour éviter une élévation de la température pendant la sonication. L'extrémité de la sonde en graphite est placée au centre du bécher et immergée à environ 1 cm de la surface. La sonication consiste à effectuer 4 cycles de 42 secondes à 40 % de la puissance maximum de l'appareil ULTRASONIC PROCESSOR (Bioblock Scientific, Thermofisher).

#### 1.2.1.2 Précipitation des protéines

La précipitation s'effectue pendant 2 heures à température ambiante en présence de sulfate d'ammonium,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , à 60% de la saturation, sous agitation. Les protéines sont ensuite récupérées après une centrifugation à 8200 x G à 4 °C pendant 20 min (Avanti 30, Beckman). Le culot protéines/sels d'ammonium est re-solubilisé dans du tampon Tris-HCl (25mM) NaCl (50mM) à pH 8.

#### 1.2.1.3 Dialyse

La dialyse permet d'éliminer les sels contenus dans la solution des protéines re-suspendues suite à leur précipitation au sulfate d'ammonium. La solution protéique est placée dans une membrane de dialyse dont le seuil de coupure est de 12-14 kDa (Spectrum laboratories, Inc.). La membrane est ensuite immergée dans un bain de tampon Tris-HCl (25mM) NaCl (50mM) à pH 8 à 4°C. Le dessalement et l'élimination de peptides inférieurs à 12-14 kDa sont assurés par une agitation continue et un renouvellement du bain toutes les 30 min pendant 3 heures, suivi d'un dernier bain de 12h.

### 1.2.2 Concentration des protéines

Les protéines issues de la dialyse sont concentrées à l'aide de colonnes de concentration/diafiltration (Amicon ® Ultra -15 centrifugal filter devices, Millipore). Ces colonnes sont composées de deux parties :

- Un dispositif de filtration membranaire dont le seuil de coupure est de 10 kDa.
- Un tube de 50 mL (Falcon) permettant de collecter le filtrat en aval du dispositif filtrant.

12 mL d'échantillon peuvent être déposés dans chaque tube, la concentration se fait à une vitesse de 5000 g pendant 30 min à température ambiante. La durée de centrifugation est variable selon le volume et la nature de la solution.

### 1.2.3 Séparation des protéines

Une chromatographie liquide basse pression préparative (AKTA purifier 100, GE Healthcare) échangeuse d'anions forts (Q Sepharose : Quaternary aminométhyl Sepharose) a été utilisée pour séparer les protéines obtenues après précipitation au sulfate d'ammonium, dialyse et concentration. Le système est équipé d'une colonne de 1,6 cm de diamètre et 10 cm de haut (volume de colonne de 20 mL), qui est équilibrée avec la phase mobile (tampon TrisHCl 25mM, NaCl 50mM à pH 8). Le volume d'échantillon injecté est de 5 mL et le débit de travail est de 2 mL.min<sup>-1</sup>. La désorption s'effectue avec un gradient de NaCl constitué de 10 paliers correspondant aux concentrations suivantes: 0,05 M, 0,1 M, 0,2 M, 0,25 M, 0,3 M, 0,35 M, 0,4 M, 0,45 M, 0,5 M et 1 M. Le suivi de désorption s'effectue par une analyse UV à 214, 226 et 280 nM, tandis que le suivi de la concentration en NaCl se fait par lecture de conductimétrie (Figure 19).

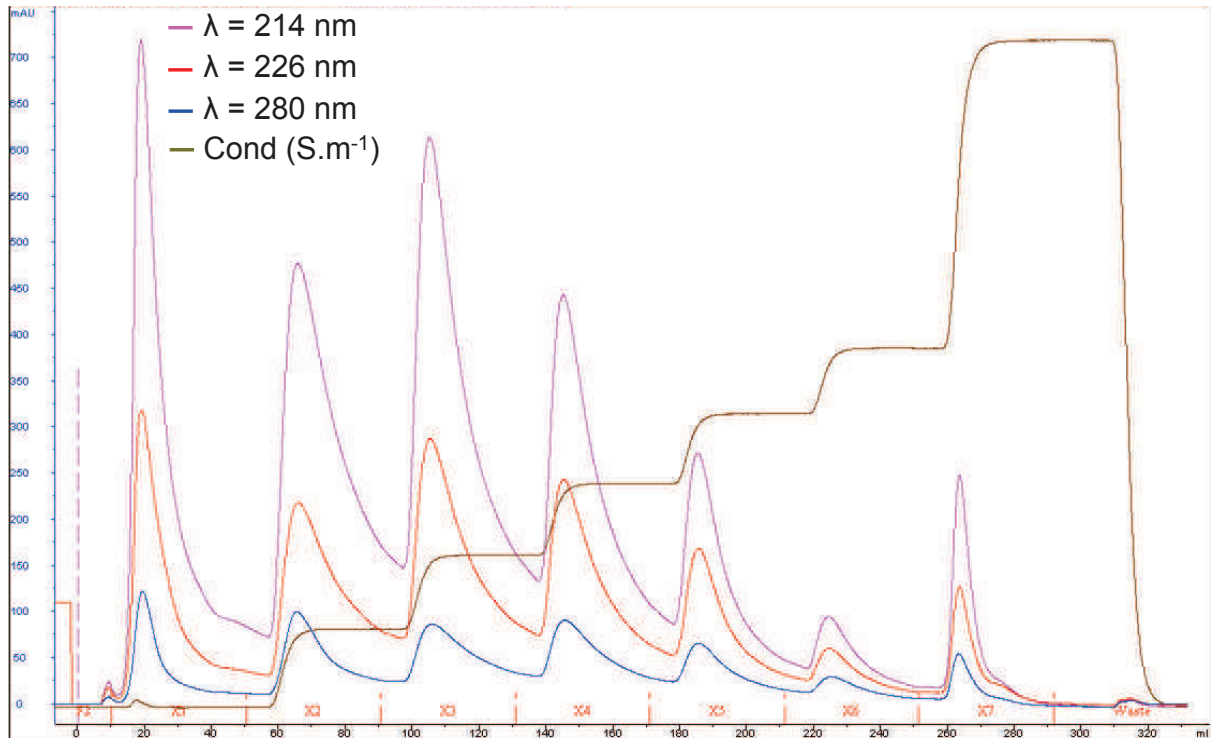


Figure 19 : Chromatogramme de désorption de protéines par paliers de NaCl.

### 1.3 Obtention des mutants de *S. ambofaciens*

#### 1.3.1 Construction de mutants :

Les souches mutées de *S. ambofaciens* ont été construites dans le cadre d'un partenariat avec l'UMR1128 DynAMic (Dynamique des Génomes et Adaptation Microbienne). Ces mutants ont été construits à partir de *S. ambofaciens* ATCC 23877. Les souches bactériennes, les plasmides et les chromosomes artificiels (BACs) utilisés sont listés dans le Tableau 24.

Tableau 24 : Liste des souches, plasmides et BACs utilisés

Souches, BAC, cosmides ou plasmides	Principales caractéristiques	Références
<i>S. ambofaciens</i> ATCC 23877	Souche sauvage (WT)	Pinnert-Sindico, 1954
<i>S. ambofaciens</i> $\Delta$ samL1383 :: <i>apra-oriT</i>	Le gène <i>samL1383</i> est remplacé par la cassette de mutagenèse <i>aac(3)-IV-oriT</i> .	Ces travaux
<i>S. ambofaciens</i> $\Delta$ sam-AA :: <i>apra-oriT</i>	Le gène <i>sam-AA</i> est remplacé par la cassette de mutagenèse <i>aac(3)-IV-oriT</i> .	Ces travaux
<i>S. ambofaciens</i> $\Delta$ samL1383 :: <i>scar</i>	Le gène <i>samL1383</i> est délété en phase	Ces travaux
<i>S. ambofaciens</i> $\Delta$ sam-AA :: <i>scar</i>	Le gène <i>sam-AA</i> est délété en phase	Ces travaux
<i>S. ambofaciens</i> $\Delta$ samL1383 :: <i>scar</i> $\Delta$ sam-AA :: <i>scar apra-oriT</i>	Le gène <i>samL1383</i> est délété et la gène <i>sam-AA</i> est remplacé par la cassette de mutagenèse <i>aac(3)-IV-oriT</i> .	Ces travaux
<i>S. ambofaciens</i> $\Delta$ samL1383 :: <i>scar</i> $\Delta$ sam-AA :: <i>scar</i>	Les gènes <i>samL1383</i> et <i>sam-AA</i> sont délétés en phase	Ces travaux
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	Souche généralement utilisée pour le clonage	Hanahan, 1983
<i>E. coli</i> ET12567/pUZ8002	Souche non-méthylante pour l'ADN néo-formé	MacNeil <i>et al.</i> , 1992
<i>E. coli</i> BW25113/pKD20	Souche utilisée pour la mutagenèse dirigée par PCR ( <i>gam</i> , <i>bet</i> , <i>exo</i> , <i>bla</i> )	Datsenko et Wanner, 2000
BAB8ZA11	BAC issu de la librairie génomique de <i>S. ambofaciens</i> ( <i>cat</i> )	Choulet <i>et al.</i> , 2006
BAB3ZC8	BAC issu de la librairie génomique de <i>S. ambofaciens</i> ( <i>cat</i> )	Choulet <i>et al.</i> , 2006
BAA10ZD3	BAC issu de la librairie génomique de <i>S. ambofaciens</i> ( <i>cat</i> )	Choulet <i>et al.</i> , 2006
BAB8ZA11 :: <i>neo</i> / $\Delta$ samL1383 :: <i>aac(3)IV + oriT</i>	Le gène <i>samL1383</i> est remplacé par une cassette apramycine et le gène <i>cat</i> est remplacé par le néo-gène	Ces travaux
BAA10ZD3 :: <i>neo</i> / $\Delta$ sam-AA :: <i>aac(3)IV + oriT</i>	Le gène <i>sam-AA</i> est remplacé par une cassette apramycine et le gène <i>cat</i> est remplacé par le néo-gène	Ces travaux
pPSM88T	Plasmide dérivé de pOSV503 contenant <i>oriT</i>	Raynal <i>et al.</i> , 2006
pOSK1111	Plasmide de conjugaison contenant les gènes <i>xis</i> et <i>int</i> de pSAM2	Raynal <i>et al.</i> , 2006

<sup>a</sup>*bal*, gène de résistance à l'ampicilline ; *neo*, gène de résistance à la kanamycine ; *aac(3)IV*, gène de résistance à l'apramycine(*apra*) ; *oriT*, origine de transfert ; *gam*, inhibiteur de l'exonucléase hôte V ; *bet*, protéine de liaison à l'ADN simple brin ; *exo*, exonucléase promoteur de la recombinaison avec *bet* ; *cat*, gène de résistance au chloramphénicol ; *xis* et *int*, respectivement excisionase et intégrase de pSAM2.

### 1.3.2 Cultures pour l'obtention de mutants

Les souches de *Streptomyces* utilisées pour l'obtention des mutants délétés ont été manipulées comme décrits dans les travaux de Bunet *et al.* (2014) et Kieser *et al.* (2000). Les souches *E. coli* ont été cultivées sur du milieu LB (Sambrook *et al.*, 1989)

### 1.3.3 Manipulation ADN

L'isolement, le clonage et les manipulations ADN ont été effectués selon les travaux de Kieser *et al.* (2000) pour *Streptomyces* et selon les travaux de Sambrook *et al.* (1989) pour *E. coli*. L'amplification des fragments d'ADN par PCR a été effectuée avec la polymérase *Taq* ADN (NEB) ou la polymérase Takara (Fermentas), selon les instructions des fournisseurs. Lorsque cela a été nécessaire, une purification des produits de PCR et des fragments de restriction a été réalisée sur un gel d'agarose avec le kit de purification High Pure PCR (Roche).

### 1.3.4 Délétion en phase de gènes codant pour des acylases chez *S. ambofaciens*

Le système REDIRECT (Gust *et al.*, 2003) a été utilisé pour réaliser une délétion en phase des 2 gènes codant pour des acylases chez *S. ambofaciens* ATCC 23877, *samL1383* et *sam-AA*. La procédure suivie a été celle décrite pour d'autres gènes de *Streptomyces* dans les travaux de Bunet *et al.* (2008) et Pang *et al.* (2004). La cassette de mutagenèse *aac(3)-IV-oriT* utilisée pour le remplacement de gène a été synthétisée par PCR avec le plasmide pSPM88T comme modèle (Raynal *et al.*, 2006). Les paires d'amorces utilisées sont décrites dans le Tableau 25. *E. coli* BW251113/pKD20 (Datsenko and Wanner, 2000) a été transformé dans un premier temps avec le BAC contenant le gène d'intérêt codant pour une acylase (*samL1383* ou *sam-AA*), puis, avec le produit de PCR (cassette de mutagenèse *aac(3)-IV-oiT*) pour remplacer le gène cible par recombinaison homologue. Le gène de résistance au chloramphénicol du vecteur pBelo-BAC11 a été remplacé par un gène de résistance à la kanamycine en suivant la même stratégie. *E. coli* ET12567/pUZ8002 a été transformé avec le BAC muté par conjugaison avec *S. ambofaciens* ATCC23877. Le remplacement des gènes a été confirmé par des analyses de PCR utilisant un jeu d'amorces encadrants les gènes cibles ou des analyses par Southern blot. Pour obtenir les mutants délétés en phase *samL1383* et *sam-AA*, la cassette a été supprimée en utilisant les excisionases et intégrases du plasmide pSAM2 comme décrit dans les travaux de Raynal *et al.* (2006). Seuls les codons START et STOP des gènes supprimés subsistent après la délétion. Toutes les amorces utilisées pour confirmer la délétion des gènes sont décrits dans le Tableau 25.

**Tableau 25 : Amorces utilisées dans ces travaux**

Primers	Séquence nucléotidique (5' -> 3')
Gène de remplacement	
disrupt_samL1383_F	<b>tgccggccggtccgcgagggcgagactggtgcatg</b> ATCGCGCGCTTCGTTCCGGACGAA
disrupt_samL1383_R	<b>cccgggagaagatcatgccccgtggcccgagatca</b> ATCTGCCTCTTCGTCCCGAAGCAACT
disrupt_sm-AA_F	<b>agcagggacaccagcagtgacagcgggaggaaccacgtg</b> ATCGCGCGCTTCGTTCCGGACGAA
disrupt_sm-AA_R	<b>ctcgggcggttcaggacgcgtcgaatctcgggcggttca</b> ATCTGCCTCTTCGTCCCGAAGCAACT
verif_samL1383_F*	tggtgctgtccacgcctac
verif_samL1383_R*	tgtcaacagtcgtgcgacct
verif_sm-AA_F*	ctcaagctagcgcgtctgcc
verif_sm-AA_R*	gcacacgcgagcgaatagca

Les nucléotides en gras sont identiques aux extrémités des séquences des gènes codant pour les acylases. Les amorces marquées d'un astérisque ont été utilisées pour vérifier la validité de la délétion.

## 1.4 Expression hétérologue

### 1.4.1 Souches bactériennes utilisées

Les souches utilisées au cours de ces travaux sont les suivantes :

***Pichia pastoris* X33** (Pichia Expression Kit, Invitrogen) : est une souche de type sauvage. Cette souche possède 2 gènes codant une alcool oxydase (AOX), nommés AOX1 et AOX2. Ces 2 gènes sont sous le contrôle de promoteurs forts inductibles par le méthanol. Son phénotype Mut<sup>+</sup> (Methanol utilization plus) signifie qu'elle est capable de se développer avec le méthanol comme seule source de carbone par l'intermédiaire du produit du gène AOX1 sous le contrôle du promoteur;

***Escherichia coli* TOP10F'** (Invitrogen) : souche de *E. coli* utilisée pour la préparation et le clonage plasmidique, présentant une grande efficacité de transformation grâce à l'élimination des gènes *recA* et *endA*.

## 1.4.2 Milieux de culture utilisés

Les milieux de culture utilisés pour l'expression hétérologue du gène *SamL1383* sont présentés dans le Tableau 26.

**Tableau 26 : Milieux de cultures utilisés pour la production de protéines par voie hétérologue.**

Utilisation	Nom	Composant	Quantité	Rôle
Culture de <i>Pichia pastoris</i>	Milieu BMGY (Buffered Minimal Glycerol-complex medium)	Extrait de levure	1% (vol/vol)	Utilisé pour diminuer l'activité des protéases et favoriser la croissance de la biomasse
		Peptone de soja	2% (vol/vol)	
		Phosphate de potassium (pH6)	100 mM	
		YNB	1,34% (vol/vol)	
		biotine	4.10 <sup>-5</sup> % (vol/vol)	
		Glycérol	1% (vol/vol)	
Culture de <i>Pichia pastoris</i>	Milieu MMH (Minimal Methanol Medium + Histidine)	YNB	1,34% (vol/vol)	Utilisés pour la différenciation phénotypique <i>Pichia pastoris</i> Mut <sup>+</sup> /Mut <sup>s</sup>
		biotine	4.10 <sup>-5</sup> % (vol/vol)	
		Méthanol	0,5% (vol/vol)	
		YNB	1,34% (vol/vol)	
		biotine	4.10 <sup>-5</sup> % (vol/vol)	
		Dextrose	2% (vol/vol)	
Culture de <i>Pichia pastoris</i>	Milieu MDH (Minimal Dextrose Medium + Histidine)	Extrait de levure	1%	Utilisé pour l'obtention de cellules compétentes
		Peptone	2%	
		Dextrose (glucose)	2%	
		(Agar)	2%	
		(Zéocine à pH 7,5)	200 µg.mL <sup>-1</sup>	
Culture de <i>Escherichia coli</i>	Milieu Low salt LB (Luria-Bertani)	Tryptone	1%	Utilisé pour l'amplification du plasmide
		Extrait de levure	0,5%	
		NaCl (pH 7,5)	0,5%	
		(Agar)	1,5%	
		(Zéocine à pH 7,5)	25 µg.mL <sup>-1</sup>	

### 1.4.3 Transfert du gène *samL1383* chez *P.pastoris*

#### 1.4.3.1 Optimisation du gène *samL1383* et construction du vecteur plasmidique

Le gène à cloner, *samL1383*, doit être optimisé en raison d'une différence d'usage de codons entre *P.pastoris* et *S. ambofaciens*. Cette dernière présente un génome plus riche en GC chez *Streptomyces*, peuvent conduire à un arrêt précoce de traduction).

Le vecteur plasmidique choisi pour la transformation de *P. pastoris* est pPICZ $\alpha$ A (3329 pb). C'est un vecteur commercialisé et utilisé pour exprimer et sécréter une protéine recombinante chez *P. pastoris*. L'optimisation du gène *samL1383* et la construction du plasmide ont été réalisées par la société GeneArt.

Le plasmide final contient (Figure 20) :

- Le fragment de 942 pb « 5' *AOXI* » contenant le promoteur *AOXI* (alcool oxydase) qui permet l'expression du gène d'intérêt à haut niveau après une induction déclenchée en présence de méthanol.
- le facteur  $\alpha$ , qui est un signal de sécrétion pour la protéine recombinante ;
- l'origine de répllication issue du plasmide pUC, qui permet la répllication du plasmide chez *E. coli* ;
- Une séquence poly-histidine en position C terminale, qui permet la purification de la protéine recombinante par chromatographie d'affinité.
- Le gène de résistance à la zéocine (ZeoR), qui permet le maintien du plasmide dans la cellule.



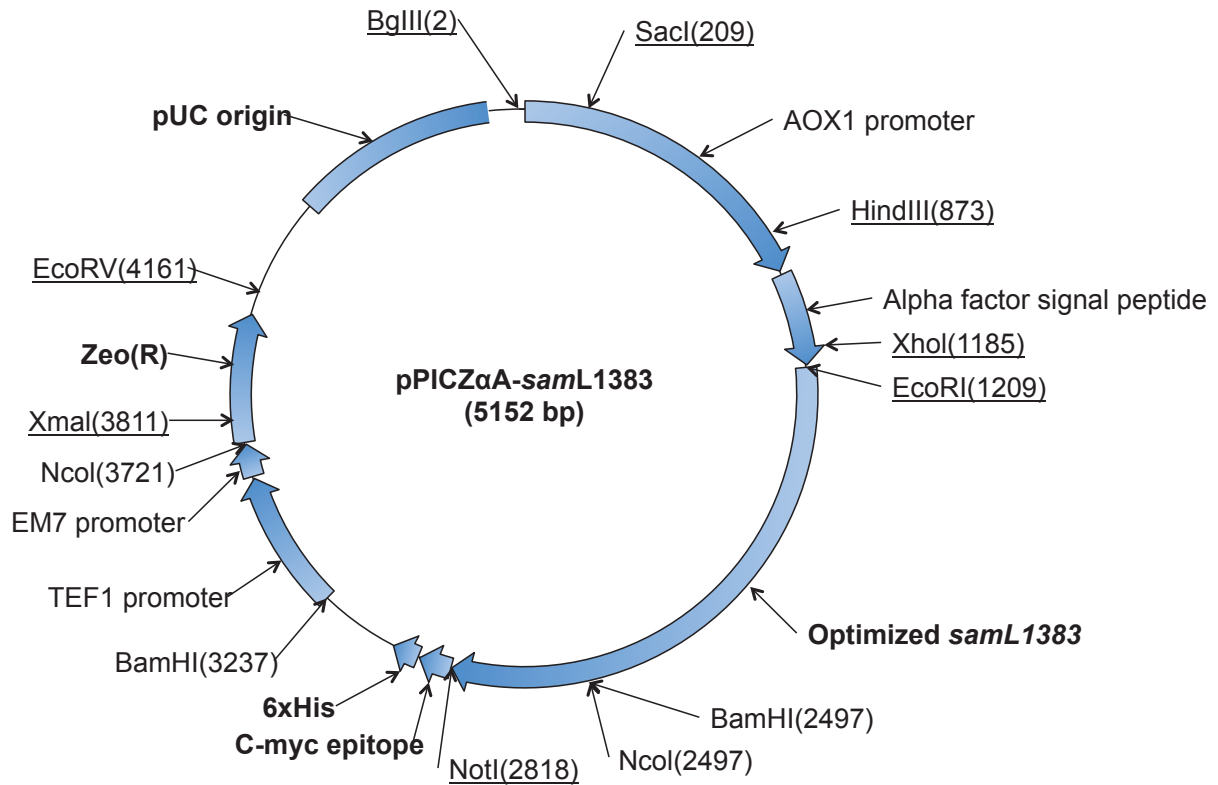


Figure 20 : Carte plasmidique de pPICZαA-samL1383

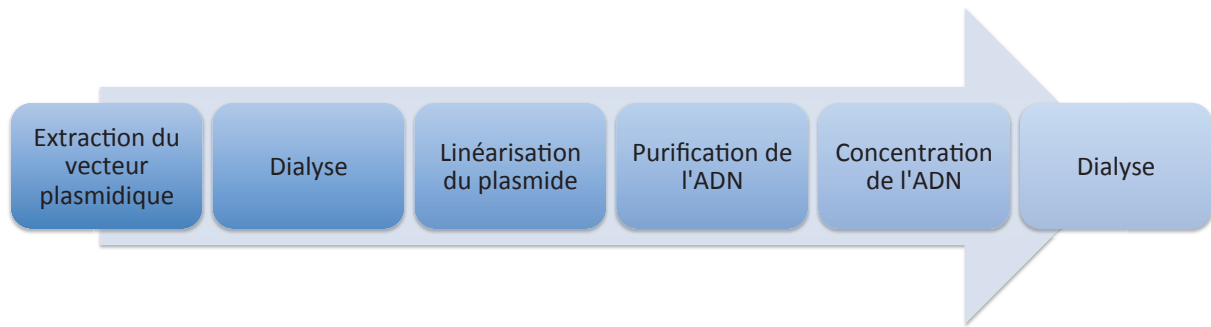
La séquence du gène *samL1383* (1633pb) est intégrée dans le site de clonage après le facteur  $\alpha$  et en 3' du promoteur d'AOX1.

#### 1.4.3.2 Amplification de pPICZαA-samL1383

Le plasmide est amplifié chez *E. coli* TOP10F' cultivé sur le milieu low salt LB (Luria-Bertani) avec la zéocine à 25 $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>.

#### 1.4.3.3 Extraction, linéarisation et concentration du plasmide pPICZαA-samL1383

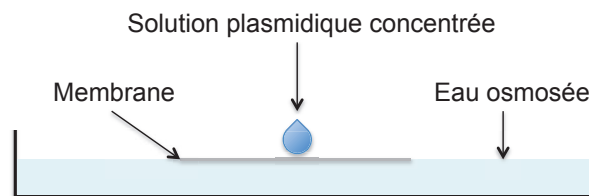
L'ensemble de la démarche suivie pour extraire et purifier le plasmide pPICZαA-samL1383 est décrit dans la Figure 21.



**Figure 21 : Protocole de récupération du plasmide pPICZ $\alpha$ A-samL1383**

Le vecteur plasmidique est extrait grâce au kit Genejet (Thermo Scientific) à partir de 50 mL de culture d'*E. coli* TOP10F' possédant pPICZ $\alpha$ A-samL1383. La solution plasmidique est ensuite concentrée 3 fois à l'aide d'un Speed Vac (concentrator 5301, Eppendorf) à 40°C, pendant 1 h.

Après la concentration, une dialyse d'une heure élimine le sel de la solution. Cette dialyse consiste à déposer une goutte de solution plasmidique concentrée (<20 $\mu$ L) sur une membrane hydrophobe ayant une porosité de 0,22 $\mu$ m (Millipore). La dialyse se fait contre de l'eau osmosée. Un schéma de la dialyse est présenté Figure 22.



**Figure 22 : Dialyse de la solution plasmidique concentrée.**

La linéarisation du plasmide s'effectue grâce à la digestion de l'ADN plasmidique par l'endonucléase de restriction SacI (Biolabs). Cette dernière clive le plasmide au site (209) selon la carte du vecteur plasmidique (Figure 20) sans endommager le site de clonage ni le gène d'intérêt. La réaction de clivage s'effectue dans une solution contenant 15 $\mu$ L de tampon 1 (Biolabs), 15 $\mu$ L de BSA 10 $\times$  (Biolabs) et 150 $\mu$ L d'eau stérile. 45 $\mu$ g d'ADN plasmidique sont ajoutés à cette solution et digérés pendant 2 h à 37°C par 40 U de SacI. L'enzyme de restriction est ensuite désactivée par un palier de température à 65°C pendant 20 min. Une vérification de la digestion peut être faite en réalisant un gel d'électrophorèse (§ 1.4.3.7 ).

La purification des plasmides est ensuite effectuée à l'aide de kit «NucleoSpin Gel and PCR Clean-up» (Macherey Nagel).

Suite à cette purification, une concentration et une dialyse sont effectuées et l'ADN linéaire est concentré dans 10 $\mu$ L de solution (kit de digestion Biolabs).

#### 1.4.3.4 Transformation de *P. pastoris* X33

##### 1.4.3.4.1 Obtention des cellules compétentes

Dans un premier temps, une pré-culture est réalisée. Pour cela, 25 mL de milieu YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) sontensemencés avec 2 mL de suspension glycérolée de cellules de *P. pastoris* X33 conservée à -80°C. La pré-culture est faite pendant une nuit à 30°C sous une agitation à 200rpm.

Une culture de 125 mL de YPD est ensuite réalisée pendant 8h à 30°C sous une agitation à 200 rpm. L'ensemencement du milieu se fait à une DO<sub>600</sub> initiale d'environ 0,1 en vue d'avoir des cellules en phase exponentielle de croissance à une DO<sub>600</sub> entre 1, 3 et 1,5 après 7h de culture.

Suite à cette culture, le milieu de culture est centrifugé pendant 5 min à 1500 g, à une température de 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot est lavé (re-suspension du culot puis centrifugation pendant 5 min, à 1500 g, à une température de 4°C) 3 fois : 2 fois avec 50 mL de l'eau stérile à 4°C et une fois avec 20 mL de sorbitol à 1 M. Le culot est ensuite re-suspendu dans 1 ml de sorbitol à 1 M pour la transformation.

##### 1.4.3.4.2 Transformation

Dans une cuvette d'électroporation pré-refroidie, 80  $\mu$ L d'une suspension de cellules compétentes sont mélangés avec 5 à 20  $\mu$ g de vecteur linéarisé. Après avoir placé la cuvette pendant 5 min dans la glace, une électroporation est réalisée (GenePulseur, Biorad ; 1,5 kV ; 25  $\mu$ F ; 200  $\Omega$ ). 1 mL de sorbitol 1M (4°C) est ajouté immédiatement dans la cuvette et le contenu est transféré dans un microtube stérile avant d'effectuer une incubation pendant 1h à 30°C en statique. Des volumes de 50  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 200  $\mu$ L et 500  $\mu$ L de suspension cellulaire sont ensuite étalés sur du milieu solide YPD + zéocine à 200  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>. L'incubation est réalisée sur 3 ou 4 jours à une température de 28°C. Les colonies qui se développent sur ce milieu sont celles qui ont, a priori, intégré le plasmide.

#### 1.4.3.5 Sélection des cellules de *P. pastoris* de phénotype Mut<sup>+</sup>

Les mutants Mut<sup>+</sup> (Methanol utilization plus) sont les levures pour lesquelles le plasmide est correctement inséré. Les mutants Mut<sup>S</sup> (Methanol utilization slow) sont les levures qui ont le plasmide intégré dans l'extrémité 3' du gène AOX1.

Pour faire la distinction entre ces deux phénotypes, les transformants sont repiqués sur des milieux solides MDH (Minimal Dextrose Medium + Histidine) + zéocine à 200 µg.mL<sup>-1</sup> et MMH (Minimal Methanol + Histidine) + zéocine à 200 µg.mL<sup>-1</sup> et incubés pendant au moins 2 jours à une température de 30°C. Lorsque le milieu de culture contient du méthanol comme unique source de carbone, seuls les mutants Mut<sup>+</sup> capables de le métaboliser. Les mutants Mut<sup>S</sup> ayant perdu la majeure partie de l'activité d'AOX1 dû à une mauvaise intégration du gène dans la séquence du promoteur AOX1. Par conséquent, seuls les mutants Mut<sup>+</sup> peuvent se multiplier sur les 2 milieux minimum alors que le mutant Mut<sup>S</sup> ne peut survivre que sur le milieu MDH.

#### 1.4.3.6 PCR sur colonie

Une PCR est réalisée directement sur les colonies de *P. pastoris* pour vérifier si le vecteur plasmidique est bien inséré dans son génome. Une paire d'amorces spécifiques du gène *samL1383* a été utilisée (Tableau 27).

**Tableau 27 : Amorces utilisées pour la détection du gène *samL1383*.**

Noms des amorces	Séquences
Amorce 5' <i>samL1383</i>	5'-TCCACTACTCCTTCCACTAC-3'
Amorce 3' <i>samL1383</i>	3'-TGACAAAAGCAATCTGGACC-5'

La colonie testée est recueillie avec la pointe d'une pipette puis re-suspendue dans un tube de PCR dans 10 µL d'une solution stérile de NaOH à 0,02 M. La solution est ensuite incubée pendant 10 min à une température de 97°C pour lyser les cellules. La PCR est ensuite effectuée dans le mélange réactionnel suivant (Tableau 28) :

**Tableau 28 : Composition du mélange réactionnel de PCR.**

Constituants	Volume ( $\mu\text{L}$ )
Tampon de PCR (10x)	5
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	2,5
dNTP (2,5 mM)	10
5' amorce (20 $\mu\text{M}$ )	1
3' amorce (20 $\mu\text{M}$ )	1
Polymérase Taq (5U. $\mu\text{L}^{-1}$ )	1
Cellules lysées	5
Eau stérile	24,5

Le protocole de PCR suivi est décrit dans le Tableau 29 :

**Tableau 29 : Protocole de PCR.**

Procédure	Température (°C)	Temps (min)	Nombre de cycle
Préchauffage	95	5	1
Dénaturation	95	1	
Hydratation	53	1	30
Extension	72	2	
Extension finale	72	7	1

#### 1.4.3.7 Electrophorèse

Un gel d'agarose à 1% est préparé dans du tampon TAE (Tris-acetate-EDTA) auquel est ajouté 0,01% (v/v) de SYBR SAFE DNA gel stain (Invitrogen). Un dépôt de 10  $\mu\text{L}$  de produit de PCR ou de produit de digestion mélangé à 3  $\mu\text{L}$  de bleu de charge est effectué sur le gel. La migration s'effectue pendant 40 min sous une tension de 85V dans le tampon TAE. La visualisation de gel est ensuite réalisée sous une lumière bleue ( $\lambda \approx 470 \text{ nm}$ ).

#### 1.4.4 Expression hétérologue de l'aminocyclase chez *P. pastoris*

##### 1.4.4.1 *Conditions de culture*

La pré-culture est réalisée dans des fioles d'Erlenmeyer de 500 mL contenant 50 mL de milieu BMGY. La pré-culture est incubée à une température de 30°C sous une agitation de 250 rpm pendant 12h.

Le fermenteur est une cuve de 3 L (Applikon, Pays Bas) et le milieu de culture utilisé est le BMGY. La calibration de la sonde pH (pH=4 et pH=7) est faite avant la stérilisation du réacteur, alors que celle de l'oxygène (100% avec de l'air et 0% avec de l'azote) est réalisée avant l'ensemencement. Le volume de pré-culture servant d'inoculum est calculé afin de débiter la culture avec une DO<sub>600</sub> de 1. La température de la culture est fixée à 30°C, le pH est régulé à 6 pendant toute la culture par ajout d'ammoniaque 6 N. Le débit d'air est fixé à 120 L.h<sup>-1</sup> et l'agitation imposée est de 800 rpm. De l'anti-mousse (polypropylène glycol) est ajouté au milieu de culture avant la stérilisation du bio-fermenteur à une concentration de 1 mL.L<sup>-1</sup>. L'induction au méthanol (0,5% ou 1% v/v) est réalisée une fois que la DO<sub>600</sub> atteint 40 à 50. Suite à cette induction, des prélèvements de 200 mL sont effectués toutes les 12 heures pendant 4 jours. La biomasse et le surnageant de culture des prélèvements sont séparés par centrifugation (8200 g à 4°C pendant 20 minutes) et le surnageant est stocké à -18°C. La biomasse est lavée 3 fois avec 50 mL de tampon TrisHCl 25 mM NaCl 50 mM (re-suspension du culot puis centrifugation pendant 5 min, à 1500 g, à une température de 4°C), puis lysée par sonication ou plusieurs passages en presse de French (voir § 1.2.1.1 ). Les débits cellulaires sont éliminés par centrifugation (10 000 g à 4°C pendant 20 minutes) et le surnageant est finalement stocké à -18°C.

## 1.5 Mise en oeuvre des réactions enzymatiques

### 1.5.1 Réactifs utilisés

Novozym 435<sup>®</sup> est une préparation industrielle produite par Novozyme Corporation et commercialisée par Sigma, résultant de l'immobilisation de CALB sur une résine acrylique macroporeuse. Cette préparation se présente sous forme de granules blanc de diamètre compris entre 0,3 et 0,9 mm. Elle est fournie avec une activité de 7000 PLU.g<sup>-1</sup> (Propyl Laurate Synthesis), une unité PLU étant définie comme la quantité d'enzyme qui permet la transformation d'1 µmole d'acide laurique par minute en laurate de propyle, en conditions standards et équimolaires. Sa teneur en eau est de 1 à 2 % (p/p) et sa teneur en protéines enzymatiques est comprise entre 1 et 10 %. Le Tableau 30 ci-dessous donne un descriptif exhaustif de l'ensemble des produits chimiques utilisés pour cette étude :

**Tableau 30 : Descriptif des réactifs utilisés pour les réactions enzymatiques.**

	Produit	Pureté (%)	Fournisseur
Biocatalyseur	Lipase B de <i>Candida antarctica</i> (Novozyme 435 <sup>®</sup> )	-	Sigma-Aldrich
	Lys-Ser, HCl (M = 269,73 g.mol <sup>-1</sup> )	99	Bachem
	Lys-Tyr-Ser (M = 396,44 g.mol <sup>-1</sup> )	99	Bachem
Réactifs accepteurs d'acyle	Ser-Tyr-Lys (M= 396,45 g.mol <sup>-1</sup> )	99,39	Genecust
	Leu-Gln-Lys-Trp (M= 573.33 g.mol <sup>-1</sup> )	>95	GENOSPHERE
	Ser-O-oléoyl-Tyr-Lys (M= 660,9 g.mol <sup>-1</sup> )	>71	Bachem
	Ser-N-oléoyl-Tyr-Lys (M= 660,92 g.mol <sup>-1</sup> )	99,25	Genecust
Réactif donneurs d'acyle	Acide oléique (M=282,47 g.mol <sup>-1</sup> )	99	Sigma-Aldrich
Substrats d'hydrolyse	N-α-acétyl-L-lysine (M= 188,22 g.mol <sup>-1</sup> )	99	Sigma-Aldrich
	N-ε-acétyl-L-lysine (M= 188,22 g.mol <sup>-1</sup> )	99	Sigma-Aldrich
Solvant organique	2-Méthyl-2-Butanol	99	Carlo-Erba
Tampon aqueux	TrisHCl (M= 121,14 g.mol <sup>-1</sup> )	99	Sigma-Aldrich
Autres	NaCl (M= 58,44 g.mol <sup>-1</sup> )	99	Bachem
	Triéthylamine (TEA) (M= 101,19 g.mol <sup>-1</sup> )	99	Sigma-Aldrich

### 1.5.2 Réactions enzymatiques en milieux organiques et aqueux

Les réactions enzymatiques ont été effectuées dans des tubes munis de bouchons hermétiques. Les milieux réactionnels sont agités par un barreau aimanté. Les réacteurs enzymatiques sont chauffés par une plaque chauffante thermorégulée (IKA) par l'intermédiaire d'un bain d'huile thermostaté. Pour toutes les réactions enzymatiques mises en oeuvre, le volume réactionnel était soit de 1 mL, soit de 2 mL.

#### 1.5.2.1 Procédure expérimentale de synthèse :

Pour toutes les réactions d'acylation mises en oeuvre, les réactifs sont toujours introduits selon le même ordre. Les substrats à acyler (Lys-Ser, HCl, Lys-Tyr-Ser, Ser-Tyr-Lys, Leu-Gln-Lys-Trp) se présentant sous forme solide sont introduits en premier dans le réacteur. Puis le milieu réactionnel est ajouté, suivi de l'agent acylant (acide oléique). Pour la plupart des peptides formulés sur forme HCl, une base organique (TEA) est ajoutée pour déprotoner les fonctions amines comme le suggère une étude antérieure (Reyes-Duarte *et al.*, 2002). Une fois le milieu réactionnel constitué, celui-ci est mis sous agitation à la température réactionnelle choisie pendant 12 h, de façon à solubiliser les substrats. La réaction est initiée par l'ajout du biocatalyseur dans le milieu à des concentrations de 10 g.L<sup>-1</sup> pour CALB et 1,2 g.L<sup>-1</sup> pour les acylases de *S. ambofaciens*. Le suivi de la synthèse est réalisé pendant 96h pendant lesquelles des prélèvements sont réalisés directement dans le milieu. La réaction enzymatique est arrêtée en plongeant les échantillons dans de la glace. Les solvants réactionnels ou tampons aqueux utilisés au cours des réactions sont conservés soit à 4°C soit sur tamis moléculaire (solvants organiques) afin de maintenir une  $a_w$  initiale en début de réaction inférieure à 0,1. De nombreux travaux (Gatfield, 1984; Humeau *et al.*, 1998a) ont en effet montré l'importance d'une faible  $a_w$  des milieux de synthèse pour l'optimisation de procédés d'acylation catalysés par le Novozym 435<sup>®</sup>. L' $a_w$  du milieu réactionnel est mesuré à l'aide du thermoconstateur Novasina.

#### 1.5.2.2 Procédure expérimentale d'hydrolyse :

L'activité enzymatique des aminoacylases est mesurée avec l'hydrolyse de L-lysine acétylée sur le groupement amine porté par le carbone  $\alpha$  (N- $\alpha$ -acétyl-L-lysine) ou sur le groupement amine porté par le dernier carbone de la chaîne latérale (N- $\epsilon$ -acétyl-L-lysine). Dans des réacteurs type tube à essai, un volume de 0,2 mL de substrat (40mM) est introduit dans 1,5



mL de tampon Tris-HCl (25mM) NaCl (50mM) à pH 8. La réaction débute avec l'ajout de 0,3 mL d'échantillon enzymatique. Des prélèvements sont effectués pendant 24h directement dans le milieu réactionnel et la réaction est arrêtée en plongeant les échantillons prélevés dans de la glace. Pour les tests d'activité hydrolytique en fonction du pH, les tampons utilisés sont détaillés dans le Tableau 31.

**Tableau 31 : Composition des tampons utilisés pour la recherche de pH optimal d'hydrolyse.**

pH	Constituant			Volume (mL)	Dilution
	Nom	Formule brute	Concentration (M)		
4	Hydrogénophosphate de sodium	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5	30,84	200
	Acide citrique	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	0,5	24,58	
5	Hydrogénophosphate de sodium	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5	41,2	200
	Acide citrique	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	0,5	19,4	
6	Hydrogénophosphate de sodium	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5	50,52	200
	Acide citrique	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	0,5	14,74	
7	Hydrogénophosphate de sodium	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5	65,88	200
	Acide citrique	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	0,5	7,06	
8	Hydrogénophosphate de sodium	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5	77,8	200
	Acide citrique	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	0,5	1,1	
9	Soude	NaOH	0,2	21,4	200
	Chlorure de potassium, borate	KCl, H <sub>2</sub> BO <sub>3</sub>	0,2	50	
10	Hydrogénophosphate de sodium	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,05	50	100
	Soude	NaOH	0,1	18,3	
11	Hydrogénophosphate de sodium	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,05	50	100
	Soude	NaOH	0,1	29,6	
12	Hydrogénophosphate de sodium	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,05	50	100
	Soude	NaOH	0,1	33,7	

## 1.6 Méthodes analytiques

### 1.6.1 Mesure de la concentration protéique

La concentration protéique est mesurée selon la méthode de Bradford. Cette technique est basée sur la réaction du bleu de Coomassie avec des protéines. La mesure de la concentration des protéines se fait par une lecture spectrophotométrique (U-2000, HITACHI) à une

longueur d'onde de 595 nm. 20  $\mu$ L de solution à tester sont dilués dans 980  $\mu$ L de tampon de Bradford dans une cuve de spectrophotomètre. La cuve est ensuite placée dans le noir à température ambiante pendant 15 min. Pour relier les densités optiques lues aux concentrations protéiques, une courbe étalon est réalisée avec de l'albumine de sérum bovin. Les composants du tampon de Bradford sont indiqués dans le Tableau 32:

**Tableau 32 : Composition du réactif de Bradford.**

Réactifs	Quantités
Coomasie G250	20 mg
Éthanol (70%)	10 mL
Acide orthophosphorique	20 mL
Eau distillée	20 mL

### 1.6.2 Estimation des poids moléculaires des protéines

L'estimation des poids moléculaires des protéines se fait sur un gel SDS-PAGE par migration verticale. Les compositions des gels, tampons et solutions utilisés sont décrites dans le Tableau 33:

**Tableau 33 : Gels, tampons et solutions utilisées pour les SDS-PAGE.**

	<b>Constituants</b>	<b>Quantité</b>
Gel de séparation 12,5%	Acrylamide: Bis-acrylamide (30%: 0,8% (m/v))	8 mL
	Tampon de séparation: TrisHCl 1,5 M, pH 8,8	5 mL
	Eau distillée	6,7 mL
	SDS 10%	0,2 mL
	TEMED	10 $\mu$ L
	Persulfate d'ammonium	100 $\mu$ L
Gel de concentration 4%	Acrylamide: Bis-acrylamide (30%: 0,8% (m/v))	1,3 mL
	Tampon de séparation: TrisHCl 0,5 M, pH 6,8	2,5 mL
	Eau distillée	6,1 mL
	SDS 10%	100 $\mu$ L
	TEMED	10 $\mu$ L
	Persulfate d'ammonium	50 $\mu$ L
Solution de dépôt	Tampon de séparation: TrisHCl 0,5 M, pH 6,8	1,2 mL
	Eau distillée	4,8 mL
	SDS 10%	2 mL
	Glycérol	1 mL
	Bleu de bromophénol 0,5% (m/v)	0,5 mL
	$\beta$ -mercaptoéthanol	475 $\mu$ L
Tampon de migration	TrisHCl 3 g.L <sup>-1</sup>	3 g.L <sup>-1</sup>
	Glycine 14,4 g.L <sup>-1</sup>	14,4 g.L <sup>-1</sup>
	SDS 1 g.L <sup>-1</sup>	1 g.L <sup>-1</sup>
Solution de révélation	Coomassie R250	10%
	Méthanol	40%
	Acide acétique	7,5%
	Eau distillée	52,5%

Après polymérisation, les gels sont placés dans la solution tampon de migration. Les échantillons sont solubilisés dans la solution de dépôt, puis placés pendant 5 min à 95°C. La migration s'effectue à 20 mA (fixe) et 180 V pendant environ 1h. Le gel SDS-PAGE est ensuite placé sous agitation dans la solution de révélation pendant une nuit pour être finalement décoloré avec la solution décolorante acide acétique/éthanol/eau (7,5/30/62,5 v/v/v). Le stockage du gel se fait dans un mélange à 5% d'acide acétique.

### 1.6.3 Analyse des produits de réactions enzymatiques

#### 1.6.3.1 *Chromatographie sur couche mince (CCM)*

La CCM est basée sur la migration différentielle des constituants des échantillons en fonction de leur polarité. La migration s'effectue sur un gel de silice déposé sur une plaque d'aluminium, les échantillons étant entraînés en fonction de leur polarité par un éluant apolaire. Des dépôts de 5µL d'échantillons sont réalisés sur une plaque de silice (Silica gel 60, Merck). La plaque est ensuite placée dans une enceinte fermée hermétiquement contenant l'éluant (n-butanol 60%, acide acétique 20% et eau distillée 20%). Après séchage, les composés sont révélés par pulvérisation d'une solution de ninhydrine (1g de ninhydrine dans 475ml de butanol et 25ml d'acide acétique), qui forme des complexes colorés avec les groupements amines primaires. Pour le développement de la coloration, la plaque est placée dans un four à 110 °C pendant 3 minutes.

#### 1.6.3.2 *Chromatographie liquide haute performance*

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est utilisée pour quantifier la quantité de lysine produite lors des hydrolyses. Le système utilisé est une chaîne de chromatographie LC-20, SHIMAZU équipée :

- D'une pompe de liquide LC-10AD
- D'un injecteur automatique SIL-10A
- D'un four de colonnes CTO-10A
- D'un détecteur HPLC à fluorescence RF-10A
- D'un processeur C-R7A
- D'un contrôleur général du système SCL-10A
- D'une colonne de stabilisation Gracemont RP 18 5µ
- D'une pré-colonne Apollo C18 5µ
- D'une colonne analytique Apollo C18 5µ

La séparation des constituants des échantillons s'effectue selon la méthode Shimadzu® (<http://www.shimadzu.com>) par dérivation des acides aminés avec de l'ortho-phthalaldéhyde (OPA) qui une fois excités avec une longueur d'onde de 350 nm, émettent une fluorescence à 460 nm. Après la dérivation, 2  $\mu\text{L}$  d'échantillons sont injectés dans le système à un débit de 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . La température du four est de 45°C. Les molécules adsorbées sur la colonne sont désorbées avec le gradient d'acétonitrile (Sigma-Aldrich) suivant:

- 0 à 1 min : 95% de phase A et 5% de phase B
- 1 à 10 min : gradient allant jusqu'à 5% de phase A et 95% de phase B
- 10 à 15 min : 100% de phase B
- 15 à 16 min : gradient allant jusqu'à 0% de phase B et 100% de phase A
- 16 à 21 min : 100% de phase C
- 21 à 34 min : gradient allant jusqu'à 0% de phase C, 95% de phase A et 5% de phase B.
- Phases mobiles :
  - A :  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,78  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1,79  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
  - B : Phase A 600 mL, Acétonitrile 300mL
  - C : Acétonitrile 80% (v/v), eau distillée (20 v/v)

### 1.6.3.3 Spectrométrie de masse

Les produits des synthèses enzymatiques ont été identifiés par un couplage chromatographie liquide/spectrométrie de masse (ThermoFisher Scientific, San Jose, CA, USA). Cette méthode analytique consiste à passer l'échantillon dans une pompe binaire connectée simultanément à un détecteur à barrette de diode (PDA) et à un analyseur de masses correspondant à une trappe ionique LQT (Linear Trap Quadripole) avec une source d'ionisation positif de type  $\text{ESI}^+$  (ElectroSpray Ionisation). La séparation chromatographique est réalisée par une colonne C18 amide (150 mm  $\times$  2,1 mm, 5  $\mu\text{m}$  de porosité – Grace/Alltech, Darmstadt, Germany) précédée d'une pré-colonne C18 amide (7,5 mm  $\times$  2,1 mm, 5  $\mu\text{m}$  de porosité - Grace/Alltech, Darmstadt, Germany) à 25°C. Les phases mobiles sont constituées d'un mélange méthanol/eau/acide trifluoroacétique (80:20:0.1, v/v/v) pour la phase A et méthanol/acide trifluoroacétique (100:0.1, v/v) pour la phase B. Les peptides acylés sont élués avec un gradient linéaire de 0% à 100% de phase B en 5 min, à un débit de 0,2  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , suivi d'une

étape en isocratique à 100% de phase B de 10 min, à un débit de 0,2 mL.min<sup>-1</sup>. Les conditions de la spectrométrie de masse sont les suivantes (Tableau 34) :

**Tableau 34 : Paramètres appliqués pour la spectrométrie de masse.**

Paramètres		Valeurs
Tension de l'electrospray		4,5 kV
Gaz de source (ionisation)	Gaz de nébulisation	30 UA.min <sup>-1</sup>
	Gaz auxiliaire	10 UA.min <sup>-1</sup>
	Gaz rideau	10 UA.min <sup>-1</sup>
Capillaires de transfert	Température	250°C
	Tension	49 V
Tension optique de transfert	Tube lens	120 V
	Split lens	- 34 V
	Front lens	- 4,25 V

Les paramètres de l'optique de transfert ont été optimisés par réglages automatiques en utilisant une solution standard d'oléoyl-KS à une concentration de 0,1 g.L<sup>-1</sup> perfusée dans la phase mobile (A/B, 50:50) à un débit de 5 µL.min<sup>-1</sup>. Les spectres MS ont été réalisés de 100 à 1000 m/z et les spectres MS<sup>2</sup> additionnels ont été réalisés à des fins d'analyse structurale en se basant sur l'identification d'ions fils. Les analyses de spectre de masse sont réalisées avec le logiciel Xcalibur (version 2.1 Thermo Scientific).

#### 1.6.4 Détermination de l'activité spécifique des aminoacylases

L'activité spécifique est définie comme la vitesse de production de lysine en mmol.h<sup>-1</sup> catalysée par un gramme d'aminoacylases à partir d'un hydrolysats de N-α ou de N-ε-acétyl-L-lysine. L'activité spécifique des aminoacylases peut se calculer avec la formule suivante :

$$AE = \frac{V}{C [protéines]} \quad \text{où} \quad V = \frac{\Delta C [Lysine]}{\Delta t}$$

AE : activité enzymatique spécifique (mmol lysine.h<sup>-1</sup>.g protéines<sup>-1</sup>) ;

V : vitesse de production de lysine (mmol lysine.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) ;

C [protéines] : concentration protéique ( $\text{g.L}^{-1}$ ) ;

C [lysine] : concentration de lysine ( $\text{mmol.L}^{-1}$ ) ;

t : temps (h)

## 2 Modélisation moléculaire

### 2.1 Ressources informatiques

#### 2.1.1 Ordinateurs

Un ordinateur et deux serveurs de calculs sont utilisés pour l'exécution et l'analyse des simulations :

- Un processeur Intel Core Duo CPU 6550 (2,33 Ghz), équipé avec 2 Go de mémoire RAM.
- Un bi-processeur AMD Opteron Shanghai 2384 4CPU (2,7 Ghz, 16 Go de mémoire)
- Un bi-processeur 4CPU (1,8 Ghz, 16 coeurs de calculs, 8 Go de mémoire RAM)
- Un bi-processeur Intel Xeon 4CPU L5420 (2,5 Ghz, 30 coeurs de calculs, 16 Go de mémoire)

#### 2.1.2 Logiciels de modélisation moléculaire

Pour ces travaux, les logiciels utilisés ont été les suivants :

- *Discovery Studio 3.5 (Accelrys, Inc)* : ce logiciel comporte de nombreux modules de simulation moléculaire voués à l'étude structurale des protéines et des acides nucléiques, et de leurs interactions avec d'autres molécules. Les éléments utilisés dans cette étude sont : le champs de force CHARMM (Brooks *et al.*, 1983) pour les simulations de mécanique moléculaire et de dynamique moléculaire ; le module *Solvation* pour ajouter des molécules de solvant et des contres-ions ; le module *LigandFit* (Venkatachalam *et al.*, 2003) pour les simulations de docking et le module *Consensus Score* (Feher, 2006) pour le classement des complexes à l'issue du docking.

- *NAMD v.2.7 (Not Another Molecular Dynamics Program)* (<http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/>) : ce logiciel est un code de dynamique moléculaire efficace pour les calculs en parallèle, conçu pour les simulations de systèmes biomoléculaires de grandes tailles.
- *VMD v.1.8.7 (Visual Molecular Dynamics)* (Humphrey *et al.*, 1996) : ce logiciel est un programme de visualisation moléculaire pour l’affichage animé et la visualisation des systèmes biomoléculaires de grandes tailles à l’aide d’une interface graphique et de la conception de scripts.

## 2.2 Préparation des structures

### 2.2.1 Structure de CALB

La structure cristalline utilisée de CALB est la forme 1LBS disponible sur la protein data bank (PDB). Il s’agit d’un cristal composé de six chaînes protéiques par cellule. Les dimensions de chaque cellule sont  $a = 229,5 \text{ \AA}$ ,  $b = 95,6 \text{ \AA}$ ,  $c = 86,8 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ . Chaque chaîne est constituée de 317 acides aminés, et contient un inhibiteur éthyl-hexyl-phosphonate (HEE) lié de manière covalente à la sérine catalytique (Ser105). Les chaînes contiennent aussi un dimère de N-acétyl-glucosamine (NAG) lié au résidu asparagine 74 (Asn74). De plus, 92 molécules d’eau sont adsorbées à la chaîne A. Dans les études de modélisation moléculaire, la forme cristalline 1LBS fait partie des structures les plus citées. En effet, la présence de l’inhibiteur phosphonate fournit des informations expérimentales sur le mode d’ancrage et l’orientation du ligand vis-à-vis du trou oxyanionique.

La préparation de la structure initiale se compose des étapes suivantes :

- Conservation d’une chaîne et suppression des autres chaînes.
- Suppression de l’inhibiteur HEE et du dimère NAG.
- Conservation des molécules d’eau adsorbées.
- Addition des atomes d’hydrogène.
- Ajustement à pH neutre de l’état de protonation des résidus.
- Solvatation de la structure avec des molécules d’eau TIP3P.
- Neutralisation du système avec des contre-ions.



## 2.2.2 Structure des ligands

Les structures tridimensionnelles des peptides ont été construites en utilisant les outils du module *Builer* de *Discovery Studio 3.5*. Les types d'atome des substrats ont été fixés en appliquant le champs de force CHARMM général. Les structures résultantes ont été soumises à une correction géométrique ('clean geometry' de *Discovery Studio 3.5*) afin d'ajuster la longueur des liaisons. L'énergie des systèmes a été minimisée pour s'assurer de la viabilité énergétique des différents substrats. Pour cela, le protocole appliqué est une minimisation de 2000 itérations avec l'algorithme 'Steepest Descent' de *Discovery Studio 3.5*.

## 2.2.3 Construction de la structure « acyl-enzyme »

La structure « acyl-enzyme » a été construite en 4 étapes en utilisant le logiciel *Discovery Studio 3.5* (*Accelrys, Inc*). Dans un premier temps, le proton de l'hydroxyle de la chaîne latérale du résidu Ser105 de CALB a été supprimé manuellement. Dans un deuxième temps, un groupement acyle a été construit à partir de l'atome d'oxygène en position  $\beta$  de la chaîne latérale du résidu Ser105. Dans un troisième temps, une chaîne carbonée de 17 atomes comprenant une double liaison entre le 8<sup>ième</sup> et le 9<sup>ième</sup> carbone est générée (construction de la chaîne oléoyle). Dans un quatrième et dernier temps, les atomes d'hydrogène de la chaîne carbonée sont ajoutés automatiquement en utilisant la fonction « add proton » de *Discovery Studio 3.5* (*Accelrys, Inc*). Le placement de la chaîne acyle construite est ajusté dans le site actif de CALB manuellement.

## 2.3 Simulations de dynamique moléculaire

### 2.3.1 Paramètres des simulations

#### 2.3.1.1 *La température*

La température ( $T = 300$  K) à laquelle sont menées les simulations de dynamique moléculaire est un paramètre important car c'est en fonction de celui-ci que les vitesses initiales des

atomes sont établies. Le plus souvent, elles sont déterminées aléatoirement selon une distribution de Maxwell-Boltzmann. En outre, la température est directement reliée à l'énergie cinétique du système :

$$\frac{Tk_b}{2}(3N - N_c) = \sum_{i=1}^N \frac{|p_i|^2}{2m_i}$$

Où :

- $k_b$  est la constante de Boltzmann,
- $T$  est la température (300 K),
- $N_c$  est le nombre de contraintes,
- $(3N-N_c)$  est le nombre total de degrés de liberté,
- $p_i$  est le moment total de la particule
- $i$  et  $m_i$  sont la masse de la particule.

### 2.3.1.2 *Le pas d'intégration*

Le pas d'intégration ( $\Delta t$ ) est choisi selon la fréquence de vibration la plus élevée des molécules étudiées. Pour les systèmes biologiques, il s'agit de la fréquence vibrationnelle des liens hydrogènes ( $10^{-14}$ s). Pour assurer une intégration idéale des équations du mouvement, le pas d'intégration doit être de l'ordre du dixième de cette fréquence. Dans cette étude, le pas d'intégration est de 2 fs ( $10^{-15}$ s).

### 2.3.1.3 *L'algorithme SHAKE*

L'algorithme SHAKE (Ryckaert *et al.*, 1977) est utilisé pour contraindre les liens hydrogènes à une longueur fixe. Il a l'avantage de permettre d'accélérer les calculs, car la position de l'atome d'hydrogène n'est pas calculée selon les équations du mouvement mais plutôt en fonction de la position de l'atome lourd auquel il est lié. L'application de cet algorithme permet notamment l'utilisation d'un pas d'intégration de 2 fs.

### 2.3.1.4 Les ensembles thermodynamiques

Les ensembles thermodynamiques permettent de simuler différents types de phénomènes physiques. Cette étude s'est déroulée avec l'ensemble isothermale-isobare (ou NPT) caractérisé par un nombre  $N$  de particules, une pression et une température constants. La pression est maintenue constante par une fluctuation du volume

### 2.3.1.5 Distance de troncation et méthode « Particule Mesh Ewald »

Le calcul de l'énergie des termes non liés au cours d'une simulation de dynamique moléculaire ou d'une minimisation d'énergie est la partie la plus coûteuse en temps. Le nombre de termes non liés qui doit être évalué est proportionnel au carré du nombre de particules et est donc de l'ordre de  $N^2$ . Par ailleurs, les interactions intramoléculaires sont négligeables au delà d'une certaine distance. En effet, le potentiel de Lennard-Jones (Figure 23), modélisant les interactions de van der Waals, tend rapidement vers 0 et les interactions électrostatiques sont inversement proportionnelles à la distance entre 2 atomes.

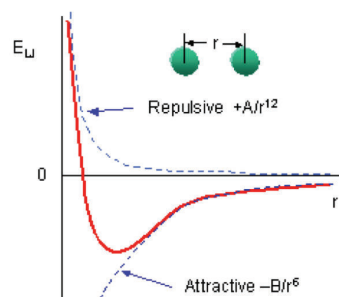
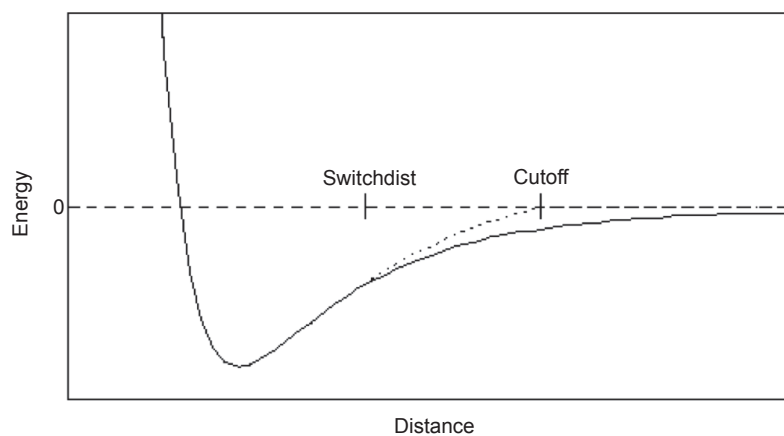


Figure 23 : Représentation graphique du potentiel de Lennard-Jones 6-12.

De ce fait, les interactions entre atomes espacés d'une certaine distance sont négligées pour accélérer le temps de calcul. Cette distance est appelée *distance de troncation (cutoff)*.

L'introduction d'une coupure radicale à la distance de troncation introduit des artefacts dans les interactions moléculaires. En effet, même si les interactions sont plutôt faibles au delà de la distance de troncation, l'effet global dans un système comportant plusieurs milliers d'atomes est important. Une façon d'atténuer cet artefact est d'employer une fonction mathématique. Celle-ci ramène progressivement à zéro les interactions exercées par un atome sur les autres atomes du système. Parmi les différentes méthodes existantes, c'est la fonction

'switching' qui est utilisée. Son application permet de réduire progressivement le potentiel à 0 entre la distance 'switch' et la distance de troncation (Figure 24)



**Figure 24 : Potentiel de van der Waals en présence (trait continu) et en absence (trait discontinu) de la fonction 'switchdist'. L'application de la fonction 'switchdist' réduit progressivement le potentiel à 0 entre la distance 'switch' et la distance de troncation (Bhandarkar *et al.*, 2003).**

La méthode « Particule Mesh Ewald » est une méthode permettant d'éviter les approximations liées aux distances de troncation pour le calcul des interactions électrostatiques. Dans cette méthode, le calcul des interactions électrostatiques est séparé en deux parties :

- Les interactions de courte portée ( $E_{sr}$ ) qui sont calculées avec une sommation traditionnelle
- Les interactions de longue portée ( $E_{lr}$ ) qui incluent les interactions supérieures à la distance de troncation et qui sont calculées en utilisant un algorithme de Transformation de Fourier rapide (*Fast Fourier Transform : FFT*).

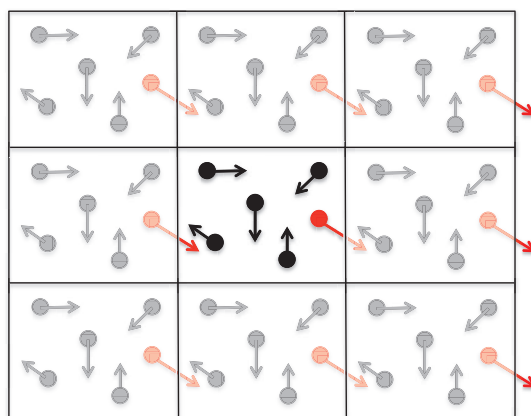
### 2.3.2 Conditions périodiques frontières

Lors de simulations menées sur des systèmes solvatés, deux problèmes sont rencontrés aux frontières du système :

- Les interactions non liées sont discontinues
- Les molécules en mouvement ne sont pas contraintes et peuvent s'échapper.

La solution à ces problèmes est l'application de conditions périodiques aux frontières du système (*Periodic Boundary Conditions*). Selon ces conditions, le système de base composé

de plusieurs molécules est positionné au centre d'un espace et pour chaque face exposée, une réplique virtuelle du système de base est juxtaposée (Figure 25).



**Figure 25 : Représentation en 2D des conditions périodiques frontières.**

Chaque particule interagit avec les autres particules du système ainsi qu'avec ses images virtuelles. Ces répliques sont utilisées pour calculer les interactions non liées des molécules localisées aux frontières. En outre, l'application de conditions périodiques frontières permet la disparition de l'effet frontière. En effet, le déplacement d'une molécule vers une réplique virtuelle entraîne l'intégration d'une molécule de la réplique de la frontière opposée vers le système de base.

### 2.3.3 Conditions des simulations de dynamique moléculaire

Toutes les simulations de dynamique moléculaire ont été menées sur des serveurs de calcul utilisant le programme NAMD v.2.7 ainsi que les paramètres et les fichiers topologiques de champs de force CHARMM implémentés dans Discovery Studio 3.5. Les différentes conditions appliquées lors des simulations sont les suivantes :

- La température du système est fixée à 300 K.
- Le pas d'intégration ( $\Delta t$ ) a été fixé à 2 fs.
- Les interactions électrostatiques à courte portée ont été calculées toutes les 2 fs.
- Les interactions électrostatiques à courte et longue portée ont été évaluées toutes les 2 fs.

- L'ensemble canonique ou NPT (nombre de particules, pression et température constants) a été considéré comme ensemble thermodynamique.
- L'utilisation de l'ensemble canonique requiert l'application de conditions périodiques frontières sur le système.
- Les interactions électrostatiques ont été traitées avec la méthode 'Particule Mesh Ewald'.
- La distance de troncation (*Cutoff*) a été fixée à 12 Å.
- La fonction 'switching' a été appliquée aux interactions de van der Waals entre 10 et 12 Å.
- Les coordonnées ont été sauvées toutes les 2 ps.
- La liste des atomes voisins pour les interactions non liées a été actualisée toutes les 10 étapes d'intégration.
- Les liens entre les atomes lourds et les atomes d'hydrogène ont été maintenus rigides (algorithme SHAKE)

#### 2.3.4 Protocole des simulations de dynamique moléculaire

Des simulations de dynamique moléculaire ont été menées d'une part pour l'étude de la stabilité structurale des systèmes acyl-enzyme cibles et d'autre part pour l'étude du positionnement de la chaîne oléoyl dans la cavité catalytique de CALB. Le protocole appliqué à ces simulations est détaillé ci-dessous (Figure 26).

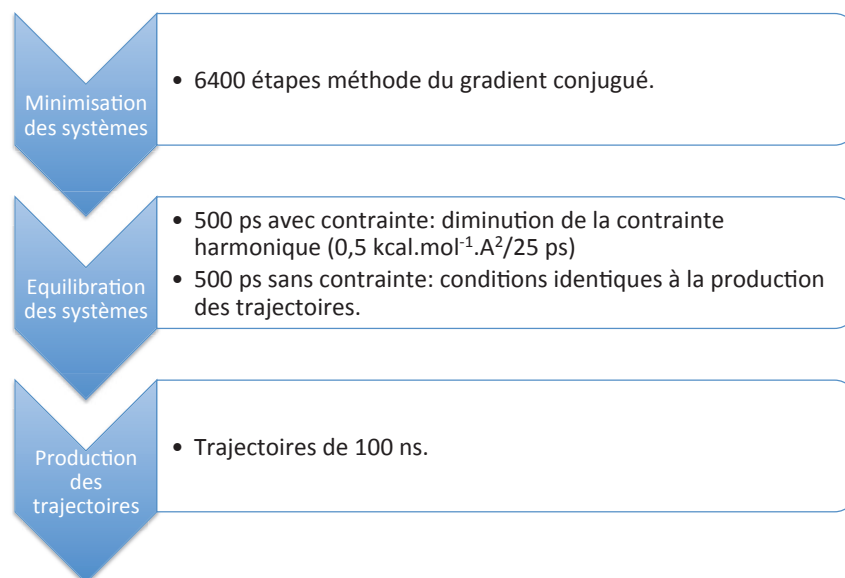


Figure 26 : Représentation schématique du protocole des simulations de dynamique moléculaire.

#### 2.3.4.1 Minimisation des systèmes

Pour chaque système moléculaire étudié, une minimisation de 10 000 étapes a été effectuée selon la méthode du gradient conjugué (algorithme implémenté dans NAMD).

#### 2.3.4.2 Equilibration des systèmes

Cette étape correspond au début de l'intégration des équations de mouvement et donc, au début de la dynamique. L'objectif de la phase d'équilibration est de permettre au système d'évoluer de la configuration de départ vers une configuration d'équilibre atteinte à la température choisie pour les simulations. L'équilibration se poursuit jusqu'à ce que les valeurs d'un ensemble de propriétés soient stables. En général, les propriétés suivies sont des grandeurs thermodynamiques telles que l'énergie, la température et la pression, ainsi que des propriétés structurales. La phase d'équilibration des systèmes est divisée en deux parties :

- Durant les 500 premières ps, les systèmes sont soumis à une contrainte harmonique. Celle-ci est fixée initialement à  $100 \text{ kcal.mol}^{-1} \cdot \text{Å}^2$  et progressivement diminuée à raison de  $0,5 \text{ kcal.mol}^{-1} \cdot \text{Å}^2$  toutes les 25 ps.
- Ensuite, l'équilibration est menée sans contrainte dans les mêmes conditions que la phase de production durant 500 ps complémentaires.

### 2.3.4.3 Production des trajectoires de dynamique moléculaire

Cette étape du protocole est la plus coûteuse en temps de calcul. A titre indicatif, une nanoseconde de trajectoire est calculée en 6 heures pour un système composé d'environ 50000 atomes sur 12 noeuds d'un serveur de calcul. La phase de production des différentes simulations a été effectuée avec les paramètres présentés dans la partie 2.3.3 . Des durées de trajectoires de 100 ns ont été appliquées.

### 2.3.4.4 Analyses des résultats

Les trajectoires de dynamique moléculaire fournissent des informations sur les propriétés conformationnelles des systèmes moléculaires et sur la façon dont les changements de conformation s'opèrent dans le temps. L'analyse des simulations est facilitée par la réalisation de graphes montrant l'évolution de plusieurs paramètres au cours du temps.

Dans un premier temps, les trajectoires sont exploitées pour l'analyse structurale des différents systèmes moléculaires étudiés. Les évènements spécifiquement observés sont la stabilité de la protéine (maintien de la forme active), le positionnement de la chaîne oléoylle et l'orientation de son groupement carbonyle dans la cavité du site actif, la stabilité de la triade catalytique. Des paramètres tels que le RMSD (*Root Mean Square Deviation*), les cartes RMSD ou RMSD 2D et la conservation des structures secondaires de la protéine (Timeline) ont été calculés pour les différentes trajectoires afin de vérifier la stabilité des systèmes, de mettre en évidence et de localiser d'éventuels changements structuraux importants.

Le RMSD ou écart quadratique moyen est une mesure de la différence entre la position des atomes dans les différentes conformations adoptées par le système étudié au cours de la trajectoire :

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \delta_i^2}$$

Où :

- N est le nombre d'atomes,
- $\delta$  est la distance entre N paires d'atomes



Les cartes RMSD sont une comparaison de toutes les conformations entre elles au cours du temps. Elles permettent notamment de faire ressortir des conformations stables ou redondantes au cours de la simulation de dynamique moléculaire.

L'outil Timeline est une application de *VMD v.1.8.7* permettant de visualiser l'évolution de chaque élément de structure secondaire de la protéine au cours des trajectoires.

Le positionnement de la chaîne oléoyl dans la cavité catalytique a également été analysé de manière à identifier une conformation pertinente d'acyl-enzyme pouvant être utilisée dans les simulations ultérieures de docking. Pour ce faire, divers critères nous ont semblés pertinents :

- les distances entre l'oxygène du carbonyle lié à la sérine catalytique et les atomes du trou oxyanionique ont été mesurées. Le bon positionnement du carbonyle de l'acyl-enzyme est un élément important favorisant l'attaque nucléophile du substrat accepteur d'acyle (dans notre cas le peptide).

- les distances et liaisons hydrogène entre les résidus constituant la triade catalytique ont été suivies au cours des trajectoires afin de vérifier que la conformation active de la protéine est maintenue au cours du temps. Ces liaisons stabilisent l'histidine catalytique dans une position adéquate pour le transfert du proton du groupement accepteur d'acyle à l'azote  $\epsilon^2$  situé sur la chaîne latérale de l'His224. Ce transfert a pour effet de faciliter l'attaque nucléophile du substrat sur l'acyl-enzyme.

La démarche d'analyse des trajectoires de dynamique moléculaire est la suivante :

- Découpe des trajectoires de 100 ns toutes les 2 ps. Les analyses sont ainsi effectuées sur 5000 conformations extraites de la trajectoire de dynamique moléculaire.
- Mesure des distances d'intérêt et calculs des valeurs de RMSD sur les 5000 conformations extraites de la trajectoire.

## 2.4 Docking et scoring

### 2.4.1 Considérations générales

Le docking et le scoring sont deux méthodes permettant de prédire le positionnement le plus probable d'un ligand dans le site actif d'une enzyme.

Dans un premier temps, le docking (littéralement « arrimage » en français) permet d'identifier les positions et orientations potentielles d'un ligand en interaction avec le site actif d'une protéine, appelé cible de docking. L'avantage de cette méthode est qu'elle est relativement peu coûteuse en temps de calcul. Une de ses limites est que la structure de l'enzyme est fixe, limitant les possibilités d'ajustement de l'enzyme en présence du ligand (phénomène d'induced fit effect). Depuis peu, 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 les plus amples (mouvement de domaines) ne soient pas pris en compte.

Dans un deuxième temps, l'étape de scoring permet de classer les différentes poses issues du docking en leur affectant une note (un « score ») grâce à des fonctions de score évaluant les interactions entre le ligand et le récepteur. Les fonctions de score dérivent généralement de la mécanique moléculaire et apprécient plusieurs paramètres thermodynamiques tels que : les interactions hydrophobes, les interactions électrostatiques, les liaisons hydrogènes, les effets de solvatation, les effets d'entropie...

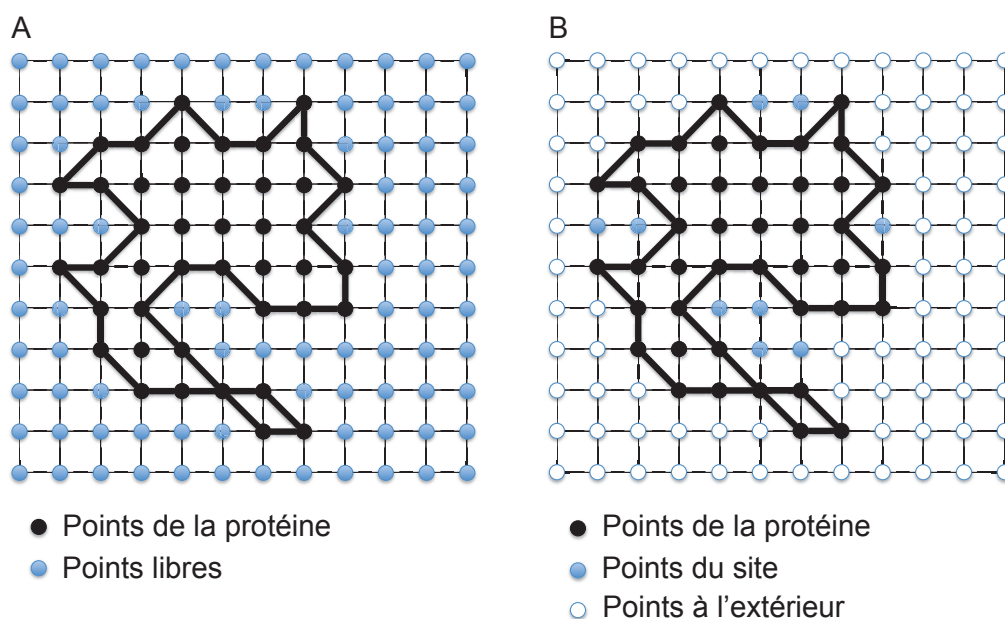
### 2.4.2 Simulation de docking

La mise en oeuvre d'une simulation de docking comprend la définition du site actif, la génération des complexes, la sélection des complexes et le classement des complexes sélectionnés. Toutes les simulations de docking ont été menées avec le module *LigandFit* de *Discovery Studio 3.5*.

### 2.4.2.1 Définition du site actif

Le module *LigandFit* offre un outil pour la détection des cavités dans les protéines. Cet outil se base sur l'algorithme de remplissage par diffusion (*flood-filling algorithm*) et fonctionne en deux étapes successives :

- Une grille tridimensionnelle avec un espacement de 0,5 Å est construite en se basant sur les dimensions (x, y, z) de la protéine. Chaque point de la grille est classé comme « occupé » si la distance de contact la plus proche de l'atome lourd de la protéine est inférieure ou égale à 2,5 Å ; dans le cas contraire, le point de la grille est classé comme « libre » (Figure 27A).
- En partant de l'extérieur de la grille, les points libres sont effacés jusqu'à ce que les nuages de points aient une largeur maximale prédéfinie par l'utilisateur. Chaque nuage de points conservé représente une cavité (Figure 27B).



**Figure 27 : Représentation schématique de la grille étendue à travers la protéine. A : les points de la grille 'occupés' par la protéine sont représentés par des cercles noirs tandis que les points 'libres' sont représentés par des cercles bleus. B : les cercles blancs représentent des points de la grille qui ont été effacés et qui laissent apparaître des cercles ombragés identifiés comme des points de cavités (Venkatachalam *et al.*, 2003).**

Les protéines ayant des typologies de surfaces assez irrégulières, plusieurs cavités sont détectées par cette procédure automatique. Il appartient au modélisateur, en se basant sur les

connaissances de la protéine étudiée, de sélectionner parmi les cavités détectées celle qui constitue le site de liaison dans lequel sera effectué le docking du ligand.

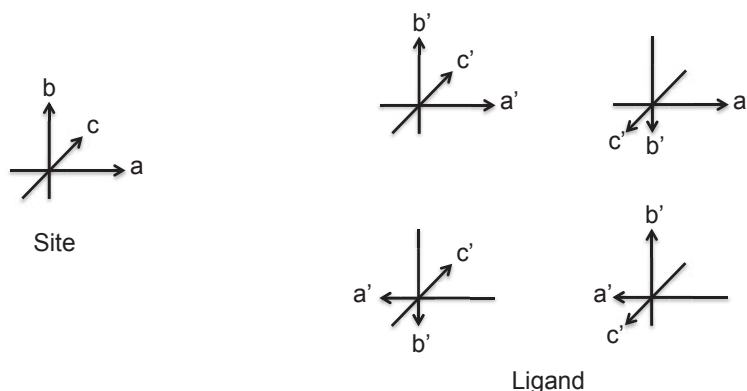
#### 2.4.2.2 Site actif de CALB

Le site actif de CALB a été défini en se basant sur la recherche des cavités, à partir des données cristallographiques trouvées dans la littérature (Uppenberg *et al.*, 1994a). La cavité de CALB est étroite et profonde. La triade catalytique constituée des résidus Ser105, His224 et Asp187 est localisée dans le fond de la cavité. Les résidus du trou oxyanionique sont la Thr40 et la Gln106. En outre la cavité de cette enzyme est essentiellement hydrophobe, tapissée par des résidus aliphatiques Leu140, Ala141, Leu144, Val149, Ser150, Ala151, Val154, Ile189, Lys290, Leu278, Ala281, Ala282, Ile285 et Ala286. Seule une petite région autour des résidus catalytiques possède un caractère hydrophile, dû à la présence de résidus Thr40, Asp134 et Gln157.

#### 2.4.3 Génération des complexes peptides-CALB

La génération et la sélection des conformères du ligand se font de la façon suivante :

- Le nombre maximal de conformères à générer ( $N_{\text{trials}}$ ) et le nombre maximal de ces conformères à sauvegarder ( $N_{\text{save}}$ ) sont définis par le modélisateur.
- En partant d'une conformation initiale arbitraire  $n$  du ligand, chaque angle de torsion de la molécule est soumis à une incrémentation aléatoire (Oldfield, 2001), ce qui conduit à un nouveau conformère  $n+1$ . Tous les conformères ainsi générés sont placés dans le site actif selon 4 orientations différentes conduisant à 4 poses du ligand (Figure 28). Une pose correspond à une position et à une orientation donnée du conformère. Les complexes résultants sont sauvegardés dans une liste de sauvegarde, jusqu'à ce que le nombre maximal de conformères de cette liste ( $N_{\text{save}}$ ) soit atteint. Quand la liste est pleine, la prochaine pose générée est comparée à chaque pose de la liste précédemment constituée selon deux critères : l'adéquation géométrique avec la cavité du site actif et l'énergie potentielle d'interaction dans le complexe formé.



**Figure 28 : Représentation schématique des 4 orientations du ligand dans le site actif du récepteur (Venkatachalam *et al.*, 2003).**

- L'adéquation de forme entre les poses du ligand et le site actif est évaluée à l'aide d'un principe mathématique de comparaison. Le site actif ainsi que les conformations du ligand sont représentés par un ensemble de points dans l'espace cartésien tridimensionnel. A partir des sommations des coordonnées (x, y, z) de ces points, une matrice M est définie pour la pose du ligand et une autre pour le site du récepteur :

$$M = \begin{bmatrix} \sum x^2 & \sum xy & \sum xz \\ \sum xy & \sum y^2 & \sum yz \\ \sum xz & \sum yz & \sum z^2 \end{bmatrix}$$

En utilisant les valeurs propres de la matrice de divergence de forme du ligand ( $L_1, L_2, L_3$ ;  $L_1 > L_2 > L_3$ ) et celle du site du récepteur ( $S_1, S_2, S_3$ ;  $S_1 > S_2 > S_3$ ), l'écart de forme  $\rho$  est calculé :

$$\rho = \sqrt{\left(\frac{S_1}{S_2} - \frac{L_1}{L_2}\right)^2 + \left(\frac{S_2}{S_3} - \frac{L_2}{L_3}\right)^2 + \left(\frac{S_1}{S_3} - \frac{L_1}{L_3}\right)^2}$$

Plus la valeur de  $\rho$  s'approche de 0, plus les deux formes sont semblables. Si la valeur de  $\rho$  est supérieure à celle de la structure la plus mauvaise dans la liste (soit celle présentant la valeur de  $\rho$  la plus élevée), la pose en test est rejetée. Dans le cas

contraire, la pose est confrontée à un second filtre de type énergétique avant d'être acceptée dans la liste de sauvegarde.

- Pour les poses ayant passé le filtre géométrique présenté précédemment, l'énergie d'interaction est calculée comme la somme des contributions de van der Waals (représentées par un terme de Lennard Jones 9-6) et électrostatiques (représentées par un terme de Coulomb) :

$$E = \sum_{i,j} \varepsilon_{ij} \left[ 2 \left( \frac{r_{ij}^*}{r_{ij}} \right)^9 - 3 \left( \frac{r_{ij}^*}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{332,0716}{\varepsilon} \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{r_{ij}}$$

Où :

$$- \varepsilon_{ij} = \sqrt{\varepsilon_i \varepsilon_j},$$

$$- r_{ij}^* = \sqrt{r_i^* r_j^*},$$

-  $r_i^*$  et  $\varepsilon_i$  sont des paramètres similaires pour l'atome  $j$  de la protéine,

-  $r_{ij}$  est la distance entre l'atome  $i$  du ligand et l'atome  $j$  de la protéine,

-  $q_i$  et  $q_j$  sont les charges respectives de l'atome  $i$  du ligand et de l'atome  $j$  de la protéine

-  $\varepsilon$  est la constante diélectrique du terme électrostatique.

- Si la valeur de l'énergie d'interaction de la pose en test est supérieure à celle de la structure la plus mauvaise dans la liste précédemment établie (soit celle présentant la valeur  $E$  la plus élevée), la pose est rejetée. Dans le cas contraire, elle remplace la structure classée dernière de cette liste.

Cette procédure est répétée pour chaque conformère généré aléatoirement, jusqu'à ce que le nombre maximal de conformères ( $N_{\text{trials}}$ ) défini par le modélisateur soit atteint. La liste de sauvegarde est continuellement mise à jour, en éliminant les poses défavorables et les poses redondantes. Seules les meilleures structures, d'un point de vue géométrique et énergétique, sont donc accumulées et au cours du processus.

#### 2.4.4 Scoring

Le classement des poses issues des simulations de docking est effectué en appliquant des fonctions de score. Une manière alternative de classer les complexes ligand- protéine consiste à utiliser un consensus de fonction de score. Cette technique consiste à considérer plusieurs fonctions de score pour évaluer les complexes. De ce fait, les faiblesses de certaines fonctions sont compensées par les forces d'autres fonctions. Cette technique permet d'augmenter la fiabilité du classement final.

Les 50 poses retenues dans la liste de sauvegarde sont classées en utilisant individuellement les 6 fonctions de score implémentées dans *Discovery Studio 3.5* : PLP1, PLP2 (Gehlhaar *et al.*, 1995), LigScore2, LigScore2 (Krammer *et al.*, 2005), Jain (Jain, 1996) et PMF (Muegge, 2006; Muegge and Martin, 1999). Le consensus de fonctions de score consiste à définir un nombre de poses à retenir dans le classement de chaque fonction de score (ex : les 10 meilleures poses de chaque classement) et à observer combien de fois une pose apparaît dans le classement « restreint » de chaque fonction de score (dans l'exemple : combien de fois une pose va apparaître dans le top 10 de chaque fonction de score). La pose obtenant le plus grand consensus de score sera la pose étant le plus de fois dans le classement « restreint » des fonctions de score (dans l'exemple : si une pose obtient un score de 5, cela signifie que cette pose apparaît dans le top 10 de 5 fonctions de score distinctes).

##### 2.4.4.1 *Docking des peptides*

Les paramètres appliqués dans le protocole de docking et de scoring sont présentés dans le Tableau 35. Les paramètres non spécifiés dans ce tableau adoptent les valeurs par défaut proposées par le logiciel.

**Tableau 35 : Paramètres utilisés lors des simulations de docking.**

Paramètres	Valeurs	Remarques
Nombre de conformères générés ( $N_{\text{trials}}$ )	$10^6$	Le nombre de conformères testé est élevé pour s'assurer de couvrir l'espace conformationnel des peptides dockés.
Nombres de poses retenues ( $N_{\text{save}}$ )	50	Le nombre de 50 permet d'apercevoir la formation de familles d'orientations possibles.
Ecart RMS minimum pour la discrimination des poses du ligand	1,5 Å	Cette valeur évite que des conformères trop similaires soient conservés dans la liste de sauvegarde.
Pénalité énergétique de sortie du site de docking	$10^4$ kcal.mol <sup>-1</sup> .atome <sup>-1</sup>	Cette pénalité élevée permet d'exclure de la liste de sauvegarde des ligands sortants du site de docking
Fonctions de score utilisées	PLP1	Fonctions de score disponibles dans la base de données de Discovery Studio 3.5.
	PLP2	
	LigScore1	
	LigScore2	
	PMF	
Jain		
Algorithme de minimisation	Steepest Descent, 1000 étapes	Cette étape supplémentaire permet de minimiser les atomes des ligands.

#### 2.4.5 Identification des complexes productifs

On qualifie un complexe de productif lorsque celui-ci présente une conformation adéquate pouvant conduire à la formation du 2<sup>ème</sup> intermédiaire tétraédrique, puis au produit d'acylation. Deux éléments majeurs ont été pris en considération pour identifier de tels complexes : le classement des poses de docking à l'issue de la procédure de scoring et les distances minimales requises pour qu'une attaque nucléophile entre un groupement hydroxyle ou amine du peptide et le carbonyle de l'acyl-enzyme puisse avoir lieu.

Pour être considérée comme réactive, une pose doit respecter deux critères de distances (Figure 29):

- l'atome lourd du groupement devant être acylé situé à moins de 4 Å du carbone de la chaîne oléoylle liée à la sérine catalytique.
- le proton du groupement devant être acylé situé suffisamment proche (<4 Å) de l'histidine catalytique pour autoriser un transfert de proton.



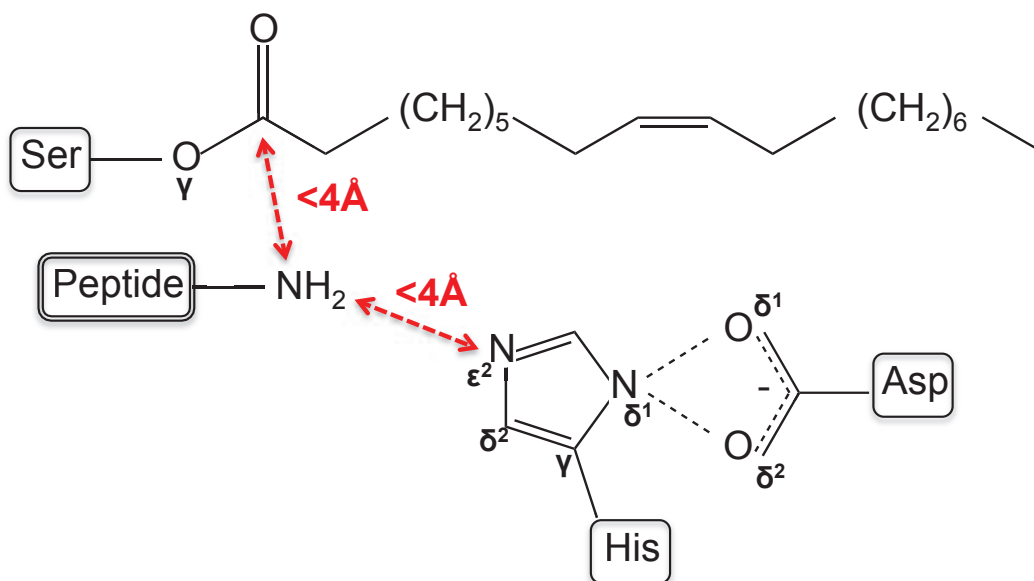


Figure 29 : Critères de distance pour une réaction d'acylation fonctionnelle catalysée par CALB.

Si ces deux conditions sont validées, alors une pose est considérée comme productive, c'est-à-dire susceptible de conduire à une acylation.



**CHAPITRE 1 : IDENTIFICATION DES REGLES DE  
REGIO- ET DE CHIMIO-SELECTIVITE POUR  
L'ACYLATION DE PEPTIDES CATALYSEE PAR  
CALB EN SOLVANT ORGANIQUE.**

---

## 1 Introduction

L'acylation de peptides bioactifs est une réaction qui présente plusieurs enjeux. En effet, le greffage d'une chaîne acyle sur un peptide peut modifier son activité biologique, ses propriétés technofonctionnelles et améliorer sa biodisponibilité. Les propriétés et activités d'une molécule étant étroitement liées à sa structure chimique, il est indispensable de maîtriser la chimio- et la régio-sélectivité de la réaction afin de produire la structure pouvant apporter les caractéristiques recherchées. Actuellement, peu de travaux se consacrent à l'étude de la sélectivité d'acylation enzymatique de peptides.

Dans le domaine de l'acylation enzymatique, le biocatalyseur le plus utilisé est CALB. Cette enzyme est étudiée autant pour son énantio-sélectivité, qui permet la résolution de mélanges racémiques, que pour sa chimio-sélectivité et sa régio-sélectivité envers des molécules polyfonctionnelles comme les amino-alcools, certains composés polyhydroxylés comme les sucres, les flavonoïdes ou encore les prostaglandines (Ardhaoui *et al.*, 2004; Bidouil *et al.*, 2011; Habeych *et al.*, 2011; De Oliveira *et al.*, 2009, 2010; Vallikivi *et al.*, 2005). En revanche, la sélectivité de CALB reste méconnue pour des molécules polyfonctionnelles complexes comme les peptides dont la structure peut comporter plusieurs groupements fonctionnels de même nature ou non. L'étude qui suit est présentée sous forme d'article publié dans « Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic » en 2014 (volume 101, pages 122-133). Le but de cette étude est de comprendre la sélectivité de CALB pour des réactions d'acylation de petits peptides présentant une problématique de régio- et de chimio-sélectivité. Ces peptides contiennent en effet plusieurs sites d'acylation de natures différentes tels que des groupements amines et hydroxyles, localisés en différentes positions de leur structure. Le donneur d'acyle utilisé pour ces réactions d'acylation est l'acide oléique. Une étude de modélisation moléculaire a été menée afin d'expliquer la sélectivité expérimentale de CALB observée avec le peptide KS. Un modèle « acyl-enzyme », a été construit en fixant une chaîne oléoyle sur la sérine catalytique de CALB. La structure de cet « acyl-enzyme » a été ajustée par dynamique moléculaire dans le but de proposer un modèle robuste pouvant être utilisé comme cible de docking pour étudier les modes d'interaction avec les peptides (Figure 30) et tirer des conclusions en termes de sélectivité. Dans un premier temps, le modèle « acyl-enzyme » a été utilisé pour docker le peptide KS dans le site actif de l'acyl-enzyme. Les résultats de l'étude de docking ont ensuite été comparés aux résultats expérimentaux obtenus antérieurement pour vérifier la robustesse du modèle. Le placement du peptide dans la cavité

catalytique de l'acyl-enzyme a permis de dégager des tendances de régio- et chimio-sélectivité de CALB. D'autres peptides ont ensuite été dockés contre la cible de docking pour prédire la sélectivité de leur acylation. En parallèle, les réactions d'acylation des peptides ont été réalisées expérimentalement afin de vérifier la validité des modèles théoriques.

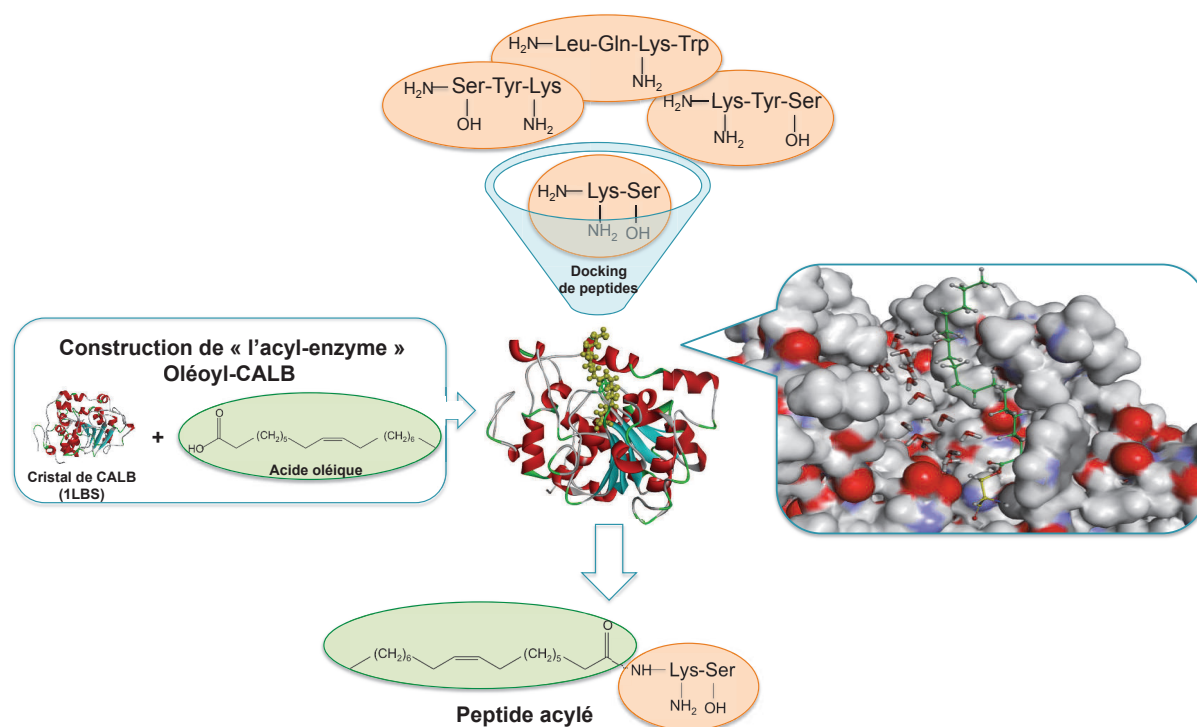


Figure 30 : Schéma général de la démarche de modélisation mise en oeuvre pour l'étude de la sélectivité de CALB vis-à-vis de différents peptides.

## 2 Molecular rules for chemo- and regio-selectivity of *Candida antarctica* lipase B in peptide acylation reactions

Florent Ferrari<sup>a</sup>, Cédric Paris<sup>b</sup>, Bernard Maignet<sup>c</sup>, Christelle Bidouil<sup>b</sup>, Stephane Delaunay<sup>a</sup>, Catherine Humeau<sup>b,\*,1</sup>, Isabelle Chevalot<sup>a,1</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, CNRS UMR-7274, Université de Lorraine, 2 av. de la Forêt d'Haye, 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

<sup>b</sup>Laboratoire Ingénierie des Biomolécules, Université de Lorraine, 2 av. de la Forêt d'Haye, 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

\* Corresponding author. Tel.: +33 3 83 59 57 84. E-mail address:

[catherine.humeau@ensai.inpl-nancy.fr](mailto:catherine.humeau@ensai.inpl-nancy.fr) (C. Humeau).

<sup>1</sup> Authors with equal contribution.

## 2.1 Abstract

The chemo- and regio-selectivity of the lipase B of *Candida antarctica* (CALB) in peptide acylation by oleic acid was investigated combining experimental and theoretical methodologies. Molecular dynamics and docking simulations were performed to study the selectivity of CALB toward the dipeptide Lysine-Serine at the molecular level. To this end, a model that mimics the acyl-enzyme system was built from CALB crystallographic structure and optimized then to be used as docking target. One main orientation of the peptide within the catalytic cavity was obtained. The lysine side chain was observed to enter the cavity, placing the  $\epsilon$ -amino group as to be acylated near the catalytic residues. This result was consistent with the N-acylation experimentally observed, showing the robustness of the model. Docking simulations were then applied to the peptides Lysine-Tyrosine-Serine, Serine-Tyrosine-Lysine and Leucine-Glutamine-Lysine-Tryptophan aiming to predict the selectivity of the reaction. Whatever the peptidic sequence and its constitutive amino acids, the models suggested the preferential N-acylation of the lysine side chain. These theoretical results were in perfect accordance with experimental data showing that N $\epsilon$ -oleoyl-Lys derivatives were the major products.

KEYWORDS *Candida antarctica* lipase B; peptide acylation; regio-selectivity; chemo-selectivity; docking; molecular dynamics;

## 2.2 Introduction

Peptides are molecules presenting various beneficial effects such as antioxidant [1,2], anti-hypertensive [3,4], neuroprotective [5], antiviral [6] or antimicrobial activities [7]. However

their use can be limited by their short half-life due to potential hydrolysis by endo-proteases and their polarity that can restrict their transfer through biological membranes [8]. One solution to overcome these drawbacks is the acylation of peptides with fatty acids [9–11]. The main challenge when acylating polyfunctional substrates like peptides is the selectivity of the reaction. Conversely to chemical pathways, enzymatic acylation allows grafting acyl chains on specific positions, leading to specific structures. Understanding the factors that regulate selectivity constitutes a scientific challenge that can be undertaken by both experimental and theoretical approaches such as molecular modeling simulations. Experiments provide valuable insights on the efficiency of the reaction and the structure of the products, allowing to draw conclusions about selectivity, but without any understanding of the mechanism. One major difficulty of this approach is the purification and the structural determination of the products that can be laborious. Molecular modeling simulations provide additional information about the possible binding modes of the substrates within the catalytic cavity. Accessibility of the substrate functional groups can be investigated, and assumptions about selectivity can be then formulated. Such an approach is expected to deepen understanding of enzyme selectivity and even to give elements to predict selectivity before experimental verification.

Several enzymes are able to catalyze acylation reaction. The most studied and industrially used are lipases (EC 3.1.1.3). These are able to catalyze the acylation of both hydroxyl (O-acylation) and amine groups (N-acylation). Few studies reported the selective acylation of polyfunctional molecules like amino-alcohols [12–15]. Other authors described the enzymatic acylation of peptides and amino acids catalyzed by CALB. The results demonstrated that the regio- and the chemo-selectivity of the reaction strongly depend on the structure of the acyl acceptor. When using the l-lysine as acyl acceptor, the N-acylation was shown to occur specifically on the  $\epsilon$ -amino group, with oleic and palmitic acid as acyl donors [16]. The same tendency was observed for the acylation of the modified peptide l-phe- $\alpha$ -l-lys-O-t-Bu and l-ala- $\alpha$ -l-lys-O-t-Bu with trifluoroethyl acetate, catalyzed by lipases from *Pseudomonas sp.*, *Aspergillus niger* and *Chromobacterium viscosum* [17]. Other studies reported the acylation of a serine that was modified on either its N- or its C-terminal extremity. Results showed the efficient O-acylation of the serine side chain when acylating the l-serine-amide with lauric acid [18]. Similar results were observed for the acylation of the N-carbobenzyloxy-l-serine with myristic acid [19]. Nevertheless when lysine and serine are linked together like in the peptide Lys-Ser (KS) the specific N-acylation of the lysine side chain was obtained [20]. The O-acylation of the serine side chain was never observed. A possible explanation was the weak

Identification des règles de régio- et de chimio-sélectivité pour l'acylation de peptides catalysée par CALB en solvant organique.

---

nucleophilicity of the serine hydroxyl group due to the electrophilic effect of the C-terminal carboxylic group.

All these results were obtained from experimental approach. Until now, only assumptions were made to explain the selectivity of CALB toward amino-acids and peptides but no extensive explanation has been given so far.

For quite a number of years now, molecular modeling simulations have been recognized as powerful tools to explain enzymatic selectivity. Most of molecular simulations studies related to enantio-selectivity of enzymes. Only few works reported the use of molecular modeling methodologies to address the topic of regio- and chemo-selectivity toward polyfunctional substrates. Two recent studies combining molecular dynamics and docking simulations provided a possible explanation for the regioselective acetylation of flavonoids catalyzed by CALB and *Pseudomonas cepacia* lipase [21,22]. Interaction modes between the catalytic cavity of the enzyme and the substrates were shown to be directly responsible for functional group accessibility and consequently for selectivity. Few other studies concerned the chemo-selectivity of CALB toward various amino alcohols. The structure of both the acyl donor and the acyl acceptor was shown to be the main factor influencing selectivity, favoring either the O- or the N- acylation [23,24]. To our knowledge, no study has ever been conducted to explain the selectivity of lipases toward peptide acylation.

The present work aimed to gain deeper insight into the selectivity of CALB in acylation reactions involving short peptides and oleic acid as acyl donor. Molecular modeling simulations were carried out to explain the selectivity experimentally observed during the acylation of KS. To achieve this goal, a model of acyl-enzyme was developed and used as target to dock the peptide within the catalytic cavity. The binding modes of the peptide were studied to draw conclusions about the chemo- and the regio-selectivity of the reaction. Simulation results were compared to experimental data and then the model was applied to predict the selectivity of the reaction in the case of short peptides presenting a lysine residue but differing from each other by their sequence. Finally, acylation reactions were achieved in order to check the concordance between theoretical results and experimental evidence.



## 2.3 Materials and methods

### 2.3.1 Enzymatic reactions

#### 2.3.1.1 *Syntheses*

Novozym 435<sup>®</sup> (lipase B from *Candida antarctica* immobilized on an acrylic resin) with propyl laurate synthesis activity of 7000 PLU g<sup>-1</sup> and protein grade of 1–10% was from Novo Nordisk A/S (Bagsværd, Denmark). Peptides KS-HCl, Lys-Tyr-Ser (KYS), Ser-Tyr-Lys (SYK) with 99% of purity were acquired from Bachem (Switzerland). The peptide Leu-Gln-Lys-Trp (LQKW) (99% purity) was produced by Genosphere (France). Oleic acid used as acyl donor substrate for all syntheses ( $M = 282.49 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , purity: 99%) was from Sigma-Aldrich (France). 2-Methyl-2-butanol (M<sub>2</sub>B<sub>2</sub>) and triethylamine of HPLC quality were purchased from Carlo Erba (France).

The enzymatic acylation of peptides was carried out in test tubes. In a typical reaction, the peptide (0.12M) and oleic acid (0.24 M) were added in 2 mL of M<sub>2</sub>B<sub>2</sub> previously dehydrated on 4 Å molecular sieves. The initial water activity of the media was decreased below 0.1 to favor the synthetic activity of the lipase and prevent hydrolysis. Triethylamine was added to the reaction media in a large excess (2.4 mol L<sup>-1</sup>) to favor the neutral form of amino groups [25,26]. Peptides exhibit low solubility in organic medium; consequently few hours are necessary to allow the formation of an ionic complex between the peptidic substrate and oleic acid. This complex favored the solubilization of the peptide. After solubilization of the substrates for 12 h at 55°C, the acylation was started by the addition of 10 g L<sup>-1</sup> of enzyme preparation. Reaction media were kept at 55°C and stirred at 250 rpm. 50 µL samples were withdrawn for analyses. The enzyme was removed from the reaction medium by filtration. Then, samples were diluted with methanol/water (80/20, v/v) and stored at -18°C before LC-MS analysis. Each reaction was repeated twice.

#### 2.3.1.2 *Analyses of reaction media*

Qualitative and semi quantitative analysis of peptide derivatives was carried out on a HPLC-MS system (ThermoFisher Scientific, San Jose, CA, USA) consisting in a binary delivery

Identification des règles de régio- et de chimio-sélectivité pour l'acylation de peptides catalysée par CALB en solvant organique.

pump connected to a photodiode array detector (PDA) and a LTQ ion trap as mass analyzer (Linear Trap Quadrupole) equipped with an atmospheric pressure ionization interface operating in positive electrospray mode (ESI<sup>+</sup>). Chromatographic separation was performed on a C18 amide column (150 mm × 2.1 mm, 5 μm porosity – Grace/Alltech, Darmstadt, Germany) equipped with a C18 amide pre-column (7.5 mm × 2.1 mm, 5 μm porosity – Grace/Alltech Darmstadt, Germany) at 25°C. Mobile phases consisted in methanol/water/TFA (80:20:0.1, v/v/v) for A and methanol/TFA (100:0.1, v/v) for B. Acylated peptides were eluted using a linear gradient from 0% to 100% of B for 5 min and then an isocratic step at 100% of B for 10 min, at a flow rate of 0.2 mL min<sup>-1</sup>. Mass spectrometric conditions were as follows: spray voltage was set at +4.5kV; source gases were set for sheath gas, auxiliary gas and sweep gas at 30, 10 and 10, respectively (in arbitrary units min<sup>-1</sup>); capillary temperature was set at 250°C; capillary voltage was set at 48 V; tube lens, split lens and front lens voltages were set at 120 V, -34 V and -4.25 V, respectively. Ion optic parameters were optimized by automatic tuning using a standard solution of oleoyl KS at 0.1 g L<sup>-1</sup> infused in mobile phase (A/B, 50:50) at a flow rate of 5 μL min<sup>-1</sup>. Full scan MS spectra were performed from 100 to 1000 m/z and additional MS<sup>2</sup> scans were realized in order to get structural information based on daughter ions elucidation. Raw data were processed using Xcalibur software (version 2.1 Thermo Scientific).

## 2.3.2 Molecular modeling simulations

### 2.3.2.1 *Computational resources*

Construction and relaxation of the systems as well as docking experiments were carried out on a bi-processor AMD Dual Core 280, 2.4GHz. Docking and Scoring were performed using respectively the LigandFit [27] and the Consensus Score modules of the program-package Discovery Studio version 3.5 (Accelrys, Inc.). Molecular dynamics simulations were carried out on a computer cluster equipped with 2 Quad Core Intel Xeon processors L5420, 2.5 GHz and 16 GB of RAM on a Linux Platform, using NAMD (v.2.7) [28]. Visualization and analysis of trajectories were performed with VMD (v.1.8.7) [29]. All molecular mechanics and molecular dynamics calculations were performed with the CHARMM force field [30].

### 2.3.2.2 *Acyl-enzyme construction*

The first step of molecular modeling simulations was the construction of the acyl-enzyme system that was used as target for the docking of peptides.

#### 2.3.2.2.1 Starting structures

The crystal structure of CALB was downloaded from the Protein Data Bank (PDB entry: 1LBS; resolution: 2.60Å) [31]. The 1LBS crystal structure is made of 6 protein chains per unit cell of dimensions  $a = 229.5 \text{ \AA}$ ,  $b = 95.6 \text{ \AA}$ ,  $c = 86.8 \text{ \AA}$ ;  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ . Each chain includes 317 aminoacids, 1 ethylhexylphosphonate (HEE) inhibitor covalently bound to the residue Ser105, 1 N-acetyl-glucosamine (NAG) dimer covalently bound to the residue Asn74 and 97 adsorbed water molecules. One protein chain was kept for further simulations. The HEE inhibitor and the NAG dimer were removed while adsorbed water molecules were kept. Missing hydrogen atoms were added at their theoretical positions. Protonation states of residues were assumed to be those observed at pH 7.0. Histidines were mono-protonated, aspartic and glutamic acids were negatively charged, and arginines and lysines were positively charged. Crystallographic data from PDB entries (1TCA and 1LBS) indicated Asp134 in deprotonated state. In the present study, experiments were performed in the presence of an organic base (triethylamine) to keep substrate amino group under deprotonated form. For these reasons, the assumption was carried out that Asp134 should be deprotonated rather than protonated. The resulting structure was used as starting point for the construction of the acyl-enzyme system.

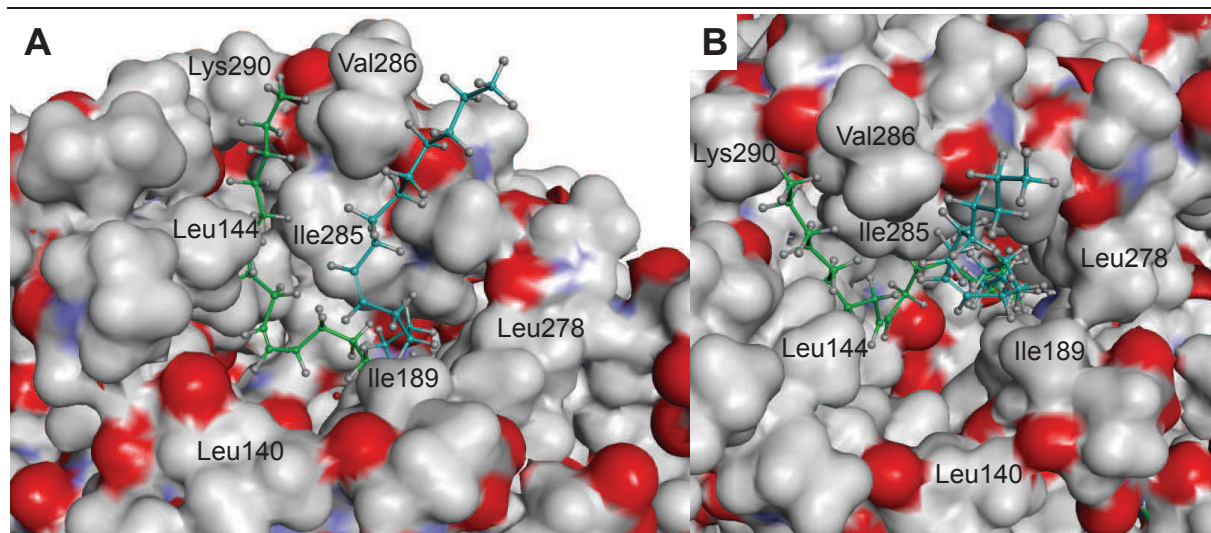
#### 2.3.2.2.2 Construction of acyl-enzyme systems:

The mechanism of lipase-catalyzed acylation reaction involves the prior binding of the acyl donor substrate to the catalytic serine leading to the acyl-enzyme. In order to mimic this intermediate in the case of acylation reactions catalyzed by CALB with oleic acid, an oleoyl chain was fixed to the Ser105 side chain [21,22,32,33]. To attempt this goal, two building strategies were followed, leading to two oleoyl-CALB systems: OCALB1 and OCALB2. The first five carbon atoms of the acyl chain were placed as the inhibitor hexyl chain that was assumed to indicate the orientation of the acyl-enzyme acyl moiety. In the case of OCALB2

the rest of the chain was constructed in such a manner that carbon atoms could interact with hydrophobic residues of the catalytic cavity as indicated by Pleiss *et al.* [34]. In the case of OCALB1 the rest of the chain was placed without any specific orientation. Both structures were solvated and centered in periodic water boxes that contained 167,885 and 164,933 TIP3P water molecules for OCALB1 and OCALB2, respectively [35]. Water box dimensions were  $a = 93 \text{ \AA}$ ,  $b = 86 \text{ \AA}$ ,  $c = 74 \text{ \AA}$ ;  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$  for OCALB1 and  $a = 92 \text{ \AA}$ ,  $b = 86 \text{ \AA}$ ,  $c = 70 \text{ \AA}$ ;  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$  for OCALB2. A margin of  $15 \text{ \AA}$  was kept along each dimension. The total charge of the systems was neutralized adding one  $\text{Na}^+$  atom.

#### 2.3.2.2.3 Relaxation of the systems:

Both acyl-enzyme systems OCALB1 and OCALB2 were relaxed progressively and carefully in order to preserve the crystalline organization of protein atoms [36,37]. Constraints and restraints were added to the initial systems, and then progressively removed. A three steps protocol was applied : heavy atoms were initially fixed. Only hydrogen atoms of the protein and water molecules were allowed to move. Secondly, the side chains of the protein residues were released. Thirdly, the overall structure was allowed to relax without any constraint or restraint. The first minimization step was performed using 1000 Steepest Descent iterations until the root mean square deviation (RMSD) gradient fell below 0.01. Further steps were achieved using the Conjugate Gradient method until the RMSD gradient reached  $0.0001 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$ . The two systems were used as starting structures for molecular dynamics simulations (Figure 31).



**Figure 31 : Input structures for molecular dynamics simulations. The initial placement of the oleoyl chain is colored in blue and green in OCALB1 and OCALB2 respectively. Lateral view (A). Top view (B).**

### 2.3.2.3 Molecular dynamics simulations

#### 2.3.2.3.1 Molecular dynamics conditions:

Molecular dynamics simulations were carried out in explicit water, assuming that  $M_2B_2$  had little effect on the dynamic behavior of CALB [38–40]. An equilibration phase of 1 ns was performed using NAMD software. During this step, all atoms of the acyl-enzyme systems were harmonically restrained. The force constant was initially fixed at  $10 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^2$  and was progressively decreased ( $0.5 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^2/25 \text{ ps}$ ). The equilibration was continued over 500 ps. Then, a production phase of 99.5 ns was applied. All molecular dynamics simulations were performed at constant pressure (1 atm) and constant temperature (300K), controlled by Langevin piston and Langevin thermostat, respectively. The Particle–Mesh–Ewald (PME) method [41] was applied to calculate long-range electrostatic interactions. The cutoff distance for non-bonded interactions was set to 12 Å and a switch function was applied between 10 and 12 Å. The SHAKE algorithm [42] was applied to constrain all of the covalent bonds involving hydrogen atoms. Periodic boundary conditions were applied to all dimensions. A time step of 2 femtosecond was applied. Coordinates were saved every 1 picosecond. The

Identification des règles de régio- et de chimio-sélectivité pour l'acylation de peptides catalysée par CALB en solvant organique.

---

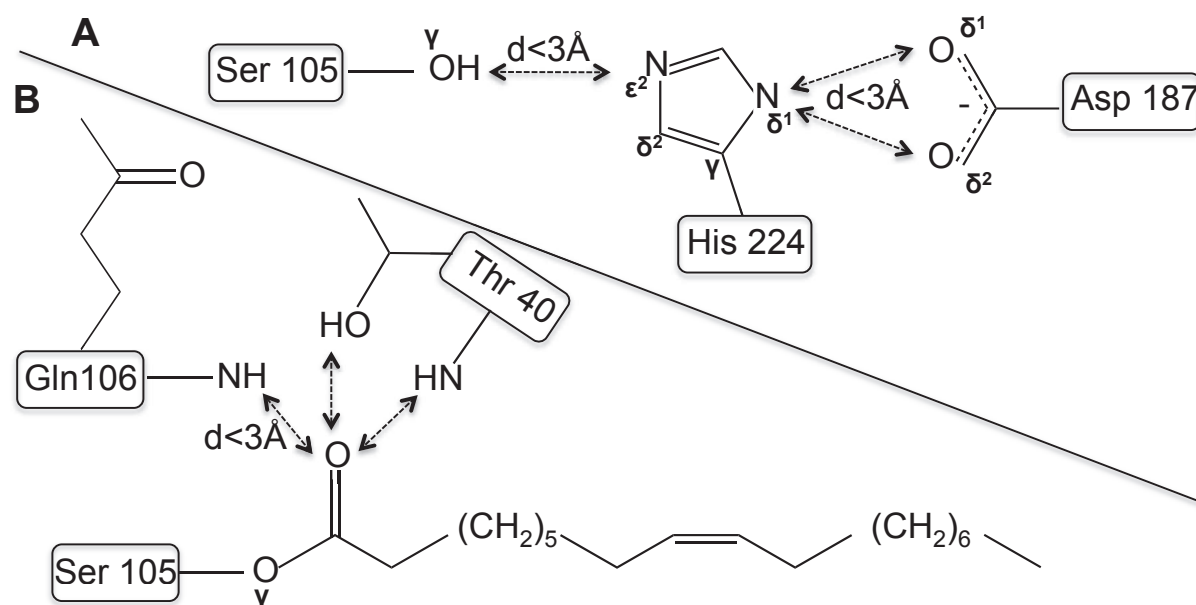
dynamic behavior of the systems was studied using 11,000 frames covering the production phase (1 frame every 10 ps).

#### 2.3.2.3.2 Analysis of molecular dynamics trajectories:

Molecular dynamics simulations aimed to study the dynamic behavior of the oleoyl chain within CALB catalytic cavity and to choose a pertinent target for peptide docking. In order to increase the robustness of the model, two starting structures were constructed and submitted to molecular dynamics simulations. Trajectories were analyzed and compared, as a mean to find converging and stable conformations that could be used as target for further docking steps.

Trajectories were analyzed including 11,000 frames of the production phase and applying different VMD analytic tools. The Timeline plugin was used to follow detailed structural events like changes in secondary structures through the simulations. The root mean square deviation (RMSD) was computed referring to the input structure submitted to molecular dynamics simulations. Two RMSD were calculated. One based on the protein backbone and the other based on the oleoyl chain and the backbone of the residues constituting the catalytic cavity: Thr138, Ile189, Val190, Asp134, Thr40, Gln157, Ile285, Gly44 and Val149. RMSD 2D heatmap graphs were generated for all the trajectories to find stable conformations of the systems. Structural specificities were also monitored like the distance between the serine bound acetyl and the residues constituting the oxyanion hole (Thr40 and Gln106). This affects the possibility to stabilize the catalytic intermediates through hydrogen bond interactions (Figure 32). Other distances ensuring that the catalytic activity of the enzyme is maintained were considered. More specifically, the residues constituting the catalytic triad must be maintained close to each other in order to participate to hydrogen atom transfers involved in the catalytic pathway (Figure 32).





**Figure 32 : Functional conformation of CALB active site (A). Distances required for the stabilization of the acyl-enzyme by the oxyanion hole residues (B).**

#### 2.3.2.4 Peptide docking and scoring

Targets were extracted from molecular dynamics trajectories and optimized using a 6000 steps Conjugate Gradient minimization before docking. Peptides were non-covalently docked against oleoyl-CALB targets using LigandFit that combines a Monte Carlo conformational search algorithm and a shape comparison filter. In addition to the geometric fit with the binding pocket, LigandFit entails an internal scoring function (DockScore) that assures to keep only the ligand conformations having favorable energy of interaction with the protein. This energy was taken as the sum of van der Waals energies (represented by a 6–9 Lennard–Jones term) and electrostatic energies (represented by a Coulomb term). For each docking simulation 10<sup>6</sup> Monte Carlo trials were performed. Only the 50 most favorable complexes were retained and ranked considering a consensus of six different scoring functions: LigScore1, LigScore2, PLP1, PLP2, PMF and Jain [43]. The consensus score ranged from 0 to 6, the best score being 6. Complexes exhibiting a high consensus score (consensus scores of 5 or 6) were considered as the most probable binding modes of the peptides within the catalytic cavity.

## 2.4 Results and discussion

Selectivity properties of lipases toward polyfunctional substrates constitute their main advantage over chemical catalysts. Many experimental and theoretical studies focused on this topic, aiming to explain and even predict lipase selectivity properties. Specific orientations and interactions of the substrates within the catalytic cavity of the enzyme are the main driving forces for the selectivity. Two substrates are involved in acylation reactions, one acyl acceptor and one acyl donor. According to the enzymatic mechanism, the step where these two substrates are close together within the catalytic cavity corresponds to the nucleophilic attack of the acyl-enzyme by the acyl acceptor substrate. This represents a key step for selectivity. During the last decade, molecular modeling tools have proved their high efficiency to study the binding modes between lipases and their substrates [21,22,44–50]. Orientations and interactions of both substrates within the catalytic cavity are studied aiming to draw conclusions about selectivity. In the present study, this approach was applied to explain the selectivity of CALB toward the peptide KS for which experimental data are known [20]. Once validated, the model was applied to predict the chemo- and the regio-selectivity of CALB toward other polyfunctional peptides. Lys-Ser was chosen as a model of substrate exhibiting both hydroxyl and amino groups aiming to study the N and/or O-acylation. Ser-Tyr-Lys and Lys-Tyr-Ser were interesting substrates because of their different sequences that allowed investigating the effect of the chemical environment of the residues on their acylation. Leu-Glu-Lys-Trp was chosen for the hindered position of the lysine residue in the peptidic sequence. Furthermore this peptide exhibits some interesting biological activities such as antihypertensive and antioxidant activities [51,52].

### 2.4.1 Theoretical study of CALB selectivity toward KS acylation:

KS exhibits several potential acylation sites with two amine groups, one in  $\alpha$  position and one in  $\epsilon$  position on the lysine side chain (Figure 33A).



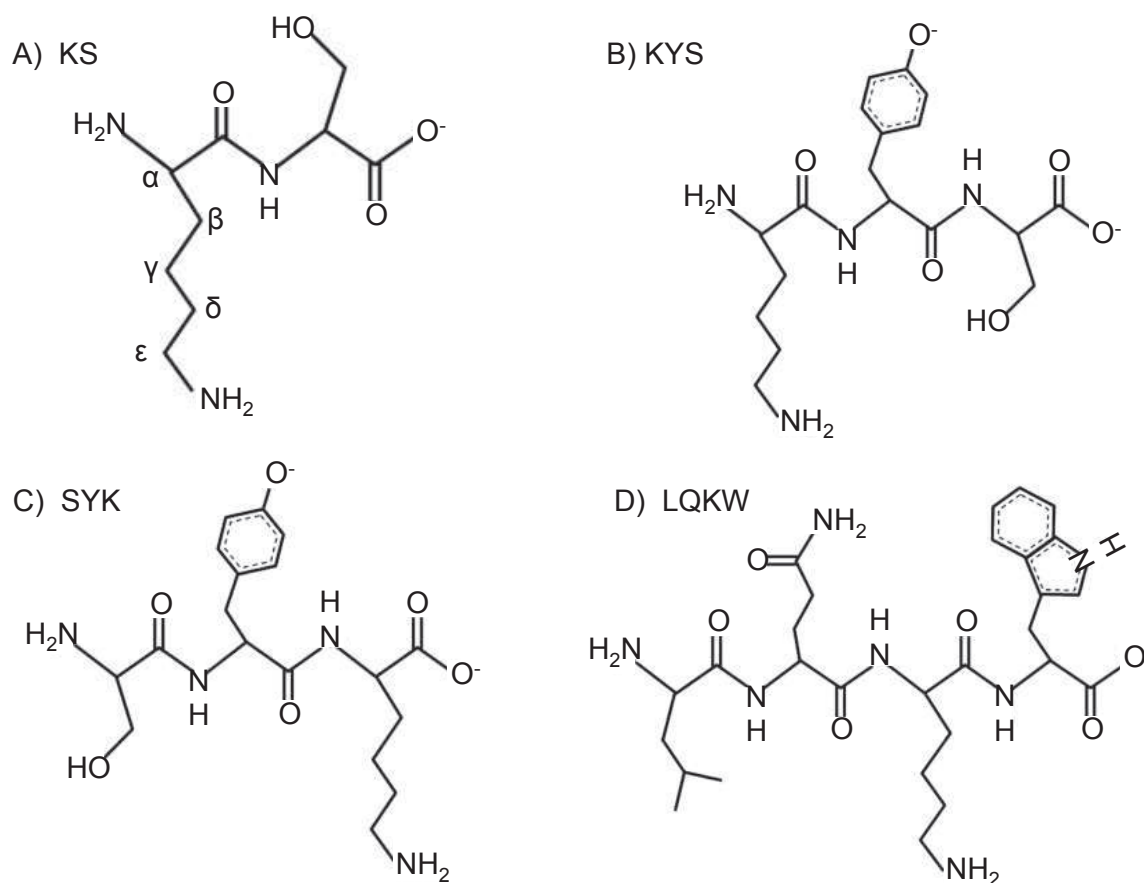


Figure 33 : Molecular structures of KS (A), KYS (B), SYK (C), LQKW (D).

KS also presents a hydroxyl group that is available for the O-acylation on the serine side chain. Previous results showed that KS acylation catalyzed by CALB led only to the formation of one mono-acylated peptide and few traces of a di-acylated peptide. A conversion yield up to 36% for KS acylation after 72 h of reaction, at 55°C was obtained in 2-methyl-2-butanol. The mono-acylated product was identified as N- $\epsilon$ -oleoyl-KS by MS<sup>2</sup> and NMR [20]. A molecular modeling approach was developed to study the chemo and the regio-selectivity of KS acylation catalyzed by CALB. The strategy consisted in building a robust acyl-enzyme model which could be used for the docking of this peptide. The validity of the model was verified and then applied to other polyfunctional peptides.

#### 2.4.1.1 Acyl-enzyme building

The catalytic cavity of CALB is a narrow and quite deep channel (10 Å × 4 Å wide and 12 Å deep) [31]. Contrary to other lipases, CALB structure does not include any lid that regulates

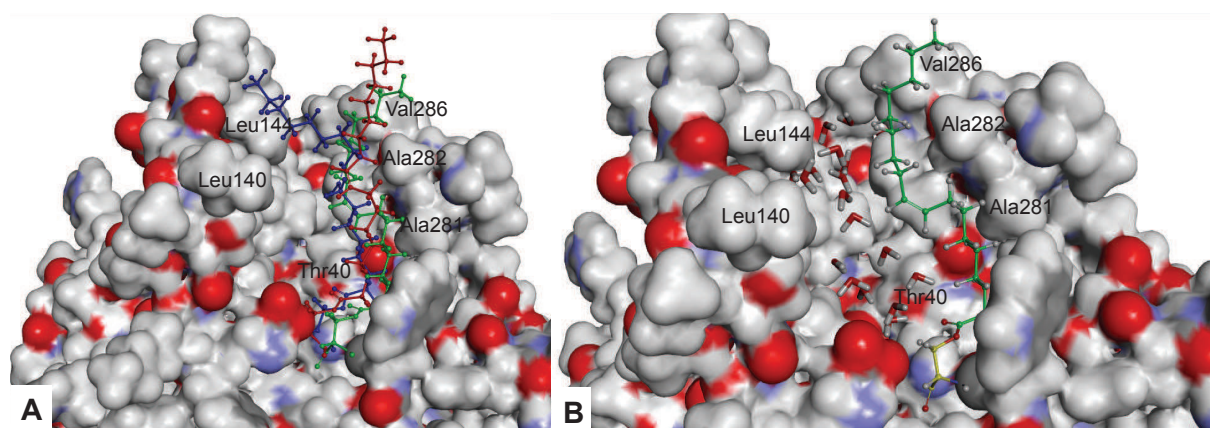
access to the catalytic cavity. The active site is composed by three amino acids: Ser105, His224 and Asp187. During the catalytic pathway, the acyl-enzyme intermediate is stabilized by the residues Thr40 and Gln106, constituting the oxyanion hole. Residues forming the catalytic cavity walls are mainly hydrophobic and do not include any aromatic residue. They are identified as: Leu140, Ala141, Leu144, Val149, Ser150, Ala151, Val154, Ile189, Lys290, Leu278, Ala281, Ala282, Ile285 and Ala286. Furthermore, the cavity includes a small slightly polar region that is localized around the catalytic Ser105 and that is constituted by the residues Thr40, Asp134 and Gln157. The aim of this study was to determine the main orientations and interactions of the two substrates involved in KS acylation by oleic acid within CALB catalytic cavity. The first step of the molecular modeling workflow consisted in building an acyl-enzyme model that was submitted to docking simulations afterwards. The acyl-enzyme system was obtained by prior binding of the oleoyl chain to the catalytic Ser105 side chain [21,22,31,33]. Two acyl-enzyme models were built corresponding to two different conformations of the oleoyl chain. In the first system (OCALB1), the C1 to C7 atoms of the oleoyl chain were placed according to the crystallographic coordinates of the inhibitor N-hexylphosphonate-ethyl-ester that are given by crystallographic data [53]. Then, the construction of the rest of the chain was manually extended to reach the cavity entrance (Figure 31). The second system (OCALB2) was built assuming that the oleoyl chain logically interacts with the hydrophobic residues of the cavity, that correspond to the fatty acid scissile binding site as described by Pleiss *et al.* [34]: the C1 to C4 atoms of the oleoyl chain were placed as the inhibitor N-hexylphosphonate-ethyl-ester and were guided by the residues Thr138, Ile189, Val190 on one side and the residues Gln157 and Thr40 on the other side. Then, the C4 to C7 atoms fitted within a narrow cleft that is constituted by the residues Asp134 and Ser105. The C7 to C13 atoms were placed in such a manner as to allow interactions with the hydrophobic residues Val154, Ile285, Leu144 and Val149. Finally, the rest of the chain was constructed placing the C13 to C18 atoms straight toward the cavity entrance (Figure 31). For both systems, particular attention was given to the serine-bound carbonyl group that links the catalytic serine with the acyl-donor substrate. This must be orientated so that hydrogen bond interactions can be established with the residues of the oxyanion-hole Thr40 and Gln106.

#### 2.4.1.2 *Analyses of molecular dynamics trajectories:*

The two acyl-enzyme systems were solvated with explicit water, and then carefully relaxed. 100 ns molecular dynamics simulations were achieved aiming to study the dynamic behavior of the systems and, more particularly, to explore the conformational space of the oleoyl chain within the catalytic cavity. This strategy that consisted in building two systems characterized by different sets of atomic coordinates was expected to strengthen the robustness of the simulations in order to converge toward a pertinent model of acyl-enzyme that could be used as target for docking simulations.

Molecular dynamics trajectories were analyzed from different aspects: integrity of the catalytically active structure, orientation of the serine-bound carbonyl, main orientations and conformations of the oleoyl chain within the cavity. Exploration of secondary structure events (Timeline plot) showed that the residue attributes were globally maintained all along the trajectories except for the  $\alpha 5$ - helix covering the 141–147 residues that was observed to shift between the initial helix form and an undetermined secondary structure (Complementary data figure 41). Such a behavior was also observed by Kumaresan *et al.* [48] who pointed out that CALB  $\alpha 5$ - helix could unwind then loose its initial conformation after 8 ns of molecular dynamics simulations. The flexibility of this region enables it to cover partially the active site, thus affecting the selectivity of the enzyme. The conformational stability of the systems was monitored through RMSD calculation based on the backbone of the protein and the oleoyl chain. The conformation used as input in molecular dynamics simulations was used as reference. In the case of OCALB1, the average RMSD value was about 2 Å during the first 20ns of the trajectory then increased, fluctuating between 3.25 Å and 4.5 Å during the rest of the production phase. In the case of OCALB2, the average RMSD value increased from 1.5 Å to 2.75 Å during the first 35 ns of the trajectory, and then stabilized around a value of 2.75 Å until 90 ns of simulation. Finally, the average RMSD was around 3.2 Å during the last 10 ns of the trajectory. RMSD 2D heatmap graphs were built, aiming to identify the most stable conformations of the systems (Complementary data figure 42). The dynamic behavior of the oleoyl chain was also observed. For the two molecular dynamic simulations, the initial conformation of the chain was globally kept all along the trajectories. Only minor changes were observed as shown by RMSD values that were around 2 Å, referring to starting structures. The oleoyl chain moved within the cavity just like the clapper of a bell, without undergoing any significant conformational change.

Furthermore, each trajectory was analyzed separately aiming to identify “near to attack” conformations. The orientation of the serine-bound carbonyl was monitored all along the trajectories. In the case of OCALB1, H-bond interactions with the oxyanion hole residues were maintained during the first 50 ns of the production phase. In the case of OCALB2, the serine-bound carbonyl came alternatively within then outside the oxyanion hole. In conjunction with all these observations, three particular conformations of the acyl-enzyme intermediate were identified as representative models of the system. Two of them were extracted from OCALB1 molecular dynamics trajectory: conformation 1 (CF1) and conformation 2 (CF1') that were obtained after 5.6 ns and 20.2 ns of simulation, respectively. The third conformation of interest (CF2) was taken from OCALB2 trajectory and was obtained after 4.4 ns of simulation (Figure 34A).



**Figure 34 : A: Lateral views of CALB catalytic pocket showing the placement of the oleoyl chain in the conformations CF1 (blue), CF1' (red) and CF2 (green). B: Lateral view of the selected docking target after minimization. Carbon atoms of the oleoyl chain are colored in green. Other atoms are colored according to standard color code. Water molecules interacting with hydrophilic residues are shown.**

These three conformations were extracted from periods where the system was stable as indicated by the RMSD maps and then were expected to correspond to realistic models (complementary data Fig. 2). Furthermore, they met the criteria that make the acylation reaction possible: the serine-bound carbonyl was stabilized within the oxyanion hole allowing the nucleophilic attack of the acyl acceptor substrate (Complementary data figure 43); the integrity of the catalytic triad was maintained (Table 36) allowing the electron and proton transfers involved in the catalytic pathway. Before being analyzed, the three potential docking targets were minimized performing a 6000 steps Conjugate Gradient calculation.

**Table 36: Interatomic distances between catalytic residues and between the oxyanion holes residues and the serine-bound carbonyl in the conformations CF1, CF1' and CF2 after a 6000 steps Conjugate Gradient minimization.**

Inter-atomic distances(Å)		CF1	CF1'	CF2
Active site	O <sub>γ-Ser105</sub> /N <sub>ε2-His224</sub>	3,87	4,1	3,21
	HN <sub>δ1-His224</sub> /O <sub>δ1-Asp187</sub>	2,28	1,97	2,83
	HN <sub>δ1-His224</sub> /O <sub>δ2-Asp187</sub>	1,97	2,29	1,95
Oxyanion hole	HN <sub>Gln106</sub> /O <sub>O=C acyl-enzyme</sub>	1,91	1,99	1,94
	HN <sub>Thr40</sub> /O <sub>O=C acyl-enzyme</sub>	2,08	2,12	2,24

Among them, the conformation CF1 was rejected as the oleoyl chain came across the catalytic cavity and might impede access to the peptidic substrate. The conformations CF2 and CF1' were quite similar as indicated by a RMSD value of 1.33 Å based on both the residues of the catalytic cavity and the oleoyl chain. In the case of CF1', the chain came straight out of the cavity. In CF2, the chain lodged in a hydrophobic hollow constituted by the residues Ala286, Ile285, Thr40, Gly39, Leu278, Ileu189, and Ala282. Furthermore, a string of water molecules was observed from the cavity bottom to the cavity entrance, interacting with more hydrophilic areas. The localization of these water molecules is assumed to indicate the area which could receive the acyl acceptor substrate (Figure 34B). CF2 appeared as the most realistic model for the acyl-enzyme system and was kept as target for further docking simulations.

#### 2.4.1.3 KS docking:

Before docking, the target structure was finalized by deleting the water molecules that were present in the catalytic cavity. Docking simulations were achieved to determine the main orientations and binding modes of the ligand KS within the catalytic cavity. All the 50 complexes that were automatically retained by LigandFit presented the lysine side chain of KS toward the cavity bottom (Figure 35A).



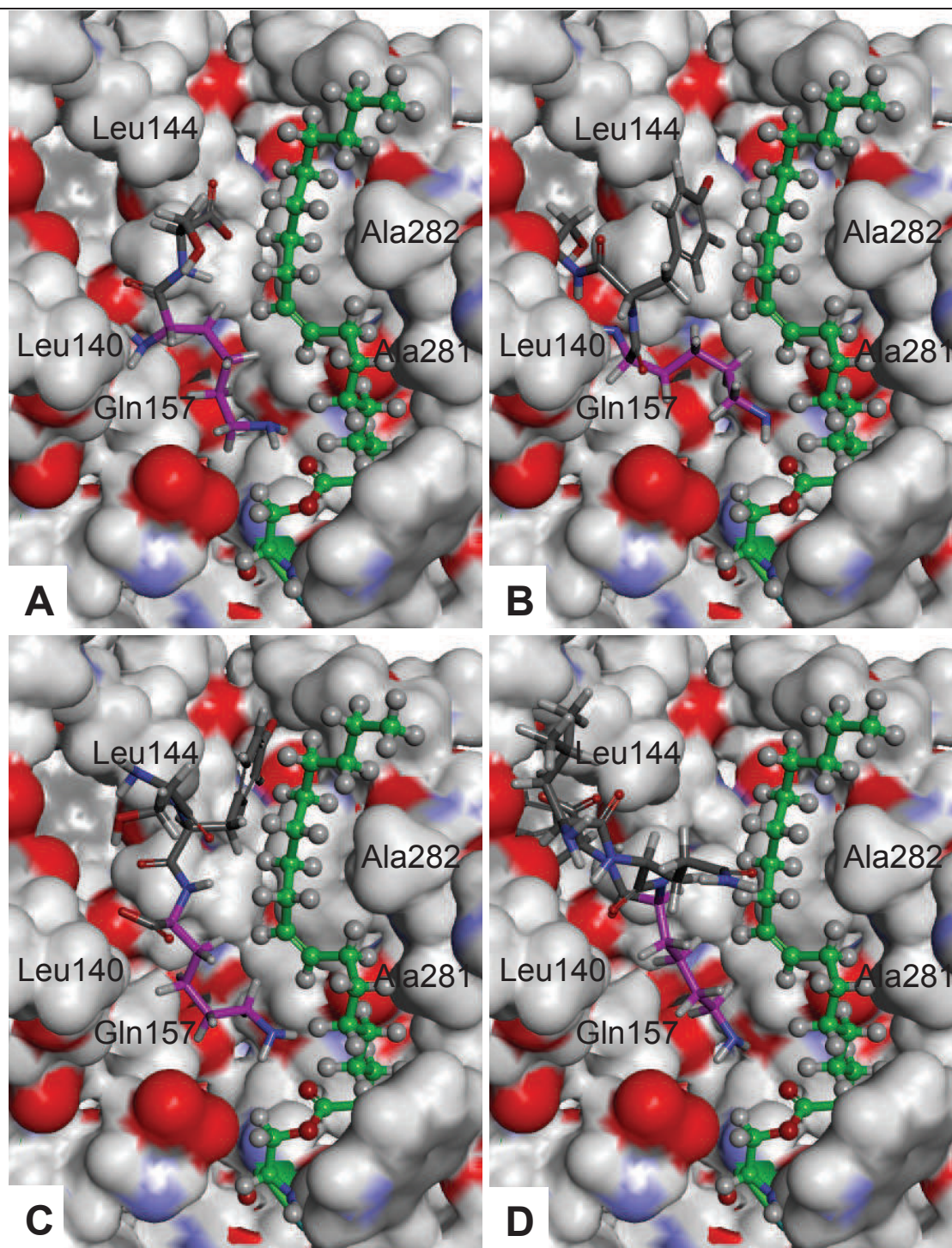


Figure 35 : Lateral view showing peptide binding modes within oleoyl-CALB catalytic pocket. A: KS, B: KYS, C: SYK, D: LQKW, carbon atoms of the oleoyl chain are colored in green, carbon atoms of the lysine side chain are colored in purple. Other atoms are colored according to standard color code.

37 of them established an H-bond interaction between the residue Ile189 and the lysine  $\alpha$ -amino group. The propensity of the complexes to form the second tetrahedral intermediate, and then the acylation product, was evaluated basing on two main criteria: (i) at least one

nucleophilic group of the ligand must come near the catalytic triad at a distance that allows the attack of the acyl-enzyme carbonyl (distance around 4 Å) ; (ii) this nucleophilic attack is favored by a proton transfer from the group to be acylated to the catalytic His224. Once again, a distance criterion around 4 Å has to be respected (Figure 36) [21,22,33,54].

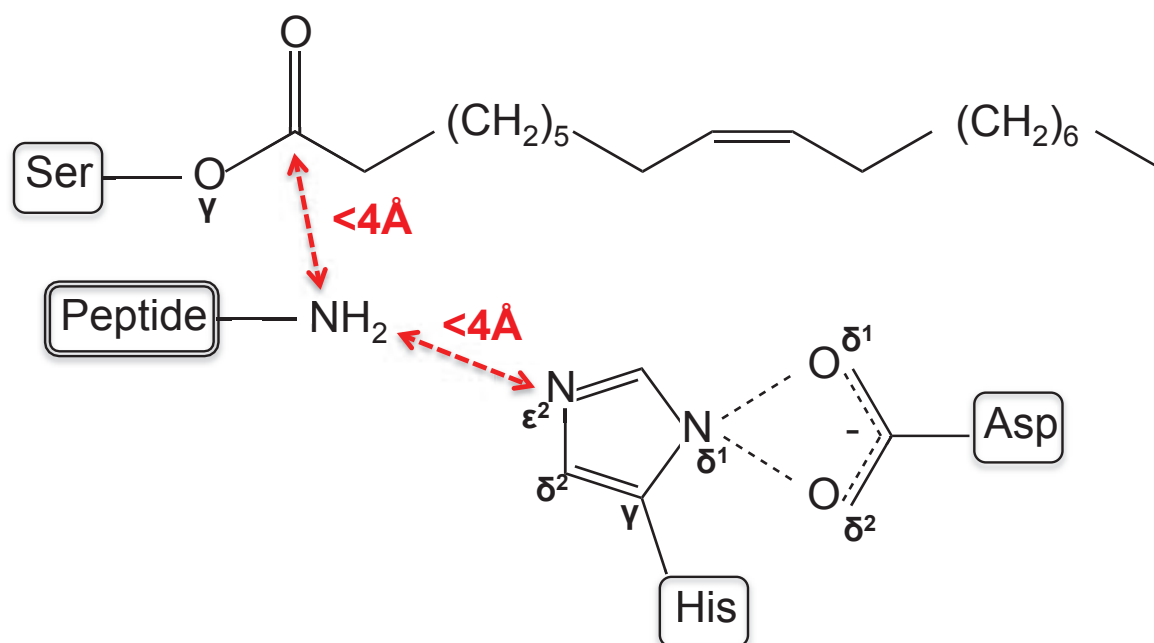


Figure 36 : Distance criteria for CALB-catalyzed acylation reactions.

31 of the 50 complexes respected these distance conditions and 2 of them exhibited the consensus score of 6 referring to the top 10 of scoring functions. These results suggested the N-acylation of the lysine  $\epsilon$ -amino group of KS and are in perfect accordance with experimental data. According to the model, the absence of acylation on both the lysine  $\alpha$ -amino group and the serine hydroxyl group of KS is mainly due to their inaccessibility to the catalytic machinery. This result showed the relevance of the acyl-enzyme model to address the selectivity of CALB in peptide acylation. This model was thus used to study the enzymatic acylation of other peptides.

#### 2.4.2 Influence of the peptidic sequence on CALB selectivity:

Once validated, the model of acyl-enzyme was used to predict the chemo- and the regio-selectivity of CALB toward two tri-peptides constituted by the same amino-acids but differing

Identification des règles de régio- et de chimio-sélectivité pour l'acylation de peptides catalysée par CALB en solvant organique.

---

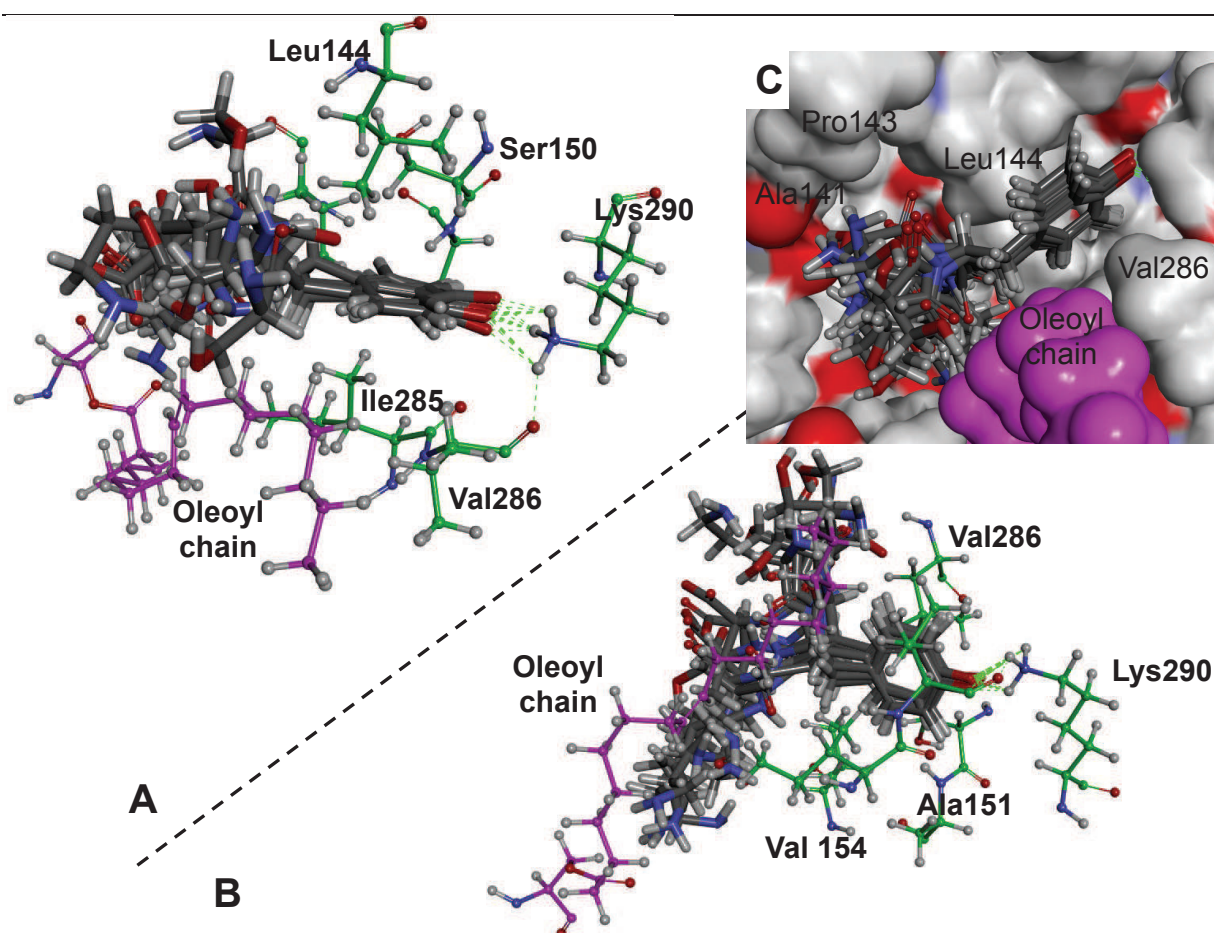
by their sequence. KYS and SYK present various amine and hydroxyl groups that could be acylated (Figure 33B, C).

#### 2.4.2.1 *Theoretical study of KYS and SYK acylation:*

KYS docking was carried out using the target that was previously validated. Among the 50 complexes generated by LigandFit, 41 presented the lysine side chain pointing toward the cavity bottom. 15 of them respected the distances required for acylation. Among these 15 poses, 2 of them were in the top 10 of 5 score functions (consensus score of 5) and 1 pose was in the top 10 of 6 scoring functions. KYS other functional groups were never orientated to the catalytic residues (Figure 35B). This result suggested a preferential acylation of the lysine  $\epsilon$ -amino group of KYS.

Similar results were observed with SYK. 45 conformations among 50 presented the lysine side chain close to the catalytic residues. 4 of them respected the distances criteria. 1 pose was in the top 5 of 6 scoring functions (Figure 35C). In 5 conformations, the serine side chain faced the cavity bottom but stayed far from the catalytic triad. All the conformations produced by SYK docking exhibited the aromatic ring of the tyrosine side chain embedded in a small alcove. This was formed by the oleoyl chain and the residues Leu144, Ser150, Ile285, Val286, Val154 and Ala151 (Figure 37).





**Figure 37 : Interactions between SYK tyrosine side chain and the hydrophobic alcove of CALB. A and B represent the alcove top views and side view, respectively (sticks and balls representation). Carbone atoms of the alcove are colored in green and carbon atoms of the oleoyl chain are colored in purple. SYK is represented with sticks. The Van der Waals surface of the alcove is shown in C. Atoms are colored according to the standard color code.**

This position was stabilized by a hydrogen bond interaction between the tyrosine hydroxyl group and the residue Lys290. In such an orientation, only the lysine  $\epsilon$ -amino group of the peptide was likely to reach the catalytic triad, suggesting a selective acylation of this group. In the case of KYS, the same tendency was observed for 11 conformations showing the tyrosine side chain entrapped in the alcove. 6 out of these 11 poses presented the lysine side chain pointing toward the catalytic residues. The other conformations were entrapped in the alcove did not show any particular orientation toward the catalytic triad. The hydrophobic area constituting the alcove was already reported to interact with aromatic rings of flavonoids influencing the selectivity of their acylation [21,22].

#### 2.4.2.2 Experimental validation of KYS and SYK acylation:

Acylation reactions catalyzed by CALB were performed in  $M_2B_2$  organic solvent at  $55^\circ\text{C}$  during 72 h. In order to control the ionization state of the substrate, tri-ethylamine (TEA) was added to the media with a peptide/TEA molecular ratio of 1:20 [25]. The molar ratio between oleic acid and the peptide was 2:1. Acylation reaction samples were analyzed by liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS) allowing  $MS^2$  fragmentation for structural elucidation of compounds of interest. For KYS, the acylation reaction catalyzed by CALB led to the formation of one mono-acylated product with molecular mass  $M = 660$  and which was detected at a retention time of 5.65min. By fragmentation of this pseudo molecular  $[M+H]^+$  parent ion ( $m/z = 661$ ), three major daughter ions were detected at  $m/z = 348$ ,  $m/z = 528$  and  $m/z = 556$  corresponding to  $[(\text{Oleoyl-K})-\text{H}_2\text{O}-\text{COOH}+H]^+$ ,  $[(\text{Oleoyl-KY})-\text{H}_2\text{O}-\text{CO}+H]^+$  and  $[(\text{Oleoyl-KY})-\text{H}_2\text{O}+H]^+$ , respectively. Those daughter ions thus clearly demonstrate that acylation took place on the lysine amino acid. Furthermore, the fragment  $m/z = 348$  was specifically observed in case of Lysine N- $\epsilon$  acylation by oleic acid as shown by Husson *et al.* [20] in KS acylation catalyzed by CALB (Figure 38).

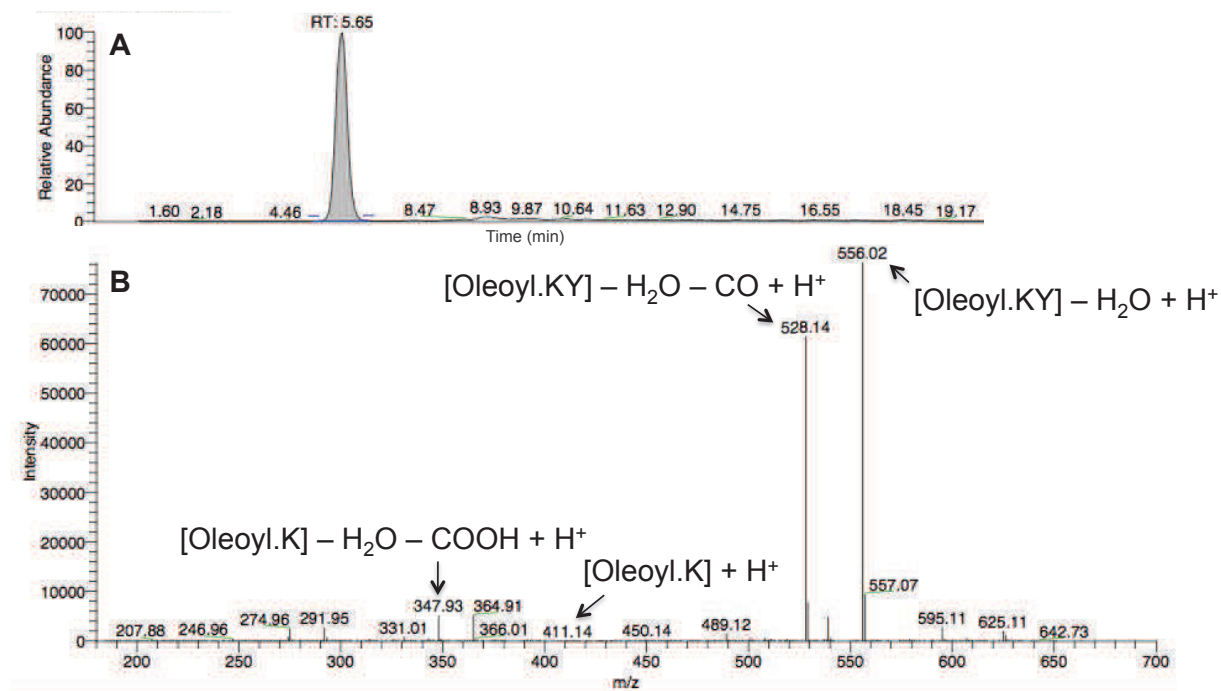
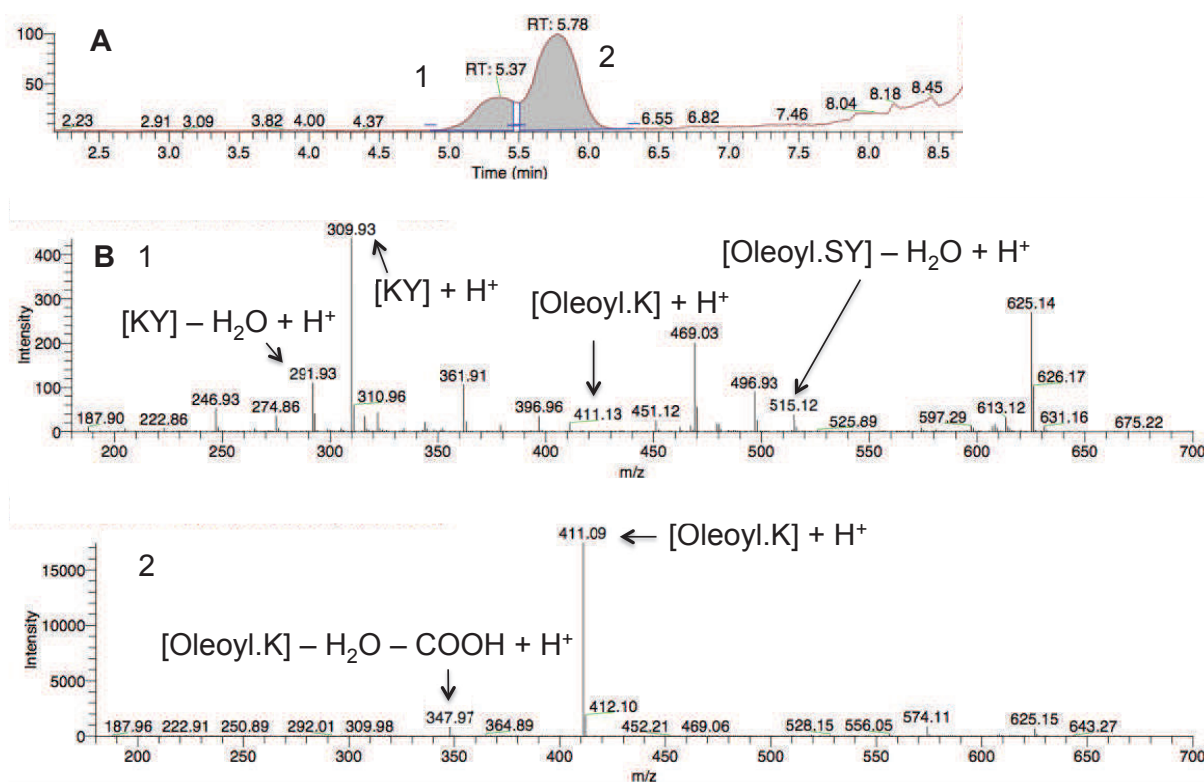


Figure 38 : Mass analyses of N $\epsilon$ -oleoyl KYS. A: single ion chromatogram (SIC) of acylated product  $[M+H]^+$  parent ion ( $m/z=661$ ) . B: MS2 spectrum after fragmentation of the parent ion.

Concerning the acylation of SYK, two mono-acylated products of molecular masses  $M = 660$  were detected by LC-MS. The first minority one was observed at a retention time of 5.37 min, and was identified as a product acylated on the serine residue. Indeed, the MS<sup>2</sup> profile especially showed the presence of a oleoyl-serine fragment  $[(\text{Oleoyl-SY})-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$  ( $m/z = 515$ ) and of KY peptidic fragments ( $m/z = 310$  and  $m/z = 292$  after loss of water). The second mono-acylated product, which was predominant, had a retention time of 5.78 min and resulted from the acylation of the lysine  $\epsilon$ -amino group (Figure 39).



**Figure 39 : Mass analyses of N- $\epsilon$ -oleoyl SYK. A: SIC of acylated product  $[\text{M}+\text{H}]^+$  parent ion ( $m/z=661$ ). B: MS<sup>2</sup> spectrum after fragmentation of the parent ion.**

Therefore, these results showed that CALB is able to catalyze SYK acylation mainly on the lysine side chain and weakly on the serine. In the case of KS and KYS, the acylation of the serine was never detected when placed in the C-terminal position, suggesting a weak reactivity of the serine hydroxyl group due to its molecular environment and particularly to the presence of a free carboxylic group known for its electroattractor property [20].

All these experimental results were relevant with those predicted by docking simulations, especially in the case of the major products experimentally obtained. Only the minority acylation of the SYK serine remained not predicted by the models. One probable reason for

Identification des règles de régio- et de chimio-sélectivité pour l'acylation de peptides catalysée par CALB en solvant organique.

---

this gap between experimental results and theoretical predictions is the use of a fixed target in docking simulations that corresponds to a specific conformation of the system. But, in reality, the protein is a flexible system that can adjust depending on the substrates and the environment.

Results showed that CALB catalyzed the preferential acylation of the lysine side chain whatever the peptidic sequence. This can be explained by the shape of CALB catalytic pocket that allows preferential access to long and flexible chains that can penetrate deep inside the cavity to reach the catalytic triad. In the case of KYS and SYK, only the lysine side chain corresponded to these conditions.

### 2.4.3 Study of CALB selectivity towards a sterically hindered peptide

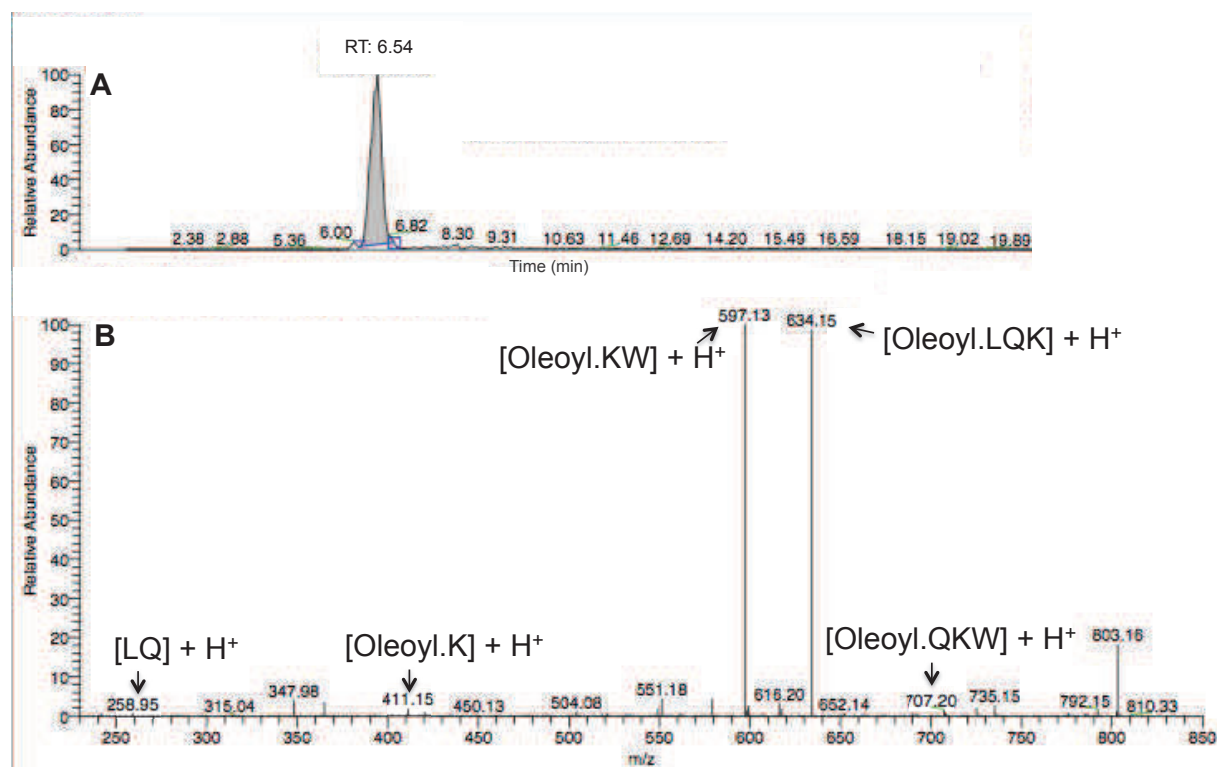
Above-mentioned results showed the possible acylation of peptides exhibiting a lysine residue at their extremity. The docking methodology was applied to LQKW that exhibits two acylable amino groups (Figure 33D). In this peptide, the lysine side chain was expected to be less accessible due to its position in the peptidic sequence and the presence of hindered neighboring amino acids.

#### 2.4.3.1 *Theoretical study of LQKW acylation:*

Docking simulations showed that 17 of the 50 best-ranked poses presented the lysine side chain close to the catalytic residues. All of them respected the distance criteria and 1 pose was in the top 5 of 6 scoring functions (Figure 35D). The 33 other poses presented the leucine side chain pointing toward the active site. However, in this orientation, no acylation reaction can occur for two reasons: the leucine side chain does not exhibit any hydroxyl or amino group; the leucine  $\alpha$ -amino group remained too far from the catalytic triad to be acylated. With regard to these simulations, the selective N-acylation of the lysine side chain was once again predicted in spite of the presence of bulky neighboring amino acids.

### 2.4.3.2 Experimental validation of LQKW acylation:

Experimental acylation of LQKW led to the formation of one major mono oleoyl-product with molecular mass  $M=838$  at a retention time of 6.14 min (Figure 40).



**Figure 40 : Mass analyses of N- $\epsilon$ -oleoyl LQKW. A: SIC of acylated product  $[M+H]^+$  parent ion ( $m/z=839$ ). B: MS<sup>2</sup> spectrum after fragmentation of the parent ion.**

MS<sup>2</sup> fragmentation profile of pseudo molecular  $[M+H]^+$  parent ion ( $m/z = 839$ ) was composed by daughter ions with  $m/z = 259$ ,  $m/z = 411$ ,  $m/z = 597$ ,  $m/z = 634$  and  $m/z = 707$  corresponding to fragments Leu-Gln, oleoyl-Lys, oleoyl-Lys-Trp, oleoyl-Leu-Gln-Lys and oleoyl-Gln-Lys-Trp, respectively. These results showed that acylation occurred on the amino group of the lysine side chain and were in perfect accordance with theoretical predictions. Once again, this selectivity can be explained by the accessibility of the peptide functional groups. Only the lysine side chain exhibits an acylable group able to reach the cavity bottom. Similar N- $\epsilon$ -acylations were observed with the dipeptides l-Phe- $\alpha$ -l-Lys-O-t-Bu and l-Ala- $\alpha$ -l-Lys-O-t-Bu [17]. The absence of acylation on the N- $\alpha$ -amino group was explained by its inaccessibility due to the presence of bulky groups [16,55].



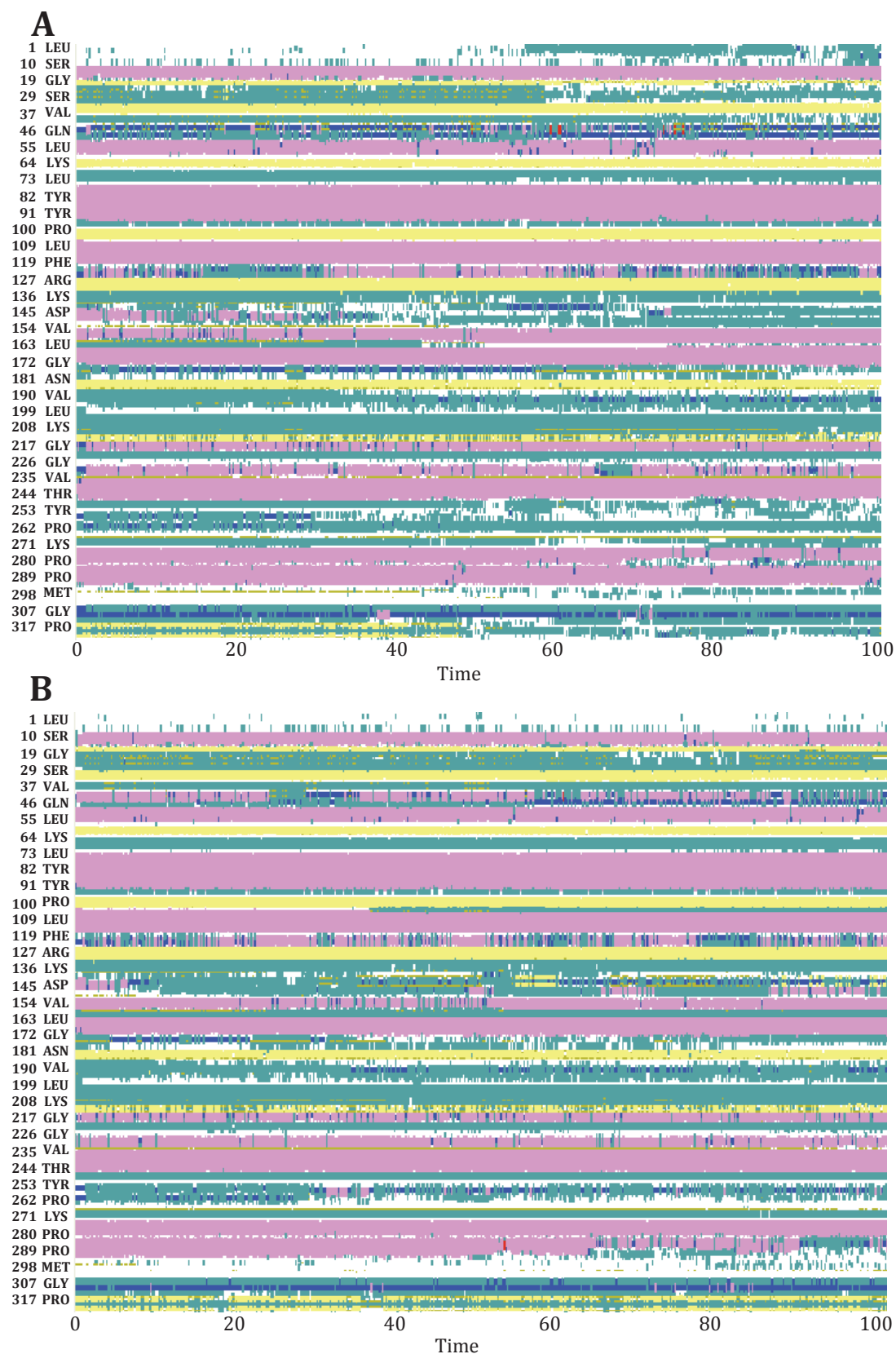
## 2.5 Conclusion

Experimental and molecular modeling approaches were combined to better understand the chemo- and regio-selectivity of CALB toward lysine-based peptides in acylation reactions. Whatever the constitutive amino acids and the sequence of the peptide, both approaches agree that CALB catalyzed preferentially the N- acylation of the lysine side chain. No acylation of the N  $\alpha$ -amino groups or hydroxyl groups was obtained or at least in trace quantities in the case of SYK. Molecular simulations pointed out the importance of the shape of the catalytic cavity in CALB selectivity. The tightness and the depth of the active site appeared to be the major cause for selectivity. In such conditions, the acylation of functional groups located at the end of carbon chains that are long enough to reach the cavity bottom, was favored. Furthermore, the nature of the residues constituting the enzymatic cavity was shown to guide the binding modes of the peptidic substrate. More specifically, peptides including a tyrosine residue adopted a particular position in which stabilizing interactions with hydrophobic residues of the cavity walls were observed. Such results have never been reported before and constitute an important step forward to better understand the rules for selectivity in peptide acylation reactions catalyzed by CALB. Molecular modeling simulations were shown to provide useful information about enzymatic selectivity and can be used to address the acylation of more complex peptides exhibiting biological properties.

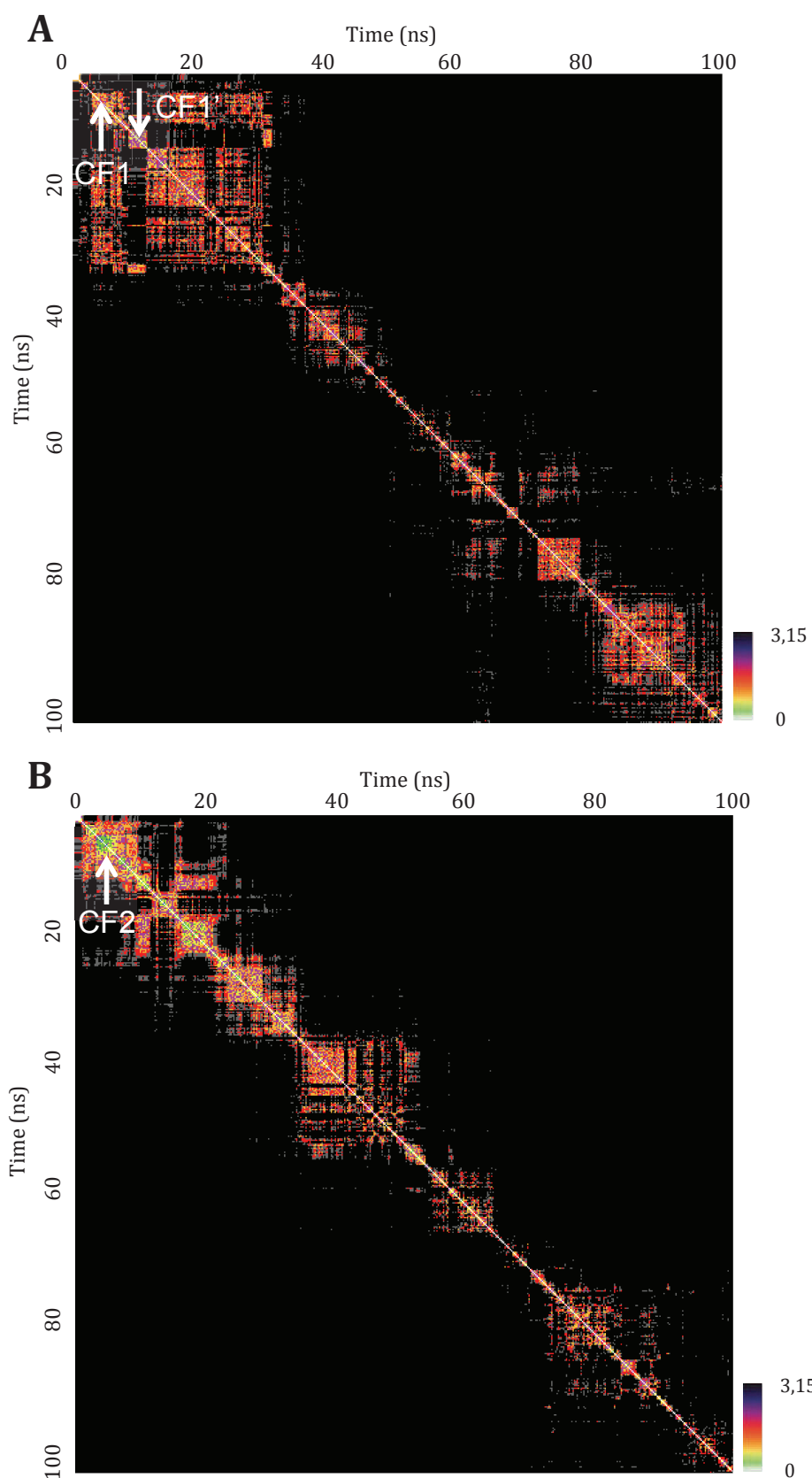
## 2.6 Acknowledgements

The authors thank Evelyne Ronat-Heit for her technical support in molecular modeling experiments.

## 2.7 Complementary data

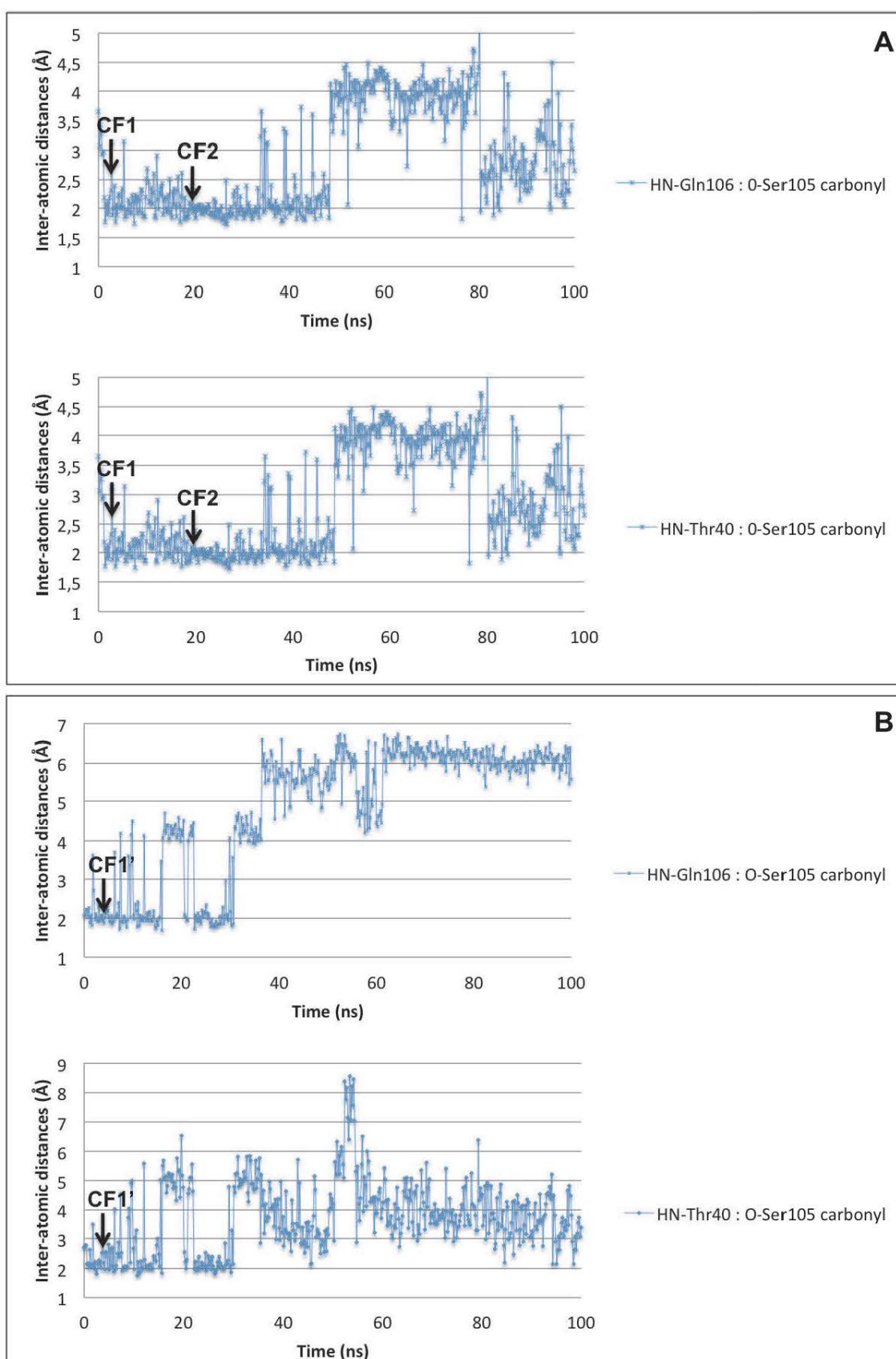


Complementary data figure 41 : VMD Timeline graphics of molecular dynamic trajectories of OCALB1 (A) and OCALB2 (B) (Pink:  $\alpha$ -helix, blue: 3-10 helix, yellow:  $\beta$ -sheet, green: turn, red:  $\pi$ -helix, white: undetermined).



Complementary data figure 42 : RMSD heat map of molecular dynamic trajectories of OCLAB1 (A) and OCALB2 (B). (White arrows point acyl-enzyme stable conformations)





Complementary data figure 43 : Position of the serine-bound carbonyl group with the oxyanion hole residue of OCALB1 (A) and OCALB2 (B).

## 2.8 References

- [1] S.I. Togashi, N. Takahashi, M. Iwama, S. Watanabe, K. Tamagawa, T. Fukui, *Placenta* 23 (6) (2002) 497–502.
- [2] M.A. Babizhayev, *Life Sci.* 78 (20) (2006) 2343–2357.
- [3] P.Y. Deng, Y.J. Li, *Peptides* 26 (9) (2005) 1676–1685.
- [4] C.A. Silva, F.C.V. Portaro, B.L. Fernandes, D.A. Ianzer, J.R. Guerreiro, C.L. Gomes, S.M.T. Serrano, N. Nascimento, A. Camargo, *Toxicon* 51 (4) (2008) 515–523.
- [5] Y. Shen, Y. Fan, H. Dai, Q. Fu, W. Hu, Z. Chen, *Neurosci. Lett.* 414 (2) (2007) 145–149.
- [6] A.A. Fouad, M.A. Morsy, W. Gomaa, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 25 (3) (2008) 292–297.
- [7] T.A. Egorov, T.I. Odintsova, V.A. Pukhalsky, E.V. Grishin, *Peptides* 26 (11) (2005) 2064–2073.
- [8] H. Khandelia, J.H. Ipsen, O.G. Mouritsen, *Biochim. Biophys. Acta* 1778 (7–8) (2008) 1528–1536.
- [9] D.H. Na, Y.S. Youn, S.D. Lee, M.W. Son, W.B. Kim, P.P. DeLuca, K.C. Lee, *J. Controlled Release* 92 (3) (2003) 291–299.
- [10] N. Almiñana, M.A. Alsina, F. Reig, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 57 (2) (2007) 243–249.
- [11] F. Veuillez, J. Deshusses, P. Buri, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 48 (1) (1999) 21–26.
- [12] F. Le Joubioux, N. Bridiau, Y.B. Henda, O. Achour, M. Graber, T. Maugard, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 95 (2013) 99–110.
- [13] E. Husson, V. Garcia-Matilla, C. Humeau, I. Chevalot, F. Fournier, I. Marc, *Enzyme Microb. Technol.* 46 (2010) 338–346.
- [14] O. Torre, V. Gotor-Fernandez, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* 17 (2006) 860–866.
- [15] M. Fernández-Pérez, C. Otero, *Enzyme Microb. Technol.* 33 (2003) 650–660.
- [16] E. Soo, A. Salleh, M. Basri, R.N.Z. Rahman, K. Kamaruddin, *Process Biochem.* 39 (11) (2004) 1511–1518.
- [17] L. Gardossi, D. Bianchi, A.M. Klivanov, *J. Am. Chem. Soc.* 113 (16) (1991) 6328–6329.

- 
- [18] X. Zhang, S. Adachi, Y. Watanabe, R. Matsuno, *Food Res. Int.* 38 (3) (2005) 297–300.
- [19] R. Valivety, P. Jauregi, I. Gill, E. Vulfson, *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 74 (7) (1997) 879–886.
- [20] E. Husson, C. Humeau, C. Paris, R. Vanderesse, X. Framboisier, I. Marc, I. Chevalot, *Process Biochem.* 44 (4) (2009) 428–434.
- [21] E.B. De Oliveira, C. Humeau, L. Chebil, E.R. Maia, F. Dehez, B. Maigret, M. Ghoul, J.M. Engasser, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 59 (1-3) (2009) 96–105.
- [22] C. Bidouil, E.B. De Oliveira, L. Chebil, E.R. Maia, B. Maigret, E.H. Ronat, M. Ghoul, J.M. Engasser, C. Humeau, *J. Biotechnol.* 156 (3) (2011) 203–210.
- [23] M. Cammenberg, K. Hult, S. Park, *ChemBioChem* 7 (11) (2006) 1745–1749.
- [24] P.O. Syren, F. Le Joubioux, Y. Ben Henda, T. Maugard, K. Hult, M. Graber, *Chem-CatChem* 5 (7) (2013) 1842–1853.
- [25] D. Reyes-Duarte, E. Castillo, R. Martínez, A. López-Munguía, *Biotechnol. Lett.* 24 (24) (2002) 2057–2061.
- [26] E. Husson, C. Humeau, C. Harscoat, X. Framboisier, C. Paris, E. Dubreucq, I. Marc, I. Chevalot, *Process Biochem.* 46 (4) (2011) 945–952.
- [27] C.M. Venkatachalam, X. Jiang, T. Oldfield, M. Waldman, *J. Mol. Graph. Model.* 21 (4) (2003) 289–307.
- [28] J.C. Phillips, R. Braun, W. Wang, J. Gumbart, E. Tajkhorshid, E. Villa, C. Chipot, R.D. Skeel, L. Kale, K. Schutlen, *J. Comput. Chem.* 26 (16) (2005) 1781–1802.
- [29] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, *J. Mol. Graph. Model.* 14 (1) (1996) 33–38.
- [30] A.D. MacKerell, D. Bashford, M. Bellott, R.L. Dunbrack, J.D. Evanseck, M.J. Field, J. Gao, H. Guo, S. Ha, *J. Phys. Chem. B* 102 (18) (1998) 3586–3616.
- [31] J. Uppenberg, S. Patkar, T. Bergfors, T.A. Jones, *J. Mol. Biol.* 235 (2) (1994) 790–792.
- [32] B. Botta, G. Zappia, A. Tafi, M. Botta, F. Manetti, E. Cernia, G. Milana, C. Palocci, S. Soro, G. Monache, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 16 (5–6) (2002) 241–247.
- [33] C. Palocci, M. Falconi, S. Alcaro, A. Tafi, R. Puglisi, F. Ortuso, M. Botta, L. Alberghina, E. Cernia, *J. Biotechnol.* 128 (4) (2007) 908–918.
- [34] J. Pleiss, M. Fischer, R.D. Schmid, *Chem. Phys. Lipids* 93 (1–2) (1998) 67–80.
- [35] W.L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J.D. Madura, R.W. Impey, M.L. Klein, *J. Chem. Phys.* 79 (2) (1983) 926–935.
- [36] E.F.F. Da Cunha, T.C. Ramalho, R.B. de Alencastro, E.R. Maia, *Comput. Math.*

- Methods Med. 8 (2) (2007) 113–124.
- [37] C.K. Andrade, W.A. Silva, E.R. Maia, J. Biomol. Struct. Dyn. 25 (1) (2007) 35–48.
- [38] D. Roccatano, Curr. Protein Pept. Sci. 9 (4) (2008) 407–426.
- [39] C.M. Soares, V.H. Teixeira, A.M. Baptista, Biophys. J. 84 (3) (2003) 1628–1641.
- [40] P. Trodler, J. Pleiss, BMC Struct. Biol. 8 (9) (2008) 1–10.
- [41] T. Darden, D. York, L. Pedersen, J. Chem. Phys. 98 (12) (1993) 10089–10092.
- [42] J.P. Ryckaert, G. Ciccotti, H.J. Berendsen, J. Comput. Phys. 23 (3) (1977) 327–341.
- [43] M. Feher, Drug Discov. Today 11 (9–10) (2006) 421–428.
- [44] I.W. Lavandera, S. Fernandez, J. Magdalena, M. Ferrero, R.J. Kazlauskas, V. Gotor, Chembiochem 6 (8) (2005) 1381–1390.
- [45] G. Fuentes, A. Ballesteros, C.S. Verma, J. Biomol. Struct. Dyn. 25 (2) (2007) 145–155.
- [46] M. Linder, A. Hermansson, J. Liebeschuetz, T. Brinck, J. Mol. Model. 17 (4) (2011) 833–849.
- [47] Z.Q. Duan, W. Du, D.H. Liu, Bioresour. Technol. 102 (23) (2011) 11048–11050.
- [48] J. Kumaresan, T. Kothai, B.S. Lakshmi, Mol. Simul. 37 (12) (2011) 1053–1061.
- [49] E.D. Gudino, L.E. Iglesias, M.L. Ferreira, Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics 1824 (4) (2012) 627–636.
- [50] S. Jung, J. Kim, S. Park, RSC Adv. 3 (8) (2013) 2590–2594.
- [51] M. del Mar Contreras, B. Hernández-Ledesma, L. Amigo, P.J. Martín-Álvarez, I. Recio, LWT – Food Sci. Technol. 44 (2011) 9–15.
- [52] B. Hernández-Ledesma, M. del Mar Contreras, I. Recio, Adv Colloid Interface Sci. 165 (2011) 23–35.
- [53] J. Uppenberg, M.T. Hansen, S. Patkar, T.A. Jones, Structure 2 (4) (1994) 293–308.
- [54] T. Xu, L. Zhang, X. Wang, D. Wei, T. Li, BMC Bioinformatics 10 (257) (2009) 1–7.
- [55] T. Izumi, Y. Yagimuma, M. Haga, J. Am. Oil. Chem. Soc. 74 (7) (1997) 875–878.

### **3 Contribution de l'article**

Cette étude a permis la construction d'un modèle d'acyl-enzyme, permettant d'étudier la chimio et la régio-sélectivité de CALB pour l'acylation de petits peptides avec l'acide oléique.

Dans un premier temps, les positions préférentielles de l'acide oléique dans la cavité du site actif ont été déterminées par dynamique moléculaire. Pour augmenter la robustesse du modèle, nous avons fait le choix de mener 2 simulations de dynamique moléculaire de 100 ns chacune, en partant de 2 jeux de coordonnées atomiques initiales, se différenciant par le positionnement de la chaîne oléoylle dans le site actif de l'enzyme. La cible de docking la plus pertinente a été identifiée comme étant la structure conformationnelle énergétiquement stable, commune aux deux trajectoires de dynamique moléculaire. Dans cette conformation, la chaîne oléoylle se place dans une cavité hydrophobe constituée des résidus Ala286, Ile285, Thr40, Gly39, Leu278, Ile189 et Ala282. La validité de ce modèle d'acyl-enzyme a été vérifiée par le docking du peptide KS pour lequel la sélectivité de CALB a été antérieurement déterminée expérimentalement. L'adéquation entre les prévisions d'acylation issues de l'étude de docking et les résultats d'acylation expérimentale a démontré la validité du modèle et autorise l'utilisation de cette cible de docking pour l'étude de la sélectivité de CALB envers d'autres structures peptidiques.

Dans un deuxième temps, le modèle d'acyl-enzyme a été utilisé pour le docking de peptides de petite taille comprenant les résidus lysine et sérine tels que Lys-Try-Ser, Ser-Tyr-Lys. La lysine présente un groupement amine sur sa chaîne latérale et la sérine un groupement hydroxyle. Ces peptides comportent de plus une fonction amine à l'extrémité N-terminale. Cette étude a mis en évidence :

- une régio-sélectivité d'acylation de CALB avec une acylation majoritaire systématique du groupement amine de la chaîne latérale de la lysine, quel que soit le peptide étudié;
- une acylation minoritaire de la sérine lorsque celle-ci est située en position N-terminale dans la séquence peptidique.

Toutefois, ces régio- et chimio-sélectivités observées sont relatives car la localisation de l'acylation minoritaire sur la sérine du peptide SYK n'avait, à ce stade, pas été clairement identifiée.

Les travaux de simulation ont apporté des éléments clés intervenant dans la sélectivité de CALB. Ainsi, il a été démontré que la forme et la profondeur de la cavité du site actif jouent un rôle important dans la sélectivité de l'enzyme. En effet, seule la longue chaîne latérale de la lysine semble pouvoir atteindre la triade catalytique située au fond de la cavité du site actif. En outre, le positionnement des peptides dockés semble être lié à la présence d'un élément de structure en forme de "sabot" formé par les résidus Leu144, Ser150, Ile285, Val286, Val154 Ala151 et l'établissement d'une liaison hydrogène avec le résidu Lys290.

Concernant le peptide SYK, une étude complémentaire a été réalisée afin de déterminer la position exacte de l'acylation minoritaire de la sérine. Par ailleurs, la cible de docking construite a été utilisée pour l'étude de l'acylation du 6-amino-1-héxanol, molécule linéaire portant à la fois un groupement amine et un groupement hydroxyle, ces deux groupements présentant la même accessibilité d'un point de vue stérique. Des données expérimentales concernant cette réaction ont été recueillies lors de travaux antérieurs. L'objectif de cette étude complémentaire était de comprendre, au niveau moléculaire, la chimio-sélectivité de la réaction d'acylation catalysée par CALB.

## **4 Résultats complémentaires**

### **4.1 Identification de la localisation de l'acylation minoritaire de SYK par CALB avec de l'acide oléique :**

La sérine du peptide SYK présente deux sites d'acylation potentiels : une fonction amine correspondant à l'extrémité N-terminale du peptide et le groupement hydroxyle de la chaîne latérale de la sérine (Figure 44).

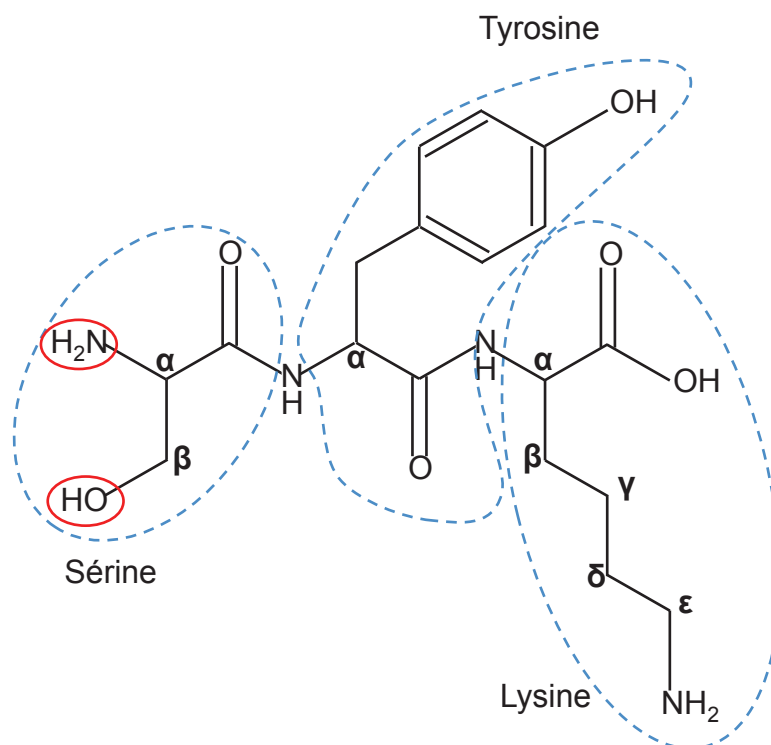
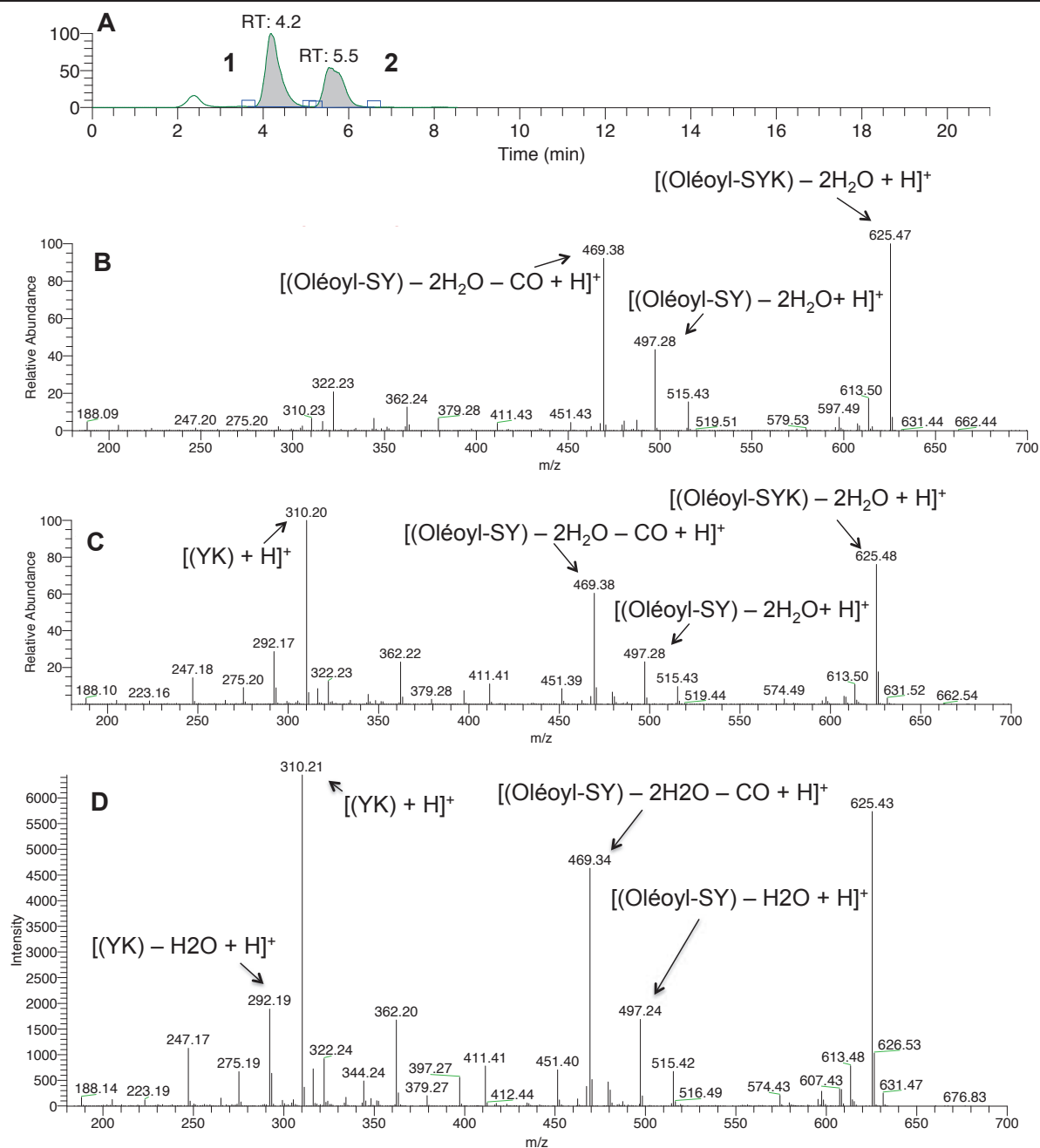


Figure 44 : Structure moléculaire du peptide SYK avec entourés en rouge, les deux sites d'acylation potentiels de la sérine.

Afin d'identifier le groupement de la sérine acylé par CALB, une analyse LCMS-MS a été réalisée sur deux mono-oléoyl-Ser-Tyr-Lys synthétisés par voie chimique, l'un résultant d'une acylation sur la fonction amine N-terminale de Ser-Tyr-Lys et l'autre obtenu en acylant la fonction hydroxyle de la sérine. Ces deux dérivés sont caractérisés par des temps de rétention et des profils  $MS^2$  différents. Le chromatogramme et les profils  $MS^2$  d'un échantillon réunissant ces deux standards sont présentés dans la Figure 45.



**Figure 45 : Chromatogramme et spectres MS<sup>2</sup> de standards de Ser-N/O-oléoyl-Tyr-Lys. A: Chromatogramme d'un échantillon comprenant le standard Ser-O-oléoyl-Tyr-Lys (A, 1) et le standard Ser-O-oléoyl-Tyr-Lys (A, 2). B: Profil MS<sup>2</sup> du standard Ser-O-oléoyl-Tyr-Lys. C: Profil MS<sup>2</sup> du standard Ser-N-oléoyl-Tyr-Lys. D: Spectre MS<sup>2</sup> du composé minoritaire oléoyl-Ser-Tyr-Lys obtenu expérimentalement avec CALB.**

Le standard Ser-O-oléoyl-Tyr-Lys est caractérisé par un temps de rétention de 4,2 min et génère les ions fils  $[(\text{YK}) + \text{H}^+]$ ,  $[(\text{Oléoyl-SY}) - 2\text{H}_2\text{O} - \text{CO} + \text{H}^+]$ ,  $[(\text{Oléoyl-SY}) - 2\text{H}_2\text{O} + \text{H}^+]$ ,  $[(\text{Oléoyl-SYK}) - 2\text{H}_2\text{O} + \text{H}^+]$  de masses respectives  $m/z = 310.20, 469.38, 497.28$  et  $625.48$ . Le second standard Ser-N-oléoyl-Tyr-Lys présente quant à lui, un temps de rétention



de 5,5 min et génère des ions fils identiques à ceux issus du standard précédent mais avec des différences d'intensités relatives notamment pour l'ion [(YK) + H<sup>+</sup>] (m/z = 310,20). Il est donc possible de différencier ces deux standards par une analyse LCMS couplée à de la fragmentation en ions fils. Ces informations ont été utilisées pour élucider la structure du produit minoritaire obtenu lors de l'acylation de Ser-Tyr-Lys. La comparaison des spectres MS<sup>2</sup> des standards avec le spectre MS<sup>2</sup> du produit minoritaire d'acylation montre que ce dernier est identique à celui obtenu avec le standard Ser-N-oléoyl-Tyr-Lys. L'acylation minoritaire de SYK catalysée par CALB s'effectue donc sur le groupement amine de la sérine.

CALB favoriserait donc l'acylation du groupement amine en position N-terminale de la sérine au détriment de la fonction hydroxyle portée par la chaîne latérale de la sérine. Cette sélectivité d'acylation paraît surprenante car CALB catalyse plus facilement les liaisons esters que les liaisons amides (Ganjalkhany *et al.*, 2012; Nakagawa *et al.*, 2007; Syrén and Hult, 2011; Syrén *et al.*, 2012). Deux hypothèses peuvent expliquer cette N-acylation :

- La première serait un possible transfert d'acyle O-N intramoléculaire qui a déjà été rapporté par certains auteurs dans le cas d'acylation de molécules polyfonctionnelles, en solvant organique. Furutani *et al.*, (1996) décrivent la N-acylation stricte de l'éthanolamine catalysée par la lipase QL de *Alicagenes* sp., avec de l'acide oléique et de l'acide myristique en milieu M<sub>2</sub>B<sub>2</sub>. Cette N-acylation résulterait d'une O-acylation suivie d'un transfert d'acyle O-N intramoléculaire. La O-acylation serait, de plus, masquée par la forte activité hydrolytique de la lipase QL vis-à-vis des liaisons esters, favorisant la disparition de produits O-acylés. Mouls *et al.* (2004) ont, quant à eux, étudié l'acylation chimique d'un pentapeptide (Ser-Phe-Leu-Leu-Arg) avec de l'acide palmitique et de l'acide octanoïque. Ils ont décrit également un transfert intramoléculaire O-N de la chaîne acyle, de la chaîne latérale de la sérine vers la fonction amine en position N-terminale, dans un environnement réactionnel basique.

Lors de la synthèse d'oléoyl-Ser-Tyr-Lys catalysée par CALB, l'ajout de TEA au milieu assure des conditions réactionnelles basiques. La N-acylation observée de la sérine catalysée par CALB est donc très probablement due à un transfert intramoléculaire du groupement hydroxyle de la chaîne latérale de la sérine, au groupement amine en position N-terminale. CALB possédant une forte activité hydrolytique vis-à-vis des liaisons ester, aucune O-acylation de la sérine n'a pu être observée.

Ce transfert d'acyle intramoléculaire permettrait également d'expliquer les résultats des simulations de docking : aucune pose présentant la fonction amine de Ser-Tyr-Lys en position N-terminale orienté vers le site actif n'a été obtenue, suggérant une absence d'acylation enzymatique sur ce groupement. En revanche, quelques poses présentant la chaîne latérale de la sérine de Ser-Tyr-Lys orientée vers la triade catalytique ont été obtenues, suggérant une O-acylation potentielle.

- L'équipe de Syrén *et al.* propose une autre hypothèse (2013), permettant d'expliquer une N-acylation préférentielle. L'absence de détection de SYK O-acylé sur la chaîne latérale de la sérine suggère une N-acylation directe du groupement amine porté par le carbone  $\alpha$  de la sérine. Cette N-acylation serait permise par un mécanisme de « proton navette » lors d'un état transitoire de l'acyl-enzyme entre l'attaque nucléophile de l'accepteur d'acyle et l'établissement du deuxième intermédiaire tétraédrique du mécanisme de catalyse de CALB (Figure 16).

## 4.2 Etude de la chimio-sélectivité de CALB pour l'acylation du 6-amino-1-hexanol.

Afin de vérifier la capacité de notre démarche de modélisation à appréhender correctement la question de la chimio-sélectivité de CALB, une étude de docking a été menée sur l'acylation d'une molécule polyfonctionnelle linéaire présentant à ses extrémités un groupement amine et un groupement hydroxyle, et pour laquelle la chimio-sélectivité de CALB a été déterminée expérimentalement lors de travaux antérieurs.

L'acylation du 6-amino-1-hexanol a été étudiée dans les travaux de Husson *et al.* (2010). Le 6-amino-1-hexanol est une chaîne carbonée de 6 carbones présentant à ses extrémités un groupement amine ainsi qu'un groupement hydroxyle (Figure 46).

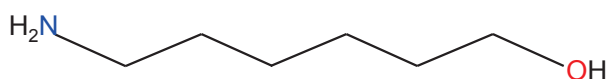


Figure 46 : Représentation en bâtonnets du 6-amino-1-hexanol.

En solvant M<sub>2</sub>B<sub>2</sub>, CALB catalyse l'acylation du 6-amino-1-hexanol en deux phases. Pendant la première heure, une réaction pouvant être qualifiée de rapide (vitesse initiale de synthèse de  $120 \pm 16 \text{ mM.h}^{-1}$ ) a lieu, conduisant essentiellement à l'accumulation du produit O-oléoyl aminohexanol. Une seconde phase moins rapide (vitesse initiale de synthèse de  $12 \pm 3 \text{ mM.h}^{-1}$ ) permet ensuite d'atteindre l'équilibre thermodynamique (48h). C'est lors de cette phase que le composé mono-acylé est N-acylé, conduisant alors au produit O, N-diacylé.

L'absence de produit N-oléoyl aminohexanol peut s'expliquer selon deux hypothèses :

- Soit CALB catalyse préférentiellement la O-acylation de la fonction hydroxyle du 6-amino-1-hexanol. Cette hypothèse s'appuie sur le fait que CALB est connue pour avoir une chimio-sélectivité favorisant les réactions de O-acylation par rapport aux réactions de N-acylation, contrairement aux protéases et aux amidases qui présentent pourtant une triade catalytique identique (Syrén and Hult, 2011). Le transfert d'acyle du O vers le N étant peu probable (Fernández-Pérez and Otero, 2001; Furutani *et al.*, 1996; Tufvesson *et al.*, 2007), le produit monoacylé est ensuite N-acylé pour former le O,N-dioléoyl aminohexanol.
- Soit la N-acylation du 6-amino-1-hexanol se produit, mais reste indétectable car le 6-amino-1-hexanol N-acylé est immédiatement transformé en composé di-acylé.

Pour valider ces hypothèses, un docking du 6-amino-1-hexanol a été effectué avec la cible de docking construite précédemment (§2.4.1.2 ).

#### 4.2.1 Etude par modélisation moléculaire de la chimio-sélectivité de CALB pour l'acylation du 6-amino-1-hexanol.

Les paramètres de docking du 6-amino-1-hexanol sont identiques à ceux utilisés pour le docking des peptides présentés précédemment (§2.3.2.4 ).

Sur les 50 complexes enzyme/substrats retenus, tous présentent la fonction hydroxyle du 6-amino-1-hexanol à proximité de la triade catalytique. 4 poses parmi ces 50 respectent les critères de distance requis pour l'acylation. Ces 4 poses sont caractérisées par un placement identique du 6-amino-1-hexanol dans la cavité et obtiennent un score de 5 dans le top 10 des fonctions de scores. (Figure 47)

Identification des règles de régio- et de chimio-sélectivité pour l'acylation de peptides catalysée par CALB en solvant organique.

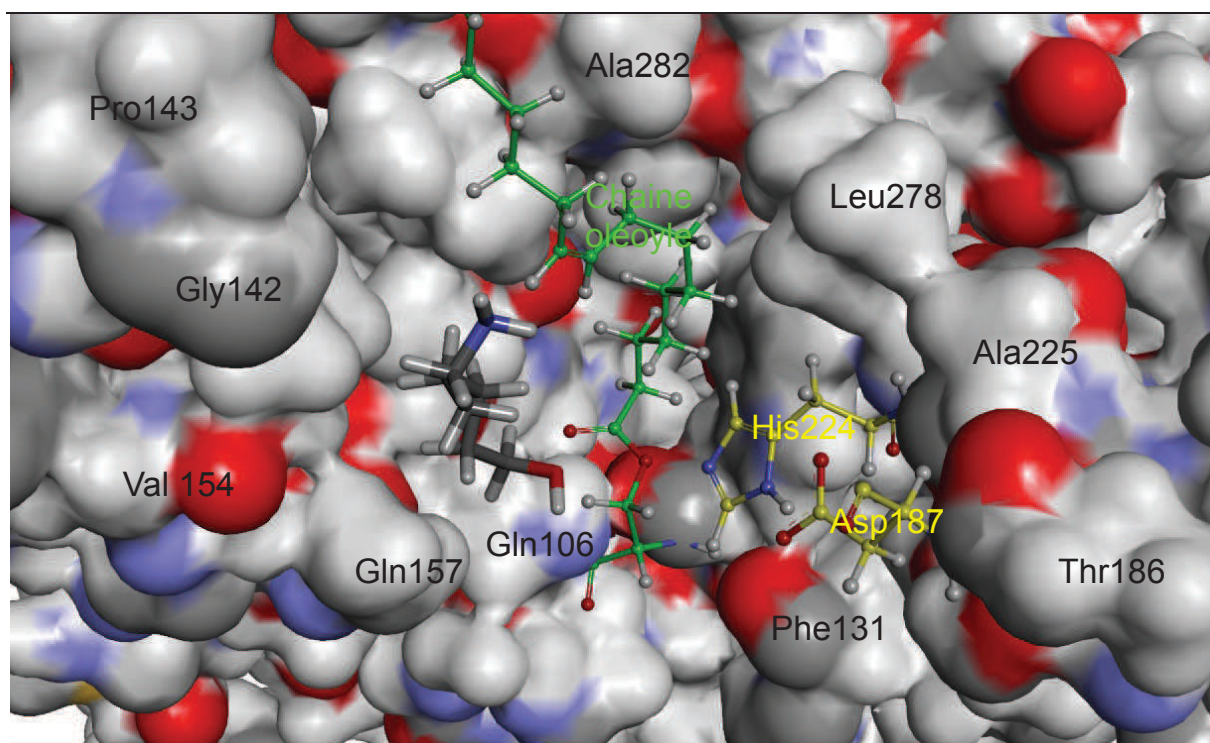


Figure 47 : Vue latérale du site actif montrant le positionnement du 6-amino-1-hexanol dans la cavité catalytique de l'acyl-enzyme. Les atomes de carbone de la chaîne oléoyle sont colorés en vert, les atomes de carbone des résidus catalytiques du site actif sont en jaune. Les autres atomes sont colorés selon le code couleur standard.

D'après les résultats des simulations, l'acylation du 6-amino-1-hexanol s'effectue exclusivement sur la fonction hydroxyle. Ce résultat permet de valider la première partie de l'hypothèse selon laquelle le 6-amino-1-héxanol est acylé préférentiellement sur la fonction hydroxyle. Pour valider la seconde partie stipulant une seconde acylation du substrat sur la fonction amine, le docking du produit O-oléoyl-6-amino-1-hexanol a été réalisé pour étudier la possibilité d'une N-acylation.

#### 4.2.2 Etude par modélisation moléculaire de l'acylation du O-oléoyl-6-amino-1-hexanol catalysée par CALB.

Avec les mêmes paramètres de docking que précédemment,  $10^6$  conformères du O-oléoyl-6-amino-1-hexanol ont été dockés dans le site actif de l'acyl-enzyme. L'étude des 50 meilleures poses retenues montre que le ligand n'a pas d'orientation préférentielle vis-à-vis de l'acyl-enzyme ; 20 poses sont orientées avec la fonction amine du O-oléoyl-6-amino-1-héxanol vers le fond de la cavité, 25 présentent l'extrémité de la chaîne carbonée oléoyle à proximité de la



triade catalytique et 7 n'ont pas d'orientation particulière. Parmi les 20 poses présentant la fonction amine dans le fond du site, la partie 6-amino-1-hexanol du ligand se positionne de manière similaire dans tous les complexes, contrairement à la chaîne oléoyle qui adopte de multiples positions. 6 poses respectent les critères de distances requis pour une acylation fonctionnelle. Ces 6 poses obtiennent un score d'au moins 5 dans le top 25 des fonctions de scores. (Figure 48)

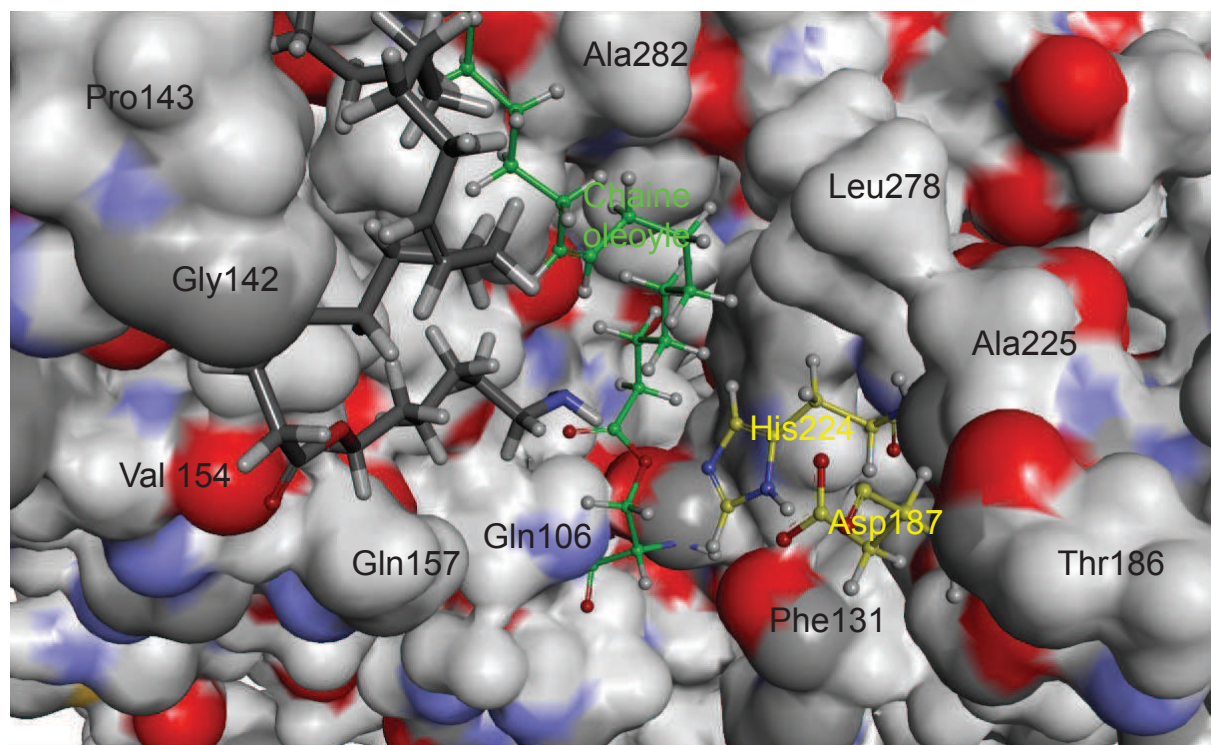
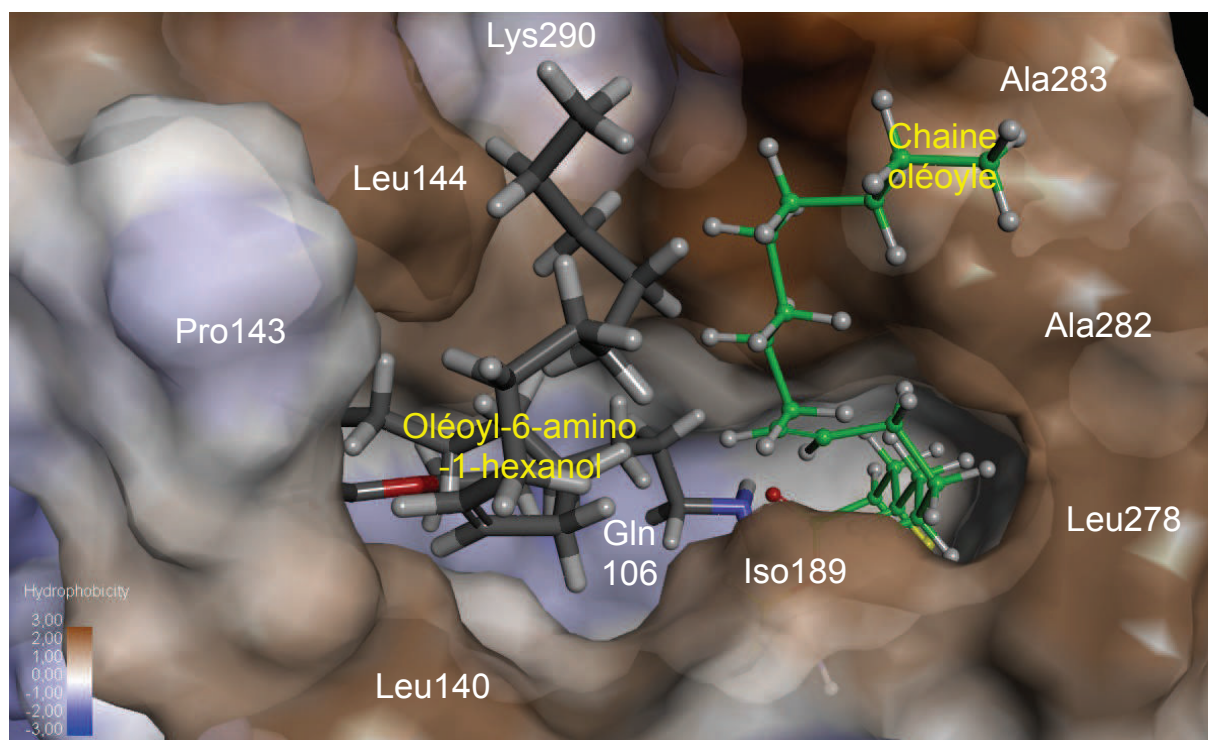


Figure 48 : Vue latérale du site actif montrant le positionnement du O-oléoyl-6-amino-1-hexanol dans la cavité catalytique de l'acyl-enzyme. Les atomes de carbone de la chaîne oléoyle sont colorés en vert, les atomes de carbone des résidus du site actif sont en jaune. Les autres atomes sont colorés selon le code couleur standard.

L'étude des 50 poses retenues montre que l'acylation du groupement amine du O-oléoyl-6-amino-1-hexanol est possible. Cependant, cette N-acylation semble moins favorisée que celle du groupement hydroxyle, aux vues des différentes orientations adoptées par le ligand dans la cavité. En effet, seules 20 poses sur 50 présentent le groupement amine au voisinage de la triade catalytique. Cette difficulté de positionnement peut s'expliquer par l'hydrophobicité accrue de la molécule une fois acylée avec la chaîne grasse oléoyle. Pour subir une seconde acylation, le groupement cible de l'accepteur d'acyle doit se placer dans une région

Identification des règles de régio- et de chimio-sélectivité pour l'acylation de peptides catalysée par CALB en solvant organique.

« hydrophile » localisée dans le fond de la cavité de CALB, constituée des résidus Thr40, Asp134 et Gln 157 (Figure 49).



**Figure 49 :** Vue frontale du site actif montrant le positionnement de l'O-oléoyl-6-amino-1-hexanol dans la cavité catalytique de l'acyl-enzyme. Les atomes de carbone de la chaîne oléoyle sont colorés en vert, les atomes de carbone des résidus du site actif sont en jaune. Les autres atomes sont colorés selon le code couleur standard. Les surfaces bleues représentent les résidus hydrophiles et les surfaces marron les résidus hydrophobes.

La chaîne oléoyle adopte des placements différents pour chaque pose. Cette instabilité de placement de la chaîne oléoyle peut expliquer la difficulté pour CALB d'acyler la fonction amine de l'O-oléoyl-6-amino-1-hexanol, et justifier la première phase d'accumulation de l'O-oléoyl aminohexanol mise en évidence lors de l'acylation expérimentale.

Cette étude complémentaire de docking sur l'acylation du 6-amino-1-hexanol confirme l'hypothèse selon laquelle deux phases d'acylation successives ont lieu. Une première, rapide, induisant l'acylation du groupement hydroxyle, puis une seconde, plus lente, conduisant à l'acylation du groupement amine du produit O-acylé généré précédemment.

Dans cette étude, la fonction amine et la fonction hydroxyle ont le même environnement chimique et le même encombrement stérique. La chimio-sélectivité de CALB en faveur de la O-acylation a été démontrée.

Une parfaite corrélation a été obtenue entre les modèles issus des simulations et les résultats expérimentaux, démontrant ainsi l'efficacité de la démarche de modélisation pour expliquer la chimio-sélectivité enzymatique de CALB.

## **5 Conclusion**

Cette première étude a permis de construire un modèle « acyl-enzyme » permettant l'étude de la chimio- et de la régio-sélectivité de CALB lors de l'acylation de substrats peptidiques polyfonctionnels.

L'utilisation de ce modèle en tant que cible de docking a permis de prévoir l'acylation majoritaire de peptides catalysée par CALB avec l'acide oléique, à savoir une N-acylation majoritaire de la chaîne latérale de la lysine pour tous les peptides testés.

Les analyses de docking ont permis d'expliquer cette sélectivité, qui semble liée à l'hydrophobie, la forme étroite et la profondeur de la cavité catalytique de CALB. Plus précisément, il ressort de cette étude que CALB favorise l'acylation de groupements fonctionnels situés à l'extrémité d'une longue chaîne carbonée permettant d'atteindre la triade catalytique (typiquement, la fonction amine située sur la chaîne latérale de la lysine). Ces résultats sont en accord avec une étude réalisée sur le flavonoïde rutine, montrant que le groupement acylé est celui qui est le plus accessible de la molécule (De Oliveira *et al.*, 2009). La chaîne latérale de la sérine semble également acylable, mais dans une moindre mesure puisque, expérimentalement, l'acylation de la sérine ne s'effectue que pour le peptide SYK et en faibles proportions.

Pour des substrats porteurs d'une fonction amine et d'une fonction hydroxyle présentant le même environnement chimique et donc la même accessibilité (exemple du 6-amino-1-hexanol) les résultats de modélisation ainsi que les résultats expérimentaux montrent que CALB favorise la O-acylation par rapport à la N-acylation. L'ester obtenu subit ensuite une N-acylation, conduisant au produit diacylé. Pour les peptides comportant une sérine en position N-terminale (Ser-Tyr-Lys), l'acylation de la fonction amine N-terminale résulte probablement d'un transfert d'acyle O-N intramoléculaire, les résultats de docking suggérant

Identification des règles de régio- et de chimio-sélectivité pour l'acylation de peptides catalysée par CALB en solvant organique.

la possibilité d'une O-acylation de la chaîne latérale de la sérine tandis que l'amine N-terminale semble inaccessible aux résidus catalytiques. Les simulations effectuées ne permettent pas de mettre en évidence ce genre de transfert. Il est donc possible que la chaîne latérale de la sérine soit acylée par l'intermédiaire du mécanisme « proton navette ». Toutefois, cette O-acylation peut être masquée soit par le transfert d'acyle évoqué précédemment, soit par l'hydrolyse immédiate des liaisons esters à peine formées, rendant impossible la détection des produits O-acylés. Dans le cas des peptides présentant une sérine en position C-terminale (Lys-Ser, Lys-Tyr-Ser) aucun produit O-acylé n'est obtenu expérimentalement. Des travaux antérieurs suggéraient une diminution de la réactivité de la fonction hydroxyle de la chaîne latérale de la sérine due à la présence de la fonction C-terminale (effet électro-attracteur diminuant le caractère nucléophile et donc la réactivité de la fonction hydroxyle). Les résultats de docking quant à eux évoquent plutôt l'orientation des peptides par rapport aux résidus catalytiques pour expliquer l'absence de O-acylation au niveau de la chaîne latérale de la sérine.

Pour aller plus loin dans la compréhension de la sélectivité de CALB, des études complémentaires doivent être menées.

Dans un premier temps, des dynamiques moléculaires doivent être réalisées sur les complexes résultant du docking des peptides dans la cavité de l'acyl-enzyme pour étudier le comportement dynamique de la cavité et des substrats de la réaction. Le site actif de CALB est décrit comme profond et étroit mais il est aussi flexible et plastique. Des motifs des parois du site actif limitant le placement des substrats (comme le "sabot" identifié précédemment) pourraient par exemple s'effacer au cours du temps, laissant davantage de liberté aux substrats pour se placer.

Dans un deuxième temps, un criblage de molécules polyfonctionnelles de diverses structures doit être réalisé sur l'acyl-enzyme afin d'apporter plus d'informations quant aux restrictions induites par la forme du site actif. Il serait intéressant par exemple de tester des peptides modifiés contenant soit une lysine classique, soit une lysine portant un groupement hydroxyle sur la chaîne latérale.

Dans un troisième temps, il paraît primordial d'étudier expérimentalement la faisabilité de l'acylation de la chaîne latérale de la sérine. Un procédé permettant de travailler dans des conditions quasi-anhydres permettrait de limiter l'hydrolyse des liaisons esters éventuellement formées et de conclure ainsi sur la formation ou non de produits O-acylés.



Enfin, le phénomène de transfert d'acyle O-N intramoléculaire évoqué dans ce travail et suggéré précédemment par d'autres auteurs mériterait d'être approfondi. Une étude théorique impliquant des calculs quantiques pourrait notamment être entreprise pour vérifier la faisabilité d'un tel transfert au sein des structures. Seules des hypothèses ont été formulées jusqu'ici ; une telle étude constituerait sans doute une avancée scientifique significative.

L'association d'une étude de modélisation à une étude expérimentale a permis de mieux appréhender les règles de sélectivité de CALB au point de prévoir ses potentialités d'acylation pour des peptides de structures diverses.

CALB reste cependant une enzyme difficile à utiliser pour l'acylation de peptides. En effet, sa grande sélectivité et surtout l'insolubilité des molécules polaires en solvant organique constituent des freins à son utilisation en tant que biocatalyseur au sein de procédés de synthèse de peptides acylés.

Il existe en revanche, d'autres enzymes telles que des acylases qui permettent de s'affranchir de certains verrous. En effet, les acylases sont des enzymes qui, d'une part, catalysent, l'acylation en milieux aqueux, et, d'autre part, qui possèdent une spécificité d'acylation favorable à la synthèse d'une liaison amide entre des acides aminés et une chaîne grasse en milieux aqueux (Koreishi *et al.*, 2005a, 2005b, 2006, 2009a). La suite des travaux s'intéressera à la production de tels biocatalyseurs.



**CHAPITRE 2 : RECHERCHE DE NOUVELLES  
PROTEINES DE TYPE AMINOACYLASES  
PRODUITES PAR *STREPTOMYCES*.**

---

## **1 Recherche d'enzymes capables de catalyser l'acylation de peptides en milieu aqueux.**

Différentes acylases ont été mises en évidence dans des surnageants de culture de *S. mobaraensis* (Koreishi *et al.*, 2005a, 2005b, 2006, 2007, 2009a, 2009b; Zhang *et al.*, 2007). Parmi ces acylases, une  $\epsilon$ -lysine acylase (N-acyl-L-lysine amido-hydrolase; EC 3.5.1.17) monomérique d'une masse de 60 kDa a été décrite puis caractérisée (Koreishi *et al.*, 2005a). Cette enzyme catalyse spécifiquement l'hydrolyse de la liaison amide de plusieurs N- $\epsilon$ -acyl-L-lysines et permet également l'acylation de la chaîne latérale de la lysine avec des acides gras ou des groupements aromatiques en tampon aqueux. Cette description d'enzymes catalysant l'acylation d'acides aminés en milieux aqueux est très intéressante pour l'acylation de biomolécules telles que les peptides. Elles permettent non seulement de s'affranchir de l'utilisation de solvants organiques souvent toxiques mais aussi une meilleure dissolution dans le milieu réactionnel, les peptides étant des molécules souvent polaires. L'utilisation des acylases de *S. mobaraensis* est protégée par un brevet (Takakura *et al.*, 2010). Des activités aminoacylases similaires ont donc été recherchées dans des surnageants de culture de *S. ambofaciens* et de *Streptomyces pristinaespiralis*, dans le but de rechercher des activités enzymatiques permettant l'acylation de peptides en milieu aqueux.

### **1.1 Etude de l'activité hydrolytique des surnageants de culture de *S. ambofaciens* et de *S. pristinaespiralis*.**

Les souches de *S. ambofaciens* ATCC 23877 et de *S. pristinaespiralis* pr11 (Corvini *et al.*, 2004) ont été mises en culture pendant 7 jours. Les protéines excrétées au cours de la culture ont été concentrées et semi-purifiées pour évaluer leur capacité à hydrolyser la lysine N-acétylée qui servira de réaction enzymatique de référence dans la suite de cette étude. Cette réaction évalue l'activité aminoacylase des surnageants de culture pour l'hydrolyse de la N-acétyl-lysine, laquelle est acétylée soit sur le groupement amine en position N-terminale, N- $\alpha$ -acétyl-L-lysine, soit sur le groupement amine porté par le dernier carbone de la chaîne latérale de la lysine, N- $\epsilon$ -acétyl-L-lysine (Figure 50).

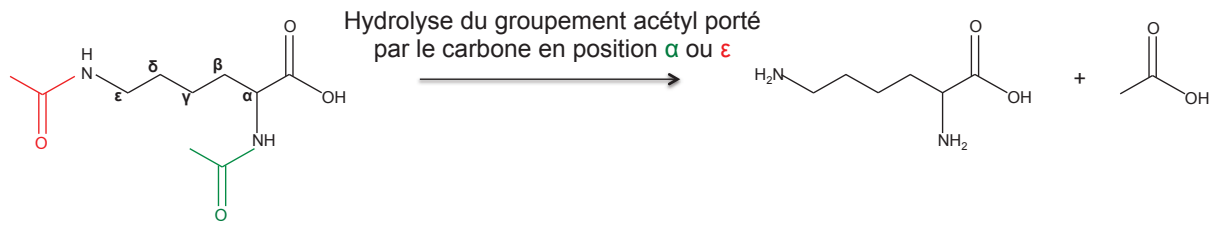


Figure 50 : Réaction d'hydrolyse de N- $\alpha/\epsilon$ -acétyl-L-lysine

Les réactions d'hydrolyse ont été réalisées selon les conditions décrites par Koreishi *et al.* (2005b) : 4 mM de N- $\epsilon$ -acétyl-lysine ou de N- $\alpha$ -acétyl-lysine sont dilués dans du tampon Tris-HCl 25 mM, NaCl 50 mM (pH 8). Les extraits protéiques concentrés issus des cultures de *S. ambofaciens* ou de *S. pristinaespiralis* sont ajoutés (correspondant à  $t_0$ ) et la réaction se déroule à 37°C pendant 24 h. Les résultats sont analysés par CCM où une révélation à la ninhydrine permet de mettre en évidence les molécules ayant une ou plusieurs fonctions amines libres. En l'absence d'extraits protéiques issus des surnageants, aucune hydrolyse des substrats n'est observée (Figure 51).

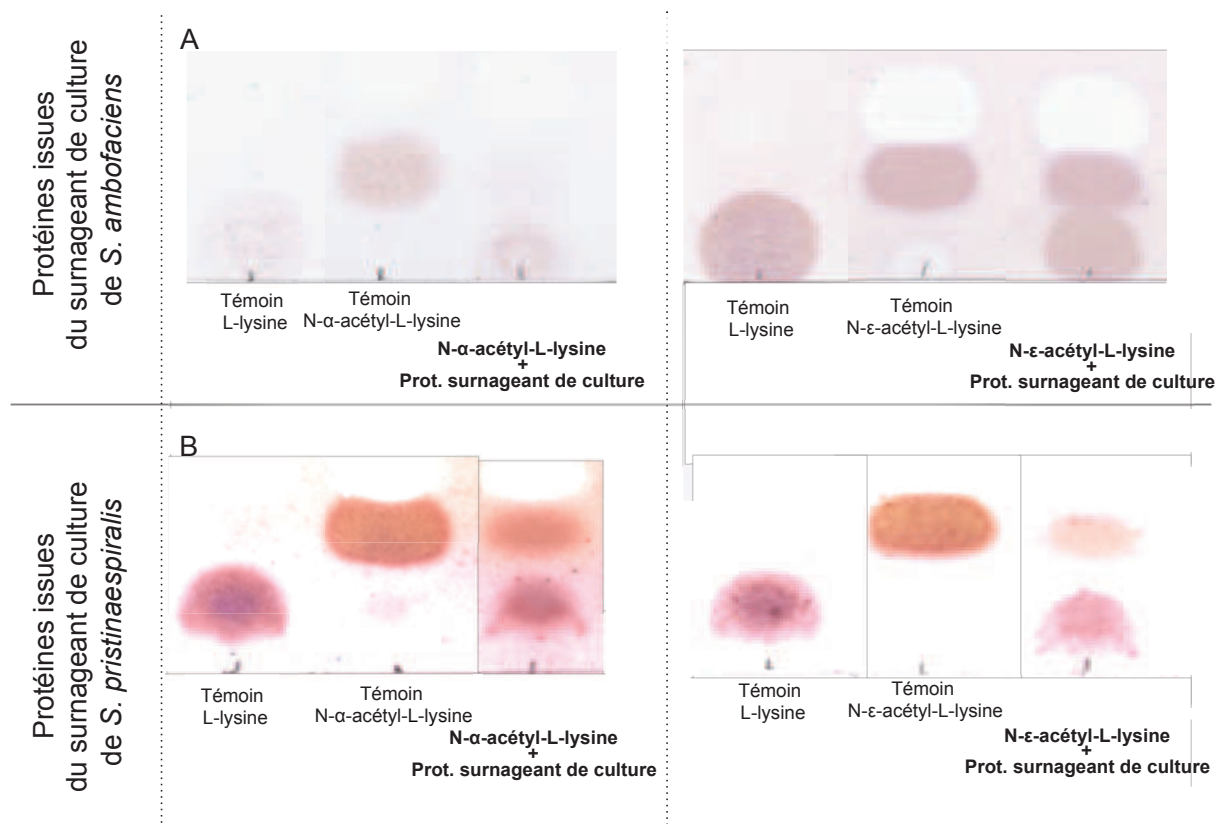


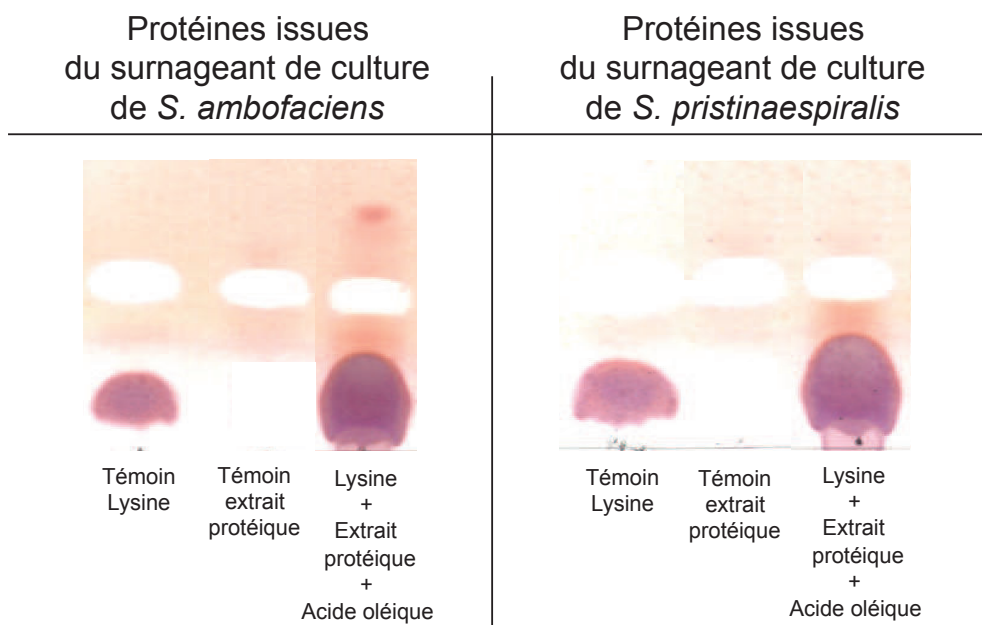
Figure 51 : Hydrolyse de N- $\alpha/\epsilon$ -acétyl-L-lysine par les protéines issues des surnageants de culture de *S. ambofaciens* (A) et de *S. pristinaespiralis* (B) après 24 h de réaction à 37°C.

Les résultats de ces hydrolyses montrent que comme pour *S. mobaraensis*, une activité hydrolytique aminoacylase est retrouvée dans les surnageants des deux espèces testées (Figure 51).

L'intensité des taches révélées par la ninhydrine indiquent que les activités hydrolytiques aminoacylases de *S. ambofaciens* et *S. pristinaespiralis* semblent plus importantes vis-à-vis de la lysine acétylée en  $\alpha$  que de celle acétylée en  $\epsilon$ . L'équipe de Koreishi *et al.*, (2005b) a également étudié l'activité aminoacylase d'une des enzymes purifiées du surnageant de culture de *S. mobaraensis* concernant l'hydrolyse de l' $\epsilon$ -acétyl-lysine et d'acides aminés N- $\alpha$ -acétylés en milieu aqueux tamponné. Il a été montré que Sm-eLA, issue de la culture de *S. mobaraensis* catalysait l'hydrolyse de la N- $\epsilon$ -acétyl-lysine (3370 U/mg d'enzyme Sm-eLA) ainsi que l'hydrolyse de la N- $\alpha$ -acétyl-lysine mais dans une moindre mesure (72 U/mg d'enzyme Sm-eLA). Une enzyme similaire pourrait donc être produite par *S. ambofaciens* et *S. pristinaespiralis*, celle-ci aurait une activité hydrolytique plus forte pour la catalyse de groupements acétyl portés par le carbone  $\alpha$  que par le carbone en position  $\epsilon$ .

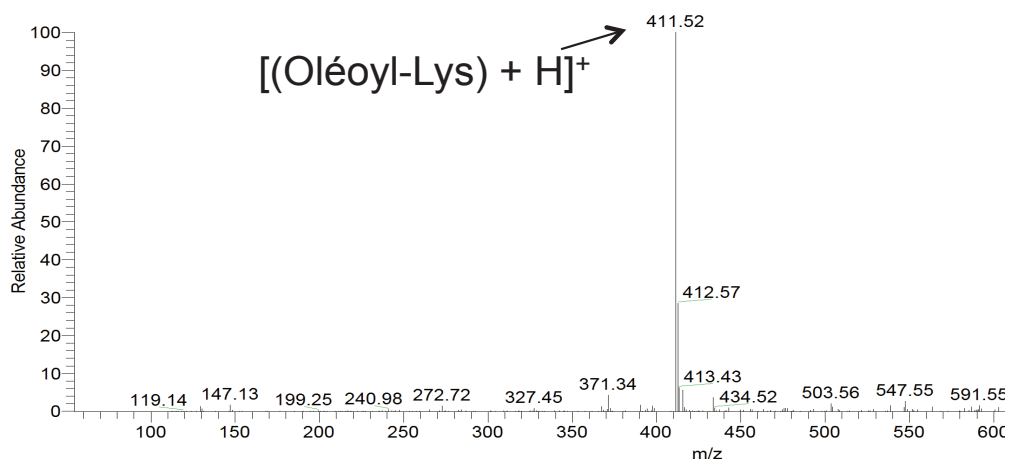
## 1.2 Etude de l'activité de synthèse d'acyl-lysine par des surnageants de culture de *S. ambofaciens* et de *S. pristinaespiralis*.

Des synthèses de lysine acylée avec de l'acide oléique (10 mM) ont été réalisées à partir de L-lysine (5 mM) avec les extraits protéiques issus des cultures des deux espèces bactériennes. Les réactions suivent les conditions décrites par Koreishi *et al.* (2005b) ; le milieu réactionnel est constitué de tampon Tris-HCl 50 mM, pH 8 et la réaction se déroule à 45°C pendant 4 jours. Les extraits issus des surnageants de culture de *S. ambofaciens* et de *S. pristinaespiralis* ont été ajoutés au volume réactionnel à hauteur de 25% (v/v). Les prélèvements au cours du temps ont été analysés qualitativement par CCM. Une révélation à la ninhydrine a permis de mettre en évidence la lysine ainsi que des tâches intenses ( $R_f = 0,6$ ) apparaissant seulement pour les synthèses catalysées par les extraits protéiques de *S. ambofaciens* (Figure 52).



**Figure 52 : Synthèse de N-oléoyl-L-lysine par les protéines issues du surnageant de culture de *S. ambofaciens* et *S. pristinaespiralis* après 96 h de réaction à 45°C.**

Ces produits étant révélés par la ninhydrine possèdent par conséquent une fonction amine libre. Ces molécules sont donc des lysines mono-acylées. Aucun spot n'apparaît concernant les réactions contenant les extraits protéiques issus du surnageant de culture de *S. pristinaespiralis* : aucune acylation de la lysine ne semble donc être catalysée. Aucune tache n'apparaît non plus dans les témoins négatifs contenant uniquement les extraits protéiques sans lysine. Une analyse par LC-MS-MS révèle que seuls les échantillons issus de la réaction d'acylation en présence de l'extrait protéique du surnageant de culture de *S. ambofaciens* présentent un pic de masse molaire moléculaire de 411 g.mol<sup>-1</sup> caractéristique de la molécule oléoyl-lysine. (Figure 53).



**Figure 53 : Analyse par spectrométrie de masse avec fragmentation de la molécule acylée formée par les protéines issues du surnageant de culture de *S. ambofaciens* (45°C pendant 72 h).**

Par contre, aucun pic n'est détecté pour la synthèse réalisée avec le surnageant de culture de *S. pristinaespiralis*. Par ailleurs, aucun pic de masse molaire moléculaire de 675 g.mol<sup>-1</sup> caractéristique de la molécule di-oléoyl-lysine n'a été détecté pour les deux réactions.

Le surnageant de culture de *S. ambofaciens* possède donc une activité de type aminoacylase capable de catalyser la synthèse de lysine acylée avec une chaîne oléoyle en milieu aqueux tamponné. La conversion n'est cependant pas totale après 72 h, la présence d'une tache de lysine sur la plaque de CCM indique une concentration de lysine résiduelle. L'équipe de Koreishi *et al.* (2005b) a fait des analyses similaires avec une enzyme purifiée issue du surnageant de culture de *S. mobaraensis*. Un rendement de 100% avait été obtenu pour la synthèse de lauroyl-lysine, myristoyl-lysine et décanoïl-lysine. Ce rendement élevé peut être expliqué par une solubilité plus élevée de ces acides gras et surtout par la pureté de l'enzyme utilisée. En effet, les extraits protéiques issus des surnageants de culture de *S. ambofaciens* ou *S. mobaraensis* ne sont probablement pas constitués uniquement de protéines à activité aminoacylases.

Le surnageant de *S. ambofaciens* étant le seul à présenter une activité aminoacylase capable de catalyser l'acylation d'acide aminé en milieu aqueux tamponné, la suite de l'étude se focalise sur la production et la caractérisation des potentialités d'acylation de ces protéines. La souche utilisée dans la suite de l'étude est alors *S. ambofaciens* ATCC 23877.

### 1.3 Conditions de cultures de *S. ambofaciens*



Différentes conditions de cultures ont été évaluées en vue de déterminer celles qui permettront une production maximale de protéines à activité enzymatique de type aminoacylase. Les deux paramètres de culture qui ont été étudiés sont la nature du milieu nutritif et la durée de la culture. L'étude des effets de ces 2 paramètres a été réalisée par l'évaluation des capacités hydrolytiques vis-à-vis de N- $\alpha/\epsilon$ -acétyl-L-lysine décrit ci-dessus (Figure 50). La mesure de l'activité d'hydrolyse a été préférée à celle de synthèse pour des raisons de rapidité réactionnelle : la phase stationnaire de conversion est atteinte au bout de 24 h pour les réactions d'hydrolyse de N- $\alpha/\epsilon$ -acétyl-L-lysine contre 72 h pour les réactions de synthèse d'acyl-acides aminés. De plus, ce choix semble faire consensus dans la littérature pour caractériser les activités aminoacylases (Koreishi *et al.*, 2005a, 2005b, 2009a; Wada *et al.*, 2002).

### 1.3.1 Sélection d'un milieu de culture pour la production de protéines de type aminoacylase par *S. ambofaciens*.

Le milieu utilisé pour la culture de *S. ambofaciens* est celui développé par Koreishi *et al.*, (2005a) pour la production d'une  $\epsilon$ -lysine acylase de *S. mobaraensis*. Ce milieu complexe contient des particules insolubles et génère beaucoup de mousse ce qui peut limiter les transferts gazeux et de substrats lors des cultures. D'autres milieux moins complexes ont été étudiés et comparés à celui de Koreishi. Ces différents milieux sont utilisés pour des cultures standard de bactérie ou pour d'autres espèces de *Streptomyces* en vue de produire des métabolites d'intérêt (Tableau 37).

**Tableau 37 : Milieux testés pour la culture de *S. ambofaciens*.**

Nom des milieux testés	Métabolites produits	Microorganismes.	Références
Milieu basal	Transglutaminase	<i>Streptomyces</i> sp. P20	Macedo <i>et al.</i> , (2007)
Milieu Czapek-Dox Yeast Extract	Antifongiques et antibactériens	<i>Streptomyces</i> sp. 201	Thakum <i>et al.</i> , (2009)
Bouillon nutritif	Antifongiques et dermatophytes	<i>Streptomyces</i> sp. ERI-04	Valanarasu <i>et al.</i> , (2010)

Des cultures de *S. ambofaciens* ont été réalisées dans ces différents milieux et les activités hydrolytiques des protéines extraites ont été évaluées et comparées. L'ensemencement des milieux a été fait à partir de la même pré-culture et les cultures ont été menées pendant 7 jours. Des prélèvements ont été effectués à 1, 3, 5 et 7 jours et la teneur en protéines de ces échantillons a été quantifiée. La capacité hydrolytique des surnageants des milieux de culture a été calculée pour les prélèvements les plus concentrés en protéines. Pour chacun de ces milieux, la concentration la plus élevée de protéines a été atteinte à 7 jours de culture. Pour chaque hydrolyse, les substrats N- $\alpha/\epsilon$ -acétyl-L-lysine (4 mM) ont été dissous dans un volume de 1,7 mL de Tris-HCl 25mM, NaCl 50 mM, (pH=8). Un volume de 0,3 mL de protéines concentrées du surnageant de culture a ensuite été ajouté au milieu réactionnel. La réaction d'hydrolyse a été réalisée pendant 24 h à 37°C. Les activités spécifiques d'hydrolyse ont été calculées pour chaque surnageant de culture afin de comparer les activités enzymatiques présentes dans les différents milieux (Tableau 38).

**Tableau 38 : Comparaison de la teneur en protéines et de l'activité spécifique d'hydrolyse du surnageant de différentes cultures de *S. ambofaciens*.**

Milieux de culture	Protéines (g.L <sup>-1</sup> )	Activité spécifique d'hydrolyse à 24h (mmol lysine.h <sup>-1</sup> .g de protéines <sup>-1</sup> )	
		$\alpha$	$\epsilon$
Milieu basal (Macedo et al, 2007)	0,61	0,03	0,002
Milieu Czapeck-Dox-Yst Ext (Thakur et al, 2009)	0,07	0	0
Bouillon nutritif	0,26	0,02	0,004
Milieu Koreishi (Koreishi et al, 2005)	0,45	0,15	0,02

La comparaison des différentes activités spécifiques d'hydrolyse des milieux montre que celui développé par Koreishi et son équipe est le plus performant, avec une concentration en protéine de 0,45 g.L<sup>-1</sup> après 7 jours de culture et des activités enzymatiques spécifiques d'hydrolyse plus élevées que celles obtenues dans les autres milieux. Le milieu de culture développé par Koreishi et son équipe a donc été conservé pour la suite de l'étude.

### 1.3.2 Recherche du temps optimal de culture de *S. ambofaciens* pour la production de protéines ayant une activité aminoacylase.

Le temps de culture de *S. ambofaciens* défini avec le milieu de Koreishi *et al.* (2005b) est de 7 jours. C'est en effet après une semaine de culture que la concentration protéique du milieu est la plus forte, ce qui laisse penser que c'est également le temps de culture nécessaire pour obtenir l'activité aminoacylase la plus importante. Cependant, un suivi morphologique des cellules par observation microscopique montre, qu'en fin de culture, les pelotes de mycélium perdent leur intégrité pour ne redevenir que des enchevêtrements de filaments. Cette observation suggère un début de lyse cellulaire qui pourrait expliquer la teneur en protéines maximale à 7 jours de culture si une lyse cellulaire engendre une libération de protéines intracellulaires en fin de culture. Les protéines alors relarguées dans le milieu n'ayant pas toutes une activité aminoacylase, peuvent occasionner une diminution de l'activité spécifique aminoacylase. Il convient alors de définir la durée de culture pour laquelle le ratio protéine de type aminoacylase/ protéines du surnageant est le plus grand. Pour ce faire, les activités spécifiques d'hydrolyse ont été mesurées dans des surnageants de culture après 1, 3, 5 et 7 jours de culture (Figure 54).

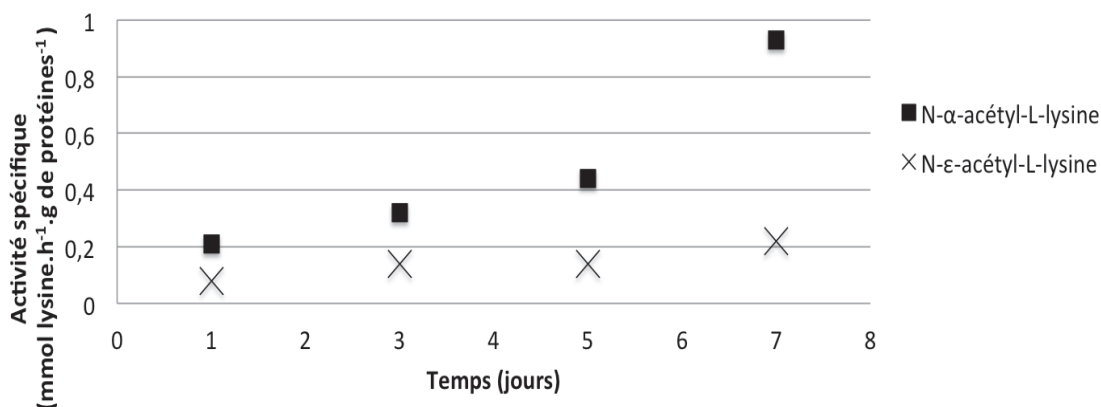


Figure 54 : Activité spécifique d'hydrolyse de N-α/ε-acétyl-L-lysine du surnageant de culture de *S. ambofaciens* au cours du temps.

Il apparaît que c'est à 7 jours que l'activité spécifique d'hydrolyse du surnageant de culture est la plus importante avec une activité spécifique vis-à-vis de l'α-acétyl-L-lysine de 0,93 mmol lysine.h<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup> de protéines et une activité spécifique contre l'ε-acétyl-L-lysine de 0,22 mmol lysine.h<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup> de protéines. Cette activité maximale peut s'expliquer par une production

d'enzyme continue au cours de la culture par la bactérie filamenteuse, la tendance générale de la courbe de l'activité spécifique au cours du temps ayant un profil croissant. Une autre possibilité serait que cette activité spécifique soit accrue par un relargage de protéine intracellulaire lié à la lyse décrite ci-dessus. Pour vérifier cette hypothèse, la biomasse récoltée à 7 jours a été lavée plusieurs fois, centrifugée puis lysée par presse de French. Les protéines issues de ce lysat de *S. ambofaciens* ont été précipitées puis concentrées et les activités spécifiques d'hydrolyse pour les substrats N- $\alpha$ / $\epsilon$ -acétyl-L-lysine ont été calculées (Tableau 39)

**Tableau 39 : Comparaison d'activités spécifiques d'hydrolyse de N- $\alpha$ / $\epsilon$ -acétyl-L-lysine entre le surnageant de culture *S. ambofaciens* à 7 jours de culture et un lysat de *S. ambofaciens* à partir de cellules obtenues à 7 jours de culture.**

Substrat	Activité spécifique d'hydrolyse (mmol lysine.h <sup>-1</sup> .g de protéine <sup>-1</sup> )	
	Extrait protéique issu du surnageant de culture de <i>S. ambofaciens</i>	Extrait protéique issu du lysat de <i>S. ambofaciens</i>
N- $\alpha$ -acétyl-L-lysine	0,93	1,95
N- $\epsilon$ -acétyl-L-lysine	0,22	0,58

Il en résulte que les protéines du lysat de *S. ambofaciens* ont une activité spécifique enzymatique environ 2 fois plus élevée que les protéines présentes dans le surnageant de culture. Les protéines ayant une activité aminoacylase semblent donc être en partie accumulées de manière intracellulaire et l'activité hydrolytique élevée observée à 7 jours de culture est probablement liée à une lyse cellulaire partielle.

#### 1.4 Étude de la purification partielle des enzymes de type aminoacylases de *S. ambofaciens*.

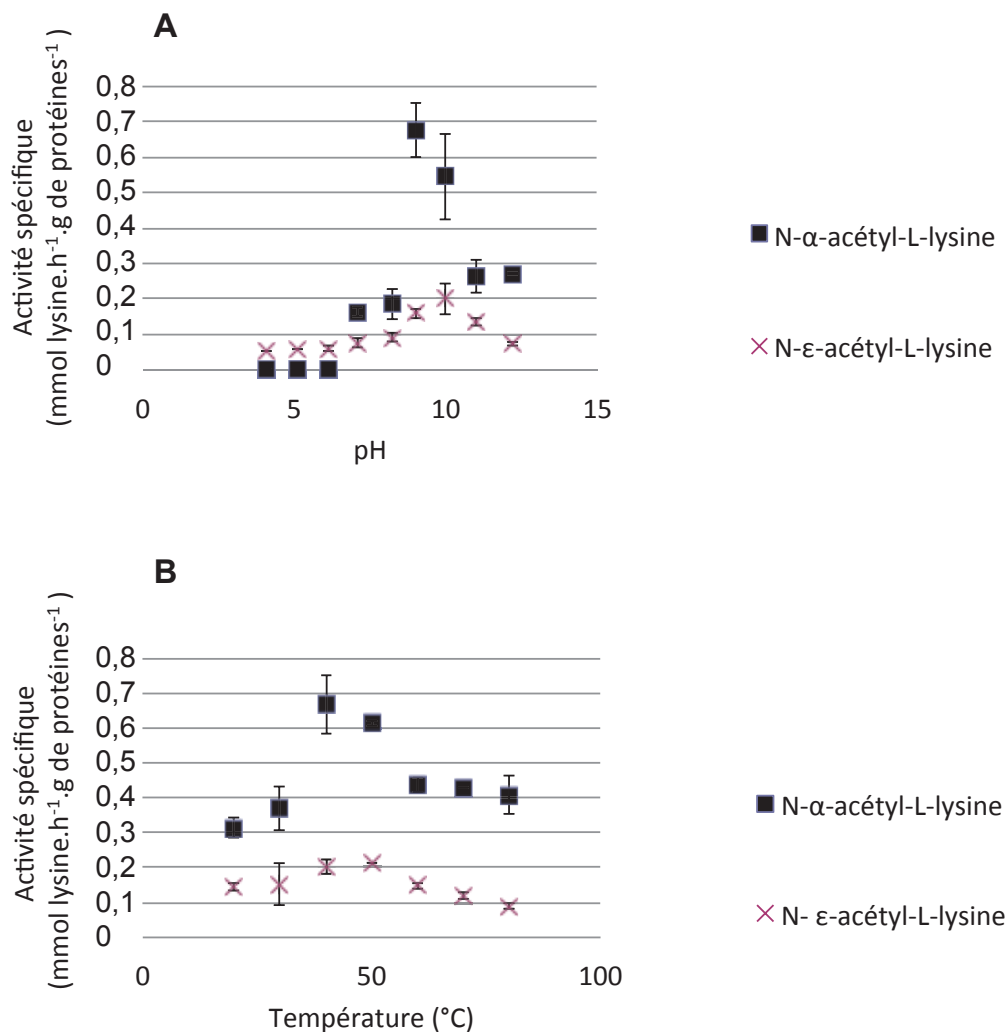
La purification partielle des extraits protéiques a été étudiée, en particulier l'étape de dialyse après précipitation des protéines : ainsi, différents tampons aqueux ont été comparés. Par ailleurs, les extraits ont été caractérisés et le couple pH/ température optimal pour l'activité hydrolytique de la N- $\alpha$  acétyl-lysine et de la N- $\epsilon$  acétyl-lysine a été déterminé.

#### 1.4.1 Etude de l'étape de dialyse : choix du tampon

Afin d'étudier l'activité aminoacylase des surnageants de culture de *S. ambofaciens*, les protéines produites au cours de la culture doivent être concentrées. Pour ce faire, une méthode a été développée à partir de celle utilisée par Koreishi *et al.* (2005b). A la fin de chaque culture, la biomasse est éliminée par centrifugation. Les protéines contenues dans le surnageant sont précipitées par ajout de sulfate d'ammonium à 60% de la saturation, puis re-suspendues dans un tampon aqueux à pH 8. Les sels et les petits peptides contenus dans la solution de protéines re-suspendues sont ensuite éliminés par dialyse avec une membrane dont le seuil de coupure est compris entre 12 et 14 kDa contre le même tampon aqueux. Enfin, la solution dialysée est concentrée par centrifugation dans des colonnes de concentration-diafiltration dont le seuil de coupure est de 10 kDa. Les conditions de dialyse pouvant avoir un effet néfaste sur le maintien des activités enzymatiques recherchées, notamment à travers des différences de solvation des protéines, plusieurs tampons aqueux ont été comparés. Le meilleur tampon permettant, par la suite, l'obtention d'une solution protéique catalysant l'hydrolyse des substrats N- $\alpha/\epsilon$ -acétyl-L-lysine avec les plus hauts taux de conversion est le tampon Tris-HCl 25 mM, NaCl 50 mM. Ce tampon sera utilisé dans le protocole de concentration des protéines produite par *S. ambofaciens* pour le reste de l'étude.

#### 1.4.2 Identification du couple pH/température optimal

Suite à l'élaboration d'un protocole de production et de concentration des protéines du surnageant de *S. ambofaciens*, le couple pH/température optimal d'hydrolyse a été déterminé. Différents pH (à 37°C) ainsi que différentes températures (à pH 8) ont été testés pour hydrolyser les substrats N- $\alpha/\epsilon$ -acétyl-L-lysine (Figure 55).



**Figure 55 : Identification du couple pH/température d'hydrolyse optimal des molécules N-α/ε-acétyl-L-lysine pour le surnageant de culture de *S. ambofaciens*. A : détermination du pH optimal ; B : détermination de la température optimale.**

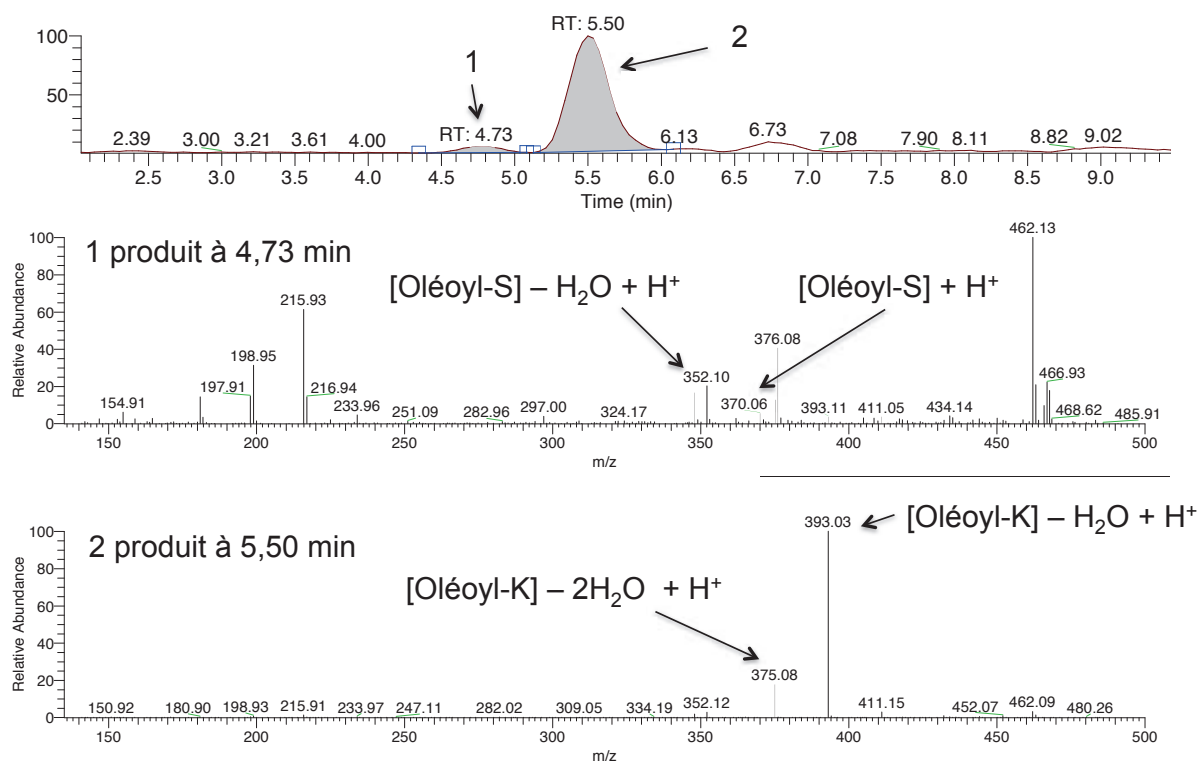
Les protéines produites par *S. ambofaciens* semblent avoir une activité aminoacylase avec une température optimale d'hydrolyse située entre 40 et 45°C et un pH optimal d'hydrolyse autour de 8 et 9 (Figure 55). Ce couple pH/température optimal sera utilisé pour les réactions d'hydrolyse et de synthèse pour la suite de l'étude.

## 1.5 Etude de la capacité de synthèse de peptides acylés des protéines issues de surnageants de culture de *S. ambofaciens* :

Une étude sur les spécificités d'acylation de peptides des enzymes issues du surnageant de culture *S. ambofaciens* a été réalisée dans le but de les comparer avec celles de CALB. Cette étude a pris pour base les peptides acylés par CALB présentés dans le chapitre précédent : Lys-Ser, Lys-Tyr-Ser, Ser-Tyr-Lys et Leu-Gln-Lys-Trp. Les réactions d'acylation sont réalisées à 45°C, à pH 8, pendant 72 heures dans du tampon TrisHCl 25mM, NaCl 50mM. Des extraits protéiques issus du surnageant de *S. ambofaciens* ATCC 23877 et concentrés à 22,1 g de protéine.L<sup>-1</sup> sont ajoutés à t<sub>0</sub> dans le volume réactionnel à hauteur de 10% en volume. Le rapport molaire entre donneur/accepteur d'acyle est de 2. Le donneur d'acyle utilisé pour toutes ces réactions est l'acide oléique.

### 1.5.1 Acylation de Lys-Ser :

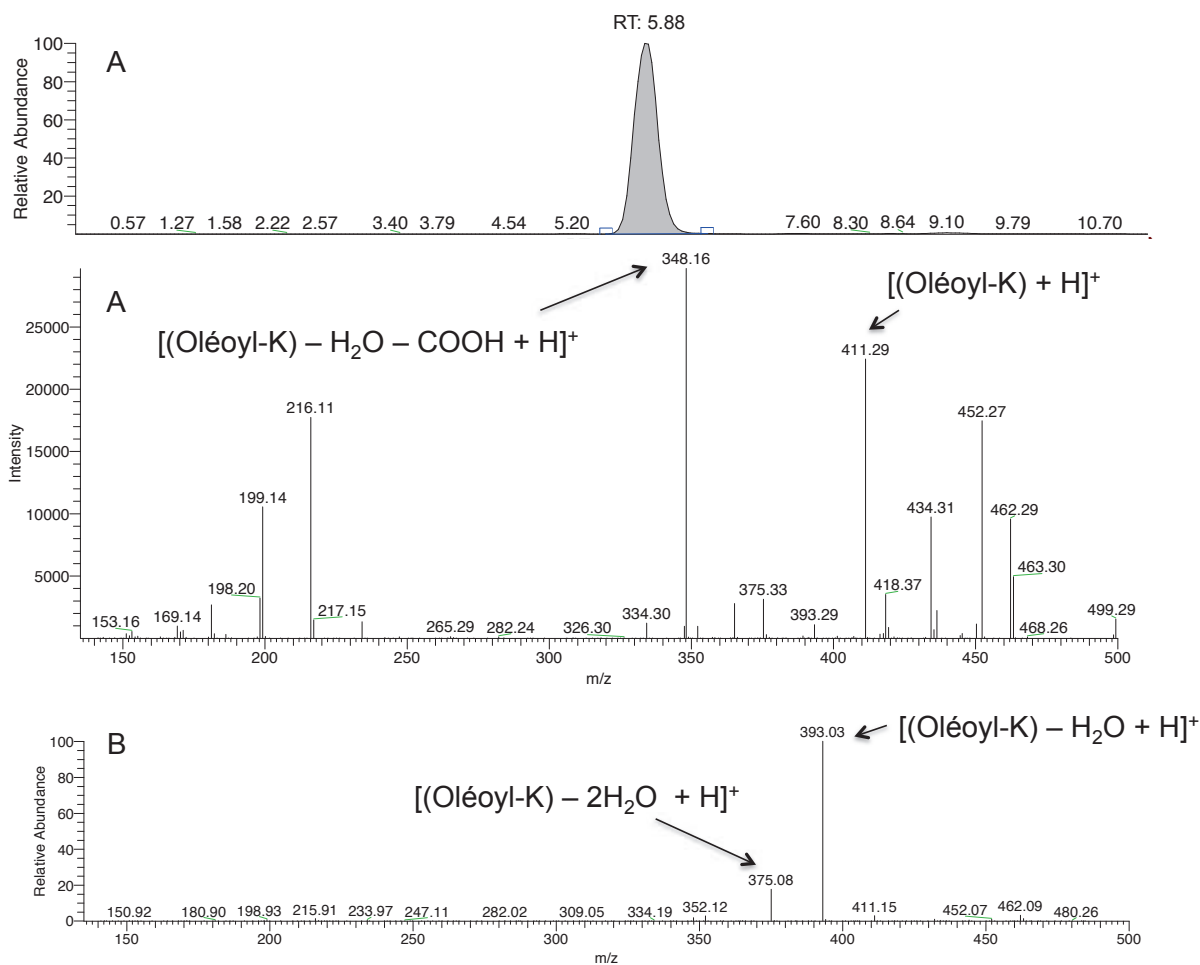
Comme mentionné précédemment, il existe trois sites d'acylation potentiels sur le peptide Lys-Ser : deux sur la lysine, et un sur la chaîne latérale de la sérine (Figure 33 A). L'analyse par chromatographie couplée à la spectrométrie de masse montre que l'acylation de Lys-Ser catalysée par les protéines du surnageant de culture de *S. ambofaciens* ATCC 23877 forme deux molécules mono-acylées (temps de rétention (RT) : 4,73 min et 5,5 min) (Figure 56). D'après l'analyse du profil MS<sup>2</sup>, le composé majoritairement formé (RT : 5,5 min) se fragmente en ions fils [(Oléoyl-K) – 2H<sub>2</sub>O + H<sup>+</sup>] (m/z = 375,08) et [(Oléoyl-K) – H<sub>2</sub>O + H<sup>+</sup>] (m/z = 393,03) identifiés comme de l'oléoyl-lysine. Ce composé majoritaire correspond donc au dipeptide acylé sur une des deux fonctions amines de la lysine. La molécule minoritaire (RT : 4,73 min) se fragmente, elle, en ions fils [(Oléoyl-S) – H<sub>2</sub>O + H<sup>+</sup>] (m/z = 352,10) et [(Oléoyl-S) + H<sup>+</sup>] (m/z = 370,06) identifiés comme de l'oléoyl-sérine. Ces ions fils sont donc générés à partir d'un dipeptide acylé sur la sérine (Figure 56).



**Figure 56** : Chromatogramme et spectre MS<sup>2</sup> après fragmentation d'oléoyl-Lys-Ser produit par les protéines issues du surnageant de culture de *S. ambofaciens* ATCC 23877. 1 : Oléoyl-Lys-Ser acylé sur la sérine, 2 : Oléoyl-Lys-Ser acylé sur la lysine.

Pour déterminer la régio-/chimio-sélectivité des enzymes testées, il est essentiel d'identifier quel groupement du peptide est acylé. Le produit minoritaire correspond à de l'oléoyl-sérine. La chaîne oléoyle est donc portée par le groupement hydroxyle de la chaîne latérale de la sérine. Pour le produit majoritaire correspondant à une acylation sur la lysine, deux acylations sont possibles sur les deux groupements amines de la lysine. Pour identifier le groupement acylé, une comparaison des temps de rétention et des profils MS<sup>2</sup> a été faite avec ceux obtenus pour le produit oléoyl-Lys-Ser formé par CALB et analysé par RMN (Husson *et al.*, 2009) qui correspond à du N-ε-oléoyl-Lys-Ser, portant la chaîne oléoyle sur le groupement amine du carbone en position ε de la lysine (Figure 57).





**Figure 57 : (A) Chromatogramme et spectre MS<sup>2</sup> après fragmentation d'oléoyl-Lys-Ser produit par CALB. (B) Spectre MS<sup>2</sup> issu de la fragmentation d'oléoyl-Lys-Ser acylé sur la lysine produit par les protéines issues du surnageant de culture de *S. ambofaciens* ATCC 23877.**

Les deux peptides acylés présentent des ions fils caractéristiques d'une acylation sur la lysine mais présentent des temps de rétention et des profils MS<sup>2</sup> différents. L'oléoyl-Lys-Ser synthétisé par l'extrait protéique produit par *S. ambofaciens* ATCC 23877 correspond donc à une acylation de l'autre site disponible de la lysine : le groupement amine situé sur le carbone  $\alpha$ .

Il est donc possible de différencier avec une chromatographie couplée à la spectrométrie de masse et à une fragmentation en ions fils, deux isomères de position lorsque l'isomérisation porte sur les groupements amines de la lysine. Cette distinction permet d'identifier des ions fils spécifiques d'une acylation de la lysine sur le carbone en position  $\epsilon$ , et ceux spécifiques d'une acylation sur le carbone en position  $\alpha$ . Ces ions fils spécifiques sont indiqués dans le Tableau 40.

**Tableau 40 : Molécules et masses molaires moléculaires correspondant aux ions fils caractéristiques d'une N-acylation du peptide Lys-Ser sur la lysine.**

Carbone portant l'amine acylé	Carbone $\alpha$	Carbone $\epsilon$
<b>Molécules caractéristiques et masses spécifiques associées (m/z)</b>	375 : [Oléoyl-lys] – 2H <sub>2</sub> O + H <sup>+</sup>	348 : [Oléoyl-lys] – H <sub>2</sub> O – COOH + H <sup>+</sup>
	393 : [Oléoyl-lys] – H <sub>2</sub> O + H <sup>+</sup>	411 : [Oléoyl-lys] + H <sup>+</sup>

Les protéines de *S. ambofaciens* ATCC 23877 catalysent donc une acylation majoritaire du groupement amine en position N-terminale du peptide Lys-Ser et de façon minoritaire le groupement hydroxyle porté par la chaîne latérale de la sérine. Cette spécificité d'acylation est remarquable pour deux raisons :

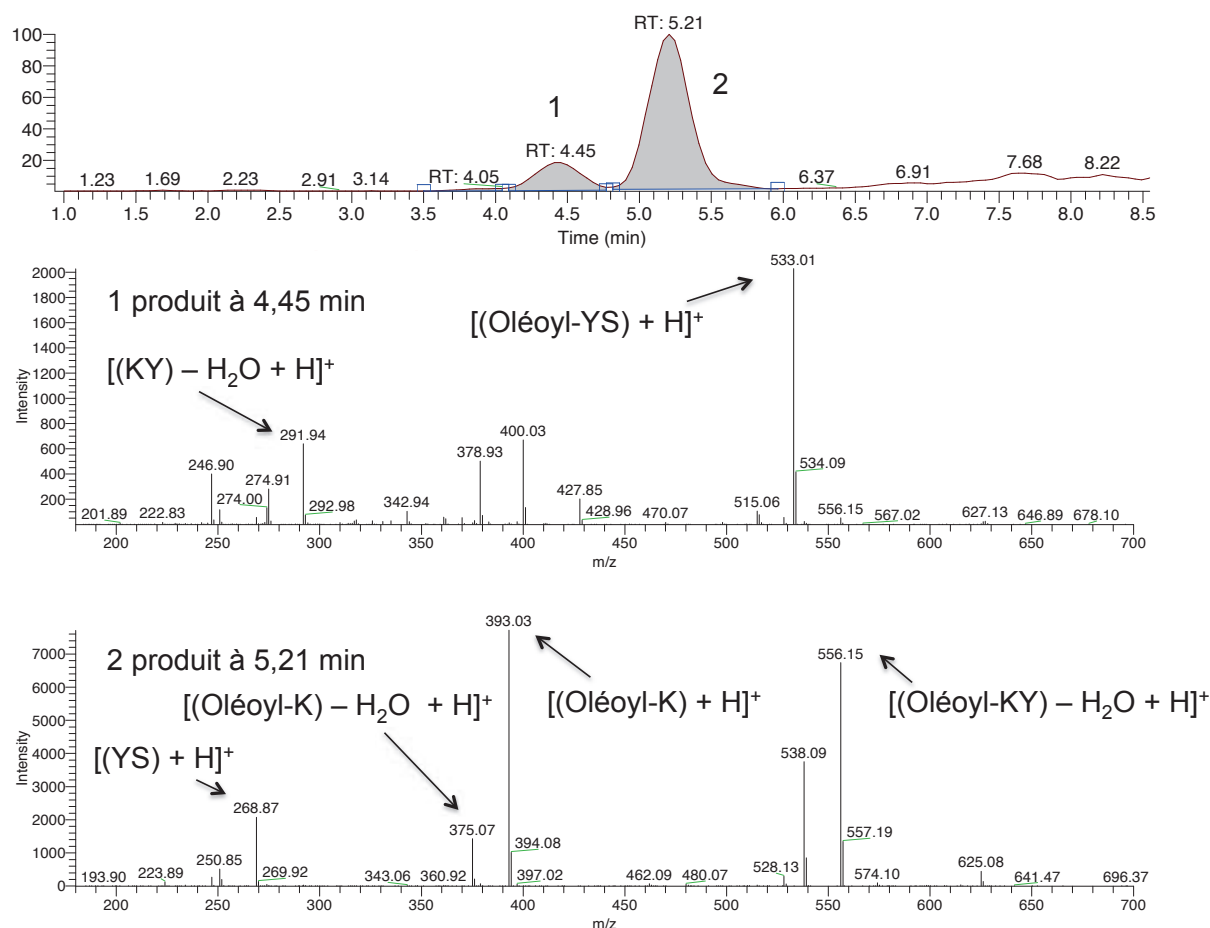
- elle apporte une possibilité supplémentaire d'acylation de Lys-Ser par rapport à celle de CALB, qui n'acyle spécifiquement que la chaîne latérale de la lysine,
- elle permettrait d'acyler sans distinction tous les peptides si cette spécificité est confirmée, car le groupement amine porté par le carbone  $\alpha$  est un élément constitutif universel de tous les peptides.

#### 1.5.2 Acylation de Lys-Tyr-Ser, Ser-Tyr-Lys et Leu-Gln-Lys-Trp par les protéines issues du surnageant de culture de *S. ambofaciens* ATCC 23877

Les réactions d'acylation des tripeptides Lys-Tyr-Ser et Ser-Tyr-Lys et du térapeptide Leu-Gln-Lys-Trp ont été menées dans les mêmes conditions que précédemment.

##### 1.5.2.1 Peptides Lys-Tyr-Ser et Ser-Tyr-Lys

L'acylation du peptide Lys-Tyr-Ser catalysée par les protéines du surnageant de culture de *S. ambofaciens* ATCC 23877 a mené à la formation de deux molécules (Figure 58).

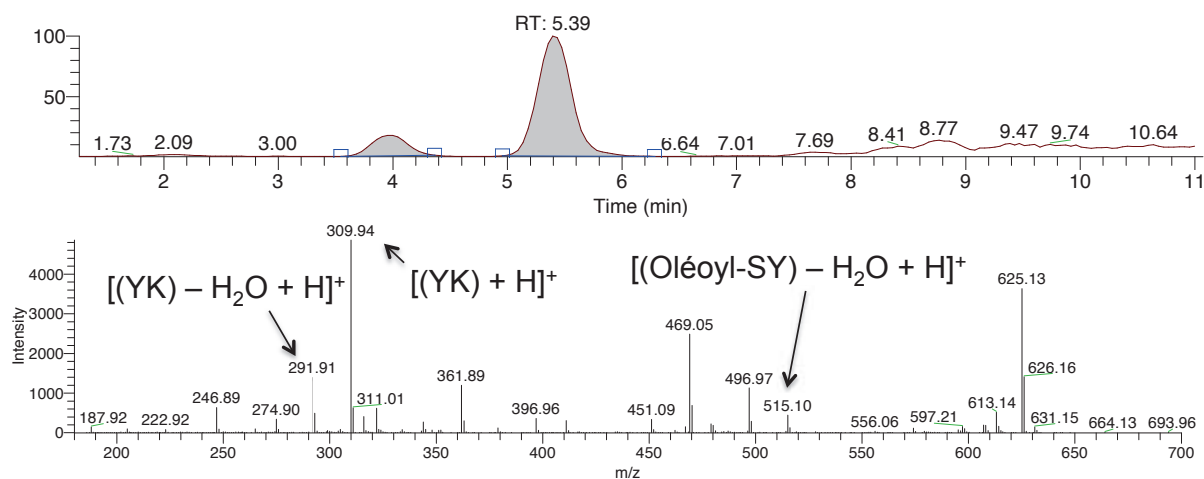


**Figure 58 : Chromatogramme et spectres MS<sup>2</sup> après fragmentation d'oléoyl-Lys-Tyr-Ser produit par les protéines issues du surnageant de culture de *S. ambofaciens* ATCC 23877. 1 : Spectre de masse des ions fils issus de la fragmentation du pic détecté à 4,45 min correspondant à de l'oléoyl-Lys-Tyr-Ser acylé sur la sérine, 2 : Spectre de masse des ions fils issus de la fragmentation du pic détecté à 4,45 min correspondant à de l'oléoyl-Lys-Tyr-Ser acylé sur la lysine.**

Le premier produit minoritairement formé présente un temps de rétention de 4,45 min et un profil MS<sup>2</sup> composé des ions fils  $[(KY) - H_2O + H]^+$  (m/z = 291,96) et  $[(Oléoyl-YS) + H]^+$  (m/z = 533,01). Ces ions fils sont identifiés comme résultant de la fragmentation du tripeptide KYS acylé sur le groupement hydroxyle de la sérine. Le deuxième produit majoritairement formé a un temps de rétention de 5,32 min et un profil MS<sup>2</sup> constitué des ions fils  $[(YS) - H_2O + H]^+$  (m/z = 268,87),  $[(Oléoyl-K) - H_2O + H]^+$  (m/z = 375,08),  $[(Oléoyl-K) + H]^+$  (m/z = 393,05) et  $[(Oléoyl-KY) - H_2O + H]^+$  (m/z = 556,11) identifiés comme issus de la fragmentation de l'oléoyl-Lys-Tyr-Ser acylé sur la lysine. Pour le produit majoritaire, deux de ses ions fils ont des masses m/z de 375 et de 393, identifiés précédemment comme caractérisant une acylation du groupement amine porté par le carbone  $\alpha$  de la lysine. Les protéines produites par *S. ambofaciens* ATCC 23877 sont donc bien capables de catalyser la

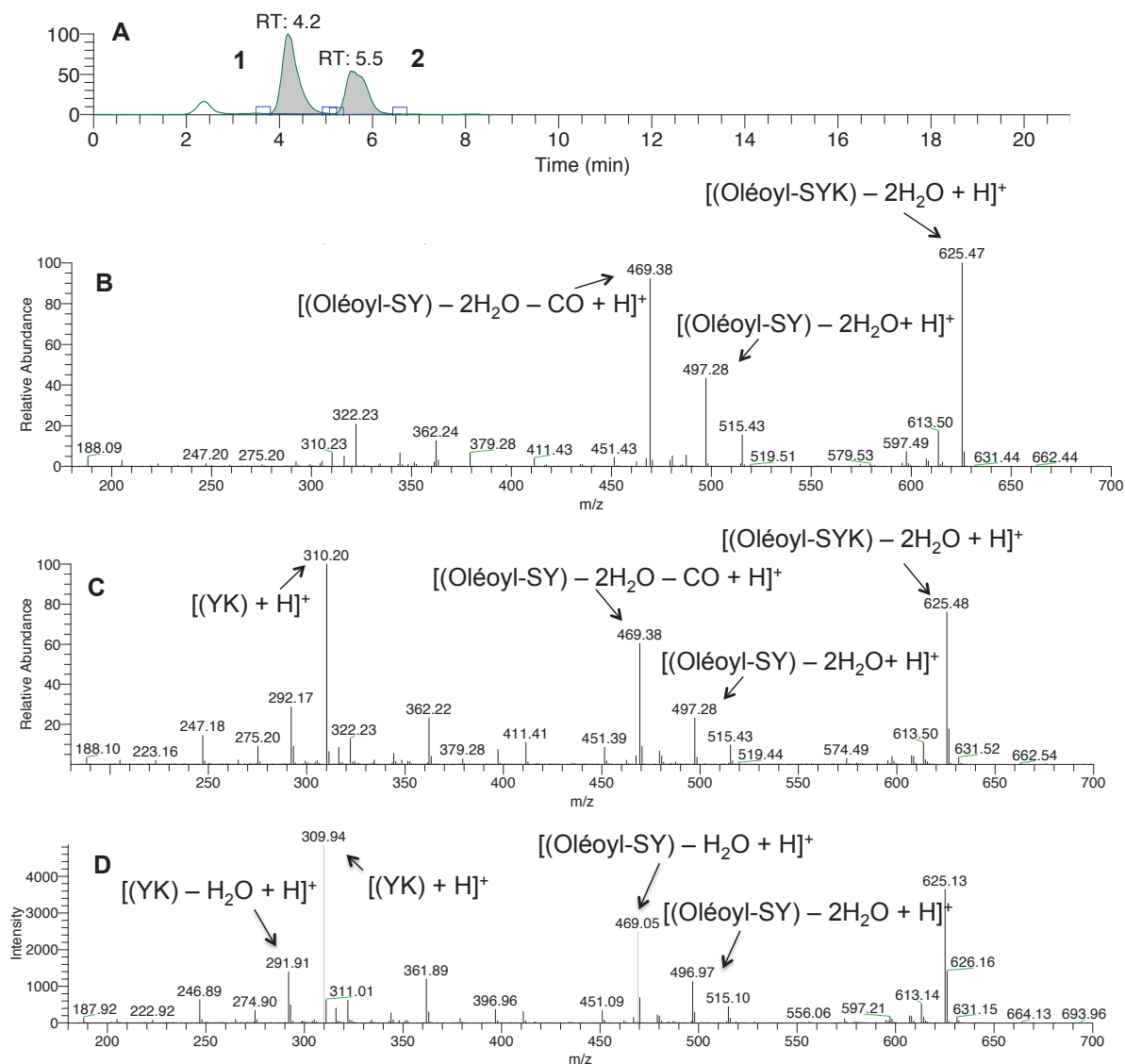
réaction d'acylation du peptide Lys-Tyr-Ser majoritairement sur le groupement amine porté par le carbone  $\alpha$  de la lysine et dans une moindre mesure, le groupement hydroxyle de la chaîne latérale de la sérine.

L'analyse des produits formés par l'acylation du peptide Ser-Tyr-Lys, a révélé la formation d'une seule molécule présentant un temps de rétention de 5,39 min (Figure 59).



**Figure 59 : Chromatogramme et spectre MS<sup>2</sup> après fragmentation d'oléoyl-Ser-Tyr-Lys produit par les protéines issues du surnageant de culture de *S. ambofaciens* ATCC 23877.**

L'analyse du profil MS<sup>2</sup> permet de montrer que l'acylation a lieu sur la sérine à travers la fragmentation du tripeptide acylé en ions fils  $[(YK) - H_2O + H^+]$  (m/z = 291,91),  $[(YK) + H^+]$  (m/z = 310) et  $[(Oléoyl-SY) - H_2O + H^+]$  (m/z = 515,09). Le fractionnement en ions fils de molécules standards synthétisées par voie chimiques de SYK acylés sur le groupement amine en position N-terminale ou sur le groupement hydroxyle porté par la chaîne latérale de la sérine génère deux profils MS<sup>2</sup> différents (Figure 60). Le fractionnement différent de ces isomères de position permet de distinguer une réaction d'acylation sur la fonction amine ou sur la fonction hydroxyle de la sérine.



**Figure 60** : Chromatogramme et spectres MS<sup>2</sup> de standards de Ser-N/O-oléoyl-Tyr-Lys. **A** : Chromatogramme d'un échantillon comprenant le standard Ser-O-oléoyl-Tyr-Lys (A, 1) et le standard Ser-O-oléoyl-Tyr-Lys (A, 2). **B** : Profil MS<sup>2</sup> du standard Ser-O-oléoyl-Tyr-Lys. **C** : Profil MS<sup>2</sup> du standard Ser-N-oléoyl-Tyr-Lys. **D** : Spectre MS<sup>2</sup> du composé oléoyl-Ser-Tyr-Lys obtenu expérimentalement avec l'extrait protéique issu du surnageant de culture de *S. ambofaciens* (C).

Comme démontré précédemment, les différences de temps de rétention et de profils MS<sup>2</sup> permettent de différencier les deux acylations possibles de la sérine pour le peptide Ser-Tyr-Lys.

Le spectre MS<sup>2</sup> issu de l'acylation du peptide sur la sérine par l'extrait protéique issu du surnageant de *S. ambofaciens* est identique à celui de l'étalon acylé sur le groupement amine porté par le carbone  $\alpha$  et les temps de rétention de ces deux molécules sont semblables (Figure 59). Les protéines produites par *S. ambofaciens* sont donc bien capables de catalyser

l'acylation de Ser-Tyr-Lys sur le groupement amine porté par le carbone  $\alpha$  de la sérine. La régio-sélectivité d'acylation pour ce groupement est donc confirmée. Le groupement amine des carbones  $\alpha$  des peptides n'est cependant pas le seul à être acylé ; le groupement hydroxyle de la chaîne latérale de la sérine l'est aussi pour les peptides Lys-Ser et Lys-Tyr-Ser, toutefois de manière très minoritaire. Seul Ser-Tyr-Lys n'est pas acylé sur la chaîne latérale de la sérine. Cette absence d'acylation peut être liée à un transfert intramoléculaire de la chaîne oléoyle vers le groupement amine de la sérine en position N-terminale. Cette migration intramoléculaire d'une chaîne acyle a déjà été observée en tampon aqueux légèrement alcalin avec des isopeptides portant aussi une sérine en position N-terminale (Sohma *et al.*, 2007). Mouis *et al.* (2004) observent également cette migration d'acyl lors de la synthèse de l'acyl-pentapeptide Ser-Phe-Leu-Leu-Arg avec de l'acide palmitique ou de l'acide octanoïque. Les protéines issues du surnageant de *S. ambofaciens* catalysent donc peut être l'acylation de la chaîne latérale de la sérine de Ser-Tyr-Lys, mais elle ne peut être observée probablement à cause d'un transfert d'acyle intramoléculaire sur le groupement amine.

#### 1.5.2.2 Peptide Leu-Gln-Lys-Trp :

Enfin, le térapeptide Leu-Gln-Lys-Trp a été acylé. Ce peptide possède une leucine en position N-terminale et est composé de deux acides aminés portant un groupement amine sur leur chaîne latérale : une lysine en troisième position et une glutamine en deuxième position. La réaction d'acylation est réalisée dans les mêmes conditions que précédemment et les analyses des produits ont mis en évidence la formation d'une seule molécule mono-acylée (Figure 61).

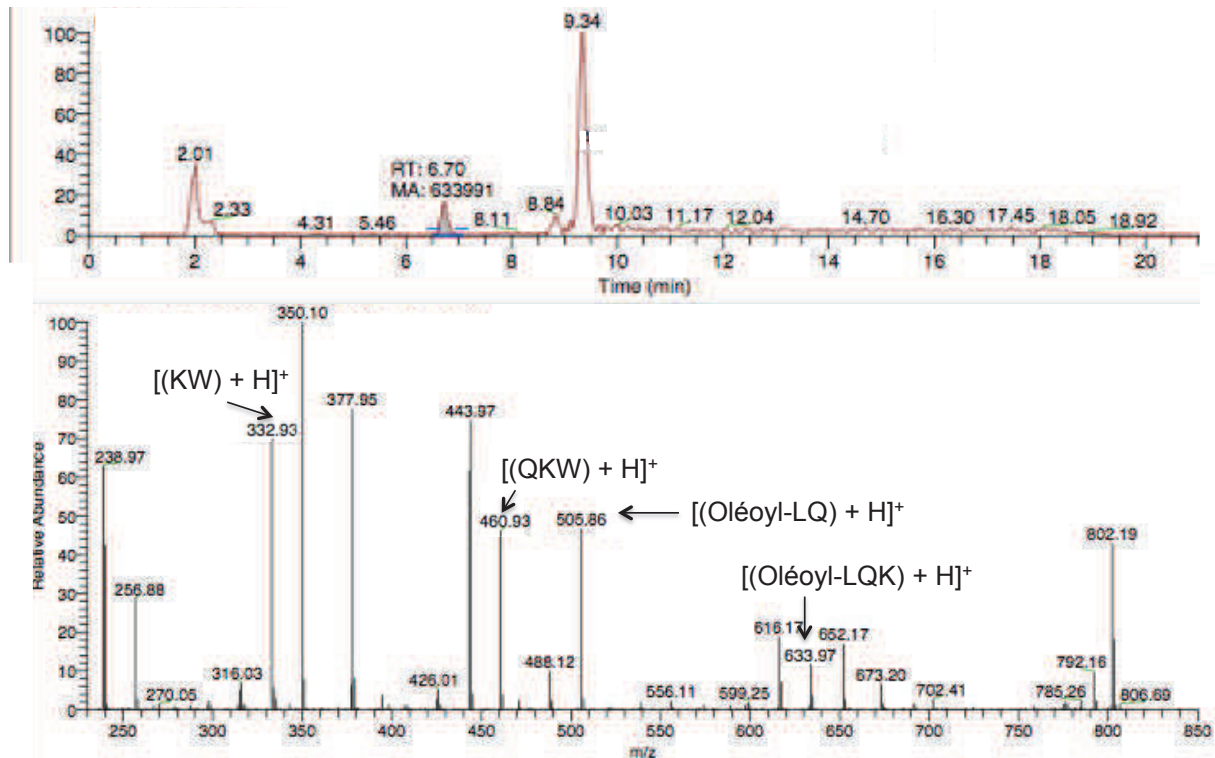


Figure 61 : Chromatogramme et spectre MS<sup>2</sup> après fragmentation d'oléoyl-Leu-Gln-Lys-Trp catalysée par les protéines issues du surnageant de culture de *S. ambofaciens* ATCC 23877.

L'analyse des ions fils [(KW) + H<sup>+</sup>], [(QKW) + H<sup>+</sup>], [(Oléoyl-LQ) + H<sup>+</sup>] et [(Oléoyl-LQK) + H<sup>+</sup>] de masses respectives m/z = 332.93, 460.93, 505.86 et 633.97 du spectre MS<sup>2</sup> correspondant au pic présentant un temps de rétention de 6,54 min permet l'identification de l'oléoyl-Leu-Gln-Lys-Trp acylé sur le groupement amine porté par le carbone  $\alpha$  de la leucine. Ces résultats confirment la sélectivité observée précédemment, à savoir une sélectivité de l'extrait protéique concentré de *S. ambofaciens* ATCC 23877 pour le groupement amine du peptide porté par le carbone en position  $\alpha$ .

Les résultats obtenus lors de l'acylation des peptides, Lys-Ser, Lys-Tyr-Ser, Ser-Tyr Lys et Leu-Gln-Lys-Trp permettent de mettre clairement en évidence la sélectivité des protéines de type aminoacylases produites par *S. ambofaciens* ATCC 23877. Ces dernières sont capables de catalyser l'acylation sélective du groupement amine en position N-terminale des peptides, indépendamment de la nature de l'acide aminé en position N-terminale. Bien qu'étant minoritairement acylé, le groupement hydroxyle de la chaîne latérale de la sérine est également un site d'acylation. Les protéines de type aminoacylases produites par *S. ambofaciens* ne possèdent donc pas de chimio-sélectivité stricte.

## 1.6 Comparaison des spécificités d'acylation des protéines de *S. ambofaciens* ATCC 23877 et de CALB.

Les résultats obtenus lors des acylations des peptides catalysées par CALB et par l'extrait protéique de *S. ambofaciens* sont synthétisés dans le Tableau 41.

L'extrait de *S. ambofaciens* ATCC 23877 est capable de catalyser l'acylation des groupements amines et hydroxyles. Toutefois, l'acylation de fonction amine n'a lieu que sur les groupements portés par les carbones  $\alpha$  des peptides. La chaîne latérale de la lysine n'est jamais acylée. CALB au contraire semble catalyser spécifiquement l'acylation du groupement amine porté par la chaîne latérale de la lysine. Le groupement amide de la chaîne latérale de la glutamine n'est acylé ni par CALB ni par les protéines de *S. ambofaciens* ATCC 23877. L'acylation de groupements hydroxyles par les protéines du surnageant de culture de *S. ambofaciens* ATCC 23877 s'effectue uniquement sur la chaîne latérale de la sérine lorsque celle-ci n'est pas placée en position N-terminale sur le peptide. Le groupement hydroxyle de la tyrosine n'est jamais acylé, probablement à cause de sa proximité avec un cycle aromatique. Aucune di-acylation n'a été détectée avec les protéines de *S. ambofaciens*.



**Tableau 41 : Récapitulatif de la sélectivité d'acylation de peptides par CALB et les protéines produites par *S. ambofaciens* ATCC 23877.**

Peptides	Lipase B de <i>C. antarctica</i>		Protéines du surnageant de culture de <i>S. ambofaciens</i>
	Monoacylation	Diacylation (traces)	
Lys-Ser			
Lys-Tyr-Ser			
Ser-Tyr-Lys			
Leu-Gln-Lys-Trp			

○ Acylation majoritaire    ○ Acylation minoritaire

## 2 Conclusion

Dans cette seconde partie de l'étude, une recherche d'activité de type aminoacylase dans le surnageant de *S. ambofaciens* ATCC23877 et de *S. pristinaespiralis* pr11 a été réalisée. Des activités spécifiques d'hydrolyse ont été mises en évidence pour les substrats N- $\alpha$ -acétyl-L-lysine et N- $\epsilon$ -acétyl-L-lysine. Cependant, seul le surnageant de culture de *S. ambofaciens* présente une activité de type aminoacylase catalysant la synthèse de lysine acylée avec de l'acide oléique.

Un des objectifs de ces travaux étant la recherche de nouvelles activités enzymatiques catalysant l'acylation de peptides, un protocole permettant d'obtenir une activité enzymatique de type aminoacylase la plus importante possible dans le surnageant de culture de *S. ambofaciens* a été établi. Plusieurs milieux de culture standard utilisés pour la croissance de *S. ambofaciens* ont été testés et le milieu présentant la plus forte activité hydrolytique de type aminoacylase est celui développé par Koreishi et son équipe pour la production d'une  $\epsilon$ -lysine acylase de *S. mobaraensis*. La durée optimale de culture a également été recherchée. Il a été démontré que la durée permettant l'obtention de la meilleure activité spécifique d'hydrolyse est de 7 jours. Il a également été montré que la lyse des cellules était très certainement à l'origine de l'activité aminoacylase mesurée dans le surnageant de culture. Cela suggère une accumulation intracellulaire de ces protéines de type aminoacylase chez *S. ambofaciens*.

Afin d'étudier les potentialités de l'activité aminoacylase des surnageants de culture de *S. ambofaciens*, les conditions optimales de purification partielle des extraits protéiques et le couple pH/température optimal d'hydrolyse ont été déterminées. Le tampon utilisé pour l'obtention des extraits protéiques permettant l'hydrolyse des substrats N- $\alpha/\epsilon$ -acétyl-L-lysine avec les plus hauts taux de conversion est le tampon Tris-HCl 25 mM, NaCl 50 mM. L'activité hydrolytique des aminoacylases produites par *S. ambofaciens* a une température optimale située entre 40 et 45°C et un pH optimal autour de 8 et 9.

Pour finir, les potentialités d'acylation des protéines issues du surnageant de culture de *S. ambofaciens* ont été étudiées à travers l'acylation des peptides Lys-Ser, Lys-Tyr-Ser, Ser-Tyr-Lys et Leu-Gln-Lys-Trp. Ces spécificités d'acylation ont ensuite été comparées avec celles de CALB. Il ressort de cette analyse que l'extrait protéique du surnageant de culture de *S. ambofaciens* possède une sélectivité d'acylation originale par rapport à CALB. En effet, les protéines produites par *S. ambofaciens* sont capables de catalyser une acylation spécifique du groupement amine  $\alpha$  en position N-terminale des peptides, et ce, indépendamment de la nature de l'acide aminé portant ce groupement amine. Une autre différence de sélectivité

intéressante entre ces deux enzymes est la capacité de ces protéines à catalyser l'acylation de la chaîne latérale de la sérine. En revanche, contrairement à CALB, l'extrait protéique du surnageant de culture de *S. ambofaciens* ne catalyse jamais l'acylation de la chaîne latérale de la lysine quelle que soit la position de cet acide aminé dans la séquence peptidique.

L'étude de ces nouvelles enzymes de type aminoacylases, une production en quantité et une purification de ces protéines doit être obtenue. Pour ce faire, une identification des gènes responsables de la production de ces nouvelles aminoacylases a été réalisée et des mutants ont été obtenus pour vérifier la fonctionnalité des enzymes. Enfin, une expression hétérologue a été initiée.



**CHAPITRE 3 : IDENTIFICATION DES GENES  
RESPONSABLES DE L'ACTIVITE AMINOACYLASE  
DU SURNAGEANT DE CULTURE DE  
*STREPTOMYCES AMBOFACIENS.***

---

## **1 Introduction**

Comme cela vient d'être montré, une activité de type aminoacylase permettant de catalyser la réaction de N-acylation de peptide est présente dans des surnageants de culture de *S. ambofaciens*. Ces enzymes capables de catalyser l'acylation d'acides aminés avec des acides gras en milieux aqueux offrent une alternative à l'utilisation de CALB avec une spécificité d'acylation permettant d'acyler tous les peptides sur le groupement amine en position N-terminale. Les travaux qui suivent, présentés sous forme d'une proposition d'article, ont pour but d'étudier cette activité enzymatique. Après un rappel des potentialités de l'activité aminoacylase issue de *S. ambofaciens* en termes d'acylation de molécules aminées, une purification partielle des protéines responsables de cette activité aminoacylase a été effectuée. Celle-ci a révélé un découplage entre les deux activités hydrolytiques  $\alpha$ -aminoacylase et  $\varepsilon$ -aminoacylase. Ce découplage démontrant la présence d'au moins deux enzymes dans l'extrait protéique issu du surnageant de culture de *S. ambofaciens*, l'identification des gènes codant pour ces protéines a été réalisée en comparant la séquence génétique du génome de *S. ambofaciens* à celles des enzymes de type aminoacylase identifiées chez *S. mobaraensis*. Enfin, des mutants de *S. ambofaciens* délétés en phase pour les gènes identifiés suite à la comparaison de séquences ont été construits afin de confirmer leur rôle dans l'activité de type aminoacylase de type aminoacylase issue de *S. ambofaciens*.

## **2 Identification of original aminoacylases in *S. ambofaciens***

Ferrari F.<sup>1</sup>, Ma J.<sup>1</sup>, Aymes A.<sup>1</sup>, Hôtel L.<sup>2</sup>, Humeau C.<sup>3</sup>, Kapel R.<sup>1</sup>, Aigle B.<sup>2</sup>, Chevalot I.<sup>1</sup>, Delaunay S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, CNRS UMR-7274, Université de Lorraine, 2 av. de la Forêt d'Haye, 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France, <sup>2</sup> Dynamique des Génomes et Adaptation Microbienne, UMR 1128, Université de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France, <sup>3</sup> INRA, <sup>3</sup> Laboratoire Ingénierie des Biomolécules, Université de Lorraine, 2 av. de la Forêt d'Haye, 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

## 2.1 Abstract

The presence of an aminoacylase activity was investigated in a crude extract of *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877. A hydrolytic activity toward N- $\alpha$  or N- $\epsilon$ -acetyl-L-lysine was identified. Furthermore, the extract allowed the catalysis of the acylation of lysine and serine-tyrosine-lysine on the  $\alpha$ -amine group was identified. A separation of the proteins from the crude extract highlighted that at least two enzyme activities would be responsible for these aminoacylase activities. A comparison of the previously identified sequences of aminoacylases from *Streptomyces mobaraensis* with the genome of *S. ambofaciens* ATCC 23877 was then performed. 2 sequences whose products exhibited a high identity with Sm-eLA and Sm-AA, two aminoacylases from *S. mobaraensis* were revealed. *S. ambofaciens* mutants deleted in one or both of the respective genetic sequences, *samL1383* and *sam-AA* were constructed. It appeared that SamL1383 and Sam-AA were responsible of most of these aminoacylase hydrolytic activities determined in the crude extract of *S. ambofaciens* ATCC 23877. SamL1383 was mainly specific of the hydrolysis of N- $\alpha$ -acetyl-L-lysine and Sam-AA of N- $\epsilon$ -acetyl-L-lysine.

## 2.2 Introduction

Through their emulsifying, antimicrobial or surfactant activities, N-(long/short)-chain-fatty-acyl-L-amino acids are of great interest and are suitable for cosmetic, pharmaceuticals or food industries (Koreishi *et al.*, 2005a; Wada *et al.*, 2002). N-acylated amino acids are currently chemically produced using mainly fatty acid chlorides as acyl donors. Unfortunately, this chemical process has the drawback of producing by-products like salt, which have to be removed in order to obtain valuable final products (Wada *et al.*, 2002). An alternative to this process is to develop an enzymatic process. Lipases are the most currently used enzymes to catalyze ester or amide functions for the synthesis of bioactive molecules, but the use of these hydrolytic enzymes involves the utilization of aqueous-free solvent as reaction medium. This limits the solubility of polar molecules such as amino acids, leading to low conversion yield (Soo *et al.*, 2004). An alternative to lipases is then the use of acylases. These enzymes are able to catalyze the acylation of amino acids with fatty acids in aqueous media (Koreishi *et al.*, 2005a, 2005a, 2006, 2007, 2009a). These enzymes are produced by various

microorganisms including the filamentous bacteria from *Streptomyces* genus. 4 acylases able to catalyze the N-acylation of amino acids have been previously identified in *Streptomyces mobaraensis*. The first one is Sm-AA, a monomer of 55kDa belonging to the peptidase M20 family. This enzyme has an optimal pH from 7 to 8 and an optimal temperature of 50°C. Sm-AA has a rare specific ability to hydrolyze amino acids acylated with long and short fatty chain (C<sub>2</sub> to C<sub>16</sub>) (Koreishi *et al.*, 2009b). The second enzyme is Sm-eLA (55kDa monomer) which has been identified as a ε-lysine-acylase (N 6-acyl-L-lysine amidohydrolase; EC 3.5.1.17). Sm-eLA has an optimal pH of 8 and is stable at temperatures up to 50°C for 1h at pH 8. This enzyme efficiently catalyzes the N-acylation of the lysine side chain with fatty acids or aromatic compounds as acyl donors in an aqueous buffer. The reaction yield can reach 90% or higher using 10 mM of fatty acid and 0.5 M of L-lysine (Koreishi *et al.*, 2005a). The third enzyme is a metallo-enzyme (100 kDa monomer) which is stable at temperatures up to 60°C for 1h at pH 7.2. It catalyzes the hydrolysis of the amide bond in various N-α-acylated-L-amino acids except the N-acetyl-L-proline. This acylase also catalyzes the deacylation of 7-aminocephalosporanic acid and cephalosporin C (Koreishi *et al.*, 2005b). The fourth acylase is Sm-PVA (61kDa, 19kDa dimer) which belongs to the penicillin V acylase family. This enzyme presents an optimal pH of 8 and is stable at temperatures up to 55°C. It efficiently catalyzes the synthesis of β-lactam antibiotics, capsaicin derivatives, N-fatty-acyl-amino acid and N-fatty-acyl-peptide derivatives (Koreishi *et al.*, 2006). Genes encoding the enzymes Sm-AA, Sm-eLA and Sm-PVA have been expressed in *Streptomyces lividans* TK24 (Koreishi *et al.*, 2009a, 2009b; Zhang *et al.*, 2007). Another acylase, FR901379 acylase which is able to deacylate a precursor of micafungin, used in the treatment of candidaemia, has been identified in culture broth of *Streptomyces* sp. no. 6907 (FERM BP-5809) (Ueda *et al.*, 2011).

These studies suggested that the *Streptomyces* genus might be an interesting bacterial source of new aminoacylases. For this reason, the presence of such enzymes in another species of *Streptomyces*, *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877 was investigated. This bacterium has been widely studied for the production of various antibiotic or antifungal compounds such as spiramycine, congocidine and also kinamycins, stambomycins and antimycins (Aigle *et al.*, 2014) and is known to produce some hydrolytic enzymes such as a ferulic acid esterase (Kheder *et al.*, 2009).



## 2.3 Materials and methods

### 2.3.1 Bacterial strains and plasmids

Bacterial strains, plasmids and Bacterial Artificial Chromosomes (BACs) used in this study are listed in Table 42. *Streptomyces* strains were manipulated as described previously (Bunet *et al.*, 2014; Kieser *et al.*, 2000). *Escherichia coli* strains were cultivated in LB medium (Sambrook *et al.*, 1989).

**Table 42 : List of strains, plasmids and BACs used in this work.**

Strains, BAC, cosmid or plasmid	Principal characteristics <sup>a</sup>	Source or Reference
<i>S. ambofaciens</i> ATCC23877	Wild-type (WT)	Pinnert-Sindico, 1954
<i>S. ambofaciens</i> $\Delta$ <i>samL1383::apra-oriT</i>	The <i>samL1383</i> gene replaced by the <i>aac(3)-IV-oriT</i> mutagenesis cassette	This work
<i>S. ambofaciens</i> $\Delta$ <i>samAA::apra-oriT</i>	The <i>samAA</i> gene replaced by the <i>aac(3)-IV-oriT</i> mutagenesis cassette	This work
<i>S. ambofaciens</i> $\Delta$ <i>samL1383::scar</i>	The <i>samL1383</i> gene in-frame-deleted	This work
<i>S. ambofaciens</i> $\Delta$ <i>samAA::scar</i>	The <i>samAA</i> gene in-frame-deleted	This work
<i>S. ambofaciens</i> $\Delta$ <i>samL1383::scar<math>\Delta</math><i>samAA::apra-oriT</i></i>	The <i>samL1383</i> gene in-frame-deleted and the <i>samAA</i> gene replaced by the <i>aac(3)-IV-oriT</i> cassette	This work
<i>S. ambofaciens</i> $\Delta$ <i>samL1383::scar<math>\Delta</math><i>samAA::scar</i></i>	The <i>samL1383</i> and <i>samAA</i> genes in-frame-deleted	This work
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	General cloning strain	Hanahan, 1983
<i>E. coli</i> ET12567/pUZ8002	Nonmethylating strain with mobilization plasmid for conjugation with <i>Streptomyces</i>	MacNeil et al., 1992
<i>E. coli</i> BW25113/pKD20	Strain used for the PCR-targeting mutagenesis ( <i>gam</i> , <i>bet</i> , <i>exo</i> , <i>bla</i> )	Datsenko and Wanner, 2000
BAB8ZA11	BAC from the genomic library of <i>S. ambofaciens</i> ( <i>cat</i> )	Choulet et al., 2006
BAB3ZC8	BAC from the genomic library of <i>S. ambofaciens</i> ( <i>cat</i> )	Choulet et al., 2006
BAA10ZD3	BAC from the genomic library of <i>S. ambofaciens</i> ( <i>cat</i> )	Choulet et al., 2006
BAB8ZA11:: <i>neo</i> / $\Delta$ <i>samL1383::aac(3)IV+oriT</i>	<i>samL1383</i> replaced by an apramycin cassette and the <i>cat</i> gene by the <i>neo</i> gene	This work
BAA10ZD3:: <i>neo</i> / $\Delta$ <i>smAA::aac(3)IV+oriT</i>	<i>smAA</i> replaced by an apramycin cassette and the <i>cat</i> gene by the <i>neo</i> gene	This work
pPSM88T	pOSV503 derivative containing <i>oriT</i>	Raynal et al., 2006; A. Thibessard, pers. com.
pOSK1111	Conjugative plasmid with the <i>xis</i> and <i>int</i> genes of pSAM2	Raynal et al., 2006

<sup>a</sup>*bla*, ampicillin resistance gene; *neo*, kanamycin resistance gene; *aac(3)IV*, apramycin(*apra*) resistance gene; *oriT*, origin of transfer; *gam*, inhibitor of the host exonuclease V; *bet*, single-stranded DNA binding protein; *exo*, exonuclease promoting recombination along with *bet*; *cat*, chloramphenicol resistance gene; *xis* and *int*: excisionase and integrase of pSAM2, respectively.

### 2.3.2 DNA manipulation

Isolation, cloning, and manipulation of DNA were carried out as previously described in (Kieser *et al.*, 2000) for *Streptomyces* and in (Sambrook *et al.*, 1989) for *E. coli*. Amplification of DNA fragments by PCR was performed with *Taq* DNA polymerase (NEB) or Takara polymerase (Fermentas), according to the manufacturer's instructions. When needed, PCR products and restriction fragments were purified from agarose gels with the High Pure PCR product purification kit (Roche).

### 2.3.3 In-frame deletion of the acylase encoding genes in *S. ambofaciens*

The REDIRECT system (Gust *et al.*, 2003) was used to make an in-frame deletion of the three acylase encoding genes in *S. ambofaciens* ATCC 23877, *samL1383*, *samL0890* and *sm-AA*, as described in previous works for other genes (Bunet *et al.*, 2008; Pang *et al.*, 2004). The *aac(3)-IV-oriT* mutagenesis cassette used for gene replacement was synthesized by PCR using pSPM88T (A. Thibessard, pers. com.; Raynal *et al.*, 2006) as template and the primer pairs described in Table 43. *E. coli* BW251113/pKD20 (Datsenko and Wanner, 2000) was first transformed with the BAC containing the acylase gene of interest (*samL1383*, *samL0890* or *sm-AA*), and then with the PCR product (*aac(3)-IV-oriT* mutagenesis cassette) to replace the targeted gene by homologous recombination. The chloramphenicol resistance gene of the vector pBelo-BAC11 was replaced by a kanamycin resistance gene, using the same strategy. *E. coli* ET12567/pUZ8002 was transformed with the mutated BACs for conjugation with *S. ambofaciens* ATCC23877. Gene replacements were confirmed by PCR analysis using primer sets flanking the targeted genes and/or Southern blot analyses. To get in frame deleted mutants of *samL1383*, of *samL0890* and of *sm-AA*, the cassette was removed using the excisionase and the integrase of pSAM2 as described in (Raynal *et al.*, 2006). Only the start and stop codons of the genes remained after deletion. All primers used to confirm the gene deletion are described in Table 43.

**Table 43 : Oligonucleotide primers used in this work.**

Primers	Nucléotide sequence (5' -> 3')
Gene replacement	
disrupt_samL1383_F	<b>tgccggccggtccgcgcgagggcgagactggtgccatg</b> ATCGCGCGCTTCGTTCCGGACGAA
disrupt_samL1383_R	<b>cccgggagaagatcatcgccccgtcgccgccgagatca</b> ATCTGCCTCTTCGTCCCGAAGCAACT
disrupt_samL0890_F	<b>tcagccgccccttcccaaagacgtcgggaggcagcagatg</b> ATCGCGCGCTTCGTTCCGGACGAA
disrupt_samL0890_R	<b>gctcggcgccggcggggtcggggacgggcgcggtctca</b> ATCTGCCTCTTCGTCCCGAAGCAACT
disrupt_sm-AA_F	<b>agcagggacaccagcagtgacagcgggaggaaccacgtg</b> ATCGCGCGCTTCGTTCCGGACGAA
disrupt_sm-AA_R	<b>ctcggcggttcaggacgcgtcgaatctcgggcggttca</b> ATCTGCCTCTTCGTCCCGAAGCAACT
verif_samL1383_F*	tggtgctgtccacgcctac
verif_samL1383_R*	tgtaacagtcgtgcgacct
verif_samL0890_F*	gtcgaccgtgctgccgtgtc
verif_samL0890_R*	atcttcccggatcgccgtg
verif_sm-AA_F*	ctcaagctagcgcgtctgcc
verif_sm-AA_R*	gcacacgcgagcgaatagca

The bold nucleotides are identical to the sequences at the extremities of the acylase genes. The primers labelled with an asterisk were used to check the in-frame deletion.

#### 2.3.4 Media and culture conditions for aminoacylase production

All *S. ambofaciens* strains were stored as spore suspensions ( $10^7$  to  $10^8$  Units Forming Colony.mL<sup>-1</sup>) at -80°C. The first step of the culture protocol was a culture in the ICS medium. This medium consisted in sucrose 15 g.L<sup>-1</sup>, corn steep 5 g.L<sup>-1</sup>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 g.L<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g.L<sup>-1</sup>, NaCl 3 g.L<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.2 g.L<sup>-1</sup> and CaCO<sub>3</sub> 0.2 g.L<sup>-1</sup>. Medium pH was adjusted at 6.8 prior to sterilization at 121°C for 20 min. 40 mL of this medium were inoculated with 100 µL of spore suspension. After 48 h culture, 2.5 mL of ICS medium were transferred in 25 mL of culture medium for the pre-culture step. The composition of this culture medium was: meat extract 40 g.L<sup>-1</sup>, soluble starch 40 g.L<sup>-1</sup>, casein hydrolysate 20 g.L<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub> 20 g.L<sup>-1</sup>, and K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 g.L<sup>-1</sup> (Koreishi *et al.*, 2005a). The pH of the culture medium was set at 7 before sterilization at 121°C for 20 min. The preculture was performed for 48 h and then, 5 ml of this preculture were used to inoculate 95 ml of fresh culture medium for the main culture step. This last culture was maintained for 7 days. All the cultures were carried out in baffled flasks, at 250 rpm and at 28°C. All the components of the culture media were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France), except sucrose and yeast extract, from Fluka (Saint

Quentin Fallavier, France), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (99%), NaCl, CaCO<sub>3</sub> and acetonitrile, from Carlos Erba (Val-de-Reuil, France).

### 2.3.5 Preparation of enzyme solution

At the end of the main culture, in order to disrupt the bacterial cells, the whole suspension was submitted to 4 passages in a French press (Constant cell) at 2.5 kbars. Then, the cellular debris were removed by centrifugation at 8600 x g, at 4°C for 20 min. Thereafter, some ammonium sulfate was added to the supernatant to 60 % of saturation to precipitate proteins of the supernatant including acylases and agitation was maintained for 1 h, at room temperature. The precipitate was recovered by centrifugation at 8600 x g at 4°C for 20 min and was dissolved in 25mM TrisHCl buffer, NaCl 50mM, at pH 8. The solution was dialyzed 7 times (cutoff at 12.5 kDa) against the same buffer. This solution will be mentioned as *S. ambofaciens* crude extract in the following experiments.

The protein separation step was carried out on a low-pressure ion exchange liquid chromatography (AKTA purifier 100, GE Healthcare) on a Q Sepharose (quaternary aminomethyl Sepharose) column (1.6 x 10 cm, column, volume: 20 mL). Mobile phase consisted in TrisHCl 25 mM NaCl 50mM. The column was loaded with 5 mL of the protein solution. Proteins were eluted using a gradient of NaCl (step: 0, 0.1, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45, 0.5 and 1.0 M of NaCl) at a flow rate of 2 mL.min<sup>-1</sup>. Each step of the gradient was hold during 1 column volume.

Each collected fraction was concentrated using Amicon® ultra-15 centrifugal filter devices (molecular weight cutoff: 10K, Millipore). 15 mL of the protein solution were transferred into the device and centrifuged for 30 min at 5000G at room temperature.

Protein concentrations were assayed according to the Bradford method using bovine serum albumin as standard (Bradford, 1976).

### 2.3.6 Enzyme assays

The aminoacylase activity was determined in each sample using N- $\alpha$ -acetyl-L-lysine or N- $\epsilon$ -acetyl-L-lysine as substrate. The enzymatic hydrolysis of N- $\alpha/\epsilon$ -acetyl-L-lysine was carried out in test tubes. In a typical reaction, 0.2 mL of the substrate (40 mM) and 0.3 mL of enzymatic sample were added in 1.5 mL of TrisHCl 25mM NaCl 50 mM at pH 8. The

hydrolysis reaction was started by the addition of the enzyme sample. Reaction media were kept at 37°C and stirred at 250 rpm. Samples of 50 µL were withdrawn for analyses. The reaction was stopped after 24h by soaking in cold water and stored at -18°C before HPLC analysis. Each reaction was performed in triplicate.

The enzymatic acylation of lysine and Ser-Tyr-Lys (SYK) were carried out in test tubes. With *S. ambofaciens* crude extract as biocatalyst, the reaction medium consisted in, the acyl-acceptor (0.12M) and acyl-donor (0.24 M) in 2 mL of TrisHCl 25 mM NaCl 50 mM at pH 8. With the *Candida antarctica* lipase B (CALB) catalyzed reactions, substrates were added in 2 mL of M<sub>2</sub>B<sub>2</sub> previously dehydrated on 4 Å molecular sieves. The initial water activity of the medium was decreased below 0.1 to prevent the hydrolytic activity of CALB. Triethylamine was added to the reaction media in a large excess (2.4 mol L<sup>-1</sup>) to favor the neutral form of amino groups. Peptides exhibit low solubility in organic medium; consequently a few hours were necessary to allow the formation of an ionic complex between the peptidic substrate and oleic acid. This complex favored the solubilization of the peptide. After solubilization of the substrates for 12 h at 55°C, the acylation was started by the addition of 10 g L<sup>-1</sup> of CALB.

Reaction media were stirred at 250 rpm and kept at 45°C for *S.ambofaciens* crude catalyzed reactions and 55°C for CALB catalyzed reactions. 50 µL samples were withdrawn for analyses. These samples were diluted with methanol/water (80/20, v/v) and stored at -18°C before LC-MS analysis. Each reaction was repeated at least twice. Novozym 435<sup>®</sup> (lipase B from *C. antarctica* immobilized on an acrylic resin) with propyl laurate synthesis activity of 7000 PLU g<sup>-1</sup> and protein grade of 1-10% was from Novo Nordisk A/S (Bagsværd, Denmark). Lysine and oleic acid were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France), SYK with 99% of purity was acquired from Bachem (Bubendorf, Switzerland).

### 2.3.7 Analysis of the reaction media

Quantitative analysis of the lysine was made by high-pressure liquid chromatography (HPLC). The separation of sample constituents was carried out according to the Shimadzu method<sup>®</sup> (Mehmood *et al.*, 2011). The production of lysine of each reaction was monitored using HPLC (LC 20 AD – VP, Shimadzu, France) equipped with a fluorescence detector (RF-10A): excitation wavelength: 350 nm, emission wavelength: 460 nm. The column used was a C18 (150 × 4.6 mm – 5 µm, Apollo, France) maintained at 45° C. The elution was performed

using a gradient fed at a constant flow rate of 1.0 mL.min<sup>-1</sup> as following: 95 % reagent A and 5 % reagent B for 1 min., 95-0 % reagent A and 5-100 % reagent B for 9 min., 100 % buffer B for 5 min., 100-0 % reagent B for 1 min. The column was then washed with acetonitrile (80 %) for 5 min. The column temperature was controlled at 45°C. Mobile phases consisted in NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,78 g.L<sup>-1</sup>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.79 g.L<sup>-1</sup> for A phase and 600 mL of A phase added at 300mL of acetonitrile for B phase.

Qualitative and semi quantitative analysis of aminoacid and peptide derivatives were carried out on a HPLC–MS system (ThermoFisher Scientific, San Jose, CA, USA) consisting in a binary delivery pump connected to a photodiode array detector (PDA) and a LTQ ion trap as mass analyzer (Linear Trap Quadrupole) equipped with an atmospheric pressure ionization interface operating in positive electrospray mode (ESI<sup>+</sup>). Chromatographic separation was performed on a C18 amide column (150 mm × 2.1 mm, 5 µm porosity – Grace/Alltech, Darmstadt, Germany) equipped with a C18 amide pre-column (7.5 mm × 2.1 mm, 5 µm porosity – Grace/Alltech Darmstadt, Germany) at 25°C. Mobile phases consisted in methanol/water/TFA (80:20:0.1, v/v/v) for A and methanol/TFA (100:0.1, v/v) for B. Acylated peptides were eluted using a linear gradient from 0% to 100% of B for 5 min and then an isocratic step at 100% of B for 10 min, at a flow rate of 0.2 mL min<sup>-1</sup>. Mass spectrometric conditions were as follows: spray voltage was set at +4.5 kV; source gases were set for sheath gas, auxiliary gas and sweep gas at 30, 10 and 10, respectively (in arbitrary units min<sup>-1</sup>); capillary temperature was set at 250°C; capillary voltage was set at 48 V; tube lens, split lens and front lens voltages were set at 120 V, -34 V and -4.25 V, respectively. Ion optic parameters were optimized by automatic tuning using a standard solution of oleoyl SYK at 0.1 g L<sup>-1</sup> infused in mobile phase (A/B, 50:50) at a flow rate of 5 µL min<sup>-1</sup>. Full scan MS spectra were performed from 100 to 1000 m/z and additional MS<sup>2</sup> scans were realized in order to get structural information based on daughter ions elucidation. Raw data were processed using Xcalibur software (version 2.1 Thermo Scientific).

## 2.4 Results and discussion

### 2.4.1 Research for an aminoacylase activity in a crude extract of *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877



As Koreishi *et al.* (2005a-b, 2009a) previously showed that most of the aminoacylases from *S. mobaraensis* exhibit a specific regio-selectivity against N-acetyl-L-lysine, the presence of an aminoacylase hydrolytic activity using both N- $\alpha$ - and N- $\epsilon$ -acetyl-L-lysine as substrates was investigated. Aminoacylase activity was assayed according to Koreishi method, performing hydrolytic reactions at 37°C with 4 mM of N- $\alpha$ - or N- $\epsilon$ -acetyl-L-lysine as substrate, in TrisHCl 25 mM NaCl 50 mM, at pH 8, during 24 h. Hydrolytic reactions were followed by the lysine production analysis. A 7 day culture was performed with *S. ambofaciens* ATCC23877. Aminoacylases from *S. mobaraensis* are intracellular except the penicillin V acylase (Sm-PVA) which is not able to hydrolyze N- $\alpha/\epsilon$ -acetyl-L-lysine (Koreishi 2009 a-b). The enzyme activity in the culture supernatant of *S. mobaraensis* is then probably a consequence of the protein leakage from the cells as a result of cell lysis at the end of the culture. This result is strengthened by the fact that aminoacylase activity was mainly determined in the culture supernatant from *S. mobaraensis* after 7 days of culture (Koreishi *et al.*, 2005a, 2005b, 2007, 2009b). Therefore, to increase the level of aminoacylase activity in the crude extract of *S. ambofaciens* ATCC23877, the whole cell suspension was disrupted using a French press. Then, before aminoacylase activity determination, proteins from the culture supernatant were precipitated using ammonium sulfate and concentrated by diafiltration. Crude extract of *S. ambofaciens* presented an aminoacylase activity which specifically catalyzed the hydrolysis of N- $\alpha$ - or N- $\epsilon$ -amide bond in N- $\alpha$ - or N- $\epsilon$ -acetyl-L-lysine. After 7 days of culture, a specific hydrolytic activity of 0.13 mmol<sub>lys</sub>.h<sup>-1</sup>.g protein<sup>-1</sup> was observed with N- $\alpha$ -acetyl-L-lysine, and of 0.11 mmol<sub>lys</sub>.h<sup>-1</sup>.g protein<sup>-1</sup> with N- $\epsilon$ -acetyl-L-lysine as substrate. Similar hydrolytic regio-selectivities were previously identified in *S. mobaraensis* crude extract. The hydrolysis of the amide bond of N- $\alpha$ -acetyl-L-lysine was assigned to a short-chain-acyl aminoacylase (Koreishi *et al.*, 2005b) and the hydrolysis of the amide bond of N- $\epsilon$ -acetyl-L-lysine to a  $\epsilon$ -lysine acylase (Sm-eLA) (Koreishi *et al.*, 2009a). Aminoacylase activities of *S. ambofaciens* crude extract for amino acid and peptide acylation were also investigated through the acylation of lysine and of the tripeptide SYK with oleic acid. The regio-selectivity of *S. ambofaciens* crude extract was compared to that of CALB which is widely used for that catalysis of acylation reactions. Acylation reactions were performed during 72h in TrisHCl 25 mM NaCl 50 mM, at 45°C, for those catalyzed by the crude extract of *S. ambofaciens* or in M<sub>2</sub>B<sub>2</sub>, at 55°C, for those catalyzed by CALB. The molar ratio between the acyl-donor and the acyl-acceptor was 2:1. The acylation reaction of lysine with oleic acid catalyzed by the *S. ambofaciens* crude extract led to the formation of one mono-acylated product with molecular mass MM = 410 which



was detected at a retention time of 7.84 min. By fragmentation of this pseudo molecular  $[M+H]^+$  parent ion ( $m/z = 411$ ), one major daughter ion was detected at  $m/z = 375$  corresponding to  $[(\text{Oleoyl-K}) - 2\text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$  and two minor daughter ions were also detected at  $m/z = 147$  and  $m/z = 348$  corresponding to  $[(\text{Oleoyl-K}) + \text{H}]^+$  and  $[(\text{Oleoyl-K}) - \text{H}_2\text{O} - \text{COOH} + \text{H}]^+$ , respectively (Figure 62, A1-A2). With CALB, a different mono-acylated product was detected. The same molecular mass was measured ( $\text{MM} = 410$ ) but it was detected at a different retention time (8.18 min). Moreover, the MS2 profile obtained by fragmenting this pseudo molecular  $[M+H]^+$  parent ion ( $m/z = 411$ ) was different, presenting only one daughter ion detected at  $m/z = 348$ , corresponding to  $[(\text{Oleoyl-K}) - \text{H}_2\text{O} - \text{COOH} + \text{H}]^+$  (Figure 62, B1-B2).

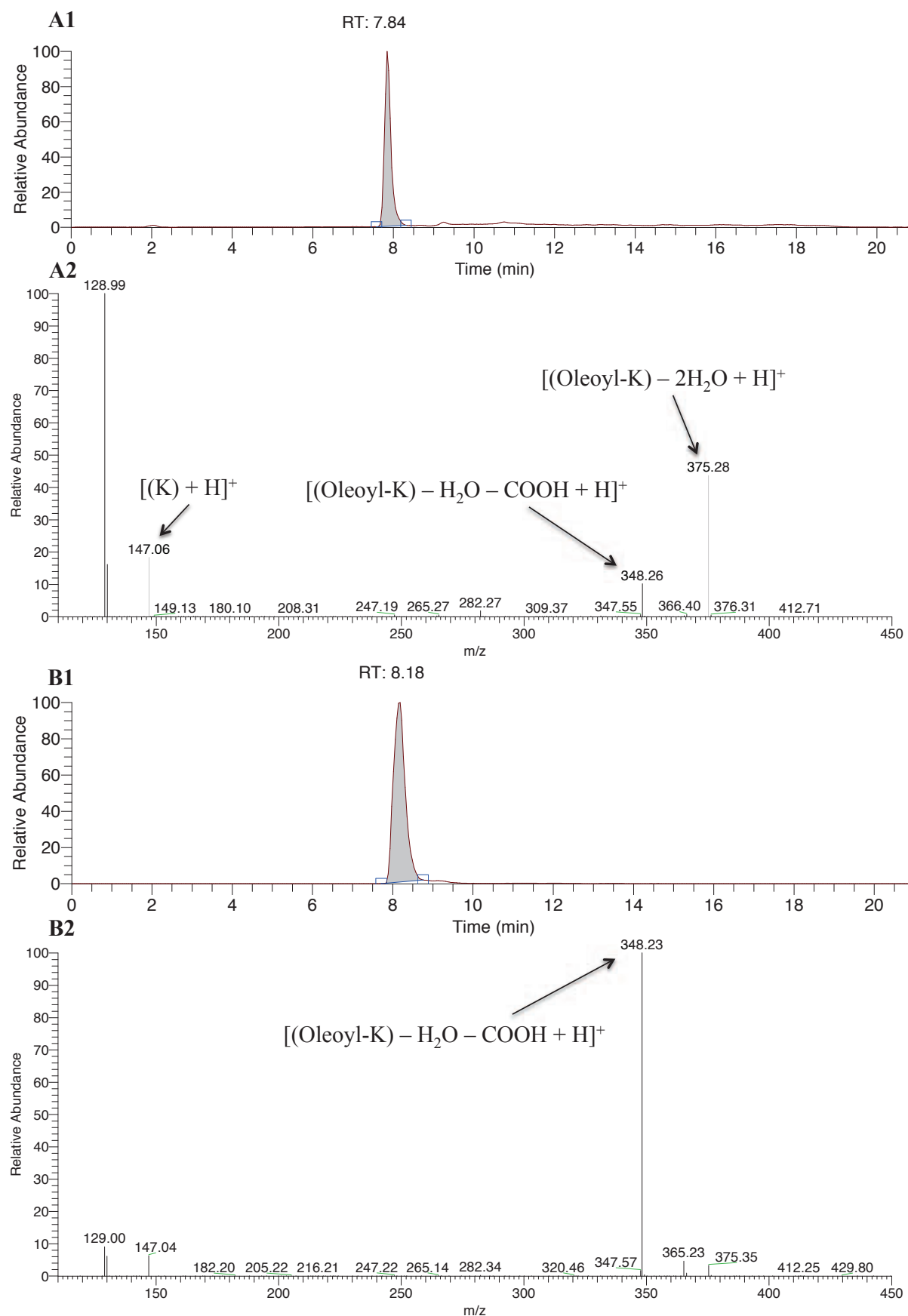
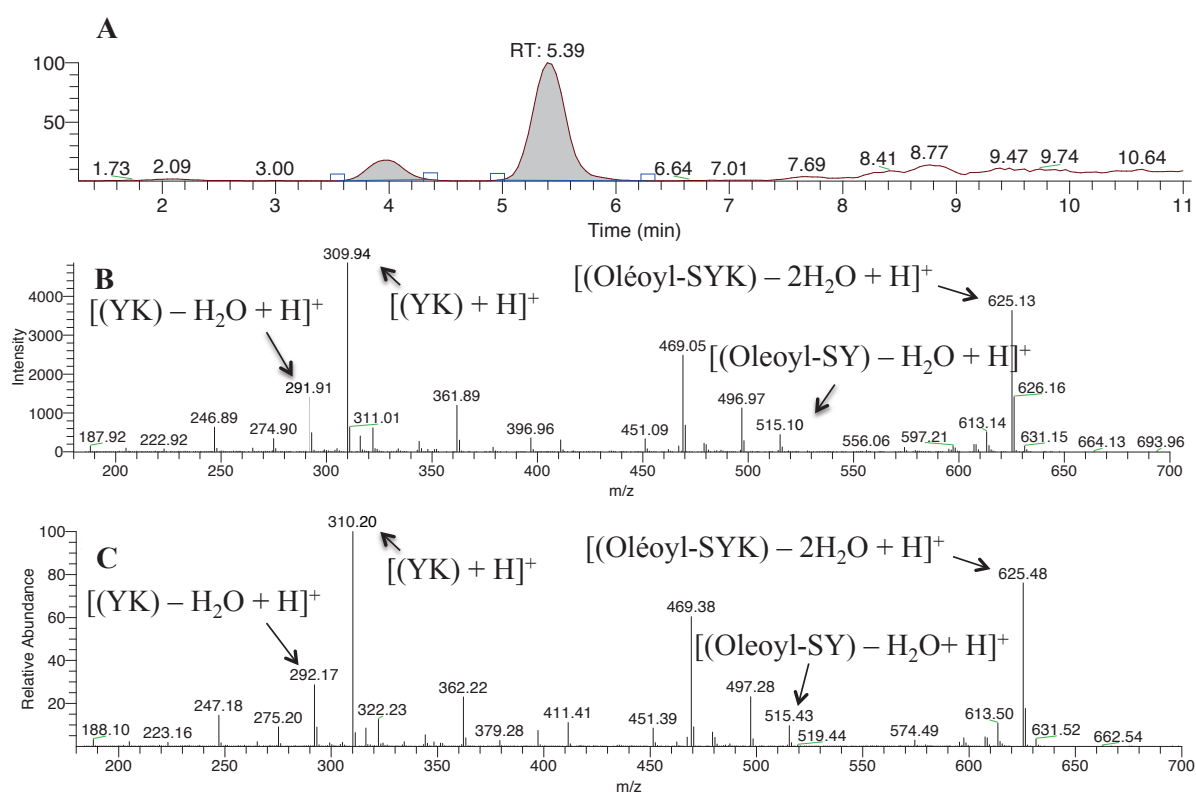


Figure 62 : Mass analysis of oleoyl-lysine synthesized using crude extract of *S. ambofaciens* (A and A2) and CALB (B1 and B2). A1: single ion chromatogram of acylated product  $[M+H]^+$  parent ion ( $m/z=410$ );

**A2:** and MS2 spectrum after fragmentation of ion parent synthesized; **B1:** single ion chromatogram of acylated product  $[M+H]^+$  parent ion ( $m/z=410$ ); **B2:** MS2 spectrum after fragmentation of ion parent synthesized.

It was previously demonstrated that CALB specifically catalyzed the formation of N- $\epsilon$ -acyl-lysine (Montet *et al.*, 1990). As a consequence, the acylation of lysine catalyzed by *S. ambofaciens* crude extract took place on the lysine  $\alpha$ -amino group.

Concerning SYK acylation, CALB was shown to be able to catalyze SYK acylation mainly on the lysine side chain and weakly on the serine (Ferrari *et al.*, 2014). SYK acylation with oleic acid catalyzed by *S. ambofaciens* crude extract led to the formation of one mono-acylated product of molecular mass  $M = 660$  with a retention time of 5.39 min and identified as a product acylated on the serine residue. Indeed, the MS<sup>2</sup> profile showed the presence of a oleoyl-serine fragment  $[(\text{Oleoyl-SY})-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$  ( $m/z = 515.10$ ) and of YK peptidic fragments  $[(\text{YK}) - \text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$  ( $m/z = 291,91$ ) and  $[(\text{YK}) + \text{H}]^+$  ( $m/z = 309.94$ ). An identical MS<sup>2</sup> profile was obtained by fragmenting a pure standard of N- $\alpha$ -oleoyl-SYK (Figure 63).

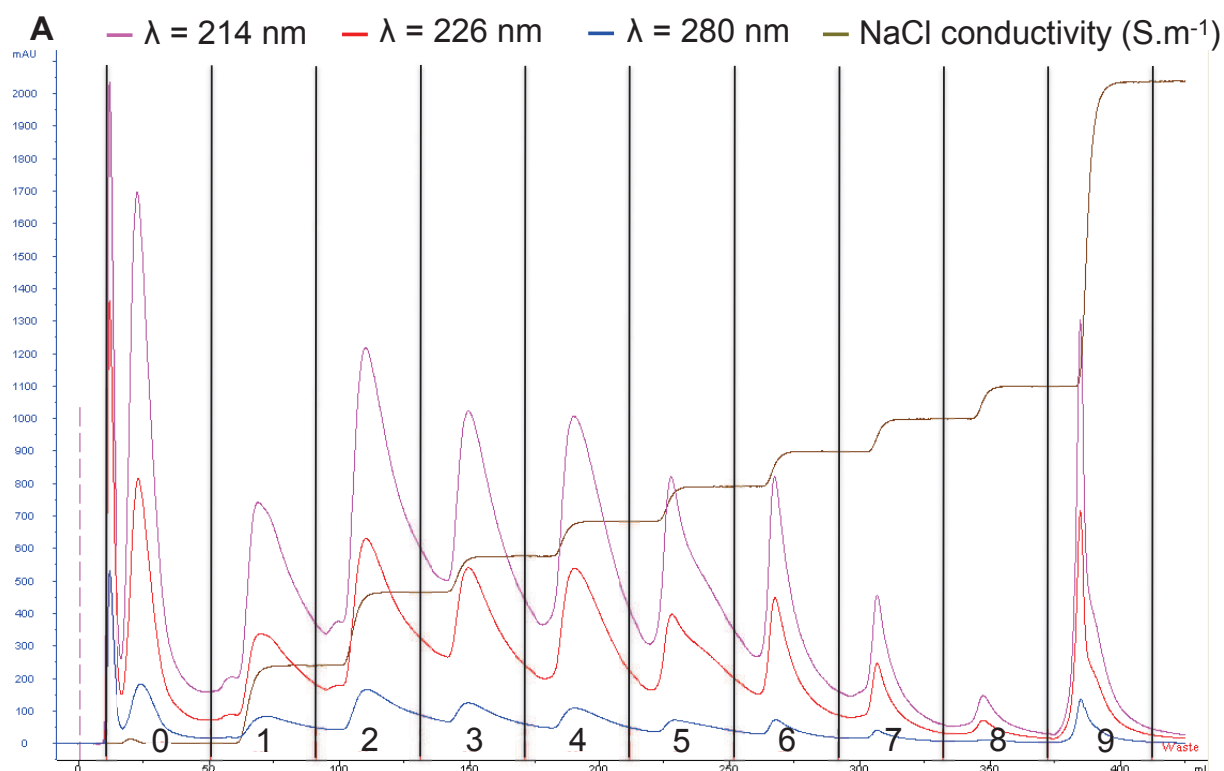


**Figure 63 :** Mass analysis of oleoyl-SYK. **A:** single ion chromatogram of enzymatic acylated product  $[M+H]^+$  parent ion ( $m/z=661$ ); **B:** MS2 spectrum after fragmentation of ion parent; **C:** MS2 spectrum after fragmentation of a standard of N- $\alpha$ -oleoyl-SYK.

Thus, the enzymes of the crude extract of *S. ambofaciens* ATCC23877 catalyzed the acylation of the amine group located in N-terminal extremity of SYK. Therefore, these results showed that *S. ambofaciens* crude extract presents an aminoacylase activity able to catalyze the acylation of lysine and SYK  $\alpha$ -amino groups. This regio-selectivity is of great interest as aminoacylases from *S. ambofaciens* appear to be susceptible to catalyze the acylation of peptides or amino acids, on their  $\alpha$ -amine group. Conversely, this regio-selectivity cannot be reached with CALB (Ferrari *et al.*, 2014).

#### 2.4.2 Partial purification of aminoacylases from *S. ambofaciens* ATCC23877

4 different aminoacylases were identified or detected in *S. mobaraensis* (Koreishi *et al.*, 2005a, 2005b, 2006, 2009b). To check the presence of several enzymes in *S. ambofaciens* ATCC23877, proteins from *S. ambofaciens* crude extract were fractionated by ionic exchange low pressure chromatography on a Q Sepharose column (Figure 64).



**B**

Fraction number	Specific activity ( $\text{mmol}_{\text{lys}}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}_{\text{protein}}^{-1}$ )	
	N- $\alpha$ -acetyl-L-lysine	N- $\epsilon$ -acetyl-L-lysine
0	0.1	0.27
1	0.07	0.04
2	0.03	+
3	0.05	<b>0.49</b>
4	0.06	<b>0.45</b>
5	<b>2.9</b>	0.13
6	<b>1.8</b>	0.09
7	0.9	0.1
8	0.3	0.18
9	0.09	+

Figure 64 : Separation of the hydrolytic activities of *S. ambofaciens* crude extract. A: chromatogram corresponding to protein fractions separated by anionic exchange low pressure chromatography with NaCl gradient; B: Hydrolytic activity of each fraction toward N- $\alpha/\epsilon$ -acetyl-L-lysine.

The determination of aminoacylase activity in each fraction showed that  $\alpha$ -aminoacylase activity could be split from  $\epsilon$ -aminoacylase activity. The  $\alpha$ -aminoacylase was mainly measured in fractions 5 and 6 (respectively 2.9 and 1.8  $\text{mmol}_{\text{lys}}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g protein}^{-1}$ ) whereas the  $\epsilon$ -aminoacylase activity was found in the fractions 3 and 4 (respectively 0.49 and 0.45  $\text{mmol}_{\text{lys}}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g protein}^{-1}$ ). This result suggested that several aminoacylases might be synthesized by *S. ambofaciens* ATCC23877.

Two aminoacylases from *S. mobaraensis* are known to catalyze the hydrolysis of N- $\alpha$ - or N- $\epsilon$ -acetyl-L-lysine. The *S. mobaraensis* short-chain-acyl aminoacylase catalyzes mainly the hydrolysis of N- $\alpha$ -acetyl-L-lysine with a specific activity of 41  $\text{units}\cdot\text{mg}^{-1}$  (Koreishi *et al.*, 2005b) and Sm-eLA is characterized by a specific activity of 3370  $\text{units}\cdot\text{mg}^{-1}$  for the hydrolysis of N- $\epsilon$ -acetyl-L-lysine (Koreishi *et al.*, 2009a). Sm-eLA has been biochemically and genetically characterized. To date, the gene coding the short-chain-acyl aminoacylase has not been identified. However, two other acylases, the N-(short/long)-chain-fatty-acyl-L-amino acid acylase (Sm-AA) and the penicillin V acylase (Sm-PVA), have been described in *S. mobaraensis*. The genes encoding these two last enzymes have been identified. The 3 genes known to encode acylases in *S. mobaraensis* genome were then searched in *S. ambofaciens* ATCC23877 genome.

#### 2.4.3 Analysis of the *S. ambofaciens* ATCC23877 acylase encoding genes

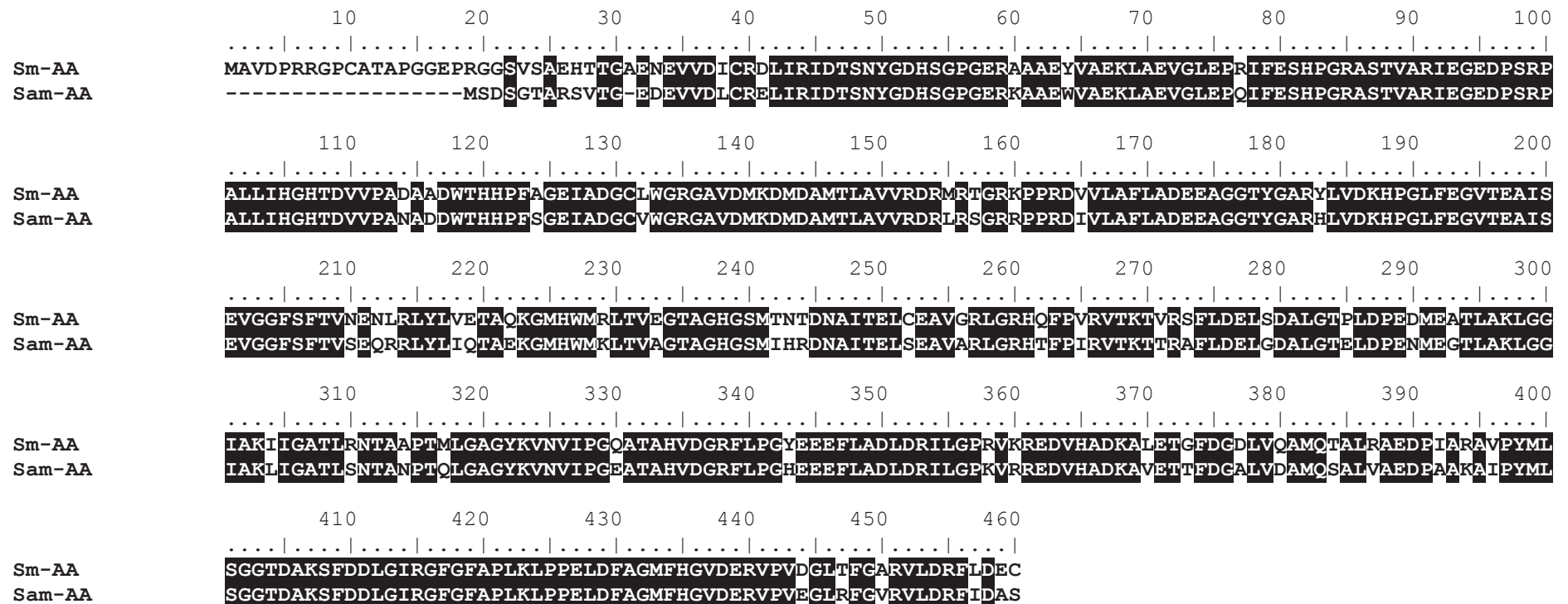
The genome of *S. ambofaciens* ATCC23877 has recently been sequenced (Choulet *et al.*, 2006). Therefore, the genes potentially encoding acylases have been searched using tblastn and the products of the *S. mobaraensis* genes as "baits". As mentioned above, three acylases have been identified and characterized in *S. mobaraensis*, Sm-PVA, Sm-AA and Sm-eLA (accession numbers: BAF51977, BAI44523.1 and BAH59036, respectively).

The tblastn analysis revealed that the genome of *S. ambofaciens* ATCC23877 encodes three acylases which share high level of identity and similarity with the *S. mobaraensis* enzymes (Figure 65). Thus, SamL0890 showed 69% identity (78% similarity) with Sm-PVA while SamL1383 shared 80% identity (85% similarity) with Sm-eLA. The third identified acylase was homologous to Sm-AA and was named Sam-AA. The two proteins shared 85% identity at the amino-acid level (93% similarity). Interestingly, another gene product of *S. ambofaciens* ATCC23877 has also homology with Sm-AA but with a lower level of identity/similarity (53%/66%) suggesting the presence of a fourth enzyme with acylase

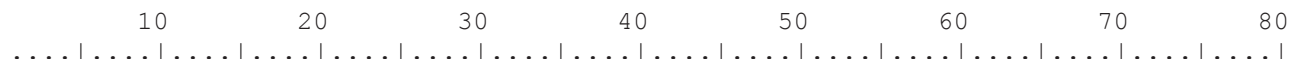
activity in this species. Like Sam-AA and Sm-AA, this last protein belongs to the M20 Peptidase, carboxypeptidase yscS-like family (cd05675). One candidate product of this last gene could be a protein similar to the short-chain-acyl amino acylase detected but not characterized in *S. mobaraensis* (Koreishi *et al*, 2005b).

Identification des gènes responsables de l'activité aminoacylase du surnageant de culture de *Streptomyces ambofaciens*.

A



B





Sm-ELA  
SamL1383

LTGLDLSGAATLGEALERVRAYAAARPGDRILLGHGWDAARWPEGRPPSRAELDAAADGRPLYLTRVDVHSAVVTALLD  
LTGLDLSGAPTREAALALVRDFAAARPGDRVLLGHGWDAARWPDGLPPTRAELDEATGGRPLYLSRIDVHSAVVTALLD

170 180 190 200 210 220 230 240

Sm-ELA  
SamL1383

LVPNARDLRGFTPDGPLTDDAHHAVRSTAHAAVTPAORTEAQRALARAVALSLGIGSVHECAGPLISGEDDLTGILLRLAAE  
LIPGAGDR----ADGPLTADAHHAVRAAALGAVAPAORTEAQRALAAHAAASLGIGTVHECAGPEISSEDDLTGILLRLSAA

250 260 270 280 290 300 310 320

Sm-ELA  
SamL1383

EPGPRVVGWAEAFSTSVNQLAKIRELGAHGAAGDLFVDGSLGSHTACLHEPYADAPGATGTAHLADDTVAHVAACTEAG  
EAGPRVIGWAEQ-----DVDKARELGAHGAAGDLFVDGALGSHTACLHEPYADA-GHOGTAYLDAAVAAHVAACTEAG

330 340 350 360 370 380 390 400

Sm-ELA  
SamL1383

VQAGFHAIGDAALTTVVTVGVRAAAQKVGGLDRVRAARHRVEHAEMLTPEHTAFAESALITASVQPAFDAWGGDDGMYYAR  
LQAGFHAIGDAAVTAVVEGVRAAAQKGLLARVRAARHRVEHAEMLTPEHTVAFAELGLITASVQPAFDAWGGEDGLYYAR

410 420 430 440 450 460 470 480

Sm-ELA  
SamL1383

LGRERARTLNPYAAMLRAGVPLALGSDSPVTPLDPWGTVRAAAFHRTPPEHRVSVRAAFTAHTRGGWRALGRDDAGVLPVPG  
LGAGRARTLNPYAALLRAGVPLAFGSDSPVTPLDPWGTVRAAAFHRTPPEHRVSVRAAFTAHTRGGWRVGRDDAGVLPVPG

490 500 510 520 530 540

Sm-ELA  
SamL1383

APADYAVWEAGDLVVQVPDARVANWSTDPRSGLPGLPELVPGGOLPRCVRTVVAGRTVYAA---  
APADYAVVRTGELVVQVPDDRVARWSTDPRSGLPGLPDLTPGRDLPVCLRTVVGGRTVVFVRPGE

C

Sm-PVA  
SmL0890

MGVILRLRHSRLRALAVGGVLLITGAGALPAVAASD--AARGERPSADGLSAVIRYTEYGVPHILADYADLGFCDGWAQADAVCTLADGFVTVRGERAR  
-----MRTRLRRLVVTAVALLTAATLPGAADERSAGRHEHPHSHGGLSAVIRYTEYGVPHILADYANLGFCDGWAQAEDEVCTLADGFVTVRGERSR

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100

Sm-PVA  
SmL0890

YFGPDAAPDRSFSSEASTNLSSDLFFRGVRRDARTVEKLLDRPAPEGPSROAKELMRGWAAGYNAWLROHKVTD PACRGKGVWRPVTATDVARRCYALTVLG  
YFGADAVS DLSLSSAATNLSSDL YFGVRRSGTVERLLAE PAPRGPSRDSEELMRGFAAGYNAWLEQNRI TDPACRGAAWRPVTSLDVAVRGFALSVLG

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200

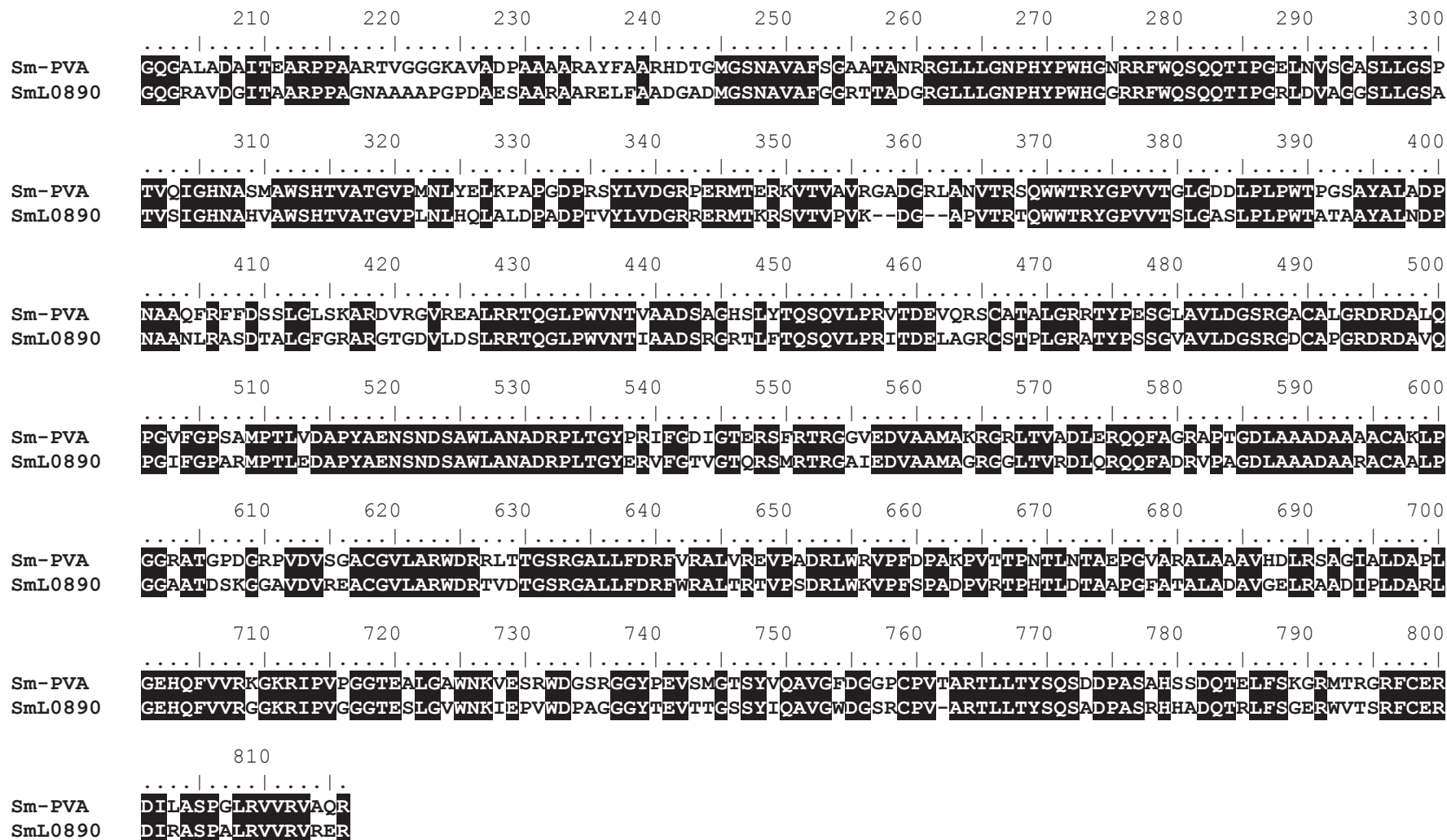


Figure 65 : Sequence alignments between *S. ambofaciens* and *S. mobaraensis* proteins. A: Sam-AA and Sm-AA; B: SamL1383 and Sm-eLA; C: SamL0890 and Sm-PVA.

Using N- $\alpha$ - or N- $\epsilon$ -acetyl-L-lysine as substrates, the Sm-PVA activity could not be determined (Koreishi *et al*, 2006). For this reason, this enzyme was not further studied. To correlate the acylase activities observed in the crude extract of *S. ambofaciens* ATCC23877 with the putative acylase encoding genes identified from the genome analysis, the two genes, *samL1383* and *sam-AA*, were in-frame deleted giving rise to the mutants  $\Delta$ *samL1383::scar*, and  $\Delta$ *sam-AA::scar*. In addition, a double mutant strain was obtained by deleting the *sam-AA* gene from the  $\Delta$ *samL1383::scar* clone ( $\Delta$ *samL1383::scar* $\Delta$ *sam-AA::scar*). None of the mutants was affected in growth and morphological differentiation (data not shown).

#### 2.4.4 Correlation between the putative *S. ambofaciens* acylases and the observed enzymatic activities

The hydrolytic activity against N- $\alpha$ - or N- $\epsilon$ -acetyl-L-lysine as substrates was determined in a crude extract from each simple mutant. Before the enzyme activity determination, a separation of the proteins from the crude extract was performed by ionic exchange low pressure chromatography following the same protocol as with the wild type strain. The enzyme activity was then assayed in each collected fraction. The Table 44 and Table 45 highlighted the fractions in which the enzyme activity was significantly different compared to the wild type strain.

**Table 44 : Hydrolysis of N- $\epsilon$ -acetyl-L-lysine in selected fractions resulting from the separation of the proteins of the crude extracts of *S. ambofaciens* wild type strain and mutants.**

Bacterial strain	Aminoacylase activity ( $\text{mmol}_{\text{lys}} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}_{\text{protein}}^{-1}$ )	
	Fraction 3	Fraction 4
<i>S. ambofaciens</i> ATCC23877	0.49	0.45
$\Delta$ <i>samL1383</i> mutant	0.02	0.02
$\Delta$ <i>sam-AA</i> mutant	0.68	0.54

A similar enzymatic activity was measured in fractions from crude extracts from *S. ambofaciens* ATCC23877 and from  $\Delta sam-AA$  mutant. On the contrary, a dramatic decrease in the enzyme activity was observed in the fractions collected from  $\Delta samL1383$  mutant. This result suggested that the product from *samL1383* gene would be an aminoacylase catalyzing the specific hydrolysis of N- $\epsilon$ -acetyl-L-lysine.

**Table 45 : Hydrolysis of N- $\alpha$ -acetyl-L-lysine in selected fractions resulting from the separation of the proteins of the crude extracts of *S. ambofaciens* wild type strain and mutants.**

Bacterial strain	Aminoacylase activity (mmol <sub>lys</sub> ·h <sup>-1</sup> ·g <sub>protein</sub> <sup>-1</sup> )	
	Fraction 5	Fraction 6
<i>S. ambofaciens</i> ATCC23877	2.9	1.8
$\Delta samL1383$ mutant	1.1	1.8
$\Delta sam-AA$ mutant	0.04	0

Although the enzyme activity was quite similar in the fractions from *S. ambofaciens* ATCC23877 and from  $\Delta samL1383$  mutant, a negligible activity was measured in the same fractions from a crude extract from  $\Delta sam-AA$  mutant. This result supported the hypothesis that the product from *sam-AA* would encode a second aminoacylase, different from the product of *sam-L1383* and specific for the hydrolysis of N- $\alpha$ -acetyl-L-lysine. This regio-selectivity of the enzyme encoded by *sam-AA* is surprising because the enzyme Sm-AA produced by *S. mobaraensis* was not able to catalyze N-acetyl-L-lysine hydrolysis (Koreishi *et al.*, 2009b).

To check the presence of another aminoacylase with specificity for the hydrolysis of N-  $\alpha$  or  $\epsilon$ -acetyl-L-lysine, a double mutant with the deletion of both *sam-AA* and *samL1383* was constructed. The aminoacylase activity of the crude extract from this mutant strain was analysed as previously (Table 46)

**Table 46 : Hydrolysis of N- $\alpha$ - or N- $\epsilon$ -acetyl-L-lysine by the crude extracts of *S. ambofaciens* wild-type strain and  $\Delta$ samL1383 $\Delta$ sam-AA mutant.**

Bacterial strain	Aminoacylase activity	
	(mmol <sub>lys</sub> .h <sup>-1</sup> .g <sub>protein</sub> <sup>-11</sup> )	
	N- $\alpha$ -acetyl-L-lysine	N- $\epsilon$ -acetyl-L-lysine
<i>S. ambofaciens</i> ATCC23877	0.13	0.11
$\Delta$ samL1383 $\Delta$ sam-AA mutant	0.02	0.03

The concomitant deletion of *samL1383* and *sam-AA* resulted in a dramatic decrease in the hydrolytic activity against both N- $\alpha$ - and N- $\epsilon$ -acetyl-lysine. The deletion of these two genes induced an 85% loss in the specific hydrolysis of N- $\alpha$ -acetyl-L-lysine and a 75% reduction of N- $\epsilon$ -acetyl-L-lysine hydrolysis. The presence of a residual activity in the culture supernatant of  $\Delta$ samL1383 $\Delta$ sam-AA mutant suggested that, at least, a third aminoacylase catalyzing the N- $\alpha$ - or N- $\epsilon$ -acetyl-lysine hydrolysis could be synthesized by this mutant strain. One candidate could be an enzyme similar to the short-chain-acyl aminoacylase previously found in *S. mobaraensis* (Koreishi *et al.*, 2005b).

## 2.5 Conclusion

Two aminoacylases catalyzing the hydrolysis of N-acetyl-L-lysine have been identified in *S. ambofaciens*. One, Sam-AA, similar to Sm-AA, presents a propensity for the  $\alpha$  amide bond hydrolysis of N- $\alpha$ -acetyl-L-lysine, and the second one, SamL1383, similar to Sm-eLA from *S. mobaraensis*, catalyzes mainly the hydrolysis of N- $\epsilon$ -acetyl-L-lysine. According to aminoacylase sequences from *S. mobaraensis*, two genes encoding aminoacylases were identified in *S. ambofaciens* genome: *samL1383* and *sam-AA*. A third enzyme, SamL890, similar to the product of the gene encoding the Sm-PVA in *S. mobaraensis* was also identified. SamL1383 and Sam-AA were the source of most of the hydrolytic activity of *S. ambofaciens* crude extract, however the presence of a third aminoacylase able to catalyze the hydrolysis of N- $\alpha$ - or N- $\epsilon$ -acetyl-L-lysine has been highlighted. These enzymes could also be responsible for the promising catalytic activity that was determined using lysine or SYK as acyl acceptors. However, further characterization and use of these enzymes will require the heterologous production of each of the aminoacylases identified in *S. ambofaciens*

ATCC23877, and their purification. This work is in progress in order to evaluate their ability to acylation reaction catalysis.

## 2.6 Acknowledgements

This work was supported by the “Structure Fédérative de Recherche Ecosystèmes Forestiers, Agroressources, Bioprocédés et Alimentation”. The authors would like to thank Cécile Ritt and Emilie Morel for their help in some of the manipulations.

## 2.7 References

- Aigle, B., Lautru, S., Spiteller, D., Dickschat, J.S., Challis, G.L., Leblond, P., and Pernodet, J.-L. (2014). Genome mining of *Streptomyces ambofaciens*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* *41*, 251–263.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* *72*, 248–254.
- Bunet, R., Mendes, M.V., Rouhier, N., Pang, X., Hotel, L., Leblond, P., and Aigle, B. (2008). Regulation of the Synthesis of the Angucyclinone Antibiotic Alpomycin in *Streptomyces ambofaciens* by the Autoregulator Receptor AlpZ and Its Specific Ligand. *J. Bacteriol.* *190*, 3293–3305.
- Bunet, R., Riclea, R., Laureti, L., Hotel, L., Paris, C., Girardet, J.-M., Spiteller, D., Dickschat, J.S., Leblond, P., and Aigle, B. (2014). A Single Sfp-Type Phosphopantetheinyl Transferase Plays a Major Role in the Biosynthesis of PKS and NRPS Derived Metabolites in *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877. *Plos One.* *9* (1), 1-12.
- Datsenko, K.A., and Wanner, B.L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 6640–6645.
- Ferrari, F., Paris, C., Maigret, B., Bidouil, C., Delaunay, S., Humeau, C., and Chevalot, I.

- (2014). Molecular rules for chemo- and regio-selectivity of *Candida antarctica* lipase B in peptide acylation reactions. *J. Mol. Catal. B Enzym.* *101*, 122–132.
- Gust, B., Challis, G.L., Fowler, K., Kieser, T., and Chater, K.F. (2003). PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 1541–1546.
- Kheder, F., Delaunay, S., Abo-Chameh, G., Paris, C., Muniglia, L., and Girardin, M. (2009). Production and biochemical characterization of a type B ferulic acid esterase from *Streptomyces ambofaciens*. *Can. J. Microbiol.* *55*, 729–738.
- Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F., and Hopwood, D.A. (2000). Practical *Streptomyces* Genetics. *Int. Microbiol.* *3*, 260–261.
- Koreishi, M., Kawasaki, R., Imanaka, H., Imamura, K., and Nakanishi, K. (2005a). A novel  $\epsilon$ -lysine acylase from *Streptomyces mobaraensis* for synthesis of N  $\epsilon$ -acyl-l-lysines. *J. Am. Oil Chem. Soc.* *82*, 631–637.
- Koreishi, M., Asayama, F., Imanaka, H., Imamura, K., Kadota, M., Tsuno, T., and Nakanishi, K. (2005b). Purification and characterization of a novel aminoacylase from *Streptomyces mobaraensis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *69*, 1914–1922.
- Koreishi, M., Zhang, D., Imanaka, H., Imamura, K., Adachi, S., Matsuno, R., and Nakanishi, K. (2006). A Novel Acylase from *Streptomyces mobaraensis* that Efficiently Catalyzes Hydrolysis/Synthesis of Capsaicins as Well as N-Acyl-l-amino Acids and N-Acyl-peptides. *J. Agric. Food Chem.* *54*, 72–78.
- Koreishi, M., Tani, K., Ise, Y., Imanaka, H., Imamura, K., and Nakanishi, K. (2007). Enzymatic synthesis of  $\beta$ -lactam antibiotics and N-fatty-acylated amino compounds by the acyl-transfer reaction catalyzed by penicillin V acylase from *Streptomyces mobaraensis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *71*, 1582–1586.
- Koreishi, M., Kawasaki, R., Imanaka, H., Imamura, K., Takakura, Y., and Nakanishi, K. (2009a). Efficient N $\epsilon$ -lauroyl-l-lysine production by recombinant  $\epsilon$ -lysine acylase from *Streptomyces mobaraensis*. *J. Biotechnol.* *141*, 160–165.
- Koreishi, M., Nakatani, Y., Ooi, M., Imanaka, H., Imamura, K., and Nakanishi, K. (2009b).

- Purification, Characterization, Molecular Cloning, and Expression of a New Aminoacylase from *Streptomyces mobaraensis* That Can Hydrolyze N-(Middle/Long)-chain-fatty-acyl-L-amino Acids as Well as N-Short-chain-acyl-L-amino acids. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *73*, 1940–1947.
- Mehmood, N., Olmos, E., Goergen, J.-L., Blanchard, F., Ullisch, D., Klöckner, W., Büchs, J., and Delaunay, S. (2011). Oxygen supply controls the onset of pristinamycins production by *Streptomyces pristinaespiralis* in shaking flasks. *Biotechnol. Bioeng.* *108*, 2151–2161.
- Montet, D., Servat, F., Pina, M., Graille, J., Galzy, P., Arnaud, A., Ledon, H., and Marcou, L. (1990). Enzymatic synthesis of N- $\epsilon$ -acyllysines. *J. Am. Oil Chem. Soc.* *67*, 771–774.
- Pang, X., Aigle, B., Girardet, J.-M., Mangenot, S., Pernodet, J.-L., Decaris, B., and Leblond, P. (2004). Functional Angucycline-Like Antibiotic Gene Cluster in the Terminal Inverted Repeats of the *Streptomyces ambofaciens* Linear Chromosome. *Antimicrob. Agents Chemother.* *48*, 575–588.
- Raynal, A., Karray, F., Tuphile, K., Darbon-Rongere, E., and Pernodet, J.-L. (2006). Excisable cassettes: New tools for functional analysis of *Streptomyces* genomes. *Appl. Environ. Microbiol.* *72*, 4839–4844.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (Cold Spring Harbor Laboratory).
- Soo, E., Salleh, A., Basri, M., Rahman, R.N.Z., and Kamaruddin, K. (2004). Response surface methodological study on lipase-catalyzed synthesis of amino acid surfactants. *Process Biochem.* *39*, 1511–1518.
- Ueda, S., Kinoshita, M., Tanaka, F., Tsuboi, M., Shimizu, S., Oohata, N., Hino, M., Yamada, M., Isogai, Y., and Hashimoto, S. (2011). Strain selection and scale-up fermentation for FR901379 acylase production by *Streptomyces* sp. no. 6907. *J. Biosci. Bioeng.* *112*, 409–414.
- Wada, E., Handa, M., Imamura, K., Sakiyama, T., Adachi, S., Matsuno, R., and Nakanishi, K. (2002). Enzymatic synthesis of N-acyl-L-amino acids in a glycerol-water system using acylase I from pig kidney. *J. Am. Oil Chem. Soc.* *79*, 41–46.



Zhang, D., Koreishi, M., Imanaka, H., Imamura, K., and Nakanishi, K. (2007). Cloning and characterization of penicillin V acylase from *Streptomyces mobaraensis*. *J. Biotechnol.* *128*, 788–800.

### **3 Contribution de l'article**

Cette étude a permis d'identifier 3 gènes présents chez *S. ambofaciens* codant pour des aminoacylases capables de catalyser l'acylation d'acides aminés et de peptides sur leur groupement amine en position N-terminale.

Dans un premier temps, la présence d'une activité aminoacylase au sein de l'extrait protéique brut du surnageant de culture de *S. ambofaciens* a été confirmée avec l'hydrolyse de N- $\alpha$  et de N- $\epsilon$ -acétyl-lysine. Des activités spécifiques d'hydrolyses de 0,13 mmol Lys.h<sup>-1</sup>.g de protéine<sup>-1</sup> ont été calculées pour l'hydrolyse de N- $\alpha$ -acétyl-lysine et de 0,11 mmol Lys.h<sup>-1</sup>.g de protéine<sup>-1</sup> pour l'hydrolyse de N- $\epsilon$ -acétyl-lysine. La régio-sélectivité de l'extrait protéique brut du surnageant de culture de *S. ambofaciens* a également été reconfirmée pour la synthèse de molécules acylées sur l'amine primaire portée par le carbone  $\alpha$  à travers l'acylation de la lysine et du tripeptide SYK avec de l'acide oléique.

Dans un deuxième temps, une semi-purification des protéines du surnageant de culture de *S. ambofaciens* a été réalisée par chromatographie semi-préparative échangeuse d'ions. Cette semi-purification a révélé une séparation des activités régio-sélectives d'hydrolyse. L'activité hydrolytique  $\alpha$ -aminoacylase est retrouvée principalement dans les fractions 5 et 6 avec des activités spécifiques respectives de 2,9 et 1,8 mmol Lys.h<sup>-1</sup>.g de protéine<sup>-1</sup>, alors que l'activité hydrolytique  $\epsilon$ -aminoacylase se retrouve principalement dans les fractions 3 et 4 avec des activités spécifiques respectives de 0,49 et 0,45 mmol Lys.h<sup>-1</sup>.g de protéine<sup>-1</sup>. Cette séparation implique la présence d'au moins deux enzymes différentes de type aminoacylases dans le surnageant de culture de *S. ambofaciens*, l'une responsable de l'activité hydrolytique du groupement acétyl porté par l'amine en position N-terminale, et l'autre catalysant l'hydrolyse du groupement acétyl porté par la chaîne latérale de la lysine.

Dans un troisième temps, une comparaison de séquence génétique a été réalisée avec une analyse tblastn entre le génome de *S. ambofaciens* et 3 aminoacylases précédemment caractérisées d'un point de vue génétique chez *S. mobaraensis*. 3 séquences génétiques de *S.*

*ambofaciens* codent pour 3 produits possédant une forte homologie avec les 3 enzymes de *S. mobaraensis* :

- SamL0890 présente 78% de similitude avec Sm-PVA
- SamL1383 présente 85% de similitude avec Sm-eLA
- Une séquence nommée Sam-AA présente 93% de similitude avec la séquence protéique Sm-AA.

Une quatrième séquence possédant une homologie avec Sm-AA d'une similitude de 65%, suggère l'existence d'une quatrième enzyme de type aminoacylase produite par *S. ambofaciens*. Un candidat possible pour cette dernière enzyme serait l'enzyme de *S. mobaraensis* catalysant l'acylation d'acide aminés avec des acides gras à courtes chaîne dont le gène n'a pas été identifié (Koreishi *et al.*, 2005b).

Pour corrélérer l'identification de ces séquences génétiques à l'activité aminoacylase de l'extrait protéique issu de l'extrait brut de culture de *S. ambofaciens*, 2 simples mutants délétés en phase pour les gènes *samL1383* et *sam-AA* et un mutant délété en phase pour les deux gènes *samL1383* et *sam-AA* ont été construits. Aucun mutant n'a été construit pour l'enzyme SamL0890 car son homologue Sm-PVA ne présente pas d'activité hydrolytique aminoacylase pour les substrats N- $\alpha$ / N- $\epsilon$  -acétyl-lysine. Les extraits protéiques bruts des surnageants de culture de ces mutants  $\Delta$ *samL1383* :: scar,  $\Delta$ *sam-AA* :: scar et  $\Delta$ *samL1383* :: scar  $\Delta$ *sam-AA* :: scar ont subi une semi-purification par chromatographie semi-préparative échangeuse d'ions, et les activités hydrolytiques  $\alpha$ - et  $\epsilon$ -aminoacylases ont été calculées pour les fractions 3, 4, 5 et 6 de chaque extrait protéique brut. Il ressort de cette analyse que le mutant  $\Delta$ *samL1383* :: scar conserve une activité hydrolytique  $\alpha$ -aminoacylase comparable à celle de la souche sauvage dans les fractions 5 et 6 (respectivement 1,1 et 1,8 mmol Lys.h<sup>-1</sup>.g de protéine<sup>-1</sup>) mais perd en revanche l'activité hydrolytique  $\epsilon$ -aminoacylase des fractions 3 et 4 (respectivement 0,02 et 0,02 mmol Lys.h<sup>-1</sup>.g de protéine<sup>-1</sup>). Cette perte d'activité confirme bien une production d'aminoacylase ayant une activité hydrolytique  $\epsilon$ -aminoacylase du gène *samL1383*. Le mutant  $\Delta$ *sam-AA* :: scar conserve, lui, une activité  $\epsilon$ -aminoacylase similaire à la souche sauvage de *S. ambofaciens* dans les fractions 3 et 4 (respectivement 0,68 et 0,54 mmol Lys.h<sup>-1</sup>.g de protéine<sup>-1</sup>) et perd l'activité hydrolytique  $\alpha$ -aminoacylase des fractions 5 et 6 (respectivement 0,04 et 0 mmol Lys.h<sup>-1</sup>.g de protéine<sup>-1</sup>). Cette perte d'activité suggère que *sam-AA* code une enzyme de type aminoacylase catalysant spécifiquement l'hydrolyse du N- $\alpha$ -acétyl-lysine. Cette régio-sélectivité est remarquable car l'enzyme Sm-AA produite par *S. mobaraensis* n'est pas capable de catalyser l'hydrolyse de lysine N-acétylée. La délétion des deux gènes *samL1383* et *sam-AA* induit une perte d'activité hydrolytique  $\alpha/\epsilon$ -aminoacylase de

l'extrait protéique du surnageant de culture du double mutant  $\Delta samL1383 :: scar \Delta sam-AA :: scar$ , avec une réduction de 85% de l'activité hydrolytique  $\alpha$ -aminoacylase ( $0,02 \text{ mmol Lys.h}^{-1} \cdot \text{g de protéine}^{-1}$ ) et de 75% de l'activité  $\epsilon$ -aminoacylase ( $0,03 \text{ mmol Lys.h}^{-1} \cdot \text{g de protéine}^{-1}$ ). L'activité résiduelle observée peut être imputée à l'enzyme ayant une séquence génétique similaire à 65% à Sm-AA.

#### **4 Résultats complémentaires**

Dans le cadre d'un stage de master II recherche, une expression hétérologue du gène *samL1383* a été initiée chez *P. pastoris* X33. La séquence génétique du gène à cloner a du être optimisée en raison d'une différence d'usage de codons *S. ambofaciens* et de *P. pastoris*, le génome de *S. ambofaciens* étant plus riche en cytosine et en guanine. L'optimisation de *samL1383* a été réalisée par la société GeneArt. Deux sites de restriction ont également été ajoutés en amont et en aval de *samL1383* pour permettre son insertion dans un vecteur de transfert. Les sites de restriction sont : *EcoRI* en amont et *NotI* en aval (Figure 66).

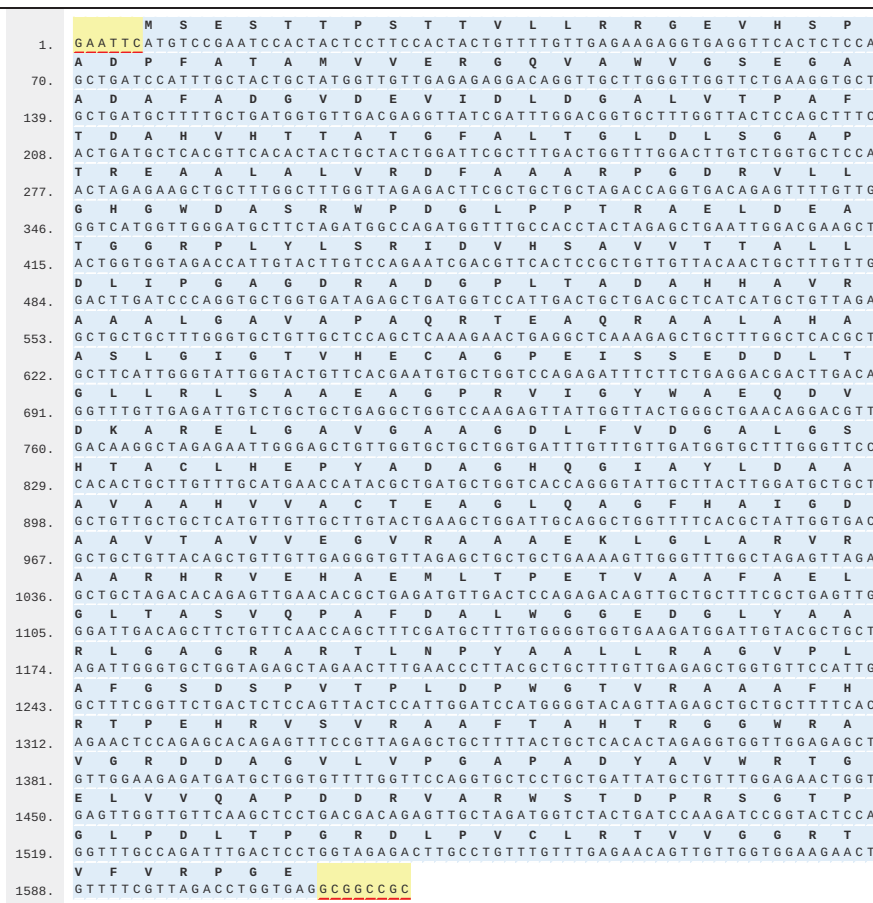


Figure 66 : Séquence *samL1383* optimisée pour une expression hétérologue chez *P. pastoris* fournies par GeneArt. Les sites de restrictions ajoutés sont surlignés en jaune et soulignés en rouge.

Le plasmide commercialisé pPICZ $\alpha$ A (3329 pb) a été choisi comme vecteur plasmidique. Ce vecteur est constitué du promoteur de AOX1 (alcool oxydase) permettant l'expression du gène d'intérêt grâce à une induction au méthanol, d'un signal d'excrétion de la protéine recombinante et d'un gène de résistance à la zéocine (ZeoR), qui permet la sélection des clones ayant intégré le plasmide. La construction de ce plasmide a également été effectuée par la société GeneArt.

Pour confirmer l'intégration de *samL1383*, une PCR sur clones est effectuée sur différents clones capables de se développer sur le milieu YPD gélosé avec zéocine. 27 clones ont ainsi été testés. Les amorces utilisées étant spécifiques du gène *samL1383*, le produit attendu a une taille théorique de 1633 pb. Pour les clones n° 2, 8 et 9, une bande aux alentours de 1650 pb, correspondant donc à la taille de *samL1383*, est présente (Figure 67).

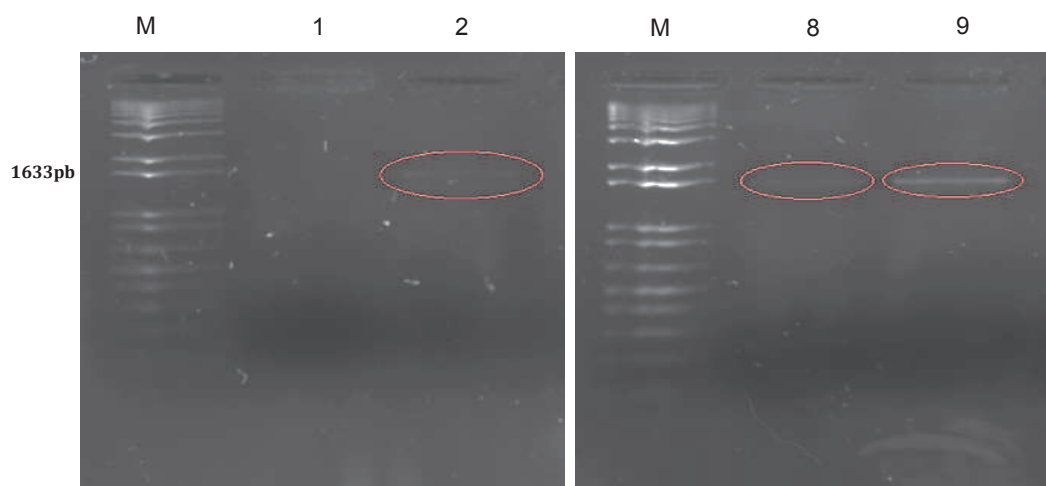
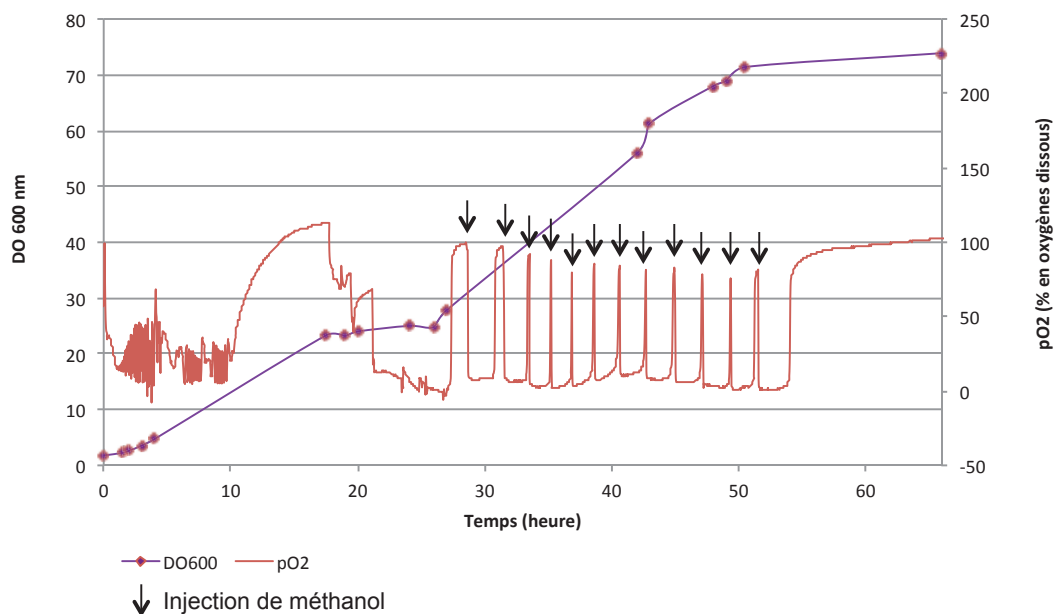


Figure 67 : Electrophorèse des produits de PCR des clones 2, 8 et 9 avec les amorces spécifiques de *samL1383*

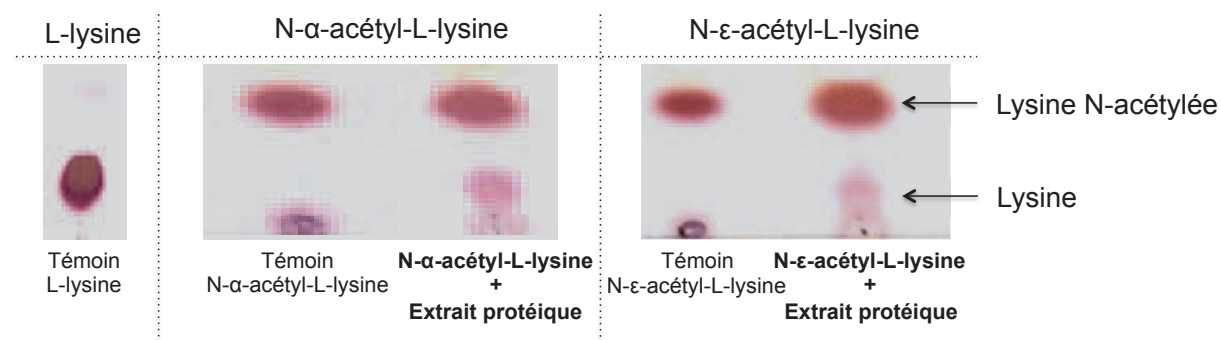
Le gène *samL1383* a donc été intégré dans le génome de *P. pastoris* pour les clones à l'origine de ces colonies.

Des cultures en fioles d'Erlenmeyer ont été réalisées dans le milieu BMGY et le clone n°8 s'est révélé être le plus intéressante en termes de production d'aminocyclase. Une culture en bioréacteur avec ajout discontinu de méthanol dans le milieu BMGY durant 70 heures a alors été réalisée. Le suivi de la concentration en oxygène dissous au court du temps a permis de mesurer l'évolution de la consommation en oxygène. A chaque augmentation de pO<sub>2</sub>, traduisant une baisse d'activité métabolique, un ajout de méthanol a été effectué afin d'atteindre une concentration de 1% (v/v) dans le réacteur. L'absorbance à 600 nm atteinte en fin de culture est d'environ 75 (Figure 68).



**Figure 68 :** Variation du pourcentage d'oxygène dissous ainsi que de la  $DO_{600}$  au cours du temps lors de la culture du clone 8 de *P. pastoris* transformée dans le milieu BMGY en bioréacteur instrumenté.

En fin de culture, un extrait protéique d'une concentration de  $2,4 \text{ g de protéine} \cdot \text{L}^{-1}$  est constitué à partir du surnageant de culture en suivant le même protocole que pour le surnageant de culture de *S. ambofaciens*. L'activité hydrolytique de type aminoacylase de cet extrait a été testé sur les substrats N- $\alpha$ -acétyl-L-lysine et N- $\epsilon$ -acétyl-L-lysine (Figure 69).



**Figure 69 :** Hydrolyse de N- $\alpha/\epsilon$ -acétyl-L-lysine par l'extrait protéique issu du surnageant de culture du clone 8 de *P. pastoris* modifié pour la production de SamL1383 après 24 h de réaction à  $37^\circ\text{C}$ .

Les résultats de ces hydrolyses montrent qu'une activité hydrolytique aminoacylase est retrouvée pour le substrat N- $\alpha$ -acétyl-L-lysine et comme pour le substrat N- $\epsilon$ -acétyl-L-lysine.

Une production hétérologue de SamL1383 a donc bien lieu. Cependant, la sélectivité de l'enzyme semble être modifiée car une affinité pour l'hydrolyse de N- $\alpha$ -acétyl-L-lysine est apparue. Il serait donc intéressant de purifier cette enzyme afin de la caractériser et de la comparer à son homologue produite par *S. ambofaciens*. Il faudrait également réaliser après la purification de l'enzyme, une suppression de son étiquette poly-histidine, suivie de réactions d'hydrolyse avec l'enzyme avec et sans Tag afin de vérifier si le changement de régio-sélectivité pourrait être lié à la présence de cette étiquette.

## 5 Conclusion

Dans cette partie de nos travaux, plusieurs enzymes de type aminoacylases ont pu être mises en évidence chez *S. ambofaciens* de spécificités différentes. Une comparaison de séquences peptidique a été réalisée en comparant les 3 aminoacylases décrites chez *S. mobaraensis* par Koreishi *et al* (2005a, 2005b, 2006, 2009a, 2009b) avec le génome de *S. ambofaciens*. 3 séquences génétiques ont pu être identifiées dans le génome de *S. ambofaciens* correspondant aux 3 enzymes décrites chez *S. mobaraensis* :

- SamL0890 présentant 78% de similitude avec Sm-PVA
- SamL1383 présentant 85% de similitude avec Sm-eLA
- une séquence nommée Sam-AA présentant 93% de similitude avec la séquence peptidique Sm-AA.

Une 4<sup>ième</sup> séquence possédant une homologie avec Sm-AA de 65%, suggère l'existence d'une dernière enzyme de type aminoacylase chez *S. ambofaciens*. Cette enzyme est probablement similaire à l'aminacylase non séquencée de *S. mobaraensis* catalysant l'acylation d'acide aminés avec des acides gras à courtes chaînes (Koreishi *et al.*, 2005b). La construction de mutants délétés pour les séquences génétiques de SamL1383 et SamL-AA a permis de valider la fonctionnalité des gènes identifiés. Un double mutant délété à la fois pour SamL1383 et SamL-AA a démontré la présence d'une activité de type aminoacylase résiduelle, probablement due à la 4<sup>ième</sup> enzyme non séquencée. Aucun mutant n'a été construit pour l'enzyme SamL-0890 car son homologue Sm-PVA ne présente pas d'activité hydrolytique aminoacylase pour les substrats N- $\alpha$ / N- $\epsilon$ -acétyl-lysine.

Une expression hétérologue a ensuite été initiée chez *P. pastoris* X33 avec l'enzyme SamL1383. Un plasmide contenant le gène de SamL-1383, ainsi qu'un promoteur inductible au méthanol a été construit et plusieurs clones de *P. pastoris* ont été transformés avec ce

plasmide. 27 clones ont intégré ce nouveau gène. Le clone la plus forte activité aminoacylase sur le milieu de culture BMGY a été mis en culture dans un réacteur instrumenté pour une production massive de SamL1383. Un extrait protéique brut a été réalisé à partir de ce clone transformé et une activité aminoacylase a été détectée pour les substrat N- $\epsilon$ -acétyl-L-lysine et N- $\alpha$ -acétyl-L-lysine. Une production hétérologue de Sam 1383 a donc bien lieu, mais la sélectivité de l'enzyme semble être modifiée car une affinité pour l'hydrolyse de N- $\alpha$ -acétyl-L-lysine est apparue.

Une suite à cette étude consisterait bien entendu, à continuer la caractérisation des nouvelles enzymes identifiées dans le génome de *S. ambofaciens*. Il est pour cela indispensable de les obtenir en quantité importante et une production hétérologue semble être une solution adaptée. Une production hétérologue chez d'autres micro-organismes hôtes tels que *E. coli* ou *S. lividans* peut être envisagée. Cependant, une des étapes du protocole de production de protéine par voie hétérologue consiste à cribler de nombreux clones transformés avec le plasmide afin de sélectionner celui exprimant le plus la protéine d'intérêt. Cette étape est actuellement très fastidieuse car le traitement des surnageants de culture pour obtenir des extraits protéiques, ainsi que l'analyse de l'activité hydrolytique de ces extraits protéiques limite le nombre de clones qui peut être tester. Il faudrait donc mettre au point une technique de préparation des échantillons ainsi qu'un test d'activité aminoacylase plus rapide permettant un criblage d'un nombre élevé de clones transformés.

L'étude de l'enzyme produite par le clone de *P. pastoris* transformé serait également intéressante pour identifier la source du changement de régio-sélectivité observée. Dans un premier temps, il faut vérifier la séquence génétique du gène inséré chez le clone de *P. pastoris* produisant cette enzyme. Ensuite, une suppression de son étiquette poly-histidine et une comparaison des sélectivités d'hydrolyse catalysées par l'enzyme avec et sans étiquette, permettraient de vérifier s'il existerait un impact de cette queue histidine sur la sélectivité de l'enzyme.



## **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

---

Cette thèse avait pour objectif d'étudier la sélectivité d'acylation enzymatique de peptides par des approches combinées expérimentales et de modélisation, ainsi que la recherche et la description de nouveaux biocatalyseurs. Dans un premier temps, suite à des travaux antérieurs au sein du LRGP qui avaient mis en évidence une chimio- et une régio-sélectivité lors de réactions d'acylation de dipeptides catalysées par CALB, l'étude a porté sur l'identification des règles de régio- et la chimio-sélectivité de CALB pour l'acylation de peptides avec de l'acide oléique en solvant organique dans le but de construire un modèle prédictif des potentialités d'acylation de l'enzyme. Dans un deuxième temps, afin de catalyser la réaction d'acylation de peptides en milieux aqueux, de nouvelles acylases ont été recherchées chez les bactéries du genre *Streptomyces*. Dans un troisième et dernier temps, les gènes responsables de la synthèse de ces nouvelles enzymes ont été identifiés.

Ces objectifs peuvent se résumer avec les questions suivantes :

- Quelles sont les règles de régio- et de chimio-sélectivité pour l'acylation de peptides catalysée par CALB en solvant organique ? Peut-on expliquer et prédire ces propriétés de sélectivité enzymatique par des approches de modélisation moléculaire ?
- Des bactéries appartenant au genre *Streptomyces* peuvent-elles constituer une source de nouvelles protéines de type aminoacylase capables de catalyser l'acylation de peptides en milieux aqueux ?
- Quelles sont les protéines responsables de l'activité aminoacylase observée dans le surnageant de culture de *Streptomyces ambofaciens*, espèce sélectionnée parmi plusieurs *Streptomyces* ?

Les principaux résultats sont synthétisés ci-dessous.

## **1 Quelles sont les règles de régio- et de chimio-sélectivité pour l'acylation de peptides catalysée par CALB en solvant organique ? Peut-on expliquer et prédire ces propriétés de sélectivité enzymatique par des approches de modélisation moléculaire ?**

Pour répondre à cette question, un modèle d'« acyl-enzyme » permettant l'étude de la chimio- et la régio-sélectivité de CALB a été construit. Ce modèle permet de simuler l'acylation de

molécules polyfonctionnelles avec de l'acide oléique catalysée par CALB. La construction de ce modèle a été réalisée, dans un premier temps, en fixant une chaîne oléoyle (le donneur d'acyle) à la sérine catalytique de CALB. Cette structure appelée « acyl-enzyme » correspond au premier intermédiaire tétraédrique du mécanisme de catalyse de CALB. Dans un deuxième temps, le comportement de cet « acyl-enzyme » a été simulé dans un environnement aqueux en réalisant deux dynamiques moléculaires de 100 ns ; Dans un troisième et dernier temps, une conformation adoptée par « l'acyl-enzyme » lors des trajectoires de dynamique a été identifiée comme la plus propice pour catalyser la réaction d'acylation.

Cette conformation fonctionnelle a été utilisée comme cible pour le docking de différents peptides dans le but d'identifier les règles de régio- et de chimio-sélectivité de CALB.

Les résultats ont permis de mettre en évidence que CALB possède une plus grande affinité d'acylation pour les groupements hydroxyles et pour des groupements amines, comme le montre la simulation de docking avec le 6-amino-1-hexanol. Cependant, la forme et la profondeur de la cavité du site actif de CALB limite l'accès des résidus catalytiques à des groupements stériquement encombrés dans la structure du ligand. Seuls des groupements situés au bout de chaînes carbonées linéaires semblent capables d'atteindre la triade catalytique de CALB. Ainsi une acylation systématique du groupement amine de la chaîne latérale de la lysine des peptides est observée contrairement aux groupements amines situés en position N-terminale. Ces spécificités d'acylation prédites par les analyses de docking ont été confirmées expérimentalement. Cette méthodologie de modélisation a permis de prédire l'acylation majoritaire de peptides pour lesquels un conflit d'acylation entre des groupements amines et hydroxyles pouvait avoir lieu.

Elle ne permet cependant pas de prévoir les sites d'acylation minoritaire, comme l'acylation de la sérine du peptide Ser-Tyr-Lys.

Afin d'améliorer les performances du modèle « acyl-enzyme » et d'affiner son potentiel prédictif, plusieurs solutions peuvent être envisagées.

Tout d'abord, de nouvelles dynamiques moléculaires peuvent être réalisées afin de parcourir l'ensemble de l'espace conformationnel de « l'acyl-enzyme » pour identifier d'autres conformations fonctionnelles pour la catalyse d'une acylation. Deux stratégies peuvent être envisagées ; l'espace conformationnel peut être parcouru soit avec des dynamiques moléculaires longues de plusieurs centaines de nanosecondes voire de l'ordre de la milliseconde, soit avec des dynamiques moléculaires plus courtes mais plus nombreuses, en partant de différents jeux de coordonnées initiales. Parmi toutes les conformations adoptées par « l'acyl-enzyme » de CALB lors des différentes trajectoires de dynamiques, la

conformation apparaissant le plus grand nombre de fois constituera une nouvelle cible de docking.

Les dynamiques moléculaires de ces travaux ont été simulées en environnement aqueux. Or, les réactions sont conduites en milieu organique. Il serait intéressant de mener les simulations dans des environnements se rapprochant des solvants organiques utilisés pour les réactions de synthèse de molécules acylées comme le M<sub>2</sub>B<sub>2</sub>. En effet, le solvant est susceptible d'induire des changements conformationnels au niveau de la structure de l'enzyme et peut également influencer les modes d'interactions avec les substrats.

En outre, les modèles moléculaires pourraient sans doute être améliorés par des simulations de dynamique moléculaire post-docking permettant la prise en compte d'éventuels "induced fit effects". Ceux-ci désignent l'ajustement conformationnel de la structure de l'enzyme en présence des substrats. Il serait également intéressant de tester d'autres ligands comme des peptides comprenant des acides aminés ayant une longue chaîne latérale comme l'arginine, ou un analogue de la lysine ayant un groupe hydroxyle à la place du groupement amine sur la chaîne latérale.

Enfin, afin de vérifier l'hypothèse d'un éventuel transfert d'acyle O-N de la chaîne latérale de la sérine vers la fonction amine N-terminale, une réaction d'acylation de Ser-Tyr-Lys pourrait être réalisée en bloquant ce groupement amine avec, par exemple, un groupement acétyle et en étudiant la possibilité d'acyler la fonction hydroxyle. Des calculs quantiques pourraient également être menés pour étudier la faisabilité d'un tel transfert ou pour vérifier si une N-acylation directe pourrait avoir lieu.

## **2 Des bactéries appartenant au genre *Streptomyces* peuvent-elles constituer une source de nouvelles protéines de type aminoacylase capables de catalyser l'acylation de peptides en milieux aqueux ?**

Les activités aminoacylases dans des surnageants de culture des espèces de *S. ambofaciens* et *S. pristinaespiralis* ont été évaluées. Des activités d'hydrolyse de lysines acétylées sur leurs groupements amines ont été mises en évidence pour ces deux espèces. Toutefois, seuls les surnageants de culture de *S. ambofaciens* présentent une activité de synthèse de lysine acylée avec de l'acide oléique. Les synthèses de peptides acylés catalysées par le surnageant de culture de *S. ambofaciens* montrent une acylation régio-sélective majoritairement sur le groupement amine situé en position N-terminale pour tous les peptides étudiés (Lys-Ser, Lys-

Tyr-Ser, Ser-Tyr-Lys, Leu-Gln-Lys-Trp) et une acylation minoritaire sur le groupement hydroxyle de la chaîne latérale de la sérine. Ces protéines de types aminoacylase ne catalysent cependant pas l'acylation du groupement amine de la chaîne latérale de la lysine présente dans ces peptides, de même, aucune di-acylation n'est observée. Les protéines de l'extrait du surnageant de culture de *S. ambofaciens* possède donc une sélectivité d'acylation originale par rapport à celle de CALB.

La recherche d'un milieu de culture permettant de maximiser l'activité hydrolytique du surnageant de culture de *S. ambofaciens* a montré que le milieu développé par l'équipe de Koreishi était le plus adéquat. Les protéines de type aminoacylase semblent être principalement intracellulaires même si elles peuvent se retrouver dans le milieu extracellulaire après 5 à 7 jours de culture suite à une lyse cellulaire. Les conditions optimales d'hydrolyse des aminoacylases présentes dans le surnageant de culture de *S. ambofaciens* ATCC 23877 sont une température entre 40°C et 45°C et un pH de 8.

Pour continuer les travaux sur la production de protéines de type aminoacylases produites par *S. ambofaciens*, un milieu de culture synthétique équivalent en terme de production d'aminacylases à celui de l'équipe de Koreishi doit être développé. Ce dernier générant beaucoup de mousse et contenant de nombreuses particules insolubles limite son utilisation en bioréacteurs. Il serait, de plus, intéressant de s'affranchir de l'utilisation de composés tel que l'extrait de viande dont la présence rend complexe le procédé de purification de protéines. Une fois l'élaboration d'un milieu de culture optimal effectué, il serait intéressant de déterminer le rôle physiologique de ces acylases chez *S. ambofaciens*. Ce dernier fournirait des clefs de compréhension supplémentaires quant à la sélectivité de ces enzymes.

La régio-sélectivité de l'acylation d'acide aminé et de peptide de ces enzymes est très intéressante car étant spécifique du groupement amine en position N-terminale, elle permet l'acylation de n'importe quel peptide indifféremment de la séquence peptidique, contrairement à une enzyme commerciale telle que CALB dont les régio- et chimio-sélectivités plus strictes peuvent limiter les potentialités d'acylation. Il est toutefois indispensable de réaliser un criblage sur l'ensemble des acides aminés et sur des peptides plus longs pour confirmer cette sélectivité.

Enfin, puisque de nouvelles activités aminoacylases ont été découvertes chez des espèces de *Streptomyces* autres que *mobarraensis*, il serait nécessaire de vérifier la présence d'une telle activité pour d'autres espèces. Un criblage de plus grande ampleur pourrait être envisagé.

### **3 Quelles sont les protéines responsables de l'activité aminoacylase observée dans le surnageant de culture de *Streptomyces ambofaciens*, espèce sélectionnée parmi plusieurs *Streptomyces* ?**

Une séparation des activités hydrolytiques du surnageant de culture de *S. ambofaciens* a été réalisée par chromatographie préparative échangeuse d'anions forts (Q-Sépharose). Une analyse de l'activité spécifique des fractions obtenues a mis en évidence un découplage de l'activité hydrolytique spécifique des liaisons amides N-terminales, de l'activité hydrolytique des liaisons amides portés par le carbone  $\epsilon$  de la lysine. Sur les 10 fractions obtenues, les fractions 5 et 6 montrent une activité spécifique forte pour l'hydrolyse de la N- $\alpha$ -acétyl-L-lysine (respectivement 2,9 et 1,8 mmLys.h<sup>-1</sup>.g protéines<sup>-1</sup>) et une activité plus faible pour l'hydrolyse de la N- $\epsilon$ -acétyl-L-lysine (respectivement 0,13 et 0,09 mmLys.h<sup>-1</sup>.g protéines<sup>-1</sup>). Les fractions 3 et 4 présentent, quant à elles, une activité spécifique hydrolytique forte pour l'hydrolyse de la N- $\epsilon$ -acétyl-L-lysine (respectivement 0,49 et 0,45 mmLys.h<sup>-1</sup>.g protéines<sup>-1</sup>) et une activité spécifique hydrolytique faible pour l'hydrolyse de la N- $\alpha$ -acétyl-L-lysine (respectivement 0,05 et 0,06 mmLys.h<sup>-1</sup>.g protéines<sup>-1</sup>). Cette séparation protéique a donc révélé la présence d'au moins 2 protéines aux activités hydrolytiques différentes. De même, une comparaison de séquences génétiques entre *S. ambofaciens* et *S. mobaraensis* a permis de mettre en évidence 4 séquences, pouvant correspondre à des gènes d'aminocyclases dans le génome de *S. mobaraensis* à 3 acylases :

- *samL1383* qui possède 80% de similitude avec le gène de *S. mobaraensis* codant l'acylase Sm-eLA (Koreishi *et al.*, 2005a, 2009b). Cette enzyme catalyse spécifiquement l'hydrolyse de la liaison amide en position  $\epsilon$  de la N- $\epsilon$ -acétyl-L-lysine.
- *sam-AA* possède 86% de similitude avec le gène de *S. mobaraensis* qui code l'enzyme Sm-AA (Koreishi *et al.*, 2009a).
- *samL0890* possédant une similitude de 69% avec le gène de *S. mobaraensis* codant la pénicilline V acylase : Sm-PVA (Koreishi *et al.*, 2006, 2007; Zhang *et al.*, 2007) qui n'hydrolyse pas les liaisons amides de lysines N-acétylées sur leurs groupements amines.
- Une séquence possédant une similitude de 65% avec l'aminocyclase Sm-AA qui correspondrait à l'aminocyclase non-séquencée de *S. mobaraensis* décrite par Koreishi *et al.* (2005b).

Trois mutants de *S. ambofaciens* ont été construits : deux mutants, chacun délété pour *samL1383* ou pour *sam-AA* et un mutant délété pour les deux gènes à la fois. La mise en culture de ces mutants a révélé une perte de 75% de l'activité hydrolytique pour les liaisons amides en position  $\epsilon$  de la N- $\epsilon$ -acétyl-L-lysine pour le mutant  $\Delta$  *samL1383* par rapport à la souche sauvage, ainsi qu'une perte de 85% de l'activité hydrolytique pour la liaison amide portée par le carbone  $\alpha$  de la N- $\alpha$ -acétyl-L-lysine pour le mutant  $\Delta$  *sam-AA*. L'analyse du surnageant de culture de mutant délété pour les deux gènes présente une activité hydrolytique résiduelle totale faible vis-à-vis des lysines N-acétylées sur leurs groupements amines. Une perte d'activité spécifique d'hydrolyse de 85% est observée pour l'hydrolyse de lysine N-acétylée sur le groupement amine situé en position N-terminale avec une activité résiduelle de 0,02 mmLys.h<sup>-1</sup>.g protéines<sup>-1</sup> et une diminution de 75% est observée pour l'hydrolyse de N- $\epsilon$ -acétyl-L-lysine avec une activité spécifique hydrolytique résiduelle de 0,03 mmLys.h<sup>-1</sup>.g protéines<sup>-1</sup>. Cette activité résiduelle peut s'expliquer par la quatrième enzyme de *S. ambofaciens* correspondant à l'enzyme de *S. mobaraensis* non séquencée par l'équipe de Koreishi *et al.* (2005b). Pour compléter cette étude, il serait donc intéressant d'identifier cette enzyme et de caractériser la pénicilline acylase issue de *samL0890* en la comparant à Sm-PVA issue de *S. mobaraensis*.

Pour donner suite à la mise en évidence de nouvelles aminoacylases, il est nécessaire de produire ces nouvelles enzymes en quantité et de les purifier pour ensuite les caractériser. Pour ce faire, une expression hétérologue a été initiée chez *P. pastoris* X33 avec l'enzyme SamL1383. Un plasmide contenant notamment le gène de *samL1383*, ainsi qu'un promoteur induit par le méthanol a été construit et 27 clones ayant intégré ce nouveau gène ont été testés. Le clone possédant la plus forte activité a été mis en culture dans un réacteur instrumenté. Un extrait protéique brut a été réalisé avec le surnageant de culture de ce clone transformé et une activité aminoacylase a été détectée pour les substrats N- $\alpha$ -acétyl-L-lysine et N- $\epsilon$ -acétyl-L-lysine. Une production hétérologue de SamL1383 a donc bien lieu, mais la sélectivité de l'enzyme semble être modifiée car une affinité pour l'hydrolyse de N- $\alpha$ -acétyl-L-lysine est apparue. Il serait donc intéressant de purifier cette enzyme afin de la caractériser et de la comparer à son homologue produite par *S. ambofaciens*. Il faudrait également réaliser après la purification de l'enzyme, une suppression de son étiquette poly-histidine, suivie de réactions d'hydrolyse avec l'enzyme avec et sans cette étiquette afin d'identifier la source de ce changement de régio-sélectivité. Il serait également intéressant de tester d'autres optimisations de *samL1383* pour une expression chez *P. pastoris*. D'autres souches de cette

dernière pourraient également être testées. L'utilisation de promoteur de type constitutif pour coder le gène d'intérêt, comme pGAP par exemple, peut être aussi envisagée. Toutefois, un des verrous les plus importants à lever pour l'expression hétérologue de ces protéines recombinantes est le faible nombre de clones testés. En effet, dans cette étude seuls 27 clones ont été testés car la préparation et le test des échantillons de surnageant de culture d'un clone nécessite une précipitation des protéines, suivie d'une dialyse, d'une concentration éventuelle des protéines et d'une hydrolyse de 24h. Ce protocole, lourd, empêche un criblage important de clones transformés contenant la séquence génétique de SamL1383. Une méthode plus simple et plus rapide doit être élaborée afin d'identifier un clone exprimant en quantité la protéine d'intérêt. Cette méthode pourrait être l'hydrolyse d'une molécule libérant un composé chromogène.

Lorsque ces enzymes seront produites en quantité et purifiées, l'identification de leurs caractéristiques réactionnelles comme leur couple pH/ température optimal et l'identification de l'ion métallique associé à leur structure devront être effectuées. Leur sélectivité devra également être étudiée avec un criblage d'acylation de divers acides aminés. L'influence de la longueur de la chaîne acylant ces acides aminés devra également être évaluée car généralement les aminoacylases catalysent la réaction d'hydrolyse de molécules acylées soit avec des donneurs d'acyles à courtes chaînes carbonées, soit avec des donneurs d'acyle à moyennes et longues chaînes carbonées. En parallèle de l'identification de la sélectivité des acylases par voie expérimentale, les enzymes étant produites en quantité importante et purifiées, il serait pertinent de réaliser une cristallisation de ces protéines. Aujourd'hui très peu d'acylases autres que les pénicilline-acylases ont été cristallographiées, le site actif des aminoacylases ainsi que leur mécanisme de catalyse restent inconnus.

A plus long terme, une fois ces enzymes caractérisées, cristallographiées et leurs règles de sélectivités identifiées, la construction d'une banque de cible de docking pourrait être envisagée. Elle serait constituée d'acyl-enzymes issus de plusieurs biocatalyseurs ayant des sélectivités différentes comme CALB et les aminoacylases de *Streptomyces*. Cette banque permettrait une utilisation de type « boîte à outils » des cibles de docking afin de répondre à des besoins d'acylation spécifiques de peptides bioactifs. Une enzyme catalysant une acylation d'un groupement précis pourrait ainsi être identifiée rapidement et à coûts réduits à travers une analyse de docking.



L'un des défis des industries pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires est de limiter l'utilisation de la chimie dite « lourde » pour se tourner vers la chimie verte. La biocatalyse est l'une des solutions possibles pour s'affranchir des procédés chimiques actuels, polluants. En effet, l'utilisation d'enzymes permet comme nous l'avons démontré, de catalyser l'acylation de peptides de manière sélective dans des conditions réactionnelles respectueuses de l'environnement. La modélisation moléculaire est un domaine scientifique jeune, de plus en plus reconnu par la communauté scientifique, comme le prouve la remise du prix Nobel de chimie 2013 à Martin Karplus. Ce domaine pourrait apporter des pistes de réflexion pour faciliter l'utilisation d'enzymes au sein de procédés industriels car la modélisation moléculaire permet, en effet, de simuler le comportement de molécules et d'observer le mécanisme de réactions chimiques. A travers nos travaux, il a été montré que l'utilisation de la modélisation moléculaire permet de comprendre et de prévoir la régio- et la chimio-sélectivité de CALB.

Des approches expérimentales enzymatiques couplées à la modélisation moléculaire permettent donc d'offrir une nouvelle voie pour la synthèse de molécules acylées, ce qui constitue une solide alternative aux procédés chimiques classiques.



## REFERENCES

---

- Adlercreutz, P. (2013). Immobilisation and application of lipases in organic media. *Chem. Soc. Rev.* *42*, 6406–6436.
- Aigle, B., Lautru, S., Spitteller, D., Dickschat, J.S., Challis, G.L., Leblond, P., and Pernodet, J.-L. (2014). Genome mining of *Streptomyces ambofaciens*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* *41*, 251–263.
- Almiñana, N., Alsina, M.A., and Reig, F. (2007). New GHK hydrophobic derivatives: Interaction with phospholipid bilayers. *Colloids Surf. B Biointerfaces* *57*, 243–249.
- Anders, M.W., and Dekant, W. (1994). Aminoacylases. *Adv. Pharmacol. San Diego Calif* *27*, 431–448.
- Andrade, C.K., Silva, W.A., and Maia, E.R. (2007). Computational Approach for the Design of AP1867 Analogs: Aiming at New Synthetic Routes for Potential Immunosuppressant Agents. *J. Biomol. Struct. Dyn.* *25*, 35–48.
- Ardhaoui, M., Falcimaigne, A., Engasser, J.-M., Moussou, P., Pauly, G., and Ghoul, M. (2004). Acylation of natural flavonoids using lipase of *Candida antarctica* as biocatalyst. *J. Mol. Catal. B Enzym.* *29*, 63–67.
- Arroyo, M., Mata, I. de la, Acebal, C., and Castellón, M.P. (2003). Biotechnological applications of penicillin acylases: state-of-the-art. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *60*, 507–514.
- Asada, H., Douen, T., Mizokoshi, Y., Fujita, T., Murakami, M., Yamamoto, A., and Muranishi, S. (1994). Stability of Acyl Derivatives of Insulin in the Small Intestine: Relative Importance of Insulin Association Characteristics in Aqueous Solution. *Pharm. Res.* *11*, 1115–1120.
- Avrahami, D., and Shai, Y. (2004). A New Group of Antifungal and Antibacterial Lipopeptides Derived from Non-membrane Active Peptides Conjugated to Palmitic Acid. *J. Biol. Chem.* *279*, 12277–12285.
- Babizhayev, M.A. (2006). Biological activities of the natural imidazole-containing

- peptidomimetics n-acetylcarnosine, carcinine and l-carnosine in ophthalmic and skin care products. *Life Sci.* *78*, 2343–2357.
- Babizhayev, M.A., Yermakova, V.N., Sakina, N.L., Evstigneeva, R.P., Rozhkova, E.A., and Zheltukhina, G.A. (1996). N $\alpha$ -Acetylcarnosine is a prodrug of L-carnosine in ophthalmic application as antioxidant. *Clin. Chim. Acta* *254*, 1–21.
- Beckman, E.J. (2004). Supercritical and near-critical CO<sub>2</sub> in green chemical synthesis and processing. *J. Supercrit. Fluids* *28*, 121–191.
- Belsito, E., Di Gioia, M.L., Greco, A., Leggio, A., Liguori, A., Perri, F., Siciliano, C., and Viscomi, M.C. (2007). N-Methyl-N-nosyl- $\beta$ 3-amino Acids. *J. Org. Chem.* *72*, 4798–4802.
- Bhandarkar, M., Brunner, r, and Chipot, C. (2003). NAMD User's Guide version 2.5.
- Bidouil, C., De Oliveira, E.B., Chebil, L., Maya, E.R., Maigret, B., Ronat-Heit, E., Ghoul, M., Engasser, J.M., and Humeau, C. (2011). Combined docking and molecular dynamics simulations to enlighten the capacity of *Pseudomonas cepacia* and *Candida antarctica* lipases to catalyze quercetin acetylation. *J. Biotechnol.* *156*, 203–210.
- Birnbaum, S.M. (1955). [12] Aminoacylase: Amino acid acylases I and II from hog kidney. In *Methods in Enzymology*, (Academic Press), pp. 115–119.
- Birnbaum, S.M., Levintow, L., Kingsley, R.B., and Greenstein, J.P. (1952). Specificity of Amino Acid Acylases. *J. Biol. Chem.* *194*, 455–470.
- Blanchfield, J.T., Dutton, J.L., Hogg, R.C., Gallagher, O.P., Craik, D.J., Jones, A., Adams, D.J., Lewis, R.J., Alewood, P.F., and Toth, I. (2003). Synthesis, Structure Elucidation, in Vitro Biological Activity, Toxicity, and Caco-2 Cell Permeability of Lipophilic Analogues of  $\alpha$ -Conotoxin MII. *J. Med. Chem.* *46*, 1266–1272.
- Bloomer, S., Adlercreutz, P., and Mattiasson, B. (1990). Triglyceride interesterification by lipases. 1. Cocoa butter equivalents from a fraction of palm oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* *67*, 519–524.
- Bommarius, A.S., Drauz, K. and Waldmann, H. (2002). Hydrolysis of N-Acylamino Acids. In *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Wiley-VCH Verlag GmbH. *1*, 741–761.

- Boogaard, P.J., Mulder, G.J., and Nagelkerke, J.F. (1989). Isolated proximal tubular cells from rat kidney as an in vitro model for studies on nephrotoxicity. II. Alpha-methylglucose uptake as a sensitive parameter for mechanistic studies of acute toxicity by xenobiotics. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *101*, 144–157.
- Bordusa, F. (2002). Proteases in Organic Synthesis†. *Chem Rev* *102*, 4817–4868.
- Bringezu, F., Majerowicz, M., Maltseva, E., Wen, S., Brezesinski, G., and Waring, A.J. (2007). Penetration of the antimicrobial peptide dicynthaurin into phospholipid monolayers at the liquid-air interface. *Chembiochem* *8*, 1038–1047.
- Brooks, B.R., Bruccoleri, R.E., Olafson, B.D., States, D.J., Swaminathan, S., and Karplus, M. (1983). CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J. Comput. Chem.* *4*, 187–217.
- Bunet, R., Mendes, M.V., Rouhier, N., Pang, X., Hotel, L., Leblond, P., and Aigle, B. (2008). Regulation of the synthesis of the angucyclinone antibiotic alpomyacin in *Streptomyces ambofaciens* by the autoregulator receptor AlpZ and its specific ligand. *J. Bacteriol.* *190*, 3293–3305.
- Bunet, R., Riclea, R., Laureti, L., Hotel, L., Paris, C., Girardet, J.-M., Spitteller, D., Dickschat, J.S., Leblond, P., and Aigle, B. (2014). A single Sfp-Type phosphopantetheinyl transferase plays a major role in the biosynthesis of PKS and NRPS derived metabolites in *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877. *Plos One*, *9* (1), 1-12.
- Calvez, P., Bussi eres, S.,  Eric Demers, and Salesse, C. (2009). Parameters modulating the maximum insertion pressure of proteins and peptides in lipid monolayers. *Biochimie* *91*, 718–733.
- Cammarota, M.C., and Freire, D.M.G. (2006). A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. *Bioresour. Technol.* *97*, 2195–2210.
- Cammenberg, M., Hult, K., and Park, S. (2006). Molecular basis for the enhanced lipase-catalyzed N-acylation of 1-phenylethanamine with methoxyacetate. *ChemBioChem* *7*, 1745–1749.

- Cardillo, G., Gennari, A., Gentilucci, L., Mosconi, E., Tolomelli, A., and Troisi, S. (2010). Synthesis of chiral non-racemic intermediates and Arg-Gly-Asp mimetics by CaLB-catalyzed resolution. *Tetrahedron Asymmetry* *21*, 96–102.
- Celia, E., Cernia, E., Palocci, C., Soro, S., and Turchet, T. (2005). Tuning *Pseudomonas cepacea* lipase (PCL) activity in supercritical fluids. *J. Supercrit. Fluids* *33*, 193–199.
- Chamouleau, F., Coulon, D., Girardin, M., and Ghouil, M. (2001). Influence of water activity and water content on sugar esters lipase-catalyzed synthesis in organic media. *J. Mol. Catal. B Enzym.* *11*, 949–954.
- Cheng, W., and Lim, L.-Y. (2008). Comparison of reversible and nonreversible aqueous-soluble lipidized conjugates of salmon calcitonin. *Mol. Pharm.* *5*, 610–621.
- Chibata, I., Tosa, T., Sato, T., and Mori, T. (1976). Production of L-amino acids by aminoacylase adsorbed on DEAE-Sephadex. *Methods Enzymol.* *44*, 746–759.
- Chinsky, N., Margolin, A.L., and Klibanov, A.M. (1989). Chemoselective enzymic monoacylation of bifunctional compounds. *J. Am. Chem. Soc.* *111*, 386–388.
- Choulet, F., Aigle, B., Gallois, A., Mangenot, S., Gerbaud, C., Truong, C., Francou, F.-X., Fourier, C., Guerineau, M., Decaris, B., et al. (2006). Evolution of the terminal regions of the *Streptomyces* linear chromosome. *Mol. Biol. Evol.* *23*, 2361–2369.
- Chu-Kung, A.F., Bozzelli, K.N., Lockwood, N.A., Haseman, J.R., Mayo, K.H., and Tirrell, M.V. (2004). Promotion of peptide antimicrobial activity by fatty acid conjugation. *Bioconjug. Chem.* *15*, 530–535.
- Contreras, M. del M., Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Martín-Álvarez, P.J., and Recio, I. (2011). Production of antioxidant hydrolyzates from a whey protein concentrate with thermolysin: Optimization by response surface methodology. *LWT - Food Sci. Technol.* *44*, 9–15.
- Counter, F.T., Allen, N.E., Fukuda, D.S., Hobbs, J.N., Ott, J., Ensminger, P.W., Mynderse, J.S., Preston, D.A., and Wu, C.Y. (1990). A54145 a new lipopeptide antibiotic complex: microbiological evaluation. *J. Antibiot. (Tokyo)* *43*, 616–622.
- Couto, S.R., and Sanromán, M.Á. (2006). Application of solid-state fermentation to food

- industry—A review. *J. Food Eng.* *76*, 291–302.
- Csomos, P., Kanerva, L., Sundholm, O., Bernath, G., and Fulop, F. (2000). Lipase-catalysed resolution of alicyclic beta-amino acid derivatives. *Magy. Kem. Folyoirat* *106*, 71–84.
- Da Cunha, E.F.F., Ramalho, T.C., de Alencastro, R.B., and Maia, E.R. (2007). Docking simulations and QM/MM studies between isoniazid prodrug, catalase-peroxidase (KatG) and S315T mutant from *Mycobacterium tuberculosis*. *Comput. Math. Methods Med.* *8*, 113–124.
- Curley, P., Does, C. van der, Driessen, A.J.M., Kok, J., and Sinderen, D. van (2003). Purification and characterisation of a lactococcal aminoacylase. *Arch. Microbiol.* *179*, 402–408.
- Darden, T., York, D., and Pedersen, L. (1993). Particle mesh Ewald: An N·log(N) method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* *98*, 10089–10092.
- Dasgupta, P., Singh, A.T., and Mukherjee, R. (2000). Lipophilization of somatostatin analog RC-160 with long chain fatty acid improves its anti-proliferative activity on human oral carcinoma cells in vitro. *Life Sci.* *66*, 1557–1570.
- Datsenko, K.A., and Wanner, B.L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 6640–6645.
- Deng, P.-Y., and Li, Y.-J. (2005). Calcitonin gene-related peptide and hypertension. *Peptides* *26*, 1676–1685.
- Derewenda, Z. (1994). Structure and Function of Lipases. *Adv. Protein Chem.* *45*, 1–52.
- DiCosimo, R., McAuliffe, J., Poulouse, A.J., and Bohlmann, G. (2013). Industrial use of immobilized enzymes. *Chem. Soc. Rev.* *42*, 6437–6474.
- Dion, M., Loussouarn, F., Batisse, N., Rabiller, C., and Sakanyan, V. (1995). Use of the overexpressed *Bacillus stearothermophilus* aminoacylase for the resolution of D,L-amino acids in conventional and non-conventional media. *Biotechnol. Lett.* *17*, 905–910.
- Doukyu, N., and Ogino, H. (2010). Organic solvent-tolerant enzymes. *Biochem. Eng. J.* *48*,



270–282.

- Duan, Z.Q., Du, W., and Liu, D.H. (2011). The mechanism of solvent effect on the positional selectivity of *Candida antarctica* lipase B during 1,3-diolein synthesis by esterification. *Bioresour. Technol.* *102*, 11048–11050.
- Eeman, M., Berquand, A., Dufrière, Y.F., Paquot, M., Dufour, S., and Deleu, M. (2006). Penetration of surfactin into phospholipid monolayers: nanoscale interfacial organization. *Langmuir* *22*, 11337–11345.
- Egorov, T.A., Odintsova, T.I., Pukhalsky, V.A., and Grishin, E.V. (2005). Diversity of wheat anti-microbial peptides. *Peptides* *26*, 2064–2073.
- Elkins, J.M., Kershaw, N.J., and Schofield, C.J. (2005). X-ray crystal structure of ornithine acetyltransferase from the clavulanic acid biosynthesis gene cluster. *Biochem. J.* *385*, 565–573.
- Endo, Y. (1978). N-Acyl-L-aromatic amino acid deacylase in animal tissues. *Biochim. Biophys. Acta.* *523*, 207–214.
- Endo, Y. (1980). In vivo deacetylations of N-acetyl amino acids by kidney acylases in mice and rats A possible role of acylase system in mammalian kidneys. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* *628*, 13–18.
- Fan, X., Burton, R., and Austic, G. (2013). The Enzymatic Conversion of Brown Grease to Biodiesel in a Solvent-free Medium. *Energy Sources Part Recovery Util. Environ. Eff.* *35*, 1779–1786.
- Feher, M. (2006). Consensus scoring for protein–ligand interactions. *Drug Discov. Today* *11*, 421–428.
- Ferrari, F., Paris, C., Maignet, B., Bidouil, C., Delaunay, S., Humeau, C., and Chevalot, I. (2014). Molecular rules for chemo- and regio-selectivity of *Candida antarctica* lipase B in peptide acylation reactions. *J. Mol. Catal. B Enzym.* *101*, 122–132.
- Férir, G., Petrova, M.I., Andrei, G., Huskens, D., Hoorelbeke, B., Snoeck, R., Vanderleyden, J., Balzarini, J., Bartoschek, S., Brönstrup, M., et al. (2013). The Lantibiotic Peptide Labyrinthopeptin A1 Demonstrates Broad Anti-HIV and Anti-HSV Activity with

- Potential for Microbicidal Applications. *PLoS ONE* 8, 1-16.
- Ferjancic-Biagini, A., Giardina, T., Reynier, M., and Puigserver, A. (1997). Hog kidney and intestine aminoacylase-catalyzed acylation of L-methionine in aqueous media. *Biocatal. Biotransformation* 15, 313–323.
- Fernández-Pérez, M., and Otero, C. (2001). Enzymatic synthesis of amide surfactants from ethanolamine. *Enzyme Microb. Technol.* 28, 527–536.
- Fernández-Pérez, M., and Otero, C. (2003). Selective enzymatic synthesis of amide surfactants from diethanolamine. *Enzyme Microb. Technol.* 33, 650–660.
- Findlay, B., Zhanel, G.G., and Schweizer, F. (2012). Investigating the antimicrobial peptide “window of activity” using cationic lipopeptides with hydrocarbon and fluorinated tails. *Int. J. Antimicrob. Agents* 40, 36–42.
- Fischer, M., and Pleiss, J. (2003). The lipase engineering database: a navigation and analysis tool for protein families. *Nucleic Acids Res.* 31, 319–321.
- Florent, S., Malaplate-Armand, C., Youssef, I., Kriem, B., Koziel, V., Escanyé, M.-C., Fifre, A., Sponne, I., Leininger-Muller, B., Olivier, J.-L., et al. (2006). Docosahexaenoic acid prevents neuronal apoptosis induced by soluble amyloid- $\beta$  oligomers. *J. Neurochem.* 96, 385–395.
- Fones, W.S., and Lee, M. (1953). Hydrolysis of N-acyl derivatives of alanine and phenylalanine by acylase I and carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.* 201, 847–856.
- Fouad, A.A., El-Rehany, M.A.-A., and Maghraby, H.K. (2007). The hepatoprotective effect of carnosine against ischemia/reperfusion liver injury in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 572, 61–68.
- Fouad, A.A., Morsy, M.A., and Gomaa, W. (2008). Protective effect of carnosine against cisplatin-induced nephrotoxicity in mice. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 25, 292–297.
- Fu, B., and Vasudevan, P.T. (2009). Effect of Organic Solvents on Enzyme-Catalyzed Synthesis of Biodiesel. *Energy Fuels* 23, 4105–4111.
- Fuentes, G., Ballesteros, A., and Verma, C.S. (2004). Specificity in lipases: A computational

- study of transesterification of sucrose. *Protein Sci.* *13*, 3092–3103.
- Fukuda, H., Iwade, S., and Kimura, A. (1982). A new enzyme: long acyl aminoacylase from *Pseudomonas diminuta*. *J. Biochem.* *91*, 1731–1738.
- Furutani, T., Furui, M., Ooshima, H., and Kato, J. (1996). N-acylation of  $\beta$ -amino alcohol by acyl migration following enzyme-catalyzed esterification. *Enzyme Microb. Technol.* *19*, 578–584.
- Gade, W., and Brown, J.L. (1981). Purification, characterization and possible function of alpha-N-acylamino acid hydrolase from bovine liver. *Biochim. Biophys. Acta* *662*, 86–93.
- Gais, H.-J., Jungen, M., and Jadhav, V. (2001). Activation of pig liver esterase in organic media with organic polymers. Application to the enantioselective acylation of racemic functionalized secondary alcohols. *J. Org. Chem.* *66*, 3384–3396.
- Ganjalkhany, M.R., Ranjbar, B., Taghavi, A.H., and Tohidi Moghadam, T. (2012). Functional motions of *Candida antarctica* lipase b: a survey through open-close conformations. *PLoS ONE* *7*, 1-14.
- Garcia Linares, G., and Baldessari, A. (2013). Lipases as efficient catalysts in the synthesis of monomers and polymers with biomedical applications. *Curr. Org. Chem.* *17*, 719–743.
- Gardossi, L., Bianchi, D., and Klivanov, A.M. (1991). Selective acylation of peptides catalyzed by lipases in organic solvents. *J. Am. Chem. Soc.* *113*, 6328–6329.
- Gatfield, I.L. (1984). The enzymatic synthesis of esters in nonaqueous systems. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *434*, 569–572.
- Gehlhaar, D.K., Verkhivker, G.M., Rejto, P.A., Sherman, C.J., Fogel, D.R., Fogel, L.J., and Freer, S.T. (1995). Molecular recognition of the inhibitor AG-1343 by HIV-1 protease: conformationally flexible docking by evolutionary programming. *Chem. Biol.* *2*, 317–324.
- Gill, I.I., Das, J., and Patel, R.N. (2007). Enantioselective enzymatic acylation of 1-(3' -bromophenyl)ethylamine. *Tetrahedron Asymmetry* *18*, 1330–1337.

- Gog, A., Roman, M., Toşa, M., Paizs, C., and Irimie, F.D. (2012). Biodiesel production using enzymatic transesterification – Current state and perspectives. *Renew. Energy* 39, 10–16.
- Goodford, P.J. (1985). A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. *J. Med. Chem.* 28, 849–857.
- Gordon, C.M. (2001). New developments in catalysis using ionic liquids. *Appl. Catal. Gen.* 222, 101–117.
- Gotor, V., Brieva, R., and Rebolledo, F. (1988). Enantioselective Acylation of Amino-Alcohols by Porcine Pancreatic Lipase. *J. Chem. Soc.-Chem. Commun.* 957–958.
- Gotor-Fernández, V., Brieva, R., and Gotor, V. (2006). Lipases: useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 40, 111–120.
- Graber, M., Irague, R., Rosenfeld, E., Lamare, S., Franson, L., and Hult, K. (2007). Solvent as a competitive inhibitor for *Candida antarctica* lipase B. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* 1774, 1052–1057.
- Gremos, S., Zarafeta, D., Kekos, D., and Kolisis, F. (2011). Direct enzymatic acylation of cellulose pretreated in BMIMCl ionic liquid. *Bioresour. Technol.* 102, 1378–1382.
- Griebenow, K., and Klivanov, A.M. (1996). On protein denaturation in aqueous–organic mixtures but not in pure organic solvents. *J Am Chem Soc* 118, 11695–11700.
- Gudino, E.D., Iglesias, L.E., and Ferreira, M.L. (2012). A rational approach to the regioselective deacetylation of 2',3',5'-tri-O-acetyluridine by Novozym 435 catalysed alcoholysis. *Biochim. Biophys. Acta-Proteins Proteomics* 1824, 627–636.
- Guranda, D.T., Volovik, T.S., and Švedas, V.K. (2004). pH stability of penicillin acylase from *Escherichia coli*. *Biochem. Mosc.* 69, 1386–1390.
- Gust, B., Challis, G.L., Fowler, K., Kieser, T., and Chater, K.F. (2003). PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 1541–1546.
- Gutiérrez, A., del Río, J.C., Jesús Martínez, M., and Martínez, A.T. (2001). The biotechnological control of pitch in paper pulp manufacturing. *Trends Biotechnol.* 19,

340–348.

- Habeych, D.I., Juhl, P.B., Pleiss, J., Vanegas, D., Eggink, G., and Boeriu, C.G. (2011). Biocatalytic synthesis of polyesters from sugar-based building blocks using immobilized *Candida antarctica* lipase B. *J. Mol. Catal. B Enzym.* *71*, 1–9.
- Habulin, M., Šabeder, S., Paljevac, M., Primožič, M., and Knez, Ž. (2007). Lipase-catalyzed esterification of citronellol with lauric acid in supercritical carbon dioxide/co-solvent media. *J. Supercrit. Fluids* *43*, 199–203.
- Hammond, D.A., Karel, M., Klibanov, A.M., and Krukonis, V.J. (1985). Enzymatic reactions in supercritical gases. *Appl. Biochem. Biotechnol.* *11*, 393–400.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* *166*, 557–580.
- Hasan, F., Shah, A.A., Javed, S., and Hameed, A. (2010). Enzymes used in detergents: Lipases. *Afr. J. Biotechnol.* *9*, 4836–4844.
- Hernández-Ledesma, B., del Mar Contreras, M., and Recio, I. (2011). Antihypertensive peptides: production, bioavailability and incorporation into foods. *Adv. Colloid Interface Sci.* *165*, 23–35.
- Hobbs, H.R., and Thomas, N.R. (2007). Biocatalysis in supercritical fluids, in fluoruous solvents, and under solvent-free conditions. *Chem. Rev.* *107*, 2786–2820.
- Hudson, E.P., Eppler, R.K., and Clark, D.S. (2005). Biocatalysis in semi-aqueous and nearly anhydrous conditions. *Curr. Opin. Biotechnol.* *16*, 637–643.
- Humeau, C., Girardin, M., Rovel, B., and Miclo, A. (1998a). Effect of the thermodynamic water activity and the reaction medium hydrophobicity on the enzymatic synthesis of ascorbyl palmitate. *J. Biotechnol.* *63*, 1–8.
- Humeau, C., Girardin, M., Rovel, B., and Miclo, A. (1998b). Enzymatic synthesis of fatty acid ascorbyl esters. *J. Mol. Catal. B Enzym.* *5*, 19–23.
- Humphrey, W., Dalke, A., and Schulten, K. (1996). VMD: Visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph. Model.* *14*, 33–38.

- Husson, E., Humeau, C., Blanchard, F., Framboisier, X., Marc, I., and Chevalot, I. (2008). Chemo-selectivity of the N,O-enzymatic acylation in organic media and in ionic liquids. *J. Mol. Catal. B Enzym.* *55*, 110–117.
- Husson, E., Humeau, C., Paris, C., Vanderesse, R., Framboisier, X., Marc, I., and Chevalot, I. (2009). Enzymatic acylation of polar dipeptides: Influence of reaction media and molecular environment of functional groups. *Process Biochem.* *44*, 428–434.
- Husson, E., Garcia-Matilla, V., Humeau, C., Chevalot, I., Fournier, F., and Marc, I. (2010). Enzymatic acylation of a bifunctional molecule in 2-methyl-2-butanol: Kinetic modelling. *Enzyme Microb. Technol.* *46*, 338–346.
- Husson, E., Humeau, C., Harscoat, C., Framboisier, X., Paris, C., Dubreucq, E., Marc, I., and Chevalot, I. (2011). Enzymatic acylation of the polar dipeptide, carnosine: reaction performances in organic and aqueous media. *Process Biochem.* *46*, 945–952.
- Infante, M., Pinazo, A., and Seguer, J. (1997). Non-conventional surfactants from amino acids and glycolipids: Structure, preparation and properties. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* *123–124*, 49–70.
- Infante, M.R., Pérez, L., Pinazo, A., Clapés, P., Morán, M.C., Angelet, M., García, M.T., and Vinardell, M.P. (2004). Amino acid-based surfactants. *Comptes Rendus Chim.* *7*, 583–592.
- Irimescu, R., and Kato, K. (2004). Investigation of ionic liquids as reaction media for enzymatic enantioselective acylation of amines. *J. Mol. Catal. B Enzym.* *30*, 189–194.
- Izumi, T., Yagimuma, Y., and Haga, M. (1997). Enzymatic syntheses of N-lauroyl- $\beta$ -alanine homologs in organic media. *J. Am. Oil Chem. Soc.* *74*, 875–878.
- Jackson, M., Kucera, C., and Lenney, J. (1991). Purification and properties of human serum carnosinase. *Clin. Chim. Acta* *196*, 193–205.
- Jain, A.N. (1996). Scoring noncovalent protein-ligand interactions: a continuous differentiable function tuned to compute binding affinities. *J. Comput. Aided Mol. Des.* *10*, 427–440.
- Jain, N., Kumar, A., Chauhan, S., and Chauhan, S.M.S. (2005). Chemical and biochemical

- transformations in ionic liquids. *Tetrahedron* *61*, 1015–1060.
- Jiang, Z.Y., Xu, S.W., and Wu, H. (2002). Enzymatic structural modification of natural products. *Chin. J. Org. Chem.* *22*, 220–226.
- Johannessen, L., Remsberg, J., Gaponenko, V., Adams, K.M., Barchi, J.J., Tarasov, S.G., Jiang, S., and Tarasova, N.I. (2011). Peptide structure stabilization by membrane anchoring and its general applicability to the development of potent cell-permeable inhibitors. *Chembiochem* *12*, 914–921.
- Jorgensen, W.L., Chandrasekhar, J., Madura, J.D., Impey, R.W., and Klein, M.L. (1983). Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* *79*, 926–935.
- Le Joubioux, F., Bridiau, N., Ben Henda, Y., Achour, O., Graber, M., and Maugard, T. (2013a). The control of Novozym® 435 chemoselectivity and specificity by the solvents in acylation reactions of amino-alcohols. *J. Mol. Catal. B Enzym.* *95*, 99–110.
- Le Joubioux, F., Henda, Y.B., Bridiau, N., Achour, O., Graber, M., and Maugard, T. (2013b). The effect of substrate structure on the chemoselectivity of *Candida antarctica* lipase B-catalyzed acylation of amino-alcohols. *J. Mol. Catal. B Enzym.* *85–86*, 193–199.
- Jung, S., Kim, J., and Park, S. (2013). Rational design for enhancing promiscuous activity of *Candida antarctica* lipase B: a clue for the molecular basis of dissimilar activities between lipase and serine-protease. *Rsc Adv.* *3*, 2590–2594.
- Kaar, J.L., Jesionowski, A.M., Berberich, J.A., Moulton, R., and Russell, A.J. (2003). Impact of ionic liquid physical properties on lipase activity and stability. *J. Am. Chem. Soc.* *125*, 4125–4131.
- Karn, S.K., Kumar, P., and Pan, X. (2013). Extraction of lipase and protease and characterization of activated sludge from pulp and paper industry. *Prep. Biochem. Biotechnol.* *43*, 152–162.
- Khandelia, H., Ipsen, J.H., and Mouritsen, O.G. (2008). The impact of peptides on lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* *1778*, 1528–1536.
- Kheder, F., Delaunay, S., Abo-Chameh, G., Paris, C., Muniglia, L., and Girardin, M. (2009).

- Production and biochemical characterization of a type B ferulic acid esterase from *Streptomyces ambofaciens*. *Can. J. Microbiol.* *55*, 729–738.
- Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F. and Hopwood D.A. (2000). Practical *Streptomyces* genetics. *Int. Microbiol.* *3*, 260–261.
- Kim, M.-J., Choi, M.Y., Lee, J.K., and Ahn, Y. (2003). Enzymatic selective acylation of glycosides in ionic liquids: significantly enhanced reactivity and regioselectivity. *J. Mol. Catal. B Enzym.* *26*, 115–118.
- Kimura, Y., Kobayashi, Y., Adachi, S., and Matsuno, R. (1992). Aminoacylase-catalyzed synthesis of N-acyl amino acid from fatty acid or its ethyl ester and amino acid. In *Biochemical Engineering for 2001*, P.S. Furusaki, D.I. Endo, and P.R. Matsuno, eds. (Springer Japan), pp. 109–111.
- Klibanov, A.M. (1989). Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents. *Trends Biochem. Sci.* *14*, 141–144.
- Klibanov, A.M. (2001). Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* *409*, 241.
- Koda, Y., Del Borgo, M., Wessling, S.T., Lazarus, L.H., Okada, Y., Toth, I., and Blanchfield, J.T. (2008). Synthesis and in vitro evaluation of a library of modified endomorphin 1 peptides. *Bioorg. Med. Chem.* *16*, 6286–6296.
- Koreishi, M., Kawasaki, R., Imanaka, H., Imamura, K., and Nakanishi, K. (2005a). A novel  $\epsilon$ -lysine acylase from *Streptomyces mobaraensis* for synthesis of N  $\epsilon$ -acyl-l-lysines. *J. Am. Oil Chem. Soc.* *82*, 631–637.
- Koreishi, M., Asayama, F., Imanaka, H., Imamura, K., Kadota, M., Tsuno, T., and Nakanishi, K. (2005b). Purification and characterization of a novel aminoacylase from *Streptomyces mobaraensis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *69*, 1914–1922.
- Koreishi, M., Zhang, D., Imanaka, H., Imamura, K., Adachi, S., Matsuno, R., and Nakanishi, K. (2006). A novel acylase from *Streptomyces mobaraensis* that efficiently catalyzes hydrolysis/synthesis of capsaicins as well as N-acyl-l-amino acids and N-acyl-peptides. *J. Agric. Food Chem.* *54*, 72–78.



- Koreishi, M., Tani, K., Ise, Y., Imanaka, H., Imamura, K., and Nakanishi, K. (2007). Enzymatic synthesis of  $\beta$ -lactam antibiotics and N-fatty-acylated amino compounds by the acyl-transfer reaction catalyzed by penicillin V acylase from *Streptomyces mobaraensis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *71*, 1582–1586.
- Koreishi, M., Nakatani, Y., Ooi, M., Imanaka, H., Imamura, K., and Nakanishi, K. (2009a). Purification, characterization, molecular cloning, and expression of a new aminoacylase from *Streptomyces mobaraensis* that can hydrolyze N-(middle/long)-chain-fatty-acyl-L-amino acids as well as N-short-chain-acyl-L-amino acids. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *73*, 1940–1947.
- Koreishi, M., Kawasaki, R., Imanaka, H., Imamura, K., Takakura, Y., and Nakanishi, K. (2009b). Efficient N $\epsilon$ -lauroyl-L-lysine production by recombinant  $\epsilon$ -lysine acylase from *Streptomyces mobaraensis*. *J. Biotechnol.* *141*, 160–165.
- Kosáry, J., Sisak, C.S., Szajani, B., and Boross, L. (1994). Acylation of amino acids by aminoacylase in non-conventional media. *Biocatal. Biotransformation* *11*, 329–337.
- Kraai, G.N., Winkelman, J.G.M., de Vries, J.G., and Heeres, H.J. (2008). Kinetic studies on the *Rhizomucor miehei* lipase catalyzed esterification reaction of oleic acid with 1-butanol in a biphasic system. *Biochem. Eng. J.* *41*, 87–94.
- Krammer, A., Kirchhoff, P.D., Jiang, X., Venkatachalam, C.M., and Waldman, M. (2005). LigScore: a novel scoring function for predicting binding affinities. *J. Mol. Graph. Model.* *23*, 395–407.
- Kremnický, L., Mastihuba, V., and Côté, G.L. (2004). *Trichoderma reesei* acetyl esterase catalyzes transesterification in water. *J. Mol. Catal. B Enzym.* *30*, 229–239.
- Kubota, D., Ishikawa, M., Yamamoto, M., Murakami, S., Hachisu, M., Katano, K., and Ajito, K. (2006). Tricyclic pharmacophore-based molecules as novel integrin  $\alpha\beta 3$  antagonists. Part 1: Design and synthesis of a lead compound exhibiting  $\alpha\beta 3/\alpha\text{IIb}\beta 3$  dual antagonistic activity. *Bioorg. Med. Chem.* *14*, 2089–2108.
- Kumaresan, J., Kothai, T., and Lakshmi, B.S. (2011). In silico approaches towards understanding CALB using molecular dynamics simulation and docking. *Mol. Simul.* *37*, 1053–1061.

- Lafaquière, V., Barbe, S., Puech-Guenot, S., Guieysse, D., Cortés, J., Monsan, P., Siméon, T., André, I., and Remaud-Siméon, M. (2009). Control of lipase enantioselectivity by engineering the substrate binding site and access channel. *ChemBioChem* *10*, 2760–2771.
- Lancaster, M. (2008). Renewable resources. *Green Chem.* 166–209.
- Van Langen, L.M., Oosthoek, N.H.P., Guranda, D.T., van Rantwijk, F., Švedas, V.K., and Sheldon, R.A. (2000). Penicillin acylase-catalyzed resolution of amines in aqueous organic solvents. *Tetrahedron Asymmetry* *11*, 4593–4600.
- Lapanje, S. (1978). *Physicochemical aspects of protein denaturation* (New York: Wiley).
- Lecoq, C., Dubreucq, E., and Galzy, P. (1996). Ester synthesis in aqueous media in the presence of various lipases. *Biotechnol. Lett.* *18*, 869–874.
- Lee, H.-K., Zhang, L., Smith, M.D., White, H.S., and Bulaj, G. (2009). Glycosylated neurotensin analogues exhibit sub-picomolar anticonvulsant potency in a pharmaco-resistant model of epilepsy. *Chemmedchem* *4*, 400–405.
- Lee, I.H., Lee, Y.S., Kim, C.H., Kim, C.R., Hong, T., Menzel, L., Boo, L.M., Pohl, J., Sherman, M.A., Waring, A., et al. (2001). Dicynthaurin: an antimicrobial peptide from hemocytes of the solitary tunicate, *Halocynthia aurantium*. *Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subj.* *1527*, 141–148.
- Liisa, T. Kanerva, M.K. (1992). Studies on the chemo and enantio-selectivity of the enzymatic monoacylations of amino alcohols. *Acta Chem. Scand. - ACTA CHEM SCAND* *46*, 1101–1105.
- Lin, L.-L., Chen, M.-H., Chien, H.-C.R., Kan, S.-C., Chen, C.-C., Hu, H.-Y., and Hsu, W.-H. (2007). Characterization of a bifunctional aminoacylase/carboxypeptidase from radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. *J. Biotechnol.* *128*, 322–334.
- Löffler, H.G., Kroll, M., and Schneider, F. (1988). 3-(2-furyl) acryloyl-, thienyl-acryloyl and cinnamoyl-amino acids: novel substrates for aminoacylase I (EC 3.5.1.14). *Biol Chem Hoppe-Seyler* 866.
- Lozano, P., Diego, T.D., Carrié, D., Vaultier, M., and Iborra, J.L. (2001). Over-stabilization

- of *Candida antarctica* lipase B by ionic liquids in ester synthesis. *Biotechnol. Lett.* *23*, 1529–1533.
- Ma, L., Persson, M., and Adlercreutz, P. (2002). Water activity dependence of lipase catalysis in organic media explains successful transesterification reactions. *Enzyme Microb. Technol.* *31*, 1024–1029.
- Macneil, D., Gewain, K., Ruby, C., Dezeny, G., Gibbons, P., and Macneil, T. (1992). Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene* *111*, 61–68.
- Majerle, A., Kidrič, J., and Jerala, R. (2003). Enhancement of antibacterial and lipopolysaccharide binding activities of a human lactoferrin peptide fragment by the addition of acyl chain. *J. Antimicrob. Chemother.* *51*, 1159–1165.
- Mak, P., Pohl, J., Dubin, A., Reed, M.S., Bowers, S.E., Fallon, M.T., and Shafer, W.M. (2003). The increased bactericidal activity of a fatty acid-modified synthetic antimicrobial peptide of human cathepsin G correlates with its enhanced capacity to interact with model membranes. *Int. J. Antimicrob. Agents* *21*, 13–19.
- Malina, A., and Shai, Y. (2005). Conjugation of fatty acids with different lengths modulates the antibacterial and antifungal activity of a cationic biologically inactive peptide. *Biochem. J.* *390*, 695.
- Marinelli, L., Meyer, A., Heckmann, D., Lavecchia, A., Novellino, E., and Kessler, H. (2005). Ligand binding analysis for human  $\alpha 5\beta 1$  integrin: strategies for designing new  $\alpha 5\beta 1$  integrin antagonists. *J. Med. Chem.* *48*, 4204–4207.
- Martinelle, M., and Hult, K. (1995). Kinetics of acyl transfer-reactions in organic media catalyzed by *Candida antarctica* lipase B. *Biochim. Biophys. Acta-Protein Struct. Mol. Enzymol.* *1251*, 191–197.
- Matalon, R., Michals, K., Sebesta, D., Deanching, M., Gashkoff, P., and Casanova, J. (1988). Aspartoacylase deficiency and N-acetylaspartic aciduria in patients with Canavan disease. *Am. J. Med. Genet.* *29*, 463–471.
- Matsumoto, J., and Nagai, S. (1972). Amidohydrolases for N-Short and Long Chain Fatty

- Acyl-L-Amino Acids from *Mycobacteria*. *J. Biochem. (Tokyo)* *72*, 269–279.
- Maugard, T., Remaud-Simeon, M., Petre, D., and Monsan, P. (1997). Lipase-catalyzed chemoselective N-acylation of amino-sugar derivatives in hydrophobic solvent: acid-amine ion-pair effects. *Tetrahedron* *53*, 7587–7594.
- Maugard, T., Remaud-Simeon, M., Petre, D., and Monsan, P. (1998). Enzymatic amidification for the synthesis of biodegradable surfactants: synthesis of N-acylated hydroxylated amines. *J. Mol. Catal. B Enzym.* *5*, 13–17.
- Mehmood, N., Olmos, E., Goergen, J.-L., Blanchard, F., Ullisch, D., Klöckner, W., Büchs, J., and Delaunay, S. (2011). Oxygen supply controls the onset of pristinamycins production by *Streptomyces pristinaespiralis* in shaking flasks. *Biotechnol. Bioeng.* *108*, 2151–2161.
- Montet, D., Servat, F., Pina, M., Graille, J., Galzy, P., Arnaud, A., Ledon, H., and Marcou, L. (1990). Enzymatic synthesis of N- $\epsilon$ -acyllsines. *J. Am. Oil Chem. Soc.* *67*, 771–774.
- Moravcsik, E., Telegdi, J., Tüdös, H., Kőmíves, K., and Otvös, L. (1977). Substrate specificity of acylase-I-catalyzed dipeptide hydrolysis. *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* *12*, 399–402.
- Mouls, L., Subra, G., Enjalbal, C., Martinez, J., and Aubagnac, J.-L. (2004). O–N-Acyl migration in N-terminal serine-containing peptides: mass spectrometric elucidation and subsequent development of site-directed acylation protocols. *Tetrahedron Lett.* *45*, 1173–1178.
- Moussavou, M.R.W., Brunschwig, C., Baréa, B., Villeneuve, P., and Blin, J. (2013). Are plant lipases a promising alternative to catalyze transesterification for biodiesel production? *Prog. Energy Combust. Sci.* *39*, 441–456.
- Muegge, I. (2006). PMF Scoring Revisited. *J. Med. Chem.* *49*, 5895–5902.
- Muegge, I., and Martin, Y.C. (1999). A general and fast scoring function for protein-ligand interactions: a simplified potential approach. *J. Med. Chem.* *42*, 791–804.
- Na, D.H., Youn, Y.S., Lee, S.D., Son, M.-W., Kim, W.-B., DeLuca, P.P., and Lee, K.C. (2003). Monitoring of peptide acylation inside degrading PLGA microspheres by

- capillary electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Controlled Release* *92*, 291–299.
- Nagai, S., and Matsomoto, J. (1964). Enzyme Hydrolyzing N-Long Chain Acyl-L-aspartic Acids from *Mycobacterium smegmatis* purification and specificity of the eazyme, and the effect of alkaline metal ions on its activity. *J. Biochem. (Tokyo)* *56*, 465–476.
- Nakagawa, Y., Hasegawa, A., Hiratake, J., and Sakata, K. (2007). Engineering of *Pseudomonas aeruginosa* lipase by directed evolution for enhanced amidase activity: mechanistic implication for amide hydrolysis by serine hydrolases. *Protein Eng. Des. Sel.* *20*, 339–346.
- Naves, A.F., Fernandes, H.T.C., Immich, A.P.S., and Catalani, L.H. (2013). Enzymatic syntheses of unsaturated polyesters based on isosorbide and isomannide. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* *51*, 3881–3891.
- Neang, P.M., Subileau, M., Perrier, V., and Dubreucq, E. (2013). Peculiar features of four enzymes of the CaLA superfamily in aqueous media: Differences in substrate specificities and abilities to catalyze alcoholysis. *J. Mol. Catal. B Enzym.* *94*, 36–46.
- Nishioka, M., Tanimoto, K., Higashi, N., Fukada, H., Ishikawa, K., and Taya, M. (2008). Alteration of metal ions improves the activity and thermostability of aminoacylase from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii*. *Biotechnol. Lett.* *30*, 1639–1643.
- Ogino, H., and Ishikawa, H. (2001). Enzymes which are stable in the presence of organic solvents. *J. Biosci. Bioeng.* *91*, 109–116.
- Oldfield, T.J. (2001). A number of real-space torsion-angle refinement techniques for proteins, nucleic acids, ligands and solvent. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *57*, 82–94.
- De Oliveira, E.B., Humeau, C., Chebil, L., Maia, E.R., Dehez, F., Maigret, B., Ghoul, M., and Engasser, J.-M. (2009). A molecular modelling study to rationalize the regioselectivity in acylation of flavonoid glycosides catalyzed by *Candida antarctica* lipase B. *J. Mol. Catal. B Enzym.* *59*, 96–105.
- De Oliveira, E.B., Humeau, C., Maia, E.R., Chebil, L., Ronat, E., Monard, G., Ruiz-Lopez,

- M.F., Ghoul, M., and Engasser, J.-M. (2010). An approach based on Density Functional Theory (DFT) calculations to assess the *Candida antarctica* lipase B selectivity in rutin, isoquercitrin and quercetin acetylation. *J. Mol. Catal. B Enzym.* *66*, 325–331.
- Palocci, C., Falconi, M., Alcaro, S., Tafi, A., Puglisi, R., Ortuso, F., Botta, M., Alberghina, L., and Cernia, E. (2007). An approach to address *Candida rugosa* lipase regioselectivity in the acylation reactions of trytilated glucosides. *J. Biotechnol.* *128*, 908–918.
- Pang, X., Aigle, B., Girardet, J.-M., Mangenot, S., Pernodet, J.-L., Decaris, B., and Leblond, P. (2004). Functional angucycline-like antibiotic gene cluster in the terminal inverted repeats of the *Streptomyces ambofaciens* linear chromosome. *Antimicrob. Agents Chemother.* *48*, 575–588.
- Philippe F. X Corvini, S.D. (2004). Intracellular pH of *Streptomyces pristinaespiralis* is correlated to the sequential use of carbon sources during the pristinamycins-producing process. *Enzyme Microb. Technol. - Enzyme Microb Technol* *34*, 101–107.
- Pinnert-Sindico, S. (1954). Une nouvelle espèce de *Streptomyces* productrice d'antibiotiques: *Streptomyces ambofaciens* n. sp., caracteres culturaux. *Ann Inst Pasteur Paris* *87*, 702–707.
- Pleiss, J., Fischer, M., and Schmid, R.D. (1998). Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. *Chem. Phys. Lipids* *93*, 67–80.
- Pool, C.T., and Thompson, T.E. (1998). Chain length and temperature dependence of the reversible association of model acylated proteins with lipid bilayers†. *Biochemistry (Mosc.)* *37*, 10246–10255.
- Pushkin, A., Bus, J.S., Costa, L.G., Hodgson, E., Lawrence, D.A., Reed, D.J, and Kurtz, I. (2008). Measurement of Aminoacylases. In *current protocols in toxicology*, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Qahwash, I.M., Boire, A., Lanning, J., Pytel, T.K.P., and Meredith, S.C. (2007). Site-specific effects of peptide lipidation on beta-Amyloid aggregation and cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* *282*, 36987–36997.
- Van Rantwijk, F., Madeira Lau, R., and Sheldon, R.A. (2003). Biocatalytic transformations in

- ionic liquids. *Trends Biotechnol.* *21*, 131–138.
- Rasalkar, M.S., Potdar, M.K., and Salunkhe, M.M. (2004). *Pseudomonas cepacia* lipase-catalysed resolution of racemic alcohols in ionic liquid using succinic anhydride: role of triethylamine in enhancement of catalytic activity. *J. Mol. Catal. B Enzym.* *27*, 267–270.
- Rawlings, N.D., Tolle, D.P., and Barrett, A.J. (2004). Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem. J.* *378*, 705–716.
- Raynal, A., Karray, F., Tuphile, K., Darbon-Rongere, E., and Pernodet, J.-L. (2006). Excisable cassettes: new tools for functional analysis of *Streptomyces* genomes. *Appl. Environ. Microbiol.* *72*, 4839–4844.
- Raza, S., Fransson, L., and Hult, K. (2001). Enantioselectivity in *Candida antarctica* lipase B: a molecular dynamics study. *Protein Sci.* *10*, 329–338.
- Renukuntla, J., Vadlapudi, A.D., Patel, A., Boddu, S.H.S., and Mitra, A.K. (2013). Approaches for enhancing oral bioavailability of peptides and proteins. *Int. J. Pharm.* *447*, 75–93.
- Reyes-Duarte, D., Castillo, E., Martínez, R., and López-Munguía, A. (2002). Lipase-catalysed synthesis of olvanil in organic solvents. *Biotechnol. Lett.* *24*, 2057–2061.
- Roccatano, D. (2008). Computer simulations study of biomolecules in non-aqueous or cosolvent/water mixture solutions. *Curr. Protein Pept. Sci.* *9*, 407–426.
- Rondel, C., Portet, B., Alric, I., Mouloungui, Z., Blanco, J.-F., and Silvestre, F. (2011). Green production of anionic surfactant obtained from pea protein. *J. Surfactants Deterg.* *14*, 535–544.
- Ryckaert, J.-P., Ciccotti, G., and Berendsen, H.J.. (1977). Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of N-alkanes. *J. Comput. Phys.* *23*, 327–341.
- Ryu, J.-J., Park, K., Kim, H.-S., Jeong, C.-M., and Huh, J.-B. (2013). Effects of Anodized Titanium with Arg-Gly-Asp (RGD) Peptide immobilized via chemical grafting or physical adsorption on bone cell adhesion and differentiation. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* *28*, 963–972.

- Sakai, M., Suzuki, M., Nanjo, F., and Hara, Y. (1994) 3-O-acylated catechins and method of producing same. Patent.
- Sakanyan, V., Desmarez, L., Legrain, C., Charlier, D., Mett, I., Kochikyan, A., Savchenko, A., Boyen, A., Falmagne, P., and Pierard, A. (1993). Gene cloning, sequence analysis, purification, and characterization of a thermostable aminoacylase from *Bacillus stearothermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* *59*, 3878–3888.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (Cold Spring Harbor Laboratory).
- Sato, T., and Tosa, T. (1993). Optical resolution of racemic amino acids by aminoacylase. *Bioprocess Technol.* *16*, 3–14.
- Schmid, A., Dordick, J.S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M., and Witholt, B. (2001). Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* *409*, 258–268.
- Segura-Campos, M., Chel-Guerrero, L., Betancur-Ancona, D., and Hernandez-Escalante, V.M. (2011). Bioavailability of bioactive peptides. *Food Rev. Int.* *27*, 213–226.
- Sheldon, R.A. (1996). Large-scale enzymatic conversions in non-aqueous media. In *Enzymatic Reactions in Organic Media*, A.M.P. Koskinen, and A.M. Klivanov, eds. (Springer Netherlands), pp. 266–307.
- Sheldon, R.A., Lau, R.M., Sorgedraeger, M.J., van Rantwijk, F., and Seddon, K.R. (2002). Biocatalysis in ionic liquids. *Green Chem.* *4*, 147–151.
- Shen, Y., Fan, Y., Dai, H., Fu, Q., Hu, W., and Chen, Z. (2007). Neuroprotective effect of carnosine on necrotic cell death in PC12 cells. *Neurosci. Lett.* *414*, 145–149.
- Shi, J., Ross, C.R., Chengappa, M.M., Sylte, M.J., McVey, D.S., and Blecha, F. (1996). Antibacterial activity of a synthetic peptide (PR-26) derived from PR-39, a proline-arginine-rich neutrophil antimicrobial peptide. *Antimicrob. Agents Chemother.* *40*, 115–121.
- Shintani, Y., Fukuda, H., Okamoto, N., Murata, K., and Kimura, A. (1984). Isolation and characterization of N-long chain acyl aminoacylase from *Pseudomonas diminuta*. *J. Biochem. (Tokyo)* *96*, 637–643.



- Silva, C.A., Portaro, F.C.V., Fernandes, B.L., Ianzer, D.A., Guerreiro, J.R., Gomes, C.L., Serrano, S.M.T., Nascimento, N., and Camargo, A.C.M. (2008). Tissue distribution in mice of BPP 10c, a potent proline-rich anti-hypertensive peptide of *Bothrops jararaca*. *Toxicon* 51, 515–523.
- Siódmiak, T., Ziegler-Borowska, M., and Marszałł, M.P. (2013). Lipase-immobilized magnetic chitosan nanoparticles for kinetic resolution of (R,S)-ibuprofen. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 94, 7–14.
- Skjot, M., De Maria, L., Chatterjee, R., Svendsen, A., Patkar, S.A., Ostergaard, P.R., and Brask, J. (2009). Understanding the plasticity of the alpha/beta hydrolase fold: lid swapping on the *Candida antarctica* lipase B results in chimeras with interesting biocatalytic properties. *Chembiochem* 10, 520–527.
- Soares, C.M., Teixeira, V.H., and Baptista, A.M. (2003). Protein structure and dynamics in nonaqueous solvents: insights from molecular dynamics simulation studies. *Biophys. J.* 84, 1628–1641.
- Sohma, Y., Yoshiya, T., Taniguchi, A., Kimura, T., Hayashi, Y., and Kiso, Y. (2007). Development of O - acyl isopeptide method. *Pept. Sci.* 88, 253–262.
- Soo, E., Salleh, A., Basri, M., Rahman, R.N.Z., and Kamaruddin, K. (2004). Response surface methodological study on lipase-catalyzed synthesis of amino acid surfactants. *Process Biochem.* 39, 1511–1518.
- Story, S.V., Grunden, A.M., and Adams, M.W.W. (2001). Characterization of an aminoacylase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J. Bacteriol.* 183, 4259–4268.
- Su, L.Y., Willner, D.L., and Segall, A.M. (2010). An antimicrobial peptide that targets dna repair intermediates in vitro inhibits *Salmonella* growth within murine macrophages. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 1888–1899.
- Suzuki, S., and Tateishi, M. (1981). Purification and characterization of a rat liver enzyme catalyzing N-deacetylation of mercapturic acid conjugates. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 9, 573–577.

- Syren, P.-O., Le Joubioux, F., Ben Henda, Y., Maugard, T., Hult, K., and Graber, M. (2013). Proton shuttle mechanism in the transition state of lipase-catalyzed N-acylation of amino alcohols. *Chemcatchem* 5, 1842–1853.
- Syrén, P.-O., and Hult, K. (2011). Amidases have a hydrogen bond that facilitates nitrogen inversion, but esterases have not. *ChemCatChem* 3, 853–860.
- Syrén, P.-O., Hendil-Forssell, P., Aumailley, L., Besenmatter, W., Gounine, F., Svendsen, A., Martinelle, M., and Hult, K. (2012). Esterases with an introduced amidase-like hydrogen bond in the transition state have increased amidase specificity. *ChemBioChem* 13, 645–648.
- Takakura, Y., Nakanishi, K., Suzuki, S., Nio, N., Koreishi, M., Imamura, K., and Imanaka, H. (2010). N $\epsilon$ -acyl-l-lysine-specific aminoacylase. Patent.
- Tanimoto, K., Higashi, N., Nishioka, M., Ishikawa, K., and Taya, M. (2008). Characterization of thermostable aminoacylase from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii*. *FEBS J.* 275, 1140–1149.
- Tawaki, S., and Klibanov, A. (1993). Chemoselectivity of enzymes in anhydrous media is strongly solvent dependent. *Biocatalysis* 8, 3–19.
- Teixeira, V., Feio, M.J., and Bastos, M. (2012). Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Prog. Lipid Res.* 51, 149–177.
- Tewari, Y.B. (1990). Thermodynamics of industrially-important, enzyme-catalyzed reactions. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 23, 187–203.
- Togashi, S.-I., Takahashi, N., Iwama, M., Watanabe, S., Tamagawa, K., and Fukui, T. (2002). Antioxidative collagen-derived peptides in human-placenta extract. *Placenta* 23, 497–502.
- Toogood, H.S., Hollingsworth, E.J., Brown, R.C., Taylor, I.N., Taylor, S.J., McCague, R., and Littlechild, J.A. (2002). A thermostable L-aminoacylase from *Thermococcus litoralis*: cloning, overexpression, characterization, and applications in biotransformations. *Extremophiles* 6, 111–122.
- Torre, O., Gotor-Fernández, V., and Gotor, V. (2006). Lipase-catalyzed resolution of chiral

- 1,3-amino alcohols: application in the asymmetric synthesis of (S)-dapoxetine. *Tetrahedron Asymmetry* *17*, 860–866.
- Trodler, P., and Pleiss, J. (2008). Modeling structure and flexibility of *Candida antarctica* lipase B in organic solvents. *BMC Struct. Biol.* *8*, 9.
- Tufvesson, P., Annerling, A., Hatti-Kaul, R., and Adlercreutz, D. (2007). Solvent-free enzymatic synthesis of fatty alkanolamides. *Biotechnol. Bioeng.* *97*, 447–453.
- Ueda, S., Kinoshita, M., Tanaka, F., Tsuboi, M., Shimizu, S., Oohata, N., Hino, M., Yamada, M., Isogai, Y., and Hashimoto, S. (2011). Strain selection and scale-up fermentation for FR901379 acylase production by *Streptomyces* sp. no. 6907. *J. Biosci. Bioeng.* *112*, 409–414.
- Uppenberg, J., Hansen, M.T., Patkar, S., and Jones, T.A. (1994a). The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure* *2*, 293–308.
- Uppenberg, J., Patkar, S., Bergfors, T., and Jones, T.A. (1994b). Crystallization and preliminary X-ray studies of lipase B from *Candida antarctica*. *J. Mol. Biol.* *235*, 790–792.
- Uppenberg, J., Öhrner, N., Norin, M., Hult, K., Kleywegt, G.J., Patkar, S., Waagen, V., Anthonsen, T., and Alwyn Jones, T. (1995). Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols. *Biochemistry (Mosc.)* *34*, 16838–16851.
- Uttamsingh, V., and Anders, M.W. (1999). Acylase-catalyzed deacetylation of haloalkene-derived mercapturates. *Chem. Res. Toxicol.* *12*, 937–942.
- Valivety, R., Jauregi, P., Gill, I., and Vulfson, E. (1997). Chemo-enzymatic synthesis of amino acid-based surfactants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* *74*, 879–886.
- Valivety, R.H., Halling, P.J., and Macrae, A.R. (1993). Water as a competitive inhibitor of lipase-catalysed esterification in organic media. *Biotechnol. Lett.* *15*, 1133–1138.
- Vallikivi, I., Fransson, L., Hult, K., Järving, I., Pehk, T., Samel, N., Tõugu, V., Villo, L., and Parve, O. (2005). The modelling and kinetic investigation of the lipase-catalysed

- acetylation of stereoisomeric prostaglandins. *J. Mol. Catal. B Enzym.* *35*, 62–69.
- Vaysse, L., Dubreucq, E., Pirat, J.-L., and Galzy, P. (1997). Fatty hydroxamic acid biosynthesis in aqueous medium in the presence of the lipase-acyltransferase from *Candida parapsilosis*. *J. Biotechnol.* *53*, 41–46.
- Vaysse, L., Ly, A., Moulin, G., and Dubreucq, E. (2002). Chain-length selectivity of various lipases during hydrolysis, esterification and alcoholysis in biphasic aqueous medium. *Enzyme Microb. Technol.* *31*, 648–655.
- Venkatachalam, C.M., Jiang, X., Oldfield, T., and Waldman, M. (2003). LigandFit: a novel method for the shape-directed rapid docking of ligands to protein active sites. *J. Mol. Graph. Model.* *21*, 289–307.
- Verheyen, A., Peeraer, E., Lambrechts, D., Poesen, K., Carmeliet, P., Shibuya, M., Pintelon, I., Timmermans, J.-P., Nuydens, R., and Meert, T. (2013). Therapeutic potential of VEGF and VEGF-derived peptide in peripheral neuropathies. *Neuroscience* *244*, 77–89.
- Veuillez, F., Deshusses, J., and Buri, P. (1999). Synthesis and characterization of an acylated di-peptide (Myr-Trp-Leu) with modified transmucosal transport properties. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* *48*, 21–26.
- Villeneuve, P. (2007). Lipases in lipophilization reactions. *Biotechnol. Adv.* *25*, 515–536.
- Vollenbroich, D., Özel, M., Vater, J., Kamp, R.M., and Pauli, G. (1997). Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*. *Biologicals* *25*, 289–297.
- Vongvilai, P., Linder, M., Sakulsombat, M., Svedendahl Humble, M., Berglund, P., Brinck, T., and Ramström, O. (2011). Racemase activity of *Burkholderia cepacia* lipase leads to dual-function asymmetric dynamic kinetic resolution of  $\alpha$ -aminonitriles. *Angew. Chem. Int. Ed.* *50*, 6592–6595.
- Wada, E., Handa, M., Imamura, K., Sakiyama, T., Adachi, S., Matsuno, R., and Nakanishi, K. (2002). Enzymatic synthesis of N-acyl-L-amino acids in a glycerol-water system using acylase I from pig kidney. *J. Am. Oil Chem. Soc.* *79*, 41–46.
- Wardenga, R., Lindner, H.A., Hollmann, F., Thum, O., and Bornscheuer, U. (2010).

- Increasing the synthesis/hydrolysis ratio of aminoacylase 1 by site-directed mutagenesis. *Biochimie* 92, 102–109.
- Wedberg, R., Abildskov, J., and Peters, G.H. (2012). Protein dynamics in organic media at varying water activity studied by molecular dynamics simulation. *J. Phys. Chem. B* 116, 2575–2585.
- Wehtje, E., Costes, D., and Adlercreutz, P. (1997). Enantioselectivity of lipases: effects of water activity. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 3, 221–230.
- Wescott, C., and Klibanov, A. (1994). The solvent dependence of enzyme specificity. *Biochim. Biophys. Acta-Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1206, 1–9.
- Xiao, Y., Wu, Q., Cai, Y., and Lin, X. (2005). Ultrasound-accelerated enzymatic synthesis of sugar esters in nonaqueous solvents. *Carbohydr. Res.* 340, 2097–2103.
- Xiong, J.P., Stehle, T., Zhang, R.G., Joachimiak, A., Frech, M., Goodman, S.L., and Arnaout, M.A. (2002). Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha V beta 3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science* 296, 151–155.
- Xu, T., Zhang, L., Wang, X., Wei, D., and Li, T. (2009). Structure-based substrate screening for an enzyme. *BMC Bioinformatics* 10, 257.
- Yasmin, T., Jiang, T., Han, B., Zhang, J., and Ma, X. (2006). Transesterification reaction catalysed by Novozym 435 in supercritical carbon dioxide. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 41, 27–31.
- Yokoigawa, K., Sato, E., Esaki, N., and Soda, K. (1994). Enantioselective synthesis of N-acetyl-l-methionine with aminoacylase in organic solvent. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42, 287–289.
- Zaks, A., and Klibanov, A.M. (1985). Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82.
- Zhai, H., Chang, Y.-C., Singh, M., and Maibach, H.I. (1999). In vivo nickel allergic contact dermatitis: human model for topical therapeutics. *Contact Dermatitis* 40, 205–208.
- Zhang, L., and Bulaj, G. (2012). Converting peptides into drug leads by lipidation. *Curr. Med.*

Chem. *19*, 1602–1618.

Zhang, D., Koreishi, M., Imanaka, H., Imamura, K., and Nakanishi, K. (2007). Cloning and characterization of penicillin V acylase from *Streptomyces mobaraensis*. *J. Biotechnol.* *128*, 788–800.

Zhang, L., Robertson, C.R., Green, B.R., Pruess, T.H., White, H.S., and Bulaj, G. (2009a). Structural requirements for a lipoamino acid in modulating the anticonvulsant activities of systemically active galanin analogues. *J. Med. Chem.* *52*, 1310–1316.

Zhang, L., Lee, H.-K., Pruess, T.H., White, H.S., and Bulaj, G. (2009b). Synthesis and Applications of polyamine amino acid residues: improving the bioactivity of an analgesic neuropeptide, Neurotensin. *J. Med. Chem.* *52*, 1514–1517.

Zhang, X., Adachi, S., Watanabe, Y., and Matsuno, R. (2005). Lipase-catalyzed synthesis of O-lauroyl l-serinamide and O-lauroyl l-threoninamide. *Food Res. Int.* *38*, 297–300.

Zweytick, D., Pabst, G., Abuja, P.M., Jilek, A., Blondelle, S.E., Andrae, J., Jerala, R., Monreal, D., Martinez de Tejada, G., and Lohner, K. (2006). Influence of N-acylation of a peptide derived from human lactoferricin on membrane selectivity. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* *1758*, 1426–1435.

## Résumé

---

Les peptides sont des molécules pouvant posséder une activité biologique intéressante (antibiotique, anti-oxydante, antivirale, anti-hypertensive...). Ce sont cependant des molécules difficiles à utiliser car elles possèdent un faible temps de demi-vie *in vivo* et sont peu bio-disponibles. Le greffage d'un acide gras permet de les protéger et d'accroître leur potentiel d'action. Cette réaction appelée acylation peut être catalysée par des enzymes. A l'heure actuelle, peu de recherches sont faites sur l'acylation de peptides par voie enzymatique et sur la recherche de nouveaux biocatalyseurs adaptés pour cette réaction. Les objectifs de cette thèse ont été, dans un premier temps, de comprendre les mécanismes de la sélectivité d'acylation de peptides de la lipase B de *Candida antarctica* par une approche de modélisation moléculaire combinant docking et dynamique moléculaire, couplée à une approche expérimentale. Cette étude a permis d'identifier des interactions enzyme-substrats impliquées dans la sélectivité enzymatique et a permis de construire un modèle expliquant la régio- et chimio-sélectivité de l'acylation peptidique catalysée par cette enzyme. Dans un deuxième temps, une étude préliminaire a été menée afin d'identifier de nouvelles enzymes de type acylases présentes dans des surnageants de culture de différentes espèces de *Streptomyces*. Ces enzymes sont capables de catalyser des réactions d'acylation de peptides en milieux aqueux. Une méthode de semi-purification a été établie et une étude comparative a été menée sur la sélectivité d'acylation de la lipase B de *C. antarctica* et celle de nouvelles enzymes de type aminoacylases présentes dans un extrait protéique de surnageant de culture de *Streptomyces ambofaciens*. Ces nouvelles enzymes présentent une spécificité différente de celle de la lipase B de *C. antarctica*, permettant notamment, une acylation des acides aminés sur leur fonction amine en position  $\alpha$ . Une caractérisation partielle des activités amino-acylase du surnageant de culture de *S. ambofaciens* a été réalisée. Dans une troisième et dernière partie, une comparaison des séquences génétiques a été réalisée entre *Streptomyces mobaraensis* et *S. ambofaciens* afin d'identifier les gènes codant pour les acylases découvertes chez *S. ambofaciens*. Des mutants de *S. ambofaciens* délétés pour ces gènes ont été construits et la fonctionnalité des enzymes codées par ces gènes a été vérifiée ; enfin, une expression hétérologue de l' $\epsilon$ -lysine acylase a été initiée.

## Abstract

---

Peptides exhibit various beneficial effects such as antioxidant, anti-hypertensive, neuroprotective, antiviral or antimicrobial activities. However, their use can be limited by their short half-life and their low biological availability. One solution to overcome these drawbacks is the acylation of peptides with fatty acids. This reaction called acylation can be catalyzed using enzymes. To date, very few studies focus on enzymatic acylation of peptides and on finding new enzymes catalyzing this reaction. The objectives of this work were, in a first time, to understand the selectivity mechanisms of the lipase B of *Candida antarctica* for peptides acylation combining experimental and molecular modeling approaches. This study highlighted enzyme/substrate interactions involved in the enzymatic selectivity and a model explaining the chemo- and regio-selectivity of this enzyme for peptide acylation reactions was built. In a second time, a preliminary study was carried out in order to identify new aminoacylase enzymes produced in the culture supernatant of various species of *Streptomyces*. These enzymes are able to catalyze acylation of peptides in aqueous media. A partial purification method was set and a comparative study was performed on the selectivity of *C. antarctica* lipase B and that of the new aminoacylases discovered in the culture supernatant of *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877. These enzymes presented a selectivity different from *C. antarctica* lipase B allowing the acylation of the N-terminal amino group of amino acids or peptides. A partial description of the aminoacylase activity of the supernatant crude extract of *S. ambofaciens* was performed. In a third and final part, a comparison of sequences of aminoacylases from *Streptomyces mobaraensis* with the genome of *S. ambofaciens* ATCC 23877 was performed in order to identify genetic sequences encoding the new discovered aminoacylases from *S. ambofaciens* ATCC 23877. Each identified gene was deleted to correlate it with the aminoacylase activity observed in the crude extract of *S. ambofaciens*. Lastly, a heterologous expression of the  $\epsilon$ -lysine acylase was initiated.